

# NorPREM



Nasjonalt kompetansenettverk for persontilpasset medisin  
BRCA 1/BRCA2 tumordiagnostikk

Prosjektleder: Anne Pernille H. Dyrbekk, Sykehuset i Vestfold

Prosjektperiode: mars 2022 - august 2023

## Innhold

1. Bakgrunn .....	2
2. Mål.....	2
3. Resultater fra intra-laboratoriesammenligning .....	2
3.1 Pasientprøver .....	2
3.2 Kommersielle kontroller.....	3
3.3 Bioinformatisk dekningsanalyse.....	4
4. Diskusjon .....	4
4.1 Homopolymerområder.....	4
4.2 Nomenklatur.....	4
4.3 Falske positive varianter.....	5
4.4 Falske negative varianter .....	5
4.5 Bioinformatisk dekningsanalyse.....	6
5. Anbefalte retningslinjer.....	6
5.1 Homopolymerområder.....	6
5.2 Nomenklatur.....	6
5.3 Teknisk kontroll - Falske positive og negative varianter .....	6
5.3.1 Visualisering av data.....	6
5.3.2 Bioinformatisk dekningsanalyse.....	6
6. Deltakere .....	8
7. Referanser .....	8
8. Vedlegg.....	8

## 1. Bakgrunn

Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)-hemmere har siden 2020 blitt godkjent for bruk i behandling av somatisk BRCA1- og BRCA2- muterte kreftsvulster med utgangspunkt i eggstokk-, eggleder og bukhinne, samt prostatakraft.

De medisinske genetiske avdelingene rundt om i landet har tidligere hatt tilbud om testing for arvelige BRCA1- og BRCA2-mutasjoner. Da PARP-hemmere først ble godkjent for eggstokk-, eggleder og bukhinnekraft, ble innføringen av somatisk BRCA1/2 –testing håndtert ulikt rundt om i landet. Men da BRCA-testing av metastatisk prostatakraft senere ble anbefalt innført av European Society of Medical Oncology (Parker, 2020) ble det tydelig at det var et behov for økt samhandling, standardisering og harmonisering av tilbudet nasjonalt. I regi av Nasjonalt kompetansenettverk for persontilpasset medisin (NorPreM) ble rapporten "Innføring BRCA-test" (vedlegg 1) utarbeidet under ledelse av patolog Ragnhild M. Wold ved Universitetssykehuset i Nord-Norge (UNN). Gruppen som arbeidet med rapporten var tverrfaglig og interregionalt sammensatt, og kom med konkrete anbefalinger for innføring av testing.

For flere av patologiavdelingene inngikk allerede BRCA-genene i genpanelene de brukte ved sekvensering, mens noen ville etablere testing med andre mer BRCA-rettete panel. I tråd med BRCA-rapporten ble det derfor igangsatt en arbeidsgruppe for å utføre en felles sammenligning for analyse av HRR-gener, med spesielt fokus på genene BRCA1 og BRCA2. Målet var å sikre likt tilbud ved ulike helseforetak. Prosjektet gikk ut ifra NorPreM og startet som et regionalt prosjekt i Helse Sør Øst, men ble raskt nasjonalt. Dette dokumentet viser resultat av dette arbeidet.

## 2. Mål

Målet med sammenligning av tilbud for BRCA-test

- Harmonisering av BRCA-deteksjon, variantvurdering, tolkning og rapportering
- Samarbeid mellom laboratorier og medisinsk genetikk

Dette er i tråd med NorPreMs mandat om likt tilbud nasjonalt, kompetanseoverføring mellom sykehus, standardisering og harmonisering av tilbud, samt anbefalinger i rapporten "Innføring av BRCA-test".

## 3. Resultater fra intra-laboratoriesammenligning

Sammenligningen inkluderte både en ringtest med pasientprøver fra de ulike sykehusene og kommersielle kontroller. Detaljer knyttet til dette er beskrevet i gjennomføringsplanen (vedlegg 7) og resultattabeller er vedlagt (vedlegg 2 og 3).

### 3.1 Pasientprøver

Tolv pasientprøver ble analysert ved syv laboratorier i Norge. Alle de deltagende laboratoriene detekterte den samme patogene BRCA1- eller BRCA2-variant i 10 prøver, se vedlegg 3. For de to gjenværende prøvene ble det ikke detektert patogene BRCA-varianter på tvers av laboratoriene. Den ene av disse prøvene viste seg å være av særdeles dårlig kvalitet (degradert).

Det bemerkes at det ble rapportert inn varianter med lav frekvens, dårlige kvalitetsparametre og varianter i homopolymerområder. I tillegg er det i noen tilfeller ikke benyttet HGVS nomenklatur. Dette er ikke inkludert i resultatene.

Tre av laboratoriene (HUS, UNN og SUS) detekterte en patogen variant i et homopolymerområde i BRCA1 i tillegg til en patogen BRCA2-variant detektert ved alle laboratoriene. For de resterende laboratoriene er dekningen god i posisjonen, men varianten detekteres ikke som følge av maskering av homopolymer (>6x) fra leverandørs side, se tabell vedlegg 3.

Sammenligning av allelfraksjon for de ti BRCA-variantene som alle deltagende laboratorier detekterte viste godt samsvar, se vedlegg 3, tabell 2.

### 3.2 Kommersielle kontroller

#### **AcroMetrix Oncology Hotspot Control**

26 av de totalt 27 ATM variantene inkludert i kontrollen detekteres av samtlige deltagende laboratorier (OUS, SiV og STHF). Den ene introniske varianten som ikke detekteres er ikke inkludert i panelene til OUS, SiV og STHF, men denne varianten er benign. Variantene i ATM som skal kunne påvises med aktuell metode detekteres, og det er derfor 100 % samsvar mellom resultatene, se vedlegg 4. I og med at kontrollen inneholder flere normalvarianter, ble det nødvendig å sjekke utenfor standardfilter.

Det ble observert at en variant (ATM T2666A) klassifisert som sannsynlig patogen havnet utenfor standardfilter hos samtlige laboratorier. De tre deltagende laboratoriene benytter alle OncoPrint Extended v5.16 og v5.18 som standardfilter for analyse i diagnostikk. Inkludert i dette filteret er en terskel for Minor Allele Frequency (MAF) på  $1,0 \times 10^{-6}$ . I dette tilfellet tilsier informasjon fra Exome Aggregation Consortium (ExAC) database at varianten filtreres bort på basis av MAF over terskelverdi.

#### **BRCA Somatic Multiplex I (HD795/HD810)**

Åtte av de totalt 13 BRCA1 og BRCA2 variantene inkludert i kontrollen detekteres av samtlige deltagende laboratorier (OUS, SiV, STHF, UNN og SUS), se vedlegg 4. HUS har også analysert BRCA Somatic Multiplex I, men det var en teknisk dårlig kjøring og resultatet er derfor ikke tatt med.

Én av variantene (BRCA1 S1613G) detekteres hos 4 av de totalt 5 deltagende laboratoriene (OUS, SiV, UNN og SUS). Hos det gjenstående laboratoriet detekteres ikke denne varianten som følge av maskering fra leverandørs side (STHF). På basis av dette observeres det forskjell i maskering av samme posisjon på tvers av plattform.

Fire av variantene (BRCA2 I2675Dfs\*6, BRCA2 K1691Nfs\*15, BRCA2 N1784Tfs\*7 og BRCA2 N289H) har lav dekning eller detekteres ikke ved flere av de deltagende laboratoriene. Bioinformatisk dekningsanalyse viser at disse områdene normalt har god dekning. Det vil derfor være nærliggende å mistenke at den reduserte dekningen i disse områdene vil kunne være tilknyttet kontrollen i seg selv. I tillegg befinner tre av disse variantene seg i relasjon til eller i homopolymerer  $\geq 6x$ . For laboratoriene som benytter seg av Ion Torrent teknologi vil dette kunne medføre potensiell maskering.

BRIP1 og BARD1 inngår kun i panelet til OUS, hvor de aktuelle variantene (BRIP1 S919P og BARD1 R378S) ble detektert. NBN inngår i panelet til OUS, STHF og SiV, men kun OUS påviste NBN varianten

med god dekning. Den aktuelle varianten, NBN E185Q, er klassifisert som benign og ligger i et amplikon som både STHF og SiV hadde dårlig dekning (over 40% av amplikon hadde dårlig dekning).

### 3.3 Bioinformatisk dekningsanalyse

OUS, STHF, SUS og SiV sendte inn prøver til bioinformatisk dekningsanalyse, se vedlegg 2 for detaljer. De viktigste hovedfunnt var for BRCA1 og 2 at det var to amplikon som gikk igjen med dårlig dekning (OBRA\_BRCA1\_7 og OBRA\_BRCA1\_96), og dette var de samme amplikonene for OUS, STHF og SiV.

SUS har deltatt i dekningsanalyse med 12 prøver, og der 2 hadde dårlig dekning i noen amplikon og 1 prøve hadde dårlig kvalitet generelt. 9 av prøvene hadde god dekning i alle amplikon.

Dekningsanalyse for laboratoriet som benytter Genexus-system viser flere amplikon i andre gener med dårlig dekning sammenlignet med de andre laboratoriene.

## 4. Diskusjon

Deltagende laboratorier benytter to sekvenseringsplattformer, Illumina og Ion Torrent. Sekvenseringsprinsipp for disse to plattformene er ulike og begrensninger vil ikke nødvendigvis være overlappende. Laboratoriene benytter også ulike panel hvor det er inkludert alt fra to til 161 gener, og tilhørende prosessering av rådata er avhengig av sekvenseringsplattform, panel og valgte parameter. Til tross for underliggende forskjeller viser gjennomført intra-laboratoriesammenligning godt samsvar ved deteksjon av varianter i BRCA1 og BRCA2.

### 4.1 Homopolymerområder

Det er 32 kjente homopolymerområder med  $\geq 6$  baserepetisjoner i BRCA1 og BRCA2 (De Jonge et al, 2018). Varianter i disse områdene er teknisk vanskelig, spesielt ved bruk av Ion Torrent teknologi. I tilfeller hvor det detekteres færre eller flere av den repeterte basen vil man ikke kunne skille mellom teknisk artefakt og reell variant. Som et resultat av denne begrensningen har leverandør i noen tilfeller valgt å maskere slike varianter i homopolymerområder. Laboratoriene som detekterte slike homopolymervarianter i ringtesten hadde enten Illumina plattform eller Ion Torrent plattform med BRCA-panel.

Illumina plattform vil måle antall baserepetisjoner mer nøyaktig enn Ion Torrent plattform, men ved lav allelfraksjon vil det være mer usikkerhet knyttet til resultatet. For Ion Torrent teknologien er deteksjon av endring i baserepetisjoner en generell begrensning til tross for at man ved BRCA-panel detekterer slike varianter. Riktigheten av varianter med endret lengde på homopolymer bør for Ion Torrent verifiseres med annen egnet metode uavhengig av allelfraksjon for å unngå falske positive.

For kimbane er det kjente patogene varianter i homopolymerområder (DeJonge et al, 2018). Endret antall baserepetisjoner i en homopolymer vil ofte være patogent, og det er å forvente at slike endringer også vil forekomme i tumorutvikling.

### 4.2 Nomenklatur

En konsekvent og entydig beskrivelse av varianter er essensielt for å kunne sikre harmonisering og samarbeid på tvers av lokasjoner og fagfelt. Det er ønskelig at man følger HGVS retningslinjer for nomenklatur (den Dunnen et al. 2016).

For Ion Torrent systemene er det kjent at callingen kan resultere i feil nomenklatur; observeres spesielt ved duplikasjoner, insersjoner og delesjoner. I ringtesten ble det observert noen få tilfeller med slike varianter. Feil nomenklatur kan føre til at man ikke finner den aktuelle varianten i litteraturen eller databaser noe som kan medføre feiltolkning.

#### 4.3 Falske positive varianter

Det er flere nivåer av teknisk kontroll (f.eks. analyseoppsett, per prøve, per variant). Dette prosjektet har valgt å fokusere på kontroll for å sikre at rapporterte varianter er reelle og å unngå rapportering av falske positive varianter. Generell kvalitetskontroll i henhold til egne prosedyrer vil vi ikke gå inn på.

I ringtesten med pasientprøver ble det rapportert inn varianter med lav frekvens, dårlig kvalitetsparametre og varianter i homopolymerområder hvor det ikke var samsvar mellom laboratoriene. For slike usikre varianter er det viktig å foreta en vurdering av lesedybde, tumorandel, allelfraksjon, nærliggende sekvens og annotering. Det finnes flere verktøy for visualisering av resultatet, eksempelvis IRGV og IGV. Ion Reporter Genomic Viewer (IRGV) er innebygd i Ion Reporter ved Ion Torrent plattformen og visualiserer varianter i henhold til det annoteringsverktøyet har annotert dem til. Ved bruk av Integrative Genomics Viewer (IGV) kan man derimot visualisere alignment-fil (BAM). Det er viktig å være klar over denne forskjellen mellom IRGV og IGV ved vurdering av varianter i forhold til potensiell feilannotering.

Selv om visualisering av data ser ut til å bekrefte tilstedeværelse av den usikre varianten, vil det kunne være andre usikkerhetsmomenter heftet ved varianten, for eksempel deamineringsartefakter og homopolymerer. For formalinfikserte parafininnstøpte (FFPE) materiale kan formalinfikseringen føre til deaminering av cytosinnukleotider og forming av C>T og G>A sekvensartefakter eller andre sekvensfeil under PCR-amplifisering (Srinivasan et al, 2002; Do et al, 2015). Disse vil typisk forekomme som lavfrekvente varianter. Som diskutert ovenfor, utgjør homopolymerer også en utfordring, spesielt for Ion Torrent teknologien.

#### 4.4 Falske negative varianter

Ved analyse av BRCA Somatic Multiplex I ble det observert forskjell i maskering av en variant i BRCA1 på tvers av plattform. Ion Torrent systemene maskerer gitte posisjoner under analyseringsprosessen. Det er vanskelig å få oversikt over hva som inngår i maskeringsfilen fra leverandør. Inkludert i denne filen er posisjoner hvor leverandør har observert høy sannsynlighet for falske positive. Maskeringen bidrar til å redusere falske positive, men kan ikke utelukke at det kan forekomme reelle funn i posisjonen. Dette er en kjent begrensning ved metoden som det er viktig å kjenne til. Avhengig av testsystem vil homopolymerer bli maskert i analyseringsprosessen, se homopolymerdiskusjonen ovenfor.

Fire av variantene befant seg i områder med lav dekning eller detekteres ikke ved flere av de deltakende laboratoriene trolig grunnet utforming på kommersiell kontroll. Lav dekning vil kunne medføre falskt negativt resultat. Dette vil også være relevant i tilfeller hvor villtype har behandlingsekvens.

Ved analyse av AcroMetrix Oncology Hotspot Control ble det observert en variant i ATM klassifisert som sannsynlig patogen utenfor standardfilter (Oncomine extended) hos samtlige laboratorier. Denne varianten ble fjernet grunnet for høy frekvens i normalpopulasjonen ( $> 1,0 \times 10^{-6}$ ). Dersom varianten hadde vært definert i et hotspot av leverandøren, eller sannsynlig patogen eller patogen i ClinVar, ville

den ikke blitt filtrert bort. Til sammenligning filtrerer laboratoriene som benytter Illuminateknologi bort varianter med frekvens i normalpopulasjon over 1 %.

#### 4.5 Bioinformatisk dekningsanalyse

Patogene og sannsynlig patogene varianter i BRCA1- og BRCA2-genet kan forekomme spredt utover alle kodende områder. I motsetning til mange andre gener assosiert med kreft finnes det ikke definerte hotspot områder. Alle kodende områder bør derfor være tilstrekkelig sekvensert (ha god dekning). Det er derfor utført bioinformatisk dekningsanalyse. De fire laboratoriene som utførte denne analysen benytter Ion Torrent teknologi.

Dekningsanalysen avdekket to amplikon med dårlig dekning hos tre av laboratoriene. Begge disse amplikonene dekker ikke-kodende sekvens.

### 5. Anbefalte retningslinjer

Under arbeidet har det vært et godt samarbeid mellom deltagende laboratorier og Avdeling for medisinsk genetik, Seksjon for kreftgenetik ved OUS. Samarbeidet har resultert i generelle anbefalinger angående svarrapportering, nomenklatur, teknisk kontroll og homopolymerområder ved NGS-analyse av tumor beskrevet nedenfor.

Dette prosjektet har fokusert på kontroll for å sikre at rapporterte varianter er reelle, unngå rapportering av falske positive varianter og at man er bevisst på svakhetene i systemet. Det anbefales at hele prosessen kvalitetssikres; fra prøveopparbeidelse til svarrapportering.

#### 5.1 Homopolymerområder

Det anbefales at funn i homopolymerområder verifiseres med annen egnet metode, spesielt ved bruk av Ion Torrent teknologi.

#### 5.2 Nomenklatur

Det anbefales at det benyttes HGVS-nomenklatur. Et nyttig verktøy for å finne rikelig HGVS nomenklatur kan være Mutalyzer.nl, samt å sjekke varianten i IGV.

#### 5.3 Teknisk kontroll - Falske positive og negative varianter

##### 5.3.1 Visualisering av data

Det anbefales å visualisere alle delesjoner, insersjoner, duplikasjoner og varianter hvor nærliggende sekvens (for eksempel om det er i relasjon til homopolymerområde) ikke er kjent; både med tanke på annotering, nomenklatur og teknisk kontroll. Et nyttig verktøy kan være Integrative Genomics Viewer (IGV). Det bemerkes at Ion Reporter Genomics Viewer er vesentlig begrenset i funksjonalitet på mange områder, inkludert at man antagelig ikke alltid vil oppdage feilannotering og det er ikke mulig å søke opp posisjoner.

##### 5.3.2 Bioinformatisk dekningsanalyse

Det anbefales å sikre dekning i genområdene som ønskes analysert. Dersom metoden har begrensninger som ikke muliggjør dette, bør begrensninger oppgis til rekvirent. I tilfeller hvor villtype har behandlingskonsekvens må dekning være tilstrekkelig for rapportering.

Ved implementering av nye gener i analysen anbefales utførelse av bioinformatisk dekningsanalyse basert på historiske data dersom dette er mulig.

#### 5.3.2.1 Analyseringsprosess og maskering

Det anbefales at man forstår analyseringsprosessen og har kjennskap til eventuelle maskeringer av sekvensposisjoner i systemet.

#### 5.3.2.2 Filter

Det anbefales å sette seg inn i hva filter benyttet i diagnostikken inkluderer og ekskluderer. Søk bak filter stiller større krav til kunnskap om teknisk kontroll og variantvurdering.

#### 5.3.2.3 Ekstern kvalitetskontroll

Deltakelse i eksternt kvalitetskontrollprogram anbefales. Det finnes kvalitetsprogram for alle deler av prosessen; fra bestemmelse av tumorandel og utvelgelse av vevsområde til og med tolkning og svarrapportering.

#### 5.3.2.4 Svrrapportering

Vi har laget forslag til svrrapport (vedlagt). Denne er utarbeidet på bakgrunn av maler fra svrrapport fra spesielt UNN, AHUS, STHF, OUS og med.gen OUS og rapport fra GenQA. Det har spesielt vært en diskusjon rundt om allelfrekvens kan brukes som en indikator for at en patogent variant er somatisk eller arvelig, men GenQA anbefaler at dette brukes med forsiktighet og at man uansett henviser til avdeling for medisinsk genetikk.

Noen sykehus har med en kommentar om dekning av amplikon. Ved store panel kan dette bli omfattende informasjon, og det er opp til hvert laboratorium hvorvidt dette er informasjon man ønsker å informere om i svrrapporten.

#### 5.3.2.5 Varianter av usikker betydning (VUS)

Ved påvisning av VUS anbefales det å vurdere varianten i samarbeid med en medisinsk genetisk avdeling.

#### 5.3.2.6 Variantvurdering

Variantvurdering er et omfattende tema som ikke har vært fokusert på i dette prosjektet. I løpet av prosjektperioden har det blitt delt en del relevante databaser og artikler, se vedlegg 5. Det anbefales at laboratoriene har kjennskap til disse.

Det anbefales at det opprettes en arbeidsgruppe for variantvurdering og tolkning for harmonisering av analysetilbudet.

## 6. Deltakere

Region	HF	Lab.
Helse Vest	Stavanger universitetssykehus	Laboratorium for molekylærbiologi
Helse Vest	Haukeland universitetssykehus	Enhet for Tumorgenomikk
Helse Sør – Øst	Oslo universitetssykehus	Molekylær patologi
Helse Sør – Øst	Akershus universitetssykehus	Patologi
Helse Sør – Øst	Sykehuset Telemark	Seksjon for medisinsk genetikk
Helse Sør – Øst	Sykehuset i Vestfold	Seksjon for genteknologi, Mikrobiologisk avdeling
Helse Sør – Øst	Vestre Viken	Patologi (vil analysere prøvene senere)
Helse Nord	Universitetssykehuset Nord - Norge	Klinisk Patologi

Tabell 1: deltagende laboratorier

Region	HF	Navn
Helse Sør – Øst	Sykehuset Telemark	Linda Strand
Helse Sør – Øst	Sykehuset Telemark	Ida Marie Børresen
Helse Sør – Øst	Sykehuset i Vestfold	Nermin Zecic
Helse Sør – Øst	Sykehuset i Vestfold	Anne Pernille H. Dyrbekk
Helse Sør – Øst	Sykehuset i Vestfold	Camilla Holmsen
Helse Sør – Øst	Oslo universitetssykehus	Bjørnar Tovson Bae Flatin

Tabell 2: skrivegruppen

## 7. Referanser

Parker C *et al.* Prostate cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2020 Sep;31(9):1119-1134.

den Dunnen JT *et al.* HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat.* 2016 Jun;37(6):564-9.

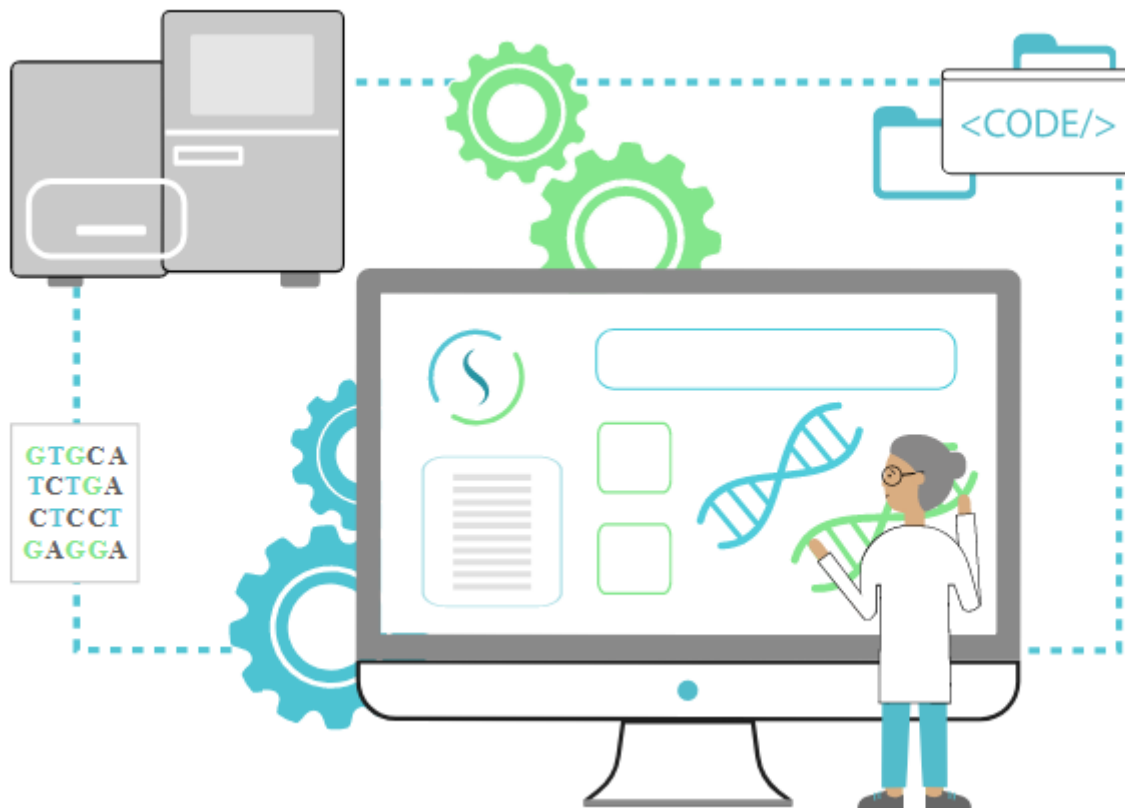
de Jonge MM *et al.* Validation and Implementation of BRCA1/2 Variant Screening in Ovarian Tumor Tissue. *J Mol Diagn.* 2018 Sep;20(5):600-611.

Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of Fixatives and Tissue Processing on the Content and Integrity of Nucleic Acids. *Am J Pathol.* 2002 Dec; 161(6): 1961–1971.

Do H, Dobrovic A. Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization. *Clin Chem* 2015 Jan;61(1):64-71.

## 8. Vedlegg

1. Rapport "Innføring BRCA-test".
2. Presentasjon dekningsanalyse
3. Resultat ringtest
4. Resultat kontroller
5. Oversikt databaser
6. Forslag svarrapport
7. Gjennomføringsplan



## NGS diagnostikk innen kreft (somatiske forandringer)

### - Innføring av BRCA - test

Rapport fra nasjonalt nettverksarbeid i NorPreM

(2020 – 2022)

Nasjonalt kompetansenettverk for persontilpasset medisin (NorPreM)





## Innhold

Sammendrag og anbefalinger .....	3
1. Arbeidsgruppe 5 – Innføring av BRCA-test.....	5
1.1 Innledning.....	5
1.2 Forutsetninger og prosess for innføring av BRCA1/2-test .....	6
1.2.1 Indikasjon .....	6
1.2.2 Prøvemateriale .....	6
1.2.3 Analysemetode.....	8
1.2.4 Variantvurdering, klassifisering og rapportering.....	8
1.2.5 Kvalitetskontroll .....	10
1.2.6 Nasjonalt og lokalt samarbeid .....	10
1.2.7 Harmonisering med kimbanetesting.....	10
1.2.8 Prøvetall og funksjonsfordeling.....	11
1.3 Oppsummering og anbefalinger.....	12
2. Vedlegg 1 – Status for BRCA1/2-testing i Norge .....	13
Vedlegg 2 - Forfattere .....	14
3. Referanser .....	15





## Sammendrag og anbefalinger

Nasjonalt kompetansenettverk for persontilpasset medisin – presisjonsmedisin ble opprettet av de fire regionale helseforetakene i 2019 etter oppdrag fra Helse- og omsorgsdepartementet. Nettverket (NorPreM) har som formål å legge til rette for økt harmonisering, felles kompetansenivå og bedre samarbeid nasjonalt for å fremme enhetlig og god implementering av persontilpasset medisin i helsetjenesten. Over en toårs periode (2020-2021) har NorPreM etablert et undernettsverk for «NGS diagnostikk innen kreft (somatiske forandringer)» ledet av fire sentrale fagpersoner fra hver helseregion og med Helse Sør Øst sin regionale fagnettverksleder som prosjekteier. Undernettsverket har organiserte fire arbeidsgrupper som så nærmere på fire områder av særskilt betydning; 1) harmonisering og standardisering, 2) etablering av nye tjenester, 3) kompetanse og utdanning og 4) IKT og samhandling. Resultatet fra dette arbeidet er presentert i egen rapport (ref.). Parallelt med dette arbeidet var det et økende behov for å etablere molekylær testing av to store kreftrelaterte gener, BRCA1 og BRCA2, i DNA fra svulstvev (somatiske forandringer). Undernettsverket ønsket derfor å opprette en egen arbeidsgruppe som kunne se på utfordringer ved implementering av slike analyser nasjonalt og komme med anbefalinger om løsninger. Dette arbeidet var med på å understøtte hovedarbeidet til «Undernettsverket for NGS analyser» ettersom utfordringer og løsninger her ble konkretisert.

Under følger gruppens anbefalinger for implementering av analyse for BRCA1 og BRCA2 genene, etterfulgt av en mer detaljert rapport.

Indikasjon for BRCA1/2-test er høygradige kreft i eggstokk/eggleder/bukhinne og kastrasjonsresistent metastatisk prostatakreft.





## Anbefalinger

- Anbefales målrettet NGS – analyse av hele kodingsområdene for BRCA 1/2
- Anbefales at BRCA1/»-test etableres ved sykehus som allerede har etablert NGS – kompetanse. Antall testsentra må harmoniseres med prøvemengde og behov.
- Anbefales nasjonal og tverrfaglig harmonisering av variantvurdering, tolkning og rapportering
- Anbefales nasjonal og tverrfaglig kommunikasjon rundt enkeltkasus samt å etablere gode rutiner for å sammenholde testresultat fra testing i svultsvev og blod.
- For prostata anbefales det at testing primært gjøres på FFPE nålebiopsi. For eggstokkreft anbefales det å bruke biopsi eller representativt snitt fra tumor i resektat (FFPE).
- Anbefales regelmessig ekstern kvalitetskontroll av testing, variantvurdering og rapportering. Nasjonal ringtesting kan vurderes.
- For etablering av metoden forutsettes det at nødvendige ressurser tilføres eller allokering av eksisterende ressurser slik at etablering og drift er gjennomførbart.

Ragnhild Margrete Wold, Tromsø, 16/03/22

Hege Russnes, Oslo, 22/02/22





## 1. Arbeidsgruppe 5 – Innføring av BRCA-test

### 1.1 Innledning

PARP-inhibitoren olaparib er nå godkjent som behandling ved BRCA1/2-mutert høygradig kreft i eggstokk, eggleder og bukhinnekreft. I dag er også preparatet til vurdering ved hos Beslutningsforum for nye metoder da det er aktuelt som behandling av metastatisk prostatakreft med BRCA1/2-mutasjon.

Pasienter som skal ha BRCA1/2-testing av tumorvev har ikke et likeverdig tilbud nasjonalt. Frem til høsten 2020 har BRCA1/2-test av ferskt tumorvev ved Oslo universitetssykehus vært eneste tilbud i Norge (somatiske mutasjoner), men prøvetakning, forsendelse og lagring av ferskt vev er tungvint og risikabelt. Noen sykehus har sendt formalinfiksert vev til utlandet, for eksempel Lund i Sverige, noe som medfører større kostnader samt praktiske utfordringer. Nylig har både Universitetssykehuset i Nord-Norge (UNN) og St. Olav hospital (St.Olav) etablert BRCA1/2-testing av tumorvev på formalinfiksert materiale.

Manglende koordinering ved etablering av nye testtilbud har resultert i at ulike diagnostiske metoder har blitt implementert på ulike tidspunkter nasjonalt. Dette gjelder også for testing av BRCA1/2 i tumorvev hvor det per dags dato ikke foreligger et nasjonalt dekkende tilbud. Et mest mulig likeverdig tilbud fordrer samarbeid og samhandling mellom sentra som skal tilby denne typen diagnostikk. I tillegg til undersøkelse på somatiske mutasjoner i BRCA1/2, er testing av kimbane anbefalt. Dette utføres ved medisinsk genetiske avdelinger i Norge, og er regulert av bioteknologiloven. Testing av både kimbane og somatiske mutasjoner krever god informasjons- og prøveflyt, samt samarbeid på tvers av fagfelt lokalt og nasjonalt.

Arbeidsgruppe 5 har som mandat å kartlegge behov for innføring av BRCA1/2-test ved helseforetakene, utvikle prosess og forutsetninger for innføring av BRCA1/2-test for innføring av BRCA1/2-testing ved helseforetakene.

Denne prosjektrapporten er utarbeidet på bakgrunn av føringer og anbefalinger i Norsk handlingsprogram for prostatakreft og Norsk handlingsprogram for gynekologisk kreft samt vitenskapelige artikler. Det er hentet ut insidenstall fra Kreftregisteret. For kartlegging av status ved de ulike helseforetakene er det sendt ut et spørreskjema til de aktuelle avdelinger. Leder av gruppen har deltatt i et nordisk ekspertpanel for BRCA1/2-utredning av pasienter med prostatakreft arrangert av Astra Zeneca og MSD. Flere av gruppens medlemmer har også deltatt på Nordisk webinar om PARP-hemming og prostatakreft arrangert av MSD. Arbeidsgruppen har avholdt 2 digitale møter våren 2021.

Rapporten har fokusert på faglige og praktiske utfordringer knyttet til selve testingen og prosessen rundt dette. Gruppen ønsker også å påpeke at for etablering av en ny metode forutsettes tilførsel av nødvendige ressurser, eller en allokering av eksisterende ressurser, slik at etablering og drift av BRCA1/2-test er gjennomførbart.

*Vedlegg 1 tabell for oversikt over status for BRCA1/2 – testing i Norge*





## 1.2 Forutsetninger og prosess for innføring av BRCA1/2-test

### 1.2.1 Indikasjon

I april 2020 godkjente Beslutningsforum PARP-inhibitoren olaparib som monoterapi til vedlikeholdsbehandling hos pasienter med avansert BRCA1/2-mutert høygradig kreft i eggstokk-, eggleder og bukhinne som responderer på førstelinjebehandling. Norsk handlingsprogram for gynekologisk kreft anbefaler derfor testing på BRCA1/2 i tumorvev<sup>1</sup>.

Det ble nylig rapportert at pasienter med antiandrogenresistent metastatisk prostatakraft med somatiske mutasjoner eller kimbanemutasjoner i BRCA1/2, eller ATM, kan ha nytte av behandling med PARP-hemmerene olaparib og rucaparib (1). Disse medikamentene er FDA-godkjente, og i dag er olaparib til vurdering hos Beslutningsforum for nye metoder med tanke på behandling av pasienter med metastatisk prostatakraft som kan ha nedarvede eller ervervede mutasjoner i DNA reparasjonsgene BRCA1/2. I samsvar med retningslinjene fra European Society of Medical Oncology (2) anbefaler det nasjonale handlingsprogrammet som et minimum å teste tumorvev for BRCA1/2 og mikrosatellittinstabilitet<sup>2</sup>. Det anbefales å benytte «next generation sequencing» (NGS) som analysemetode<sup>3</sup>(3). Begrepet «anbefaler» er i Helsedirektoratets beskrivelse av normerende produkter definert som «en sterk anbefaling/råd som gjelder de aller fleste»<sup>4</sup>.

Handlingsprogrammene anbefaler også å teste pasienter med prostata- og eggstokkreft for arvelige mutasjoner i BRCA1/2. I tumorvev vil både somatiske mutasjoner og kimbanemutasjoner påvises, men det er vanskelig å skille disse med mindre normalt vev eller blodprøve fra pasienten analyseres i tillegg. Testing av tumorvev vil derfor fungere som et supplement til kimbanetesting og visa versa. Ved funn i tumorvev bør pasienten henvises til kimbanetesting og genetisk veiledning (2). I enkelte land gjøres BRCA1/2-test i tumor og kimbane parallelt. Gruppen anbefaler at organisering og prøvetryk avtales lokalt ved de ulike helseforetakene. Initiativ til somatisk BRCA1/2-test bør tas av behandlende lege, men direkte testing ved patologiavdelingen ved diagnosetidspunkt (reflekstesting) kan vurderes ved eggstokkreft.

### 1.2.2 Prøvemateriale

Frem til høsten 2020 har BRCA1/2-testing av tumorvev kun vært gjort på ferskt vev ved Oslo Universitetssykehus i Norge. DNA fra ferskt vev har bedre kvalitet, men logistikken ved forsendelse og lagring er mer krevende enn for formalinfiksert materiale. For mange pasienter vil ferskfrosset materiale ikke være tilgjengelig. Analyser som kan benytte DNA fra formalinfikserte parafininnstøpte (FFPE) materiale har i tillegg fordel av at man kan velge ut tumorområdene ved makrodisseksjon veiledet av det diagnostiske vevssnittet. Dette gjøres rutinemessig ved de fleste NGS-baserte analyser i tumordiagnostikk i dag. For et likeverdig tilbud nasjonalt anbefaler gruppen at analysen utføres på FFPE preparater som brukes rutinemessig i morfologisk diagnostikk. Vurdering og utvelgelse av

<sup>1</sup> [Gynekologisk kreft – handlingsprogram - Helsedirektoratet](#)

<sup>2</sup> <https://www.helsedirektoratet.no/retningslinjer/prostatakraft-handlingsprogram/>

<sup>3</sup> <https://www.helsedirektoratet.no/retningslinjer/prostatakraft-handlingsprogram/>

<sup>4</sup> [Om Helsedirektoratets normerende produkter - Helsedirektoratet](#)





tumorvev gjøres av patolog og mulighet for konsultasjon hos sub-spesialisert patolog innen gynekologi og urologi ved avdelingen forutsettes.

Mutasjonsanalyse av tumorvev er utfordrende. Tumorcellene er vanligvis blandet med ikke-neoplastiske celler og mengden ekstrahert DNA er ofte begrenset og av dårlig kvalitet. I tillegg kan formalinfiksering føre til deaminering av cytosinnukleotider og forming av C>T og G>A sekvensartefakter eller andre sekvensfeil under PCR-amplifisering (4, 5). For mange krefttyper er det påvist god sensitivitet og spesifisitet ved testing for somatiske mutasjoner i FFPE-vev (Boyle TA et al. 2021, Fisher KE et al. 2016). For prostata er det noe begrenset litteratur som omhandler NGS-analyse på svulstmateriale i rutinediagnostikk. Kliniske studier rapporterer mislykket resultat for opptil 30-40% av prøvene (3,6,7,8). Dette var i hovedsak forårsaket av ikke representativt tumormateriale, begrenset prøvemateriale, lavt tumorinnhold og suboptimal DNA-mengde og/eller -kvalitet. En oppsummering av utfordringer og praktiske anbefalinger for optimalisering av mutasjonstesting av homologous recombination repair (HRR)-gener hos pasienter med metastatisk prostatakreft ble nylig publisert av en internasjonal ekspertgruppe(9). Det foreligger også tilsvarende anbefalinger for BRCA1/2-testing i eggstokkreft (10). Noen av disse er kort diskutert nedenfor.

Tilstrekkelig tumorinnhold i prøven er en avgjørende faktor for en vellykket analyse. Lavt tumorinnhold kan føre til at lavfrekvensmutasjoner ikke blir detektert, feilberegning av kopitallvariasjon og økt sannsynlighet for falske negative varianter. Det er anbefalt at patolog kontrollerer HE-snittene for å sikre at FFPE-prøver med tilstrekkelig celleinnhold og minimum tumorcelleandel har blitt analysert. Dersom det totale innholdet neoplastiske celler i vevsblokka er lavt, anbefales makro-disseksjon av tumorområdet for å øke neoplastisk celleinnhold i prøven. Forøvrig er det nødvendig med streng kvalitetskontroll av prøvematerialet gjennom alle pre-analytiske trinn. Prosessen bør inkludere DNA-ekstrahering med FFPE-tilpasset metode, fluorometri- og PCR- basert måling av DNA-mengde og -kvalitet, samt beregning av tilstrekkelig DNA-input for den spesifikke analysen (5,9,10).

Prostatektomi-preparater er cellerike og inneholder store mengder DNA, men slike operasjonspreparater foreligger kun fra 10-15% av pasientene med metastatisk prostatakreft. Fra de fleste pasienter finnes det begrenset mengde FFPE-materiale i form av nålebiopsier. DNA-utbyttet fra disse biopsiene er ofte lavt, men DNA-kvaliteten kan derimot være høyere enn i større preparater hvor fikseringsprosessen ofte har vært mindre optimal/hard (f.eks storblokker). Dersom det foreligger nok tumorvev i prostatabiopsier, anbefales derfor testing av disse. Ved eggstokkreft foreligger ofte større biopsier eller standard vevsprøver fra operasjonspreparat som har gjennomgått en mer skånsom fikseringsprosess enn prostataresektater. Gruppen anbefaler derfor BRCA1/2-analyse av FFPE biopsi eller standard snitt fra svulstvev ved eggstokkreft.

Behovet for mutasjonstesting kan ofte forekomme flere år etter primærdiagnose av prostatakreft. DNA i arkiverte FFPE-prøver gjennomgår gradvis kjemisk modifisering og degradering over tid, noe som kan redusere nytten av de eldre prøvene (7). Det er relativt god samsvar mellom BRCA1/2 mutasjonsstatus i metastase og primærtumor i prostata (11), men nytt prøvemateriale er ofte ikke tilgjengelig eller er uegnet for analyse (f.eks. syre-dekalsinerte benmetastasebiopsier). Derfor er tidligere prøver fra pasienten ofte eneste alternativ. Prosjektgruppen anbefaler at det bør jobbes mot optimalisering av fikseringsprosess og lagringsforhold av materiale for å øke sannsynlighet for pålitelige resultater.





Dersom det foreligger svært liten mengde tumorvev eller forringet DNA kan det i fremtiden være aktuelt å undersøke for BRCA1/2-mutasjoner i fritt tumor-DNA sirkulerende i blod (12). Denne analysen er foreløpig ikke etablert i rutinediagnostikk i Norge.

### 1.2.3 Analysemetode

Testmaterialets begrensinger bør tas i betraktning ved valg av analysemetode. Måltrettet NGS av hele kodingsområdene for BRCA1/2, ved enten amplikon (multiplex PCR)-beriking eller capture (probe hybridisering)-beriking av målgenområdene, er best egnet til å oppdage single nukleotidvarianter (SNVer) og små innsetninger eller «slettinger» (indeler). Amplikonbasert sekvensering har flere fordeler fremfor capture-basert analyse, blant annet ved bruk av lite DNA-input, bedre arbeidsflyt for biblioteketablering og enklere bioinformatikk. Metoden er imidlertid sensitiv for formalinfikseringsartefakter og for suboptimal DNA-input. Den kan også generere falske positive varianter, ettersom frekvensen av PCR-duplikater øker med redusert DNA-mengde. Risiko for falske positive resultater kan reduseres ved hjelp av molekylære barkoder, gjentakelse av analysen og begrensning av rapportering til varianter påvist med høyere allelfrekvens enn den validerte deteksjonsgrensen. Alternativt kan analyser basert på hybridisering brukes da disse sannsynligvis i mindre grad genererer falske positive varianter. I tillegg kan disse metodene detektere større delesjoner og genrearrangeringer (avhengig av analysedesign). På den annen side benytter hybridiseringsbaserte analyser ca. 10 ganger høyere DNA-mengde, de er mer arbeidskrevende og har mer kompleks bioinformatikk (9,10, 13).

Ved etablering på laboratoriet bør valgte analyse valideres eller verifiseres etter gjeldende retningslinjer med hensyn til alle analyserte varianttyper (14). Bruk av representative FFPE-prøver og standard referansemateriale til validering er anbefalt. For analysering av FFPE-materiale fra bryst- og eggstokkreft har amplikonbaserte BRCA-paneler blitt benyttet med god ytelse (15,16). Ulike kommersielle kit er nå tilgjengelige på markedet.

I BRCA1-genet, og i mindre grad i BRCA2-genet, er det påvist store delesjoner eller duplikasjoner (store genomiske rearrangeringer) med opphav i kimbanen. Frekvensen varierer fra 1 % - >20 % i ulike populasjoner. Disse patogene variantene kan påvirke ett eller flere eksoner og medføre kopitallvariasjon av genet. Frekvensen av somatiske rearrangeringer er ukjent, og per i dag er det vanskelig å detektere denne type varianter ved NGS-analyse på FFPE tumorvev. NGS-test med bioinformatisk pipeline for CNV-beregning utført på DNA ekstrahert fra blod er bedre egnet til dette. Metoden MLPA (multiplex ligasjonsavhengig probe amplifisering) er ansett som gullstandard for analyse av CNV eller for verifisering av NGS-funn (17).

### 1.2.4 Variantvurdering, klassifisering og rapportering

Retningslinjer for somatisk variantvurdering ble publisert i 2015 av Association for Molecular Pathology, ASCO, og College of American Pathologists(18). Her skisseres et firetrinnsystem for klassifisering av somatiske varianter, som inkluderer varianter av sterk klinisk betydning, varianter av potensiell klinisk betydning, varianter av ukjent klinisk betydning, og godartet/sannsynlig godartet. Ettersom medikamentell terapi rettet mot spesifikke biologiske prosesser utvikles raskt, har man hatt behov for en mer klinisk relevant nivåinndeling av somatiske varianter. En gitt variants prediksjonsverdi for en spesifikk behandling avdekkes ved translasjonell forskning etterfulgt av klinisk studie. De siste





årene har man tatt i bruk anbefalingene fra ESMO (European Society for Medical Oncology) for tolkning og bestemmelse av evidensnivå for somatiske varianter og utviklet ESCAT-skala (the ESMO scale for Clinical Actionability of Molecular Targets). ESCAT er et rammeverk for nivåinndelingen av somatiske varianter etter evidens for sammenheng mellom tilstedeværelse av variant (dvs. biomarkør) og effekt av et gitt medikament (19).

Ved kimbanetesting klassifiseres varianter etter et 5-delt system hvor klasse 1 =benign/ normalvariant, 2 =sannsynlig benign/normalvariant, 3 =usikker klinisk betydning (VUS), 4 =sannsynlig patogen/sykdomsgivende og klasse 5 =patogen/sykdomsgivende. Hovedretningslinjen for variantklassifisering av kimbanevarianter er "Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology"(20). Denne retningslinjen beskriver bruk av evidens som er unik for tolkning av kimbanevarianter og inkluderer informasjon om segregering, i trans og de novo funn, og pasientfenotypedata. Felles for begge retningslinjene nevnt over er mange informasjonskilder, for eksempel mutasjonstype, minor allel-frekvens, germline-variantdatabaser, publiserte funksjons- og populasjonsstudier og in silico prediksjonverktøy

I tillegg finnes kimbaneretningslinjer som er spesifikke for utvalgte tilstander/grupper av gener som for eksempel ENIGMA (Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles), som har jobbet spesielt med brystkreftgener, og særlig BRCA1/2. ENIGMA anbefaler at man benytter samme retningslinje for variantvurdering av somatiske varianter som for kimbanevarianter, nettopp for å unngå motstridende klassifisering og forvirring da dette i ytterste konsekvens kan ha alvorlige følger som profylaktiske inngrep på feil grunnlag. I to publikasjoner som omhandler BRCA1/2 i prostata- og eggstokk-kreft anbefales det at kun patogene og sannsynlig patogene varianter rapporteres. Her vises blant annet til overnevnte retningslinjer (9).

Det er allerede etablert kunnskap om og prosedyrer for variantvurdering av BRCA1/2 ved medisinsk genetiske avdelinger som har gjort kimbanetesting av disse genene i mange år. Og det er også nylig startet et prosjekt for harmonisering i bruk av variantvurderingskriterier mellom samtlige medisinsk genetiske laboratorier som analyserer BRCA1/2. American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) har retningslinjer som beskriver evidens som må vurderes og vektas for å utføre variantvurderinger, og norske genetiske avdelinger har erfart at det er hensiktsmessig med tett samarbeid slik at de forskjellige punktene brukes likt, uavhengig av den som har utført vurderingen (21). Patogene og sannsynlig patogene varianter i BRCA1/2 finnes spredt i hele genet. Det finnes norske founder-varianter som påvises med en viss frekvens, men det påvises mange nye varianter som ikke tidligere er rapportert. Medisinsk genetiske avdelinger har allerede registre over et betydelig antall varianter i BRCA1/2 som er vurdert og dokumentert etter akkreditert prosedyre. Det arbeides nå med en nasjonal database for blant annet BRCA1/2-varianter, og dette vil være et viktig verktøy for variantvurdering i Norge. Dette bør også være tilgjengelig for alle som utfører variantvurdering av somatiske varianter. Det nyetablerte nettverket «infrastruktur for presisjonsdiagnostikk» innen kreft (InPreD) har etablert utvidet molekylær testing for pasienter med avansert kreftsykdom som kan ha nytteverdi av behandling i biomarkørdefinerte kliniske studier. Her har man etablert et genpanel (TSO500) som også inneholder BRCA1/2. Testen, inkludert data analysepipelines, er etablert og validert ved OUS og AHus, og er under etablering ved flere av de andre universitetssykehusene. Klinisk betydning av varianter i BRCA1/2 vurderes både av patolog, molekylærbiolog og medisinsk genetiker, og plassering i ESCAT-kategori gjøres i samarbeid med onkolog på nasjonalt multidisiplinært møte





(Mol-MDT møte). Klassifisering av funn bør også harmoniseres mot ACMGs retningslinjer slik at det gis en score etter begge systemer.

### 1.2.5 Kvalitetskontroll

Laboratoriene bør delta i et system for kvalitetskontroll. GenQA/EMQN har regelmessig eksterne kvalitetskontroller rettet mot BRCA1/2 og andre HRR-gener med tanke på både testing og variantvurdering ved eggstokk- og prostatakreft hvor behandling med PARP-hemmere kan være aktuelt. Etter hver runde med kontroller blir resultatene gjennomgått på et seminar for opplæring og harmonisering av variantvurdering. I tillegg kan innføring av nasjonal ring-testing vurderes. Gruppen anbefaler forøvrig at behov for referanselaboratorium for BRCA1/2-testing og event. andre HRR-gener bør utredes.

### 1.2.6 Nasjonalt og lokalt samarbeid

Det anbefales at det legges til rette for samarbeid mellom testsentra for best mulig harmonisering av tester og resultattolkning. Dette samarbeidet bør blant annet støtte seg på rapporter utarbeidet av de andre arbeidsgruppene i undernettverk NGS-diagnostikk innen kreft (AG1: Harmonisering og standardisering, AG2: Nye tjenester, AG3: Kompetanse og utdanning, AG4: IKT og samhandling.) I startfasen vil det være svært spesielt nyttig å dele erfaringer, og man kan tenke seg at ukentlige nasjonale virtuelle Mol-MDT møter kan være en løsning (tilsvarende det man benytter ved InPreD for utvidede genomanalyser). Testing av HRR-gener kan etter hvert omfatte flere gener enn BRCA1/2, og behov for mer komplekse vurderinger slik som «genomisk instabilitet» vil medføre at nye tester sannsynligvis må implementeres. I tillegg vil sannsynligvis mange av pasientene som har tilbakefall under behandling være kandidat for andre kliniske studier, slik at utvidet molekylær testing av hele gruppen kan på sikt vurderes. Klinikere etterspør også analyse på MSI/MMR med tanke på immunterapi. Det anbefales derfor å arrangere jevnlig nasjonale møter for alle helseregioner både i oppstartsfasen og i årene fremover.

Det bør også etableres sterkere lokalt samarbeid mellom patologer, genetikere og onkologer. For å oppnå dette anbefaler arbeidsgruppen jevnlig møter for faglig oppdatering og hvor pasientkasus kan diskuteres (Mol-MDT møter vil være nyttig).

### 1.2.7 Harmonisering med kimbanetesting

Målet med tumoranalyse av BRCA1/2 er å identifisere varianter i tumor som kan påvirke behandlingsvalg ved kreftsykdom. Analysen vil også kunne avdekke varianter som er tilstede i kimbanen. Patogene varianter i kimbanen er forbundet med betydelig økt risiko for bryst- og eggstokkreft hos kvinner og prostatakreft hos menn, og har dermed konsekvenser utover behandlingsvalg. For samtlige kvinner med eggstokkreft, og for en ikke ubetydelig andel menn med prostatakreft, anbefaler handlingsprogrammene kimbanetest med tanke på medfødt arvelig økt risiko<sup>5</sup>.

---

<sup>5</sup> [Prostatakreft – handlingsprogram - Helsedirektoratet](#)





Ved NGS-undersøkelse av BRCA1/2-genene vil man kunne påvise både kjente og nye varianter. I svulstvev kan en finne somatiske varianter som ikke er tilstede i kimbane, og enkelte kimbanevarianter, for eksempel kopitallsvarianter, er vanskelige å detektere i analyse på svulstvev. På bakgrunn av dette anbefaler gruppen at pasienter tilbys test av både svulstvev og blod som en hovedregel. Som nevnt tidligere vil det være en stor fordel med klare retningslinjer for variantvurdering innen somatisk testing og kimbane testing, og at man bør tilstrebe å sammenholde resultater fra somatisk test og kimbane test, f.eks. gjennom et Mol-MDT møte. På denne måten vil forvirring og misforståelser både hos rekvirent og pasient unngås.

Samarbeid mellom patologi og medisinsk genetisk avdeling er viktig, f.eks. dersom man ved testing av svulstvev påviser en patogen variant i BRCA1/2 med så lav allelfraksjon at man i praksis kan utelukke at den er i kimbane. Dette bør presiseres i svarrapporten for å unngå misforståelser om hvorvidt funnet er relevant i forhold til arvelig økt risiko hos pasient og eventuelle slektninger. Hvis man ikke kan utelukke at funnet representerer kimbane, bør det anbefales at pasienten tilbys genetisk veiledning og eventuell kimbane test med tanke på arvelig økt risiko. Dersom rekvirent ikke selv har erfaring med å tilby med kimbane test, kan pasienten henvises til genetisk veiledning.

### 1.2.8 Prøvetall og funksjonsfordeling

Mutasjoner i BRCA1/2 og andre HRR-gener foreligger hos omtrent 25% av pasienter med metastatisk prostatakraft (1) og hos 10% av pasienter med høygradig kreft i eggstokk-, eggleder og bukhinne<sup>6</sup> I følge statistikk fra Kreftregisteret var insidensen av kreft i eggstokk- og eggleder i Norge totalt 504, hvorav 287 høygradig serøse, i 2019. Insidensen av metastatisk cancer prostata var totalt 365 i 2019. Tallene vil ikke være direkte overførbare til antall BRCA1/2-tester men kan brukes som rettesnor. I tillegg må man påregne større antall tester de første månedene til år grunnet etterslep. Etter hvert kan også BRCA1/2-testing, og testing av andre HRR-gener og/eller genomisk instabilitet, bli aktuelt for andre krefttyper som bryst- og bukspyttkjertelkreft.

På bakgrunn av skisserte prøvemengde, samt omfattende krav til BRCA1/2-analyse med NGS beskrevet tidligere, anbefaler arbeidsgruppen at BRCA1/2-test etableres først ved de store helseforetakene. Dersom det skulle bli store prøvemengder og lang svartid, kan det vurderes å innføre analysen ved flere sykehus, spesielt ved de helseforetakene med etablert NGS kompetanse.

<sup>6</sup> [https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534\(21\)04828-6/fulltext#tbl2](https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534(21)04828-6/fulltext#tbl2)





### 1.3 Oppsummering og anbefalinger

Indikasjon for BRCA1/2-test er høygradige kreft i eggstokk/eggleder/bukhinne og kastrasjonsresistent metastatisk prostatakreft.

#### Anbefaling 1

Det anbefales målrettet NGS-analyse av hele kodingsområdene for BRCA1/2. Analyse av andre gener vil med høy sannsynlighet bli aktuelt i nær fremtid for denne pasientgruppen

#### Anbefaling 2

Det anbefales at BRCA1/2-test etableres ved sykehus som allerede har etablert NGS-kompetanse. Antall testsentra må harmoniseres med prøvemengde og behov. Hvert helseforetak må legge føringer for arbeidsfordelingen slik at drift og faglig nivå optimaliseres.

#### Anbefaling 3

Det anbefales nasjonal og tverrfaglig harmonisering av variantvurdering, tolkning og rapportering.

#### Anbefaling 4

Det anbefales nasjonal og tverrfaglig kommunikasjon rundt enkeltkasus samt å etablere gode rutiner for å sammenholde testresultat fra testing i svulstvev og blod.

#### Anbefaling 5

For prostata anbefales det at testing primært gjøres på FFPE nålebiopsi. For eggstokkreft anbefales det å bruke biopsi eller representativt snitt fra tumor i resektat (FFPE).

#### Anbefaling 6

Det anbefales regelmessig ekstern kvalitetskontroll av testing, variantvurdering og rapportering. Nasjonal ringtesting kan vurderes.

#### Anbefaling 7

For etablering av metoden forutsettes det at nødvendige ressurser tilføres eller allokering av eksisterende ressurser slik at etablering og drift er gjennomførbart.





## 2. Vedlegg 1 – Status for BRCA1/2-testing i Norge

	OUS (HSØ)	HUS (HV)	St Olav hospital (HM)	UNN (HN)
Tilbyr ditt foretak BRCA1 og BRCA2 analyse for svulstvev	Ja	Nei, prøvene sendes til Lund	Ja	Ja
Hvis nei, Planlegger foretaket etablering av analysen	-	Ja	-	-
Hvilken klinikk/avdeling utfører analysen	Samarbeid m. Avd. for patologi, Molpat og Avd. for Med. Genetikk, Kreftgenetikk	Seksj. for Kreftgenomikk (SKG) i samarbeid med Med. Genetikk	Avd. for patologi	Diagnostisk klinikk/Klinisk patologi
Krav til tumor andel i prøven (TC%)	30%	-	>10% (helst 50%).	>20%
Hvilke prøvematerialet er analysen validert for?	Ferskfrosset, jobbes med FFPE validering nå. Har i tillegg TSO500 som inneholder BRCA1/2 (InPreD, pas. som vurderes for studier)	-	Ovarialcancer (FFPE)	Ovarialcancer og metastatisk prostatakreft (FFPE)
Er BRCA1 og BRCA2 del av et større HTS/NGS panel?	Ja	-	Nei	Nei
Hvilket panel	Custom target panel fra Illumina og TSO500	AmpliSeq BRCA Panel og TSO500	Oncomine BRCA Research Assay	AmpliSeq for Illumina BRCA Panel
Hvilke gener inngår	APC, ATM, BAP1, BARD1, BMPR1A, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CDK4 (ekson2), CDKN2A, CHEK2, DICER1, EPCAM, EXT1, EXT2, FLCN, GREM1, HOXB13, MLH1, MSH2, MUTYH, PALB2, PMS2, POLD1 (ekson 7-14), POLE (ekson 9-14), POT1, PTEN, RAD51C, RAD51D, RB1, SDHB, SDHD, SMAD4, STK11, TP53, VHL	BRCA1, BRCA2 BRCAness	BRCA1, BRCA2	BRCA1, BRCA2
Er det kommet ønsker om å utvide genpanelet for tumoranalyser knyttet til eggstokk- og brystkreft.	Nei, men Genomic Instability Score er ønsket.	Nei, men Genomic Instability Score er ønsket	Nei	Nei
Har sykehuset eventuelt planer om å utvide genpanelet?	Nei. Men tilby eksisterende tilbud ved indikasjon prostata ved avd. for patologi. Type panel ikke avgjort.	-	Ja	Ingen konkrete planer
Hvilke instrumenter brukes?	Illumina (og event. IonTorrent)	Illumina	Ion Torrent S5	Illumina MiSeq
Hvilke IKT-løsninger benyttes?	Pipeline: GATK v4, Variantcalling:Mutect2 TSO500: egen løsning	Illumina Local Run Manager, Alissa og Alamut	Torrent Suite og Ion Reporter.	Illumina Local Run Manager og Illumina Variant Studio.
Hva er deteksjonsgrense for HTS analyse?	5%	-	5%.	7,5%
Hva er minstekrav til dekningsgrad (antall reads)?	250	-	>500	500x
Brukes ACMG kriterier ved tolkning av varianter	Ja	-	Ja	Ja
Sammenholdes dette med germline funn fra samme pasient	Ja	-	Nei	Nei
Antall prøver/år:	75-100	-	30-40	Ca 50
Er analysen akkreditert	Ja	-	Nei	Nei
Deltar laboratoriet på eksterne kvalitetskontroll programmer knyttet til genetiske analyser	Ja, GenQA Variantklassifisering BRCA og HRD/HRR.	-	Ja	Ja, GenQA Ovarian cancer – BRCA testing (somatic)
Forventet svartid	4-6 uker	-	2-3 mnd	Maks 20 dager
Anbefaler laboratoriet testing av kimbane med tanke på Arvelig bryst- og eggstokkreft dersom det er somatisk funn av patogen BRCA-variant?	Ja	Germlinetesting gjøres rutinemessig	Nei Germlinetesting gjøres rutinemessig og rekvireres av kliniker uavhengig av somatisk testing på tumor	Det anbefales at pasienten må følges opp i henhold til gjeldende retningslinjer for arvelig kreft





## Vedlegg 2 - Forfattere

### Arbeidsgruppe 5 – Innføring av BRCA1/2 – test av tumorvev

Helseforetak	Navn	Avdeling	Profesjon/tittel
OUSHF	Sarah Ariansen	Medisinsk genetikk	Enhetsleder kreftgenetikk
OUSHF	Lilach Kleinberg	Patologi	Spesialingeniør
OUSHF	Ranjan Chrisanthar	Patologi	Enhetsleder / Molekylærbiolog
OUSHF	Teresia Wangensteen	Medisinsk genetikk	Lege
SiVHF	Marianne Odnakk Ludahl	Genteknologisk lab Mikrobiologisk avdeling	Fagansvarlig molekylærpatologi
SiVHF	Camilla Holmsen	Genteknologisk lab Mikrobiologisk avdeling	
St.OlavsHF	Vesterfjell, Ellen Veronika	Patologi	Lege
HUS	Randi Hovland	Kreftgenomikk	Leder /Klinisk laboratoriegenetiker
<b>UNNHF</b>	<b>Ragnhild M. Wold (gruppeleder)</b>	<b>Patologi</b>	<b>Lege Fagansvarlig molekylærpatologi</b>





### 3. Referanser

1. De Bono, J.; Mateo, J.; Fizazi, et al. Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2020, 382, 2091–2102.
2. Parker C, Castro E, Fizazi K et al. Prostate cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2020 Sep;31(9):1119-1134
3. Mosele F, Remon J, Mateo J et al. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol.* 2020 Nov;31(11):1491-1505.
4. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of Fixatives and Tissue Processing on the Content and Integrity of Nucleic Acids. *Am J Pathol.* 2002 Dec; 161(6): 1961–1971.
5. Do H, Dobrovic A. Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization. *Clin Chem* 2015 Jan;61(1):64-71
6. Zhu J, Tucker M, Marin D et al. Clinical utility of FoundationOne tissue molecular profiling in men with metastatic prostate cancer. *Urol Oncol* 2019; 37:813.e1-813.e9
7. Piulats JM, Abida W, McDermott R et al. Genomic profiling of patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) for the evaluation of rucaparib: Next-generation sequencing (NGS) of tumour tissue and cell-free DNA (cfDNA). *Eur Urol Suppl* 2019; 18(1);e469
8. Hussain M, Mateo J, Sandhu S et al. Next-generation sequencing (NGS) of tumor tissue from >4000 men with metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC): the PROfound phase III study experience (abstract). *J Clin Oncol* 2020; 38 (suppl 6): 195.
9. Gonzalez D, Mateo J, Stenzinger A et al. Practical considerations for optimising homologous recombination repair mutation testing in patients with metastatic prostate cancer. *J Pathol Clin Res.* 2021 Feb 25. doi: 10.1002/cjp2.203. Online ahead of print.
10. Capolungo E, Ellison G, Lopez-Guerrero JA et al. Guidance statement on BRCA1/2 tumor testing in ovarian cancer patients. *Semin Oncol.* 2017 Jun;44(3):187-197
11. Mateo J, Carreira S, Sandhu S et al. DNA-Repair Defects and Olaparib in Metastatic Prostate Cancer. *NEJM* 2015; Oct 29; 373 (18): 1697-1708
12. Tukachinsky H, Madison RW, Chung JH, et al. Genomic Analysis of Circulating Tumor DNA in 3,334 Patients with Advanced Prostate Cancer Identifies Targetable BRCA Alterations and AR Resistance Mechanisms. *Clin Cancer Res.* 2021 Jun 1;27(11):3094-3105. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-4805. Epub 2021 Feb 8. PMID: 33558422.
13. Wallace AJ. New challenges for BRCA testing: a view from the diagnostic laboratory. *Eur J Hum Genet.* 2016 Sep;24 Suppl 1(Suppl 1):S10-8
14. Jennings LJ, Arcila ME, Corless C. Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing–Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagn.* 2017 May;19(3):341-365
15. Mafficini A, Simbolo M, Parisi A et al. BRCA somatic and germline mutation detection in paraffin embedded ovarian cancers by next-generation sequencing. *Oncotarget.* 2016 Jan 12;7(2):1076-83.
16. Rivera D, Paudice M, Gismondi D et al. Implementing NGS-based BRCA tumour tissue testing in FFPE ovarian carcinoma specimens: hints from a real-life experience within the framework of expert recommendations. *J Clin Pathol.* 2020 Sep 7;jclinpath-2020-206840
17. Concolino P, Capolungo E. Detection of BRCA1/2 large genomic rearrangements in breast and ovarian cancer patients: an overview of the current methods. *Expert Rev Mol Diagn.* 2019 Sep;19(9):795-802
18. Li MM, Datto M, Duncavage EJ et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn* 2017 Jan;19(1):4-23





19. Mateo J et al. A framework to rank genomic alterations as targets for cancer precision medicine: the ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets (ESCAT). *Ann Oncol*. 2018 Sep 1;29(9):1895-1902. doi: 10.1093/annonc/mdy263. PMID: 30137196;
20. Richards S, Aziz N, Bale S et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med advance online publication* 2015 17, 405-423
21. Lincoln SE, Yang S, Cline MS et al. Consistency of *BRCA1* and *BRCA2* Variant Classifications Among Clinical Diagnostic Laboratories. *JCO Precis Oncol* 2017 Jul;1PO.1600020

### Nettsider

- Helsedirektoratet. Nasjonalt handlingsprogram med retningslinjer for diagnostikk, behandling og oppfølging av prostatakraft. <https://www.helsedirektoratet.no/retningslinjer/prostatakraft-handlingsprogram/>
- Helsedirektoratet. Nasjonalt handlingsprogram med retningslinjer for diagnostikk, behandling og oppfølging av gynekologisk kreft. [Gynekologisk kreft – handlingsprogram - Helsedirektoratet](#)
- Helsedirektoratet 2019 [Om Helsedirektoratets normerende produkter - Helsedirektoratet](#)



# Dekningsanalyse

Nermin Zecic & Maria Fahlström

# Programmer og parametere

## Mosdepth:

- Kalkulering av sekvenseringsdybde på BAM filer
- Hvert HF benyttet egen bed-fil fra sitt eget gen-panel

## Python:

- Konverterer output fra MosDepth fra .bed til .csv
- Kombinerer output fra alle prøver til 2 filer, regions.csv + threshold.csv

## R-Studio:

- Hotspot fil
- Output fra Python
- >30% av prøver må ha lav dekning i samme amplicon

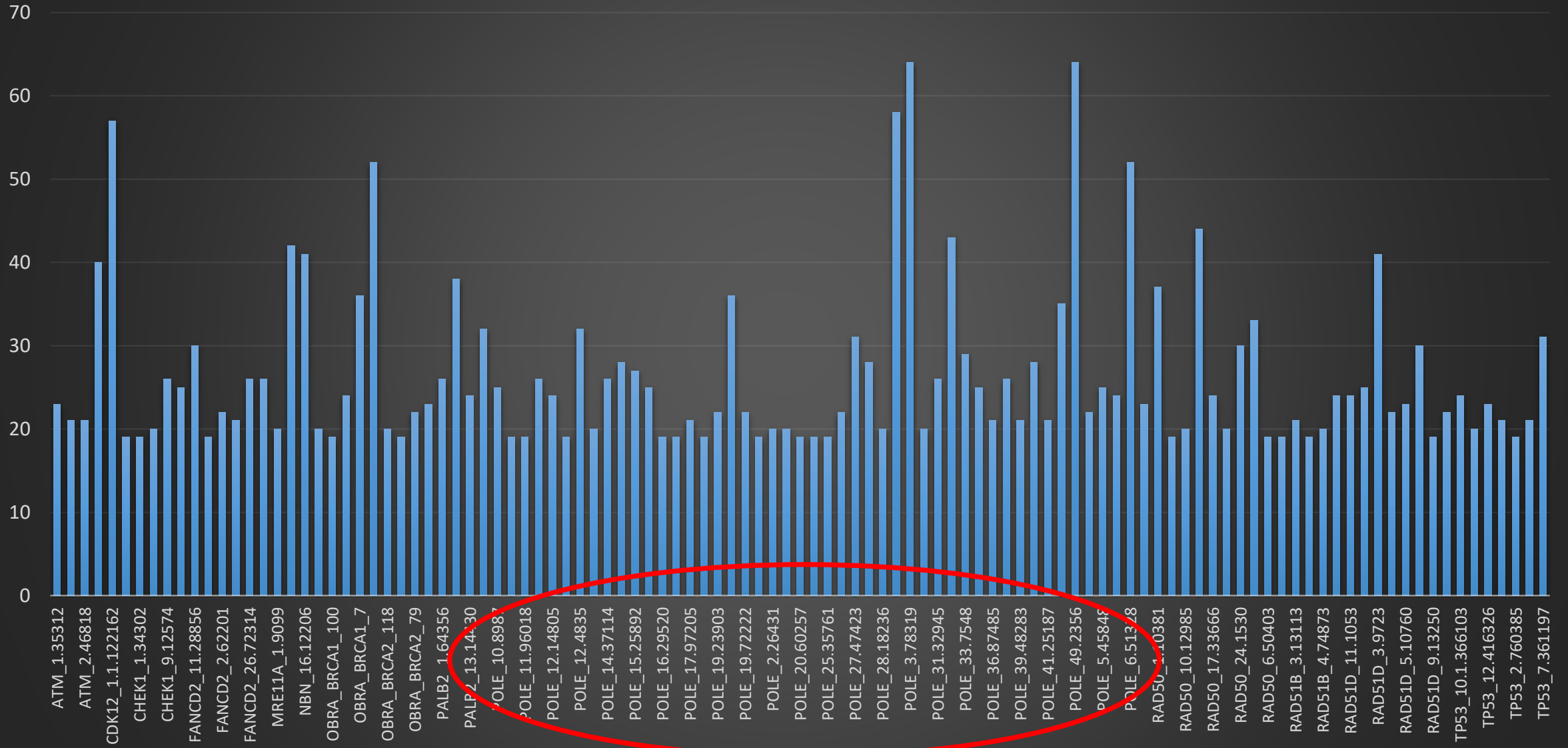
# Hva har vi sett på?

- Platform – Ion Torrent/Illumina
- Genpanel – Ulikheter mellom HF
- Designed bed – Ulikheter mellom HF
- Hotspot bed – Ulikheter mellom HF
- Genliste – Liste over HRR gener
- Amplicon – Område for amplifisering
- Posisjon i kromosomet

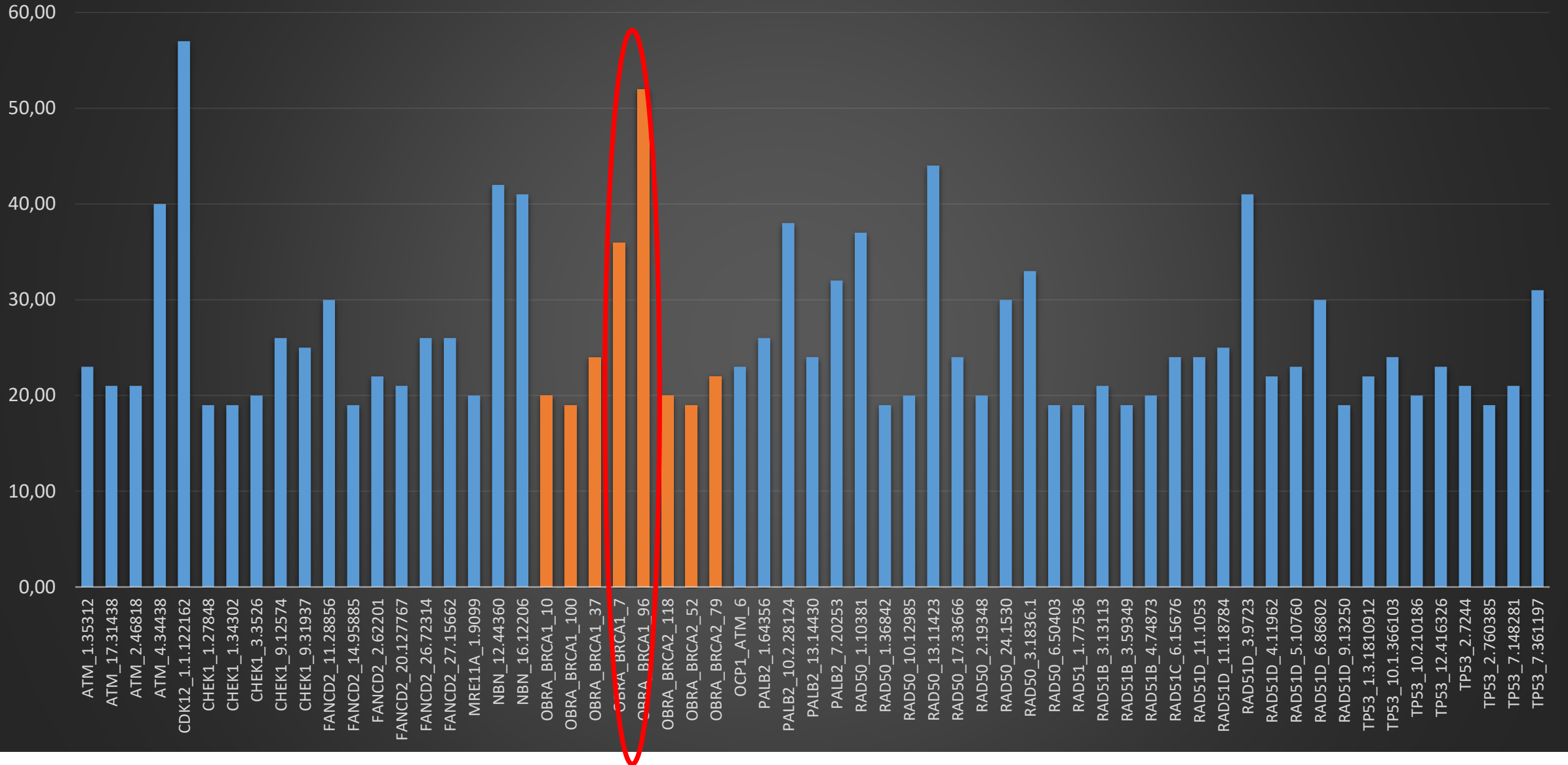
# Oversikt over antall prøver

HF	Antall prøver	Antall gener	Antall amplicon		Kommentar
STHF	64	16	109		POLE overrepresentert
OUS	51	12	18	Oncomine HRR	
SIVHF	41	8	12	OCAv3	
SUS	12	2	5	BRCA	Få antall prøver
AHUS	N/A	N/A	N/A	N/A	Ikke deltatt
Haukeland	N/A	N/A	N/A	N/A	Ikke deltatt

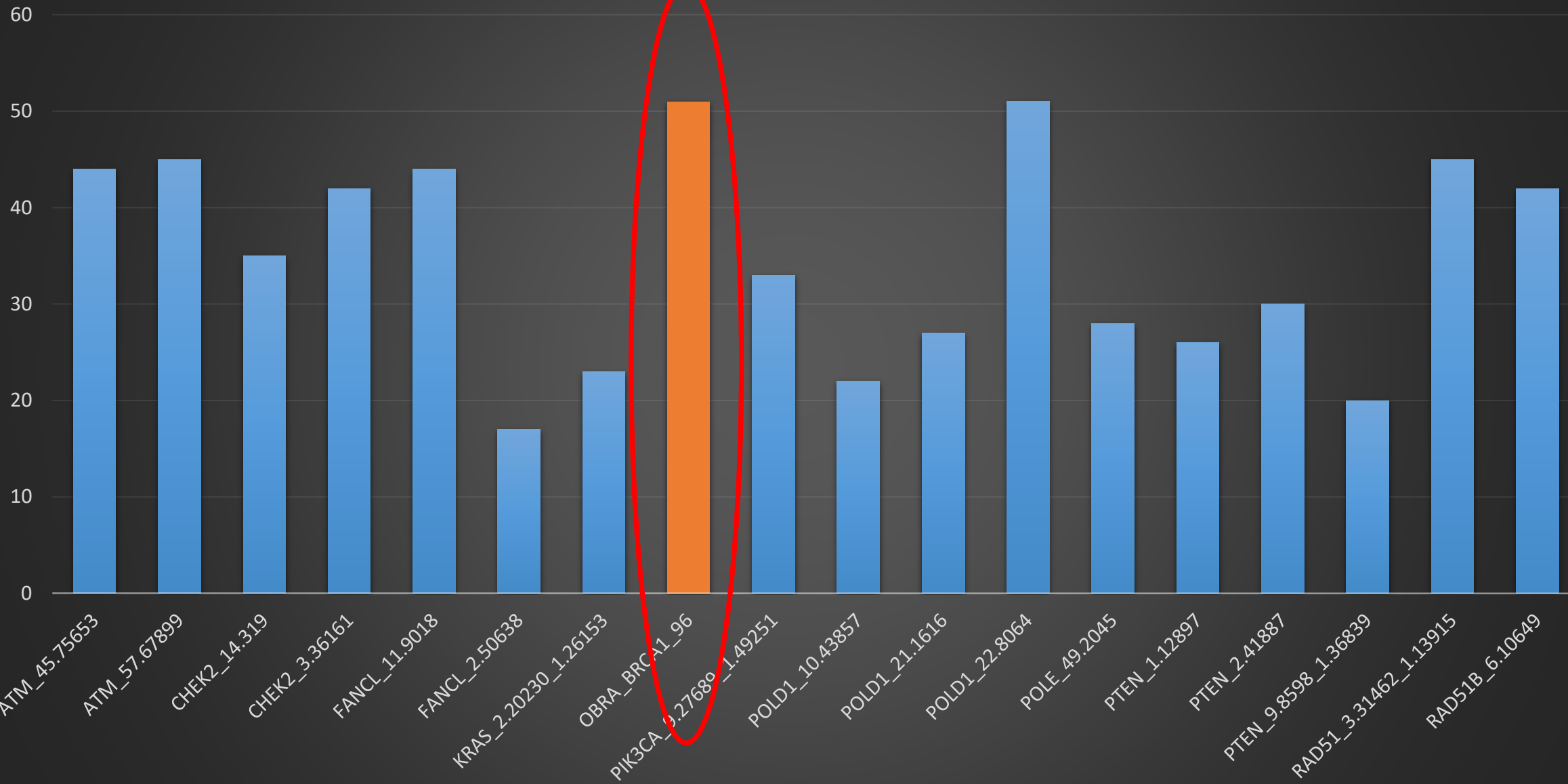
# STHF 64 prøver 16 gener 109 amplicon



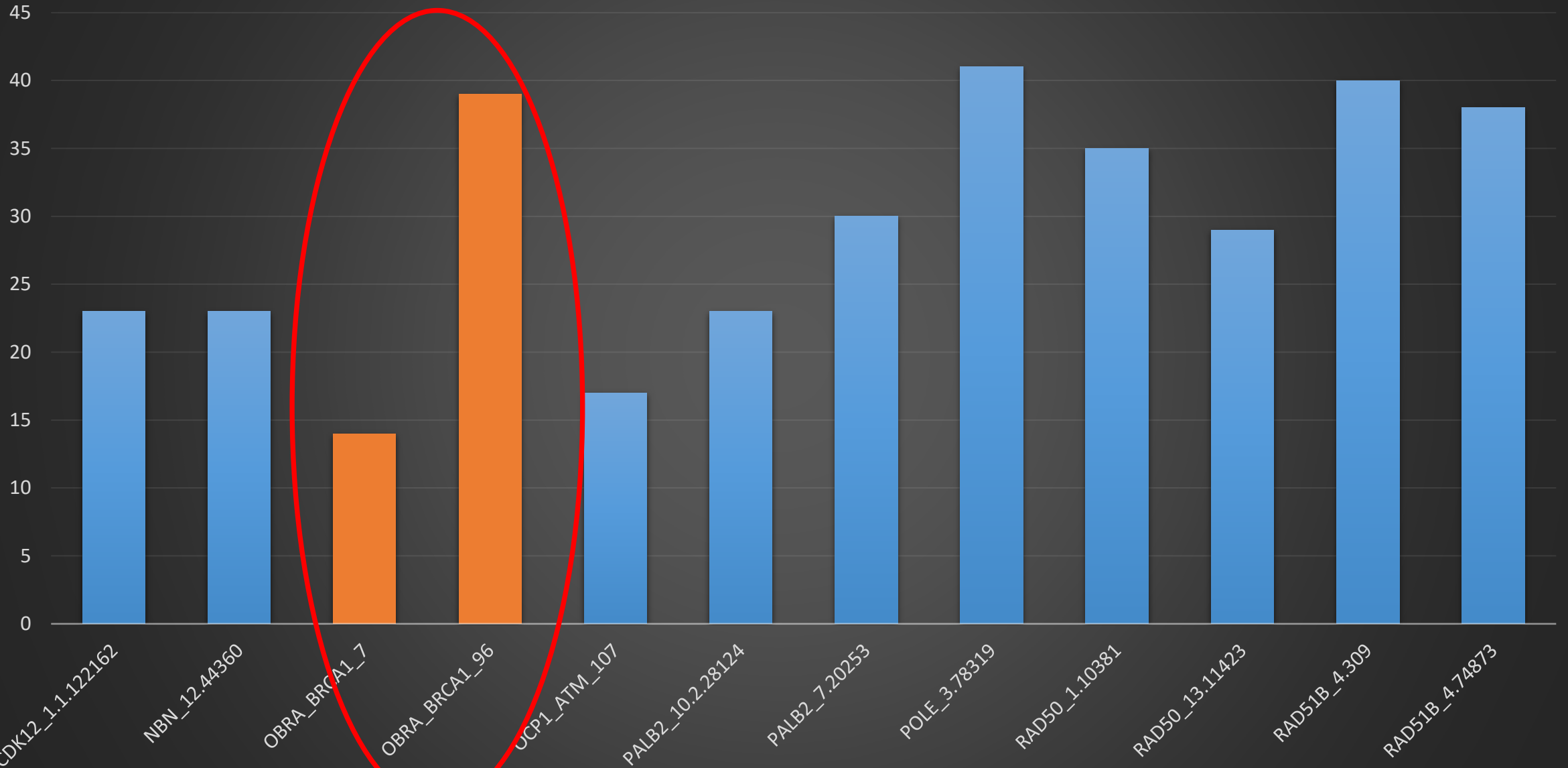
# STHF uten POLE



# OUS 51 prøver, 12 gener, 18 amplicon



# SiVHF 41 prøver, 8 gener, 12 amplicon



# Oppsummering – BRCA1/2

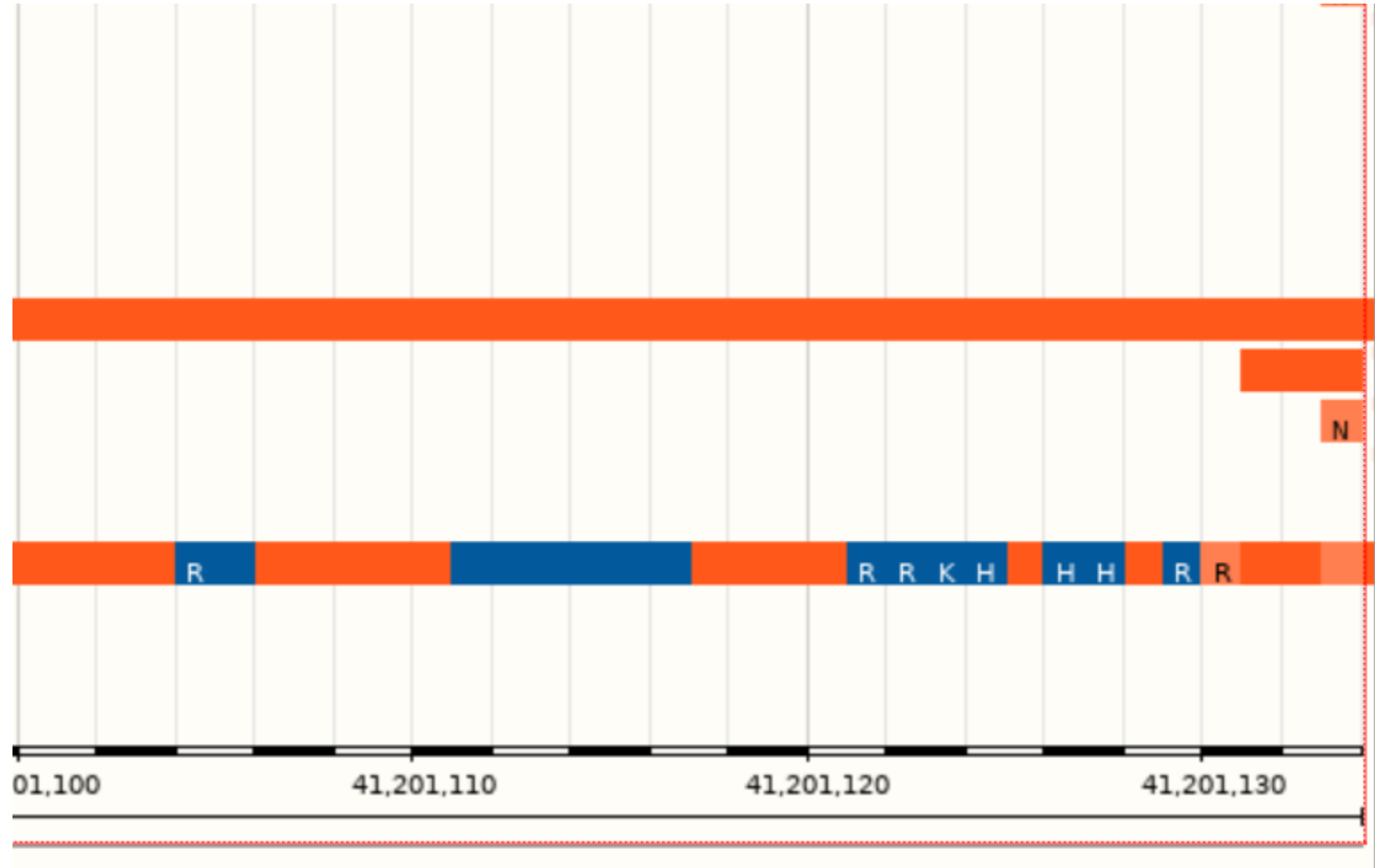
OBRA\_BRCA1\_7

OBRA\_BRCA1\_96

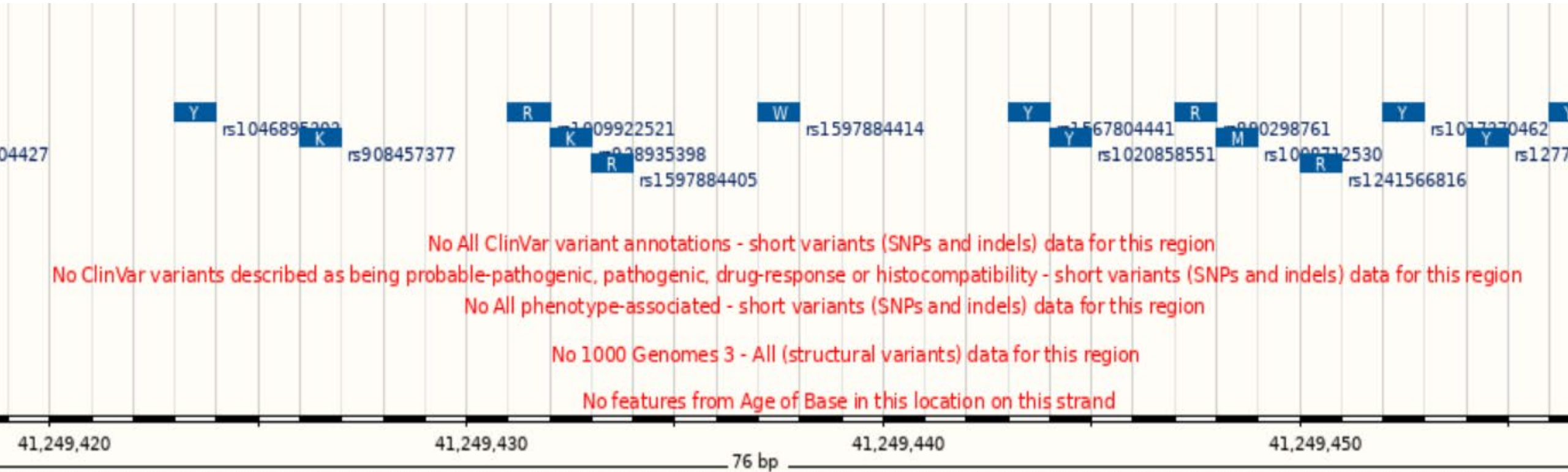
STHF	20/64	0,31	OBRA_BRCA1	OBRA_BRCA1_10	chr17:41202994-41203072
STHF	19/64	0,30	OBRA_BRCA1	OBRA_BRCA1_100	chr17:41256049-41256159
STHF	24/64	0,38	OBRA_BRCA1	OBRA_BRCA1_37	chr17:41231313-41231442
SiVHF	14/41	0,34	OBRA_BRCA1	OBRA_BRCA1_7	chr17:41201009-41201133
STHF	36/64	0,56	OBRA_BRCA1	OBRA_BRCA1_7	chr17:41201009-41201133
SiVHF	39/41	0,95	OBRA_BRCA1	OBRA_BRCA1_96	chr17:41249399-41249474
OUS	51/51	1,00	OBRA_BRCA1	OBRA_BRCA1_96	chr17:41249399-41249474
STHF	52/64	0,81	OBRA_BRCA1	OBRA_BRCA1_96	chr17:41249399-41249474
STHF	20/64	0,31	OBRA_BRCA2	OBRA_BRCA2_118	chr13:32937612-32937736
STHF	19/64	0,30	OBRA_BRCA2	OBRA_BRCA2_52	chr13:32911672-32911791
STHF	22/64	0,34	OBRA_BRCA2	OBRA_BRCA2_79	chr13:32914132-32914247

# Ensembl: OBRA\_BRCA1\_7

1. Splice acceptor variant
  2. Splice donor variant
  3. Splice region variant
- Dårlig beskrevet



# Ensembl: OBRA\_BRCA\_96



# Hotspot genes

- **Alle HF: ATM, BRCA1, RAD51B og POLE**
- **2 HF: RAD50, RAD51, CDK12, NBN, PAL2b**
- **1 HF**
- **Ingen treff: BARD1, BRIP1, RAD52, XRC22, PPPR2RA og RAD54L**

Hotspot	Low coverage	STHF	OUS	SIVHF
ATM	YES	X	X	X
TP53	YES	X		
BARD1	N/A			
CHEK1	YES	X		
BRCA1	YES	X	X	X
FANCL	YES		X	
BRCA2	YES	X		
RAD50	YES	X		X
BRIP1	N/A			
RAD51	YES	X	X	
CDK12	YES	X		X
RAD51C	YES	X		
CHEK2	YES		X	
RAD51D	YES	X		
FANCD2	YES	X		
RAD52	N/A			
MRE11	YES	X		
XRC22	N/A			
NBN	YES	X		X
KRAS	YES		X	
PALB2	YES	X		X
PIK3CA	YES		X	
PPR2R2A	N/A			
POLD1	YES		X	
RAD51B	YES	X	X	X
POLE	YES	X	X	X
RAD54L	N/A			
PTEN	YES		X	

# Amplicon

- 2 eller flere HF har samme dårlig dekning
- STHF og SiVHF har mange overlappende regioner med dårlig dekning
- Nesten identisk BED-fil
- OUS har mindre områder til felles
- Ulikheter i gen-panel

HF	Gen	Amplicon
SIVHF	CDK12	CDK12_1.1.122162
STHF	CDK12	CDK12_1.1.122162
SIVHF	NBN	NBN_12.44360
STHF	NBN	NBN_12.44360
SIVHF	BRCA1	OBRA_BRCA1_7
STHF	BRCA1	OBRA_BRCA1_7
SIVHF	BRCA1	OBRA_BRCA1_96
OUS	BRCA1	OBRA_BRCA1_96
STHF	BRCA1	OBRA_BRCA1_96
SIVHF	PALB2	PALB2_10.2.28124
STHF	PALB2	PALB2_10.2.28124
SIVHF	PALB2	PALB2_7.20253
STHF	PALB2	PALB2_7.20253
SIVHF	POLE	POLE_3.78319
STHF	POLE	POLE_3.78319
OUS	POLE	POLE_49.2045
STHF	POLE	POLE_49.2356
SIVHF	RAD50	RAD50_1.10381
STHF	RAD50	RAD50_1.10381
SIVHF	RAD50	RAD50_13.11423
STHF	RAD50	RAD50_13.11423
SIVHF	RAD51B	RAD51B_4.74873
STHF	RAD51B	RAD51B_4.74873

# Oppsummering

- Mye overlapp mellom ulike HF
- Mye likhet i BED filer på tvers av genpanel
- Mange amplicon med lav dekning i store genpaneler
- Ikke nødvendigvis at områder med lav dekning inneholder noe av interesse
- Manuell sjekk i Ensembl
- MedGen Ullevål vedr BRCA1: «Vi har ingen patogene varianter i disse områder i dag»

Tabell 1: Ringtest; varianter i BRCA1 og BRCA2

PrøveID	Materiale	% Tumor	Variant	OUS		SIV		STHF		HUS		LUNN		AHUS		SUS		Kommentar
				Dekning	Allelfraksjon	Dekning	Allelfraksjon	Dekning	Allelfraksjon	Dekning	Allelfraksjon	Dekning	Allelfraksjon	Dekning	Allelfraksjon	Dekning	Allelfraksjon	
Vestfold1	FFPE	90	NM_000059.4(BRCA2)c.3751dup.p.(Thr1251AsnfsTer14)	592	29.4 %	1996	25.1 %	1035	25.3 %	3778	26.0 %	8681	28.8 %	Ingen c.180c.181del/ins	30.7 %	1994	25.0 %	
Vestfold1	FFPE	90	NM_007294.4(c.3329dup.p.(Gln1111AlafsTer4)	Detekteres ikke		Detekteres ikke		Detekteres ikke *		3563	64.8 %	7631	65.2 %	Detekteres ikke		1981	82.0 %	Variant / homopolymerramme
Vestfold2	FFPE	80	Degradert prøve															
SUS-1	FFPE	30	NM_007294.4(BRCA1)c.1556del.p.(Lys519ArgfsTer13)	1993	67.2 %	1995	70.5 %	1978	70.2 %	8072	67.4 %	12361	67.0 %	1594/985 (c.4981)	68.1 %	1985	70.0 %	
SUS-2	FFPE	60	NM_007294.4(BRCA1)c.3607CT.p.(Arg1203Ter)	1996	81.6 %	1996	85.0 %	1670	84.7 %	6717	83.7 %	9709	84.5 %			1997	83.3 %	
AHUS	FFPE	80	NM_000059.4(BRCA2)c.5217_5223del.p.(Tyr1738Ter)	1977	29.9 %	1983	34.0 %	1971	30.4 %	5925	29.0 %	9123	24.8 %			1973	24.0 %	
OUS1	FFS	100	NM_007294.4(BRCA1)c.3084_3094del.p.(Asn1029ArgfsTer5)	1027	92.3 %	1772	89.8 %	1981	89.9 %	3074	92.8 %	6579	90.2 %	1777/195	91.2 %	1542	90.0 %	
OUS2	FFPE	70	NM_000059.4(BRCA2)c.8978C>G.p.(Gln2993Ter)	1241	72.7 %	1486	73.0 %	1141	67.0 %	2621	70.3 %	3868	60.0 %	1481	67.5 %	1005	73.0 %	
HUS1	FFPE	60	NM_007294.4(BRCA1)c.1813del.p.(Ala605HisfsTer7)	1992	50.1 %	1653	39.5 %	1965	47.9 %	1936	45.9 %	5887	44.4 %	1812/281 (c.1736)	33.7 %	1992	49.0 %	
HUS2	FFPE	40	NM_007294.4(BRCA1)c.34C>T.p.(Gln127Ter)	197	42.6 %	564	47.3 %	357	36.4 %	582	43.6 %	2033	48.0 %	407	41.3 %	1997	34.0 %	
HUS3	Blod	N/A	NM_000059.4(BRCA2)c.4936_4939del.p.(Glu1846GlnfsTer23)	1981	49.1 %	1977	49.8 %	1965	51.0 %	2718	54.4 %	4270	51.2 %			1980	48.0 %	
LUNN-1	FFPE	60	NM_007294.4(BRCA1)c.4936_4939del.p.(Gln1846GlnfsTer23)	1999	39.0 %	1999	40.37 %	1998	35.5 %	4354	34.9 %	11847	35.2 %			2000	36.0 %	
LUNN-2	FFPE	80	Ukjent prøve	Ingen patogene funn		Ingen patogene funn		Ingen patogene funn		Ingen patogene funn		Ingen patogene funn		Ingen patogene funn		Ingen patogene funn		

Degradert prøve  
Analyse ikke utført  
Variant detekteres ikke  
Informasjon mangler

\* Ved bruk av OncoPrint BRCA workflow detekteres varianten ved STHF ved 708/1045 reads og 67,8% allelfraksjon.

Tabell 2: Ringtest; Allelfraksjon

PrøveID	Materiale	% Tumor	Gen	Transkript	Annotering variant	Gjenomsnittlig allelfraksjon	ZSD	Antall deltekte laboratorier
SUS-1	FFPE	30%	BRCA1	NM_007294.4	c.1556del.p.(Lys519ArgfsTer13)	68,6 %	3,8 %	7
HUS1	FFPE	60%	BRCA1	NM_007294.4	c.1813del.p.(Ala605HisfsTer7)	44,4 %	12,0 %	7
LUNN-1	FFPE	60%	BRCA1	NM_007294.4	c.2410CT.p.(Gln804Ter)	38,8 %	4,6 %	6
OUS1	FFPE	100%	BRCA1	NM_007294.4	c.3084_3094del.p.(Asn1029ArgfsTer5)	90,9 %	2,5 %	7
HUS2	FFPE	40%	BRCA1	NM_007294.4	c.34C>T.p.(Gln127Ter)	41,9 %	10,4 %	7
SUS-2	FFPE	60%	BRCA1	NM_007294.4	c.3607CT.p.(Arg1203Ter)	83,7 %	2,6 %	6
Vestfold1	FFPE	90%	BRCA2	NM_000059.4	c.3751dup.p.(Thr1251AsnfsTer14)	27,2 %	4,8 %	7
AHUS	Blod	N/A (1/1)	BRCA2	NM_000059.4	c.4936_4939del.p.(Glu1846GlnfsTer23)	50,6 %	4,4 %	6
HUS3	FFPE	80%	BRCA2	NM_000059.4	c.5217_5223del.p.(Tyr1738Ter)	28,7 %	7,5 %	6
OUS2	FFPE	70%	BRCA2	NM_000059.4	c.8978C>G.p.(Gln2993Ter)	69,1 %	9,4 %	7

Tabell 3: Kontroll; AcroMetrix Oncology Hotspot Control

Resultat oppgitt hos leverandør				OUS		SIV		STHF		Kommentar
Gen	Aminosyreendring	CDS mutasjon	Allelfraksjon	Dekning	Allelfraksjon	Dekning	Allelfraksjon	Dekning	Allelfraksjon	
ATM	p.R337C	c.1009C>T	5-15%	1376	9,3 %	1999	6,4 %	1996	7,4 %	
ATM	p.V410A	c.1229T>C	5-15%	960	6,9 %	2000	9,2 %	2000	7,5 %	
ATM	p.P604S	c.1810C>T	5-15%	918	7,7 %	1990	6,4 %	1996	7,1 %	
ATM	p.?	c.1898+2T>A	5-15%	1077	7,7 %	1996	9,1 %	1995	8,0 %	
ATM	p.F858L	c.2572T>C	5-15%	1683	9,1 %	2000	8,4 %	1999	8,1 %	
ATM	p.A1309T	c.3925G>A	5-15%	239	10,5 %	1997	6,5 %	1999	7,4 %	
ATM	p.D1682Y	c.5044G>T	5-15%	2000	6,2 %	2000	8,0 %	1996	9,0 %	
ATM	p.L1718V	c.5152C>G	5-15%	680	9,6 %	1999	7,4 %	1999	9,1 %	
ATM	p.?	c.5178-1G>T	5-15%	1382	10,06 %	2000	7,5 %	1998	8,2 %	
ATM	p.R1730*	c.5188C>T	5-15%	1368	10,09 %	2000	8,3 %	2000	9,1 %	
ATM	p.A1742P	c.5224G>C	5-15%	1985	10,43 %	1997	7,9 %	1986	9,1 %	
ATM	p.L1794L	c.5380C>T	5-15%	2000	8,3 %	2000	5,4 %	1998	7,8 %	
ATM	p.L1826V	c.5476T>G	5-15%	1351	8,5 %	1999	9,0 %	1994	9,3 %	
ATM	p.V1941L	c.5821G>C	5-15%	573	11,3 %	1220	6,0 %	1588	8,2 %	
ATM	p.Q2442P	c.7325A>C	5-15%	899	9,3 %	2000	8,3 %	2000	8,0 %	
ATM	p.T2666A	c.7996A>G	5-15%	603	9,6 %	1467	8,5 %	2000	6,9 %	Sannsynlig patogen; havner utenfor standard filter.
ATM	p.G2695A	c.8084G>C	5-15%	2000	8,90 %	2000	7,3 %	2000	8,9 %	
ATM	p.P2699T	c.8095C>A	5-15%	1982	9,23 %	2000	6,8 %	1999	9,1 %	
ATM	p.D2725V	c.8174A>T	5-15%	1298	10,40 %	2000	8,9 %	1995	8,2 %	
ATM	p.N2875S	c.8624A>G	5-15%	1999	9,15 %	2000	4,4 %	2000	4,0 %	
ATM	p.L2890V	c.8668C>G	5-15%	1998	9,56 %	2000	6,8 %	1999	8,4 %	
ATM	p.(=)	c.8671+104T>C	genomic							
ATM	p.T2947S	c.8839A>T	5-15%	1390	7,48 %	1999	6,4 %	1997	8,9 %	
ATM	p.(=)	c.8850+60A>G	genomic	688	98,84 %	2000	93,8 %	2000	89,7 %	
ATM	p.R3008H	c.9023G>A	5-15%	1398	9,16 %	2000	7,6 %	1997	9,6 %	
ATM	p.K3018K	c.9054A>G	5-15%	1398	9,16 %	2000	7,6 %	1999	9,6 %	
ATM	p.R3047*	c.9139C>T	5-15%	1998	9,71 %	2000	6,7 %	1999	8,4 %	

Ikke inkludert i panelet

Tabell 4: Kontroll; BRCA Somatic Multiplex I (HD795/HD810)

Resultat oppgitt hos leverandør					OUS (HD810)		SIV (HD795)		STHF (HD810)		UNN (HDXXX)		SUS (HD810)		Kommentar
Gen	Aminosyreendring	CDS mutasjon	NGS allelfraksjon	NGS dekning	Dekning	Allelfraksjon	Dekning	Allelfraksjon	Dekning	Allelfraksjon	Dekning	Allelfraksjon	Dekning	Allelfraksjon	
BARD1	R378S	c.1134G>C	40,8 %	885	2000	45,3 %									
BRCA1	D435Y	c.1303G>T	7,2 %	810	1665	7,2 %	1999	8,4 %	568	6,6 %	>1000	7,7 %	1999	8,0 %	
BRCA1	K1183R	c.3548A>G	8,0 %	815	2000	6,6 %	2000	8,7 %	2000	7,3 %	>1000	8,3 %	2000	8,0 %	
BRCA1	K820E	c.2458A>G	8,8 %	1336	1889	7,2 %	1999	9,5 %	653	7,7 %	>1000	7,7 %	1994	8,6 %	
BRCA1	P871L	c.2612C>T	15,0 %	1052	2000	15,9 %	1998	17,6 %	1999	16,5 %	>1000	15,8 %	2000	16,5 %	
BRCA1	R1443*	c.4327C>T	32,8 %	886	926	36,4 %	1886	33,2 %	1915	35,8 %	>1000	34,8 %	2000	35,8 %	
BRCA1	S1613G	c.4900A>G	7,5 %	1145	2000	6,8 %	1998	8,6 %	Detekteres ikke **	>1000	8,0 %	1996	8,4 %	8,4 %	Maskert posisjon hos STHF
BRCA2	D1420V	c.4258G>T	31,3 %	907	1534	28,0 %	1994	30,29 %	1994	29,5 %	>1000	32,1 %	1974	32,4 %	
BRCA2	I2675Dfs*6	c.8021dup	8,3 %	603	Detekteres ikke	Detekteres ikke	Detekteres ikke	Detekteres ikke	Detekteres ikke	>1000	8,4 %	1965	5,3 %	5,3 %	Variant i relasjon til homopolymerområde
BRCA2	K1691Nfs*15	c.5073del	32,1 %	909	Detekteres ikke	Detekteres ikke	Detekteres ikke	Detekteres ikke	Detekteres ikke	>1000	34,9 %	1981	55,2 %	55,2 %	Variant i homopolymerområde
BRCA2	N1784Tfs*7	c.5351del	37,0 %	1011	Detekteres ikke	Detekteres ikke	Detekteres ikke	Detekteres ikke **	>1000	41,3 %	1975	45,9 %	45,9 %	45,9 %	Variant i homopolymerområde
BRCA2	N289H	c.865A>C	7,2 %	996	676	6,4 %	469	4,5 %	Detekteres ikke	>1000	7,1 %	1992	6,1 %	6,1 %	Dårlig dekning
BRCA2	N991D	c.2971A>G	6,6 %	784	1277	6,1 %	1934	9,1 %	1723	10,6 %	>1000	8,5 %	1999	7,8 %	7,8 %
BRCA2	V2466A	c.7397T>C	100,0 %	717	996	99,6 %	2000	99,8 %	2000	99,8 %	>1000	99,9 %	1999	99,7 %	
BRIP1	S919P	c.2755T>C	99,9 %	801	1401	100,0 %									
NBN	E185Q	c.553G>C	64,6 %	636	1999	62,8 %	265	54,7 %	Detekteres ikke						Dårlig dekning

Ikke inkludert i panelet

\* Ved bruk av Oncomine BRCA workflow detekteres varianten ved STHF ved 177 / 2000 reads og 8.8 % allelfraksjon.  
 \*\* Ved bruk av Oncomine BRCA workflow detekteres varianten ved STHF ved 1344 / 1973 reads og 68.1 % allelfraksjon.

## Nyttige databaser

Database	Kommentar
<a href="https://franklin.genoox.com/clinical-db/home">https://franklin.genoox.com/clinical-db/home</a>	
<a href="#">VarSome The Human Genomics Community</a>	
<a href="https://brcaexchange.org/variants">https://brcaexchange.org/variants</a>	
<a href="#">COSMIC   Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (sanger.ac.uk)</a>	
<a href="#">Karolinska - MTBP</a>	
<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/</a>	
<a href="#">OncoKB™ - MSK's Precision Oncology Knowledge Base</a>	
<a href="#">Cancer Hotspots</a>	
<a href="#">GeneCards - Human Genes   Gene Database   Gene Search</a>	
<a href="https://arup.utah.edu/database/BRCA/index.php">https://arup.utah.edu/database/BRCA/index.php</a>	
<a href="#">Home - My Cancer Genome</a>	
<a href="http://www.umd.be/BRCA1">www.umd.be/BRCA1</a>	Ustabil til tider
<a href="http://www.umd.be/BRCA2/">www.umd.be/BRCA2/</a>	Ustabil til tider
<a href="#">HGMD® home page (cf.ac.uk)</a>	
<a href="#">gnomAD (broadinstitute.org)</a>	Normaldatabase

## Nyttige artikler til variantvurdering

- Li MM *et al.* Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn.* 2017 Jan;19(1):4-23.
- Horak P *et al.* Standards for the classification of pathogenicity of somatic variants in cancer (oncogenicity): Joint recommendations of Clinical Genome Resource (ClinGen), Cancer Genomics Consortium (CGC), and Variant Interpretation for Cancer Consortium (VICC). *Genet Med.* 2022 May;24(5):986-998. doi: 10.1016/j.gim.2022.01.001. Epub 2022 Jan 29. Erratum in: *Genet Med.* 2022 Sep;24(9):1991.

Kode	Mikro	Diagnosefelt og vurdering
<p><b>NGS-B1</b> <b>BRCA1/2:</b> <b>Neg</b></p>	<p><b>Molekylærpatologiske analyser ved dypsekvensering</b></p> <p><u>Informasjon om prøve:</u> Prøvemateriale: blokk nr. X (DNA nr. DXX-21). Andel neoplastiske celler: 70% (Vurdert av XXX)</p> <p><u>Diagnose/problemstilling:</u> Undersøkelse av <i>BRCA1</i> og <i>BRCA2</i> mutasjonsstatus i tumorvev</p> <p><b>Informasjon om metoden...</b></p> <p><b>Metodebegrensninger:</b> Kun varianter klassifisert som sannsynlig sykdomsgivende eller sykdomsgivende blir rapportert. Varianter av usikker betydning kan i noen tilfeller bli kommentert i rapporten. Denne type undersøkelse er ikke egnet til å påvise alle typer genetisk variasjon. Variasjon i repeterte sekvenser, og større strukturelle varianter som insersjoner, delesjoner og duplikasjoner kan ikke alltid påvises med denne sekvenseringsmetoden.</p>	<p><b>Diagnose:</b></p> <p><i>DNA ekstrahert fra tumorvev, preparat xxx</i></p> <p><i>BRCA</i>-status: Det ble ikke påvist sykdomsassosierte varianter i <i>BRCA1/BRCA2</i> i tumorvev. Konferer vurdering.</p> <p><b>Vurdering:</b></p> <p>Det er ikke påvist somatiske mutasjoner i <i>BRCA1</i> og <i>BRCA2</i>. Referere til evt. kimbanefunn ved medisinsk genetikk</p> <p>Evt. Dette utelukker ikke tilstedeværelsen av kimbanevarianter som også kan indiserer nytte av PARP-behandling. Dette må i så fall undersøkes i blod ved henvisning til avdeling for medisinsk genetikk. Ta gjerne kontakt ved spørsmål.</p>
<p><b>NGS-B2</b> <b>BRCA1 el 2</b> <b>pos</b></p> <p><b>Tier 1 eller 2</b></p> <p><b>Klasse 4 og 5.</b></p>	<p><b>Molekylærpatologiske analyser ved dypsekvensering</b></p> <p><u>Informasjon om prøve:</u></p> <p>Prøvemateriale: blokk nr. X (DNA nr. Dxx-21). Andel neoplastiske celler: xx% (Vurdert av xxx)</p> <p><u>Diagnose/problemstilling:</u> Undersøkelse av <i>BRCA1</i> og <i>BRCA2</i> mutasjonsstatus i tumorvev.</p> <p><b>Informasjon om metoden....</b></p> <p><b>Metodebegrensninger:</b> Kun varianter klassifisert som sannsynlig sykdomsgivende eller sykdomsgivende blir rapportert. Varianter av usikker betydning kan i noen tilfeller bli kommentert i rapporten. Denne type undersøkelse er ikke egnet til å påvise alle typer genetisk variasjon. Variasjon i repeterte sekvenser, og større strukturelle varianter som insersjoner, delesjoner og duplikasjoner kan ikke alltid påvises med denne sekvenseringsmetoden.</p>	<p><b>Diagnose:</b></p> <p><i>DNA ekstrahert fra tumorvev, preparat xxx</i></p> <p><i>BRCA</i>-status: Det ble påvist sannsynlig patogen variant i <i>BRCA 1...2</i> – genet</p> <p>(HGVS nomenklatur. c.XXX; p.XXX. Påvist kopitallendring: XXX gain/loss, kopitallratio XXX (locus: XXX).</p> <p>(NM-kode)</p> <p>Evt Allellfrekvens.</p> <p>Konferer vurdering.</p> <p><b>Vurdering:</b></p>

		<p>Denne varianten er klassifisert som patogen i .....</p> <p>Dette tyder på at tumoren kan respondere på behandling med PARP-inhibitor</p> <p>Undersøkelse av tumorvev avdekker ikke om varianten er somatisk eller foreligger i kimbane. Pasienten bør få tilbud om genetisk veiledning.</p>
<p><b>NGS-B3</b></p> <p><b>Ikke konklusiv (degradert/for lite matr etc)</b></p>	<p><b>Molekylærpatologiske analyser ved dypsekvensering</b></p> <p><u>Informasjon om prøve:</u></p> <p>Prøvemateriale: blokk nr. X (DNA nr. Dxx-21). Andel neoplastiske celler: xx% (Vurdert av xxx)</p> <p><u>Diagnose/problemstilling:</u> Undersøkelse av <i>BRCA1</i> og <i>BRCA2</i> mutasjonsstatus i tumorvev.</p> <p>Det var bedt om undersøkelse av <i>BRCA1/2</i> mutasjonsstatus for denne pasienten. Dessverre viste det seg at DNA i prøven ikke var egnet for sekvensering (... sparsomt materiale, lav konsentrasjon, for fragmentert...). <i>BRCA</i>-status kan derfor ikke bestemmes.</p>	<p><i>BRCA</i>-status: Ikke analysert. Det var for lite tumormateriale i vevsblokk. [DNA i materialet var degradert/ikke egnet]</p> <p><i>BRCA1/2</i> analyse ikke konklusiv, konf beskrivelse</p> <p><i>BRCA</i>-status: Analysen var ikke konklusiv som følge av for lite og/eller degradert DNA.</p>

<p><b><u>NGS B4</u></b></p> <p><b><u>BRCA</u></b></p> <p><b><u>variant av</u></b></p> <p><b><u>usikker</u></b></p> <p><b><u>betydning</u></b></p>	<p><b>Molekylærpatologiske analyser ved dypsekvensering</b></p> <p><u>Informasjon om prøve:</u></p> <p>Prøvemateriale: blokk nr. X (DNA nr. Dxx-21). Andel neoplastiske celler: xx% (Vurdert av xxx)</p> <p><u>Diagnose/problemstilling:</u> Undersøkelse av <i>BRCA1</i> og <i>BRCA2</i> mutasjonsstatus i tumorvev.</p> <p><b>Informasjon om metoden....</b></p> <p><b>Metodebegrensninger:</b> Kun varianter klassifisert som sannsynlig sykdomsgivende eller sykdomsgivende blir rapportert. Varianter av usikker betydning kan i noen tilfeller bli kommentert i rapporten. Denne type undersøkelse er ikke egnet til å påvise alle typer genetisk variasjon. Variasjon i repeterte sekvenser, og større strukturelle varianter som insersjoner, delesjoner og duplikasjoner kan ikke alltid påvises med denne sekvenseringsmetoden.</p>	<p>BRCA-status: Det er ikke påvist variant i BRCA-genene som får betydning for behandling. Konferer vurdering.</p> <p><b>Vurdering:</b></p> <p>Det er påvist en BRCA-mutasjon med usikker betydning (VUS). Det er per i dag ikke indikasjon for behandling, men mer data er nødvendig for endelig klassifisering (benign/patogen).</p> <p>Dette utelukker ikke tilstedeværelsen av kimbanevarianter som også indiserer nytte av PARP-behandling. Dette må i så fall undersøkes i blod ved henvisning til avdeling for medisinsk genetikk. Ta gjerne kontakt ved spørsmål.</p>
---	---	---

## Gjennomføringsplan

Intra-laboratoriesammenligning BRCA1 og BRCA2

OUSHF, SiVHF, AHUSHF, STHF, SUSHF, HUSHF, UNNHF, VVHF

Plan og rapport er skrevet med utgangspunkt i mal fra OUS

### 1. Bakgrunn

Laboratoriene i Norge som benytter NGS til analyse av solide tumorer ønsker å utføre en sammenligning ved analyse av HRR-gener, med spesielt fokus på genene *BRCA1* og *BRCA2*. Målet er å sikre likt tilbud ved ulike helseforetak. Dette dokumentet viser plan for dette arbeidet.

Deltagende laboratorier:

- Laboratorium for molekylærbiologi, SUSHF
- Enhet for Tumorgenomikk, HUSHF
- Molekylær patologi, OUSHF
- Seksjon for medisinsk genetikk, STHF.
- Patologi, AHUSHF
- Seksjon for genteknologi, Mikrobiologisk/patologisk avdeling, SiVHF
- Klinisk Patologi, UNNHF
- Patologi, VVHF (vil analysere prøvene senere)

#### 1.1. Analysemetode

<b>Analyse</b>	NGS for solide tumorer. BRCA1 og BRCA2 samt andre HRR-gener som er inkludert i de ulike genpanelene som de respektive laboratoriene benytter. Kittene er «research use only», og implementeres derfor som in house metode. Sammenligningen vil omfatte SNV og små duplikasjoner/delesjoner/insersjoner. CNV og fusjoner vil ikke inngå i denne verifiseringen.
<b>Bruksområde</b>	Deteksjon av onkogene og sannsynlig onkogene sekvensvarianter i BRCA1 og BRCA2 med tanke på effekt av PARP-hemmer. Andre HRR-gener inngår også i verifiseringen der disse er inkludert i panelet.
<b>Referansesekvens(er)</b>	<b>Referansesekvens:</b> Hg19 <b>Transkript:</b> Ulike transkripter benyttes på de ulike laboratorier, men det tas utgangspunkt i BRCA1 NM_007294.4 og BRCA2 NM_000059.4 i sluttrapporten.
<b>Analyseprinsipp</b>	Utvalgte gener/hotspot amplifiseres ved PCR og sekvenseres ved NGS-teknikk. IonTorrent er en sekvenseringsmetode som baserer seg på endringer i pH som resultat av frigjørelse av H+ under polymeriseringen av DNA. Illumina sekvensering er basert på «sequencing by synthesis» hvor det benyttes fluoriserende nukleotider i syklisk sekvensering.
<b>Dokumenter/Referanser</b>	<b>OUS:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• "Oncomine™ tumor specific panels USER GUIDE", Pub. No. MAN0018518, 18. Desember 2020</li></ul>

- "Ion AmpliSeq™ Library Preparation on the Ion Chef™ System USER GUIDE", Pub. No. MAN0013432, 17. Oktober 2017
- "Ion 540™ Kit – Chef USER GUIDE", Pub. No. MAN0010851, 25. Juni 2019

Filtrering av varianter:

- **Variant calling:** IonReporter 5.18.
- **Standard filter for analyse i diagnostikk:** Oncomine Extended (5.18).
- **Sjekke utenfor standard filter:** BRCA1/2 søkes opp i «Called variants and controls (5.18)».

**SiV:**

- Oncomine™ Comprehensive Assay v3 USER GUIDE
- "Ion AmpliSeq™ Library Preparation on the Ion Chef™ System USER GUIDE", Pub. No. MAN0013432, 17. Oktober 2017
- "Ion 540™ Kit – Chef USER GUIDE", Pub. No. MAN0010851, 25. Juni 2019

Filtrering av varianter:

- **Variant calling:** Ion Reporter 5.18
- **Standardfilter for analyse i diagnostikk:** Oncomine Extended (5.18).
- **Sjekk utenfor standard filter:** Benyttes ikke i standard rutine.

**STHF:**

- "Genexus™ Integrated Sequencer USER GUIDE", Pub. No. MAN0017910, 18. October 2022.
- "Oncomine™ Comprehensive Assay v3 GX USER GUIDE", Pub. No. MAN0018512, 9. July 2020.
- "Genexus™ Purification System USER GUIDE", Pub. No. MAN0018475, 27. October 2022.

Filtrering av varianter:

- **Variant calling:** Ion Torrent Genexus Software 6.6
- **Standardfilter for analyse i diagnostikk:** Oncomine Extended (5.16).
- **Sjekk utenfor standard filter:** Benyttes ikke i standard rutine.

**UNN:**

- AmpliSeq for Illumina BRCA Panel Reference Guide. Document # 1000000039405 v06. February 2019

- Local Run Manager DNA Amplicon Analysis Module Workflow Guide. Document # 1000000155123 v00. February 2021

Filtrering av varianter (VariantStudio v3.0):

- Population frequency:<1% (global frequency)
- Consequence: select all

#### SUS:

- Ion AmpliSeq™ Library Preparation on the Ion Chef™ System USER GUIDE, Pub. No. MAN0013432, 17. Oktober 2017
- Oncomine™ BRCA Research Assay USER GUIDE, Pub. No. MAN0014634, 8. Juni 2017
- Ion 510™ & Ion 520™ & Ion 530™ Kit - Chef USER GUIDE, Pub. No. MAN0016854, 29. Oktober 2020

Filtrering av varianter:

- **Variant calling:** Ion Reporter 5.18.
- **Standard filter for analyse i diagnostikk:** Oncomine BRCA (5.18).
- **Sjekk utenfor standard filter:** Benyttes ikke i standard rutine.

#### AHUS:

- Oncomine™ Comprehensive Assay v3, User Guide, Pub. No. MAN0015885, 18. April 2019
- Ion AmpliSeq™ Library Preparation on the Ion Chef™ System User Guide, Pub. No. MAN0013432, 16. Mai 2017
- Ion 540™ Kit – Chef, User Guide, Pub. No. MAN0010851, 23. Januar 2017
- Ion Reporter™ Software 5.16, User Guide, Pub. No. MAN0019148, 22. Oktober 2020

Filtrering av varianter:

- **Variant calling:** Ion Reporter 5.16
- **Standardfilter for analyse i diagnostikk:** Oncomine Extended (5.16). Sjekker både «Filtered In Variants» og «Filtered Out Variants».
- **Sjekk utenfor standard filter:** Benyttes ikke i standard rutine

#### HUS:

- AmpliSeq for Illumina BRCA Panel Reference Guide. Document # 1000000039405 v06. February 2019.
- Local Run Manager DNA Amplicon Analysis Module Workflow Guide. Document # 1000000155123 v00. February 2021.

	<p>Filtrering av varianter:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Bruker Alissa Interpret, v5.4. September 2022</li> <li>• <b>Varianter som blir kvalitetssikret og tolket:</b> lesedybde <math>\geq 100X</math>, kvalitet (Genotype quality, GQ) <math>\geq 40</math></li> <li>• <b>Enten:</b> omtalt i variantdatabaser somatiske/patogene varianter (CIViC, COSMIC, ClinVar), populasjonsfrekvens i gnomAD <math>&lt; 1\%</math> og VAF <math>&gt; 0.3</math></li> <li>• <b>Eller:</b> ikke tilstede i listen bestående av svartelistede varianter (ofte observerte tekniske artefakter, normalvarianter), gir endring i proteinkodende sekvens/ligger i spleiseområdet (30 posisjoner i intron og 2 posisjoner i ekson), VAF <math>&gt; 0.3</math>, og populasjonsfrekvens i gnomAD <math>&lt; 1\%</math>.</li> </ul>
<b>1.2. Gjennomføring</b>	
<b>Bakgrunn</b>	Sammenligningen gjennomføres etter implementering da NGS-analysen er validert av leverandør og har vært i rutinemessig bruk ved de fleste laboratoriene. Alle laboratoriene har validert bruken av sin sekvenseringsmetode.
<b>Prøvemateriale</b>	<p><b>Ringtest:</b> 12 prøver fra diagnostikken med funn av BRCA-varianter (varierende andel tumor). DNA-materiale deles.</p> <p><b>2 kommersielle kontroller:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• BRCA Somatic Multiplex I FFPE (HD810) eller ferdig ekstrahert DNA (HD795). Kontrollen inneholder 16 verifiserte mutasjoner; BRCA1, BRCA2, BRIP1 og NBN.</li> <li>• Acrometrix Oncology Hotspot Control (kun ATM).</li> </ul> <p><b>Bioinformatisk dekningsanalyse av tidligere analyserte prøver ved de respektive laboratoriene.</b></p>
<b>2. Vurdering av ytelse</b>	
<b>Begrensninger</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Metode-uavhengige begrensninger <ol style="list-style-type: none"> <li>1.1 Kvalitet på prøvemateriale DNA-konsentrasjon samt integritet vil ha innvirkning på om analysen vil være konklusiv. FFPE-materiale er utsatt for sekvenseringsartefakter grunnet deaminering av cytosin. Sterkt fragmentert DNA vil ikke kunne sekvenseres.</li> <li>1.2 Amplikonbasert sekvensering vil være sårbar for variasjoner i bindings seter for primere.</li> <li>1.3 Pseudogener Kan gi usikkerhet ved alignment.</li> </ol> </li> <li>2. Metode-spesifikke begrensninger <ol style="list-style-type: none"> <li>2.1 IonTorrent-basert testing Falske positive/negative indel-varianter i relasjon til homopolymerer er en kjent svakhet ved IonTorrent-</li> </ol> </li> </ol>

	<p>metoden grunnet kjemien benyttet i sekvenseringen. Dette gjelder særlig homopolymerer over 6 baser i lengde. Det er per nå 32 kjente homopolymerområder i BRCA1/2 (DeJonge et al, 2018).</p> <p>2.2 Illumina-basert sekvensering: Områder med repeterte sekvenser vil være utfordring for sekvensering.</p> <p>2.3 Laboratoriene har ulike versjoner av både software og hardware, og dette kan gi ulike resultater.</p>
<b>3. Gjennomføringsplan</b>	
<p><b>1. Kommersielt kontrollmateriale: overenstemmelse for varianter definert av leverandør. Ringtest: overenstemmelse mellom laboratoriene.</b></p> <p><b>2. Allelfraksjon skal sammenlignes mellom laboratoriene. Gjennomsnittsverdi og standardavvik beregnes. Resultatene skal benyttes for å kunne informere rekvirenter om usikkerheten ved bestemmelse av allelfraksjonen.</b></p> <p><b>3. Bioinformatisk dekningsanalyse i ønskede gener: Lesedybde &gt; 500 i amplikon hvor det er kjente klinisk relevante varianter (hotspot). (QC skal være OK)</b></p>	
3.1 Parametere som skal verifiseres, avhenger av analysetype (fjern/tilføy aktuelle parametere)	
3.2.1 Arbeidsplan for:	Samsvar for kommersielle kontroller og ringtest mellom deltagende laboratorier.
<b>Mål</b>	<p><b>Gruppe 1 (Kommersielle kontroller):</b> Varianter i BRCA1/2 og ATM skal påvises med aktuell metode. Resultatet av andre HRR gener bemerkes, men er ikke i fokus.</p> <p><b>Gruppe 2 (Pasientprøver, BRCA1/2):</b> Patogene varianter i BRCA1/2 skal påvises med aktuell metode ved andre laboratorier som utfører testing.</p>
<b>Prøver</b>	<p><b>Gruppe 1 (Kommersielle kontroller):</b> To kommersielle kontroller med kjente varianter</p> <p><b>Gruppe 2 (Pasientprøver, BRCA1/2):</b> Tolv pasientprøver med kjent BRCA1/2 status.</p>
<b>Analyseoppsett</b>	<p><b>Gruppe 1 (Kommersielle kontroller):</b> Alle kontroller analyseres som i rutine, men siden flere av variantene er klassifisert som benign, er det derfor nødvendig å sjekke utenfor standard filter hos det enkelte laboratorium. Resultatene dokumenteres i vedlegg «Resultat ktr».</p> <p><b>Gruppe 2 (Pasientprøver, BRCA1/2):</b> Alle prøver analyseres som i rutine. Resultatene dokumenteres i vedlegg «Resultat ringtest».</p>
3.2.2 Arbeidsplan for:	Variasjon i allelfraksjon.
<b>Mål</b>	Variasjon i allelfraksjon måles ved å beregne gjennomsnittsverdi og standardavvik.
<b>Prøver</b>	<p><b>Gruppe 2 (Pasientprøver, BRCA1/2):</b> Tolv pasientprøver med kjent BRCA1/2 status.</p>

<b>Analyseoppsett</b>	Prøvene analyseres som i rutinediagnostikk. Resultatene dokumenteres i vedlegg «resultat ringtest».
<b>3.2.3 Arbeidsplan for:</b>	Dekningsanalyse av gener
<b>Mål</b>	Områder som er dårligere dekket skal dokumenteres slik at de kan spesifiseres i metodebegrensninger. Lesedybde > 500 i amplitudon hvor det er kjente klinisk relevante varianter (hotspot). (QC skal være OK).
<b>Prøver</b>	Resultater fra tidligere pasientprøver som tidligere er analysert på panel hvor BRCA1/2 inngår.
<b>Analyseoppsett</b>	Analysering av dekning gjøres etter utarbeidet bioinformatisk pipeline. OUSHF, STHF, SUSHF, SiVHF og evt. HUSHF deltar i dekningsanalysen.
<b>3.3 Deltakere i verifiseringen</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Laboratorium for molekylærbiologi, SUSHF.: Almaz Nigatu Teshahun</b></li> <li>• <b>Enhet for Tumorgenomikk, HUSHF.: Kari Merete Ersland og Randi Hovland</b></li> <li>• <b>Molekylær patologi, OUSHF.: Bjørnar Tovson Bae Flatin og Mohsen Shadidi</b></li> <li>• <b>Seksjon for medisinsk genetikk, STHF.: Ida Marie Børresen og Linda Strand</b></li> <li>• <b>Patologi, AHUSHF.: Vahid Bemanian, Nardos Tesfaye Woldemariam og Guro Horni Gløersen</b></li> <li>• <b>Seksjon for genteknologi, Mikrobiologisk/patologisk avdeling, SiVHF.: Camilla Holmsen, Nermin Zecic, Anne Pernille Harlem Dyrbekk</b></li> <li>• <b>Klinisk Patologi, UNNHF.: Ragnhild Wold</b></li> <li>• <b>Patologi, VVHF (vil gjennomføre valideringen senere).: Ursa Maierhofer</b></li> </ul>	



**NorPreM**

Nasjonalt kompetansenettverk  
for persontilpasset medisin