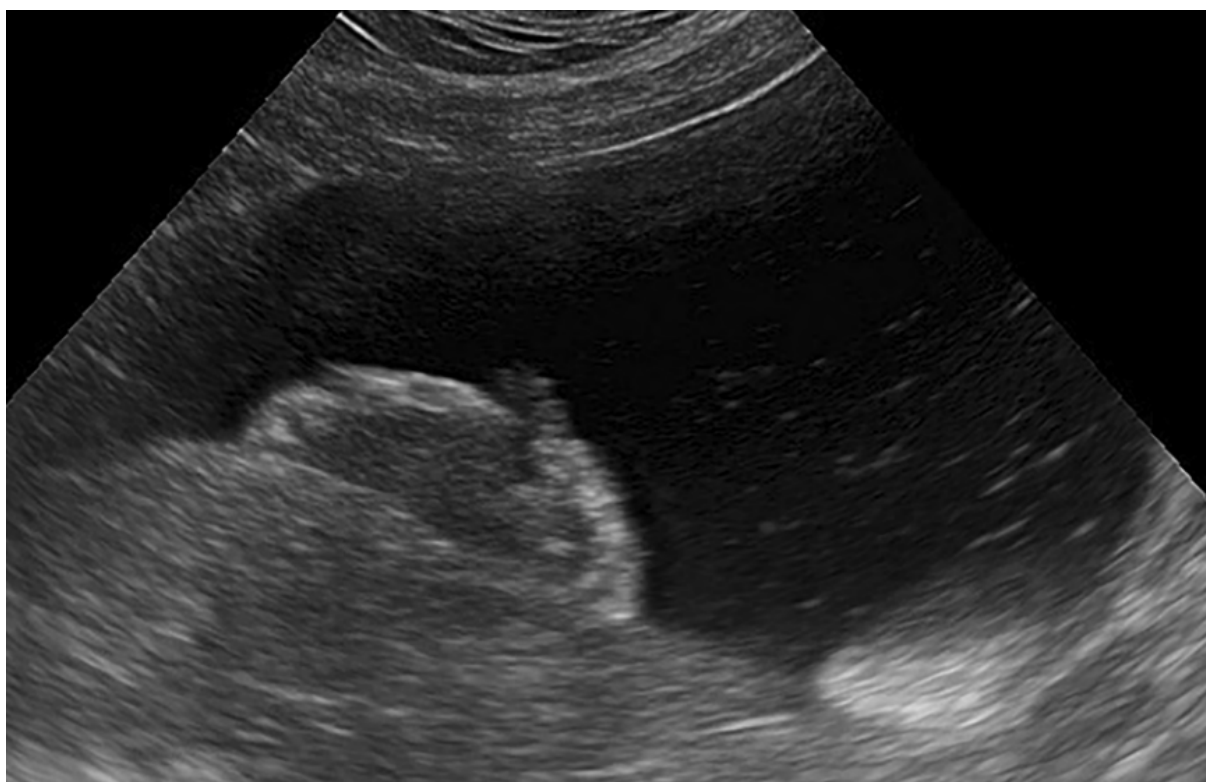


Aktualizace BRAF mutace a BRAF Comp. test



Obrázek 1: Ultrazvukový snímek karcinomu močového měchýře
Zdroj obrázku: Dr. G. Dinges, Kleintierpraxis Wachau

Uroteliální a prostatické karcinomy

U psů jsou uroteliální karcinomy (UCa) močového měchýře a močové trubice a prostatické karcinomy (PCa) vysoce maligní nádory, které jsou často diagnostikovány relativně pozdě (např. pomocí ultrazvuku, viz obr. 1) a mají špatnou prognózu. Diagnóza může být stanovena dříve testováním přítomnosti

mutace V595E v genu BRAF a to i z močového sedimentu.

Pokud není mutace BRAF nalezena, je možné zvýšit senzitivitu **novým** doplňkovým testem. Kombinaci obou testů označujeme jako **BRAF comp. test**. Oba testy jsou zde diskutovány.

Mutace BRAFV595E

Varianta BRAF V595E byla popsána v humánní medicíně a poprvé byla vyšetřována u několika nádorů psů v roce 2015 Mochizukim a kol. Na rozdíl od lidí, kde se mutace vyskytuje především u maligních melanomů, nádorů vaječníků, štítné žlázy a kolorektálních karcinomů, Mochizuki a kol. (2015) zjistili, že u psů se mutace nejčastěji vyskytuje u uroteliálních a prostatických karcinomů. Mutace BRAFV595E je somatická mutace na chromozomu 16, kterou lze detekovat pouze v nádorových buňkách. Tato mutace vede k rozvoji nádoru prostřednictvím trvalé aktivace dráhy MAP kinázy.

Indikace

Testování přítomnosti mutace BRAFV595E může být užitečné pro následující indikace:

- Screening pro včasné zjištění nádoru u predisponovaných plemen (viz níže)
- Analýza ze spontánní moči místo nutnosti invazivních odběrů (sediment).
- Vyhnutí se opakovaným invazivním odběrům v případech s nejasnými histologickými a cytologickými diagnózami (špatná kvalita vzorku, překrývající se obrazy zánětu a nádorového onemocnění).
- Cílená terapie (např. sorafenib; Chon et al. 2024) u vybraných BRAF-pozitivních případů.

Možné materiály vzorků

- Tkáň (např. biopsie fixované ve formalinu, minimálně 5 mm)
- Minimálně 2 cytologické preparáty (např. vzorek z FNA bohatý na

nádorové buňky, močový sediment)

- Moč (1 ml močového sedimentu, doporučení: spontánní ranní moč)

Jelikož je použita vysoce citlivá metoda digitální kapkové PCR (ddPCR), stačí pouze 2 nádorové buňky s mutací BRAFV595E pro potvrzení diagnózy karcinomu.



Obrázek 2: Jack Russell teriéři nesou mutaci BRAF u karcinomu močového měchýře s obzvlášť vysokou frekvencí.

Zdroj obrázku: PD Dr. H. Aupperle-Lellbach

Metodologická omezení

Analýzy rutinního materiálu pro diagnostiku mutace BRAFV595E za posledních 6 let ukázaly, že v přibližně **10 % vzorků** nebylo možné izolovat DNA. K tomu dochází zejména, když je zaslána necentrifugovaná moč místo sedimentu. DNA je přítomná v buňkách, a proto musí být ve vzorku přítomna dostatečně vysoká koncentrace epitelových buněk, aby bylo

možné izolovat dostatečné množství DNA. V zásadě je možné detekovat i DNA volnou v plazmě, ale není to možnost, na kterou by se mělo spoléhat při výběru materiálu.

Ve vzácných případech mohou být důvodem proč nelze izolovat DNA **inhibitory**, i když je přítomen dostatečný počet buněk.

Pro detekci mutace BRAFV595E není obvykle problém **bakteriální přerůstání** v moči.

Specifická a senzitivita

Specifická mutace BRAFV595E je 100 %, protože mutace BRAF nebyla detekována u žádného psa s cystitidou, polypy močového měchýře nebo podobnými stavy. To platí i pro karcinomy prostaty, protože mutace BRAFV595E nebyla nalezena u benigní hyperplazie prostaty, dlaždicové metaplasie nebo atrofie prostaty (Mochizuki et al. 2015a).

V závislosti na studii a plemeni psa se senzitivita detekce mutace BRAF u UCa pohybuje kolem 71 % a u PCa 61 %. Dokonce i časná fáze (dysplazie) UCa s mutací BRAF byly v jednom kazuistickém případě detekovatelné (Chamber et al. 2024).

Aktuální analýzy rutinního materiálu z LABOKLINu za posledních 6 let ukázaly, že podíl BRAF-pozitivních vzorků v zaslaném materiálu je výjimečně vysoký u některých plemen teriérů (viz obr. 2), šeltí a bíglů. Toto však nic neříká o senzitivě, protože nemáme k dispozici informace o tom, zda byl u negativních případů skutečně nádor. Tyto pozorování však naznačují, že mutace je ve vzorcích od těchto plemen pravidelně nalezena.

Interpretace výsledku

Pouze **pozitivní** výsledek je rozhodující pro karcinom. Pokud není v vzorku detekována mutace BRAF, jsou možné následující scénáře:

- Není přítomen UCa / PCa (např. polyp, benigní hyperplazie).
- V vzorku nejsou přítomny mutované buňky, ale karcinom je přítomen (pochybná reprezentativnost vzorku, např. buněk málo v cytologii/ moči).
- Mutace BRAFV595E není příčinou karcinomu.

Pomocť může nový test CNA (viz níže).

NOVÝ TEST: BRAF comp.

LABOKLIN přidal další molekulárně genetický test (CNA) pro diagnostiku karcinomů močového měchýře a vytvoření kompletního BRAF comp. panelu. Analýza CNA je založena na detekci změněného počtu specifických segmentů genů.

V zásadě mohou strukturální genetické změny vést ke ztrátě nebo násobení segmentů genů (změna počtu kopií, CNA). Obr. 3

Změna počtu kopií (CNA) u urotelialního karcinomu psa

Duplicitní segmenty na chromozomech 13 a 36 nebo delece na chromozomu 19 byly nalezeny u více než 75 % případů urotelialního karcinomu psa, přičemž u více než 93 % případů byly přítomny dvě nebo více těchto změn počtu kopií (Shapiro et al. 2015). Tyto změny nebyly přítomny ve vzorcích moči psů s infekcemi močových cest, cystitidou

nebo benigními polypy močového měchýře (Mochizuki et al. 2016).

Změna počtu kopií (CNA)



Obr. 3: Schematické znázornění možných genetických variací v počtu kopií.

Tyto genetické změny **nejsou** detekovatelné u karcinomů prostaty psů (viz obr. 4).

Kvantifikací těchto počtů kopií je nyní možné identifikovat urotelialní karcinomy, které nemají mutaci BRAFV595E. Kombinovaný test nabízí LABOKLIN jako **BRAF comp.** a odpovídá testu CADET® BRAF-PLUS v USA.

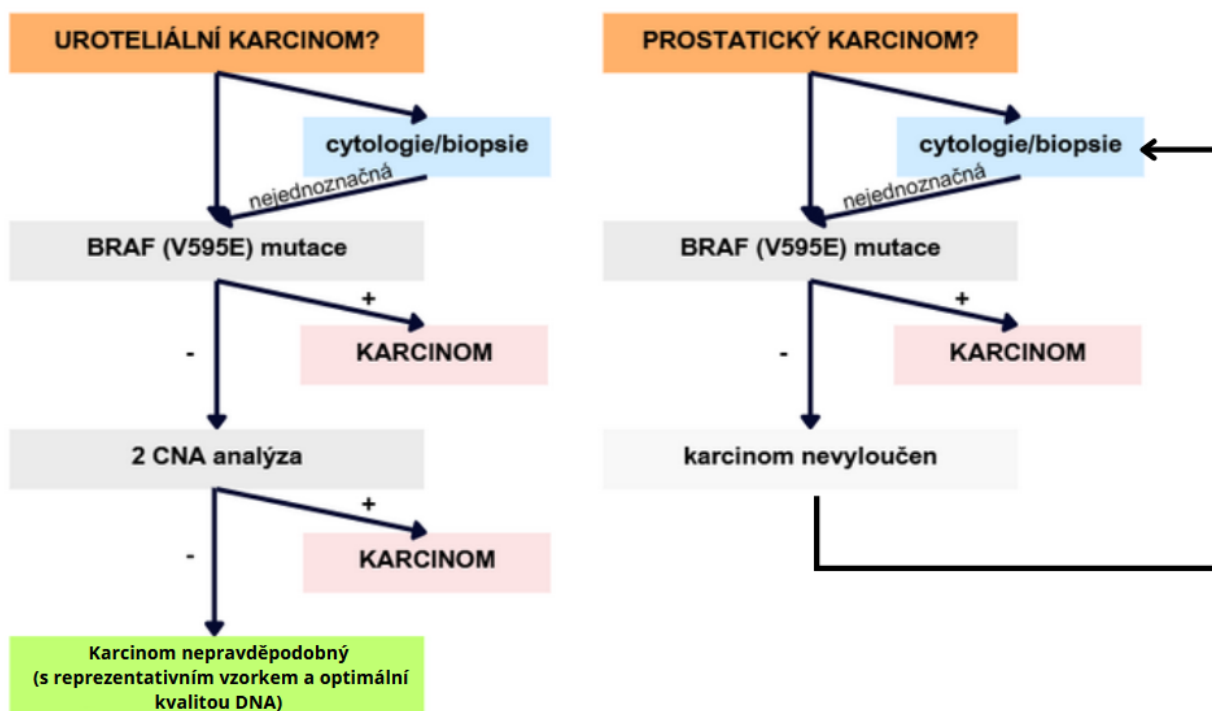
Změna počtu kopií není spojena s mutací BRAF. Přesto jde o nezávislý molekulárně genetický jev, který lze detekovat pouze v nádorových buňkách urotelialních

karcinomů psů. Molekulární důsledky na úrovni proteinu nebo v signálních kaskádách nebyly dosud prozkoumány. Zda a do jaké míry je možné pro psy s těmito CNA v karcinomu močového měchýře stanovit terapeutické nebo prognostické doporučení, je stále v oblasti výzkumu.

Metodologická omezení

V zásadě může být materiál již odeslaný pro analýzu mutace BRAF (viz výše) použit i pro analýzu CNA. **Ale:** Je vyžadována lepší kvalita DNA, protože se analyzují nejen bodové mutace BRAFV595E, ale také větší segmenty genů, které musí být k dispozici v dobré kvalitě. Existuje tedy riziko, že analýza CNA neposkytne použitelný výsledek, zejména pokud moč obsahuje málo buněk a/nebo je přítomno bakteriální přerůstání.

Doporučuje se tedy, aby nejprve byla provedena analýza mutace BRAFV595E a následná analýza CNA by měla být zvažována pouze v případě negativního výsledku (viz obr. 3). Jelikož výsledek



Obrázek 4: Diagnostický pracovní postup pro diagnostiku urotelialních a prostatických karcinomů.
Zdroj obrázku: PD Dr. H. Aupperle-Lellbach

molekulárně genetických testů je znám až po úplném dokončení analýzy, je celková cena vyúčtována, i když žádný použitelný výsledek získán nebyl ani po opakovaném testování.

Závěr

Testování na mutaci BRAF je vysoce specifická metoda (100 %) pro detekci urotelialních a prostatických karcinomů u psů. Nově zavedený test pro variace v počtu kopií specifických segmentů genů (CNA) zvýšil senzitivitu molekulárně genetické diagnostiky urotelialních karcinomů.

Vyšetření k tématu	
8675	BRAF-Mutation (V595E)
518	BRAF comp. (V595E + 2 CNA)
Pokud je BRAF negativní, vyžádejte si CNA přímo z laboratoře.	

**PD Dr. Heike Aupperle-Lellbach,
Alexandra Kehl**

Reference

Aupperle-Lellbach H, Grassinger J, Hohloch C et al. Diagnostische Aussagekraft der BRAF-Mutation V595E in Urinproben, Ausstrichen und Biopstaten 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.