

Instruks for blodprøvehåndtering ved ctDNA analyse Regionernes Bio- og GenomBank

Formål

Følgende instruks beskriver arbejdsgangen for håndtering af blod til analyse af cirkulerende tumor DNA (ctDNA) indsamlet i Regionernes Bio- og GenomBank (RBGB). Et standardfraktionssæt til RBGB indeholder ikke nok plasma til at sikre tilstrækkeligt udbytte af ctDNA og derfor tilbydes et blodprøvesæt med en større mængde plasma. Fremgangsmåden er vejledende og vil blive tilpasset i takt med større viden på området. For generel håndteringsprocedure for blodprøver i RBGB, se RBGB's instruks for håndtering af standardsæt blod.

Baggrund

Mængden af blod, der udtages, vil variere med hensyntagen til patientens øvrige prøver, behandling, og hvilke analyser der ønskes udført på ctDNA'et. Der kan være behov for op til 80 ml EDTA-fuldblod, afspejlende nuværende kendskab til kliniske interventions studier, som har indsamling via RBGB.

Ud fra litteraturen på området anbefales det, at plasmaet centrifugeres igen efter adskillelse fra buffy coat. Dette er for at undgå kontaminering med DNA fra blodceller. Da ctDNA udgør en meget lille andel, er det vigtigt at undgå kontaminering for den videre oprensning af ctDNA. Såfremt der foreligger nye undersøgelser, som bidrager til spørgsmålet om bedste praksis på området, revurderes anbefalingen.

Eftersom holdningerne til centrifugeringshastighed og temperatur er divergerende og mangler konsensus, anbefaler vi, at centrifugeringsindstillinger følger vores "Instruks for håndtering af standardsæt blod", dog med fokus på langsom opbremsning. Såfremt der foreligger nye undersøgelser, som bidrager til spørgsmålet om bedste praksis på området, revurderes anbefalingen.

Alle prøver bør optimalt være færdighåndteret efter maks. 3 timer.

Forslag til blodprøvesæt til ctDNA analyse:

Der kan være individuelle tilpasninger til indsamling og håndtering af blod til ctDNA analyse, ligesom der kan være tale om projektbetaling af indsamling eller håndtering (se evt. "RBGB Oversigt over vejledende håndteringsomkostninger"). Nedenfor findes to eksempler på et modificeret standardsæt, hvor indsamling til ctDNA imødekommes.

Eksempel 1	Eksempel 2
<ul style="list-style-type: none"> • 1×9/10 ml tørglas eller serum-gel rør <ul style="list-style-type: none"> - 2×2 ml serum (til RBGB) • 4×9/10 ml (eller andet for proceduren passende rør) EDTA rør <ul style="list-style-type: none"> - 1×1,5 ml Fuldblod (til RBGB) - 1×Buffycoat (til RBGB) - 8×2 ml plasma (til ctDNA) 	<ul style="list-style-type: none"> • 1×9/10 ml tørglas eller serum-gel rør <ul style="list-style-type: none"> - 2×2 ml serum (til RBGB) • 4×9/10 ml (eller andet for proceduren passende rør) EDTA rør <ul style="list-style-type: none"> - 1×1,5 ml Fuldblod (til RBGB) - 1×Buffycoat (til RBGB) - 3×5,3 ml plasma i 9 ml rør (til ctDNA)

Håndtering af blod til ctDNA analyse:

1. Det er vigtigt, at prøven modtages helt frisk og at centrifugering tilstræbes indenfor 1½ time for at muliggøre færdighåndtering indenfor 3 timer (Lokale forhold kan gøre, at tidsanbefalingen ikke kan overholdes. Aftale om særskilt transport kan kræve egenbetaling fra projektet).
2. Hvis der skal tages fuldblod fra, gøres dette, inden EDTA-rørene centrifugeres (jf. RBGBs Instruks for håndtering af standardsæt blod)
3. Første centrifugering: Centrifuger EDTA-rør ved 2000×g (g-værdien = 0,00001118*r*RPM², eksempelvis vil 4500 RPM ved rotorradius 9 cm svare til 2038×g) i 10 min ved 4°C (anbefales) eller stuetemperatur. Sæt centrifugen til langsom opbremsning svarende til 45 sek. Dette forhindrer, at de adskilte faser genblandes. Efter start af centrifugeringen må processen ikke afbrydes.
4. Anden centrifugering (anbefales): Overfør og saml plasmaet fra de centrifugerede EDTA-rør til et 50 ml centrifugerør ned til 0,5 cm over en evt. pellet/bunden og gentag centrifugering ved 2000×g i 10 min ved 4°C (anbefales) eller stuetemperatur. Sæt centrifugen til langsom opbremsning svarende til 45 sek. (Se punkt 3.)
5. Afpipetter plasmaet til DNA low-binding mikrorør mrk. EDTA-plasma til ctDNA. Vigtigt: De nederste 0,5 cm af plasmaet over en evt. pellet/bunden må ikke udtages. Denne kan kontaminere prøven, og derved give falske værdier i de efterfølgende analyser.
6. Denne procedure medfører ca. 4 ml plasma per 9 ml fuldblod til ekstraktion af frit-cirkulerende DNA.

Nedfrysning af prøver:

1. Buffy coat opbevares ved -20°C eller -80°C og plasma og fuldblod ved -80°C jf. "Instruks for håndtering af standardsæt blod".

Ekstraktion af frit-cirkulerende DNA fra plasma:

Der findes flere kommercielle kits til ekstraktion af cfDNA. For nuværende peger litteraturen på, at følgende kit fra Qiagen giver det bedste udbytte, men flere undersøgelser af tilgængelige kits anbefales, så valg af kit fremadrettet kan baseres på erfaring og direkte sammenligning.

Hyppigst beskrevet anvendt i litteraturen: QIAamp® Circulating Nucleic Acid kit fra Qiagen til ekstraktion af frit-cirkulerende DNA fra humant plasma (Cat.nr. 55114)

Andre kits anvendt i publicerede artikler:

QI-Aamp minElute ccfDNA mini kit (Qiagen Cat#55284; Qiagen magnetic (QiaM))

Maxwell RSC ccfDNA plasma kit (Promega Cat#AS1480; Promega magnetic (ProM))

Litteratur

1. Markus H. et al. Evaluation of pre-analytical factors affecting plasma DNA analysis. Sci Rep. 2018.
2. Risberg B. et al. Effects of Collection and Processing Procedures on Plasma Circulating Cell-Free DNA from Cancer Patients. J Mol Diagn. 2018.
3. Diefenbach RJ, Lee JH, Kefford RF, Rizos H. Evaluation of commercial kits for purification of circulating free DNA. Cancer Genet. 2018.
4. Sorber L, et al. A Comparison of Cell-Free DNA Isolation Kits Isolation and Quantification of Cell-Free DNA in Plasma J Mol Diagn. 2017.

Oplysninger om Regionernes Bio- og GenomBank (RBGB) kan fås ved henvendelse til:

Sekretariatet for Regionernes Bio- og GenomBank, Afdeling for Patologi, Herlev Hospital, Borgmester Ib Juuls Vej 73, Opgang 7, 4. etage, L5, 2730 Herlev. Tlf. (+45): 3868 9132/3868 9812 (i tidsrummet kl. 10-12). E-mail: RBGB.sekretariat.herlev-og-gentofte-hospital@regionh.dk