

NorPREM



Nasjonalt kompetansenettverk for persontilpasset medisin

Veileder for preanalytiske forhold ved ctDNA-analyser

Prosjektleder: Anne Pernille H. Dyrbekk, Sykehuset i Vestfold

Prosjektperiode: Mars 2023 - September 2024

Innhold

Bakgrunn	2
Hva er ctDNA?	2
Hvordan kan ctDNA bli brukt i kreftdiagnostikk?	3
Hvorfor er preanalyse viktig?	4
Prøvetakning	5
Pasientforberedelse, forhold som kan påvirke analysesvaret	5
Blodprøvetakning	5
Prøverør	5
Sentrifugering	8
Forsendelse	11
Ekstraksjon	11
Medlemmer plasmagruppen i NorPreM	14
Referanser	15

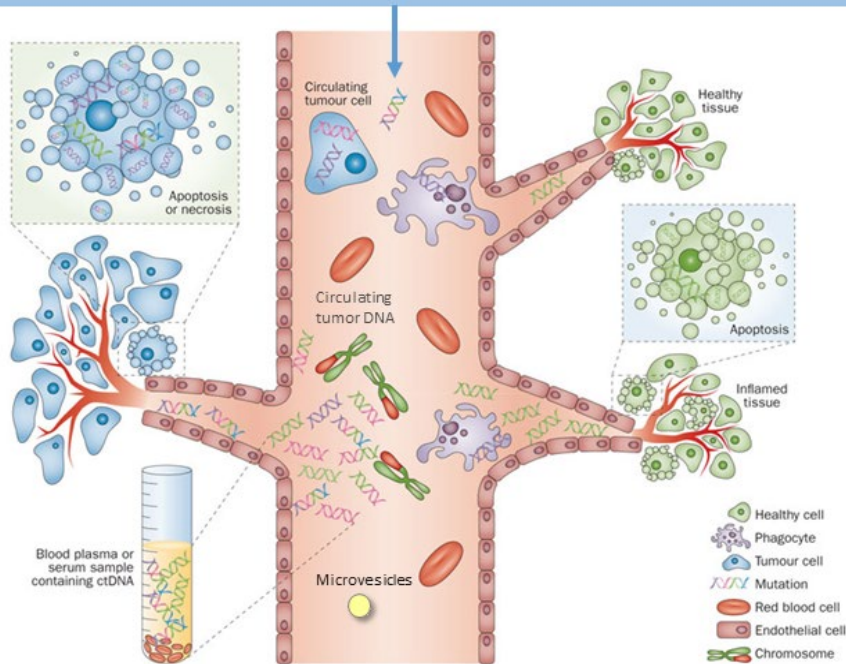
Bakgrunn

Prosjektet «Kompetanseoverføring og standardisering av analyser på ctDNA» utgår fra Nasjonalt kompetansenettverk for persontilpasset medisin (NorPreM) og har som delmål å lage denne veilederen for preanalyse ved analyser av sirkulerende tumor-DNA (ctDNA). Standardisering og optimalisering av preanalytiske forhold er spesielt viktig ved analyser av ctDNA, og en veileder vil være nyttig både for forskningsprosjekter, og dersom analysen blir en del av rutinediagnostikk av kreft. Veilederen vil fokusere på ctDNA, men mange av prinsippene vil være det samme for sirkulerende tumor-RNA (ctRNA), eksosomer, m.m. Kunnskapsgrunnlaget for veilederen er basert på praktisk erfaring fra forskningsprosjekter i Norge, internasjonale veiledere og sentral litteratur. Målet med veilederen er å samle erfaringsbasert kunnskap for å harmonisere preanalytiske betingelser og få et godt utgangspunkt for videre analyser.

Hva er ctDNA?

I plasma og andre væsker kan man finne fritt sirkulerende DNA, såkalt cellefritt DNA (cfDNA) fra celler. Deler av det cellefrie DNAet kommer fra tumorceller og blir kalt fritt sirkulerende tumor-DNA (ctDNA). Opprinnelsen til ctDNA er i hovedsak nekrotiske/apoptotiske tumorceller, men ctDNA kan også skilles ut i ekstracellulære vesikler fra levende tumorceller, sekresjon fra makrofager som har spist tumorceller og fra sirkulerende tumorceller i blodbanen (1-3), Figur 1. Mengden ctDNA i plasma er avhengig av mange forhold, blant annet kreftform. Hjernesvulster skiller ut lite ctDNA til blodsirkulasjonen, mens nevroendokrine svulster, brystkreft og svulster fra gastrointestinal traktus er blant kreftformene som skiller ut mest ctDNA(4). Tumorbyrden er også viktig, og ved metastatisk sykdom er ctDNA oftere påvisbart enn tidligere i sykdomsforløpet (4;5). Lokaliseringen av metastasen kan også ha betydning for mengde ctDNA som kan påvises i plasma, der levermetastaser oftere gir funn av ctDNA mens det ved lungemetastaser kan være vanskeligere å påvise. Halveringstiden til ctDNA er kort, fra minutter til et par timer ettersom det fjernes effektivt fra sirkulasjonen hovedsakelig via lever, til dels milt og nyrer(6).

Sirkulerende tumor DNA = celfritt DNA med tumorspesifikk mutasjon



Crowly et al, 2013

Figur 1. Modifisert bilde fra Crowley et al.(7). ctDNA kan komme fra døde tumorceller, ekstracellulære mikrovesikler og fritt sirkulerende tumorceller. Det frigjøres også DNA fra andre celler i kroppen, og da spesielt de hematopoietiske cellene.

Hvordan kan ctDNA bli brukt i kreftdiagnostikk?

Ved flere krefttyper er det nødvendig å undersøke tumorvevet med tanke på kreftspesifikke genendringer som kan få betydning for behandling og prognose. Det er dog ikke alltid tilstrekkelig tumorvev til stede i biopsi/cytologisk materiale for disse tilleggssanlysene, og da kan ctDNA-påvisning være nyttig. Analyser av ctDNA blir i økende grad aktuelle for å gi bedre persontilpasset kreftbehandling, og vil få større plass i kreftoppfølging framover.

Det foreligger ingen nasjonale retningslinjer for bruk av ctDNA, men ctDNA er nevnt iblant annet i Det norske handlingsprogrammet for lungekreft 2023 (8). Internasjonalt har bl.a. European Society for Medical Oncology (ESMO) laget en generell retningslinje for ctDNA og en spesifikk for lungekreft. Analyse av ctDNA er i disse retningslinjene anbefalt når det ikke er tilgjengelig eller tilstrekkelig materiale fra vev, eller der det haster å få informasjon om genendringer (9;10).

I tillegg til å være et substitutt ved for lite tumorinnhold i biopsi/cytologi, har også ctDNA-analyser vist seg nyttig til å påvise minimal restsykdom (MRD) etter kurativ behandling, måle behandlingsrespons og oppdage tilbakefall tidligere enn med billediagnostiske metoder. Med sensitive metoder kan mutasjoner påvises selv ved svært lite ctDNA til stede. For noen kliniske problemstillinger vil det være tilstrekkelig å undersøke for enkelte spesifikke avvik ved kvantitativ polymerase kjedereaksjon (PCR), mens andre trenger bred analyse med sekvensering (neste generasjons sekvensering/high-throughput

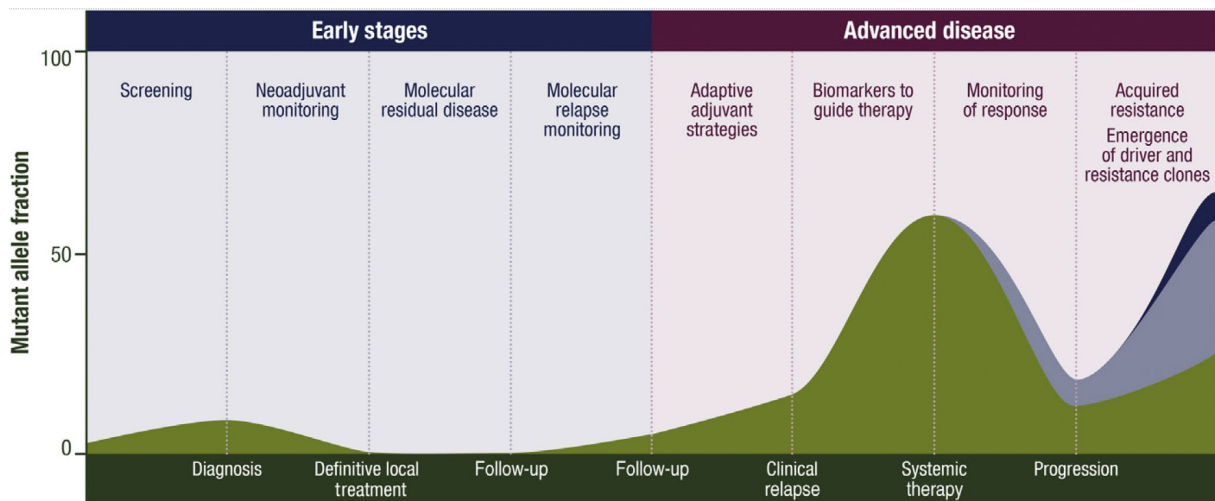
sekvensering). Evidensgrunnlaget for klinisk nytte ved ulike indikasjoner og kliniske problemstillinger er varierende og i stor grad basert på retrospektive studier (11). Det er et økende antall prospektive studier der ctDNA-resultatet inngår i beslutningsgrunnlaget for behandling, men for de fleste indikasjoner vil det ta noe tid før vi har tilstrekkelig grunnlag for å konkludere om nytteverdi.

I Norge er analyse på ctDNA fra plasma tilgjengelig i IMPRESS-studien, samt i rutinenære prosjekter ved noen få sykehus. Potensielt er dette et fagområde hvor behovet kan øke kraftig.

Hvorfor er preanalyse viktig?

De fleste analysene som blir utført på ctDNA er PCR-baserte og er dermed svært sensitive for forurensning. Cellefritt DNA i plasma består hovedsakelig av DNA fra hematopoietiske celler, og selv ved langtkommen kreftsykdom utgjør ctDNA kun en liten andel. Mengden cfDNA øker f.eks etter kirurgi, intensiv trening, infeksjoner, kirurgi og tumorrettet behandling. En slik økning i cfDNA fra andre celler enn tumorceller vil føre til at andelen ctDNA blir enda mindre, og dermed gi redusert mulighet for påvisning av ctDNA (5). Riktig valg av tidspunkt for prøvetakning er derfor viktig. I tillegg må man ved selve prøvehåndteringen ta forhåndsregler for å hindre forurensning av DNA fra leukocytter.

Det kan også oppstå mutasjoner i hematopoetiske stamceller, såkalt klonal hematopoiesis med usikkert potensial (clonal hematopoiesis of indeterminate potential= CHIP). DNA fra disse vil også være en del av cfDNA. Ved påvist mutasjon i ctDNA som er assosiert med CHIP, vil funn av tilsvarende mutasjon i buffycoaten bekrefte dette.



Figur 2. Fra Pascual et al.(9) Variasjon i mutert allelfraksjon i løpet av et behandlingsforløp.

Prøvetakning

Pasientforberedelse, forhold som kan påvirke analysesvaret

Som nevnt er det mange faktorer som kan påvirke forholdet mellom ctDNA og cfDNA; Infeksjoner, tumorrettet behandling, pågående infusjoner, blodtransfusjoner, fysisk aktivitet og kroppstilling øker mengden cfDNA generelt. Kjemoterapi, målrettet terapi, immunterapi og stråling kan alle påvirke mengden ctDNA og forholdet mellom ctDNA og cfDNA. Toksisk behandling vil særlig øke mengden cfDNA, og dette kan påvirke sensitiviteten negativt både for påvisning av minimalrestsykdom og påvisning av behandlingsrelevante biomarkører. Anbefalt prøvetakingstidspunkt vil også avhenge av aktuell klinisk problemstilling. Ettersom kirurgi øker mengde av cfDNA, er det anbefalt at det går 2-4 uker etter kirurgi før prøve til ctDNA blir tatt(9;12). Ved graviditet er også cfDNA høyere enn normalt.

Blodprøvetakning

Tidsrammen for prøvetaking er avhengig av type prøverør og om prøven skal sendes. Ved prøvetaking må det tas hensyn til at prøven må prosesseres raskt på lab dersom EDTA-rør benyttes, og god dialog med personell/avdeling som prosesserer prøven er derfor anbefalt.

Generelt bør pasienten sitte i ro i 10-15 min. før prøvetakning. Da det er spesielt viktig å unngå hemolyse ved prøvetakning til ctDNA, skal pasienten ikke pumpe hånden for tydeligere vener, og bruk av stase bør begrenses (under 1 minutt). Butterfly med grønn kanyle (21 G) anbefales ved spesialrør for å unngå backflow av kjemikalier. Prøverørene må fylles helt opp. Vend rørene forsiktig i henhold til type prøverør, se Tabell 1. Prøverør settes vertikalt etter blanding og oppbevares ved anbefalt temperatur. Merk av på rekvisisjonen dersom det er problemer rundt prøvetakning. For øvrig gjelder også vanlige rutiner for blodprøvetaking inkludert prøvetakning ved pågående intravenøs behandling og rekkefølge av ulike prøvetakningsrør (13).

Prøverør

EDTA-rør er foretrukket hvis rørene kan prosesseres raskt (helst innen 1-2 timer, maks 4 timer). Dersom rask prosessering ikke er mulig, benyttes spesialrør. Slike spesialrør bør også prosesseres så raskt som mulig. Generelt sett er glassrør antatt bedre enn plastrør. Spesialrør inneholder kjemikalier som stabiliserer cellemembranen i leukocytene slik at leukocyt-DNAet ikke lekker ut av cellen og forhindrer påvisning av ctDNA. Innholdet i spesialrørene kan derimot påvirke nedstrømsanalyser, inkludert både ekstraksjon og påfølgende ctDNA-analyse (9). Ved valg av prøverør må man derfor sjekke kompatibilitet mot metode for ekstraksjon og ctDNA-analyse. Ofte vil leverandører av nedstrømsanalyser gi anbefalinger. Streck-rør blir mye brukt i ulike studier, men kjemikalier i disse rørene vil også kunne interferere med reagenser ved nedstrømsanalyser. Heparin- og citratrør anbefales ikke (14). Ulike rør er designet for å ta vare på ulike typer nukleinsyrer, og nye rør kommer stadig på markedet. Se Tabell 1 for spesifikasjoner for et utvalg spesialrør tilgjengelig per november 2023.

Mengde blodvolum som tappes må være tilpasset ctDNA-metoden som skal benyttes, ofte er det tilstrekkelig med ett eller to 9ml EDTA-rør. Rørene bør holdes mest mulig i ro og ikke utsettes for store temperaturforskjeller, vær obs på at det kan være forskjell mellom spesialrørene.

Rør	Formål	Godkjenninger	Rekkefølge prøvetakning	Spesifikasjon prøvetakning	Reagent	Volum	Stabilitet	Sentrifugering	Temperatur sentrifugering	Kompatibilitet
<i>BD Vacutainer® K₂ EDTA Tube / VACUETTE® Tube</i>	Rens av cfDNA, cfrRNA og mikrovesikler er mulig*. Ingen stabilisering av nukleinsyrer.	Ikke FDA-godkjent for analyse av cellefrie nukleinsyrer.	Sist av andre diagnostiske rør, før spesialrør.	Størrelse på nål er ikke spesifisert Rør vendes 5-10 x 180 grader etter prøvetakning	K ₂ EDTA / K ₃ EDTA Rør er dekket med stabiliserende agent.	2, 3, 4, 6, 10 mL, plastrør	Preserverer erytrocytter, leukocytter og trombocytter opptil 24 timer.	Ikke spesifisert av produsent#	Ikke spesifisert av produsent#	Ikke spesifisert av produsent
<i>STRECK Cell-Free DNA BCT® Tubes</i>	Stabilisering av cfDNA	FDA-godkjent for analyse av cellefrie nukleinsyrer. Godkjent for diagnostisk bruk <i>in vitro</i> .	Etter EDTA-rør, før fluorid oxalat-rør. Dersom tatt direkte etter heparin-rør anbefales det å ta et waste-EDTA-rør før BCT-røret.	21-22G nål er anbefalt Rør vendes 10 x 180 grader etter prøvetakning	K ₃ EDTA og konserveringsmiddel for celler (ikke spesifisert) [§] .	10 mL, glassrør	cfDNA: 7 dager ved 18°C-25°C.	Swing bucket sentrifuge. 10 min ved 1600 G etterfulgt av 10 min ved 3220G.	10°C	NGS (validert for Guardant360® CDx assay)
<i>STRECK Cell-Free DNA BCT® Tubes RUO/CE</i>	Stabilisering av cfDNA og CTC	FDA-godkjent for analyse av cellefrie nukleinsyrer. Stabilitets-spesifikasjoner er ikke FDA-godkjent. Ikke godkjent for diagnostisk bruk.	Etter EDTA-rør, før fluorid oxalat-rør. Dersom tatt direkte etter heparin-rør anbefales det å ta et waste-EDTA-rør før BCT-røret.	21-22G nål er anbefalt Rør vendes 10 x 180 grader etter prøvetakning	K ₃ EDTA og konserveringsmiddel for celler (ikke spesifisert) [§] .	10 mL, glassrør	cfDNA: 14 dager ved 6°C-37°C. CTC: 7 dager ved 15°C-30°C (ikke FDA-evaluert).	Swing bucket sentrifuge. Protokoll 1: 20 min ved 300G etterfulgt av 10 min ved 5000G Protokoll 2 (maks utbytte): 10 min ved 1600G etterfulgt av 10 min ved 16000G.	RT	Ikke spesifisert av produsent
<i>STRECK Nucleic Acid BCT™</i>	Stabilisering av cfDNA, cfrRNA og ekstracellulære vesikler	Ikke godkjent av FDA for analyse av cellefrie nukleinsyrer. Ikke godkjent for diagnostisk bruk.	Etter EDTA-rør, før fluorid oxalat-rør. Dersom tatt direkte etter heparin-rør anbefales det å ta et waste-EDTA-rør før BCT-røret.	21-22G nål er anbefalt Rør vendes 10 x 180 grader etter prøvetakning	Antikoagulant (ikke spesifisert) samt konserveringsmiddel (ikke spesifisert) [§] .	5 mL, glassrør	cfDNA/cfrRNA/vesikler: 7 dager ved 18°C-25°C.	Swing bucket sentrifuge. 15 min ved 1800G etterfulgt av 15 min 2800G.	RT	Ikke spesifisert av produsent

STRECK RNA Complete BCT® (også CE-alternativ)	Stabilisering av cfRNA og ekstracellulære vesikler	Ikke godkjent av FDA for analyse av cellefrie nukleinsyrer. Ikke godkjent for diagnostisk bruk.	Etter EDTA-rør, før fluorid oxalat-rør. Dersom tatt direkte etter heparin-rør anbefales det å ta et waste-EDTA-rør før BCT-røret.	21-22G nål er anbefalt Rør vendes 10 x 180 grader etter prøvetakning	Antikoagulant samt konserveringsmiddel (ikke spesifisert) [§] .	10 mL, glassrør	cfRNA/vesikler: 7 dager ved romtemperatur.	Swing bucket sentrifuge. 15 min ved 1800G etterfulgt av 15 min ved 2800G.	RT	ddPCR og NGS
PreAnalytiX PAXgene® Blood ccfDNA Tube (CE-IVD)	Stabilisering av cfDNA	Ikke godkjent av FDA for analyse av cellefrie nukleinsyrer. Ikke godkjent for diagnostisk bruk.	Etter heparin-rør, EDTA-rør og fluorid oxalat-rør.	Størrelse på nål er ikke spesifiser Rør vendes 8 x 180 grader etter prøvetakning	Antikoagulant samt konserveringsmiddel (ikke spesifisert). 1.5 mL stabiliserende agent.	10 mL, plastrør	cfDNA: 10 dager ved opptil 25°C. 7 dager ved 25°C-30°C. 3 dager ved 30°C-37°C.	Swing bucket sentrifuge. 15 min ved 1600-3000G etterfulgt av 10 min ved 1600-3000G.	RT	PCR (ddPCR, multiplex og q-RT), SNP genotyping, farmakogeno miske analyser, NGS
NORGEN cf-DNA/cf-RNA Preservative Tubes Dx (CE-IVD)	Stabilisering av cfDNA og cfRNA	Ikke godkjent av FDA for analyse av cellefrie nukleinsyrer. For <i>in vitro</i> diagnostisk bruk.	Ikke spesifisert	Størrelse på nål er ikke spesifisert Rør vendes 5-10 x 180 grader etter prøvetakning Ytterligere agitering før plasmaseparasjon kan gi hemolyse	Antikoagulant samt konserveringsmiddel (ikke spesifisert). Formaldehyd-fritt. 1.6 mL stabiliserende agent. Må etterfylles med 1xPBS (pH 7.4) før plasmarens dersom rør ikke er fullt med blod.	10 mL, plastrør	ccfDNA: 30 dager ved 15°C-25°C. 8 dager ved 25°C-37°C. ccfRNA: 30 dager ved 15°C-25°C. CTC: 14 dager ved 15°C-25°C.	Sentrifuge ikke spesifisert av produsent. 20 minutt ved 425G.	RT	Ikke spesifisert av produsent
Roche Cell-Free DNA Collection Tube (RUO/CE-IVD)	Stabilisering av cfDNA	Ikke godkjent av FDA for analyse av cellefrie nukleinsyrer. Ikke godkjent for diagnostisk bruk.	Ikke spesifisert	Størrelse på nål er ikke spesifisert Håndtering etter prøvetakning er ikke spesifisert	K ₃ EDTA og konserveringsmiddel for celler (ikke spesifisert). 1.5 mL stabiliserende agent.	10 mL, plastrør	cfDNA: 30 dager ved 15°C-25°C. 8 dager ved 25°C-37°C.	Ikke spesifisert av produsent	Ikke spesifisert av produsent	Ikke spesifisert av produsent

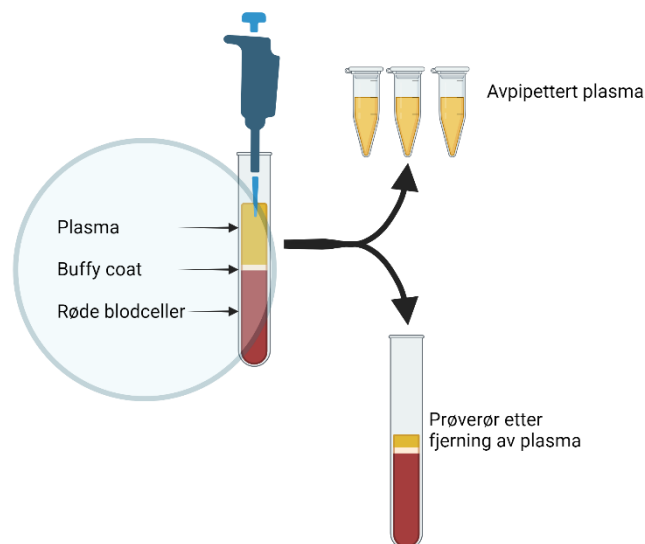
Tabell 1. Oversikt ulike prøverør per november 2023. Alle rør må transporteres i romtemperatur. Ingen rør kan fryses.

*Fordrer rask prosessering (innen 1-2 timer, maksimum 4 timer) for å hindre degradering av sirkulerende nukleinsyrer. #To sentrifugeringssteg er anbefalt, se kapittel «Sentrifugering». §Volum for stabiliserende agent er ikke spesifisert av produsent. RT = romtemperatur

Sentrifugering

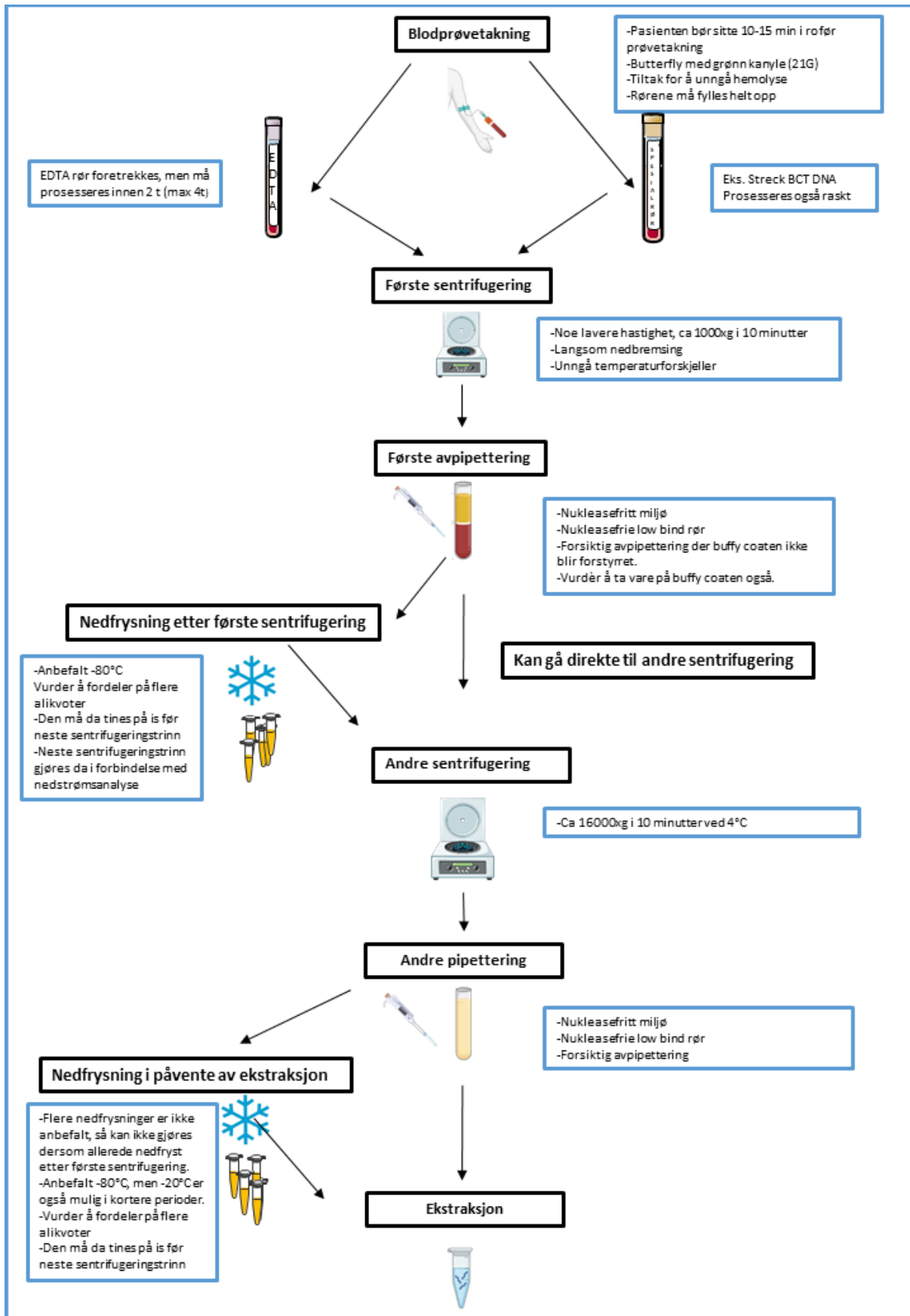
For å sørge for minst mulig kontaminering av ctDNA og unngå reduksjon av analysesensitivitet, er to runder med sentrifugering anbefalt (Figur 4). Det er mulig å fryse ned plasmaet etter første sentrifugering ved -80°C .

- Første sentrifugering av prøverøret utføres med noe lavere hastighet (ca 1000xg) i 10 minutter, avhengig av type rør. Langsom bremsing over 45 sekunder anbefales. Dersom prøverørene er ved romtemperatur kan sentrifugeringen gjøres i romtemperatur for å unngå temperaturforskjeller. Dersom rørene kommer fra kjøleskap anbefales sentrifugering ved 4°C (EDTA-rør).
- Det viktigste med det første sentrifugeringstrinnet er å få fjernet de hvite blodcellene før de lyserer, og 1000xg er tilstrekkelig for dette. I litteraturen er det stor variasjon i anbefalinger av antall g for første sentrifugering, og vi vil bemerke at ISO 20186-3:2019 anbefaler 1600xg-2500xg(15).
- Avpipettering gjøres i et nukleasefritt miljø. Det kan være hensiktsmessig å gjøre prøvehåndteringen i «steril»-bank med «laminar air flow». UV-lys kan benyttes for dekontaminering etter bruk. Overflater og pipetter vaskes med spesialrengjøring f.eks. PCR-clean. Bruk pipettespisser med filter (godkjent for PCR) og nukleasefrie "lowbind" rør i prosessen.
- Avpipetteringen av plasma må gjøres forsiktig. Det skal være litt plasma (ca 0,5cm) igjen etter avpipettering for å unngå buffycoaten som inneholder hvite blodceller. (Se Figur 3).
- Buffycoaten kan avpipetteres til sist dersom det er aktuelt å undersøke for klonal hematopoiese, eller definere arvelige varianter i kimbane-DNA fra leukocyttter



Figur 3. Avpipettering av plasma etter første sentrifugeringstrinn. Det skal være litt plasma (ca 0,5cm) igjen etter avpipettering for å unngå buffycoaten.

- Dersom plasmaet skal fryses ned etter dette steget, er det anbefalt nedfrysning til -80°C . Plasma tines på is/kjøleblokk før andre sentrifugeringstrinn. Andre sentrifugeringstrinn gjøres i forbindelse med nedstrømsanalyse.
- Ved andre sentrifugeringstrinn er det anbefalt høyhastighets-sentrifugering, gjerne $16000\times g$ i 10 minutter ved 4°C (14). For enkelte spesialrør anbefales egne sentrifugeringsprotokoll. Avpipettering utføres uten å forstyrre pellet.
- Dersom første og andre sentrifugering gjøres samtidig, fryses plasmaet ned til -80°C med mindre nedstrømsanalysen skal utføres samme dag.
- Gjentatte tining og frysing bør unngås, fordeling på flere alikvoter bør derfor vurderes.



Figur 4. Prosedyre for ctDNA - fra blodprøvetakning til ekstraksjon.

Forsendelse

Forsendelse fra annet sykehus: Sjekk leverandørens anbefaling ved sending av spesialrør. Spesialrør kan for eksempel ikke fryses, og skal heller ikke kjøles (Tabell 1). Ettersom transportselskaper ikke kan garantere for frostfritt miljø, bør prøver sendes i isoporboks. Dersom første sentrifugering er gjort og man skal sende en frossen prøve, må man forsikre seg om at transportselskap godkjenner tørris.

Forsendelse innad i sykehus (EDTA-rør): Minst mulig bevegelse av glassene. Rørpost er ikke egnet. Prøven må tas tidlig på dagen, slik at videre prosessering er mulig å gjennomføre innenfor samme arbeidsdag. God kommunikasjon med lab som skal håndtere prøvene er nødvendig.

Ekstraksjon

Ekstraksjonsmetode inngår ikke i denne veilederen, men vi gir her noen generelle betraktninger, og har også laget en tabell over en del av metodene og maskinene som er tilgjengelig på markedet. Valg av ekstraksjonsmetode er avhengig av type prøverør, hva man skal ekstrahere (ctDNA, ctRNA, ctmiRNA, mikrovæsikler) og hvilke nedstrømsanalyse som skal utføres. ctDNA er korte fragmenter (≈ 166 bp (100-200bp)) og finnes i lave konsentrasjoner i plasma(16;17). Dette krever strenge kriterier for valg av ekstraksjonsmetode. Metoden må kunne ekstrahere DNA med høy renhet og kvalitet som er egnet til nedstrømsanalyser som PCR-baserte metoder og NGS. Metoder som oftest benyttes er basert på bruk av kolonner (silicamembran) eller paramagnetiske kuler. Det finnes utallige varianter av både automatiserte og manuelle teknikker. Metoden kan med fordel være automatisert for å minimalisere variasjon. Med dagens kunnskap er det dog bruk av manuelle, kolonnebaserte ekstraksjonsmetoder som har oppnådd best utbytte og kvalitet, men risiko for krysskontaminering kan være større for kolonnebasert metode enn kulebasert. Hver lab bør utføre en validering/verifisering av ekstraksjonsmetode før oppstart(18).

Leverandør	Navn på kit/instrument	Utbytte	Metode	Automatisert/manuell	Antall per run	Input volum	Output volum	Tidsbruk	Prøve-type	Kommentar	Referanse
Qiagen	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	DNA og RNA	Spinnkolonne, vakuum	Manuell, eller automatisert på QIAcube Connect	≥24	Opptil 5ml	20-150µl	<120min	Plasma, serum, urin	Vakuummotoden kan være utfordrende i praksis	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit ccfDNA/RNA QIAGEN
Qiagen	QIAamp MinElute ccfDNA Kits	DNA	Paramagnetiske kuler	Kan delvis automatiseres på QIAcube Connect	1-50	1-10ml	20 µl	60min	Serum, plasma		QIAamp MinElute ccfDNA Kits (qiagen.com)
Qiagen	QIAamp ccfDNA/RNA Kit	DNA og RNA	Spinnkolonne, proteinfelling	Manuell	1-50	1-4ml	14 µl	2,5 time	Plasma	Kan ha utfordringer med proteinfelling	QIAamp ccfDNA/RNA Kit (qiagen.com)
Qiagen	QIASymphony DSP Circulating DNA Kit	DNA	Paramagnetiske kuler	Automatisert på QIASymphony	1-96	2-4ml	60µl	Ikke spesifisert	Plasma, urin	Lavere utbytte enn manuell ekstraksjon	QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (qiagen.com)
Qiagen	EZ2 Connect EZ1&2 ccfDNA Kit	DNA	Paramagnetiske kuler	Automatisert	14 eller 24	1-8 ml	75 µl	35-70 min.	Plasma, serum		EZ1&2 ccfDNA Kit (qiagen.com)
ThermoFisher Scientific	Genexus Purification System. Genexus Cell-Free Total Nucleic Acid Purification Kit	TNA	Paramagnetiske kuler	Automatisert	6x4	Inntil 8ml	Ikke spesifisert	Ikke spesifisert	Plasma		Genexus™ Cell-Free Total Nucleic Acid Purification Kit (thermofisher.com)
ThermoFisher Scientific	MagMAX Cell-Free DNA Isolation Kit.	DNA	Paramagnetiske kuler	Manuell (kan automatiseres på KingFisher)	6-24	100 µL to 10 mL	15 µL to 50 µL	40min til 2 timer avh. om automatise rt metode	Serum og plasma		MagMAX™ Cell-Free DNA Isolation Kit (thermofisher.com)
ThermoFisher Scientific	MagMAX Cell-Free Total Nucleic Acid Isolation Kit	TNA	Paramagnetiske kuler	Manuell eller automatisert på KingFisher	25 for 4ml prøvevolum	1-6ml	15-60µl	1,5 til 2 timer avh. om automatise rt metode	Plasma		MagMAX™ Cell-Free Total Nucleic Acid Isolation Kit (thermofisher.com)
Promega/Nerliens Meszansky	Maxwell RSC ccfDNA Plasma Kit	DNA	Paramagnetiske kuler	Automatisert	16	0,2 – 8 ml	50-60 µl	90-120 min.	Plasma		Maxwell® RSC ccfDNA Plasma Kit Protocol (promega.com)

NorGen	Norgen Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Midi Kit /Max kit	DNA	Spinnkolonne	Manuell	50 50	1-4ml 5-10ml	25-50µl 25-50µl	15-20 min for 10 prøver	Plasma, urin		https://norgenbiotek.com/product/plasmaserum-cell-free-circulating-dna-purification-kits
Roche	MagNA Pure 24 and 96 Systems med MagNA Pure cfNA Buffer Set	DNA	Paramagnetiske kuler	Automatisert	24	0,2-4ml avhengig av kit	50-100µl	30min	Plasma		https://lifescience.roche.com/global/en/products/others/magna-pure-cfna-buffer-set-382227.html
Roche	AVENIO ctDNA Analysis Kits V2	DNA	Spinnkolonne	Manuell	16	2-5ml	65µl	Ca 4t.	Plasma	Selges kun som del av NGS-kit	AVENIO ctDNA Analysis Kits Reagent Workflow User Guide (roche.com)
Zymo	Quick-cfDNA/cfRNA Serum and Plasma kit	DNA og RNA	Spinnkolonne	Manuell	50	Opp til 3ml	6-15µl	Ca 2,5timer	Plasma		Quick-cfDNA/cfRNA Serum and Plasma Kit VWR
Zymo	Quick-cfDNA Serum and Plasma kit	DNA	Spinnkolonne	Manuell	50	Opp til 10ml	≥35µl	Ca 2,5timer	Serum, plasma, CSF		Quick-cfDNA™ Serum and Plasma Kit, Zymo Research VWR
Beckman Coulter Life Science	Apostle MiniMax™ High Efficiency Isolation Kits	DNA	Paramagnetiske kuler	Automatisert/ manuell	10-50	0,2-5ml	20-100µl	Ca 2 timer	Plasma, serum, og urin		Comparative analysis of cell-free DNA extraction efficiency from plasma (beckman.com)

Tabell 2. Oversikt ulike ekstraksjonsmetoder og kit. TNA: fritt sirkulerende nukleinsyre.

Medlemmer plasmagruppen i NorPreM

Rolle	Navn	Organisasjon
Skrivegruppen	Rakel Brendsdal Forthun	Haukeland universitetssykehus
Skrivegruppen	Ragnhild Nome	Oslo universitetssykehus
Skrivegruppen	Marianne Odnakk Ludahl	Sykehuset i Vestfold
Prosjektleder/Skrivegruppen	Anne Pernille Harlem Dyrbekk	Sykehuset i Vestfold
Medlem	Almaz Nigatu Tesfahun	Stavanger universitetssykehus
Medlem	Anna Veronica Reber Norén	Sykehuset Østfold
Medlem	Catherine Kjølberg Halvorsen	Sykehuset Østfold
Medlem	Hong Yan Dai	St. Olavs Hospital
Medlem	Emilius Adrianus Maria Janssen	Stavanger universitetssykehus
Medlem	Eva Smedsrud	Oslo Universitetssykehus
Medlem	Gro Gundersen	Akershus universitetssykehus
Medlem	Heidemarie Svendsen	Vestre Viken
Medlem	Jon Andreas Lorentzen	Stavanger universitetssykehus
Medlem	Kristin Åberg	Universitetssykehuset Nord-Norge
Medlem	Emilius Adrianus Maria Janssen	Stavanger universitetssykehus
Medlem	Jon Andreas Lorentzen	Stavanger universitetssykehus
Medlem	Lilach Kleinberg	Oslo Universitetssykehus
Medlem	Linda Strand	Sykehuset Telemark
Medlem	Mahsa Fakhraee	Sørlandet sykehus
Medlem	Randi Hovland	Haukeland universitetssykehus
Medlem	Tonje Bøyum Riste	Helse Førde
Medlem	Sarah Ariansen	Oslo Universitetssykehus
Medlem	Silje Mathiassen	Akershus Universitetssykehus
Medlem	Sissel Gyrid Freim Wahl	St. Olavs hospital
Medlem	Tonje Bøyum Riste	Helse Førde
Medlem	Urša Maierhofer	Vestre Viken
Medlem	Vahid Bemanian	Akershus Universitetssykehus

Referanser

1. Cheng F, Su L, Qian C. Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. *Oncotarget*. 2016;7(30):48832-41. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27223063>
2. Tivey A, Church M, Rothwell D, Dive C, Cook N. Circulating tumour DNA - looking beyond the blood. *Nat Rev Clin Oncol*. 2022;19(9):600-12. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35915225>
3. Tkach M, Thalmensi J, Timperi E, Gueguen P, Nevo N, Grisard E, et al. Extracellular vesicles from triple negative breast cancer promote pro-inflammatory macrophages associated with better clinical outcome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022;119(17):e2107394119. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35439048>
4. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*. 2014;6(224):224ra24. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24553385>
5. Huang RSP, Xiao J, Pavlick DC, Guo C, Yang L, Jin DX, et al. Circulating Cell-Free DNA Yield and Circulating-Tumor DNA Quantity from Liquid Biopsies of 12 139 Cancer Patients. *Clin Chem*. 2021;67(11):1554-66. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34626187>
6. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*. 2008;14(9):985-90. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18670422>
7. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013;10(8):472-84. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23836314>
8. HelseDirektoratet. Nasjonalt handlingsprogram med retningslinjer for diagnostikk, behandling og oppfølging av lungekreft, mesoteliom og thymom. 2021. [hentet 29.12.2022]. Tilgjengelig fra: <https://www.helsebiblioteket.no/retningslinjer/lungekreft/forord>
9. Pascual J, Attard G, Bidard FC, Curigliano G, De Mattos-Arruda L, Diehn M, et al. ESMO recommendations on the use of circulating tumour DNA assays for patients with cancer: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol*. 2022;33(8):750-68. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35809752>
10. Heitzer E, van den Broek D, Denis MG, Hofman P, Hubank M, Mouliere F, et al. Recommendations for a practical implementation of circulating tumor DNA mutation testing in metastatic non-small-cell lung cancer. *ESMO Open*. 2022;7(2):100399.
11. Nordgard O, Brendsdal Forthun R, Lapin M, Gronberg BH, Kalland KH, Kopperud RK, et al. Liquid Biopsies in Solid Cancers: Implementation in a Nordic Healthcare System. *Cancers*. 2021;13(8). Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33924696>
12. Henriksen TV, Reinert T, Christensen E, Sethi H, Birkenkamp-Demtroder K, Gogenur M, et al. The effect of surgical trauma on circulating free DNA levels in cancer patients-implications for studies of circulating tumor DNA. *Mol Oncol*. 2020;14(8):1670-9. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32471011>
13. Husøy A-M. Blodprøvetaking i praksis: Cappelen Damm; 2018.
14. National Cancer Institute US. CELL-FREE DNA: BIOSPECIMEN COLLECTION AND PROCESSING. 2020. [hentet 13.10.2023 2023]. Tilgjengelig fra: https://biospecimens.cancer.gov/global/pdfs/Expert-vetted_Cell-Free_DNA_BEBP.pdf
15. Norsk Standard. NS-EN ISO 20186-3:2019 Molecular in-vitro diagnostic examinations — Specifications for pre-examination processes for venous whole blood — Part 3: Isolated

- circulating cell free DNA from plasma. <https://online.standard.no/nb/ns-en-iso-20186-3-2019>; Standard Norge; 2019.
16. Beranek M, Sirak I, Vosmik M, Petera J, Drastikova M, Palicka V. Carrier molecules and extraction of circulating tumor DNA for next generation sequencing in colorectal cancer. Acta Medica (Hradec Kralove). 2016;59(2):54-8. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27526306>
 17. Aggarwal C, Thompson JC, Black TA, Katz SI, Fan R, Yee SS, et al. Clinical Implications of Plasma-Based Genotyping With the Delivery of Personalized Therapy in Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. JAMA Oncol. 2019;5(2):173-80. Tilgjengelig fra: https://jamanetwork.com/journals/jamaoncology/articlepdf/2705609/jamaoncology_aggarwal_2018_oi_180083.pdf
 18. Lampignano R, Neumann MHD, Weber S, Klotten V, Herdean A, Voss T, et al. Multicenter Evaluation of Circulating Cell-Free DNA Extraction and Downstream Analyses for the Development of Standardized (Pre)analytical Work Flows. Clin Chem. 2020;66(1):149-60. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31628139>



NorPreM

Nasjonalt kompetansenettverk
for persontilpasset medisin