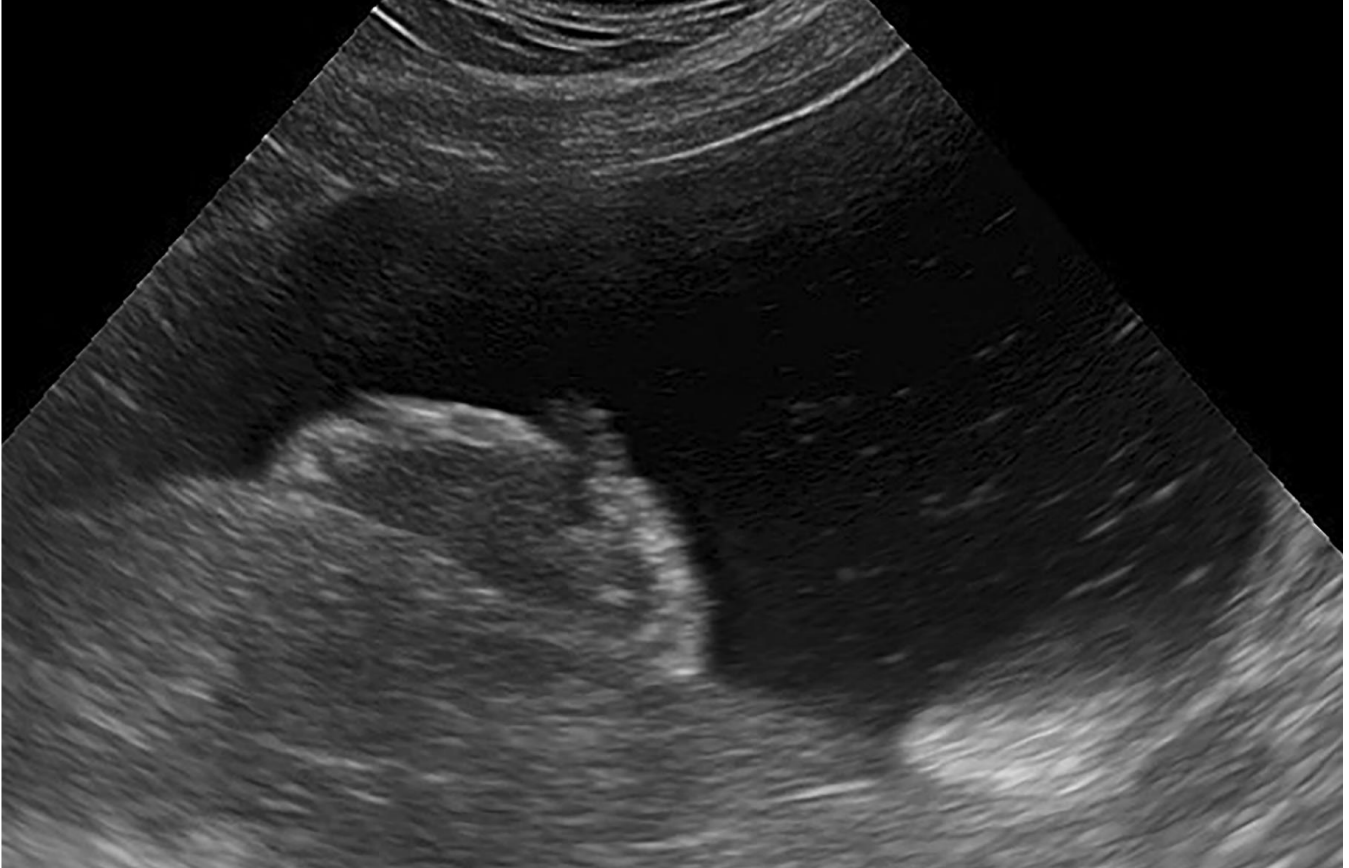


BRAF mutácia a BRAF comp. test - update



Obr.1: Ultrazvuk karcinómu močového mechúra

Zdroj obrázka: Dr. G. Dinges, Kleintierpraxis Wachaus

Karcinómy urotelu a prostaty

Urotelové karcinómy (UCa) močového mechúra a uretry, ako aj karcinóm prostaty (PCa) u psov sú vysoko malígne nádory, ktoré sa často diagnostikujú pomerne neskoro (napr. ultrazvukom, obr. 1) a majú zlú prognózu. Analýzou na prítomnosť mutácie V595E v géne BRAF je možné stanoviť diagnózu vo včasnom štádiu, dokonca aj v močovom sedimente.

Novinkou je doplnkový test, ktorý sa môže použiť, ak sa nezistila mutácia BRAF a je potrebné zvýšiť citlivosť celkového testu. V Labokline sa kombinovaný test nazýva **BRAF comp.**

Obidva testy vám v texte ešte raz predstavíme.

BRAF^{V595E} mutácia

Variant BRAF V595E, známy z humánnej medicíny, bol prvýkrát skúmaný v roku 2015 Mochizukim et al. vo veľkom počte psích nádorov. Na rozdiel od ľudí, u ktorých sa mutácia vyskytuje najmä v malígnych melanómoch, nádoroch vaječníkov, karcinómoch štítnej žľazy a kolorektálnych karcinómoch, Mochizuki et al. (2015) zistili mutáciu u psov najčastejšie v uroteliálnych karcinómoch a karcinómoch prostaty.

Mutácia BRAF^{V595E} je somatická mutácia v chromozóme 16, ktorú možno zistiť len v nádorových bunkách. Táto mutácia vedie k vzniku nádoru prostredníctvom trvalej aktivácie dráhy MAP kinázy.

Indikácie

Testovanie na prítomnosť mutácie BRAF^{V595E} môže byť užitočné pri nasledujúcich indikáciách:

- Skríning na včasnú detekciu u predisponovaných plemien (pozri nižšie).
- Invazívnemu odberu vzoriek by sa malo predísť analýzou spontánneho moču (sedimentu).
- V prípadoch s nejasnou patohistologickou a cytologickou diagnózou (zlá kvalita vzorky, prekryvajúce sa obrazy zápalu a neoplázie) sa možno vyhnúť opakovanému invazívnemu odberu vzoriek.
- Individualizovaná liečba vo vybraných prípadoch s pozitívnym BRAF (napr. sorafenibom; Chon et al. 2024).

Materiál vzorky: možnosti

- tkanivo (napr. biopsie fixované vo formalíne, aspoň 5 mm)
- aspoň 2 cytologické nátery (napr. tenkoihlové aspiráty bohaté na nádorové bunky, močový sediment)
- moč (1 ml močového sedimentu, odporúčanie: spontánny ranný moč)

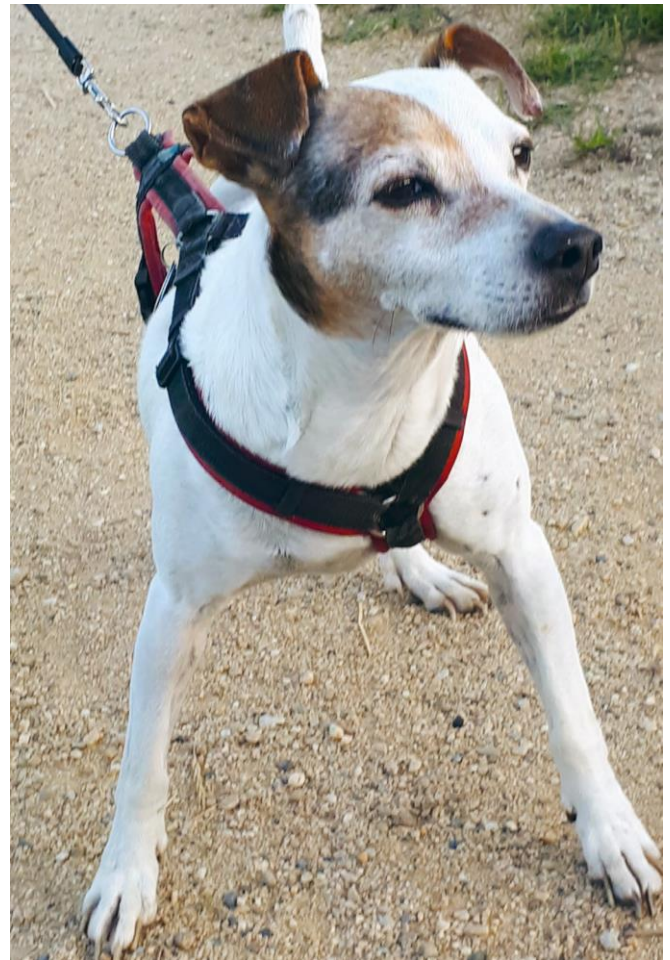
Keďže sa používa vysoko citlivá **metóda** kvapôčkovej digitálnej PCR (ddPCR), na diagnostiku karcinómu stačia len 2 nádorové bunky s mutáciou BRAF^{V595E}.

Metodické obmedzenia

Hodnotenia rutinného materiálu na diagnostiku mutácie BRAF^{V595E} za posledných 6 rokov ukázali, že v približne 10 % vzoriek nebolo možné izolovať žiadnu DNA. K tomu dochádza najmä vtedy, keď sa namiesto sedimentu pošle necentrifugovaný moč. Keďže DNA je prítomná v bunkách, vo vzorke musí byť prítomný dostatočne vysoký podiel epitelových buniek, aby bolo možné izolovať dostatočné množstvo DNA. V zásade možno zistiť aj DNA bez buniek, ale pri výbere materiálu sa na túto možnosť netreba spoliehať.

V ojedinelých prípadoch môžu byť príčinou toho, že napriek dostatočnému počtu buniek sa nepodarí izolovať žiadnu DNA, aj inhibítory.

Premnoženie baktérií v moči zvyčajne nie je problémom pri detekcii mutácie BRAF^{V595E}.



Obr. 2: Jack Russell teriéry majú mutáciu BRAF pri rakovine močového mechúra obzvlášť často

Zdroj obrázka: PD Dr. H. Aupperle-Lellbach

Špecifita a senzitivita

Špecifita diagnostiky mutácie BRAF^{V595E} je 100 %, keďže mutáciu BRAF nebolo možné zistiť u žiadneho psa s cystitídou, polypmi močového mechúra a podobne. Platí to aj pre karcinóm prostaty, keďže mutácia BRAF^{V595E} sa nenašla pri benígnej hyperplázii prostaty, skvamóznej metaplázii alebo atrofii prostaty (Mochizuki et al. 2015a).

V závislosti od štúdie a plemena psa je citlivosť detekcie mutácie BRAF pri UCa až 86 % a pri PCa približne 61 %. V jednej kazuistike (Chamber et al. 2024) boli dokonca detegovateľné skoré štádiá UCa (dysplázia) s mutáciou BRAF. Súčasné analýzy rutinného materiálu z Laboklinu za posledných 6 rokov ukázali, že podiel BRAF pozitívnych vzoriek v predloženom materiáli je obzvlášť vysoký u niektorých plemien

teriérov (obr. 2), shetlandských ovčiakov a biglov. To však nevypovedá nič o citlivosti, pretože nie sú k dispozícii informácie o tom, či v negatívnych prípadoch bol alebo nebol prítomný nádor. Tieto pozorovania však naznačujú, že mutácia sa vo vzorkách z týchto plemien vyskytuje veľmi pravidelne.

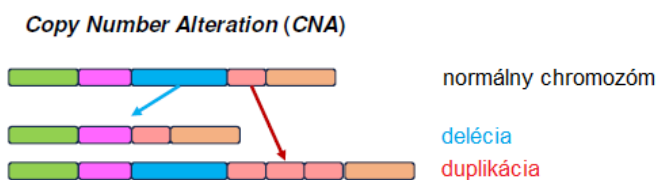
Interpretácia výsledkov

Iba pozitívny výsledok je dôkazom karcinómu. Ak sa vo vzorke nedá zistiť mutácia BRAF, sú možné nasledujúce scenáre:

- Nie je prítomný UCa / PCa (napr. polyp, benígna hyperplázia).
- Vo vzorke nie sú žiadne zmutované bunky, ale je prítomný karcinóm (sporná reprezentatívnosť vzorky, napr. cytológia/moč chudobný na bunky).
- Karcinóm nie je spôsobený mutáciou BRAF^{V595E}.
- Užitočný môže byť nový test CNA (pozri nižšie).

Nové: BRAF comp.

Diagnostika karcinómov močového mechúra bola teraz v LABOKLINE rozšírená o ďalší molekulárne-genetický test (CNA) na kompletný panel BRAF comp. Analýza CNA je založená na detekcii zmeneného počtu špecifických génových segmentov. Štrukturálne zmeny génov môžu v zásade viesť k strate alebo zmnoženiu génových segmentov (zmena počtu kópií = *Copy Number Alteration*, CNA), pozri obr. 3.



Obr. 3: Schematické znázornenie možných genetických variácií počtu kópií *Zdroj: PD Dr. H. Aupperle-Lellbach*

Copy Number Alteration (CNA) pri uroteliálnom karcinóme psov

Duplikácie na chromozómoch 13 a 36 alebo delécie na chromozóme 19 boli nájdené v >75 % prípadov uroteliálneho karcinómu psov, pričom >93 % malo dve alebo viac týchto CN zmien

(Shapiro et al. 2015). Tieto zmeny chýbali vo vzorkách moču psov s infekciami močových ciest, cystitídou alebo benígnymi polypmi močového mechúra (Mochizuki et al. 2016).

Pri neopláziách prostaty u psov tieto genetické zmeny NIE sú zistiteľné (pozri obrázok 4).

Kvantifikáciou týchto počtov kópií možno teraz identifikovať aj uroteliálne karcinómy, ktoré nemajú mutáciu BRAF^{V595E}. Kombinovaný test, ponúkaný spoločnosťou LABOKLIN, sa nazýva BRAF comp. a zodpovedá testu CADET® BRAF-PLUS v USA.

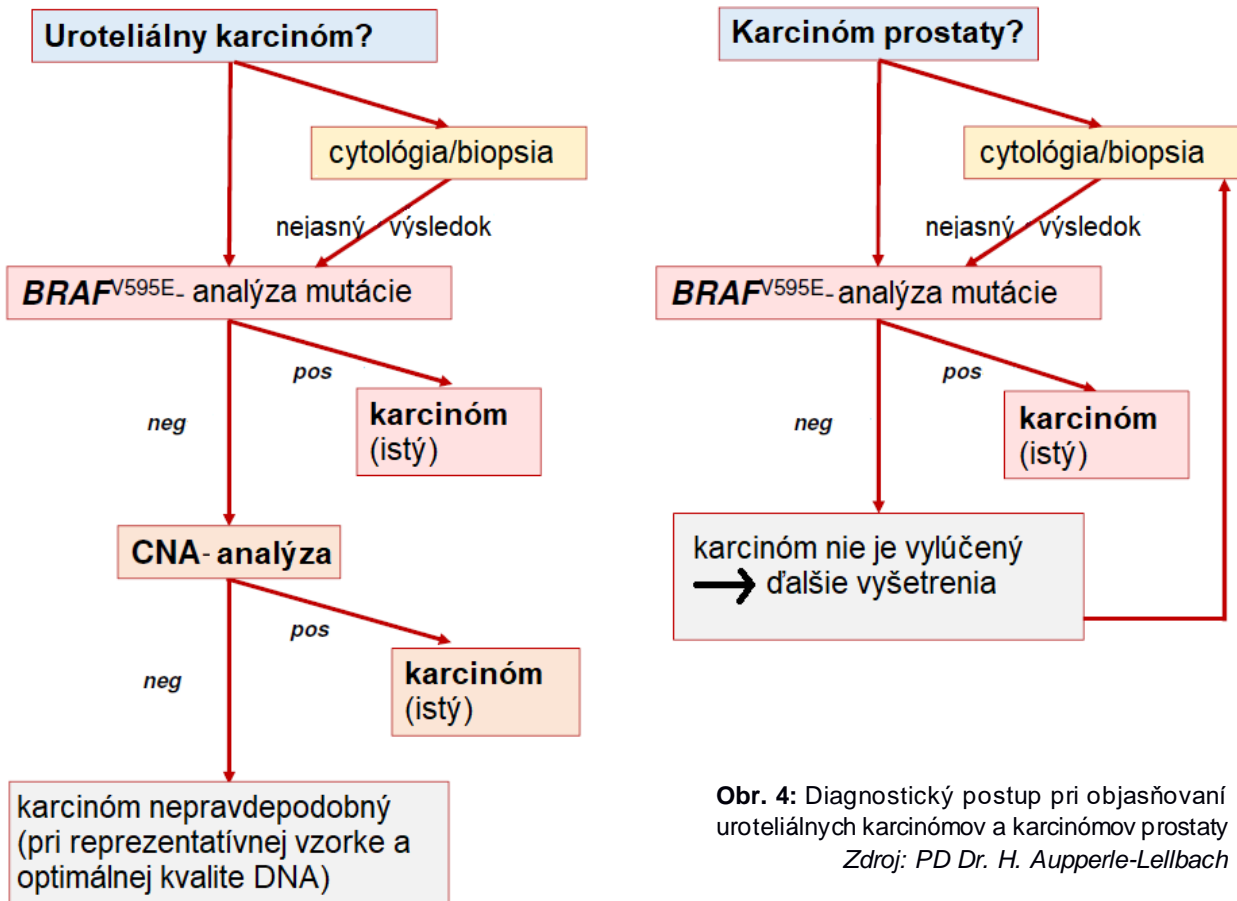
Zmenený počet kópií však nesúvisí s mutáciou BRAF, ale je nezávislým molekulárne-genetickým javom, ktorý je zistiteľný len v nádorových bunkách uroteliálnych karcinómov psov. Molekulárne dôsledky na úrovni proteínov alebo v rámci signálnych kaskád zatiaľ neboli preskúmané. Či a do akej miery je možné terapeutické alebo prognostické vyjadrenie pre psov s týmito CNA pri karcinóme močového mechúra, je potrebné ešte preskúmať.

Metodické obmedzenia

Materiál, ktorý už bol zaslaný na analýzu mutácie BRAF (pozri vyššie), sa v zásade môže použiť aj na analýzu CNA.

ALE: Vyžaduje sa lepšia kvalita DNA, pretože sa skúma nielen bodová mutácia BRAF^{V595E}, ale analyzujú sa aj väčšie génové úseky, ktoré preto musia byť k dispozícii v dobrej kvalite. Existuje preto riziko, že analýza CNA neposkytne použiteľný výsledok, ak je v moči málo buniek a/alebo je prerastený baktériami.

Preto sa odporúča najskôr vykonať analýzu mutácie BRAF^{V595E} a následnú analýzu CNA zvážiť až vtedy, ak je výsledok negatívny (pozri obrázok 4). Keďže výsledok molekulárne-genetických testov je známy až po úplnom dokončení analýzy, je splatná plná cena, aj keď (napriek opakovanému testovaniu) nebolo možné dosiahnuť žiadny použiteľný výsledok.



Obr. 4: Diagnostický postup pri objasňovaní uroteliálnych karcinómov a karcinómov prostaty
 Zdroj: PD Dr. H. Aupperle-Lellbach

Súhrn

Testovanie na mutáciu BRAF je vysoko špecifický postup (100 %) na detekciu uroteliálneho karcinómu a karcinómu prostaty u psov. Novozavedený test na zmeny v počte kópií určitých génových segmentov (CNA) môže zvýšiť senzitivitu molekulárne-genetickej diagnostiky uroteliálnych karcinómov.

PD Dr. Heike Aupperle-Lellbach, Alexandra Kehl

Vyšetrenia k téme

- # 8675 BRAF mutácia
- # BRAF comp. (V595E + 2 CNA)
- doobjednanie CNA pri negatívnom výsledku BRAF priamo cez laboratórium

Ďalšia literatúra

Aupperle-Lellbach H, Grassinger J, Hohloch C et al. Diagnostische Aussagekraft der BRAF-Mutation V595E in Urinproben, Ausstrichen und Biopaten beim kaninen Harnblasenkarzinom. Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere 2018; 46: 289–95.

Aupperle-Lellbach H, Kehl A, Merz S et al. Die BRAF-Mutation V595E im Übergangszellkarzinom –

Untersuchungen zur Rassedisposition bei Terriern. Kleintiermedizin 2019; 22(1): 30–3.

Chambers JK, Takahashi N, Kato S et al. Diagnostic challenge in veterinary pathology: Detection of BRAF(V595E) mutation in a dog with follicular cystitis and flat urothelial lesion with atypia. Vet. Pathol. 2024; 61: 335-8.

Chon E, Hendricks W, White M et al. Precision Medicine in Veterinary Science. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2024; 54(3):501-21.

Grassinger JM, Aupperle-Lellbach H, Erhard H et al. Nachweis der BRAF-Mutation bei kaninen Prostataerkrankungen. Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere. 2019; 47: 313-20.

Mochizuki H, Kennedy K, Shapiro SG et al. BRAF Mutations in Canine Cancers. PloS one 2015; 10: e0129534.

Mochizuki H, Shapiro SG, Breen M. Detection of BRAF Mutation in Urine DNA as a Molecular Diagnostic for Canine Urothelial and Prostatic Carcinoma. PLoS ONE 2015a; 10, e0144170.

Mochizuki H, Shapiro SG, Breen M. Detection of Copy Number Imbalance in Canine Urothelial Carcinoma with Droplet Digital Polymerase Chain Reaction. Vet. Pathol. 2016; 53: 764–72.

Shapiro SG, Raghunath S, Williams C et al. Canine urothelial carcinoma: Genomically aberrant and comparatively relevant. Chromosome Res. 2015; 23: 311–31.