

Masteroppgave

Masterstudium i Biomedisin
Mai 2020

KRAS-genmutasjonsanalyse som førstevalg innen
molekylærdiagnostikk ved adenokarsinom i lunge

Janne Kapstad
MABIO5900
60 studiepoeng

Fakultet for helsevitenskap

OSLO METROPOLITAN UNIVERSITY
STORBYUNIVERSITETET

KRAS-genmutasjonsanalyse som førstevalg innen molekylærdiagnostikk ved adenokarsinom i lunge

av

Janne Kapstad

Masterstudium i biomedisin

Masteroppgave, 60 sp

Mai 2020

Fakultet for helsevitenskap, Institutt for naturvitenskapelig helsefag

OsloMet – storbyuniversitet

Masteroppgave utført ved Avdeling for klinisk patologi,

Drammen sykehus, Vestre Viken HF

Veileder: Odd Terje Brustugun

Biveileder: Heidemarie Svendsen

OSLOMET



Forord

Arbeidet med denne masteroppgaven har foregått ved Avdeling for klinisk patologi i Drammen, Vestre Viken HF. Molekylærbiologiske analyser er ikke en del av våre rutiner, men vi er i oppstartfasen. Jeg, med min tidligere erfaring innenfor klinisk cytologi, synes det har vært spennende men også utfordrende å begi seg ut på et nytt fagfelt som molekylærbiologi er for meg.

Jeg vil rette en stor takk til de som gjorde gjennomføringen av oppgaven mulig. Avdelingssjef Bettina Casati som tillot at dette kunne gjennomføres på avdelingen.

Jeg vil også rette en stor takk til firmaet Biocartis som har vært med på å støtte dette prosjektet delvis finansielt ved blant annet å låne ut flere Idylla analysemaskiner.

Min veileder, Odd Terje Brustugun, som med sin enorme kunnskap innenfor temaet lungekreft har vært til uvurderlig hjelp. Han var den som foreslo oppgaven for meg. Den var mer utfordrende enn jeg hadde forestilt meg.

Og så vil jeg takke min biveileder, Heidemarie Svendsen, for hjelp med å utføre analysene, for din tålmodighet, hjelpsomme og kunnskapsrike innenfor fagfeltet molekylærbiologi.

Takk til min kjære familie hjemme som alltid har vært støttende til at jeg til tider har blitt sittende å arbeide med prosjektet i helger og andre ferieperioder.

Sandefjord, 15. mai 2020

Janne Kapstad

Sammendrag

Lungekreft er kreftformen med høyest dødelighet i Norge. Behandlingsmulighetene har tidligere vært kirurgi, stråling og cellegift. De senere år har ny behandling i form av immunterapi og målrettet behandling mot genmutasjoner i svulsten bedret lungekreftprognosen, spesielt ved undertypen kalt adenokarsinom. Den målrettede behandlingen rettet mot EGFR, ALK og ROS1 har ført til behov for rutinemessig undersøkelse av disse genmutasjonene ved adenokarsinom i lunge. Det oppdages stadig flere biomarkører og utvikles flere målrettede behandlinger som kan bedre overlevelse og pasientens livskvalitet. Dagens rutine ved internt laboratorium ved Vestre Viken helseforetak innebærer å sende prøver for analyse av *EGFR*-genmutasjon ved adenokarsinom i lunge til eksternt laboratorium, Oslo universitetssykehus.

Vi ønsket å studere analysesvartiden og den eventuelle kostnadmessige besparelsen ved å analysere 33 prospektive biopsier parallelt ved internt og eksternt laboratorium. Analysesvartiden ble registrert fra prøvetakingsdato til analysesvar forelå fra internt og eksternt laboratorium. Mann-Whitney U test ble brukt for å beregne om det var signifikant forskjell på analysesvartidene. Vi studerte fordelingen av de ulike genmutasjonene ved å analysere 75 retrospektive og 33 prospektive biopsier fra adenokarsinom i lunge med en helautomatisk multipleks real-time PCR-metode fra Biocartis, Idylla™ mutasjonstest. Ved innføring av genmutasjonsanalyser på internt laboratorium ønsket vi å studere to metoder, hvor den ene metoden var med *KRAS*-genmutasjonsanalyse som førstevalg og den andre metoden var uten *KRAS*-genmutasjonsanalyse. Ved metode med *KRAS*-mutasjonsanalyse og ved positivt resultat på *KRAS*-mutasjonstest var videre analyser unødvendige da genmutasjon i *KRAS* ekskluderer tilstedeværelse av andre såkalte drivermutasjoner. Ved negativt resultat på *KRAS*-mutasjonsanalyse analyseres det for mutasjon i *EGFR*, og ved negativt resultat analyseres det videre for mutasjon i *BRAF* og proteinuttrykk av ALK og ROS1. Ved positivt resultat på *EGFR*-mutasjonstest stanses videre analyser av prøven da *EGFR*-mutasjonen også utelukker tilstedeværelse av andre drivermutasjoner. Metoden som utelukket *KRAS*-mutasjonsanalyse innebar å analysere for genmutasjon i *EGFR* og *BRAF*, og for proteinuttrykk i ALK og ROS1 på alle biopsier fra adenokarsinom i lunge. Det ble beregnet kostnader ved bruk av metodene med og uten *KRAS*-genmutasjonstest.

Studiet av analysesvartid viser at det er kostnads- og tidsbesparende å analysere på internt laboratorium. Resultatene viser en frekvens av *KRAS*-genmutasjon på 41%, og en frekvens på 12% *EGFR*-mutasjonspositive ved adenokarsinom i lunge i vår pasientgruppe. *KRAS*-mutasjon av typen G12C utgjorde 45% av totalt antall *KRAS*-mutasjoner. Det kan se ut til å være en høyere andel *KRAS*-genmutasjoner hos kvinner, men ved undersøkelse med kjikvadrattest er det ikke signifikant sammenheng mellom *KRAS*-mutasjonspositivitet og kjønn. Innføring av metode hvor *KRAS*-genmutasjonsanalyse er førstevalg er hensiktsmessig da dette er kostnadsbesparende. I tillegg er *KRAS*-mutasjonsbestemmelse gunstig siden målrettet behandling mot *KRAS*-proteinet med mutasjon av typen G12C er under utprøving og viser til gode resultater. *BRAF*-genmutasjonsanalyse bør også innføres da det finnes god behandling for denne, selv om denne målrettede medisinen enda ikke er tilgjengelig for lungekreftpasienter i Norge.

Abstract

Lung cancer is the cancer with the highest fatal outcome in Norway. The treatment has previously been surgery, radiation and chemotherapy. In recent years, new treatment in the form of immunotherapy and targeted treatment against gene mutations in the tumour has improved the prognosis of patients with lung cancer especially of type adenocarcinoma. Treatment targeting EGFR, ALK and ROS1 has led to routine examination of these gene mutations in adenocarcinoma of the lung. More and more biomarkers are being discovered and more targeted treatments are being developed that can improve survival and quality of life. Today's routine at the internal laboratory at Vestre Viken Health Trust involves sending lung adenocarcinoma samples for analysis of *EGFR* gene mutation to external laboratory, at Oslo University Hospital. We wanted to study the analysis response time and the potential cost savings by analysing 33 prospective biopsies in parallel at the internal and external laboratory. The analysis response time was recorded from the date of sampling to the time of available analysis result from the internal and external laboratory. The Mann-Whitney U test was used to calculate whether there was a significant difference in the analysis response times. We studied the distribution of the different gene mutations by analysing 75 retrospective and 33 prospective biopsies from adenocarcinoma of the lung using a fully automatic multiplex real-time PCR method from Biocartis, Idylla™ mutation test. When introducing gene mutation analyses in internal laboratory, we wanted to study two approaches. The first approach was with *KRAS* gene mutation analysis as a first step and the second was without mutation analysis of *KRAS*. Presence of a mutation in *KRAS* indicates absence of other driver mutations—they are mutually exclusive. Thus, in the method including *KRAS* mutation analysis further analyses were unnecessary if a *KRAS* mutation was detected. In case of negative *KRAS* mutational result, *EGFR* gene was analysed for mutations and if negative further analyses for gene mutation in *BRAF* and protein expression of ALK and ROS1 were performed. If an *EGFR* mutation was detected, further analysis of the sample was stopped as an *EGFR* mutation also excludes the presence of other driver mutations. The method that excluded *KRAS* mutation analysis involved testing all samples for gene mutations in *EGFR* and *BRAF*, and for protein expression in ALK and ROS1.

Costs were calculated using the methods with or without the *KRAS* gene mutations test. The study of analysis response time shows that it is cost- and time-saving to analyse in internal laboratory. The results show frequency of *KRAS* gene mutation in 41% of adenocarcinoma in our patient group, and 12% had an EGFR gene mutation. *KRAS* gene mutation of type G12C amounted to 45% compared to the total number of *KRAS* gene mutations. There may appear to be a higher proportion of *KRAS* gene mutations in women, but when examining with the Chi-square test there is no significant association with sex. Introducing a method where *KRAS* mutation analysis is the first choice is appropriate as it is cost-saving, the patient also gets mutation status on *KRAS* and there is an advantage as targeted treatment against the *KRAS* mutation type G12C is in clinical trials with encouraging albeit limited data. *BRAF* gene mutation analysis should also be introduced as there are medicines showing high response rate also in this subset, although this targeted medication is not yet available to lung cancer patients in Norway.

Liste over forkortelser

AKT	Proteinkinase B
ALK	Anaplastisk lymfomkinase (Anaplastic lymphoma kinase)
ATP	Adenosintrifosfat (Adenosine triphosphate)
Bp	Basepar
BRAF	B-raf protoonkogen, serin/treonin-kinase
CD74	Cluster of differentiation 74
cDNA	Komplementær-DNA (Complementary DNA)
Cq	Kvantifikasjonssyklus (Quantification cycle)
ctDNA	Sirkulerende tumor DNA (Circulating tumor DNA)
dATP	Deoksyadenosintrifosfat (Deoxyadenosine triphosphate)
dCTP	Deoksyctosintrifosfat (Deoxycytosine triphosphate)
ddNTP	Dideoksynukleotidtrifosfat (Dideoxynucleotide triphosphate)
ddPCR	Droplet Digital Polymerase Chain Reaction
df	Frihetsgrader (Degrees of freedom)
dGTP	Deoksyguanosintrifosfat (Deoxyguanosine triphosphate)
DNA	Deoksyribonukleinsyre (Deoxyribonucleic acid)
dNMP	Deoksyribonukleinsyremonofosfat (Deoxyribonucleoside monophosphate)
dTTP	Deoksytymintrifosfat (Deoxythymine triphosphate)
EGF	Epidermal vekstfaktor (Epidermal growth factor)
EGFR	Epidermal vekstfaktorreseptor (Epidermal growth factor receptor)
EML-4	Echinoderm microtubuli associated protein like-4
ERBB 1-4	HER 1-4 (Erytroblastisk onkogen B 1-4)
ERK	Ekstracellulær signalregulert kinase (Extracellular signal regulated kinase)
FAM	6-fluorescein amidite
FISH:	Fluoresens in situ hybridisering
FFPE	Formalinfiksert parafininnstøpt (Formalin-fixed paraffin-embedded)
G-protein	Guanin nukleotidbindende proteiner

GAP	GTPase aktiverende protein guanin
GDP	Guanosindifosfat (Guanosine diphosphate)
GEF	Guanin nuklotid utvekslingsfaktor (Guanine nucleotide exchange factor)
GRB2	Vekstfaktorreseptor protein 2 (Growth factor receptor protein 2)
GTP	Guanintrifosfat (Guanosine triphosphate)
GTPase	Guanosintrifosfat enzyme
HE	Hematoksylin og eosin
HER 1-4	Human epidermal vekstfaktorreseptor 1-4 (ERBB 1-4)
HEX	Hexachlorofluoroscein
HIFU	Høy intensitet fokusert ultralyd
HIV	Human immunsviktsyndrom virus (Human immunodeficiency virus)
HPV	Human papillomavirus
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogen homolog
IHK	Immunhistokjemi
ISH	In situ hybridisering
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MAP	Mitogenaktivert protein (Mitogen-activated protein)
MAPK	Mitogenaktivert proteinkinase (Mitogen-activated protein kinase)
MEK	MAPKK (Mitogenaktivert proteinkinase-kinase)
MET	Hepatocytt vekstfaktorreseptor
MNAzyme	Multikomponent nukleinsyreenzymer
mRNA	Budbringer ribonukleinsyre (Messenger ribonucleic acid)
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NGS	Neste Generasjons Sekvensering (Next Generation Sequencing)
NRAS	Neuroblastoma rat sarcoma viral onkogen homolog
NSCLC	Ikke-småcellet lungekreft (Non Small-Cell Lung Cancer)
NTRK	The neurotrophic receptor tyrosine kinase
OUS	Oslo universitetskehus
P	Fosfat (Phosphate)
PCR	Polymerase kjedereaksjon (Polymerase Chain Reaction)
PD-1	Programmert celledød protein 1 (Programmed cell death protein 1)

PDL-1	Programmert celledødsligand 1 (Programmed cell death ligand 1)
PI3-K	Fosfoinositid 3-kinase (Phosphoinositide 3-kinase)
PI3KCA	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat 3-kinase catalytic subunit alfa isoform
PPi	Pyrofosfat (Pyrophosphate)
PVO	Pasientvernombudet
REK	Regionale komiteer for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk
RNA	Ribonukleinsyre (Ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease (Ribonuclease)
RNaseP	Ribonuklease protein
ROS 1	Protoonkogen, reseptor tyrosinkinase (c-ROS oncogene 1)
RT-PCR	Revers transkriptase polymerase kjedereaksjon
RTK	Tyrosinkinasereseptor (Receptor tyrosine kinase)
SD	Standardavvik (Standard deviation)
Sig.	Signifikanse (Significance)
SMAD4	Mothers against decapentaplegic homolog 4
SNP	Single nucleotid polymorfism
SOS	Son of sevenless
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TGF-α	Transformerende vekstfaktor α (Transforming growth factor-α)
TKI	Tyrosinkinasehemmer (Tyrosin kinase inhibitor)
TNM	Klassifikasjonssystem basert på svulst (T, tumor), lymfeknute (N, node) og fjernspredning (M, metastase)
TP53	Tumor protein 53
VV HF	Vestre Viken Helseforetak
WT	Villtype (Wild type)

Innhold

Forord	I
Sammendrag	II
Abstract	III
Liste over forkortelser	IV
1 Innledning	1
1.1 Kreft.....	1
1.2 Lungekreftinsidensen, årsak og inndeling i Norge og verden	1
1.3 Lungekreft, stadieinndeling, prognose og behandling.....	2
1.4 Signalveien MAP-kinase	4
1.5 De hyppigst påviste genmutasjonene ved adenokarsinom i lunge.....	6
1.5.1 <i>KRAS</i>	6
1.5.2 <i>EGFR</i>	8
1.5.3 <i>BRAF</i>	10
1.5.4 <i>ALK</i>	10
1.5.5 <i>ROS1</i>	11
1.5.6 <i>RET</i>	12
1.5.7 <i>MET</i> og andre genmutasjoner og proteinuttrykk.....	12
1.6 Metoder for påvisning av genmutasjoner og proteinuttrykk	13
1.6.1 Immunhistokjemi.....	14
1.6.2 In situ hybridisering (ISH)	14
1.6.3 PCR.....	15
1.6.5 Real-time PCR	15
1.6.6 DNA-sekvensering, Sangers metode	16
1.6.7 Pyrosekvensering.....	17
1.6.8 NGS	18
1.7 Flytende biopsier	19
2 Formål med oppgaven	21
3 Materialer og metoder	22
3.1 Biocartis Idylla™ mutasjonstest.....	22
3.1.1 Genmutasjonstest med Biocartis Idylla™ <i>KRAS</i>	25
3.1.2 Genmutasjonstest med Biocartis Idylla™ <i>EGFR</i>	28
3.1.3 Genmutasjonstest med Biocartis Idylla™ <i>BRAF</i>	32

3.2 Statistiske metoder	35
3.3 Kostnadsberegninger.....	36
4 Resultater	38
4.1 Analysesvartider på interne i forhold til eksternt sendte prøver.....	38
4.2 Frekvens og relativ frekvens av genmutasjoner i <i>KRAS</i> og <i>EGFR</i> ved adenokarsinom i lunge....	44
4.3 Kostnader	51
5 Diskusjon	54
6 Konklusjon	58
7 Kilder	59
Vedlegg	
Vedlegg 1. Oversikt over antall dager før analysesvar foreligger.....	
Vedlegg 2. Oversikt over antall dager før analysesvar med dato for analysebestilling som utgangspunkt.....	
Vedlegg 3. Analyseresultater av retrospektive FFPE-vev.....	
Vedlegg 4. Analyseresultater av prospektive FFPE-vev.....	
Vedlegg 5. Utstyrliste.....	
Vedlegg 6. Statistiske resultater fra sammenligning av analysesvartider med Mann-Whitney U test....	
Vedlegg 7. Statistiske resultater fra sammenhengsstudie av <i>KRAS</i> -mutasjonspositive og kjønn ved hjelp av kjiqvadrattest.....	

1 Innledning

1.1 Kreft

Kreft er en gruppe sykdommer som er karakterisert ved unormal celleproliferasjon, multiple genetiske forandringer, heterogenitet og formasjon av tumor. Tumorer som er ondartet skiller seg fra godartede tumorer ved at de har evnen til å spre seg, metastasere. Ved metastasering spres tumorcellene fra primærorganet med blod- eller lymfebaner og invaderer annet vev og organer (1). Dette kan føre til død for pasienten. Behandlingsmetodene i dag er kirurgi, strålebehandling, cellegift, immunterapi og målrettet behandling mot genmutasjonen i svulsten. Molekylærbiologiske undersøkelser er nødvendige for å gi den beste behandlingen til pasienten. Presisjonsmedisin eller persontilpasset medisin er tilpasset de biologiske forhold hos hver enkelt pasient og brukes ved forebygging, diagnostikk, behandling og oppfølging av pasienten (2, 3)

1.2 Lungekreftinsidensen, årsak og inndeling i Norge og verden

I henhold til Kreftregisteret fikk 3351 personer lungekreft i Norge i 2018, som er det høyeste antallet kreftregisteret har registrert og med en økning i antall kvinner som får sykdommen. Antall kvinner som fikk sykdommen var 1674 og antall menn var 1677. Insidensraten pr. 100 000 er 56 for kvinner og 63 for menn (4).

Man antar at 8 av 10 som får lungekreft er røykere, og lungekreft er dermed en sykdom som kan forebygges i mange av tilfellene.

Dødsfall grunnet lungekreft var i 2018 1037 kvinner og 1164 menn (5). Den akkumulerte risikoen for å utvikle lungekreft frem til 75 år var i perioden 2014-2018 3,7% for kvinner og 3,9% for menn. Median alder ved diagnostetidspunkt for begge kjønn i 2018 var 71 år. 5 års relativ overlevelse for kvinner var i perioden 1978-1982 10,6%, og i perioden 2014-2018 26,2%. 5 års relativ overlevelse for menn var i perioden 1978-1982 6,6%, og i 2014-2018 19,4% (4).

Antall menn og kvinner som får lungekreft har økt veldig etter krigen, spesielt stor har økningen vært for kvinner med en tidobling av antall tilfeller fra 1950 til 2017. Også når vi tar hensyn til økning av folketall og antall eldre. Lungekreft er nå den enkeltstående kreftformen som tar liv av flest mennesker i Norge, og stod i 2012 for 22% av dødsfallene relatert til kreft

her i landet (6). Prognosen er, som for alle kreftsykdommer, bedre om den oppdages tidlig. Årsaken til at så mange dør av sykdommen er at den ofte oppdages for sent, og det er da kun lindrende og/eller livsforlengende behandling å tilby. For det mindretallet som kan behandles kirurgisk eller med høydosert strålebehandling er overlevelsen betydelig bedre (4).

Hovedårsaken til lungekreft er røyking (7). Ioniserende radongass (8) som kan være i berggrunnen noen steder i Norge gir også økt risiko for å utvikle lungekreft, og spesielt for røykere da radongassen kan knytte seg til partikler i tobakksrøyken. Andre risikofaktorer for lungekreft er blant annet asbest, nikkel- og kromeksponering, luftforurensing, dieseleksos og passiv røyking (4). Det er også påvist økt risiko ved bruk av husholdningsbrensel som olje-, kull- og vedfyring. Infeksjoner med human papilloma virus (HPV), human immunsviktvirus (HIV), *Helicobacter pylori*, tuberkulose og inflammatoriske sykdommer som astma har også blitt assosiert med lungekreft (8). HPV er sjelden påvist ved lungekreftsvulster i Norge (9).

Lungekreft deles inn i småcellet og ikke-småcellet type. Ikke-småcellet lungekreft (NSCLC) representerer ca. 85% av all lungekreft og inndeles igjen i plate-, adeno- og storcellet karsinom (10-13). Av NSCLC er 25-30% av type plateepitelkarsinom og 70-75% er ikke-plateepitelkarsinom, hvor adenokarsinom er klart største andel (14). Adenokarsinom utgjør dermed ca. 50%, av alle typer lungekreft med litt høyere andel hos kvinner enn menn (6).

I den vestlige verden er ca. 15-20% av lungekrefttilfellene ikke tobakksassosiert (15). Det er store epidemiologiske forskjeller relatert til lungekreftrisiko hos aldri-røykere og i forhold til kjønn globalt. Sør-Asia og Sør-Amerika hvor andelen kvinner med lungekreft som er aldri røykere er fra 60-80%, og i Europa er andelen ca. 20%. Tilsvarende for menn i Sør-Asia, Sør-Amerika og Europa er respektive 15, 11 og 2% aldri-røykere med lungekreft. Globalt er det en høyere andel kvinner enn menn som får lungekreft som ikke er relatert til røyking (8).

1.3 Lungekreft, stadieinndeling, prognose og behandling

Prognosen og behandlingen ved NSCLC er avhengig av stadiet ved diagnosetidspunktet. Stadiet inndeles etter den internasjonale tumor-node-metastasis (TNM) klassifiseringen. Primær tumor (T) beskrives etter størrelse og grad av utbredelse. Regionale lymfeknuter (N) angis utfra lokalisering av lymfeknuter som er affisert, og det registreres fravær eller tilstedeværelse av metastaser (M). Dette klassifiseres igjen inn i stadiet I-IV, hvor stadiet I er

uten metastaser og uten lymfeknuter med påviste maligne celler. Ved stadiet IV er det påvist metastaser og det kan være påvist maligne celler i lymfeknuten (16, 17).

Ved stadium I-II og i blant IIIA kan svulsten ofte fjernes kirurgisk. Stråleterapi kan være aktuelt for de som ikke tåler operasjon i stadium I-II, samt sammen med kjemoterapi i stadium III. Ved stadier som ikke er kurerbare kan målrettet behandling eventuell immunterapi forlenge levetiden. Inntil for få år siden var det kun cellegift, med begrenset effekt som var tilgjengelig. De senere år har det kommet nye behandlingsmuligheter med til dels langvarig effekt for denne pasientgruppen (18, 19).

Målrettet behandling innebærer å på ulike måter hemme signalering som resulterer i økt cellevekst, proliferasjon og udødeliggjøring av kreftceller som følge av en mutasjon. En mutasjon i et gen som omdannes til et onkogen og forårsaker svulsten betegnes som en drivermutasjon og ekskluderer som oftest andre mutasjoner. Hemming av disse onkogener reduserer kreftutviklingen og målrettet behandling mot relevante mål i signalveien er mindre toksisk for pasienten og kan ha god effekt (20).

Ved overuttrykk av programmert døds-ligand-1 (PDL-1) ved lungekreft kan det være hensiktsmessig å behandle med immunterapi, dette avhenger også av tilstedeværelse av genmutasjonsstatus. PDL-1, er et transmembran protein, og programmert celledød protein (PD-1) er et protein på celleoverflaten som regulerer immunrespons. Ved å hemme PD-1 vil immunsystemet aktiveres ved at aktiverte T-celler gjenkjenner og dreper tumorceller og oppretter immunovervåking, ved å aktivere fosfoinositide 3-kinase (PI3-K)/AKT og RAS/MEK/ekstracellulær signalregulert kinase (ERK) signalvei (21, 22). Høyt PD-L1 uttrykk ses oftere hos røykere (8).

Immunterapi med PD-1-hemmer, med eller uten cellegift samtidig kan gis til pasienter med avansert ikke-småcellet lungekreft (NSCLC). Ved analyseresultat fra immunhistokjemisk undersøkelse hvor PD-L1 > 50% kan immunterapi gis alene i førstelinje, mens ved < 50% kombineres kjemoterapi og immunterapi. Det er flere studier som viser at pasienter med epidermal vekst faktor reseptor (*EGFR*)- eller anaplastisk lymfom kinase (*ALK*)-mutasjoner har bedre nytte av målrettet behandling mot genmutasjonen, derfor gis ikke immunterapi i førstelinje til disse pasientene (23).

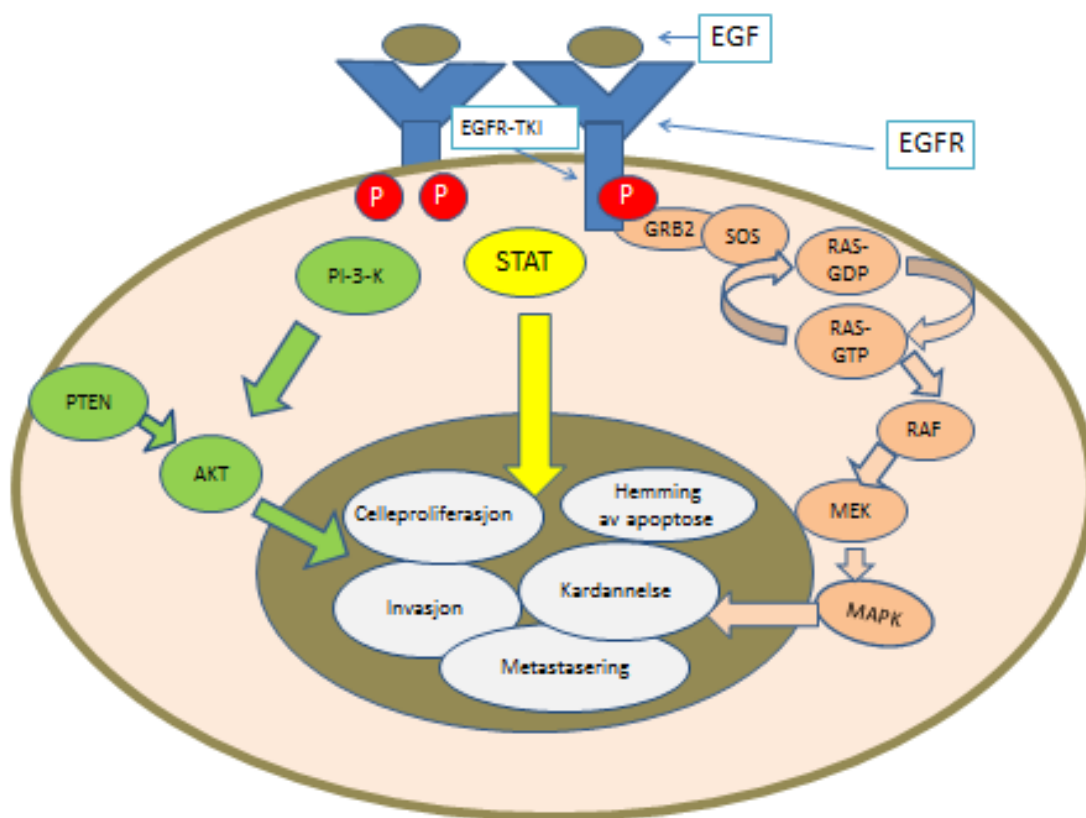
Metastatisk lungekreft er kjent for å være en dødelig sykdom, der i praksis ingen overlevde mer enn fem år fra diagnosetidspunkt. Vi ser nå en økning i antall overlevelsesår hvor mange overlever fem år med metastatisk lungekreft.

Måltrettet terapi mot genmutasjoner er sannsynlig en av årsakene til dette. Det indikerer at det kan være mulig at metastaserende lungekreft kan bli en kronisk sykdom. Basert på nylig kunnskap viser det seg at opptil 50% av NSCLC tilfeller har genetiske avvik. Slike genmutasjoner som innebærer punktmutasjoner, delesjoner, insersjoner, translokasjoner og amplifikasjoner er som oftest ved adenokarsinomer (15). De fleste genmutasjoner ved adenokarsinom i lunge fører til endringer i signalveien mitogenaktivert protein (MAP)-kinase (19, 24, 25).

1.4 Signalveien MAP-kinase

EGFR hører inn under reseptor tyrosinkinase (RTK)-familien, som aktiverer proteinet tyrosinkinase ved binding av liganden epidermal vekst faktor (EGF) til reseptoren. Videre fosforyleres og aktiveres flere signalveier og proteiner nedstrøms fra denne reseptoren som RAS/mitogen aktivert protein (MAP)-kinase og fosfoinositide 3-kinase (PI3-K) signalveien. Dette fører til fosforylering av genregulatoriske og andre proteiner (24).

Ved hemming av tyrosinkinase med tyrosinkinase hemmer (TKI) vil signaleringen nedstrøms stoppe og hindre videre transkripsjon, som igjen fører til nedsatt celleproliferasjon, cellevekst og overlevelse (26, 27, 28).



Figur 1. Bildet illustrerer aktivering av EGFR ved binding av ligand, som videre aktiverer ved fosforylering (fosfat, P) av proteiner nedstrøms via flere signalveier. Transkripsjonsfaktorer aktiveres og resulterer i økt celleproliferasjon, vekst, overlevelse, angiogenese, invasjon og metastasering. Ved målrettet behandling med tyrosinkinasehemmer (TKI) vil videre signalering fra EGFR stanse og videre transkripsjon forhindres. Bildet er eget.

Alle RTK har tre essensielle komponenter: et ekstracellulært domene som består av et ligandbindende sete, en enkel hydrofobisk transmembran alfahelix, og et cytosolisk segment som inkluderer et domene med et protein som har tyrosinkinaseaktivitet. De fleste RTK er monomeriske, og ligandbinding til det ekstracellulære domene induserer dannelse av reseptordimere. Dannelsen av funksjonelle dimere er nødvendig trinn i aktivering av RTK.

I den hvilende, ustimulerte (ingen ligand bundet) tilstand, er kinaseaktiviteten til RTK lav. Binding av ligand fører til en konformasjonsendring som promoterer dimerisering av det ekstracellulære domenet til RTK. Aktiveringen av RTK fører til at de to enhetene fosforylerer hverandres tyrosindel i aktiveringsdelen i det cytosoliske domene, og endrer dets katalytiske aktivitet. Dannelse av fosfotyrosin fungerer da som et dokkingsete for ulike signaloverføringsproteiner (29, s.724).

RTK aktiverer RAS/MAP-kinase signalvei. RAS er et protein som hører til guanosintrifosfat enzym (GTPase) superfamilie og er en intracellulær GTPase som reagerer nedstrøms fra RTK. RAS bytter mellom en inaktiv guanosindifosfat (GDP) bundet form og en aktiv guanosintrifosfat (GTP) bundet form. Disse skiftene krever assistanse av to proteiner, guanin nukleotid utvekslingsfaktor (GEF) og et GTPase-aktiverende protein guanin (GAP) (29, s.734).

RTK er koblet direkte til RAS via to proteiner, vekstfaktorreseptor protein 2 (GRB2) og son of sevenless (SOS), hvor SOS har GEF aktivitet. Ved fosforylering etter aktivering av RTK bindes proteinet med GEF aktivitet til RAS. Dette fører til en konformasjonsendring som tillater løsrivelse av GDP og binding av GTP og dermed dannelse av aktiv RAS.

Aktivert RAS trigger en kinasekaskade hvor RAF, MEK og MAP-kinase er sekvensielt fosforylert og dermed aktivert. Aktivert MAP-kinase translokerer til nukleus hvor det aktiveres mange transkripsjonsfaktorer.

Aktivering av MAP-kinase signalveien etter stimulering av vekstfaktor reseptor fører til fosforylering av transkripsjonsfaktorer. Disse danner et kompleks som promoterer transkripsjon av forskjellige tidlig respons gener. Blant målproteinene for MAP-kinasesignalveien er transkripsjonsfaktorer som regulerer uttrykk av proteiner med viktig rolle i cellesyklus og differensiering (29, s.737-741).

Mange RTK og deres ligander er identifisert i kreft hos menneske, i mutert form som stimulerer proliferering selv uten tilstedeværelse av vekstfaktor. Mutasjonen lurer reseptoren til å oppføre seg som om liganden er til stede hele tiden slik at reseptoren er konstant aktiv. En mutasjon i *RTK*, *RAS* eller et protein i MAP-kinase signaleringskaskaden er funnet i nesten alle typer av humane tumorer (29).

1.5 De hyppigst påviste genmutasjonene ved adenokarsinom i lunge

1.5.1 *KRAS*

Kirsten rat sarcoma viral onkogen homolog (*KRAS*) er et onkogen lokalisert på kromosom 12 ved posisjon 12.1 (30, 31). *KRAS* er medlem i *RAS*-familien av membran assosiert G-proteiner og koder for proteiner med GTPase aktivitet. Aktivert *KRAS* bytter GDP med GTP noe som fører til konformasjonsendringer i *KRAS*, og videre aktivering av flere mulige

nedstrøms signalveier som kontrollerer proliferasjon, apoptose, motilitet og overlevelse (19, 31).

RAS-gen familien består av *HRAS*, *NRAS* og *KRAS* som til sammen er mutert i en tredel av kreft hos mennesket. *NRAS* er mutert i færre enn 10% av alle tumorer, men ved høyere frekvens ved melanomer og enkelte leukemier. *HRAS* er mutert med relativ lav frekvens alle steder, og primært i plateepitelkarsinom. *KRAS* er mutert hos nesten 25% av alle typer kreft hos mennesket, og hovedsakelig ved adenokarsinom (32).

KRAS-onkogenet står for over 90% av *RAS*-mutasjonene i NSCLC. *KRAS*-mutasjonene har blitt detektert hos ca. 30% (8, 15, 33) av NSCLC, med størstedelen i ekson 2 (g12, g13 og q61) (34). Mutasjon i kodon 12 representerer over 90% av mutasjoner i *KRAS* ved NSCLC (34), og mutasjonstypene G12C, G12D og G12V dominerer og er ansvarlig for det konstant aktive enzymet (12). *KRAS*-genmutasjoner er nesten aldri til stede samtidig med andre drivermutasjoner som *EGFR* og *ALK* og disse er derfor gjensidig ekskluderende (27), og det er nok med mutasjon et sted for å gjøre cellen uavhengig av eksterne vekststimuli. Det antas derfor at mutasjonen forårsaker tumor (34)

Mutasjonen fører til hemmet GTPase aktivitet og konstituerende aktivering av *RAS*-signaler, som er nedstrøms for *EGFR*. Fosforylering av nedstrøms kinaser som er involvert i mange signalveier for å regulere cellevekst, differensiering og apoptose (15). *KRAS*-mutasjoner har vært assosiert ved primær resistanse for *EGFR*-TKI hos flere krefttyper og deriblant lungekreft. *KRAS*-mutasjon ses med økt frekvens ved adenokarsinom hos eldre pasienter og røykere (7, 34). Ikke røykere har oftere *KRAS*-genmutasjon av typen G12D transisjon G>A. Hos røykere ses som oftest *KRAS*-mutasjon av typen G12C, hvor G>T transisjon er vanligst, og den er også mer frekvent hos kvinner (35).

Det har siden oppdagelsen av det muterte aktiverte *RAS*-genet i 1982, vært en stor interesse for å finne en hemmer med effekt mot mutasjoner i dette genet (33, 36). Det finnes enda ikke noen målrettet behandling tilgjengelig for mutasjoner i *KRAS* (15), men i skrivende stund testes det ut lovende målrettet behandling mot genmutasjon i *KRAS* av typen G12C. *KRAS* G12C-mutasjonstypen utgjør 41% av *KRAS*-mutasjonene og er den vanligste *KRAS*-mutasjonen ved adenokarsinom (8, 19, 36).

KRAS G12C-hemmeren (AMG 510) fra firmaet AMGEN har vist lovende preklinisk aktivitet, og er den første *KRAS* G12C-hemmer i klinisk utprøving. *KRAS*-mutasjon av typen

G12C, forhindrer GTP nedbrytningen som fører til at proteinet er permanent aktivt. Dette kan igjen føre til kreft. Et lite molekyl, AMG 510, reagerer med KRAS-proteinet med G12C-mutasjon og forhindrer GTP bindingen i første omgang, og dermed hemmes kreftpromoterende aktivitet. Kliniske studier med testing av AMG 510 viser regresjon av svulster med mutasjon i *KRAS* av typen G12C (37-40).

Metoder for påvisning av *KRAS*-mutasjon er sekvenseringsmetoder som neste generasjons sekvensering (NGS) (41) og real-time polymerase kjedereaksjon (PCR) metoder (42).

1.5.2 *EGFR*

EGFR er en tyrosinkinasereseptor (RTK) og medlem av erytroblastisk onkogen B (*ERBB*)-familien. *EGFR*-genet er lokalisert i kromosom 7 ved posisjon 12 (31, 43). EGFR-familien, et medlem av underklasse 1 av transmembran RTK-familien, som består av fire nært beslektede medlemmer: EGFR/*ERBB1*/ human epidermal vekstfaktorreseptor (HER)1, *ERBB2*/HER2, *ERBB3*/HER3 og *ERBB4*/HER4. EGFR er vanligvis funnet normalt uttrykt i forskjellig vev med epitelial, mesenkymal og nevralt opprinnelse. Elleve vekstfaktorer bindes til *ERBB* reseptor, hvor syv er ligander for EGFR som EGF og transforming growthfactor- α (TGF- α), som representerer flere viktige funksjoner i mennesket. Dysregulering av *ERBB* reseptorgener eller proteiner kan føre til tumorgenese. *EGFR*- genmutasjoner ses ved mange menneskelige krefttyper som i lunge, hode og hals, tykktarm, bukspyttkjertel, bryst, eggstokker, blære, nyrer og glioma (34). *EGFR* var det første onkogene målet som ble oppdaget i NSCLC.

Når den ekstracellulære liganden bindes til EGFR genereres en dimerisering av reseptor, som fører til fosforylering av cytoplasmatisk tyrosinkinase. Dette fører til aktivering av ulike signalveier som fosfoinositid 3-kinase (PI3-K)/AKT/mammalian target of rapamycin (mTOR) og RAS/RAF/MAPK-signalvei. Dette fører igjen til celleproliferasjon, metastasering og udødeliggjøring ved forhindring av apoptose. Ved aktivert mutasjon i kinasedomenet til EGFR trigges liganduavhengig aktivering av tyrosinkinase (31).

EGFR-mutasjoner ses som oftest hos aldri-røykere, og kvinner. Hyppigheten i hvert land følger også andelen røykere, så land med høy frekvens av røykere har lavere frekvens av *EGFR*-mutasjoner. Prevalensen av *EGFR*-mutasjoner i adenokarsinom i lunge varierer fra ca. 40% hos asiatiske kvinner til ca.15% hos kaukasiere (44).

EGFR-genmutasjon er mer sjeldent ved plateepitelkarsinom. Derfor er den vanlige konsensus nå å anbefale *EGFR*-genmutasjonstesting på alle NSCLC foruten plateepitelkarsinomer, som en del av den initiale diagnosen, såkalt reflekstesting bestemt av patolog (15)

Mutasjoner i *EGFR*-genet finnes på bestemte steder på genet, og det antas at disse områdene er avgjørende for reseptorfunksjon og regulering (34). Mutasjonene kan aktivere signaleringen nedstrøms EGFR som fører til økt overlevelse og nedsatt celledød, som igjen kan føre til formasjon av tumor.

Det er beskrevet en rekke ulike aktiverende mutasjoner som påvirker responsen av TKI. Alle er lokalisert i fire eksoner, 18-21, som koder for den ATP-bindende delen av kinasen. Omtrent 90% av *EGFR*-mutasjonene er enten delesjoner i ekson 19, eller en spesiell punktmutasjon i ekson 21, L858R (31). Flere studier viser at delesjon i ekson 19 er mer sensitiv for EGFR-TKI enn L858R. Det er også påvist en rekke mindre vanlige mutasjoner som kan respondere på EGFR-TKI (45).

Pasienter med genmutasjoner i *EGFR*, ekson 18-21, ved adenokarsinom i lunge viser seg ofte å ha god effekt av tyrosinkinasehemmere (TKI) som gefitinib, erlotinib og afatinib. Norsk lungekreftgruppe anbefaler derfor denne behandlingen ved påvisning av mutasjoner i *EGFR*.

Under behandling med EGFR-TKI utvikles det før eller senere resistens ofte ved at det oppstår en sekundær mutasjon i *EGFR*-genet. I 60% av tilfellene skyldes resistensen en sekundær mutasjon i ekson 20, T790M, hvor aminosyren treonin er byttet ut med metionin i kodon 790 (46). Dette fører til en konformasjonsendring, som reduserer affiniteten for første og andre generasjons EGFR-TKI og signaleringen gjenopprettes. En tredjegerasjons EGFR-TKI, osimertinib, er spesielt designet for å hemme T790M konformasjonen til EGFR-kinase. Osimertinib hemmer både den aktiverende mutasjonen og den sekundære mutasjonen (15, 47). Andre resistensmutasjoner i ekson 19 som D761Y og C747S har blitt rapportert (34). Mutasjoner i MET og phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat 3-kinase catalytic subunit alfa isoform (PI3KCA) er også en årsak til resistens ved TKI (31).

Vanligste påvisningsmetoder er sekvensering- og real-time PCR-baserte metoder. Begge metoder har blitt rapportert å ha høy sensitivitet i å detektere disse mutasjonene i formalin-fiksert-parafin-innstøpt (FFPE) vev (48). Immunhistokjemiske (IHK) metoder viser her ikke like høy sensitivitet (31, 49, 50).

1.5.3 BRAF

B-RAF proto-onkogen, serin/treonin kinase (*BRAF*) onkogen er lokalisert på kromosom 7 ved posisjon 34 (31). Den koder for en serin/treonin kinase, som er involvert i RAS/RAF/MEK/ERK signalveien (24, 51). Når BRAF er aktivert ved onkogen mutasjon fosforylerer den MEK og det promoterer cellevekst, proliferasjon og overlevelse (31). Mutasjoner i *BRAF* påvises i ca. 2-4% av adenokarsinomer i lunge (25). Mutasjoner i *BRAF* ekskluderer andre drivermutasjoner som *EGFR*, *KRAS* og *ALK* (51, 52). Den mest frekvente mutasjonen er V600E, som også forekommer ved 50% av maligne melanomer, men også andre mutasjoner i *BRAF*-genet forekommer. *BRAF*-mutasjoner kan inndeles i V600E, som er hyppigst ved adenokarsinom i lunge og ikke-V600E (14). Det ser ut til at pasienter med *BRAF*-mutasjon V600E ofte er tidligere røykere eller røykere. Prognosen er dårlig ved *BRAF*-mutasjon av typen V600E, og de responderer dårligere på kjemoterapi (31). Måltrettet behandling mot BRAF-mutasjon, som vemurafenib, har delvis effekt mot V600E-varianten, men effektiv behandling mot andre BRAF-mutasjonsvarianter finnes foreløpig ikke (15). Ved adenokarsinom i lunge med *BRAF*-mutasjon V600E viser kombinasjonsbehandling med MEK- og BRAF-hemmer (dabrafenib og trametinib) til god effekt (14, 25, 53, 54). Det testes foreløpig ikke rutinemessig i Norge for *BRAF*-genmutasjon da behandling mot mutasjonen ikke er godkjent av Beslutningsforum.

Metoder for påvisning av *BRAF*-mutasjon er deoksyribonukleinsyre (DNA) sekvensering, NGS (41) eller real-time PCR (55).

1.5.4 ALK

ALK er en RTK som er medlem av insulinreseptor superfamilien. *ALK*-genet er lokalisert på kromosom 2 ved posisjon 23 (31, 56). Mer enn 19 forskjellige *ALK*-fusjonspartnere har blitt oppdaget i NSCLC (57), men den vanligste translokasjonen er echinoderm mikrotubuli assosiert protein like-4 (*EML-4*) og *ALK*-kinase på kromosom 9 og 22 (31, 48). Dette rearrangementet koder for et kimerisk protein med konstant kinaseaktivitet, som promoterer malign vekst og proliferasjon (31)

ALK er et proteinet som normalt ikke er detekterbart i lungeceller, men er uttrykt som et resultat av genomisk fusjon.

ALK-translokasjoner er nesten utelukkende funnet i adenokarsinomer, og disse mutasjonene ekskluderer andre drivermutasjoner (31, 48), men det er beskrevet noen sjeldne tilfeller hvor flere drivermutasjoner er representert (58, 59). Fra ulike studier er det rapportert *ALK*-translokasjoner hos 3-5% av adenokarsinomer i lunge, og det ses hyppigst hos aldri-røykere og yngre aldersgrupper (60).

Første linje terapi for *ALK*-positive tilfeller har vært krizotinib, som opprinnelig ble utviklet som en *MET*-hemmer, men som viste seg å hemme *ALK*-kinase mer effektivt (57). Gjennom mange ulike mekanismer oppstår resistens ved at det oppstår en sekundær mutasjon, eller andre ukjente mekanismer som fører til *ALK*-uavhengig tumorvekst. Neste generasjons terapi er svært aktiv både mot både primært og sekundært mutert *ALK*, som alektinib som nå er innført som standard førstelinjebehandling (15, 61).

Metoder som brukes for å detektere *ALK*-fusjons gener er FISH og immunhistokjemi, hvor FISH er gullstandarden. Det er høy, men ikke perfekt korrelasjon mellom FISH-positive og immunhistokjemi-positive tilfeller. Ved usikkert resultat på immunhistokjemi er det nå mange som analyserer videre på FISH som er en mer sensitiv metode (50, 62). Det er et lavt antall *ALK*-positive og FISH er en dyr metode, derfor brukes immunhistokjemisk metode i rutinen som er en raskere, enklere å diagnostisere i mikroskop og mer kostnadmessig gunstig metode (60). NGS sammenlignet med IHK har vist ved studie å være mer sensitiv for påvisning av *ALK*-rearrangementer (50). Studier viser også at NGS er bedre til å bekrefte et usikkert analyseresultat ved IHK, da studier viser at NGS har høyere sensitivitet for *ALK*-rearrangementer enn FISH (63).

Revers-transkriptase PCR (RT-PCR) og NGS er metoder som har høy spesifisitet og sensitive, men det kan være vanskelig å få god kvalitet på RNA og DNA fra FFPE-vev (60).

1.5.5 *ROS1*

ROS proto-onkogen 1, reseptor tyrosin kinase (*ROS1*) er en RTK som er medlem av insulin reseptor familien og er lokalisert på kromosom 6 ved posisjon 22 (31). *ROS1* spiller en rolle i celledifferensiering ved utvikling av flere organer, men ingen ligand er enda blitt identifisert (64).

Rearrangement av *ROS1*-genet, og resulterende fusjon av tyrosinkinase med ulike partnere induserer konstant aktiv nedstrøms signalering som leder til celleproliferasjon og tumorvekst.

Omtrent 2% av adenokarsinom i lunge har dette avviket (31), med CD74-ROS1 som den mest frekvente fusjonen (65). ROS1 er hovedsakelig funnet hos aldri-røykende, unge kvinnelige pasienter med adenokarsinom (8, 31, 66). ROS1-kinase deler ca. 49% aminosyresekvens med ALK-kinase og de er fylogenetisk nære. Nesten alle ALK-hemmere er også effektive hemmere av ROS1 som krizotinib (67). I dette tilfellet utvikles også ofte resistens (15).

Metode for påvisning av ROS1 inkluderer FISH, RT-PCR, IHC og RNA-NGS (41). Siden FISH er en mer kostbar og arbeidsintensiv analyse og det er få adenokarsinomer med *ROS1*-genrearrangement, brukes rutinemessig IHC (60, 68). Ved sammenligningsstudier av NGS og IHC for påvisning av ROS1 er det beskrevet at NGS reduserer antall falske positive resultater (50). Det er en ulempe at RNA er ustabil og det kan være vanskelig å få adekvate prøver til sekvensering fra FFPE-vev (63).

1.5.6 *RET*

RET er et proto onkogen som er lokalisert på kromosom 10 ved posisjon 11.2. Det koder for RTK for gliacellelinje derivert nevrotrofisk faktor (GDNF) familien. Fusjoner av *RET* er også et genrearrangement som er funnet ved NSCLC. Studier viser en prevalens på 1-2% i adenokarsinomer. Det er ofte yngre, ikke-røykere med adenokarsinom som har *RET*-fusjon og prognosen er dårlig. *RET*-fusjon ekskluderer andre kjente drivermutasjoner (31, 69, 70).

Behandlingsforsøk med medisiner som for tiden brukes er mot *RET*-positiv kreft i thyreoidea, som vandetanib, og det er prekliniske studier som viser at alektinib har anti-*RET* aktivitet (15).

I motsetning til ALK og ROS1 kan *RET*-fusjoner ikke påvises ved IHC, da det gir en høy frekvens av falske positive og negative resultater, men kan påvises ved FISH, RT-PCR og NGS (71).

1.5.7 *MET* og andre genmutasjoner og proteinuttrykk

MET-genet er lokalisert på kromosom 7 ved posisjon 31 (72). Dette onkogenet koder for en RTK (hepatocyt vekstfaktor), som aktiverer mange signalveier som spiller en stor rolle i celleproliferasjon, overlevelse, motilitet og invasjon (48). Patologisk aktivisering av *MET*

inkluderer mutasjon, genamplifikasjon og proteinoveruttrykk og er en negativ prognostisk faktor.

Aktivering av punktmutasjon i ekson 14 (METex14), som finnes i 4% av adenokarsinomer i lunge, representerer en mulig onkogen driver som kan ha nytte av MET-hemmer (73, 74).

MET-amplifikasjon er funnet hos 20% med EGFR-TKI resistens, og det antas at *MET*-avhengig aktivering av PI3-K-signalveien induserer cellevekst uavhengig av EGFR-signalvei hemming (15).

Ofte brukes NGS for påvisning av mutasjoner i *MET* (31), ved amplifikasjon kan FISH og IHK også brukes (41).

Andre genmutasjoner ved adenokarsinomer i lunge er i tumor protein 53 (*TP53*), *ERBB2* (*HER2*), *PIK3CA*, mothers against decapentaplegic homolog 4 (*SMAD4*) (75) og neurotrophic receptor tyrosine kinase (*NTRK*) (76).

Verdensomspennende undersøkelse over rutinemessig genetisk testing viser at det er høy grad av enighet om at flere biomarkører bør testes rutinemessig ved NSCLC i tillegg til *EGFR*, *ALK*, *ROS1* og *PDL-1*. Det er bred enighet om at *KRAS*, *BRAF*, *MET* og *HER2* mutasjonsanalyse bør være en del av rutinetesting (75). *EGFR*, *ALK*, *ROS1* og *BRAF* er nå mål for kinase-hemmende terapi i NSCLC (75).

1.6 Metoder for påvisning av genmutasjoner og proteinuttrykk

Det finnes i dag flere metoder for påvisning av somatiske genmutasjoner ved adenokarsinom i lunge. Reproduserbarhet, analysetid, sensitivitet og kostnad varierer ved de ulike metodene og det stilles ulike krav til blant annet konsentrasjon av DNA og RNA. Ekstrahering av DNA eller RNA før analyse for å optimalisere prøvemengde kan vurderes i forkant av de ulike analysemetodene (77, 78). Om det er ønskelig å foreta en undersøkelse av DNA på prøver hvor fusjonsgener er involvert, kan RNA omdannes til komplementært DNA (cDNA) ved bruk av enzymet revers-transkriptase (RT) (79).

1.6.1 Immunhistokjemi

Immunhistokjemi (IHK), også kalt immunhistologi er en metode som brukes i biologi og medisin for å synliggjøre proteiner eller andre strukturer i vev og celler ved hjelp av merkede antistoffer. Dersom antistoffene er merket med fluoreserende fargestoffer, snakker man om immunfluoresens. Påvisningen er basert på affiniteten til antistoffene til en spesifikk vevstruktur, epitop, som en antigen-antistoff reaksjon.

Immunhistokjemi kan gjøres ved direkte eller indirekte metode. Ved direkte metode er det spesifikke antistoffet, primært antistoff, direkte koblet (konjugert) til et enzym eller fluorokrom. Dette antistoffkomplekset binder målet i cellene eller vevet. Ved tilsetting av et bestemt substrat oppstår en enzym-substratreaksjon i form av farging. Danning av fargestoffet oppstår kun der immunhistologisk reaksjon er. Ved den indirekte metoden brukes et antistoff (sekundært antistoff) som er rettet mot det første antistoffet (primært antistoff). Det sekundære antistoffet er koblet til et enzym og utløser fargingen med enzym-substratreaksjonen. Fargen kan sees ved mikroskopering, og kan relateres til histologisk farget preparat (80, s.242).

Metoden er rask, rimelig, sensitiviteten og spesifisiteten er høy. Men uspesifikk farging kan forekomme, spesielt ved påvisning av ROS1-proteinuttrykk (60).

1.6.2 In situ hybridisering (ISH)

In situ hybridisering er en molekylærbiologisk metode for å påvise nukleinsyrer (RNA, DNA) i vev, celler eller på metafasekromosomer. Metoden utføres ved paring av to enkelttrådede DNA eller RNA som er komplementære. Den ene av de to DNA eller RNA-trådene kommer fra en kunstig produsert og merket probe, den andre er i preparatet og skal påvises. Proben kan merkes med metaller, organiske kromogener eller med fluoreserende molekyler som ved FISH.

Hybridisering tar mellom en time til flere dager, avhengig av probemateriale og målsekvens. Etter hybridiseringstiden er hybride molekyler bestående av nukleinsyrene og proben til stede. Overflødig, ikke bundne molekyler av proben vaskes ut og bundne probemolekyler kan detekteres med en indirekte antistoff-farging. Antistoffene er igjen bundet til fluorokrom (ved FISH) eller enzymer som danner farge. Begge blir deretter evaluert mikroskopisk.

Parafinsnitt er et egnet utgangspunkt for denne metoden. Anvendelsesområdet er blant annet deteksjon av amplifikasjon, delesjon og translokasjon i enkelte gener (80, s.47).

Ved usikre funn ved immunhistokjemi kan prøven analyseres med ISH eller FISH som er en mer sensitiv metode. Ulempen ved metoden er at den er kostbar, tidkrevende og det krever erfaring å tolke resultatet (60).

1.6.3 PCR

PCR er en metode for enzymatisk amplifikasjon av en eller flere spesifikke målsekvenser i DNA eller cDNA. Primer bestemmer målsekvensen da den bindes til startpunktet på DNA eller cDNA, og reversprimer bindes til sluttunktet på DNA eller cDNA som ønskes replikert og amplifisert.

Vanligvis er utgangspunktet det totale genomiske DNA, og målsekvensen i DNA er en liten del av DNAet fra utgangspunktet. RNA kan ved å omdannes til cDNA ved revers transkriptase-PCR (RT-PCR). Reaksjonen foregår over flere trinn ved ulike temperaturer hvor denaturering, primerbinding, syntese av DNA-streng og amplifisering av målgenet.

I en multipleks PCR amplifiseres flere gensekvenser med ulike primere, prober eller spesifikke smeltetemperaturer som skiller hver sekvens fra hverandre samtidig. Dette kan føre til nedsatt sensitivitet da primerne kan konkurrere med hverandre (81)

PCR en populær teknikk som innehar fordeler med at den er rask, robust og sensitiv (80, s.182-183).

1.6.5 Real-time PCR

Ved real-time PCR, er mengden DNA målt ved hver syklus med økende fluoresenssignal i direkte proporsjon til mengde PCR-produkt dannet. Data oppsamlet i den eksponentielle fasen av reaksjonen inneholder informasjon om startkvantiteten av amplifikasjonsmålet. Fluoresens brukt i real-time PCR inkluderer dobbelstreng DNA-bindende farge, eller farger bundet til PCR produkt under amplifikasjonen (80, s. 243).

Endring i fluoresensen i reaksjonen måles, og ved å plote fluoresens mot syklusnummer vil real-time PCR instrumentet generere en amplifikasjonsplot som representerer akkumuleringen av produkt gjennom tiden PCR-reaksjonen pågår (80, s. 243).

Basert på det detekterte fluoresens signal og valgt eksperimentelt oppsett er det mange analysetrinn som er nødvendig for å få biologisk meningsfulle resultater. Basert på råfluoresensverdiene blir først baselinjen trukket fra rådataene (81).

Deretter er det kvantifikasjonssyklus (C_q) verdien som kalkuleres. Generelt kan man si at C_q verdien representerer det antallet sykluser som trengs for å nå et bestemt fluoresenssignalnivå, og representerer syklusnummeret i reaksjonen (81). C_q -verdien er brukt til å beregne det initiale DNA-kopiantallet. C_q -verdi er omvendt relatert til startmengden av målet, altså høyere C_q -verdi ved lavere konsentrasjon. Ved å bruke den bestemte C_q -verdien kan kvantifiseringen av nukleinsyrer bli utført ved absolutt kvantifisering ved hjelp av standardkurve, relativ kvantifisering eller digital PCR (81).

Ved absolutt kvantifisering brukes standardkurve av standarder med ulike kjente konsentrasjoner. Dermed kan det produseres en lineær sammenheng mellom C_q og logaritmen av det totale templat DNA. Ved relativ kvantifisering brukes et referansegen for å bestemme variaser i målgenet i forhold til referansegenet (81).

Digital droplet PCR (ddPCR) hvor PCR-reaksjonen foregår i titusenvis av droplets, med måling av fluoresensen til hver droplet som deretter registreres ved et binært system 1 eller 0, det vil si enten positiv eller negativ. Antallet droplets med fluoresens blir registrert og kvantiteten måles uten bruk av standardkurve men ved hjelp av Poisson formel (82).

1.6.6 DNA-sekvensering, Sangers metode

Fred Sangers DNA-sekvenseringsmetode fra midten av 1970-tallet er en enzymatisk metode for genomsekvensering, inkludert det humane genom. Den består i syntetisering av DNA-tråder med tilfeldig hemming av DNA-kjedeforlengelse. DNA tråden må være enkelttrådet for å kunne være et templat for dannelsen av en ny komplementær DNA-streng in vitro ved bruk av passende DNA polymerase. DNA kan amplifiseres ved PCR før sekvensering, og gjøres til enkelttråd ved å bruke høy temperatur, denne kan brukes som sekvenseringstemplat.

Sekvenseringen er fordelt over fire parallelle reaksjoner, hver inneholder fire deoksynukleotidtrifosfat (dNTP) (deoksyadenosintrifosfat (dATP), deoksyctosintrifosfat (dCTP), deoksyguanosintrifosfat (dGTP) og deoksytymintrifosfat (dTTP)). I tillegg er det i hver reaksjon tilsatt fire analoge dideoksynukleotider (ddNTP), som fungerer som en basespesifikk kjedeterminator og straks et ddNTP er inkorporert terminerer kjedeforlengelsen. Det tilsettes i hver reaksjon overskudd av dNTP, og det blir en tilfeldig konkurranse om inkorporering i DNA kjeden. Ved å merke primer eller dNTP, vil den voksende kjeden være merket. Hver av disse fragmentene i en reaksjon vil ha en lik ende, 5'enden, som er definert med sekvensens primer. Mens 3' enden er variabel fordi insettingen av ddNTP skjer tilfeldig ved en av de forskjellige posisjonene som vil akseptere den spesifikke base.

Disse basespesifikke reaksjonene vil danne DNA fragmenter med ulike lengder, som skilles i størrelse på en denaturert polyakrylamidgel. Det negative ladete DNA vandrer mot positiv ladet side, mindre fragmenter vandrer lengre enn lange og kan derfor skilles, og baserekkefølgen kan avleses.

Fire av de spesifikke fluoresensfargene er brukt i de fire basespesifikke reaksjonene. Ved å ha ulik farge vil de ulike emisjonsbølglengdene skille de ulike basene slik at alle fire reaksjonene kan samles i gelen. Gjennom elektroforese vil DNA fragmentene passere en eksitasjonskilde som laser, mens en monitor detekterer og lagrer fluoresenssignalet mens DNA passerer gjennom et fiksert punkt i gelen. Dette resulterer i at det produseres intensitetsprofiler for hver av de fire forskjellige fluoroforene mens denne informasjonen også blir lagret elektronisk (80, s. 217-219).

Metoden kan lese DNA-fragmenter på 500-1000 basepar (bp) (83), og kan brukes for små mengder av DNA-fragmenter. Metoden er nøyaktig, men det analyseres få målgener hver gang og metoden blir derfor tidkrevende og kostbar (83).

1.6.7 Pyrosekvensering

DNA-kjeder syntetiseres fra dNTP og DNA-polymerasereaksjonen fører til spalting av α - og β -fosfat slik at dimonofosfat (dNMP) som inneholder α -fosfat er inkorporert i DNA, og legger tilbake pyrofosfat (PPi) bygget opp av β - og γ -fosfat. Pyrosekvensering utnytter frigjøringen av pyrofosfat hver gang et nukleotid er inkorporert i en voksende DNA kjede. Sekvensielle enzymreaksjoner er brukt til å detektere frigjøringen av PPi.

ATP sulfurylase konverterer kvantitativt PPi til ATP ved tilstedeværelse av adenosin 5' fosfosulfat. Frigjort ATP driver en reaksjon hvor luciferase omdanner luciferin til oxyluciferin, et produkt som genererer synlig lys proporsjonalt med ATP mengden. Hver gang et lyssignal er detektert er et nukleotid inkorporert i den voksende DNA strengen. De ulike dNTP er tilført sekvensielt, ulikt Sangers metode hvor alle dNTP tilføres samtidig. Om den valgte dNTP er den som kan gi dNMP ved å forlenge DNA strengen, vil det føre til at PPi blir frigjort og lys produseres og detekteres. Ubrukt dNTP og ATP er degradert ved enzymet apyrase, som er inkludert i reaksjonsmiksen. Slik at om den neste dNTP ikke er den som trengs for neste syntesetrinn, vil ikke lys bli produsert og apyrase vil degradere dNTP (80, s. 219, 84).

Pyrosekvensering blir ofte brukt til påvisning av single-nucleotide polymorphism (SNP), med korte leseledd på 100-400 bp (84).

1.6.8 NGS

Introduksjonen av neste generasjons sekvensering (NGS) har gjort det mulig med høy gjennomstrømming og detektering av multiple genetiske forandringer eller avvik i både medfødte og somatiske genomer. NGS tilbyr simultan sekvensering av tusen til millioner korte nukleinsyresekvenser i en massiv parallell reaksjon. Metoden sekvenserer, i motsetning til for eksempel Sangers metode, store regioner av genomet til en lavere kostnad og høyere sensitivitet. NGS kan utføre hel-genomsekvensering, hel-transkriptom-sekvensering (mRNA), og målrettet sekvensering av multigenpaneler. Mens de store helgenomsanalysene er aktuelle for forskningsprosjekter, vil paneler med målrettede paneler være en fordel i molekylærdiagnostisk rutine ved mange ulike sykdommer som blant annet kreft.

Mange kommersielle NGS plattformer er tilgjengelige for målrettet sekvensering som Ion Torrent og Illumina. Disse bruker ulike prinsipper men har like prosesseringstrinn. Plattformen bygger på prinsippet av klonal amplifisering av enkle DNA-molekyler, fordelt på en fast overflate og applikasjon av sekvenseringskjemi. Først er DNA fragmentert eller preamplifisert med genspesifikke primere. Deretter, tilsettes universal adapter-sekvenser til enden av DNA-fragmentet. Disse oligonukleotidadapterne er komplementære til PCR primerne som er brukt til klonal amplifisering på en fast overflate. Ion Torrent bruker emulsjon PCR for å generere klonale DNA fragmenter på 3 µm diameter kuler. pH-signal

detekteres ved frigjøringen av hydrogenioner ved enkel nukleotidinkorporering, og sekvenseringen utføres på en chip som virker som et sensitivt pH-meter (85).

Ved Illumina er PCR-klonene festet på en gjennomstrømmingscelle med dannelse av broer. PCR hvor en reversibel terminator farge kan detekteres ved syntese for hver single base som inkorporeres i den voksende DNA-tråden (85).

RNA-sekvensering kan utføres ved å omdanne RNA til cDNA ved revers transkripsjon da NGS krever DNA-substrat (83).

Leselengder for Illumina er 100-300 bp, og for Ion Torrent 100-400 bp. Begge plattformer tillater sekvensering fra begge ender av DNA-tråden (86). Sekvensering fra begge ender er en fordel ved translokasjoner og delesjoner da det gis tilleggsinformasjon om hvilke sekvenser som er i samme templat (83).

FFPE-vev er et egnet utgangspunkt for NGS, selv om det er beskrevet at det kan være problemer med å få adekvate prøver ved RNA-sekvensering (63). Anvendelsesområdet er blant annet deteksjon av punktmutasjon, amplifikasjon, delesjon og translokasjon i enkelte gener (80, s.47). Disse metodene krever lite prøvemateriale siden flere mutasjonsanalyser utføres samtidig (87).

1.7 Flytende biopsier

Biopsier fra lunge er gjerne sparsomme, og ofte er det ikke tilstrekkelig materiale til alle analysene som skal utføres. Det kan være en utfordring å få adekvat prøvemateriale på grunn av svulstens beliggenhet, eller fordi pasienten vegrer seg for stikking og særlig ved behov for gjentatte biopsier. Pakkeforløpet kan forsinkes på grunn av dette og risikoen for komplikasjoner øker.

DNA-fragmenter fra kreftceller som sirkulerer i blodet eller annen flytende veske som pleuravæske og annet kan påvises ved ulike teknikker som real-time PCR metode som ved Idylla™ mutasjonstest, NGS og ddPCR. Sirkulerende tumor DNA (ctDNA) er et potensielt avstøp av hele genomet og blir referert til som flytende biopsier (88).

En av de utfordrende biologiske egenskapene ved kreft er tumorens heterogenitet, og det området av svulsten som prøven er hentet fra trenger ikke å være representativ for hele sykdomsbildet (89, 90). Nesten alle tumorer som behandles utvikler en resistens som et

resultat av tumorheterogenitet, klonal evolusjon og seleksjon. Spesielt ved metastaserende kreft kan undersøkelse kun av primærtumor ikke nødvendigvis gi et helhetlig bilde av kreftsykdommen, og det kan ofte være vanskelig å få tatt prøver av metastaser eller lokalisere disse. CtDNA kan derfor gi et mer riktig bilde av heterogeniteten og den genetiske profilen til kreftcellene. Ved tumorprogresjon kan egenskapene til tumor endres, og kreftcellene fra metastaser innehar nødvendigvis ikke de samme egenskapene som primærtumor (88).

Ved for eksempel EGFR-TKI-resistens kan T790M detekteres ved ulike metoder i plasma, og føre til at riktig behandling med osimertinib gis ved et tidligere tidspunkt (91, 92).

Analyse av ctDNA, viser seg å ha høy konkordans i mutasjonsprofiler i forhold til biopsier fra vev fra NSCLC. Dette gjelder spesielt for drivermutasjoner (93). Men ved små tumorer kan resultatet på genmutasjonstest være falsk negativt da mengden sirkulerende DNA er mindre (94). Falske positive resultater kan forekomme, som ved *KRAS*-genmutasjonsanalyse hvor det er beskrevet falske positive resultater ved klonal hematopoese (95). Disse falske positive og falske negative tilfellene begrenser den praktiske nytten av ctDNA ved tidlig kreftdiagnose eller screening (86).

Påvisning av ctDNA kan være en potensiell mulig komplementær metode for vevsbiopsier i diagnostikken prognostisk, ved behandlingsrespons og ved resistens mot behandling (93). Om analyse på ctDNA gir et mer oversiktlig bilde over heterogenitet til primærtumor og metastaser er fortsatt et åpent spørsmål (89). Det er enda ikke anbefalt molekylær testing for ctDNA når vev eller celler fra tumor er tilgjengelig (96).

2 Formål med oppgaven

Presisjonsmedisin bedrer behandlingen til mange pasienter med adenokarsinom i lunge i form av økt levealder, færre bivirkninger og større pasienttilfredshet. Stadig flere genmutasjoner og proteinuttrykk påvises og det utvikles stadig bedre målrettede behandlinger mot disse.

Ved Vestre Viken helseforetak (VV HF) analyseres det i dag på adenokarsinom i lunge for ALK- og ROS1-proteinuttrykk, og *EGFR*-genmutasjon. ALK- og ROS1-proteinuttrykk analyseres ved immunhistokjemisk (IHK) metode lokalt på egen avdeling ved VV HF, mens genmutasjonsanalyse på *EGFR* analyseres ved eksternt laboratorium (OUS). Som følge av forlenget analysesvartid og økt kostnad ved å sende prøver til eksternt sykehus ønsker vi med dette prosjektet å studere om det kan være fordelaktig å endre dagens praksis med tanke på analysere også for *EGFR*-genmutasjon lokalt ved VV HF.

Vi ønsket å studere forskjell i tid og kostnad ved å analysere et vesentlig antall uselekterte prospektive FFPE-vev fra adenokarsinom i lunge på *EGFR*-genmutasjon parallelt ved lokalt og eksternt laboratorium.

Ved VV HF ønsket vi å se nærmere på om det var hensiktsmessig å innføre metode med *KRAS*-genmutasjonsanalyse som førstevalg ved adenokarsinom i lunge. Siden *KRAS*-mutasjon er gjensidig ekskluderende kan videre mutasjonsanalyser stanses ved positivt resultat. Ved negativt resultat på *KRAS*-mutasjonstest analyseres det videre for mutasjon i *EGFR*, og om den er negativ analyseres det videre for *BRAF*-mutasjon og IHK undersøkelse for påvisning av ALK og ROS1. Ved positivt resultat for *EGFR*-mutasjonstest er videre analyser overflødige da *EGFR*-mutasjonen også er gjensidig ekskluderende. Ved metode uten *KRAS*-genmutasjonsanalyse analyseres det for *EGFR*-, *BRAF*-mutasjonstest og immunhistokjemisk analyse for ROS1 og ALK på alle pasientprøvene.

Vi ønsket å studere fordeling og frekvens av *KRAS*-, *EGFR*- og *BRAF*-genmutasjon i et vesentlig antall retrospektive og prospektive FFPE-vev fra adenokarsinom i lunge.

Vi ønsket å analysere en eventuell gevinst ved innføring av genmutasjonsanalyse for *EGFR*, *KRAS* og *BRAF* ved eget laboratorium på FFPE-vev fra adenokarsinom i lunge. Spesifikt ønsket vi å studere metode med og uten *KRAS*-mutasjonsanalyse og studere fordeler for pasient og kostnadsbesparelse relatert til dette.

3 Materialer og metoder

Det ble hentet frem 75 retrospektive prøver med påvist adenokarsinom i lunge ved hjelp av sykehusets pasientdatasystem i VV HF. Disse var registrert foregående år med prøvetakingsdato fra desember 2017 til april 2019. Arkivert prøvemateriale var FFPE-vev som kunne hentes frem. Prøvene var tidligere analysert for *EGFR*-mutasjoner på OUS og analyseresultater forelå.

Prospektivt ble alle FFPE-vev fra pasienter som fikk påvist adenokarsinom i lunge siste halvdel av 2019 ved VV HF valgt. Det ble analysert på 33 prospektive FFPE-vev for *KRAS*, og på *EGFR*-genmutasjon der *KRAS*-mutasjonsanalyse var negativ. Siden *KRAS*- og *EGFR*-mutasjonstest ble utført samme dato, ble datoen for analyse av disse registrert i tabell til sammenligning med analysesvar fra OUS.

Totalt ble 108 FFPE-biopsier analysert retro- og prospektivt, fordelt på 46 menn og 62 kvinner. Pasientene er i aldersgruppen 43-88 år, og alle stadier av sykdomsforløpet er representert.

Pasientsamtykke ble ikke innhentet, og det ble ikke søkt Regionale komiteer for medisin og helsefaglig forskningsetikk (REK) eller personvernombudet (PVO) da prosjektet er en metodeutvikling. Alle pasientendataene ble anonymisert ved å fjerne fødselsnummer og navn i tabeller. Det ble opprettet R- og P-nummer for retrospektive og prospektive prøver som fjernet muligheten for gjenkjenning av pasient.

3.1 Biocartis Idylla™ mutasjonstest

Idylla er en fullautomatisert multipleks real-time PCR-metode. Biocartis Idylla består av konsoll, instrument og testpatroner for forskjellige mutasjonsanalyser. Konsollen består av en berøringsskjerm og strekkodeleser, hvor det ble lagt inn type test og analyseresultatet kom automatisk opp på skjerm etter endt analyse.

Instrumentet veier 18,6 kg og det kan stables fire i høyden, mens totalt åtte kan kobles til konsollen. En ledlysring indikerer status på instrumentet.



Figur 2A



Figur 2B

Figur 2A. Bildet illustrerer Biocartis™ Idylla helautomatiske multipleks-PCR instrument, med konsoll, instrumenter, og testpatron for forskjellige mutasjonsanalyser.

Figur 2B. Bildet illustrerer en testpatron som er åpnet og klar for tilsetning av prøvemateriale (97). Bildene er lånt med tillatelse av Biocartis.

Prøven ble tilsatt direkte i testpatronen som i vårt tilfelle var FFPE-vev fra adenokarsinom i lunge, men blod, plasma, serum, spytt, ekstrahert og oppkonsentrert DNA kunne også tilsettes. Testpatronen inneholdt alle nødvendige reagenser og alle prosesseringstrinn foregikk i en patron. En testpatron kunne brukes en gang og siden testpatronen var lukket var det ingen kontamineringsrisiko.

Prøvemateriale fra parafinblokken, hvor biopsien fra adenokarsinomet var innstøpt, ble snittet på mikrotomen. Molekylærbiologiske undersøkelser stiller strenge krav i henhold til kontaminering med fremmed vev og/eller fremmed DNA. Hansker skal alltid brukes ved håndtering av prøver og preparering av testkassetten. Utstyr som ikke er engangs, ble først vasket med RNase/ DNA-away og deretter med 70% etanol. Mikrotomblad og hansker ble byttet og utstyret ble rengjort mellom hver parafinblokk som ble snittet.

Det første snittet som hadde blitt farget med hematoksylin og eosin (HE) var tidligere blitt levert og diagnostisert av patolog, som ved funn av adenokarsinomceller fra lunge hadde bestilt molekylærbiologiske og immunhistokjemiske analyser.

Til molekylærbiologiske undersøkelser ble det snittet fire vevssnitt på mikrotomen med tykkelse 10 μm , men ved sparsomt prøvemateriale ble det snittet med tykkelse 8 μm og færre snitt. Deretter ble det snittet et ekstra snitt for HE-farging, slik at patologen kunne se om det fortsatt var adenokarsinomceller i siste vevssnitt.

Idyllmaskinen ble startet, og ny test ble valgt. Testpatronen ble så pakket ut og ble merket med prøvenummer. To Whatman-filterpapir ble plassert med pinsett på et rent objektglass, hvor begge var fuktet med nukleasefritt vann. FFPE-vevssnitt ble mikrodisekert for tumorceller med engangsskalpell og ble overført direkte til det ene fuktete filterpapiret ved hjelp av en pinsett. Det andre filterpapiret ble så plassert over prøvematerialet. Filterpapir og vev ble deretter overført til testpatronen til Idylla. Instrumentskuffen ble åpnet og testpatronen satt inn i Idyllmaskinen.

I testpatronen ble det automatisk tilsatt en kombinasjon av kjemiske reagensmidler, enzymer, varme og høy intensitet fokusert ultralyd (HIFU) for avparafinering, nedbryting av vevet og lysing av celler med frigjøring av nukleinsyrer. Nukleinsyrene ble festet til en silikonmembran, og DNA ble ekstrahert. Deretter amplifikasjonsdeteksjon etter real-time PCR prinsippet. Dette foregikk i fem uavhengige PCR kamre, som inneholdt tørkede reagens med blant annet primer, probe, enzymer og opp til seks fluorokromer (6-fluorescein amidite (FAM), hexachlorofluorescein (HEX), Teaxas RED, AF647N, Atto700, HiLyte750).

Påvisning av genmålene ble gjort ved hjelp av fluoresensmerkede prober. Under spesifikk amplifikasjon og deteksjon, ble fluoreserende signaler omdannet og oversatt til genetiske analysesvar. Dataen ble analysert automatisk og resultatet sendt til konsollen. Fra prøven ble tilsatt til svar forelå tok det ca. 120 minutter. Testen var fullautomatisert og dekket alle ledd innen analysen som forbehandling, DNA-isolasjon, PCR-amplifikasjon og deteksjon samt analysering av testresultatene.

Det ble stilt ulike krav til mengde celler avhengig av hvilken genmutasjon vi ønsket å påvise. Ved genmutasjonstest for *KRAS* og *EGFR* bør minimum 10% av cellene være tumorceller, og for *BRAF* bør minimum 50% av cellene være tumorceller. Tumorcellene ble markert av patolog ved mikroskopiering av HE-farget preparat, og om det var for lite tumorceller måtte snittykkelsen økes slik at mengden tumorceller var innenfor analysekravet (42, 55, 98).

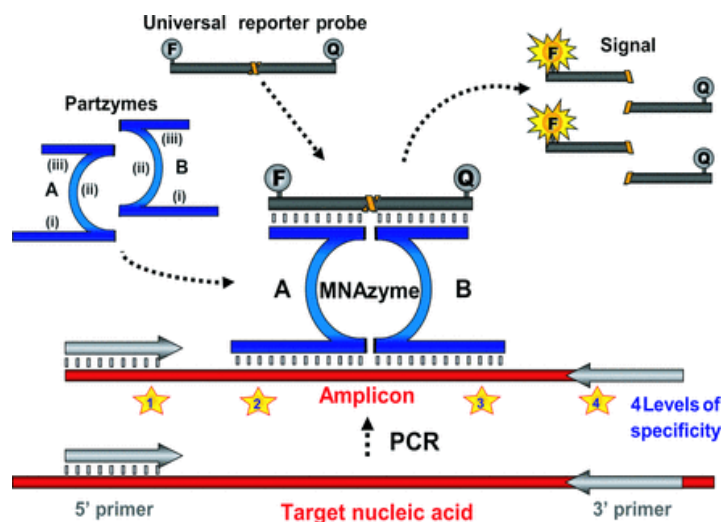
Mulige feilkilder ved metoden som man måtte være oppmerksom på var prøveforbytting. Det var også viktig å være oppmerksom på at tilstrekkelig prøvemateriale var tilsatt, og at det var tilsatt riktig i Idylla-testpatronen. Fragmentering av DNA kan forekomme om prøven har vært fiksert i formalin for lenge i forkant, optimalt ikke lengre enn 24 timer (42, 55, 98-100). Fragmentering av DNA kan også forekomme ved oppbevaring over lang tid i FFPE-blokk (101). Farget FFPE-vev kan påvirke fluoresensen så det kunne ikke brukes. Parafinen måtte ha smeltepunkt lik eller lavere enn 60°C, ellers var ikke lysing av vev og DNA isolasjon

mulig (42, 55, 98). Testpatronen måtte oppbevares riktig med tanke på temperatur og etter at testpatronen var åpnet måtte den brukes innenfor angitt tidsintervall mellom preparering av patronen og teststart. Forurensing med fremmed vev/DNA og DNase/RNase var også en mulig feilkilde ved metoden.

3.1.1 Genmutasjonstest med Biocartis Idylla™KRAS

Idylla KRAS-mutasjonstest påviste mutasjoner i ekson 2, 3 og 4 av KRAS-onkogenet. Testen bestod av fem allelspesifikke multiplekse PCR-reaksjoner som var utviklet spesifikt for å amplifisere KRAS-gensekvenser med mutasjon i kodon 12, 13, 59, 61, 117 og 146. Et konservert fragment i knutepunktet for intron 4/ ekson 5 i KRAS-genet ble amplifiseres samtidig. Denne reaksjonsmiksen (KRAS-total) var tilsatt i alle fem kamre og fungerte som en endogen kontroll. Denne kontrollreaksjonen var i tillegg en måling av mengden amplifiserbart DNA i prøven og ble brukt i analysen av prøvens mutasjonsstatus (42).

KRAS-genmutasjonstest bruker multikomponente nukleinsyre-enzymmer (MNAzyme) teknologi som innebærer dannelse av katalytiske komplekser som består av mange partzymer ved tilstedeværelse av målnukleinsyrer. MNAzymer spalter en probe mellom fluorofor og quencher for å produsere et fluoresenssignal som indikerer tilstedeværelse av målgenet (figur 3). Det probebindende domenet til partzymer kan være komplementær til mange universalprober, noe som er en fordel da det ikke er nødvendig å syntetisere en ny probe for hvert genmål (102, 103).



Figur 3. Illustrasjonen viser dannelsen av MNzyme kompleks ved binding av MNzyme til målgenet ved PCR. Probe bindes til komplekset som katalyserer spaltning av probe hvor fluoreserende signal frigjøres (102). Bildet er gjengitt med tillatelse fra Oxford University Press.

Tabell 1. Tabellen viser hvilke mutasjoner som primere bindes til med tilhørende fluorokromer som er i de ulike kamre i testkassetten for *KRAS*-genmutasjonsanalyse. *KRAS* total er en endogen kontroll som også er med på beregningen av prøvens mutasjonsstatus.

Fluorokrom	Kammer A	Kammer B	Kammer C	Kammer D	Kammer E
FAM	G12C	G12R	G12S		
HEX	<i>KRAS</i> total	<i>KRAS</i> total	<i>KRAS</i> total	<i>KRAS</i> total	<i>KRAS</i> total
Texas RED	G12V	G12D	G12A		A59T/E/G
AF647N	Q61H/H	Q61K/K	Q61R/L	A146T/V/P	
Atto700	G13D	K117N/N			
HiLyte750*					

*brukes ikke ved *KRAS*-mutasjonstest. FAM = 6-fluorescein amidite, HEX = hexachlorfluorescein (42).

Ved *KRAS*-genmutasjonstest ble de innsamlede fluoreserende signalene beregnet automatisk, og de fluoreserende signalene ble evaluert for å se om de er gyldige i henhold til PCR-kurven. En syklus for Cq ble beregnet for hver gyldige kurve. Differansen mellom prøveprosesseringskontrollens (*KRAS*-total) Cq-verdi og Cq-verdi oppnådd ved et eller flere

mutasjonssignal, det vil si ΔCq , som var et forhåndsdefinert intervall i Idylla avgjorde om prøven ble rapportert som mutasjonsnegativ eller positiv. Mutantsignalet anses som gyldig hvis ΔCq er innenfor et forhåndsdefinert gyldighetsområde, og ugyldig om det er utenfor. Prøver med et gyldig kontrollsignal, men en ΔCq -verdi utenfor det forhåndsdefinerte intervallet for alle mutantsignaler rapporteres som mutasjonsnegativ. I tilfelle ingen *KRAS*-kontrollsignaler ble detektert i en PCR-reaksjon, kunne ingen mutantsignaler fastsettes og resultatet for PCR reaksjonen ble ansett som ugyldig.

Den genetiske tildelingen som ble oppgitt på skjermen etter endt analyse viste ikke alltid den spesifikke mutasjonen som resultat, men hvilken forhåndsdefinerte mutasjonsgruppe den befant seg i (42).

Tabell 2. Tabellen viser en oversikt over mutasjonene i *KRAS* som påvises av Idylla og hvilken genetisk tildeling som hver mutasjon besvares med (42).

GEN	EXON	KODON	MUTASJON	AMINOSYRE- ENDRING	KODING DNA- ENDRING	GENETISK TILDELING IDYLLA™ KRAS
KRAS	2	12	G12A	p.Gly12Ala	c.35G>C	G12A
			G12C	p. Gly12Cys	c.34G>T	G12C
			G12D	p.Gly12Asp	c.35G>A	G12D
			G12R	p.Gly12Arg	c.34G>C	G12R
			G12S	p.Gly12Ser	c.34G>A	G12S
			G12V	p.Gly12Val	c.35G>T	G12V
			13	G13D	p.Gly13Asp	c.38G>A
	3	59	A59E	p.Ala59Glu	c.176C>A	A59T/E/G
			A59G	p.Ala59Gly	c.176C>G	
			A59T	p.Ala59Thr	c.175G>A	
		61	Q61H	p.Gln61His	c.183A>C	Q61H
			Q61H	p.Gln61His	c.183A>T	
			Q61K	p.Gln61Lys	c.181C>A	Q61K
			Q61K	p.Gln61Lys	c.180_181delinsAA	
			Q61L	p.Gln61Leu	c.182A>T	Q61L/R
	Q61R	p.Gln61Arg	c.182A>G			
	4	117	K117N	p.Lys117Asn	c.351A>C	K117N
			K117N	p.Lys117Asn	c.351A>T	
		146	A146P	p.Ala146Pro	c.436G>C	A146P/T/V
			A146T	p.Ala146Thr	c.436G>A	
A146V			p.Ala146Val	c.437C>T		

Det er ikke påvist noen reaktivitet for oligonukleotidprimerne utenfor *KRAS*-genet som kan føre til uspesifikke reaksjoner. Men det er tre mutasjoner utenfor kodonene testet av Idylla som kan føre til falske positive resultater, dvs. henholdsvis p.G10_A11insG (c.30_31insGGA), p.C1185 (c.353G>C) og p.G60D (c.179G>A). Forekomsten er lav og sannsynligheten for falske resultater er liten til ubetydelig. Kjente varianter for *KRAS*-mutasjonen dekkes av Idylla. Mer sjeldne *KRAS*-mutasjoner som G12D (c.35_36delinsAC), G12V (c.35_36delinsTC) og Q61R (c.182_183delinsGT) vil ikke bli påvist med denne testen.

Blant de kjente mutasjonene i kodonene som dekkes av Idylla™*KRAS* mutasjonstest, men som det ikke er utviklet primere for, skal mutasjon G12W (c.34_36delinsTGG) påvises og rapporteres som G12C, og mutasjon G13N (c.37_38delinsAA) og G13E (c.38_39delinsAA eller c.38_39delinsAG) vil resultere i G13D resultat. Foruten disse vil resultatet være ingen mutasjon påvist (42).

Sensitiviteten til Idylla™*KRAS* viser ved studie at laveste allelfrekvens på 5% kan påvises i over 95% av testtilfellene ved 95%konfidensintervall. Deteksjonsgrensen varierer blant forskjellige mutasjoner fra 1-5% allelfrekvens (5% for G12C, G12D, G12R, G12S, G12V, G13D, Q61H, Q61L og 1% for G12R) (42).

Reproduserbarhet mellom laboratorier og mellom partier viser ved testing for alle *KRAS*-mutante prøver og Idylla™ *KRAS*-mutasjonstest-partier, var genotypetildelingens reproduserbarhet 100% (42).

Nøyaktigheten til denne testen er undersøkt i studier med PCR-basert referansetest og NGS, og resultatet viser et generelt prosentammenfall på 97%. En studie med sammenligning av Idylla™*KRAS*-mutasjonstest og NGS viser 94% samsvar (104).

Mulig forstyrrende stoffer som nekrotisert vev viser seg å ikke forstyrre genmutasjonsanalysen hverken ved *KRAS*, *EGFR* eller *BRAF* (42).

3.1.2 Genmutasjonstest med Biocartis Idylla™*EGFR*

EGFR-genmutasjonstest med Idylla detekterer mutasjoner i ekson 18 (G719A/C/S), 20 (T790M,S768I) og 21 (L858R, L861Q), delesjon i ekson 19 (delesjon 9/12/15/18/21/24) og insersjon i ekson 20 (InsG,InsASV (9+11)/InsSVD /InsH) i *EGFR* gen (98).

Tabell 3. Tabellen viser hvilke mutasjoner som primere bindes til med tilhørende fluorokromer som er i de ulike kamre i testkassetten for *EGFR*-genmutasjonsanalyse. *EGFR* total er en endogen kontroll som også er med i beregningen av prøvens mutasjonsstatus.

Fluorokrom	<i>Kammer A</i>	<i>Kammer B</i>	<i>Kammer C</i>	<i>Kammer D</i>	<i>Kammer E</i>
FAM		Del9/Del21a	Del18/Del21b /Del24		G719A
HEX	L861Q			L858R	S768I
Texas RED	G719S		T790M		G719C1
AF647N	InsH	Del15	Del12	InsASV9/Ins ASV11/InsG	InsSVD
Atto700	<i>EGFR total</i>	<i>EGFR total</i>	<i>EGFR total</i>	<i>EGFR total</i>	<i>EGFR total</i>
HiLyte750*					

*Brukes ikke ved *EGFR*-mutasjonstest. FAM=6-fluorescein amidite, HEX=hexachlorofluoresein (98).

Som ved *KRAS*-genmutasjonsanalyse brukes MNAzyme-teknologi. Ved *KRAS*-genmutasjonsanalyse ble de innsamlede fluoresens-signalene automatisk detektert, og signalene evalueres for å se om de var gyldige i forhold til PCR-kurven hvor Cq ble beregnet for hver gyldige kurve også dette tilsvarende *KRAS*-mutasjonstest. Et konservert fragment i transmembranregionen for *EGFR*-genet ble amplifisert samtidig (*EGFR*-total) og reaksjonsmiksen til dette fragmentet var tilsatt i alle fem kamre og fungerte som en endogen kontroll. *EGFR*-total ble brukt i beregning av prøvens mutasjonsstatus, som ble fastsatt ved beregning av ΔCq (differanse mellom Cq-verdien til *EGFR*-total og Cq-verdien til *EGFR*-mutant). Denne *EGFR*-kontrollreaksjonen var også en måling av mengden amplifiserbart DNA i prøven.

Mutantsignalet anses som gyldig hvis ΔCq var innenfor et forhåndsdefinert gyldighetsområde beregnet av Idylla, og *EGFR*-kontrollsignaler måtte detekteres for at analysen skal være gyldig (98).

Idylla rapporterte resultater for syv genotypeoppkallinger. Genotypeoppkallingene som delesjon i ekson 19 og insersjon i ekson 20 dekket mutasjonsgrupper. Dersom det ble påvist mutasjoner i noen av disse gruppene ble det ikke gitt informasjon om type mutasjon, men ble besvart ut som henholdsvis ekson 19 delesjon og ekson 20 insersjoner (98).

Tabell 4a og tabell 4b viser en oversikt over mutasjonene i *EGFR* som påvises av Idylla, og hvilke mutasjoner som hører inn under hver genotypeoppkalling (98).

Tabell 4a.

GEN	EXON	MUTASJON	PROTEINENDRING	NUKLEOTIDENDRING	GENOTYP-OPPKALLING		
EGFR	18	G719A	p.Gly719Ala	c.2156G>C	G719A/C/S		
		G719C	p.Gly719Cys	c.2155G>T			
		G719C2	p.Gly719Cys(2)	c.2154_2155delinsTT			
		G719S	p.Gly719Ser	c.2155G>A			
	19	Sletting 9	p.Leu747_Ala750delinsPro	c.2238_2248delinsGC	Exon 19-sletting		
				c.2239_2248delinsC			
				p.Leu747_Ala750delinsSer		c.2240_2248del	
		Sletting 12	p.Leu747_Thr751delinsPro	c.2239_2251delinsC	p.Leu747_Thr751delinsSer	c.2240_2251del	
				p.Leu747_Glu749del		c.2239_2247del	
		Sletting 15	p.Glu746_Ala750del	c.2235_2249del	p.Leu747_Thr751del	c.2239_2253del	
				c.2236_2250del		c.2240_2254del	
				c.2238_2252del		c.2238_2252del	
				c.2237_2251del		p.Glu746_Thr751delinsAla	c.2237_2251del
				c.2235_2252delinsAAT		p.Glu746_Thr751delinsIle	c.2235_2252delinsAAT
				c.2237_2252delinsT		p.Glu746_Thr751delinsVal	c.2237_2252delinsT
				c.2234_2248del		p.Lys745_Ala750delinsThr	c.2234_2248del
				c.2236_2253delinsCTA		p.Glu746_Thr751delinsLeu	c.2236_2253delinsCTA
				c.2237_2253delinsTA		p.Glu746_Thr751delinsVal	c.2237_2253delinsTA
				c.2235_2251delinsAG		p.Glu746_Thr751delinsAla	c.2235_2251delinsAG
		c.2236_2253delinsCAA	p.Glu746_Thr751delinsGln	c.2236_2253delinsCAA			
		c.2230_2249delinsGTCAA	p.Ile744_Ala750delinsValLys	c.2230_2249delinsGTCAA			
		Sletting 18	p.Leu747_Pro753delinsSer	c.2240_2257del	p.Glu746_Ser752delinsVal	c.2237_2255delinsT	
				c.2239_2256del		p.Leu747_Ser752del	c.2239_2256del
				c.2236_2253del		p.Glu746_Thr751del	c.2236_2253del
	c.2239_2258delinsCA			p.Leu747_Pro753delinsGln		c.2239_2258delinsCA	

Tabell 4b.

GEN	EXON	MUTASJON	PROTEINENDRING	NUKLEOTIDENDRING	GENOTYP-OPPKALLING	
EGFR			p.Glu746_Ser752delinsAla	c.2237_2254del		
			p.Glu746_Ser752delinsAsp	c.2238_2255del		
			p.Glu746_Pro753delinsValSer	c.2237_2257delinsTCT		
			p.Glu746_Ser752delinsIle	c.2236_2255delinsAT		
				c.2236_2256delinsATC		
				c.2237_2256delinsTT		
			p.Glu746_Ser752delinsVal	c.2237_2256delinsTC		
				c.2235_2255delinsGGT		
			Sletting 21	p.Leu747_Pro753del		c.2238_2258del
				p.Glu746_Ser752del		c.2236_2256del
	Sletting 24	p.Ser752_Ile759del	c.2253_2276del			
	20	T790M	p.Thr790Met	c.2369C>T	T790M	
		S768I	p.Ser768Ile	c.2303G>T	S768I	
		InsG	p.Asp770_Asn771insGly	c.2310_2311insGGT	Exon 20-t tillegg	
InsASV(9)		p.Val769_Asp770insAlaSerVal	c.2307_2308insGCCAGCGTG			
InsASV(11)		p.Val769_Asp770insAlaSerVal	c.2309_2310delinsCCAGCGTGGAT			
InsSVD		p.Asp770_Asn771insSerValAsp	c.2311_2312insGCGTGGACA			
InsH		p.His773_Val774insHis	c.2319_2320insCAC			
21	L858R	p.Leu858Arg	c.2573T>G	L858R		
			c.2573_2574delinsGT			
			c.2573_2574delinsGA			
	L861Q	p.Leu861Gln	c.2582T>A	L861Q		

Sensitiviteten ved *EGFR*-mutasjonstest er ved testing vist at laveste allelfrekvens på $\leq 5\%$ for mutasjoner i ekson 19, 20 og 21 og $\leq 10\%$ for mutasjoner i ekson 18 på *EGFR*-genet kan påvises i 95% av testtilfellene ved et 95% konfidensintervall (98).

Det er ikke identifisert reaktivitet for noen av oligonukleotidprimerne utenfor *EGFR*-genet som kan resultere i uspesifikk deteksjon (98).

Reproduserbarheten mellom laboratorier for vanlig forekommende *EGFR*-mutasjoner på 95% med konfidensintervall over 98%. Reproduserbarheten mellom partier for fem vanlig forekommende *EGFR*-mutasjoner viser 95% med konfidensintervall over 96% (98)

Ved beregning av nøyaktighet er det en samsvarsprosent på 96% med 95% konfidensintervall mellom Idylla™*KRAS*-mutasjonstest og PCR-basert referansem metode (98). En sammenligningsstudie med pyrosekvensering viser et analysesvarsammenfall på 95% (105).

En studie hvor NGS, Ion Torrent sammenlignes med Idylla™ mutasjonstest viser at det er høy konkordans og at Idylla kan brukes som en hurtigtest når mutasjonsanalyse på *EGFR* ved NGS resulterer i ikke godkjent analysesvar (106), også andre studier viser til høy konkordans ved sammenligning av analysesvar ved NGS (104).

Ekstrahert DNA kan også brukes som prøvemateriale ved Idylla™ *EGFR*-mutasjonstest. Det er ved testing vist at sensitiviteten er god ved DNA-konsentrasjon på 10ng/μl tilsatt testpatron (107).

3.1.3 Genmutasjonstest med Biocartis Idylla™ *BRAF*

BRAF-genmutasjonstest benyttes hovedsakelig for å påvise genmutasjoner fra tumorceller ved malignt melanom og testen detekterer seks mutasjoner i *BRAF*-genet (V600E/E2/D, V600K/R/M) (55).

Tabell 5. Tabellen viser hvilke mutasjoner som primere bindes til med tilhørende fluorokromer som er i de ulike kamre i testkassetten for *BRAF*-genmutasjonsanalyse og housekeepinggenet RNaseP i kamrene.

Fluorokrom	<i>Kammer A</i>	<i>Kammer B</i>	<i>Kammer C</i>	<i>Kammer D</i>	<i>Kammer E</i>
FAM	V600WT	V600E/E2/D	V600K/R/M		
HEX*					
Texas RED	RNaseP	RNaseP	RNaseP		
AF647N*					
Atto700*					
HiLyte750*					

*brukes ikke ved *BRAF*-mutasjonstest. FAM=6-fluorescein amidite, HEX=hexaklorofluoresein , RNaseP=Ribonuklease P (55).

Mutasjonsanalysen ble utført med tre allelspesifikke PCR-reaksjoner i form av real-time PCR i tre individuelle kamre som inneholdt alle nødvendige reagenser, primer og prober. Til *BRAF*-genmutasjonsanalysen brukes to forskjellige fluorokromer, FAM og Texas RED.

Et housekeepinggen, Ribonuklease P (RNaseP), er en kontroll på at analysen var tilfredsstillende utført.

Prinsippet for påvisning og tolkning av resultater samsvarte i stor grad med *KRAS*- og *EGFR*-genmutasjonsanalysen. Idylla tolket resultatet automatisk. Mutasjonen ble fastsatt ved beregning av ΔCq som er forskjellen mellom *Cq* villtype (WT) *BRAF* og *Cq* mutant *BRAF*.

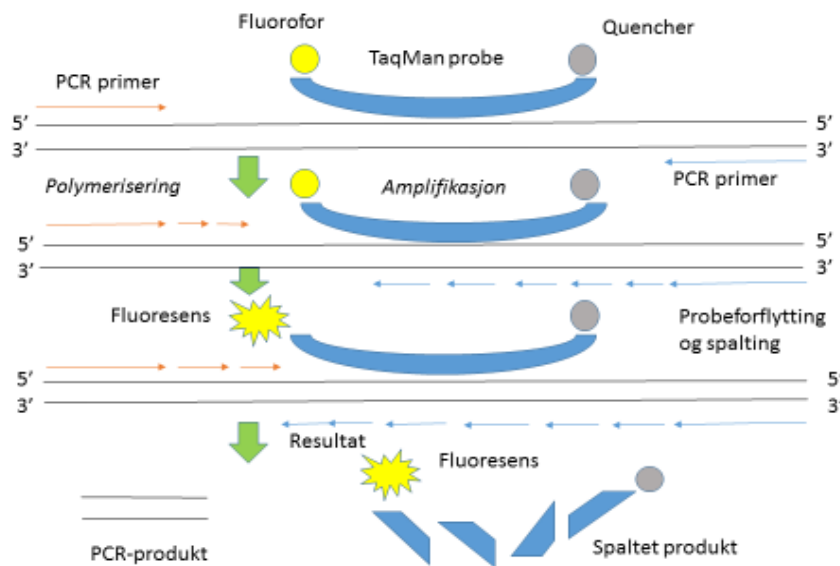
Resultatet ble vist i to mutasjonsgrupper V600E/V600E2/V600D og V600K/V600R/V600M. Idylla skilte ikke mellom de ulike typene mutasjon innenfor disse to gruppene (55).

Tabell 6. Tabellen viser en oversikt over mutasjonene i *BRAF* som påvises av Idylla, og i hvilken mutasjonsgruppe de tilhører (55).

MUTASJONSGRUPPE	MUTASJONSTYPE	DETALJER
V600E/E2/D	V600E	<ul style="list-style-type: none">• Baseendring: c.1799T>A• Aminosyreendring: p.(Val600Glu)
	V600E2	<ul style="list-style-type: none">• Baseendring: c.1799_1800TG>AA• Aminosyreendring: p.(Val600Glu)
	V600D	<ul style="list-style-type: none">• Baseendring: c.1799_1800TG>AT, c.1799_1800TG>AC• Aminosyreendring: p.(Val600Asp)
V600K/R/M	V600K	<ul style="list-style-type: none">• Baseendring: c.1798_1799GT>AA• Aminosyreendring: p.(Val600Lys)
	V600R	<ul style="list-style-type: none">• Baseendring: c.1798_1799GT>AG• Aminosyreendring: p.(Val600Arg)
	V600M	<ul style="list-style-type: none">• Baseendring: c.1798G>A• Aminosyreendring: p.(Val600Met)

BRAF-genmutasjonstest krevde et høyere antall neoplastiske celler i prøvemateriale for å kunne gi et gyldig resultat (55). Dette skyldes at Biocartis fremstilte *BRAF*-genmutasjonstest først, hvor testen ble validert med 50% neoplastiske celler.

BRAF-testen bruker også mindre sensitiv teknologi enn MNase teknologi, TaqMan-teknologi. TaqManproben består av en fluorofor i 5'enden og en quencher som hemmer fluoroforen i 3'enden. Ved binding av primer og videre polymerisering vil proben forflyttes og spaltes ved tilstedeværelse av målgenet. Quencheren som hemmet fluoroforen når TaqManproben var uspaltet vil ikke lenger hemme fluoresensen når proben er spaltet og lys emitterer som forklart i figur 4.



Figur 4. Bildet illustrerer mekanismen til TaqMan proben. TaqMan proben avhenger av 5'-3' nukleaseaktiviteten til Taq DNA-polymerase som spalter en dobbeltmerket probe under hybridisering av den komplementære målsekvensen. Dette resulterer i fluoresenssignal (108). Bildet er eget.

Ved bruk av input med store mengder V600G rapporterer Idylla™*BRAF*-mutasjonstest V600E/E2/D noe som angir V600G-kryssreaktivitet, ellers ble det ikke observert andre kryssreaktiviteter ved studie (55).

Sensitiviteten er 1% av målgenet med en positivitetsrate på 95% ved et 95% konfidensintervall (55).

Reproduserbarhet viste 100% samsvar med 95% konfidensintervall .

Reproduserbarhetspanelet bestod av kunstige svakt positive FFPE-prøver, 3,5% *BRAF*-mutasjonspositive av typen V600E og 5% *BRAF*-mutasjonspositive av typen V600K, og ble testet på to ulike Idylla-instrumenter i løpet av 5 dager på tre ulike laboratorier av 2 ulike operatører per laboratorium. Reproduserbarheten mellom laboratorier, mellom operatører og mellom instrumener ble testet (55).

En retrospektiv studie av prøver fra malignt melanom ble Idylla™*BRAF* evaluert i forhold til pyrosekvensering og det prosentvise samsvaret mellom begge metodene var på 98% med et ensidig konfidensintervall på 95%. Et studie med sammenligning av analyseresultater ved Idylla™*BRAF*- mutasjonstest og NGS viser til 100% konkordans (104).

3.2 Statistiske metoder

Det er beregnet antall kalenderdager før prøvesvar fra OUS sammenlignet med prøvesvartid lokalt på avdelingen ved VV HF på 33 prospektive FFPE-vev fra adenokarsinom i lunge fra 33 pasienter. Det ble analysert for *EGFR*-mutasjonstest ved OUS, og *KRAS*-mutasjonstest ved VV HF. Ved positivt analyseresultat på *KRAS*-mutasjonstest ble det ikke analysert for *EGFR*-mutasjon, men ved negativt resultat ble det analysert for både *EGFR*- og *KRAS*-mutasjon som ble utført samme dag. Antall dager fra dato for prøvetaking til analysesvar forelå både fra OUS og ved VV HF ble beregnet.

Ved hjelp av beskrivende statistikk ble gjennomsnitt, standardavvik, median, varianse, kvartilbredde og variasjonsbredde beregnet. Analysesvartidene så ikke ut til å være normalfordelt og det ble derfor testet for normalitet ved hjelp av testene Kolmogorov-Smirnov og Shapiro-Wiik som bekreftet dette. Siden antall dager ikke er normalfordelt, og det var to uavhengige grupper som skulle sammenlignes ble det brukt en ikke-parametrisk metode for å studere om det var forskjell i analysesvartidene. Mann-Whitney U test var den statistiske testen som ble brukt for å beregne om det var statistisk signifikant ($p < 0,05$) forskjell på analysesvartidene ved intern og eksternt analysesvartid. Median analysesvartid og interkvartiler ved internt og eksternt laboratorium ble illustrert ved hjelp av boksploott.

Det ble beregnet gjennomsnitt, median, standardavvik, varianse, variasjonsbredde, minimum, maksimum og kvartiler for dagene det tar fra prøvetaking til bestilling av spesialanalyser. Dette ble illustrert ved hjelp av tabell og boksploott. Det ble også beregnet gjennomsnitt, median, standardavvik, varianse, variasjonsbredde, minimum, maksimum og kvartiler for dagene fra bestilling av spesialanalyse til prøvesvar fra eksternt laboratorium (OUS) forelå. Dette ble også illustrert ved hjelp av tabell og boksploott.

Frekvensen av genmutasjon i *KRAS* og *EGFR* på både retrospektive og prospektive prøver ble beregnet i forhold til kjønn, i forhold til alder og i forhold til total antall biopsier fra adenokarsinom i lunge. Frekvensen av *KRAS*-genmutasjon av typen G12C i forhold til alle *KRAS*-genmutasjoner og i forhold til alle prøver med adenokarsinom ble også beregnet. Resultatene ble illustrert ved hjelp av sektordiagrammer, histogram og søylediagrammer.

Antallet kvinner i gruppen med *KRAS*-mutasjon var tilsynelatende høyere enn antallet menn, og derfor ble det testet på om *KRAS*-mutasjon og kjønn hadde en sammenheng. Menn og kvinner er kategoriske variabler og metoden som ble valgt for å studere om det var

sammenheng mellom kjønn og *KRAS*-mutasjon var kjiqvadrattest. Det ble testet for om det var statistisk signifikant sammenheng ($p < 0,05$).

Statistikken ble beregnet i Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versjon 25.

3.3 Kostnadsberegninger

Prisene for de ulike genmutasjonsanalysene som sendes til OUS er fastsatte priser for hver analyse. Disse inkluderer ikke personalkostnader eller andre utgifter som oppstår i forbindelse med sending av prøver.

Inneliggende, som er 60% av pasientgruppen med adenokarsinom i lunge, betaler VV HF for, mens prøver tatt polikliniske utgjør 40% og dekkes kostnadsmessig av Helfo. Anslagsvis nydiagnostiserte fra adenokarsionom i lunge per år er 90, hvor 54 er inneliggende pasienter ved VV HF.

Ved kostnadsoverslag på eget laboratorium ble det iberegnet testkit for genmutasjonsanalyse med *EGFR*, *KRAS* og *BRAF* og kostnader relatert til bruk av Idylla analysemaskin.

Idyllamaskinens innkjøpskostnad inkludert serviceavtale for 7 år var kr 670 000,-. Med bruk menes antall beregnede bruksår, hvor pris for analysemaskinen inkludert serviceavtale deles på antall år forventet brukstid og antall analyser som totalt analyseres på maskinen. Det er forventet at Idylla analysemaskin har en levetid på 7 år, og at det gjennomsnittlige prøveantallet er 350. Estimert kostnad per prøve på kr 273,-.

For kostnadsoverslag ved immunhistokjemisk analyse på ALK og ROS1 er det kun testkit og reagenser som er med i beregningen.

Personalkostnader kan anslås til en timelønn ved hver analyse ved egen avdeling, mens analyse eksternt kan det antas at personalkostnadene ved egen avdeling vil være 0,75 time for hver analyse. Utgifter til personal og infrastruktur er ikke medregnet, og resultatene vi kom frem til er derfor underestimert.

Gjennomsnittskostnad per prøve og kostnad per år ble beregnet ved å sammenligne hva det koster å analysere *EGFR*-mutasjon eksternt i forhold til på eget laboratorium.

Kostnadene ved å analysere med metode med *KRAS*-genmutasjonsanalyse som førstevalg innebar å analysere på *KRAS*-genmutasjon først, om den var negativ analyseres det for

genmutasjon i *EGFR* og så videre for *BRAF*-mutasjon, og immunhistokjemisk (IHK) analyse av ROS1 og ALK. Ved positive analysesvar på *KRAS*- og *EGFR*-mutasjonstest analyseres det ikke videre da disse mutasjonene ekskluderer hverandre.

Metode med *KRAS*-genmutasjonsanalyse (kostnad): $KRAS\text{-genmutasjonsanalyse kostnad} \cdot 1 + EGFR\text{-genmutasjonsanalyse kostnad} \cdot (1 - \text{andel } KRAS\text{-mutasjonspositive}) + (BRAF\text{-genmutasjonsanalyse kostnad} + ROS1\text{-IHK-kostnad} + ALK\text{-IHK-kostnad}) \cdot (1 - (\text{andel } KRAS\text{-mutasjonspositive} + EGFR\text{-mutasjonspositive})) = \text{Gjennomsnittskostnad per prøve.}$

Den prosentvise fordelingen av de ulike genmutasjonene brukes i beregningen av kostnader ved metode med *KRAS*-genmutasjonsanalyse.

Ved metoden uten *KRAS*-genmutasjonsanalyse analyseres det for genmutasjon i *EGFR*, *BRAF*, og proteinuttrykk for ROS1 og ALK.

Metode uten *KRAS*-genmutasjonsanalyse (kostnad): $EGFR\text{-genmutasjonsanalyse kostnad} + BRAF\text{-genmutasjonsanalyse kostnad} + ROS1\text{-IHK-kostnad} + ALK\text{-IHK-kostnad} = \text{Gjennomsnittskostnad per prøve.}$

Kostnadene ble beregnet per prøve og hvor mye dette utgjør per år ved metode med og uten *KRAS*-genmutasjonsanalyse.

4 Resultater

4.1 Analysestartider på interne i forhold til eksternt sendte prøver

Svartiden beregnes fra prøvetakingtidspunkt til endelig svar foreligger. Det varierer hvor lang tid det tar fra prøvetaking til diagnosen adenokarsinom stilles, og det videre bestilles analyser for proteinuttrykk og genmutasjoner.

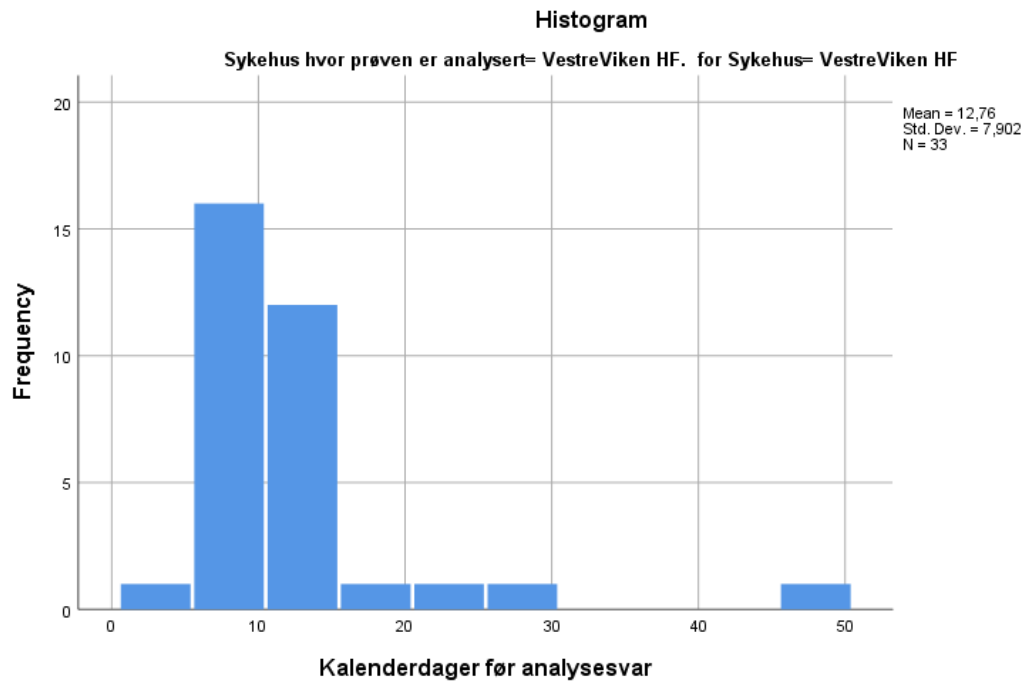
Analysesvartidene på de 33 prospektive ble testet for om de var normalfordelte i ved hjelp av Kolmogorov-Smirnov normalitetstest og Shapiro-Wilk test i Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). Testene bekrefter at analysesvartidene ikke er normalfordelte ved hjelp av tabell 7. Figur 5 og figur 6 illustrerer fordelingen ved hjelp av histogram.

Tabell 7. Tabellen viser testresultater for normalitet og bekrefter at analysesvartidene fra VV HF og OUS ikke er normalfordelt.

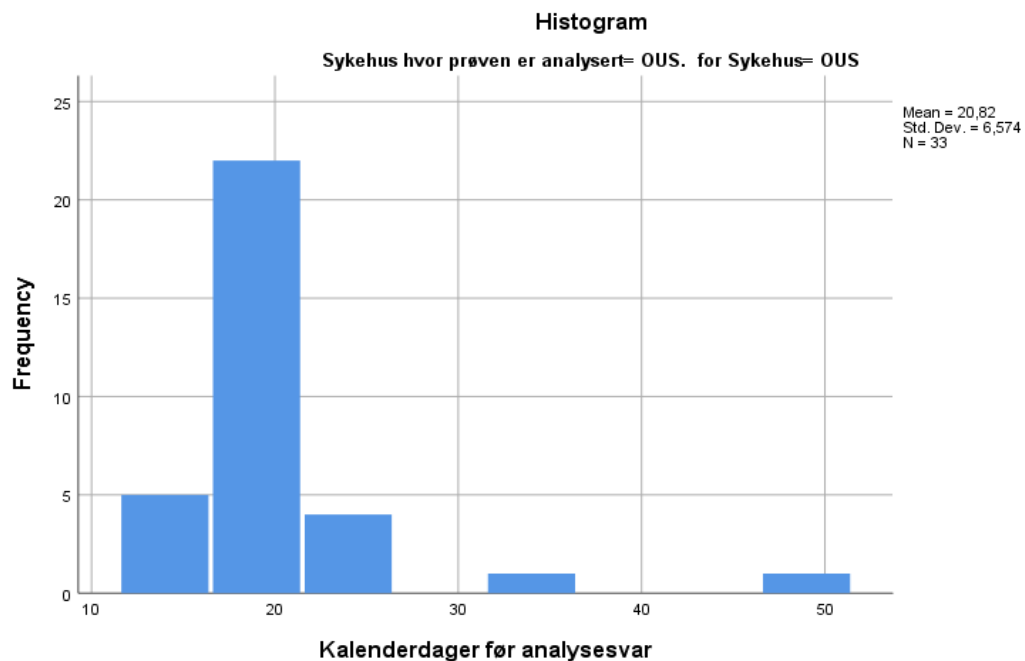
Tests of Normality							
	Sykehus hvor prøven er analysert	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	*df	**Sig.	Statistic	*df	**Sig.
Kalenderdager før analysesvar	VestreViken HF	,267	33	,000	,661	33	,000
	OUS	,307	33	,000	,638	33	,000

a. Lilliefors Significance Correction

*df=frihetsgrader (degrees of freedom), ** Sig.=signifikanse
Grønn farge indikerer at resultatet er statistisk signifikant ($p < 0,05$).



Figur 5. Histogrammet illustrerer fordelingen av kalenderdager før analysesvar foreligger ved internt laboratorium (VV HF).



Figur 6. Histogrammet illustrerer fordelingen av kalenderdager før analysesvar foreligger ved eksternt laboratorium (OUS).

Gjennomsnittlig analysesvartid ved internt laboratorium (VV HF) er 13 dager (tabell 8) og median på 10 dager (figur 7). Analysesvartid ved eksternt laboratorium (OUS) viser en gjennomsnittlig svartid på 21 dager (tabell 8) og en median på 20 dager (figur 7). Det er stor spredning på antall dager før analysesvar foreligger ved både VV HF og OUS, men noe høyere ved VV HF.

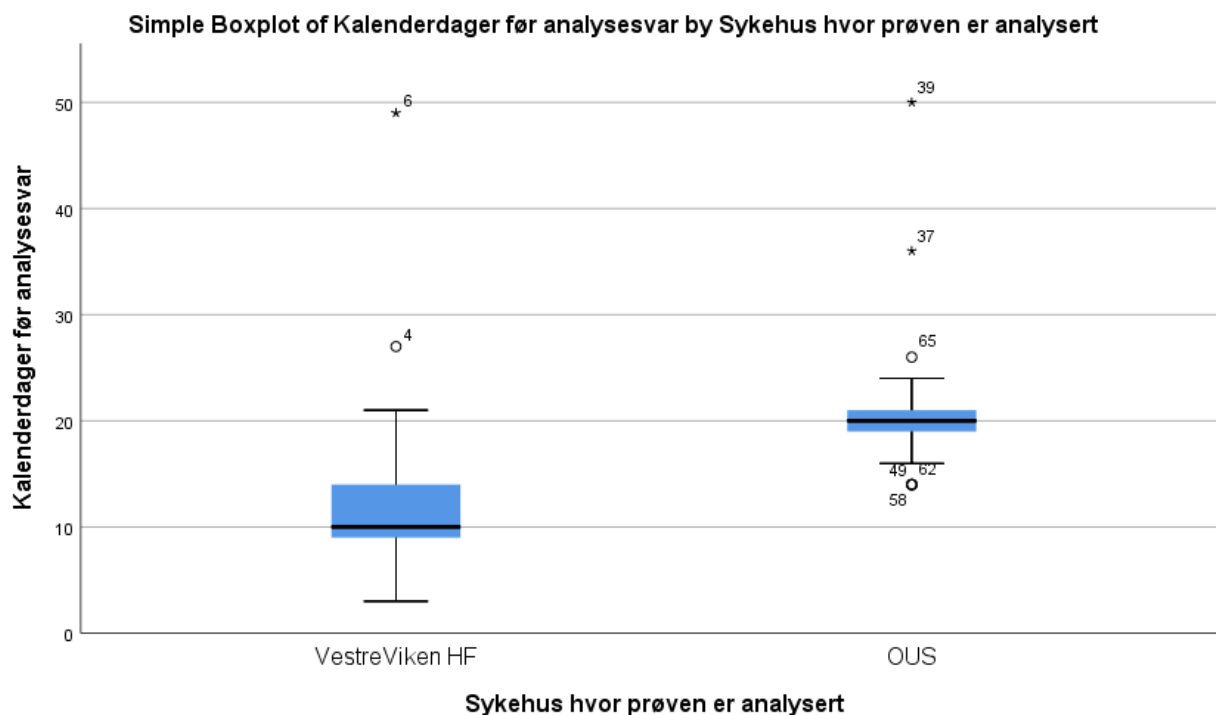
Tabell 8. Oversikt over beregnet beskrivende statistikk av analysesvardager.

Sykehuset hvor prøven er analysert	Gjennomsnitt (dager)	Antall (N)	*SD	Minimum (dager)	Maksimum (dager)	Varianse
VV HF	13	33	7,9	3	49	62,4
OUS	21	33	6,6	14	50	43,2

*SD=standardavvik (standard deviation).

Beregningen er utført i Statistical Package for the Social Sciences (SPSS).

Det interkvartile området er fra 9-15 dager ved analyse internt, og 19-21 dager ved analyse eksternt. Spredningen på dagene før analysesvar og graden av spredning illustreres i boksplottene. Det vises også ekstreme uteliggere som vil påvirke gjennomsnittverdien og derfor beregnes medianen som ikke er påvirket på samme måte av disse ekstremverdiene. Resultatene illustreres i figur 7.



Figur 7. Boksploottene illustrerer kalenderdager før analysesvar minste og største verdi, uteliiggere, øvre og nedre kvartil, median analysesvartid ved internt (VV HF) eksternt laboratorium (OUS).

*Ekstreme uteliiggere. Resultat langt utenfor interkvartilområdet, nummer angir plassering i rekken av resultater i SPSS.

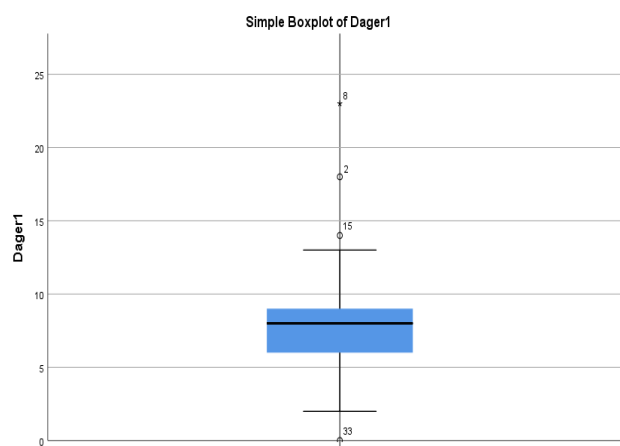
°Uteliggere. Resultat utenfor interkvartilområdet, nummer angir plassering i rekken av resultater i SPSS.

Analysesvartider på de prospektive FFPE-vev ved eksternt laboratorium ble sammenlignet med analysesvartider internt ved VV HF. Den ikke-parametriske testen, Mann-Whitney U test viser at analysesvartidene er signifikant forskjellige. Beregningen ble utført i Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) og er vedlagt oppgaven.

Fra prøvetaking til patolog bestiller spesialanalyser er det beregnet både et gjennomsnitt og en median på 8 dager. Ved beregning av beskrivende statistikk (standardavvik, varianse, variasjonsbredde, minste og største antall dager, persentiler) viser det stor spredning og variasjon i antall dager. Resultatet vises i tabell 9 og illustreres ved boksplott ved hjelp av figur 8.

Tabell 9. Oversikt over beskrivende statistikkberegninger av antall dager fra prøvetaking til bestilling av spesialanalyser.

Statistics		
		Dager1
N	Valid	33
	Missing	0
Mean		8
Median		8
Std. Deviation		4,5
Variance		20,1
Range		23
Minimum		0
Maximum		23
Percentiles	25	5,5
	50	8,0
	75	9,5

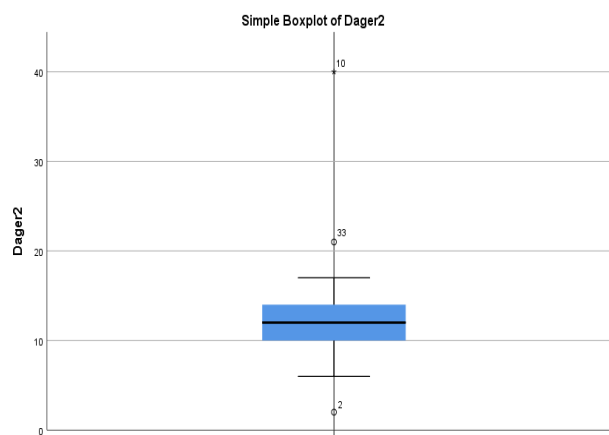


Figur 8. Boksplottet viser minste og største verdi, øvre og nedre kvartil og median på 8 dager fra prøvetaking til viderebestilling av spesialanalyser ved adenokarsinom i lunge. Resultater fra Statistical Package for the Social Sciences (SPSS).

Beregninger av tiden det tar fra bestilling av spesialanalyser til analysesvar foreligger fra eksternt laboratorium (OUS) er det beregnet gjennomsnitt, median, standardavvik, varians, variasjonsbredde, minste og største antall dager, persentiler og resultater fremkommer i tabell 10 og illustreres ved boksploott ved hjelp av figur 9. Resultatene her viser også en stor grad av spredning i antall kalenderdager.

Tabell 10. Oversikt over beskrivende statistikkberegninger av antall dager fra bestilling av spesialanalyser til analysesvar er mottatt fra eksternt laboratorium (OUS).

Statistics		Dager2
N	Valid	33
	Missing	0
Mean		13
Median		12
Std. Deviation		6,0
Variance		36,1
Range		38
Minimum		2
Maximum		40
Percentiles	25	9,5
	50	12,0
	75	14,5

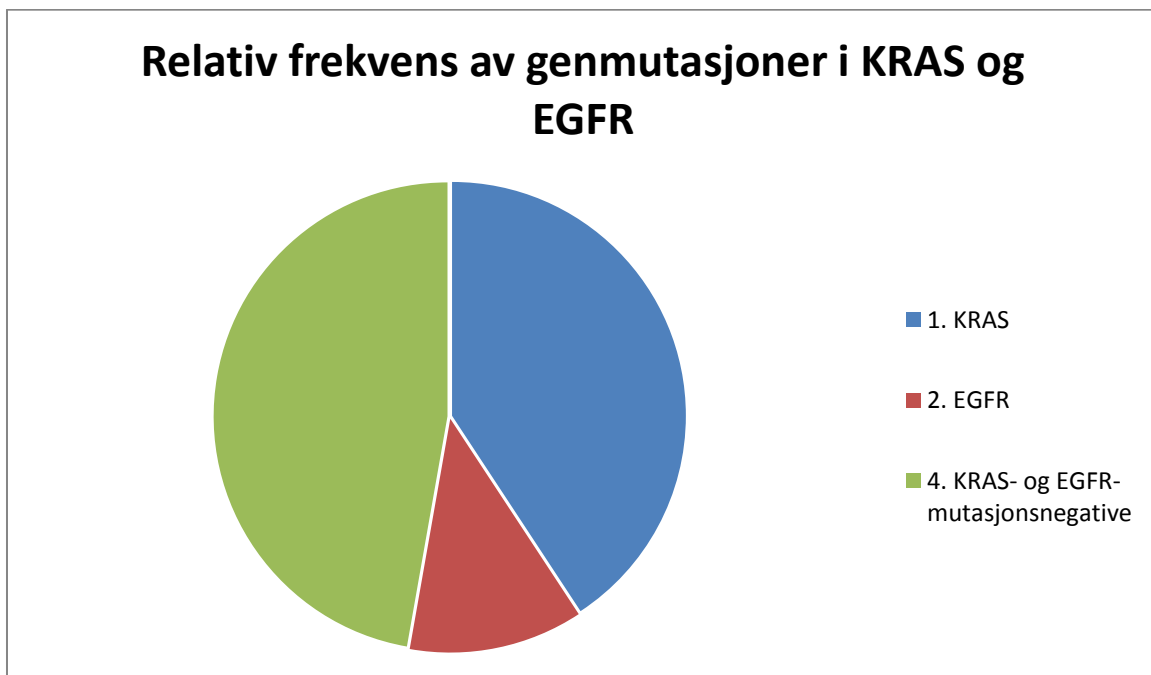


Figur 9. Boksplottet viser minste og største verdi, øvre og nedre kvartil og median på 12 dager fra spesialanalyser er bestilt til analysesvar er mottatt fra eksternt laboratorium. Resultater fra Statistical Package for the Social Sciences (SPSS).

4.2 Frekvens og relativ frekvens av genmutasjoner i *KRAS* og *EGFR* ved adenokarsinom i lunge

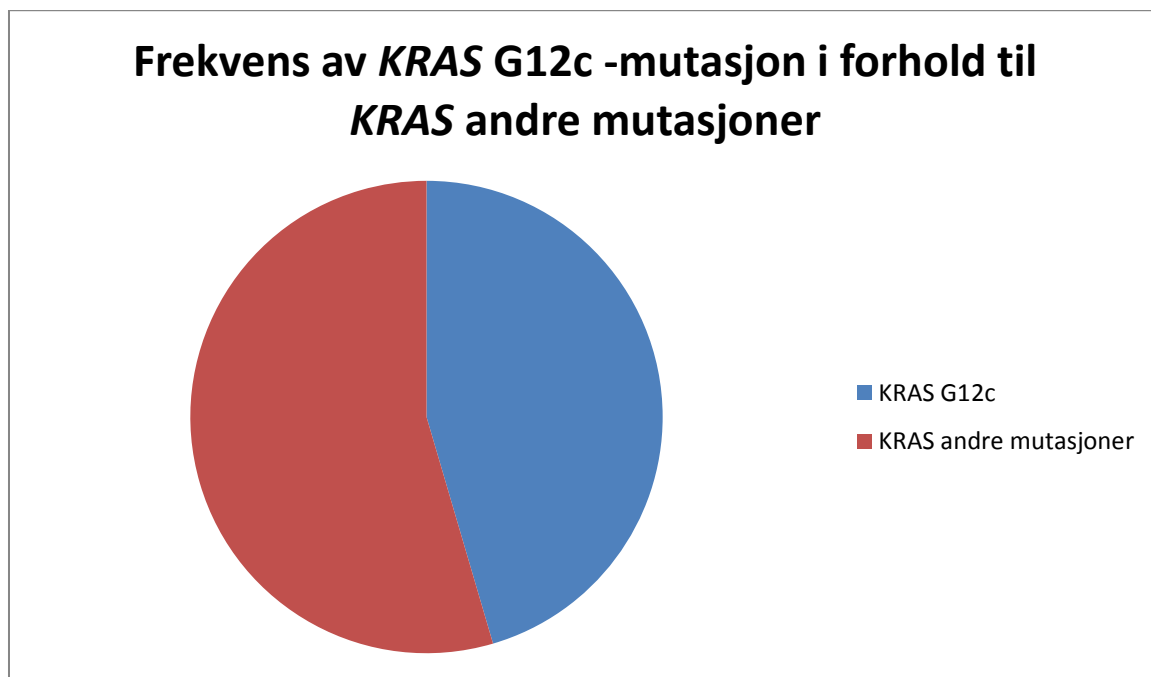
Genmutasjonsanalyser viser en frekvens på 41% for *KRAS*-mutasjonspositive og 12% er positive for genmutasjon i *EGFR*. Mutasjonsnegative for *KRAS* og *EGFR* er frekvensen 47%. Frekvensen er beregnet i forhold til 108 FFPE-vev fra adenokarsinom i lunge fra respektiv pasientgruppe på 108, hvor 46 er menn og 62 er kvinner.

BRAF-genmutasjon ble ikke analysert på prøver med lite materiale og det ble ikke beregnet frekvens, og de få resultatene vi fikk vil ligge under annet *KRAS*- og *EGFR*-mutasjonsnegative. Eventuelle positive resultater for ROS1 og ALK befinner seg i *KRAS*- og *EGFR*-mutasjonsnegative.



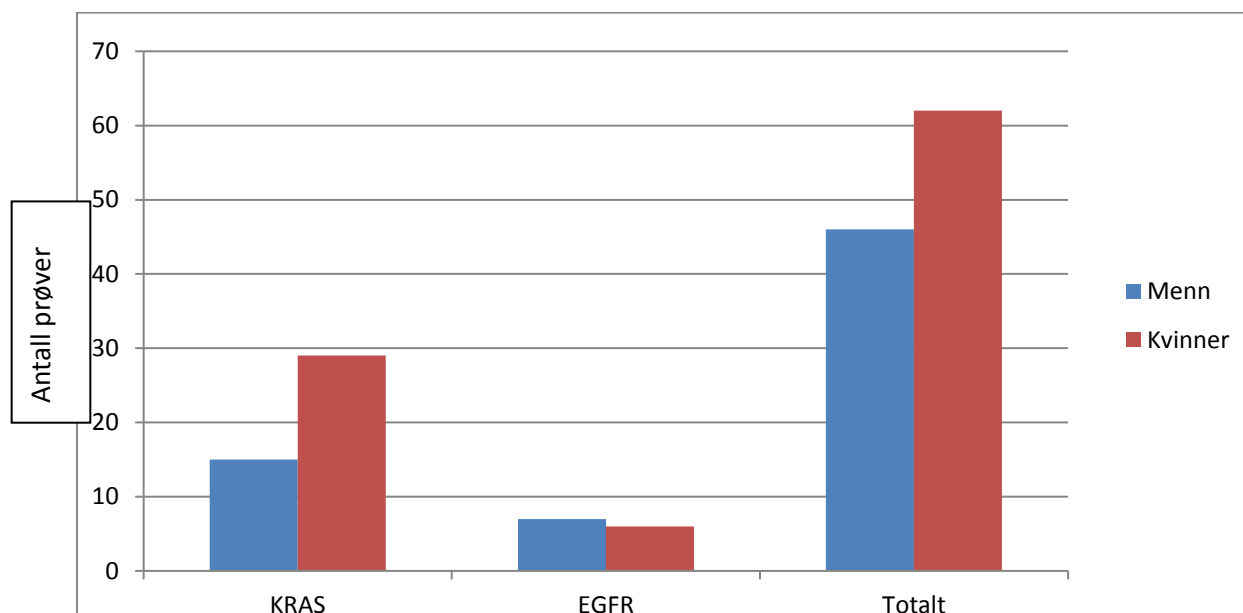
Figur 10. Sektordiagrammet viser den relative frekvensen av *KRAS*-, *EGFR*-genmutasjon ved adenokarsinom i lunge. Hvor det totale antallet er 108 FFPE-vev fra 108 ulike pasienter. Prøver med positivt resultat for *KRAS*-genmutasjonstest var 44 som tilsvarte 41%. Prøver med positivt svar for *EGFR*-genmutasjonstest var 13 som tilsvarte en andel på 12%. Det var 51 pasienter med negativt resultat for genmutasjon i *KRAS* og *EGFR*, som tilsvarende 47%.

Frekvensen av *KRAS*-mutasjon av typen G12C i forhold til andre *KRAS*-mutasjoner er 45% av totalt antall *KRAS*-mutasjoner i vårt utvalg og illustreres ved hjelp av sektordiagram (figur 11).



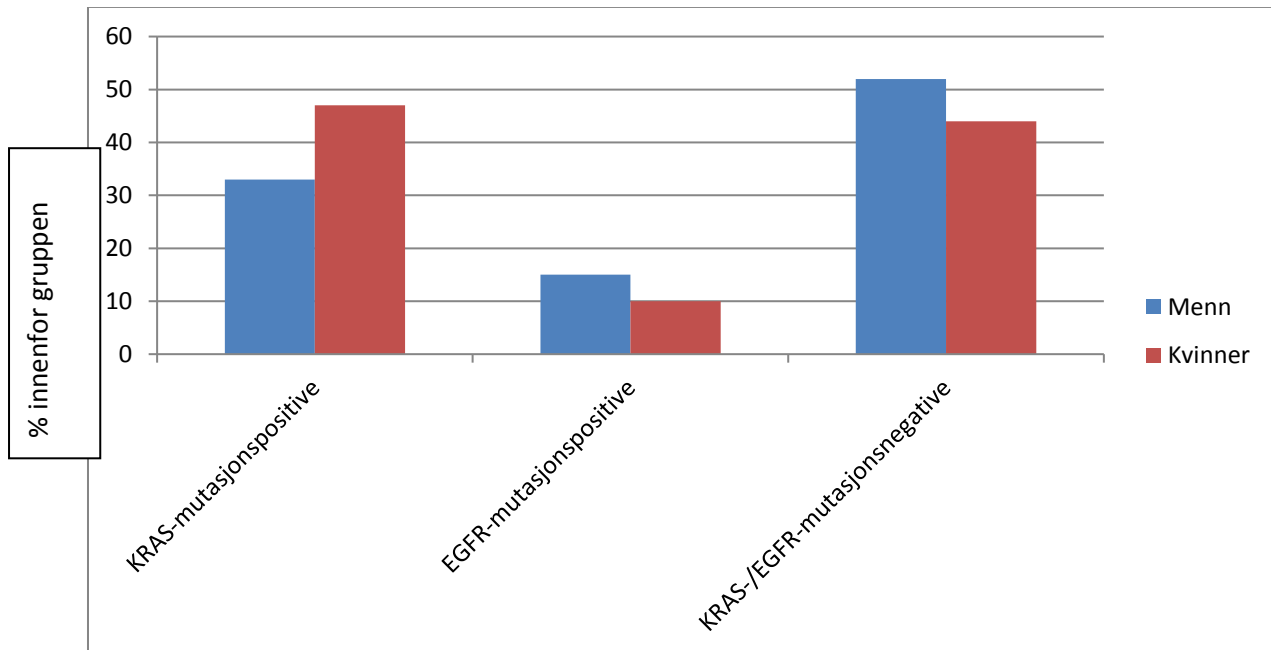
Figur 11. Sektordiagrammet viser frekvensen av *KRAS*-genmutasjon av typen G12C sammenlignet med *KRAS* andre mutasjoner. Totalt 44 prøver testet positiv for *KRAS*-genmutasjon, 20 av disse var *KRAS* av typen G12C-mutasjon. Frekvensen *KRAS* av typen G12C-mutasjon er i vårt materiale 45% av alle som er positive for *KRAS*-genmutasjon. I forhold til alle prøver fra adenokarsinom i lunge har 19% mutasjon i *KRAS* G12C.

Fordeling og frekvens av genmutasjoner i *EGFR* og *KRAS* ved adenokarsinom fordelt etter kjønn viser en høyere andel kvinner som er *KRAS*-mutasjonspositive enn menn. *EGFR*-mutasjonspositive er fordelt ganske likt. Av det totale antallet prøver fra adenokarsinom er kvinneandelen høyest i vårt utvalg.



Figur 12. Fordelingen av genmutasjon ved adenokarsinom i lunge relatert til kjønn ved analyse av 108 FFPE biopsier fra adenokarsinom i lunge. Histogrammet viser frekvens og fordeling av antall prøver i forhold til kjønn hvor *KRAS*-genmutasjonstest positive var 14% menn og 27% kvinner. Positive resultater for *EGFR*-genmutasjonstest er fordelt på 6% menn og 6% kvinner. Prosentandelen er av det totale antallet på 108 pasienter.

Ved sammenligning av menn og kvinners mutasjonsstatus i forhold til *KRAS* og *EGFR* i egen gruppe (kjønn) er det en høyere relativ frekvens for kvinner med *KRAS*-mutasjon innenfor kvinnegruppen, og en høyere relativ frekvens av *KRAS*- og *EGFR*-mutasjonsnegative menn innenfor gruppen med menn.

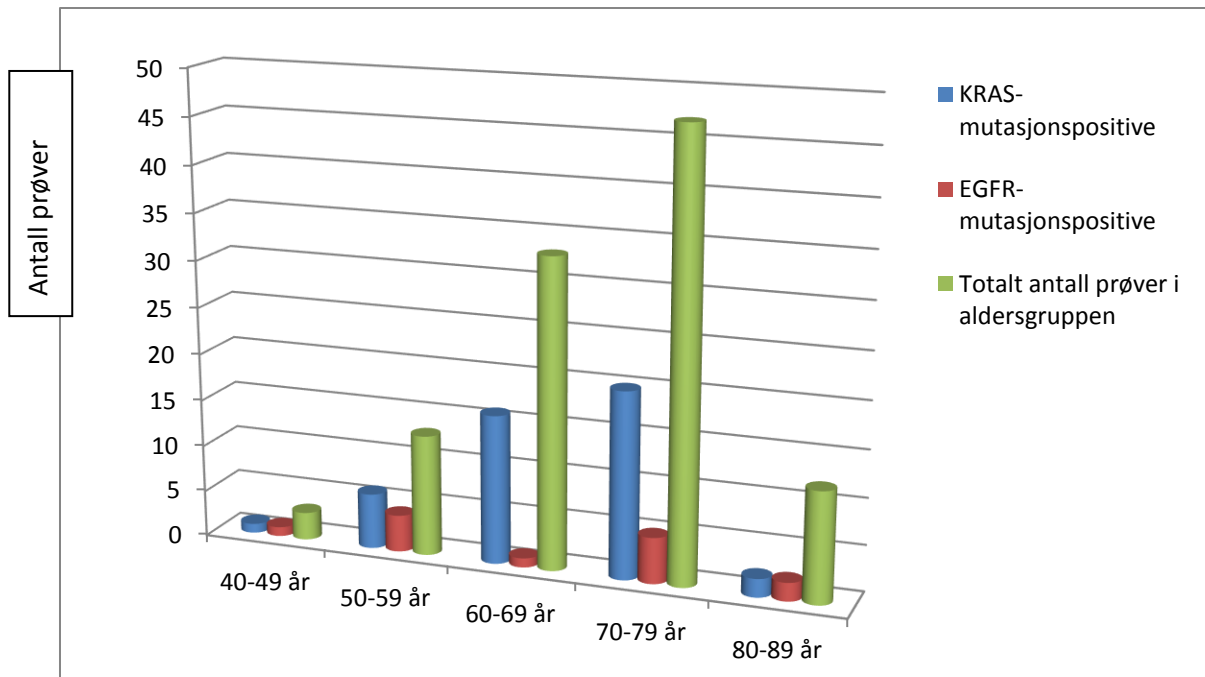


Figur 13. Histogrammet illustrerer prosentandelen menn og kvinner med tilhørende relativ frekvens av *KRAS*- og *EGFR*-genmutasjoner innenfor egen gruppe (kjønn).

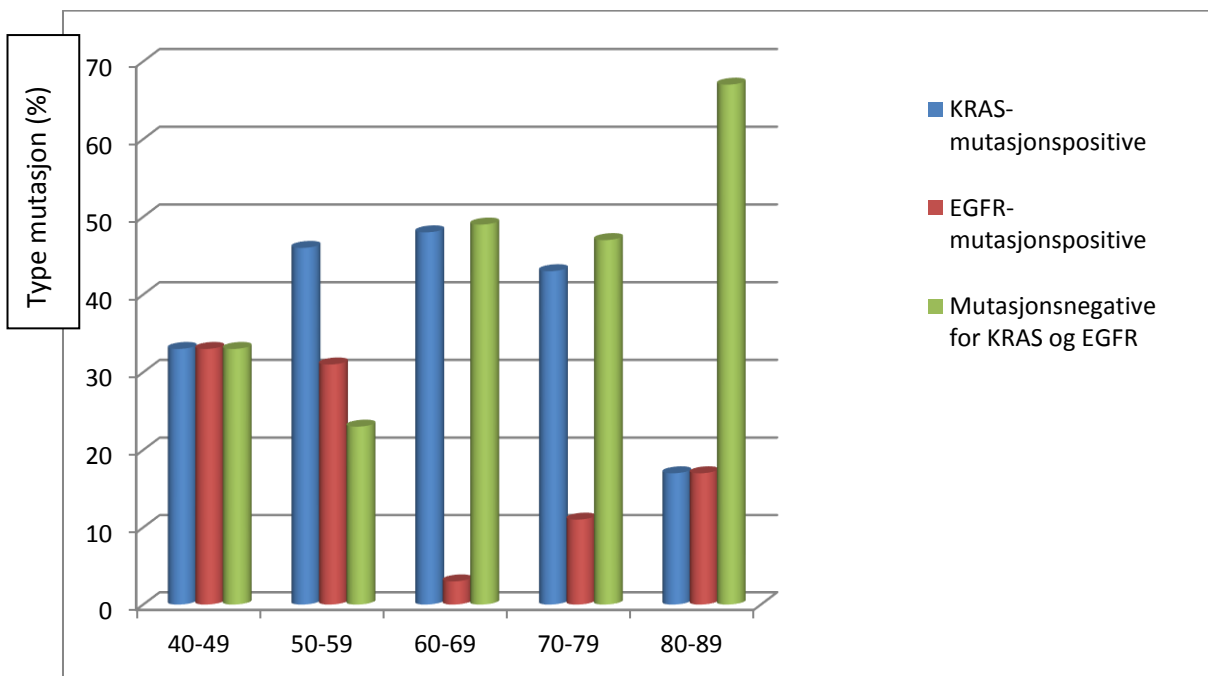
Frekvensen av genmutasjoner i *EGFR* og *KRAS* ved adenokarsinom i lunge relatert til alder viser i vårt utvalg at den aldersgruppen med høyest andel *KRAS*-mutasjoner i forhold til totalt antall prøver er 60-69 år, mens gruppen med høyest prosentandel *KRAS*-mutasjoner innenfor gruppen er aldersgruppen 50-59 år. *EGFR*-mutasjoner har høyest prosentandel ved aldersgruppen 50-59 år i forhold til egen aldersgruppe. Adenokarsinom har høyest insidens i aldersgruppen 70-79 år, og spesielt gruppen med *KRAS*- og *EGFR*-mutasjonsnegative. Tabell 11 viser til antallet prøver/pasienter i hver gruppe og prosentandel mutasjonspositive eller negative innenfor gruppen. Søylediagrammer (figur 14 og 15) illustrerer disse resultatene.

Tabell 11. Oversikt over antall pasienter og prosentandel av *KRAS*- og *EGFR*-mutasjonsstatus i hver aldersgruppe.

Alders- gruppe (år)	<i>KRAS</i> - mutasjonspositive Antall pasienter (prosentandel i aldersgruppen)	<i>EGFR</i> - mutasjonspositive Antall pasienter (prosentandel i aldersgruppen)	Mutasjonsnegativ for <i>KRAS</i> og <i>EGFR</i> Antall pasienter (prosentandel i aldersgruppen)
40-49	1 (33%)	1 (33%)	1 (33%)
50-59	6 (46%)	4 (31%)	3 (23%)
60-69	16 (48%)	1 (3%)	16 (49%)
70-79	20 (43%)	5 (11%)	22 (47%)
80-89	2 (17%)	2 (17%)	8 (67%)



Figur 14. Søylediagrammet viser frekvensen av *KRAS*-mutasjonpositive, *EGFR*-mutasjonpositive og totalt antall prøver i de ulike aldersgruppene.



Figur 15. Søylediagrammet viser den prosentvise fordelingen av genmutasjonene innen hver aldersgruppe.

To av 33 prospektive prøver viste ulike resultater for *EGFR*-mutasjonsanalyse fra VV HF og OUS. Den ene som var negativ ved VV HF og positiv ved OUS var årsaken lite eller ingen neoplastiske celler igjen i prøvematerialet. Den andre som testet positiv ved VV HF og negativt for *EGFR*-mutasjon på OUS, var årsaken uklar til denne diskrepansen. Begge prøvene er regnet som positive for *EGFR*-mutasjon i dette prøvematerialet.

Av prøvene som var mutasjonsnegative for *KRAS* og *EGFR* ble det analysert for *BRAF*-mutasjon på 45 prøver (36 retrospektive og 9 prospektive). Av de 36 retrospektive ble 27 resultater godkjent og 9 ble ikke-godkjent grunnet for lite prøvemateriale. En retrospektiv prøve var positiv for *BRAF*-mutasjon. Av de 9 prospektive ble det godkjent resultat på 7 prøver og ikke-godkjent resultat på 2, hvor ingen var positive for *BRAF*-mutasjon. De resterende mutasjonsnegative prøvene for *KRAS* og *EGFR* ble ikke analysert for *BRAF*-mutasjon på grunn av for lite prøvemateriale.

Det var en høyere andel kvinner enn menn som var *KRAS*-mutasjonspositive. Av det totale antallet pasienter på 108 som var fordelt på 62 kvinner og 46 menn, var 29 kvinner og 15 menn *KRAS*-mutasjonspositive. Det ble testet for om det var sammenheng mellom *KRAS*-mutasjon og kjønn ved hjelp av kjiqvadrattest. Den viste at det ikke var signifikant sammenheng ($P < 0,05$).

4.3 Kostnader

Kostnader for genmutasjonstest på *EGFR* analysert eksternt og internt er vist i Tabell 15.

Hvor kostnader ved analyse eksternt (OUS) for *EGFR*-genmutasjonstest per prøve er kr 6740,- og internt (VV HF) er kostnad per analyse for *EGFR*-genmutasjon per prøve kr 2023,-. Ved 54 prøver fra inneliggende pasienter utgjør dette kr 363 960,- for ekstern analyse og kr 109 242,- for analyse på eget laboratorium. Altså en differanse på kr 254 718,-.

Ved innføring av genmutasjonsanalyse Biocartis Idylla™*EGFR* ved VV HF vil besparelsen bli kr 254 718,- per år i forhold til dagens praksis.

Tabell 12. Tabellen viser en oversikt over anslagsvise kostnader for de ulike analysene og kostnader relatert disse

Analyse	Kostnad (Nkr)
KRAS-mutasjonstest (internt, VV HF)	1723,-
EGFR-mutasjonstest (internt, VV HF)	2023,-
BRAF-mutasjonstest (internt, VV HF)	1523,-
ALK IHK analyse (internt, VV HF)	870,-
ROS1 IHK analyse (internt, VV HF)	420,-
EGFR-mutasjonstest (eksternt, OUS)	6740,-

Prosentandel *KRAS*- og *EGFR*-genmutasjoner fra vårt materiale er beregnet å utgjøre henholdsvis 41% og 12%. Siden *BRAF*-mutasjoner, *ALK*- og *Ros1*-genrearrangementer utgjør tilsammen en mindre prosentandel beregner vi kostnad per prøve ved metode med *KRAS*-genmutasjonsanalyse. Metoden innebærer å analysere for *KRAS*-genmutasjonsanalyse først, om den er positiv stanser man der. *KRAS*-mutasjonsnegative analyseres videre for *EGFR*-genmutasjon. Stanser videre analyse ved positiv *EGFR*-mutasjonstest, men ved negativt resultat testes det videre på *BRAF*-genmutasjon, *ROS1*- og *ALK*- proteinuttrykk.

Metode med KRAS-genmutasjonsanalyse (kostnad per prøve):

Kr 1723,- (*KRAS*-mutasjonstest kostnad) + kr 2023,- (*EGFR*-mutasjonstest kostnad) · 0,59 + (kr 1523,- (*BRAF*-mutasjonstest kostnad) + kr 870,- (ALK IHK analysekostnad) + kr 420,- (ROS1 IHK analysekostnad)) · 0,47 = kr 4239,-

Faktorberegningen som ligger til grunn for resultatet er vist i tabell 13. Faktor reguleres etter frekvensen på *KRAS*- og *EGFR*-mutasjon i utvalget som skal testes etter metoden.

Tabell 13. Oversikt over kostnader og beregning av kostnader ved metoden med *KRAS*-mutasjonsanalyse.

Type analyse	Kostnad (Nkr)	Faktor utregnet etter frekvens	Sum (Nkr)
<i>KRAS</i> -mutasjonstest	1723,-	1	1723,-
<i>EGFR</i> -mutasjonstest	2023,-	0,59 (1- 0,41)	1194,-
<i>BRAF</i> -mutasjonstest + ALK IHK analyse + ROS1 IHK analyse	2813,-	0,47 (0,59-·0,12)	1322,-
Gjennomsnittskostnad per prøve			4239,-

*0,12=andelen *EGFR*-mutasjonspositive

Metoden uten *KRAS*-genmutasjonsanalyse innebærer analyse av *EGFR*-, *BRAF*-genmutasjonstest og immunhistokjemisk analyse av ROS1 og ALK på alle prøver med diagnose adenokarsinom i lunge.

Metode uten *KRAS*-genmutasjonsanalyse (kostnad per prøve):

Kr 2023,- (*EGFR*-mutasjonstest kostnad) + kr 1523,- (*BRAF*-mutasjonstest kostnad) + kr 870,- (*ALK* IHK analysekostnad) + kr 420,- (*ROS1* IHK analysekostnad) = kr 4836,-

Kostnadene for hver analyse vises også i tabell 14.

Tabell 14. Oversikt over kostnader ved metode uten *KRAS*-genmutasjonstest.

Type analyse	Kostnad (Nkr)
EGFR-mutasjonstest	2023,-
BRAF-mutasjonstest	1523,-
ALK IHK analyse	870,-
ROS1 IHK analyse	420,-
Gjennomsnittskostnad per prøve	4836,-

Ved bruk av formel vil metode med *KRAS*-genmutasjonsanalyse koste 4239,- per prøve og kr 228 906,- per år. Metode uten *KRAS*-genmutasjonsanalyse vil gi en gjennomsnittskostnad på kr 4836,- per prøve og kr 261 144,- per år.

Innføring av metode med *KRAS*-genmutasjonsanalyse vil sammenlignet med metode uten *KRAS*-genmutasjonsanalyse gi en innsparing på kr 32 238,- når vår beregning av prosentandel *KRAS*- og *EGFR*-mutasjonspositive er tatt med. Ved høyere eller lavere prosentandel *KRAS*- og *EGFR*-mutasjoner vil det bli andre kostnadmessige resultater. Om for eksempel andelen *KRAS*-mutasjoner er lavere vil metoden med *KRAS*-mutasjonsanalyse være mindre kostnadmessig besparende.

5 Diskusjon

Studiet av analysesvartider ved internt og eksternt laboratorium på 33 prospektive FFPE-vev fra adenokarsinom i lunge fra 33 pasienter viser en signifikant ($p < 0,05$) lavere analysesvartid ved å analysere på eget sykehus med Idylla™ mutasjonstest. Analyse lokalt på eget sykehus vil gjøre så pasientene kommer raskere i gang med behandling hvor prognose, overlevelse og pasienttilfredsheten bedres. Resultatet som viste lavere analysesvartid ved å analysere genmutasjonene lokalt var forventet, og det er hensiktsmessig å innføre denne praksisen.

Prøvetakingstidspunkt var registrert i sykehusets datasystem, dato for mottak av prøven til laboratorium og dato for bestilling av molekylære analyser er registrert nøyaktig i dette systemet. I denne studien ble prøvetakingstidspunktet beregnet som utgangspunkt for beregningen av analysesvartid. Analysesvartidspunktet fra eksternt laboratorium på *EGFR*-genmutasjonsanalyse og immunhistokjemiske analyser fra egen avdeling er registrert nøyaktig i sykehusets datasystem.

Analysesvartider fra internt laboratorium ble registrert i tabell, og noen av tidsangivelsene er estimerte siden vi analyserte for *KRAS*-genmutasjonsanalyse først, og *EGFR*-genmutasjon kun der *KRAS*-genmutasjonsanalyse var negativ.

En svakhet ved denne studien er at de lokale analysesvartidene ikke ble beregnet i en ordinær rutine, men ble analysert som et ekstra prosjekt og dermed heller ikke var berørt av eventuelle forsinkelser som kan oppstå i perioder med større prøvemengder i en normal rutinedrift på et laboratorium.

Våre resultater ved VV HF samsvarte med OUS prøvesvar foruten to prospektive prøver. Her var den ene positiv for *EGFR*-genmutasjon ved VV HF og analysesvar fra OUS var negativt, det andre prøvesvaret som ikke samsvarte var negativt for *EGFR*-genmutasjon ved VV HF og positivt analysesvar fra OUS. Forklaringen på sistnevnte var at det var for sparsomt eller manglet tumorceller i prøven. Det var 15 av 33 prospektive prøver som ble analysert parallelt på VV HF og OUS for *EGFR*-genmutasjon, henholdsvis Idylla™ mutasjonstest lokalt og Roche COBAS eksternt, og vi ser en diskordans på 2 av 15 prøver. Men her er sammenligningsmaterialet veldig lite. De resterende 18 av 33 prospektive prøvene var positive på *KRAS*-mutasjon og ble derfor ikke analysert for *EGFR*-mutasjon ved analyse lokalt. Litteraturen viser til høy sensitivitet og spesifisitet for Idylla™ mutasjonstest, men det forutsetter at det er nok celler tilsatt i testpatronen og at det er de neoplastiske cellene som er i testpatronen når prøven blir analysert (42, 98).

Kostnader ved å analysere på eksternt laboratorium innebærer faste priser for hver analyse, mens kostnad til personal for klargjøring og forsendelse av prøven ikke er medregnet, og derfor er kostnadene noe underestimerte ved analyse eksternt. Kostnadsberegningene for analyse lokalt er også estimert lavere enn faktisk kostnad da utgifter til personal og infrastruktur ikke er medregnet, som er høyere ved analyse internt enn eksternt. Forventet resultat var at det var kostnadsmessig fordelaktig å analysere lokalt, noe studien bekreftet.

Ved studiet av boksplottene som viser median og kvartilbredden til analysesvartiden ser det ut til å være en stor variasjon av analysesvartiden lokalt. Forklaringene her er at delen av analysesvartiden som varierer mer er tiden fra prøvetaking til molekylærbiologiske undersøkelser bestilles. Noen prøver blir analysert umiddelbart, noe som også gir en større variasjon i antall dager. Det er beregnet ved hjelp av beskrivende statistikk og bokplott som illustrere denne spredningen i antall kalenderdager. Noen av årsakene til denne spredningen kan forklares med forsinket mottak av biopsi, problemer med fremføring av preparatet og kapasitetsproblemer kan forekomme. Det kan være usikkert hvilken tumortype det er og det må bestilles ekstra immunhistokjemiske analyser for å typebestemme.

I vårt prøvemateriale på 108 retrospektive og prospektive FFPE-vev var det 41% som var positive for *KRAS*-genmutasjon. Andelen kvinner var høyere enn menn, noe som også er beskrevet i tidligere studier (35), men ved statistisk undersøkelse ved hjelp av kjiqvadrattest var ikke forskjellen signifikant ved $p < 0,05$.

Vårt resultat på 41% andel *KRAS*-genmutasjoner blant adenokarsinom i lunge er litt høyere enn litteraturen, som ofte viser til 30% (24, 36) andel *KRAS*-mutasjoner.

Det er en fordel at vårt utvalg er pasienter tilknyttet Vestre Viken HF, og dermed representativ for de som videre skal behandles på dette sykehuset. Siden det er epidemiologiske forskjeller i andelen *KRAS*-muterte og *EGFR*-muterte adenokarsinomer i lunge globalt og kanskje varierende nasjonalt kan det være riktig at *KRAS*-mutasjonsandelen er høy i vårt område. Det var forventet at *EGFR*-genmutasjonene skulle være mer frekvent blant kvinnene i studien, men her viste resultatet at det var likt mellom kjønnene. Ved et større utvalg vil fordeling og frekvens av genmutasjonene gi et mer pålitelig resultat.

Kostnadsberegningene ved metode med og uten *KRAS*-genmutasjonsanalyse, viser at metoden med *KRAS*-genmutasjonsanalyse er kostnadsbesparende ved en frekvens av *KRAS*-genmutasjon på 41%. Siden tidligere litteratur viser til en lavere andel *KRAS*-genmutasjoner,

ofte 30% har vi studert om det ved lavere prosentandel er kostnadmessig lønnsomt å analysere for *KRAS*-genmutasjon først. Ved 30% *KRAS*-mutasjonspositive vil metoden med *KRAS*-genmutasjonsanalyse være mindre gunstig kostnadmessig men fortsatt mer prisgunstig enn metoden uten *KRAS*-genmutasjonsanalyse, mens ved en redusert prosentandel på 20% *KRAS*-mutasjonspositive vil metoden uten *KRAS*-mutasjonsanalyse være mer kostnadsbesparende. Ved disse beregningene er det forbeholdt at prosentandel *EGFR*-mutasjonspositive er konstant.

Innføring av metode med *KRAS*-genmutasjonsanalyse er noe kostnadsbesparende, og innføring av *KRAS*-genmutasjonsanalyse vil være nyttig da det pågår en utprøving av målrettet behandling mot *KRAS*-genmutasjon G12C (37, 39), som kan resultere i behandling også mot denne mutasjonen og derfor er oppstart av *KRAS*-mutasjonsanalyse hensiktsmessig.

Lite prøvemateriale var et gjentakende problem, derfor ble det ikke analysert for *BRAF*-genmutasjon på alle *KRAS*- og *EGFR*-mutasjonsnegative som var planen i utgangspunktet. Det kan være en utfordring å få nok prøvemateriale da det ofte er sparsomt med celler som aspireres fra lunge eller metastaser ved finnålspunksjon.

Det kan være en ulempe at Idyllmaskinen krever en minste mengde tumorceller fra 10- 50% for hver analyse. Ved småbiopsier fra lungekreft må det snittes flere snitt for å tilfredsstille kravene analysen stiller, og dersom det er behov for å analysere flere gener må det tilsettes flere snitt fra tumorområde. I mange tilfeller blir tumormaterialet brukt opp ved få analyser slik at det ikke er mulig å utføre flere analyser. Om ikke prøvematerialet er tilstrekkelig nok til å utføre analysen med Idyllmaskinen må likevel materialet sendes til andre sykehus for å få utført analysen med andre metoder som NGS, som igjen medfører forlenget prøvesvartid som ikke er ønskelig på grunn av pakkeforløpet innenfor kreftdiagnostikk forsinkes betraktelig. Samtidig øker analysekostnadene for VV HF.

For å utnytte prøvematerialet man har på en optimal måte bør ekstraksjon av DNA utføres i forkant før oppstart av analyse (109). Prøver med lite prøvemateriale må derfor ekstraheres slik at alle nødvendige analyser kan utføres. Flytende biopsier kan også være en fremtidig løsning i enkelte tilfeller og forenkler tilgang til prøvemateriale (88).

Idyllmaskinen innehar fordelen ved at den er helautomatisk, og dermed er kontaminasjon et lite problem. Det trengs lite areal og ekstrautstyr for å analysere på Idyllmaskinen, og det

trengs ikke avtrekk eller andre krav til rommet den plasseres. Sensitivitet og spesifisiteten ved analysemetoden er høy og analysesvartiden er kort fra prøven tilsettes til svaret er klart.

I fremtiden vil det bli flere biomarkører som skal påvises som følge av flere målrettede behandlinger. Med hensyn på antallet analyser og liten prøvemengde kan NGS innføres og dermed kreves mindre prøvemateriale da det analyseres for mange forskjellige genmutasjoner samtidig. Ved påvisning av fusjonsgener som *ALK* og *ROS1* må RNA omdannes til cDNA før analyse på NGS. Det er beskrevet at det er kostnadmessig hensiktsmessig å utføre mutasjonsanalyser på NGS ved NSCLC, i forhold til mange enkeltgenundersøkelser (110).

Målrettet behandling som viser til god effekt for pasientgruppen med *BRAF*-mutasjon ved adenokarsinom i lunge er tilgjengelig (25), og dermed vil innføring av rutinemessig undersøkelse av *BRAF*-genmutasjon ved adenokarsinom i lunge være hensiktsmessig.

Noe som kan redusere antallet enkeltanalyser og problemet med lite prøvemateriale kan være ved en fremtidig løsning at *KRAS*-mutasjonsanalyse analyseres på Idyllamaskinen, som ved positivt svar ikke blir analysert videre for flere biomarkører. Ved negativt mutasjonsresultat på *KRAS* kan de resterende prøvene analyseres på NGS med et panel med klinisk relevante genmål. Studier viser at det er tydelige fordeler ved å innføre NGS, og ved en studie med sammenligning av NGS med konvensjonelle metoder er resultatet at det er et høyt samsvar mellom NGS og den konvensjonelle metoden ved påvisning av mutasjoner for *EGFR*, *BRAF*, *ALK* og *ROS1*. Ved *KRAS*-mutasjoner er ikke samsvaret like høyt, og real-time PCR viser i studie høyere sensitivitet (111). Ved å analysere på Idylla™*KRAS* før NGS vil det analyseres færre prøver på NGS, som resulterer i kostnadsbesparelse og det vil være behov for mindre mengde prøvemateriale. Det vil også føre til at pasienter som er mutasjonspositive på *KRAS* får raskt og pålitelig analyseresultat da Idylla™*KRAS* er rask og sensitiv (112, 113).

6 Konklusjon

Det er kostnadseffektivt og svært tidsbesparende å analysere på eget laboratorium i forhold til å sende prøvene eksternt for analyse. Det innebærer en stor pasientfordel å få raskere analysesvar på genmutasjonsanalyse ved adenokarsinom i lunge da pasienten kommer raskere i gang med riktig behandling og overlevelsen bedres.

Frekvensen viser at antallet *KRAS*-muterte adenokarsinomer blant 108 pro- og retrospektive FFPE vev er 41% i vår gruppe, og noe høyere hos kvinner. *EGFR*-muterte adenokarsinomer utgjør 12%. Andelen *KRAS*-mutasjoner av typen G12C utgjør 45% av alle *KRAS*-mutasjoner og 19% av det totale antallet med adenokarsinom i lunge.

Innføring av metode med *KRAS*-genmutasjonsanalyse gir en liten kostnadmessig fordel. Genmutasjonsanalyse på *KRAS* som førstevalg i rutinen er hensiktsmessig for å redusere antallet analyser og i tillegg gi informasjon om *KRAS* er mutert, da målrettet behandling mot mutert *KRAS*-protein av typen G12C viser lovende resultater ved prekliniske studier.

7 Kilder

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
2. Forrest SJ, Georger B, Janeway KA. Precision medicine in pediatric oncology. *Curr Opin Pediatr*. 2018;30(1):17-24.
3. Jackson SE, Chester JD. Personalised cancer medicine. *International journal of cancer*. 2015;137(2):262-6.
4. Kreftregisteret. Lungekreft Norge: Kreftregisteret; 2019 [updated 27.11.2019; cited 27.11.2019]. Available from: <https://www.kreftregisteret.no/>
5. Dødsårsakregisteret [updated 04.12.2019; cited 03.03.2020] [Available from: <http://statistikbank.fhi.no/dar/>].
6. Brustugun OT, Gronberg BH, Fjellbirkeland L, Helbekkmo N, Aanerud M, Grimsrud TK, et al. Substantial nation-wide improvement in lung cancer relative survival in Norway from 2000 to 2016. *Lung Cancer*. 2018;122:138-45.
7. McIntyre A, Ganti AK. Lung cancer-A global perspective. *J Surg Oncol*. 2017;115(5):550-4.
8. Corrales L, Rosell R, Cardona AF, Martin C, Zatarain-Barron ZL, Arrieta O. Lung cancer in never smokers: The role of different risk factors other than tobacco smoking. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2020;148:102895.
9. Sagerup CM, Nymoer DA, Halvorsen AR, Lund-Iversen M, Helland A, Brustugun OT. Human papilloma virus detection and typing in 334 lung cancer patients. *Acta Oncol*. 2014;53(7):952-7.
10. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc*. 2008;83(5):584-94.
11. UyBico SJ, Wu CC, Suh RD, Le NH, Brown K, Krishnam MS. Lung Cancer Staging Essentials: The New TNM Staging System and Potential Imaging Pitfalls. 2010;30(5):1163-81.
12. Nagy A, Pongor LS, Szabo A, Santarpia M, Gyorffy B. KRAS driven expression signature has prognostic power superior to mutation status in non-small cell lung cancer. *International journal of cancer*. 2017;140(4):930-7.
13. Blandin Knight S, Crosbie PA, Balata H, Chudziak J, Hussell T, Dive C. Progress and prospects of early detection in lung cancer. *Open biology*. 2017;7(9).

14. Leonetti A, Facchinetti F, Rossi G, Minari R, Conti A, Friboulet L, et al. BRAF in non-small cell lung cancer (NSCLC): Pickaxing another brick in the wall. *Cancer treatment reviews*. 2018;66:82-94.
15. Brustugun OT. Stratification in advanced non-small cell lung cancer: precision medicine in practice. 2016.
16. Rami-Porta R, Eberhardt WEE. Clinical implications of the innovations in the primary tumour and metastasis of the 8 th edition of the TNM classification for lung cancer. 2018. 2018:S2682-S5.
17. Van Schil PE, Rami-Porta R, Asamura H. The 8(th) TNM edition for lung cancer: a critical analysis. *Annals of translational medicine*. 2018;6(5):87.
18. Chuang JC, Liang Y, Wakelee HA. Neoadjuvant and Adjuvant Therapy for Non-Small Cell Lung Cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2017;31(1):31-44.
19. Roman M, Baraibar I, Lopez I, Nadal E, Rolfo C, Vicent S, et al. KRAS oncogene in non-small cell lung cancer: clinical perspectives on the treatment of an old target. *Mol Cancer*. 2018;17(1):33.
20. Berge EM, Doebele RC. Targeted therapies in non-small cell lung cancer: emerging oncogene targets following the success of epidermal growth factor receptor. *Seminars in oncology*. 2014;41(1):110-25.
21. Sui H, Ma N, Wang Y, Li H, Liu X, Su Y, et al. Anti-PD-1/PD-L1 Therapy for Non-Small-Cell Lung Cancer: Toward Personalized Medicine and Combination Strategies. *Journal of immunology research*. 2018;2018:6984948.
22. Sharpe AH, Pauken KE. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(3):153-67.
23. Helsedirektoratet. Norge2019 [cited 03.02.2020][Available from: <https://www.helsebiblioteket.no/retningslinjer/lungekreft/forord?hideme=true>].
24. Oikonomou E, Koustas E, Goulielmaki M, Pintzas A. BRAF vs RAS oncogenes: are mutations of the same pathway equal? Differential signalling and therapeutic implications. *Oncotarget*. 2014;5(23):11752-77.
25. Baik CS, Myall NJ, Wakelee HA. Targeting BRAF-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: From Molecular Profiling to Rationally Designed Therapy. *Oncologist*. 2017;22(7):786-96.
26. Fang S, Wang Z. EGFR mutations as a prognostic and predictive marker in non-small-cell lung cancer. *Drug Des Devel Ther*. 2014;8:1595-611.
27. Agustoni F, Suda K, Yu H, Ren S, Rivard CJ, Ellison K, et al. EGFR-directed monoclonal antibodies in combination with chemotherapy for treatment of non-small-cell lung cancer: an updated review of clinical trials and new perspectives in biomarkers analysis. *Cancer treatment reviews*. 2019;72:15-27.

28. Thomas A, Rajan A, Giaccone G. Tyrosine kinase inhibitors in lung cancer. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2012;26(3):589-605, viii.
29. Lodish H, Bretscher A, Amon A, Berk A, Krieger M, Ploegh H, Scott MP. *Molecular Cell Biology.* Molecular Cell Biology. 7 ed. New York, USA: W.H.Freeman and Company; 2013.
30. McBride OW, Swan DC, Tronick SR, Gol R, Klimanis D, Moore DE, et al. Regional chromosomal localization of N-ras, K-ras-1, K-ras-2 and myb oncogenes in human cells. *Nucleic Acids Res.* 1983;11(23):8221-36.
31. Villalobos P, Wistuba II. Lung Cancer Biomarkers. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2017;31(1):13-29.
32. Li S, Balmain A, Counter CM. A model for RAS mutation patterns in cancers: finding the sweet spot. *Nat Rev Cancer.* 2018;18(12):767-77.
33. Lindsay CR, Jamal-Hanjani M, Forster M, Blackhall F. KRAS: Reasons for optimism in lung cancer. *Eur J Cancer.* 2018;99:20-7.
34. Zhang Z, Stiegler AL, Boggon TJ, Kobayashi S, Halmos B. EGFR-mutated lung cancer: a paradigm of molecular oncology. *Oncotarget.* 2010;1(7):497-514.
35. Dogan S, Shen R, Ang DC, Johnson ML, D'Angelo SP, Paik PK, et al. Molecular epidemiology of EGFR and KRAS mutations in 3,026 lung adenocarcinomas: higher susceptibility of women to smoking-related KRAS-mutant cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2012;18(22):6169-77.
36. Cox AD, Fesik SW, Kimmelman AC, Luo J, Der CJ. Drugging the undruggable RAS: Mission possible? *Nature reviews Drug discovery.* 2014;13(11):828-51.
37. Canon J, Rex K, Saiki AY, Mohr C, Cooke K, Bagal D, et al. The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity. *Nature.* 2019;575(7781):217-23.
38. Janes MR, Zhang J, Li LS, Hansen R, Peters U, Guo X, et al. Targeting KRAS Mutant Cancers with a Covalent G12C-Specific Inhibitor. *Cell.* 2018;172(3):578-89.e17.
39. AMG 510 First to Inhibit "Undruggable" KRAS. *Cancer Discov.* 2019;9(8):988-9.
40. Lanman BA, Allen JR, Allen JG, Amegadzie AK, Ashton KS, Booker SK, et al. Discovery of a Covalent Inhibitor of KRAS(G12C) (AMG 510) for the Treatment of Solid Tumors. *J Med Chem.* 2020;63(1):52-65.
41. Chu QS. Targeting non-small cell lung cancer: driver mutation beyond epidermal growth factor mutation and anaplastic lymphoma kinase fusion. *Ther Adv Med Oncol.* 2020;12:1758835919895756.
42. Biocartis. Idylla KRAS Mutation test: Bruksanvisning. Mechelen, Belgia: Biocartis; 2017.

43. Khalil FK, Altiok S. Advances in EGFR as a Predictive Marker in Lung Adenocarcinoma. *Cancer Control*. 2015;22(2):193-9.
44. Zhang YL, Yuan JQ, Wang KF, Fu XH, Han XR, Threapleton D, et al. The prevalence of EGFR mutation in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2016;7(48):78985-93.
45. Kobayashi Y, Mitsudomi T. Not all epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer are created equal: Perspectives for individualized treatment strategy. *Cancer Sci*. 2016;107(9):1179-86.
46. Tseng JS, Su KY, Yang TY, Chen KC, Hsu KH, Chen HY, et al. The emergence of T790M mutation in EGFR-mutant lung adenocarcinoma patients having a history of acquired resistance to EGFR-TKI: focus on rebiopsy timing and long-term existence of T790M. *Oncotarget*. 2016;7(30):48059-69.
47. Wu SG, Shih JY. Management of acquired resistance to EGFR TKI-targeted therapy in advanced non-small cell lung cancer. *Mol Cancer*. 2018;17(1):38.
48. Fujimoto J, Wistuba, II. Current concepts on the molecular pathology of non-small cell lung carcinoma. *Semin Diagn Pathol*. 2014;31(4):306-13.
49. Fan X, Liu B, Xu H, Yu B, Shi S, Zhang J, et al. Immunostaining with EGFR mutation-specific antibodies: a reliable screening method for lung adenocarcinomas harboring EGFR mutation in biopsy and resection samples. *Hum Pathol*. 2013;44(8):1499-507.
50. Nong L, Zhang Z, Xiong Y, Zheng Y, Li X, Li D, et al. Comparison of next-generation sequencing and immunohistochemistry analysis for targeted therapy-related genomic status in lung cancer patients. *Journal of thoracic disease*. 2019;11(12):4992-5003.
51. Cardarella S, Ogino A, Nishino M, Butaney M, Shen J, Lydon C, et al. Clinical, pathologic, and biologic features associated with BRAF mutations in non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013;19(16):4532-40.
52. Paik PK, Arcila ME, Fara M, Sima CS, Miller VA, Kris MG, et al. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol*. 2011;29(15):2046-51.
53. Long GV, Flaherty KT, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, et al. Dabrafenib plus trametinib versus dabrafenib monotherapy in patients with metastatic BRAF V600E/K-mutant melanoma: long-term survival and safety analysis of a phase 3 study. *Ann Oncol*. 2017;28(7):1631-9.
54. O'Leary CG, Andelkovic V, Ladwa R, Pavlakis N, Zhou C, Hirsch F, et al. Targeting BRAF mutations in non-small cell lung cancer. *Translational lung cancer research*. 2019;8(6):1119-24.
55. Biocartis. Idylla BRAF Mutation test: Bruksanvisning. Mechelen, Belgia: Biocartis; 2018.
56. Zhao Z, Verma V, Zhang M. Anaplastic lymphoma kinase: Role in cancer and therapy perspective. *Cancer Biol Ther*. 2015;16(12):1691-701.

57. Du X, Shao Y, Qin HF, Tai YH, Gao HJ. ALK-rearrangement in non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Thoracic cancer*. 2018;9(4):423-30.
58. Lee T, Lee B, Choi YL, Han J, Ahn MJ, Um SW. Non-small Cell Lung Cancer with Concomitant EGFR, KRAS, and ALK Mutation: Clinicopathologic Features of 12 Cases. *J Pathol Transl Med*. 2016;50(3):197-203.
59. Sholl LM, Aisner DL, Varella-Garcia M, Berry LD, Dias-Santagata D, Wistuba, II, et al. Multi-institutional Oncogenic Driver Mutation Analysis in Lung Adenocarcinoma: The Lung Cancer Mutation Consortium Experience. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2015;10(5):768-77.
60. Luk PP, Selinger CI, Mahar A, Cooper WA. Biomarkers for ALK and ROS1 in Lung Cancer: Immunohistochemistry and Fluorescent In Situ Hybridization. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(8):922-8.
61. Paik J, Dhillon S. Alectinib: A Review in Advanced, ALK-Positive NSCLC. *Drugs*. 2018;78(12):1247-57.
62. Chang WC, Kim HK, Shin BK. Clinicopathological features and diagnostic methods of ALK fusionpositive nonsmall cell lung cancer in Korea. *Oncol Rep*. 2020;43(1):218-28.
63. Tachon G, Cortes U, Richard S, Martin S, Milin S, Evrard C, et al. Targeted RNA-sequencing assays: a step forward compared to FISH and IHC techniques? *Cancer Med*. 2019;8(18):7556-66.
64. Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol*. 2012;30(8):863-70.
65. Bubendorf L, Buttner R, Al-Dayel F, Dietel M, Elmberger G, Kerr K, et al. Testing for ROS1 in non-small cell lung cancer: a review with recommendations. *Virchows Arch*. 2016;469(5):489-503.
66. Morris TA, Khoo C, Solomon BJ. Targeting ROS1 Rearrangements in Non-small Cell Lung Cancer: Crizotinib and Newer Generation Tyrosine Kinase Inhibitors. *Drugs*. 2019;79(12):1277-86.
67. Roskoski R, Jr. ROS1 protein-tyrosine kinase inhibitors in the treatment of ROS1 fusion protein-driven non-small cell lung cancers. *Pharmacol Res*. 2017;121:202-12.
68. Cao B, Wei P, Liu Z, Bi R, Lu Y, Zhang L, et al. Detection of lung adenocarcinoma with ROS1 rearrangement by IHC, FISH, and RT-PCR and analysis of its clinicopathologic features. *Onco Targets Ther*. 2016;9:131-8.
69. Wang R, Hu H, Pan Y, Li Y, Ye T, Li C, et al. RET fusions define a unique molecular and clinicopathologic subtype of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2012;30(35):4352-9.
70. Lipson D, Capelletti M, Yelensky R, Otto G, Parker A, Jarosz M, et al. Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. *Nat Med*. 2012;18(3):382-4.

71. Ferrara R, Auger N, Auclin E, Besse B. Clinical and Translational Implications of RET Rearrangements in Non-Small Cell Lung Cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2018;13(1):27-45.
72. Zhen Z, Giordano S, Longati P, Medico E, Campiglio M, Comoglio PM. Structural and functional domains critical for constitutive activation of the HGF-receptor (Met). *Oncogene*. 1994;9(6):1691-7.
73. Paik PK, Drilon A, Fan PD, Yu H, Rekhtman N, Ginsberg MS, et al. Response to MET inhibitors in patients with stage IV lung adenocarcinomas harboring MET mutations causing exon 14 skipping. *Cancer Discov*. 2015;5(8):842-9.
74. Garinet S, Laurent-Puig P, Blons H, Oudart JB. Current and Future Molecular Testing in NSCLC, What Can We Expect from New Sequencing Technologies? *Journal of clinical medicine*. 2018;7(6).
75. Jankovic R, H JG, Cavic M, Clemente C, Lind M, Murillo Carrasco A, et al. LungCARD - Report on worldwide research and clinical practices related to lung cancer. *Journal of BUON : official journal of the Balkan Union of Oncology*. 2019;24(1):11-9.
76. Ricciuti B, Brambilla M, Metro G, Baglivo S, Matocci R, Pirro M, et al. Targeting NTRK fusion in non-small cell lung cancer: rationale and clinical evidence. *Med Oncol*. 2017;34(6):105.
77. Campos PF, Gilbert TM. DNA extraction from formalin-fixed material. *Methods Mol Biol*. 2012;840:81-5.
78. Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *J Biomed Biotechnol*. 2009;2009:574398.
79. Sjøberg NO. *Molekylær genetikk*. 4 ed. Norge: Forlaget vett og viten AS; 2006 2006. 333 p.
80. Strachan T, Read A. *Human molecular genetics*. 4 ed. USA: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC; 2011.
81. Pabinger S, Rodiger S, Kriegner A, Vierlinger K, Weinhausel A. A survey of tools for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data. *Biomolecular detection and quantification*. 2014;1(1):23-33.
82. Garcia J, Forestier J, Dusserre E, Wozny AS, Geiguer F, Merle P, et al. Cross-platform comparison for the detection of RAS mutations in cfDNA (ddPCR Biorad detection assay, BEAMing assay, and NGS strategy). *Oncotarget*. 2018;9(30):21122-31.
83. Rizzo JM, Buck MJ. Key principles and clinical applications of "next-generation" DNA sequencing. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2012;5(7):887-900.
84. Harrington CT, Lin EI, Olson MT, Eshleman JR. Fundamentals of pyrosequencing. *Arch Pathol Lab Med*. 2013;137(9):1296-303.

85. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol*. 2018;122(1):e59.
86. Yohe S, Thyagarajan B. Review of Clinical Next-Generation Sequencing. *Arch Pathol Lab Med*. 2017;141(11):1544-57.
87. Nikiforova MN, Nikiforov YE. Molecular Anatomic Pathology: Principles, techniques, and application to immunohostologic diagnosis. In: Dabbs DJ, editor. *Diagnostic Immunohistochemistry Theranostic and genomic applications*. 3 ed 2010. p. 47-62.
88. Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin Chem*. 2015;61(1):112-23.
89. Zhang Y, Chang L, Yang Y, Fang W, Guan Y, Wu A, et al. Intratumor heterogeneity comparison among different subtypes of non-small-cell lung cancer through multi-region tissue and matched ctDNA sequencing. *Mol Cancer*. 2019;18(1):7.
90. Mroz EA, Rocco JW. The challenges of tumor genetic diversity. *Cancer*. 2017;123(6):917-27.
91. Makarov M, Peled N, Shochat T, Zer A, Rotem O, Dudnik E. Circulating Tumor DNA T790M Testing as a Predictor of Osimertinib Efficacy in Epidermal Growth Factor Receptor Mutant Non-small Cell Lung Cancer: A Single Center Experience. *Isr Med Assoc J*. 2019;21(6):394-8.
92. Rosell R, Karachaliou N. Lung cancer: Using ctDNA to track EGFR and KRAS mutations in advanced-stage disease. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016;13(7):401-2.
93. Pi C, Zhang MF, Peng XX, Zhang YC, Xu CR, Zhou Q. Liquid biopsy in non-small cell lung cancer: a key role in the future of personalized medicine? *Expert Rev Mol Diagn*. 2017;17(12):1089-96.
94. Isaksson S, George AM, Jonsson M, Cirenajwis H, Jonsson P, Bendahl PO, et al. Pre-operative plasma cell-free circulating tumor DNA and serum protein tumor markers as predictors of lung adenocarcinoma recurrence. *Acta Oncol*. 2019;58(8):1079-86.
95. Hu Y, Ulrich BC, Supplee J, Kuang Y, Lizotte PH, Feeney NB, et al. False-Positive Plasma Genotyping Due to Clonal Hematopoiesis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2018;24(18):4437-43.
96. Broek D, Hiltermann TJN, Biesma B, Dinjens WN, Hart NA, Hinrichs JW, et al. Implementation of Novel Molecular Biomarkers for Non-small Cell Lung Cancer in the Netherlands: How to Deal With Increasing Complexity. *Frontiers in oncology*. 2019;9:1521.
97. Biocartis. Idylla platform: Biocartis; 2020 [updated 2020; cited 10.03.2020]. Available from: <https://www.biocartis.com/en/meet-idylla/idylla-platform>.
98. Biocartis. Idylla EGFR Mutation test: Bruksanvisning. Mechelen, Belgia: Biocartis; 2020.

99. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol.* 2002;161(6):1961-71.
100. Howat WJ, Wilson BA. Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods.* 2014;70(1):12-9.
101. Guyard A, Boyez A, Pujals A, Robe C, Tran Van Nhieu J, Allory Y, et al. DNA degrades during storage in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue blocks. *Virchows Arch.* 2017;471(4):491-500.
102. Mokany E, Tan YL, Bone SM, Fuery CJ, Todd AV. MNAzyme qPCR with superior multiplexing capacity. *Clin Chem.* 2013;59(2):419-26.
103. Mokany E, Todd AV. MNAzyme qPCR: a superior tool for multiplex qPCR. *Methods Mol Biol.* 2013;1039:31-49.
104. Van Haele M, Vander Borght S, Ceulemans A, Wieers M, Metsu S, Sagaert X, et al. Rapid clinical mutational testing of KRAS, BRAF and EGFR: a prospective comparative analysis of the Idylla technique with high-throughput next-generation sequencing. *Journal of clinical pathology.* 2019.
105. Ilie M, Butori C, Lassalle S, Heeke S, Piton N, Sabourin JC, et al. Optimization of EGFR mutation detection by the fully-automated qPCR-based Idylla system on tumor tissue from patients with non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* 2017;8(61):103055-62.
106. De Luca C, Rappa AG, Gragnano G, Malapelle U, Troncione G, Barberis M. Idylla assay and next generation sequencing: an integrated EGFR mutational testing algorithm. *Journal of clinical pathology.* 2018;71(8):745-50.
107. De Luca C, Gragnano G, Pisapia P, Vigliar E, Malapelle U, Bellevicine C, et al. EGFR mutation detection on lung cancer cytological specimens by the novel fully automated PCR-based Idylla EGFR Mutation Assay. *Journal of clinical pathology.* 2017;70(4):295-300.
108. Botes M, de Kwaadsteniet M, Cloete TE. Application of quantitative PCR for the detection of microorganisms in water. *Anal Bioanal Chem.* 2013;405(1):91-108.
109. Patel PG, Selvarajah S, Guerard KP, Bartlett JMS, Lapointe J, Berman DM, et al. Reliability and performance of commercial RNA and DNA extraction kits for FFPE tissue cores. *PLoS one.* 2017;12(6):e0179732.
110. Yu TM, Morrison C, Gold EJ, Tradonsky A, Arnold RJG. Budget Impact of Next-Generation Sequencing for Molecular Assessment of Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Value Health.* 2018;21(11):1278-85.
111. Simarro J, Murria R, Perez-Simo G, Llop M, Mancheno N, Ramos D, et al. Development, Implementation and Assessment of Molecular Diagnostics by Next Generation Sequencing in Personalized Treatment of Cancer: Experience of a Public Reference Healthcare Hospital. *Cancers (Basel).* 2019;11(8).

112. Sherwood JL, Brown H, Rettino A, Schreieck A, Clark G, Claes B, et al. Key differences between 13 KRAS mutation detection technologies and their relevance for clinical practice. *ESMO open*. 2017;2(4):e000235.

113. Lambros L, Caumont C, Guibourg B, Barel F, Quintin-Roue I, Marcorelles P, et al. Evaluation of a fast and fully automated platform to diagnose EGFR and KRAS mutations in formalin-fixed and paraffin-embedded non-small cell lung cancer samples in less than one day. *Journal of clinical pathology*. 2017;70(6):544-9.

Vedlegg 1 Oversikt over antall dager før analysesvar foreligger

<i>Preparatnummer</i>	<i>Prøvetakingsdato</i>	<i>Analysesvardato ved VV HF</i>	<i>Antall kalenderdager før analysesvar foreligger fra VV HF</i>	<i>Analysesvar mottatt fra OUS</i>	<i>Antall kalenderdager før analysesvar foreligger fra OUS</i>
P001	14.08.19	23.08.19	9	03.09.19	20
P002	08.08.19	27.08.19	9	04.09.19	20
P003	23.08.19	03.09.19	11	12.09.19	20
P004	20.08.19	05.09.19	16	11.09.19	22
P005	20.08.19	05.09.19	16	11.09.19	22
P006	02.09.19	11.09.19	9	19.09.19	17
P007	02.09.19	11.09.19	9	19.09.19	17
P008	21.08.19	17.09.19	27	26.09.19	36
P009	16.09.19	26.09.19	10	10.10.19	24
P010	27.08.19	15.10.19	49	16.10.19	50
P011	27.09.19	15.10.19	18	16.10.19	19
P012	18.10.19	28.10.19	10	06.11.19	19
P013	23.10.19	30.10.19	7	06.11.19	14
P014	29.10.19	13.11.19	15	19.11.19	21
P015	29.10.19	13.11.19	15	18.11.19	20
P016	30.10.19	13.11.19	14	18.11.19	19
P017	04.11.19	13.11.19	9	25.11.19	21
P018	04.11.19	13.11.19	9	25.11.19	21
P019	06.11.19	15.11.19	9	26.11.19	20
P020	12.11.19	15.11.19	3	26.11.19	14
P021	13.11.19	20.11.19	7	02.12.19	19
P022	13.11.19	25.11.19	12	04.12.19	21
P023	13.11.19	25.11.19	12	04.12.19	21
P024	13.11.19	25.11.19	12	29.11.19	16
P025	20.11.19	04.12.19	14	09.12.19	19
P026	19.11.19	03.12.19	14	09.12.19	20
P027	21.11.19	03.12.19	12	11.12.19	20
P028	19.11.19	04.12.19	15	11.12.19	22
P029	27.11.19	05.12.19	8	11.12.19	14
P030	26.11.19	06.12.19	10	16.12.19	20
P031	26.11.19	06.12.19	10	16.12.19	20
P032	27.11.19	18.12.19	21	23.12.19	26
P033	09.12.19	16.12.19	7	30.12.19	21

Vedlegg 2 Oversikt over antall dager før analysesvar med dato for analysebestilling som utgangspunkt

Preparatnummer	Prøvetakingsdato	Dato for bestilling av molekylærbiologisk og immunhistokjemisk analyse	Antall kalenderdager mellom prøvetaking og bestilling av molekylærbiologiske/immunhistokjemiske analyse	Analysesvartid OUS	Differanse mellom analysesvartid (OUS) og dato for bestilling av molekylærbiologisk/immunhistokjemisk analyse
P001	14.08.19	22.08.19	8	20	12
P002	08.08.19	26.08.19	18	20	2
P003	23.08.19	30.08.19	7	20	13
P004	20.08.19	02.09.19	13	22	9
P005	20.08.19	02.09.19	13	22	9
P006	02.09.19	06.09.19	4	17	13
P007	02.09.19	10.09.19	8	17	9
P008	21.08.19	13.09.19	23	36	13
P009	16.09.19	25.09.19	9	24	15
P010	27.09.19	07.10.19	10	50	40
P011	27.09.19	07.10.19	10	19	9
P012	18.10.19	25.10.19	7	19	12
P013	23.10.19	25.10.19	2	14	12
P014	29.10.19	04.11.19	6	21	15
P015	29.10.19	12.11.19	14	20	6
P016	30.10.19	07.11.19	8	19	11
P017	04.11.19	08.11.19	4	21	17
P018	04.11.19	12.11.19	8	21	13
P019	06.11.19	14.11.19	8	20	12
P020	12.11.19	14.11.19	2	19	17
P021	13.11.19	19.11.19	6	21	15
P022	13.11.19	22.11.19	9	21	12
P023	13.11.19	22.11.19	9	16	7
P024	13.11.19	22.11.19	9	19	10
P025	20.11.19	25.11.19	5	19	14
P026	19.11.19	26.11.19	7	20	13
P027	21.11.19	26.11.19	5	20	15
P028	19.11.19	28.11.19	9	22	13
P029	27.11.19	02.12.19	5	14	9
P030	26.11.19	04.12.19	9	20	11
P031	26.11.19	04.12.19	9	20	11
P032	27.11.19	09.12.19	12	26	14
P033	09.12.19	09.12.19	0	21	21

Vedlegg 3 Analyseresultater av retrospektive FFPE-vev

<i>Preparatnummer</i>	<i>Alder ved prøvetakingsdato</i>	<i>Kjønn</i>	<i>Prøvedato vev</i>	<i>Dato utført EGFR/KRAS</i>	<i>Analyse-resultat EGFR v/OUS</i>	<i>Analyse-resultat KRAS v/VV HF</i>	<i>Type mutasjon i KRAS</i>
R001	75	M	02.01.18	18.01.18/ 25.09.19	Ikke påvist	Påvist	Kodon61(Q61H) p.Gin61His/c.183A>C; c183A>T
R002	56	K	19.12.17	24.01.18/	Påvist	Ikke analysert	
R003	70	K	05.01.18	14.02.18/ 25.09.19	Ikke påvist	Påvist	Kodon12(G12D) p.Gly12Asp/c.35G>A
R004	80	M	11.01.18	29.01.18/ 25.09.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R005	54	M	17.01.18	02.02.18/ 25.09.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R006	81	K	17.01.18	02.02.18	Påvist	Ikke analysert	
R007	58	K	25.01.18	14.02.18/ 25.09.19	Ikke påvist	Påvist	Kodon12(G12C) p.Gly12Cys/c.34G>T
R008	82	K	25.01.18	07.02.18/ 20.09.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R009	79	K	29.01.18	14.02.18/ 26.09.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R010	65	M	31.01.18	14.02.18/ 30.09.19	Ikke påvist	Påvist	Kodon12(G12V) p.Gly12Val/c.35G>T
R011	55	K	31.01.18	14.02.18/ 27.09.19	Ikke påvist	Påvist	Kodon12(G12D) p.Gly12Asp/c.35G>A
R012	61	K	05.02.18	23.02.18/ 24.09.19	Ikke påvist	Påvist	Kodon12(G12D) p.Gly12Asp/c.35G>A
R013	53	K	06.02.18	16.02.18/ 20.09.19	Ikke påvist	Påvist	Kodon12(G12D) p.Gly12Asp/c.35G>A
R014	67	K	15.02.18	28.02.18/ 30.09.19	Ikke påvist	Påvist	Kodon12(G12C) p.Gly12Cys/c.35G>T
R015	47	M	17.02.18	28.02.18/ 30.09.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R016	69	K	21.02.18	15.03.18/ 30.09.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R017	63	K	06.03.18	23.03.18/ 30.09.19	Ikke påvist	Ikke påvist	

R018	69	K	27.02.18	23.03.18	Påvist	Ikke analysert	
R019	79	K	22.02.18	23.03.18/ 27.09.19	Ikke påvist	Påvist	Kodon12(G12V) p.Gly12Val/c.35G>T
R020	60	M	08.03.18	23.03.18/ 30.09.19	Ikke påvist	Påvist	Kodon61(Q61H) p.Gin61His/c.183A>C ;c.183A>T
R021	59	K	15.03.18	25.04.18/ 01.10.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R022	64	K	19.03.18	25.04.18/ 01.10.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R023	74	M	04.04.18	19.04.18/ 24.09.19	Ikke påvist	Påvist	Kodon12(G12C) p.Gly12Lys/c.34G>T
R024	70	K	05.04.18	19.04.18/ 01.10.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R025	79	K	06.04.18	23.04.18/ 01.10.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R026	79	K	09.04.18	25.04.18/ 01.10.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R027	58	M	16.04.18	02.05.18/ 01.10.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R028	71	K	25.04.18	19.05.18/ 23.10.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R029	70	K	02.05.18	29.05.18/ 24.10.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R030	72	K	30.04.18	25.05.18/ 23.10.19	Ikke påvist	Påvist	Kodon12(G12C) p.Gly12Cys/c.34G>T
R031	64	K	04.05.18	25.02.18/ 12.07.19	Ikke påvist	Påvist	Kodon12(G12D) p.Gly12Asp/c.35G>A
R032	71	M	23.05.18	26.06.18/ 15.10.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R033	83	K	24.05.18	25.06.18/ 23.10.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R034	63	K	25.05.18	09.07.18/ 15.07.19	Ikke påvist	Påvist	Kodon12(G12C) p.Gly12Cys/c.34G>T
R035	67	K	28.05.18	25.06.18/ 15.10.19	Ikke påvist	Påvist	Kodon12(G12C) p.Gly12Cys/c.34G>T
R036	73	M	29.05.18	21.06.18	Påvist	Ikke analysert	
R037	78	M	31.05.18	25.06.18/ 24.10.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R038	69	K	18.06.18	09.07.18/ 25.10.19	Ikke påvist	Påvist	Kodon12(G12C) p.Gly12Cys/c.34G>T

R039	72	M	25.06.18	16.07.18/ 28.10.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R040	62	K	27.06.18	16.07.18/ 16.10.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R041	76	K	03.07.18	20.07.18/ 31.10.19	Ikke påvist	Påvist	Kodon12(G12C) p.Gly12Cys/c.34G>T
R042	55	K	04.07.18	20.07.18	Påvist	Ikke analysert	
R043	80	M	12.07.18	09.08.18/ 01.11.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R044	55	K	19.07.18	03.08.18	Påvist	Ikke analysert	
R045	71	M	31.07.18	05.09.18/ 11.07.19	Ikke påvist	Påvist	Kodon12(G12R) p.Gly12Asp/c.34C>G
R046	84	M	14.08.18	13.09.18	Påvist	Ikke analysert	
R047	78	K	20.08.18	13.09.18/ 01.11.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R048	73	K	23.08.18	13.09.18/ 04.11.19	Ikke påvist	Påvist	Kodon12(G12C) p.Gly12Cys/c.34G>T
R049	76	K	23.08.18	19.09.18/ 19.07.19	Ikke påvist	Påvist	Kodon12(G12C) p.Gly12Cys/c.34G>T
R050	71	K	23.08.18	19.09.18	Påvist	Ikke analysert	
R051	68	M	10.09.18	19.09.18/ 18.07.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R052	71	M	10.09.18	19.09.18/ 04.11.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R053	61	M	12.09.18	26.09.18/ 17.10.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R054	62	M	20.09.18	03.10.18/ 05.11.19	Ikke påvist	Påvist	Kodon12(G12C) p.Gly12Cys/c.34G>T
R055	75	M	27.09.18	12.10.18/ 18.07.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R056	84	K	28.09.18	18.10.18/ 16.10.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R057	73	K	09.10.18	19.07.18/ 19.07.19	Ikke påvist	Påvist	Kodon12(G12C) p.Gly12Cys/c.34G>T
R058	66	M	08.11.18	21.11.18/ 17.10.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R059	68	M	19.11.18	06.12.18/ 21.10.19	Ikke påvist	Ikke påvist	

R060	88	K	20.11.18	30.01.19/ 18.07.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R061	76	M	12.12.18	04.01.19/ 21.10.19	Ikke påvist	Påvist	Kodon12(G12A) p.Gly12Ala/c.35G>C
R062	75	M	19.12.18	04.01.19	Påvist	Ikke analysert	
R063	76	M	25.03.19	09.05.19/ 21.08.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R064	74	K	01.04.19	02.05.19/ 21.08.19	Ikke påvist	Påvist	Kodon61(Q61H) p.Gin61His/c.183A>C;c.183A>T
R065	71	K	10.04.19	26.04.19/ 29.10.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R066	71	K	02.04.19	16.04.19/ 20.08.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R067	65	M	25.03.19	05.04.19/ 28.10.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R068	76	M	18.03.19	04.04.19/ 21.08.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R069	65	K	06.03.19	04.04.19/ 22.08.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R070	78	M	28.02.19	29.03.19/ 22.08.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R071	86	K	13.03.19	28.03.19/ 20.08.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R072	77	K	20.02.19	14.03.19/ 22.08.19	Ikke påvist	Påvist	Kodon12(G12C) p.Gly12Cys/c.34G>T
R073	64	M	01.03.19	14.03.19/ 27.08.19	Ikke påvist	Ikke påvist	
R074	67	K	20.02.19	07.03.19/ 20.08.19	Ikke påvist	Påvist	Kodon12(G12C) p.Gly12Cys/c.34G>T
R075	65	M	19.02.19	07.03.19/ 27.08.19	Ikke påvist	Påvist	Kodon12(G12D) p.Gly12Asp/c.35G>A

Vedlegg 4 Analyseresultater av prospektive FFPE-vev

Preparat nummer	Alder	Kjønn	Prøvetakings-dato	EGFR analyse-resultat OUS	EGFR analyse-resultat VV HF	KRAS analyse-resultat VV HF	KRAS type mutasjon
P001	58	M	14.08.19	Påvist	Påvist	Ikke påvist	
P002	72	M	08.08.19	Ikke påvist	Ikke påvist	Ikke påvist	
P003	68	M	23.08.19	Ikke påvist	Ikke påvist	Ikke påvist	
P004	64	K	20.08.19	Ikke påvist	Ikke påvist	Ikke påvist	
P005	67	K	20.08.19	Ikke påvist	Ikke påvist	Ikke påvist	
P006	87	K	02.09.19	Ikke påvist	Ikke påvist	Ikke påvist	
P007	67	M	02.09.19	Ikke påvist	Ikke påvist	Ikke påvist	
P008	52	K	21.08.19	Ikke påvist	Ikke analysert	Påvist	Kodon13(G13D) p.Gly13Asp/c.38G>A
P009	49	K	16.09.19	Ikke påvist	Ikke analysert	Påvist	Kodon12(G12V) p.Gly12Cyt/c.34G>T
P010	60	K	27.09.19	Ikke påvist	Ikke påvist	Ikke påvist	
P011	53	K	27.09.19	Ikke påvist	Ikke analysert	Påvist	Kodon12(G12V) p.Gly12Val/c.35G>T
P012	59	M	18.10.19	Ikke påvist	Ikke analysert	Påvist	Kodon13(G13D) p.Gly13Asp/c.38G>A
P013	71	K	23.10.19	Ikke påvist	Ikke påvist	Ikke påvist	
P014	76	M	29.10.19	Påvist	Ikke påvist*	Ikke påvist	
P015	43	M	29.10.19	Ikke påvist	Påvist**	Ikke påvist	

P016	84	M	30.10.19	Ikke påvist	Ikke analysert	Påvist	Kodon12(G12C) p.Gly12Cys/c.34G>T
P017	65	K	04.11.19	Ikke påvist	Ikke analysert	Påvist	Kodon12(G12C) p.Gly12Cys/c.34G>T
P018	76	M	04.11.19	Ikke påvist	Ikke analysert	Påvist	Kodon12(G12C) p.Gly12Cys/c.34G>T
P019	76	K	06.11.19	Ikke påvist	Ikke påvist	Ikke påvist	
P020	71	K	12.11.19	Ikke påvist	Ikke analysert	Påvist	Kodon12(G12C) p.Gly12Cys/c.34G>T
P021	74	M	13.11.19	Ikke påvist	Ikke påvist	Ikke påvist	
P022	80	M	13.11.19	Ikke påvist	Ikke analysert	Påvist	Kodon12(G12C) p.Gly12Cys/c.34G>T
P023	60	K	13.11.19	Ikke påvist	Ikke analysert	Påvist	Kodon12(G12C) p.Gly12Cys/c.34G>T
P024	77	M	13.11.19	Ikke påvist	Ikke analysert	Påvist	Kodon12(G12D) p.Gly12Asp/c.35G>A
P025	74	M	20.11.19	Påvist	Påvist	Ikke påvist	
P026	76	M	19.11.19	Ikke påvist	Ikke analysert	Påvist	Kodon12(G12V) p.Gly12Val/c.35G>T
P027	62	K	21.11.19	Ikke påvist	Ikke analysert	Påvist	Kodon12(G12D) p.Gly12Asp/c.35G>A
P028	71	K	19.11.19	Ikke påvist	Ikke analysert	Påvist	Kodon12(G12V) p.Gly12Val/c.35G>T
P029	66	K	27.11.19	Ikke påvist	Ikke påvist	Ikke påvist	
P030	69	K	26.11.19	Ikke påvist	Ikke analysert	Påvist	Kodon12(G12C) p.Gly12Cys/c.34G>T
P031	71	K	26.11.19	Ikke påvist	Ikke analysert	Påvist	Kodon12(G12V) p.Gly12Val/c.35G>T
P032	74	M	27.11.19	Ikke påvist	Ikke påvist	Ikke påvist	
P033	72	M	09.12.19	Ikke påvist	Ikke analysert	Påvist	Kodon61(Q61H) p.Gln61His/c.183A>C; c.183A>T

Vedlegg 5 Utstysrliste

Utstyr

Biocartis, Idylla™ plattform, instrument og konsoll

Biocartis, Idylla™ mutasjonstest

Hansker (pudderfri)

Pipetter

Pipettespisser (PCR-ren, DNase-/RNasefri)

Whatman filterpapir

Objektglass

Engangsskalpell

Lofritt tørkepapir

Pinsett uten rifler

Reagenser

RNase Away Fisher Scientific

70% etanol

Nukleasefritt vann Fisher Scientific

Prøvemateriale

FFPE-snitt eller FFPE-blokk

Vedlegg 6 Statistiske resultater fra sammenligning av analysesvartider med Mann-Whitney U test

Tilleggstabel 1. Viser antall (N) som er med i beregningen, og rank-verdier.

Mann-Whitney Test

Ranks				
	Sykehus hvor prøven er analysert	*N	Mean Rank	Sum of Ranks
Kalenderdager før analysesvar	VestreViken HF	33	20,52	677,00
	OUS	33	46,48	1534,00
	Total	66		

*N=antall

Tilleggstabel 2. Viser den teoretiske Z-verdien og at resultatet er signifikant ($p < 0,05$). Grønn farge indikerer signifikant resultat.

Test Statistics^a

	Kalenderdager før analysesvar
Mann-Whitney U	116,000
Wilcoxon W	677,000
Z	-5,515
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000

a. Grouping Variable: Sykehus hvor prøven er analysert

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Kalenderdager før analysesvar is the same across categories of Sykehus hvor prøven er analysert.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Tilleggsfigur 1. Illustrerer at nullhypotesen kan forkastes, og at det er statistisk signifikant ($p < 0,05$) forskjell på analysesvartidene.

Statistikk er utført i Statistical Package for the Social Sciences (SPSS).

Vedlegg 7 Statistiske resultater fra sammenhengsstudie av *KRAS*-mutasjonspositive og kjønn ved kjikvadrattest

Tilleggstabell 3. Krysstabell med oversikt over antall menn og kvinner, antallet og forventet antall ved *KRAS*-mutasjonspositivitet eller *KRAS*-mutasjonsnegativitet.

Kjønn * Positiv_Negativ Crosstabulation					
			Positiv_Negativ		Total
			<i>KRAS</i> - mutasjons positive	<i>KRAS</i> - mutasjons negative	
Kjønn	Menn	Count	15	31	
		Expected Count	18,7	27,3	46,0
	Kvinner	Count	29	33	62
		Expected Count	25,3	36,7	62,0
Total		Count	44	64	108
		Expected Count	44,0	64,0	108,0

Tilleggstabell 4. Oversikt over resultater for kjikvadrattest. Gul farge indikerer ikke signifikant resultat ($p < 0,05$).

Chi-Square Tests					
	Value	*df	Asymptotic Significance (2- sided)	Exact **Sig. (2- sided)	Exact **Sig. (1- sided)
Pearson Chi-Square	2,195 ^a	1	,138		
Continuity Correction ^b	1,647	1	,199		
Likelihood Ratio	2,216	1	,137		
Fisher's Exact Test				,168	,099
Linear-by-Linear Association	2,175	1	,140		
N of Valid Cases	108				
a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 18,74.					
b. Computed only for a 2x2 table					

*df=frihetsgrader (Degrees of freedom)

**Sig.=Signifikans

Statistikk er utført i Statistical Package for the Social Sciences (SPSS).