

BRAF-gen(DNA; LRG_299:g.176429T>A);P¹ NPU58684

Metodeblad nr. M-289/03

Udarbejdet af: Anders Solitander Bohlbro	Taget i brug: 26.05.2025	Revision: 26.05.2028
	Erstatter: 13.01.2025	

GENERELT	
Ansvarlig KBA analysesektion	DNA, Screening og Biobanker
Indikation og resultatvurdering	BRAF-genet, lokaliseret på kromosom 7, er et proto-onkogen, der koder for proteinet serin/threonin protein kinase B-Raf, der fungerer som intracellulært signalmolekyle og blandt andet styrer celledelingen. Mutationer i <i>BRAF</i> er blandt de mest almindelige genetiske forandringer i maligne tumorer, heriblandt malignt melanom, ikke-småcellet lungekræft og kolorektalcancer. Alt væv, herunder tumorvæv, frigiver DNA i form af cfDNA til plasma, og det er vist, at mængden af cirkulerende tumor-DNA (ctDNA) er proportionalt med tumorbyrden. Koncentrationsmåling af ctDNA kan derfor benyttes til at monitorere tumorbyrden og eventuelt recidiv efter behandling ved kendt mutation i primærtumoren. Den her beskrevne analyse undersøger en af de mest almindelige og velbeskrevne mutationer i BRAF-genet ved malignitet, V600E. <u>Indikationer:</u> • Monitorering af cancersygdom med kendt mutation i BRAF-genet <u>Resultatvurdering:</u> Der findes proportionalitet mellem koncentrationen af ctDNA og tumorbyrde. Således vil et positivt resultat tyde på tilstedeværelsen af tumor med mutationer i BRAF-genet og stigende værdier kan indikere stigende tumorbyrde.
Analysenavn og kode i SP	BRAF-GEN(DNA; LRG_299:G. 176429T>A);P, NPU58684
Analysenavn og kode i LABKA	P-BRAF-gen-(DNA; LRG_299:g. 176429T>A);antalk., CFBR600EMU
Analysenavn og kode i WebReq	Analysen kan ikke rekvireres i WebReq.
Enhed	x10 ³ /L
Prøvemateriale og rørtype	EDTA-stabiliseret plasma taget i 9 ml Vacuette®-glas med lilla prop og sort ring, indeholdende K2-EDTA (lilla9S).
Mindste prøvemængde	To fyldte glas.

¹ Der findes aktuelt ingen national konsensus om et kortnavn for denne analyse. Det angivne er et forslag.

BRAF-gen(DNA; LRG_299:g.176429T>A);P¹ NPU58684

Metodeblad nr. M-289/03

Prøvetagning herunder særlige forhold	Prøven tages på Herlev-matriklen og skal centrifugeres første gang og nedfryses indenfor 3 timer. Alternativt kan prøven tages, centrifugeres og nedfryses på andre hospitaler, hvorefter det nedfrosne prøvemateriale sendes til Klinisk Biokemisk Afdeling, Herlev Hospital med henblik på udførelse af analysen.		
Referenceinterval/kliniske beslutningsgrænser	Den teoretiske normalværdi vil for raske være 0, men dette er af analysetekniske årsager uhensigtsmæssigt. Der er derfor ikke fastsat noget referenceinterval.		
Ringegrænser	Ikke relevant		
Udførende laboratorie	Klinisk Biokemisk Afdeling, Herlev Hospital		
Analyseringshyppighed	Én gang månedligt.		
Svartid (<i>efter modtagelse af prøve</i>)	Indenfor en måned.		
Prøvehåndtering	Intern rekvirent	Ekstern rekvirent	Praksis
	Umiddelbart efter prøvetagning overføres prøven til automatiseringsbåndet og centrifugeres. Hvis prøven er taget i B1, sendes den med rørpost til båndet. Prøven skal centrifugeres (første gang), afpipetteres og nedfryses indenfor 3 timer.		Analysen kan ikke rekvireres i praksis.
Holdbarhed	<u>Fuldblod (EDTA) :</u> Stuetemperatur (15-25°C): 3 timer På køl (2-8°C): 3 timer <u>Plasma (efter centrifugering og afpipettering):</u> Stuetemperatur (15-25°C): 7 dage På køl (2 - 8°C): 14 dage Frost (-80°C): Ukendt, antages ubegrænset		Analysen kan ikke rekvireres i praksis
Forsendelse	Intern transport	Sendes på frost.	Analysen kan ikke rekvireres i praksis
Præanalytiske fejlkilder	Plasmakoncentrationen af ctDNA øges ved tumorkirurgi eller strålebehandling. Således anbefales at vente mindst 14 dage efter tumorkirurgi eller strålebehandling før prøvetagning. Det kan ikke udelukkes, at høje koncentrationer af vildtype-cfDNA påvirker analysen. Koncentrationen af vildtype-cfDNA øges ved traumer, hård fysisk aktivitet og menstruation.		

BRAF-gen(DNA; LRG_299:g.176429T>A);P¹ NPU58684

Metodeblad nr. M-289/03

METODEBESKRIVELSE	
CE mærket analyse (apparat og reagens i kombination)	Nej
Akkrediteret analyse	Nej
Metrologisk sporbarhed (rutinemålingens sporbarhed til referencemateriale og/el. –metode)	Analysen kalibreres ikke, og der findes ingen international standard for denne analyse. Den genomiske placering af primer og prober, der indgår i reaktionen, er sporbar til det humane referencegenom hg19 (MIQE context: hg19 chr7:140453075-140453197).
Analyseprincip	Sekvensspecifik nukleinsyredetektion ved hjælp af droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) udført med sekvensspecifikke fluorescerende prober og primere.
Apparatur	QiaSymphony, Qiagen. Veriti 96-Well Fast Thermo Cycler, Applied Biosystems. Automated Droplet Generator, BIO-RAD. QX200 droplet generator, BIO-RAD. C1000 Touch Thermal Cycler, BIO-RAD. QX200 Droplet Reader, BIO-RAD.
Kalibrator	Der benyttes ikke kalibrator.
Reagens	ddPCR supermix for probes (no dUTP), BIO-RAD. ddPCR Mutations Assay: BRAF pV600E c.1799T>A, Human, BIO-RAD. Droplet generation oil, BIO-RAD. Droplet reader oil, BIO-RAD.
Ekstern kvalitetskontrol	EQA scheme for circulating tumour DNA ct-DNA (Referenzinstitut für Bioanalytik) ctDNA Detection EQA (DCCC ctDNA Research Center)
Præcisionskontrolmaterialer (navn, producent, materialetype)	Der anvendes en fast intern cfDNA-kontrol lavet ud fra cellelinje-DNA med B-Raf V600E gDNA (HD238 / Horizon).
Kontrolniveauer	1 niveau.
Intermediær præcision (CV _{oprundet} inkl. instru. spred.)	12,3%

BRAF-gen(DNA; LRG_299:g.176429T>A);P¹ NPU58684

Metodeblad nr. M-289/03

Ekspanderet måleusikkerhed ($k=2$ sv.t. 95% CI på måleresultatet)	24,6%
Mindste relevante kliniske difference	Ved to prøver på samme patient (målt med ovennævnte analysemetode) er den mindste klinisk signifikante forskel på de to svar 113,6 % beregnet på baggrund af en skønnet biologisk variation på 39,1 %
Måleområde (total) standard analysemåleområde måleområde fortynding (udstyr) måleområde opkonc. (udstyr) yderligere fortynding (ja/nej)	7,20 – 50.000 x 10³/L. Svarene for 8ml plasmaoprensning bliver udgivet som følger: <0,55 x 10³/L → udgives som ”Ikke påvist”. 0,55 – 7,20 x 10³/L → udgives som ”Påvist”. >7,20 x 10³/L → med kvantificering af koncentrationen. Svarene for 4ml plasmaoprensning bliver udgivet som følger: <1,10 x 10³/L → udgives som ”Ikke påvist”. 1,10 – 7,20 x 10³/L → udgives som ”Påvist”. >7,20 x 10³/L → med kvantificering af koncentrationen.
Interferens (hæmolyse, icterus, lipæmi, andet)	Ingen kendt interferens.
Bemærkninger	Ingen

Dokumenthistorik

Dato		Initialer
02.08.2024	Oprettet.	ABOH0031
18.09.2024	Godkendt.	STEBO
13.01.2025	LoD og LoQ opdateret baseret på valideringstillæg nr. 1. Svar for negative prøver ændret. Fjernet information om at der ikke foretages fortynding eller opkoncentrering.	KHAN0715
26.05.2025	Svar ændret fra ”Se note” og svarkommentar ”Mutant ikke detekterbar” til ”Ikke påvist”.	KHAN0715