

Probio Prostatacancer Assay - Rutindiagnostisk analys av BRCA1/2 vid Klinisk Patologi, Karolinska Universitetssjukhuset.

- Rutindiagnostisk analys av BRCA1/2 ackrediterats vid Klinisk Patologi, Karolinska Universitetssjukhuset.
- Analysen görs med ProBio Prostatacancer Assay. Det är en bred DNA-analys för att hitta somatiska- samt nedärvda förändringar. Analysen har optimerats för att hitta förändringar i BRCA1/2.
- Analysen kan göras på ctDNA (cirkulerande tumör-DNA) och tumörvävnad.
- Analysen använder Next Generation Sequencing.
- Analysen etablerades för den randomiserade studien ProBio (www.probiotrial.org).
- Analysen omfattar mutationer, strukturella rearrangemang, kopietalsförändringar (amplifieringar/deletioner) samt mikrosattelinstabilitet och mutationsbörda.

Täckning av exoner för mutationsanalys													
AKT1	BRAF	CCND1	CDK4	CDK6	CDKN1A	CDKN2A	CTNNB1	CUL3	DICER1	FOXO1	HRAS	IDH1	KRAS
MED12	NRAS	PIK3CA	PIK3CB	PIK3CD	PIK3R1	PIK3R2	POLD1	POLE	SF3B1	SPOP	U2AF1	XPO1	APC
AR	ATM	BRCA1	BRCA2	CDK12	FOXA1	KDM6A	KMT2A	KMT2C	KMT2D	PALB2	PTEN	RB1	TP53
ARID1A	ARID2	ATR	BARD1	BRIP1	CDH1	CDKN1B	CHD1	CHEK2	FANCA	JAK1	KEAP1	MET	MGA
MLH1	MLH3	MRE11A	MSH2	MSH3	MSH6	NBN	NCOR1	NKX3-1	PMS1	PMS2	RAD50	RAD51	RAD51B
RAD51C	RAD51D	RNF43	SETD2	SPEN	ZFHX3	ZMYM3	RAD54L	PIK3R1					
Ökad känslighet för att detektera kopietalsförändringar (homozygota deletioner samt amplifieringar)													
AR	AKT1	AR enhancer	ATM	BRCA2	CCND1	CDK12	CDKN2A	CDKN2B	CHD1	CHEK2	ERG	FANCA	MYC
NKX3-1	PIK3CA	PIK3CB	PIK3R1	PTEN	RB1	TMPRSS2	TP53	ZBTB16					
Täckning av introner för detektion av strukturella rearrangemang (aktiverande eller inaktiverande)													
AR	BRCA2	ERG	ETV1	PTEN	RB1	TMPRSS2							

Tabell: översikt över de gener som analyseras med ProBio Prostatacancer Assay.

Vid frågor: kontakta Molekylär cancerdiagnostik i Solna 08-123 796 85, kmp.solna.karolinska@regionstockholm.se.

För ytterligare information: <https://www.karolinska.se/pta/klinisk-patologicytologi/probio-prostatacancer-assay/>

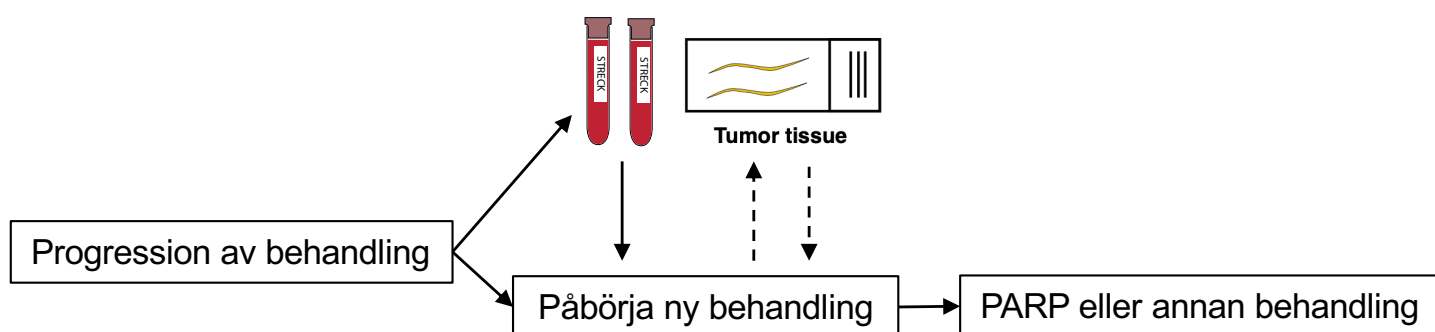
- Vid analys av ctDNA så måste blodprov tas under pågående klinisk progress i samband med byte av behandling. Nivåerna av ctDNA hos patienter som svarar på behandling är betydligt lägre, vilket riskerar att leda till att analysen misslyckas.
- Analys av tumörvävnad kan utföras under alla faser av sjukdomen.
- Vävnadsanalys erbjuds initialt utan extra kostnad vid beställning av ctDNA-analys om ctDNA-fraktionen är låg.
 - Orsaken är att om blod dras när patienten svarar på sin behandling kan ctDNA-nivåerna vara så låga att somatiska förändringar inte kan upptäckas. För vissa patienter med låg tumörbörda är ctDNA-nivåerna låga trots att blod dras vid progression.
 - Dubbelanalys kommer därför att erbjudas tills vi vet bättre för vilka patienter som ctDNA-analys kan ge ett fullgott svar.
 - Om vävnad skall analyseras, beställ då vävnad hos ditt lokala patologilaboratorium i god tid enligt instruktionerna på sida 9.
- ctDNA analys kan förstås beställas utan vävnadsanalys och vice versa.

Vid frågor: kontakta Molekylär cancerdiagnostik i Solna 08-123 796 85, kmp.solna.karolinska@regionstockholm.se.

För ytterligare information: <https://www.karolinska.se/pta/klinisk-patologicytologi/probio-prostatacancer-assay/>

- Från provtagning till rapport tar för närvarande cirka fyra veckor. Vi arbetar på att korta ner svarstiderna.
- Följande upplägg föreslås därför:

Gör vävnadsanalys om ctDNA-fraktionen är för låg.



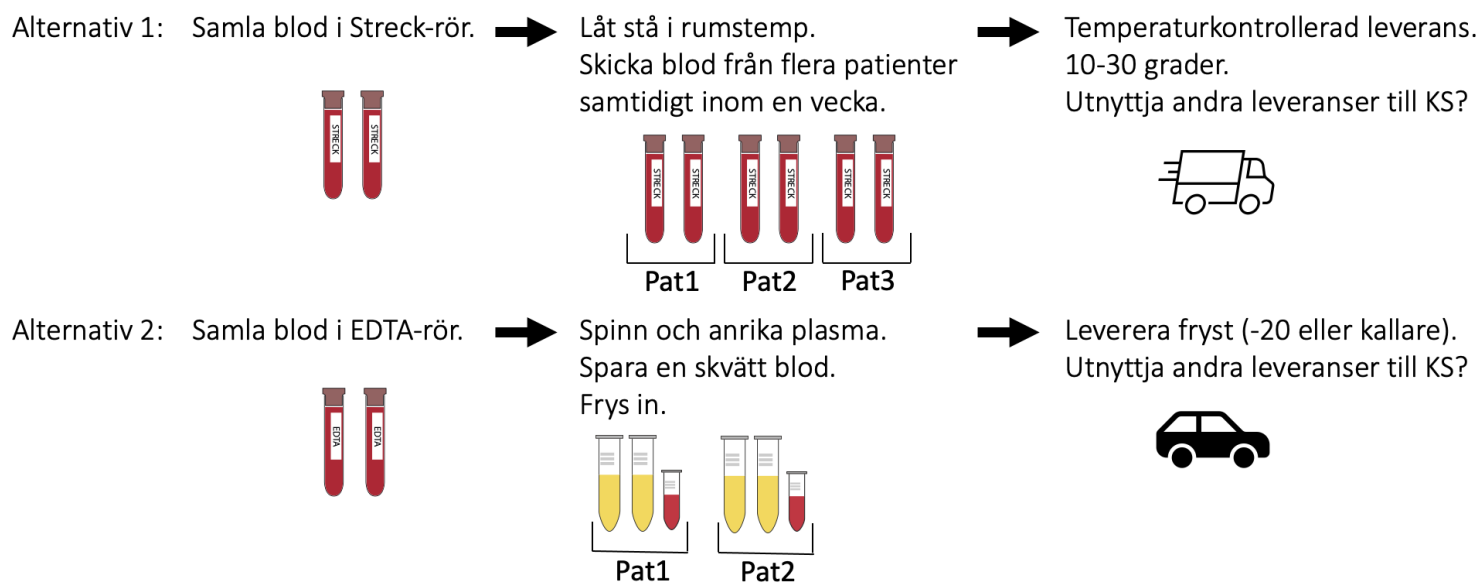
Vid frågor: kontakta Molekylär cancerdiagnostik i Solna 08-123 796 85,
kmp.solna.karolinska@regionstockholm.se.

För ytterligare information: <https://www.karolinska.se/pta/klinisk-patologicytologi/probio-prostatacancer-assay/>

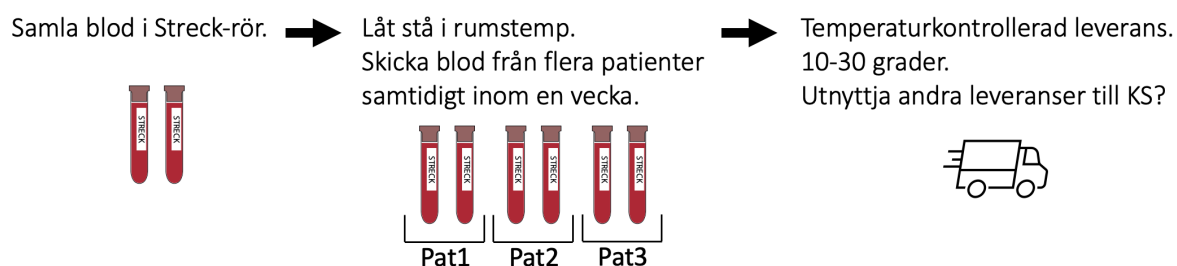
- ① Beställ remiss
- ② Provtagning
- ③ Ordna med transport
- ④ Remissvar

- Region Stockholm: elektronisk beställning i Take Care.
- Övriga regioner: beställ generell pappersremiss i Webbutiken på Karolinska.se
 - <https://www.karolinska.se/for-vardgivare/karolinska-universitetslaboratoriet/Webbutik-bestall-provmateriel-mm/>
 - Senare i vår kommer remisser kunna beställas via labbportalen.
- Information som ska ingå i remissen:
 - Frågeställning: BRCA1/2 screening prostatacancer.
 - Anamnes (fritext):
 - Ange behandlingslinje för mCRPC (metastaserad kastrationsresistent prostatacancer): (1-5)
 - Bekräfta att patienten har en pågående progressiv sjukdom och är aktuell för att byta behandling.
 - **För remissvar svar via telefon**: Telefonnummer måste i så fall uppges på remissen.
- Ange om analysen ska utföras på perifert blod och/eller tumörvävnad.
- Förslag till standardtext att klippa till remissen:
 - xx-årig man med kastrationsresistent prostatacancer, nu progress på behandlingslinje X och planerad för behandlingsbyte. Material för sekvensering: Perifert blod för ctDNA-analys och tumörbiopsi.

- **Introduktion:**
 - Perifert blod provtas för efterföljande anrikning av plasma. Plasma innehåller cellfritt-DNA från döende celler. Alla friska personer har cell-fritt DNA i plasma. Hos patienter med cancer kommer en fraktion av cell-fritt DNA från cancercellerna, detta kallas ctDNA (circulating tumor DNA).
- **Blod hanteras enligt två alternativ.**
 - Antingen dras blod i Streck-rör vilket stabiliserar blodet och möjliggör veckovis temperaturkontrollerad transport av blod från flera patienter. Eller så anrikas plasma innan transporten till Klinisk Patologi, KS.



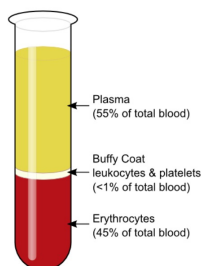
- Blod – instruktion alternativ 1:
 - Perifert blod i STRECK-rör.
 1. 2 x 10 ml blod tages.
 2. Vänd rören 10 gånger.
 3. Sätt på klisterlappar med prov-ID på rören.
 4. Förvara rören i rumstemperatur. Ställ INTE in i kylskåp eller frys.
 5. Skicka rör samt remisser till Klinisk patologi och Cancerdiagnostik, Karolinska Universitetssjukhuset i Solna.
 6. Proverna ska hålla en temperatur på mellan 10-30 grader Celsius under transport.
 7. Prover från flera patienter kan samlas in och skickas en gång per vecka.
 - Svensk återförsäljare av Streck-rör är <http://www.nordicbiosite.com/>
 - Cell-Free DNA BCT® CE, 6 tube
 - 309-218996
 - Cell-Free DNA BCT® CE, 100 tube
 - 309-218997



- Blod – instruktion alternativ 2:

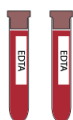
- Perifert blod i EDTA-rör för lokal anrikning av plasma:

1. 2 x 10 ml blod tages.
2. Vänd rören 10 gånger.
3. Centrifugera EDTA-röret i 10 min @ 1 600 x g vid rumstemperatur (RT). Använd en långsam bromsprofil för att förhindra störningar av buffy coat-skiktet. Ta försiktigt bort rören för att undvika turbulens. Detta kommer att placera de röda erythrocyterna (RBC) i botten av röret, plasmafraktionen som ett ljusgult/rosigt transparent skikt på toppen och WBC däremellan i buffy coat-skiktet (se figur nedan). Kasta inte blodsröret ännu (se steg 6). Överför plasman till ett nytt 15 ml rör. Lämna en barriär av plasma för att förhindra kontaminering från buffy coat-skiktet.
4. Centrifugera i 10 minuter vid $\geq 2000 - 4000$ x g vid RT (välj max centrifugeringshastighet) för att pelletera de återstående vita blodkropparna, cellrester och salter i botten av röret. Använd en slät bromsprofil för att förhindra störningar av buffy coat-skiktet. Ta försiktigt bort rören för att undvika turbulens.
5. Överför plasmafraktionen (supernatanten) till ett nytt 15 ml rör. Lämna en barriär av plasma för att förhindra kontaminering från pelleten.
6. Överför 2 ml av blodresten/buffy coat (se bild nedan) från EDTA-röret i steg 1 till ett nytt 2 ml-rör för senare extraktion av nedärvt-DNA. Förvara vid -80°C alternativt i -20 om inte -80 fryns finns tillgänglig.
7. Använd klistermärken från remissen för att märka tuberna.
8. Förvara provrören i -20°C eller kallare (-80 är bättre) tills det är dags för leverans



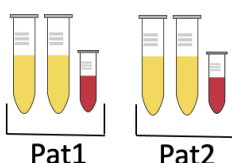
Blodkomponenter efter centrifugering (Figur anpassad från Wikipedia).

Samla blod i EDTA-rör.



Spinn och anrika plasma.
Spara en skvätt blod.

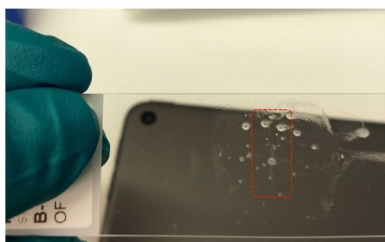
Frys in.



Leverera fryst (-20 eller kallare).
Utnyttja andra leveranser till KS?



- Vävnad – instruktion:
- Biopsimaterial
 - Från FFPE vävnad.
 - 20 x 10 μm snitt i eppendorf-rör från fraktion med högst grad och tumörcellsandel enligt patologbedömning. Om vävnaden inte räcker till, tag åtminstone $\geq 8 \times 10 \mu\text{m}$.
 - Ifall det inte räcker till $\geq 8 \times 10 \mu\text{m}$, tag ytterligare snitt från annan biopsi från samma tumörområde.
 - Märk rören med antal snitt.
 - Vid $< 20\%$ tumörcellsandel, utför makrodissektion.
 - Om makrodissektion inte kan utföras lokalt, skicka 8-20 ofärgade snitt (10 μm) på glas samt ett HTX-färgat glas med tumörområde markerat, alternativt kopia på glas / digital bild med markerat tumörområde.
 - Märk glas med preparatnummer och skicka med kopia av PAD.
 - **Notera:** ofärgade snitt på glas skall appliceras på "vanligt" glas. Superfrost får enbart användas för HTX-infärgning.
 - Leverans behöver inte vara temperaturkontrollerad.



Vanligt glas för snitt som skall sekvenseras.



Superfrost, enbart för H&E



Snitt i Epprör

- Vävnad – instruktion:
- Material från radikal prostatektomi
 - Från FFPE vävnad.
 - 8 x 10 μm snitt i eppendorf-rör från fraktion med högst grad och tumörcellsandel enligt patologbedömning.
 - Ifall det inte räcker till 8 x 10 μm , tag ytterligare snitt från annan biopsi från samma tumörområde.
 - Vid <20% tumörcellsandel, utför makrodissektion.
 - Om makrodissektion inte kan utföras lokalt, skicka 8 ofärgade snitt (10 μm) på glas samt ett HTX-färgat glas med tumörområde markerat, alternativt kopia på glas / digital bild med markerat tumörområde.
 - Märk glas med preparatnummer och skicka med kopia av PAD.
 - **Notera:** ofärgade snitt på glas skall appliceras på "vanligt" glas. Superfrost får enbart användas för HTX-infärgning.
 - Leverans behöver inte vara temperaturkontrollerad.

- Beställaren ansvarar för transporten samt att materialet kommer fram i fullgott skick.
- Observera att transport av Streck-rör måste ske temperaturkontrollerat.
- Proverna och remisser skickas till:
 - Klinisk Patologi och Cancerdiagnostik
 - Att: Molekylär cancerdiagnostik
 - Visionsgatan 56, CCK R8:02
 - Karolinska Universitetssjukhuset
 - 171 76 Stockholm

- Region Stockholm:
 - Digitala svar om möjlighet finns alternativt svar via telefon.
 - För svar via telefon: Telefonnummer måste i så fall uppges på remissen.
 - Svar kommer också med vanlig post.
- Övriga regioner:
 - Svar via telefon.
 - För svar via telefon: Telefonnummer måste i så fall uppges på remissen.
 - Svar kommer också med vanlig post.