

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

Paweł Krawczyk<sup>1,2,3</sup>, Joanna Chorostowska-Wynimko<sup>2,4</sup>, Rafał Dziadziuszko<sup>5,6</sup>,  
Jacek Jassem<sup>5,6</sup>, Maciej Krzakowski<sup>7,8</sup>, Renata Langfort<sup>9,10</sup>, Elżbieta Puacz<sup>11</sup>,  
Bartosz Wasąg<sup>3,12</sup>, Kamila Wojas-Krawczyk<sup>1</sup>

Zalecenia równolegle publikowane są w *Onkologii w Praktyce Klinicznej* i w *Pneumonologii i Alergologii Polskiej*

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

### Methodological recommendations for the diagnostics of *EGFR* gene mutations and *ALK* gene rearrangement in the selection of non-small-cell lung cancer patients to molecularly targeted therapies

Testing for *EGFR* gene mutations and *ALK* gene rearrangement is routinely used in advanced non-small-cell lung cancer for adequate patient selection to molecularly targeted therapies. We present Polish methodological recommendations for molecular analysis of *EGFR* and *ALK* genetic abnormalities. Recommendations specify clinical indications for testing, sample types and handling, as well as requirements for laboratories performing molecular diagnostics.

NOWOTWORY Journal of Oncology 2014; 64, 4: 336–342

**Słowa kluczowe:** niedrobnokomórkowy rak płuca, mutacje genu *EGFR*, rearanżacja genu *ALK*, genetyczne testy diagnostyczne

**Key words:** non-small-cell lung cancer, *EGFR* gene mutations, *ALK* gene rearrangement, genetic diagnostic tests

<sup>1</sup>Pracownia Immunologii i Genetyki Katedry i Kliniki Pneumonologii, Onkologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

<sup>2</sup>Polskie Towarzystwo Chorób Płuc

<sup>3</sup>Polskie Towarzystwo Genetyki Człowieka

<sup>4</sup>Zakład Genetyki i Immunologii Klinicznej Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie

<sup>5</sup>Katedra i Klinika Onkologii i Radioterapii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

<sup>6</sup>Polskie Towarzystwo Onkologiczne

<sup>7</sup>Klinika Nowotworów Płuca i Klatki Piersiowej Centrum Onkologii — Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

<sup>8</sup>Polskie Towarzystwo Onkologii Klinicznej

<sup>9</sup>Zakład Patomorfologii, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc

<sup>10</sup>Polskie Towarzystwo Patologów

<sup>11</sup>Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych

<sup>12</sup>Katedra i Zakład Biologii i Genetyki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

## Wprowadzenie

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

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

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

- A. Rekomendacja:** Potwierdzenie obecności mutacji w genie *EGFR* lub rearanżacji genu *ALK* w komórkach nowotworowych jest kluczowym kryterium kwalifikacji chorych na NDRP do terapii ukierunkowanych molekularnie z wykorzystaniem IKT EGFR lub IKT ALK [2].
- B. Rekomendacja:** Decyzję o wykonaniu badania genetycznego u chorego na NDRP powinien podjąć lekarz onkolog lub pulmonolog na podstawie indywidualnej oceny stanu chorego oraz wskazań klinicznych do leczenia ukierunkowanego molekularnie. Oznaczenie mutacji genu *EGFR* należy wykonać u chorych z rozpoznaniem NDRP o innym utkaniu niż płaskonabłonkowe, natomiast badanie rearanżacji genu *ALK* — u chorych z rozpoznaniem raka gruczołowego lub zawierającego komponent utkania gruczołowego. Stopień zróżnicowania histologicznego (*grade*) nie ma wpływu na wskazania do diagnostyki molekularnej [3–8].

Nie zaleca się wykonania badania genetycznego, jeśli w ocenie histopatologicznej wycinków guza uwidoczono jedynie komórki raka płaskonabłonkowego, raka drobnokomórkowego płuca lub rakowiaka. W sytuacji, gdy na podstawie standardowego barwienia hematoxyliny + eozyna (H + E) nie można określić podtypu NDRP, konieczne jest wykonanie barwień histochemicznych (na obecność śluzu w komórkach raka) i/lub immunohistochemicznych (IHC). Wskazane jest oznaczenie ekspresji co najmniej dwóch markerów: TTF-1, którego obecność wskazuje na różnicowanie gruczołowe raka, i p63 lub p40, którego ekspresja przemawia za różnicowaniem płaskonabłonkowym raka. W przypadku preparatów cytologicznych badanie IHC powinno każdorazowo poprzedzać kwalifikację do diagnostyki genetycznej [3–8].

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

- C. Rekomendacja:** Kryteria demograficzne, takie jak płeć, rasa i wywiad w kierunku palenia tytoniu, nie mają wpływu na wskazania do poszukiwania mutacji genu *EGFR* i rearanżacji genu *ALK* u chorych na NDRP. Dopuszczalne jest uwzględnienie wywiadu odnośnie palenia tytoniu, jeśli diagnostyka prowadzona jest na podstawie materiału tkankowego ubogokomórkowego lub materiału cytologicznego, w którym nie wykluczono obecności komponentu gruczołowego (NDRP NOS) [6–8].
- D. Rekomendacja:** Materiał tkankowy pochodzący z guza pierwotnego i materiał tkankowy pochodzący z przerzutów NDRP należy traktować jako równoważnościowe dla oznaczenia mutacji genu *EGFR* i rearanżacji genu *ALK*. Nie ma uzasadnienia dla równoczesnego badania kilku wycinków z jednego nowotworu [6–8].

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

- A. Rekomendacja:** Zaleca się, aby lekarz onkolog lub pulmonolog kierujący do oceny patomorfologicznej materiał pochodzący od chorego z podejrzeniem miejscowo zaawansowanego lub uogólnionego NDRP — stadium IIIB i IV według 7. edycji klasyfikacji guz-węzeł-przerzuty (TNM, *tumor-nodes-metastases*) [9, 10] — pisemnie zlecał kontynuowanie diagnostyki w zakresie badań genetycznych, o ile uzasadnia to rozpoznanie morfologiczne, objętość i jakość dostępnego materiału. W tym przypadku zaleca się, aby patomorfolog w momencie ustalenia rozpoznania mikroskopowego podejmował decyzję o ewentualnym kontynuowaniu diagnostyki genetycznej w kierunku mutacji genu *EGFR* i rearanżacji genu *ALK*. W razie braku stosownego zalecenia lekarskiego zabezpieczony materiał powinien być

przekazany do badania genetycznego niezwłocznie po uzyskaniu pisemnego skierowania od lekarza prowadzącego [6–8].

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

- B. Rekomendacja:** Zaleca się, aby w postępowaniu diagnostycznym w pierwszej kolejności ocenić mutację genu *EGFR*. Oznaczenie rearanżacji genu *ALK* u chorych z rozpoznaniem raka gruczołowego należy wykonać po uprzednim potwierdzeniu braku mutacji somatycznych w genie *EGFR*. Obecnie istnieje brak wystarczających dowodów klinicznych uzasadniających analizę innych markerów molekularnych u chorych na NDRP [6–8].
- C. Rekomendacja:** Czas oczekiwania na wynik oznaczenia mutacji genu *EGFR* i/lub rearanżacji genu *ALK* nie powinien przekraczać 10 dni roboczych od momentu dostarczenia materiału tkankowego do laboratorium genetycznego. Zaleca się jednak, aby czas oczekiwania na wynik badania genetycznego wynosił maksymalnie 5 dni roboczych [6–8].
- D. Rekomendacja:** Zaleca się aby laboratoria, w których czas oczekiwania na oznaczenie mutacji genu *EGFR* i rearanżacji genu *ALK* przekracza 10 dni roboczych, dostosowały swoje procedury i techniki badawcze do powyższych wymagań [6–8].
- E. Rekomendacja:** Czas przygotowania materiału archiwalnego przez pracownię patomorfologii i dostarczenia go do laboratorium genetycznego nie powinien przekraczać 3 dni od momentu otrzymania skierowania. Akceptowalne jest wydłużenie tego okresu w razie konieczności ponownej oceny morfologicznej materiału [6–8].

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

- A. Rekomendacja:** Zasady funkcjonowania laboratoriów wykonujących diagnostykę genetycznych czynników predykcyjnych dla terapii ukierunkowanych molekularnie w chorobach nowotworowych muszą być zgodne z zapisami Ustawy z dnia 27 lipca 2001 roku o diagnostyce laboratoryjnej (wraz z późniejszymi zmianami) oraz Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 21 stycznia 2009 roku, zmieniającym rozporządzenie w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych (Załącznik nr 3) [11, 12]. Poniższe rekomendacje B–D uszczegółwiają zasady funkcjonowania laboratorium zawarte w Załączniku nr 3 do Rozporządzenia Ministra Zdrowia.

- B. Rekomendacja:** Badanie genetyczne może być wykonywane wyłącznie pod nadzorem diagnosty laboratoryjnego lub lekarza, który jest zatrudniony w pracowni wykonującej to badanie oraz: 1) posiada tytuł specjalisty medycznej genetyki laboratoryjnej i jest zatrudniony nieprzerwanie w pracowni wykonującej badania genetyczne lub 2) posiada co najmniej dwuletni staż pracy w laboratorium genetycznym i jest w trakcie specjalizacji z medycznej genetyki laboratoryjnej; 3) w ciągu ostatnich 5 lat jest zatrudniony nieprzerwanie w laboratorium genetycznym prowadzącym badania mutacji w genie *EGFR* i rearanżacji genu *ALK*.

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

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

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

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

- A. Rekomendacja:** Badanie genetyczne w kierunku mutacji genu *EGFR* powinno być wykonywane jedynie w materiale zabezpieczonym odpowiednimi technikami: 1) fragmentach tkanek utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie (materiał preferowany ze względu na stabilność, przydatny do badania genetycznego nawet po kilku latach od pobrania materiału); 2) świeżo pobranych fragmentach tkanek; 3) tkankach zamrożonych; 4) tkankach utrwalonych w alkoholu. Materiały utrwalone w inny sposób, zwłaszcza z zastosowaniem utrwalaczy zawierających związki metali ciężkich lub roztworów o właściwościach odwapniających i w środowisku kwaśnym, nie powinny być wykorzystywane do oceny

- mutacji genu *EGFR*. Zaleca się ściśle przestrzeganie czasu utrwalania tkanek w 10-procentowym zbuforowanym roztworze formaliny, który powinien wynosić 6–48 godzin. Każde odstępstwo od rutynowych procedur laboratoryjnych, zwłaszcza zalecanego czasu utrwalania oraz metody zatapiania tkanek w parafinie, należy odnotować w raporcie patomorfologicznym ze względu na ich ewentualny wpływ na integralność DNA komórek nowotworowych [5–8].
- B. Rekomendacja:** Materiał cytologiczny, zwłaszcza utrwalony w postaci cytobloków lub jako rozmaz na szkiełku podstawowym, jest właściwy do analizy mutacji genu *EGFR*. Zawiesina komórek do sporządzenia cytobloku powinna być utrwalona w 10-procentowym zbuforowanym roztworze formaliny lub w 70-procentowym roztworze etanolu przez 6–48 godzin. Zaleca się, aby laboratorium przeprowadziło walidację pełnej procedury opracowania materiału cytologicznego, w tym jego utrwalania i analizy genetycznej w kierunku mutacji genu *EGFR* [5–8, 13, 14].
- C. Rekomendacja:** Zaleca się, aby wybór reprezentatywnego materiału do oznaczenia mutacji genu *EGFR* był dokonywany przez patomorfologa. Konieczna jest ocena procentowej zawartości komórek nowotworowych i ognisk martwicy, a w przypadku preparatów cytologicznych także liczby komórek nowotworowych. Wskazane jest przygotowanie seryjnie skrojonych preparatów z blozków parafinowych lub cytobloków według następującego schematu: pierwszy preparat grubości 3 µm, przeznaczony do oceny zawartości komórek nowotworowych w badanym materiale (barwienie hematoksyliną i eozyną — H+E); drugi preparat o grubości minimum 8–10 µm, przeznaczony do izolacji DNA (w przypadku materiałów bogatokomórkowych dopuszcza się skrojenie kilku preparatów o grubości 8–10 µm); preparaty trzeci i czwarty o grubości 3–5 µm, przeznaczone do oceny rearanżacji genu *ALK* [metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH, *fluorescent in situ hybridization*) i immunohistochemiczną (IHC, *immunohistochemistry*)], jeśli laboratorium używa tych metod do wstępnej diagnostyki rearanżacji genu *ALK*; piąty preparat o grubości 3 µm, przeznaczony do ponownej oceny zawartości komórek nowotworowych [6–8].
- D. Rekomendacja:** Konieczne jest dokonanie oceny ilości i jakości DNA po jego wyizolowaniu z materiału diagnostycznego [6–8].
- E. Rekomendacja:** Analiza genetyczna materiału cytologicznego utrwalonego na szkiełku podstawowym powinna być wykonana w rozmazach wybarwionych hematoksyliną i eozyną (H + E). Nie rekomenduje się wykorzystywania szkiełek z barwień immunohistochemicznych [6–8, 13, 14].
- Zaleca się, aby identyfikacja komórek nowotworowych i ich lokalizacji w preparacie była dokonywana przez patomorfologa. Postępowanie w laboratorium genetycznym powinno obejmować inkubację preparatu w roztworze ksylenu przez co najmniej 4–6 godzin (optymalnie 12 godzin), usunięcie szkiełka nakrywkowego oraz izolację DNA z komórek usuniętych mechanicznie ze szkiełka podstawowego wyłącznie z miejsc uprzednio oznaczonych przez patomorfologa [6–8, 13, 14].
- F. Rekomendacja:** Laboratorium genetyczne ma obowiązek ustalenia w drodze wewnętrznej kontroli jakości minimalnego odsetka komórek nowotworowych w preparacie, który zapewnia wiarygodną ocenę mutacji genu *EGFR* [6–8, 12].
- Dopuszcza się wykonanie mikrodysekcji komórek nowotworowych z badanego materiału w celu zwiększenia ich odsetka [6–8].
- G. Rekomendacja:** Do izolacji DNA należy wykorzystywać zestawy odczynników przeznaczone do diagnostyki *in vitro* (oznaczone symbolem CE-IVD) [6–8, 12].
- H. Rekomendacja:** Laboratorium genetyczne może wykorzystywać różne techniki oznaczania mutacji genu *EGFR*, pod warunkiem że zostały one poddane walidacji i dokładnie opisane zgodnie z obowiązującym w Polsce prawem (Ustawa z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych). Wskazane jest stosowanie metod przeznaczonych do diagnostyki *in vitro* (oznaczone symbolem CE-IVD) [6–8, 12, 15–17].
- Zaleca się korzystanie z technik opartych na reakcji polimerazy łańcuchowej (PCR, *polymerase chain reaction*), w tym przede wszystkim PCR z analizą w czasie rzeczywistym (RT-PCR, *real time polymerase chain reaction*). Konieczne jest, aby czułość stosowanej metody analizy mutacji genu *EGFR* zapewniała wiarygodną analizę materiału tkankowego zawierającego co najmniej 50% komórek nowotworowych. W takich materiałach dopuszczalna jest analiza genetyczna z wykorzystaniem sekwencjonowania metodą Sangera. Wskazane jest jednak stosowanie bardziej czułych technik molekularnych, umożliwiających identyfikację mutacji genu *EGFR* w materiale zawierającym co najmniej 10% komórek nowotworowych [6–8, 15, 16].
- Zaleca się, aby laboratorium nieposiadające technicznych możliwości analizy genetycznej materiału o niskim odsetku komórek nowotworowych niezwłocznie przekazało go do ośrodka referencyjnego, informując o tym również zleceniodawcę [6–8].
- I. Rekomendacja:** Wymagane jest, aby laboratorium dysponowało metodyką umożliwiającą identyfikację wszystkich mutacji genu *EGFR*, których częstość występowania wynosi co najmniej 1% (wśród znanych mutacji genu *EGFR*) (tab. I) [6–8, 16].

**Tabela I.** Znane mutacje w genie *EGFR* (NM\_005228.3), których częstość występowania wynosi co najmniej 1% spośród wszystkich mutacji tego genu [16]

Ekson genu <i>EGFR</i>	Kodon genu <i>EGFR</i>	Mutacja	Substytucje nukleotydowe	Szacowana częstość występowania wśród mutacji <i>EGFR</i> (%)			
18.	E709	p.E709K	c.2125G>A	1			
		p.E709A	c.2126A>C				
		p.E709G	c.2126A>G				
		p.E709V	c.2126A>T				
		p.E709D	c.2127A>C, c.2127A>T				
	G719	p.E709Q	c.2125G>C		2–5		
		p.G719S	c.2155G>A				
		p.G719A	c.2156G>C				
		p.G719C	c.2155G>T				
		p.G719D	c.2156G>A				
19.	K739	Insercje 18-pz		1			
	I740						
	P741						
	V742						
	A743						
	I744						
	E746			Delecje (pz) 9		45	
	L747						
	R748						
	E749						
	A750						
	T751						
	S752						
P753							
20.	S768	Insercje (pz) 3 9		4–10			
	V769						
	D770						
	N771						
	P772						
	H773						
	V774						
	S768				p.S768I	c.2303G>T	1–2
	T790				p.T790M	c.2369C>T	2
21.	L858	p.L858R	c.2573T>G	40			
		p.L858M	c.2572C>A				
	L861	p.L861Q	c.2582T>A	2–5			
		p.L861R	c.2582T>G				

pz — pary zasad

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

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

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

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

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

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

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

**D. Rekomendacja:** Zaleca się, aby badanie rearanżacji genu *ALK* było wykonywane przez diagnostę laboratoryjnego lub patomorfologa. Warunkiem koniecznym jest równoczesne stosowanie kontroli pozytywnej i negatywnej. Zaleca się, aby ocena wizualna preparatów była zawsze dokonywana przez dwóch niezależnych obserwatorów posiadających doświadczenie w interpretacji i odczycie wyników badań FISH oraz IHC [6, 18, 19].

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

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

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

**A. Rekomendacja:** Konieczne jest, aby sprawozdanie z badania mutacji genu *EGFR* i rearanżacji genu *ALK* zawierało wynik badania przedstawiony zgodnie z nomenklaturą *Human Genom Variation Society* (HGVS) [20]

oraz jego interpretację sformułowaną w sposób zrozumiały dla lekarza onkologa lub pulmonologa oraz patomorfologa.

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

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

### Konflikt interesów:

*Paweł Krawczyk:* Boehringer Ingelheim, AstraZeneca, Eli Lilly — komitet doradczy; Abbott, Roche, Eli Lilly, AstraZeneca, Boehringer Ingelheim, BMS, MSD — wykład  
*Joanna Chorostowska-Wynimko:*

Boehringer Ingelheim, Novartis — komitet doradczy; Roche, Boehringer Ingelheim, AstraZeneca — wykład  
*Rafal Dziadziuszko:* Boehringer Ingelheim, Pfizer — komitet doradczy; Boehringer Ingelheim, Pfizer, Eli Lilly, AstraZeneca — wykład

*Jacek Jassem:* Roche — grant naukowy; Boehringer Ingelheim, Eli Lilly, AstraZeneca — komitet doradczy; Roche — wykład

Maciej Krzakowski: Boehringer Ingelheim, Eli Lilly — udział w spotkaniu ekspertów

Renata Langfort: Roche, Eli Lilly, AstraZeneca,

Boehringer Ingelheim — wykład

Elżbieta Puacz: brak konfliktu interesów

Bartosz Wasąg: Roche — wykład

Kamila Wojas-Krawczyk: brak konfliktu interesów

### Prof. dr hab. n. med. Paweł Krawczyk

Pracownia Immunologii i Genetyki,

Katedra i Klinika Pneumologii,

Onkologii i Alergologii

Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

ul. Jaczewskiego 8, 20-954 Lublin

Tel./faks: 81 724 42 93

e-mail: krapa@poczta.onet.pl

Przyjęto do druku: 4 lipca 2014 r.

### Piśmiennictwo

1. Obwieszczenie Ministra Zdrowia z dnia 24 lutego 2014 r. w sprawie wykazu refundowanych leków, środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego oraz wyrobów medycznych (Dz.Ur. MZ 2014, poz. 42).
2. John T, Liu G, Tsao MS. Overview of molecular testing in non-small-cell lung cancer: mutational analysis, gene copy number, protein expression and other biomarkers of EGFR for the prediction of response to tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* 2009; 28: 514–523.
3. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M i wsp. International Association for The Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. *J. Thorac. Oncol.* 2011; 6: 244–285.
4. Travis WD, Brambilla E, Rielyl GJ. New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. *J. Clin. Oncol.* 2013; 31: 992–1001.
5. Szumera-Ciećkiewicz A, Olszewski W. Miejsce patomorfologii w terapii celowanej raka płuca. *Pol. J. Pathol.* 2010; 1: 74–79.
6. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB i wsp. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J. Thorac. Oncol.* 2013; 8: 823–859.
7. Shim HS, Chung JH, Kim L i wsp. Guideline recommendations for EGFR mutation testing in lung cancer: proposal of the Korean Cardiopulmonary Pathology Study Group. *Korean J. Pathol.* 2013; 47: 100–106.
8. Pirker R, Herth FJ, Kerr KM i wsp. Consensus for EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer: results from a European workshop. *J. Thorac. Oncol.* 2010; 5: 1706–1713.
9. Mirsadraee S, Caulo A, Oswal D i wsp. The 7th lung cancer TNM classification and staging system: Review of the changes and implications. *World J. Radiol.* 2012; 4: 128–134.
10. Rami-Porta R, Crowley JJ, Goldstrwa P. The revised TNM staging system for lung cancer. *Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2009; 15: 4–9.
11. Ustawa z dnia 27 lipca 2001 r. o diagnostyce laboratoryjnej (Dz.U. 2001, nr 100, poz. 1083).
12. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 21 stycznia 2009 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych (Dz.Ur. MZ 2009, nr 22, poz. 128).
13. Navani N, Brown JM, Nankivell M i wsp. Suitability of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration specimens for subtyping and genotyping of non-small cell lung cancer: a multicenter study of 774 patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012; 185: 1316–1322.
14. Rekhtman N, Brandt SM, Sigel CS i wsp. Suitability of thoracic cytology for new therapeutic paradigms in non-small cell lung carcinoma: high accuracy of tumor subtyping and feasibility of EGFR and KRAS molecular testing. *J. Thorac. Oncol.* 2011; 6: 451–458.
15. Ellison G, Zhu G, Moulis A i wsp. EGFR mutation testing in lung cancer: a review of available methods and their use for analysis of tumour tissue and cytology samples. *J. Clin. Pathol.* 2013; 66: 79–89.
16. Skroński M, Szpechciński A, Chorostowska-Wynimko J. Współczesne metody wykrywania mutacji genu *EGFR* jako czynnika predykcyjnego dla terapii ukierunkowanej molekularnie chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca — czy istnieje złoty standard diagnostyczny? *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2014; 82: 311–322.
17. Ustawa z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (Dz.U. 2011, nr 82, poz. 451).
18. Wojas-Krawczyk K, Krawczyk P, Ramlau R i wsp. The analysis of *ALK* gene rearrangement by fluorescence in situ hybridisation in non-small cell lung cancer patients. *Contemp. Oncol.* 2013; 17: 484–492.
19. Tsao MS, Hirsch FR, Yatabe Y. *IASCL atlas of ALK testing in lung cancer*. International Association for the Study of Lung Cancer, Aurora, Colorado, USA. 2013.
20. Human Genetic Variation Society. <http://www.hgvs.org>.