



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Anno Accademico 2020-2021

Corso di Tecnologie avanzate nella diagnostica di laboratorio
Modulo di Diagnostica molecolare su tessuto

Manila Antonelli

Calendario lezioni anno accademico 2021/2022

21 ottobre

28 ottobre

4 novembre

11 novembre

18 novembre

25 novembre

10 dicembre

Test autovalutazione (remoto)

ADE e seminari su e-learning a partire del II semestre



FACOLTÀ DI MEDICINA E FARMACIA
POLO DIDATTICO DEL MOLISE- IRCCS NEUROMED
CORSO DI LAUREA TECNICHE SANITARIE DI LABORATORIO BIOMEDICO
ANNO ACCADEMICO 2021-2022

CORSO INTEGRATO DI TECNOLOGIE AVANZATE NELLA DIAGNOSTICA DI LABORATORIO

Modulo di diagnostica molecolare su tessuto

Obiettivi formativi

Lo studente dovrà acquisire conoscenze sulle problematiche anatomo-patologiche di alcune malattie.

Programma

- Il flusso di lavoro nel laboratorio di diagnostica molecolare.
- Fase preanalitica e fase analitica
- Caratterizzazione molecolare dei tumori solidi: GIST, carcinoma della mammella, carcinoma del colon, carcinoma del polmone, immuno-oncologia
- Marcatori tumorali nei tumori solidi
- FISH e campi di applicazioni nei tumori della mammella e del sistema nervoso centrale

Testi adottati

L. Ruco- A. Scarpa
Anatomia Patologica
Le basi
UTET

Modulo di Diagnostica molecolare su tessuto

LEZIONE 1

28 ottobre 2021 – Argomenti della lezione

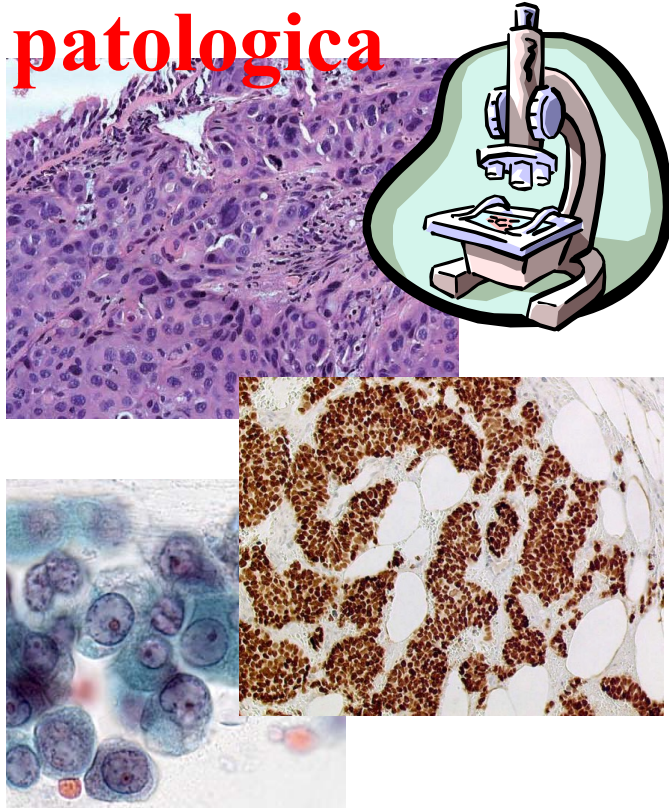
Il flusso di lavoro NELLA DIAGNOSTICA MOLECOLARE

Diagnostica molecolare

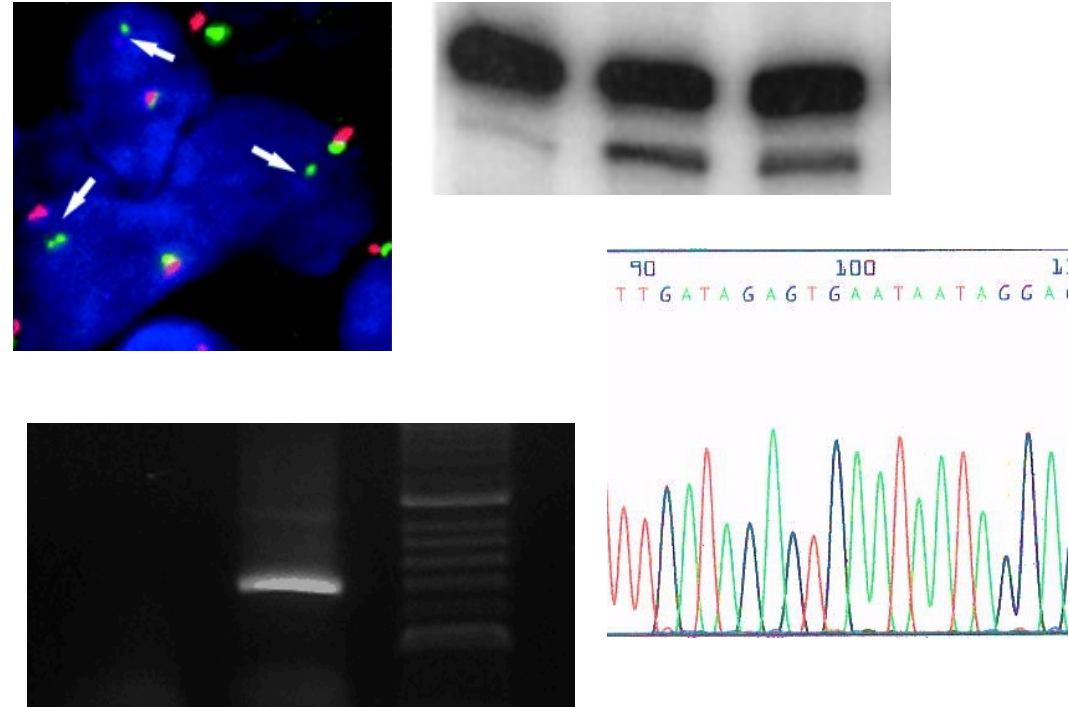
Ruolo fondamentale nella caratterizzazione dei processi patologici, permettendo di effettuare una diagnosi più accurata e adeguata agli sviluppi clinici attuali.

Corretto inquadramento del paziente ai fini della prognosi e del trattamento, in particolare con farmaci di nuova generazione per terapie personalizzate.

Anatomia patologica



Patologia molecolare



- 
- **Diagnosi**
 - **Prognosi**
 - **Bersagli terapeutici**

Il flusso di lavoro NELLA DIAGNOSTICA MOLECOLARE prevede una serie di aspetti fondamentali per un risultato ottimale

1. **Fase preanalitica** in funzione delle attività diagnostiche sia morfologiche e immunoistochimiche che molecolari
2. **Fase analitica** l'utilizzo delle più innovative ed adeguate tecnologie per la diagnostica degli specifici marcatori
3. **Controllo di qualità** sia esterni, condotti da enti riconosciuti a livello nazionale e/o internazionale, sia interni al laboratorio con lo scopo di mantenere nel tempo i livelli di qualità riconosciuti dai controlli esterni
4. **Referto diagnostico** secondo i criteri di refertazione internazionali al fine di fornire risultati facilmente interpretabili e applicabili alla pratica clinica

FLUSSO DI LAVORO

La **distribuzione degli ambienti all'interno del laboratorio** deve separare i vari passi del percorso analitico per ridurre al minimo la possibilità di contaminazione.

PCR

La distribuzione degli ambienti nel laboratorio deve tenere conto di quattro attività distinte:

1. Preparazione dei reagenti e loro conservazione
2. Preparazione dei campioni e estrazione degli acidi nucleici

**Le fasi 1 e 2 sono
“Pre-PCR”**

3. Amplificazione mediante PCR
4. Analisi dei prodotti di amplificazione.

**Le fasi 3 e 4 sono
“Post-PCR”**

Una separazione dei percorsi e/o degli ambienti durante lo svolgimento di queste attività è essenziale per ridurre al minimo il rischio di **due tipi di contaminazione**:

- A. **Cross-contaminazione** (“Target template contamination”)
- B. **Contaminazione da riporto** (“Carryover contamination”)

Cross-contaminazione (“Target template contamination”)

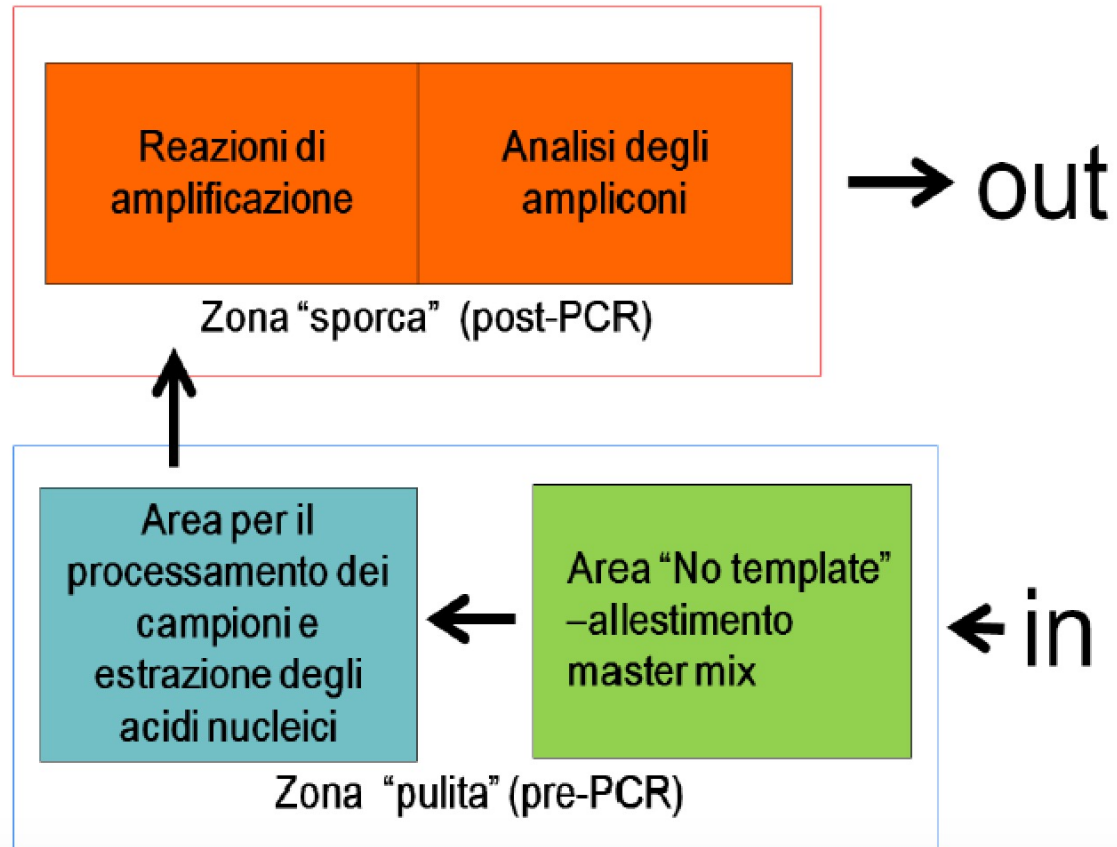
contaminazione da DNA genomico associata alle fasi Pre-PCR, spesso dovuta alla presenza di microparticelle di tessuto o di microgoccioline di acidi nucleici

Contaminazione da riporto (“Carryover contamination”)

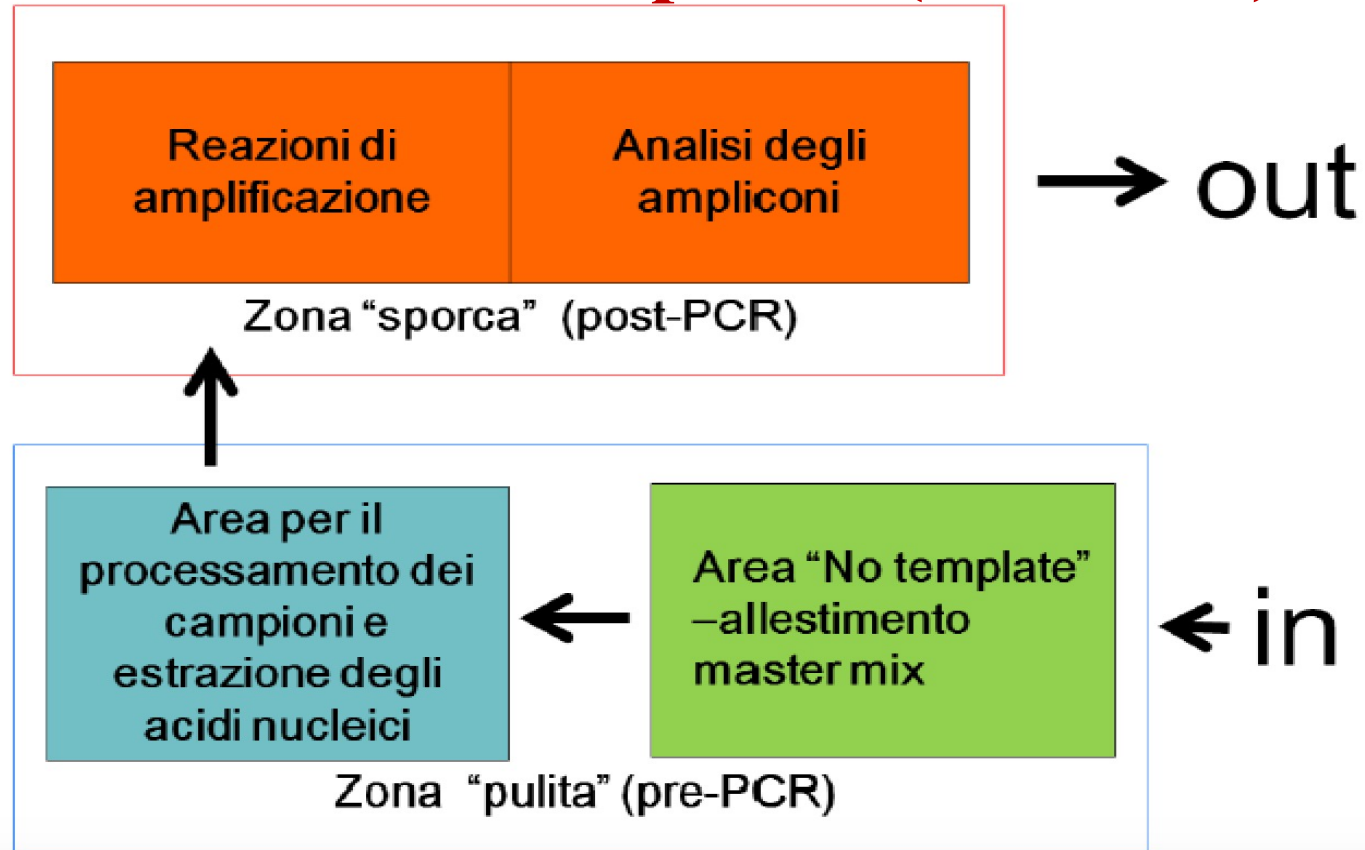
contaminazione da prodotti di DNA amplificato, associata alle fasi Post-PCR, dovuta alla aerosolizzazione degli ampliconi, la più rischiosa in quanto gli ampliconi non possono essere identificati prima che si verifichi la contaminazione

Sono dunque da prevedere aree separate per attività Pre-PCR e Post-PCR, con strumenti e consumabili (pipette, puntali, piastre, provette etc.) dedicati per i seguenti spazi:

Corretto workflow del laboratorio

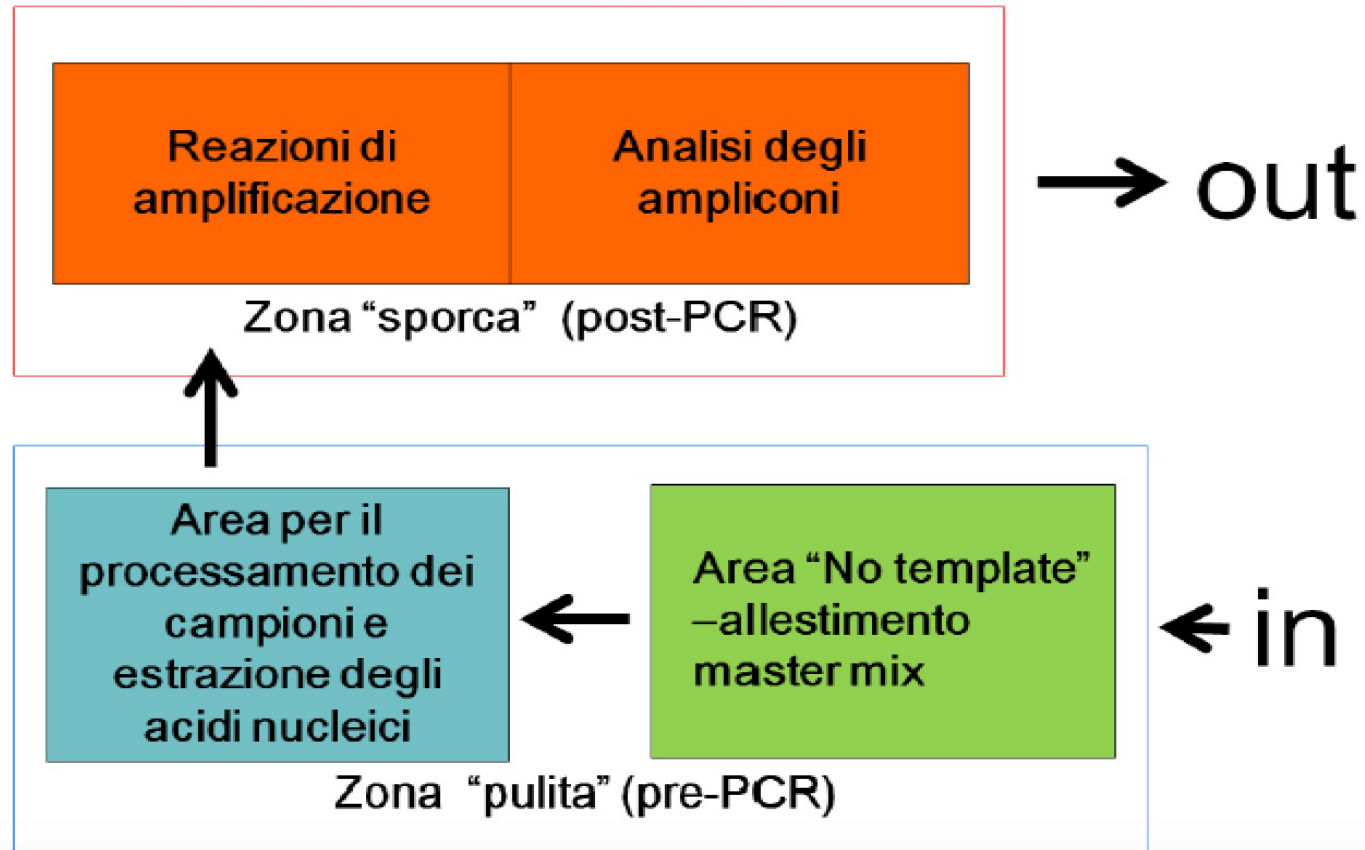


Area “No template” (Pre-PCR)



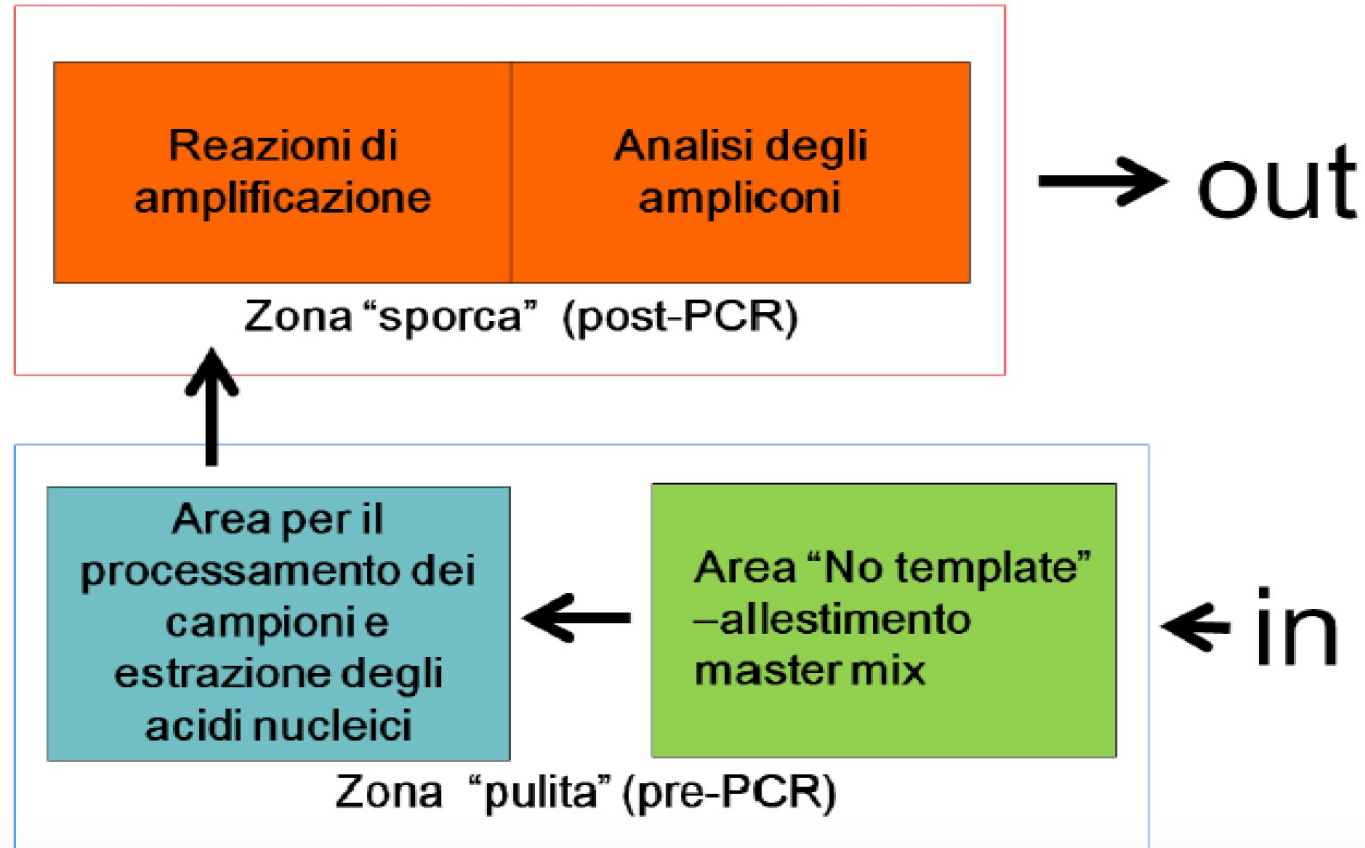
Aree destinate al trattamento **pre-analitico dei campioni (Pre-PCR)**, dove il materiale da analizzare viene processato, gli acidi nucleici estratti e conservati. Queste aree consistono di spazi distinti per: i) dissezione del materiale biologico, paraffinato o meno; ii) estrazione degli acidi nucleici; iii) allestimento delle reazioni con aggiunta degli acidi nucleici alle mastermix per amplificazione del DNA e preparazione alle analisi di sequenza.

Area “No template” (Pre-PCR)



Area “No template” (Pre-PCR) che deve rimanere sempre libera da acidi nucleici e ampliconi dedicata alla preparazione e stoccaggio dei reagenti. Se possibile questa area dovrebbe avere una ventilazione a pressione leggermente positiva, per prevenire contaminazione da materiale e acidi nucleici estranei ambientali.

Area “Post PCR”



Are Post-PCR, con separazione della zona dedicata alle reazioni di amplificazione con quella dedicata all’analisi degli ampliconi. Nella prima zona si trovano strumenti quali dispositivi per elettroforesi, termociclatori; nella seconda, piattaforme di sequenziamento, di real-time PCR o per expression profiling..

È preferibile avere almeno una stanza dedicata per gli strumenti: la stanza dev'essere ben areata o a temperatura controllata, gli strumenti non troppo ravvicinati (per evitare il surriscaldamento) e collegati a un gruppo elettrico di continuità.

Se possibile queste aree dovrebbero avere una ventilazione a **pressione leggermente negativa**, per prevenire la disseminazione ambientale di ampliconi aerosolizzati.

È comunque essenziale che nessun oggetto o reagente passi dalle aree Post- a quelle Pre-PCR

Se lo spazio a disposizione del laboratorio è limitato e tutte le attività devono essere svolte in un unico ambiente (situazione non raccomandabile) aumenta notevolmente la complessità del percorso in quanto si rende necessaria una separazione “temporale” tra le attività Pre- e Post-PCR.

Le prime possono essere svolte la mattina, le seconde il pomeriggio. In questo caso è essenziale l'utilizzo di cappe a flusso laminare attrezzate con lampade a raggi UV per le attività Pre-PCR. Al termine delle operazioni gli spazi interni della cappa vanno puliti con una soluzione di ipoclorito di sodio (NaClO) al 10% e le lampade UV accese per denaturare gli acidi nucleici.

Il flusso di lavoro NELLA DIAGNOSTICA MOLECOLARE prevede una serie di aspetti fondamentali per un risultato ottimale

1. **Fase preanalitica** in funzione delle attività diagnostiche sia morfologiche e immunoistochimiche che molecolari
2. **Fase analitica** l'utilizzo delle più innovative ed adeguate tecnologie per la diagnostica degli specifici marcatori
3. **Controllo di qualità** sia esterni, condotti da enti riconosciuti a livello nazionale e/o internazionale, sia interni al laboratorio con lo scopo di mantenere nel tempo i livelli di qualità riconosciuti dai controlli esterni
4. **Referto diagnostico** secondo i criteri di refertazione internazionali al fine di fornire risultati facilmente interpretabili e applicabili alla pratica clinica

Fase pre-analitica

La fase pre-analitica ha inizio con la richiesta dell'esame molecolare.

1. Solitamente la richiesta parte dell'oncologo che intende trattare il paziente oncologico con una terapia farmacologica mirata;
2. La richiesta può anche essere condivisa in maniera multidisciplinare (tumour board)
3. La richiesta può partire dallo stesso patologo, che avvia la procedura dell'esame molecolare (“**reflex testing**”) al momento della diagnosi di patologie neoplastiche in fase avanzata di malattia quando esistono le condizioni per una richiesta da parte del medico curante all'atto della ricezione della diagnosi (ad esempio carcinomi del colon o del polmone).

PATOLOGIA MOLECOLARE

fase pre - analitica

estrazione

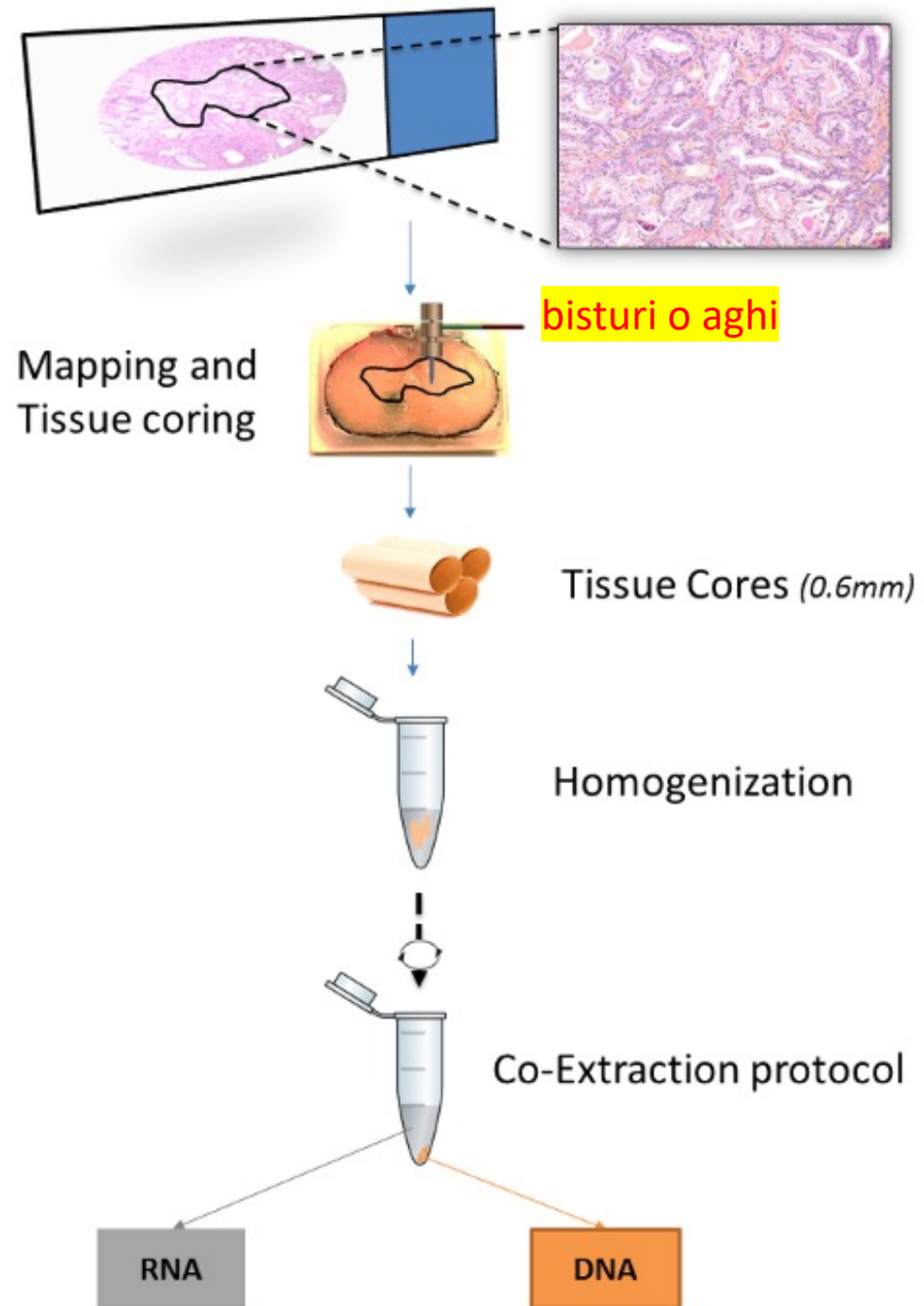
- *tessuto fresco / congelato*
- *tessuto fissato ed incluso in paraffina*

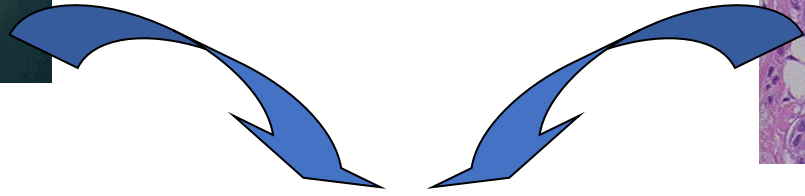
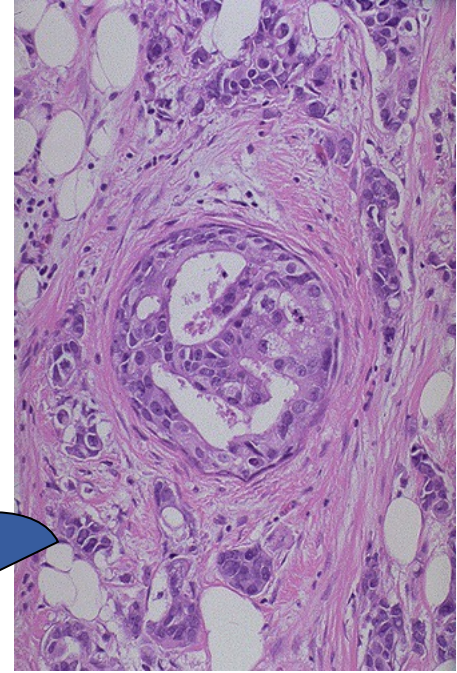
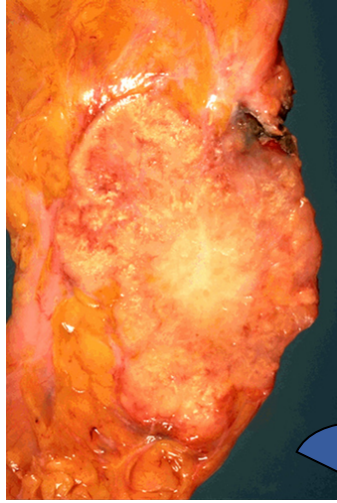
Fase pre-analitica

Si stabilisce l'adeguatezza del campione per l'analisi molecolare, stabilendo da parte del patologo il contenuto tumorale.

Il patologo insieme al tecnico effettua la microdissezione (arricchimento della componente tumorale).

Questa fase evita sia falsi-negativi, che problemi di inibizione di amplificazione del DNA (dovuti ad esempio alla presenza di mucina, melanina o altri inibitori.)



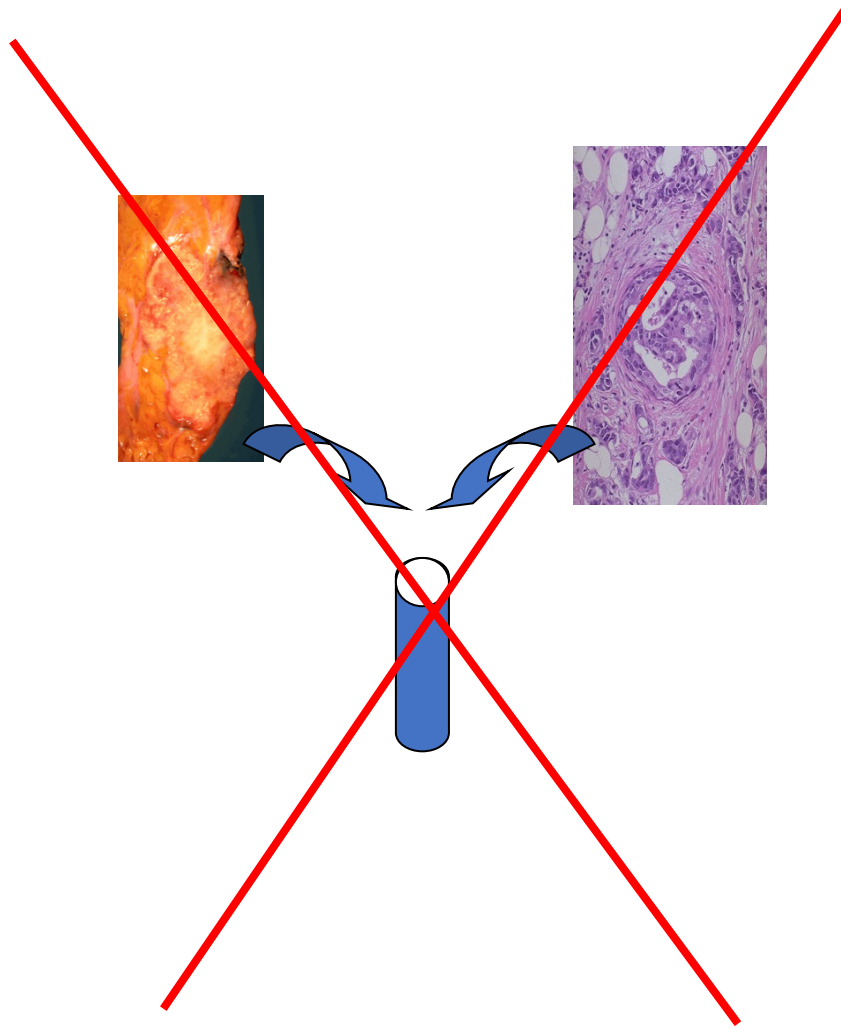


PATOLOGIA MOLECOLARE

fase pre - analitica

estrazione

selezionare ed “arricchire” la
popolazione cellulare da studiare

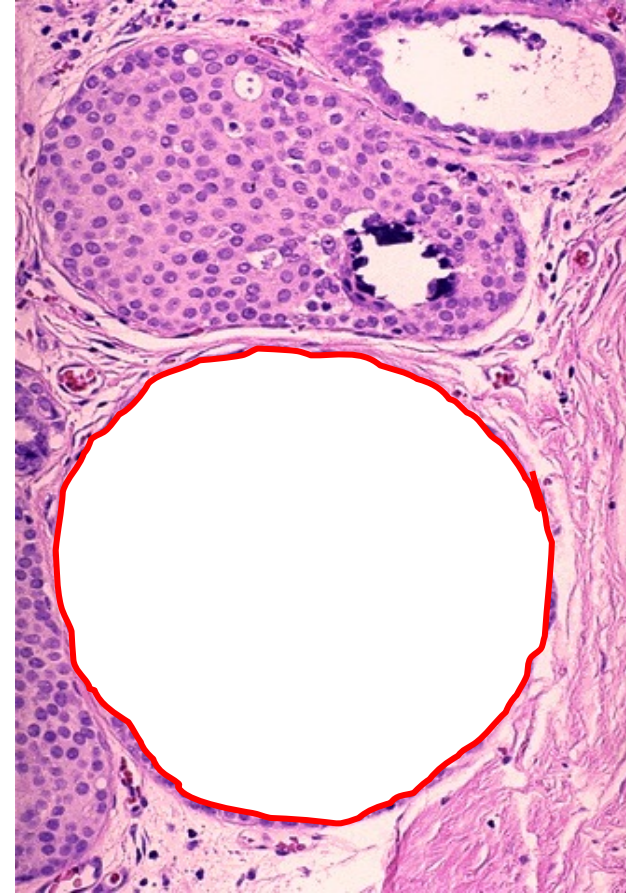
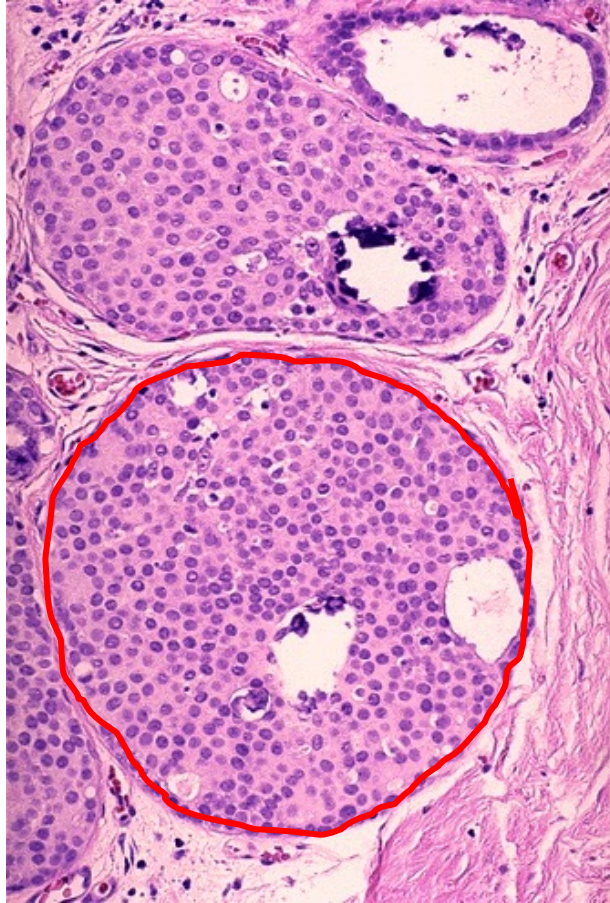


le “molecole” delle
popolazioni cellulari
diverse da quella da
studiare contaminano
quest’ultima

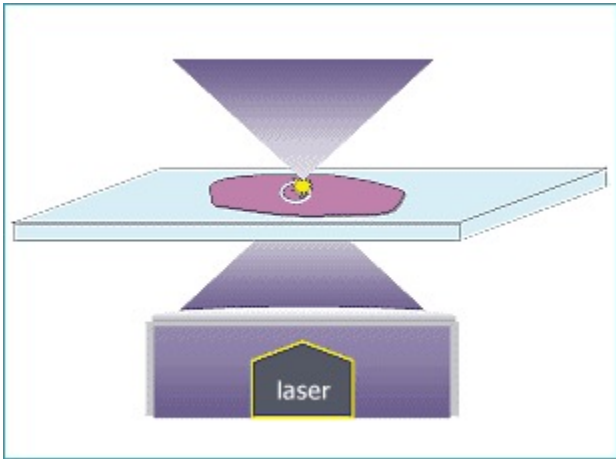
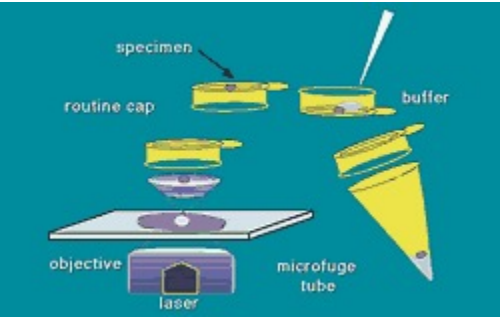
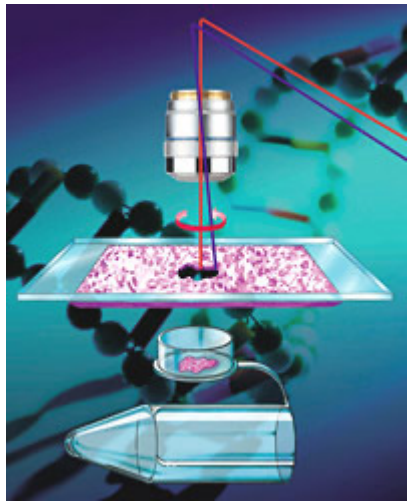
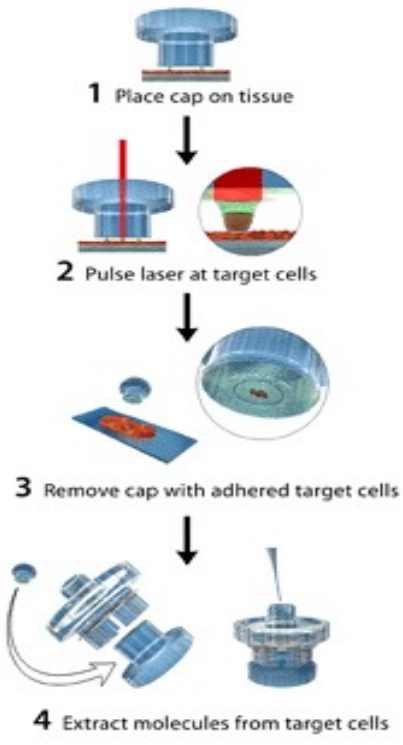


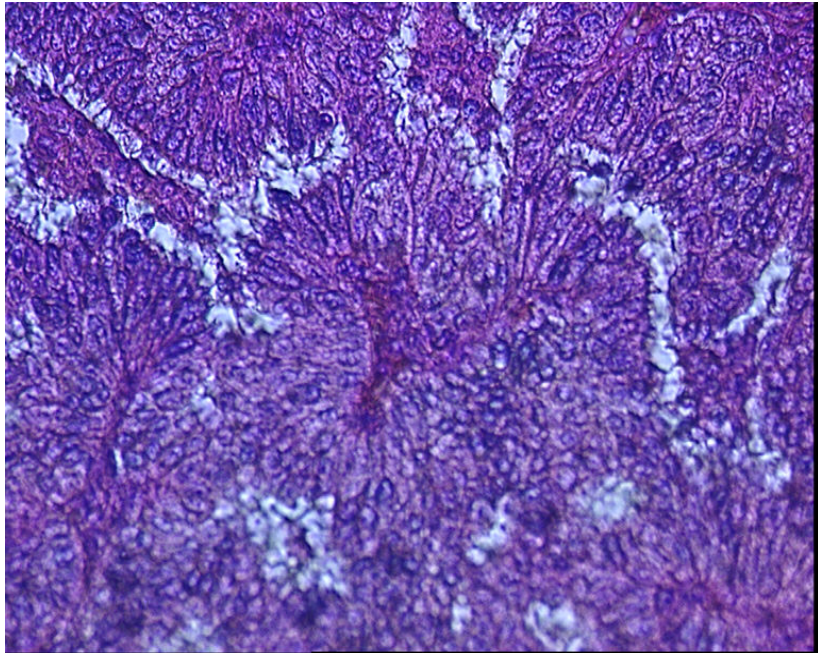
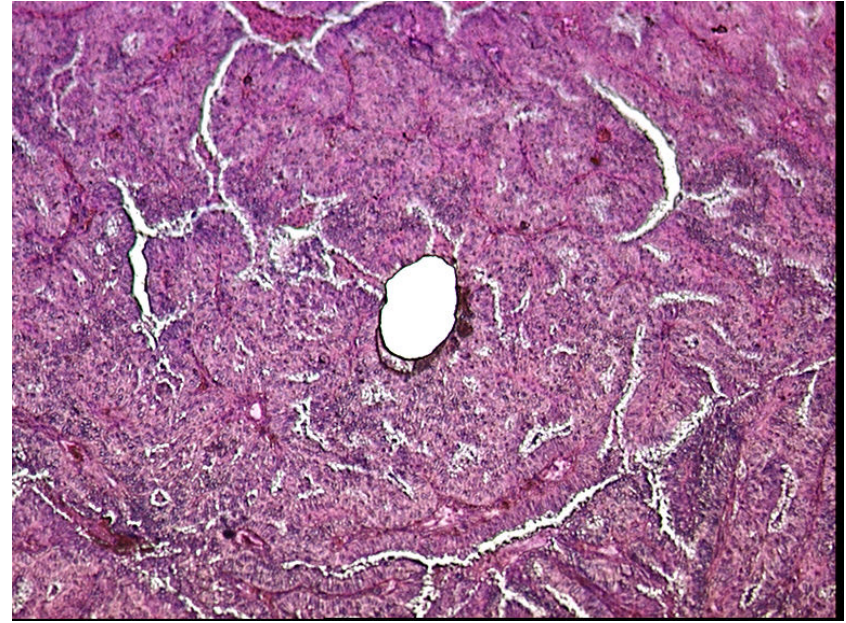
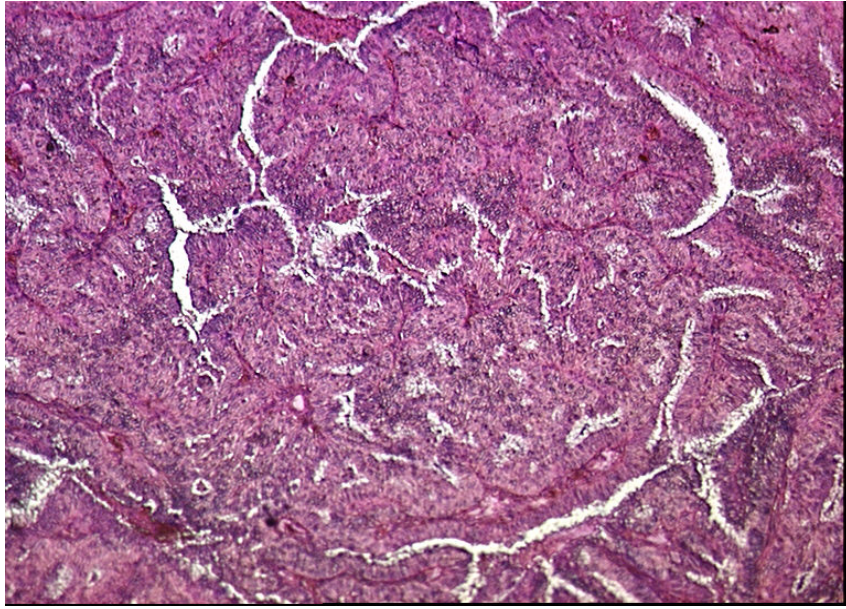
risultato falsato

micro-dissezione laser



The Laser Capture Microdissection Process





Fase pre-analitica

L'estrazione degli acidi nucleici rappresenta il momento conclusivo della fase pre – analitica.

Numerosi sistemi commerciali, basati su colonnine a setto poroso per esclusione o a separazione magnetica su biglie metalliche, consentono di recuperare acidi nucleici di qualità adeguata alle indagini molecolari

La valutazione della quantità del DNA purificato può essere eseguita con l'ausilio di varie tecnologie.....NANODROP

Nanodrop

<https://www.youtube.com/watch?v=vOtVI4ghWRs>

Il flusso di lavoro NELLA DIAGNOSTICA MOLECOLARE prevede una serie di aspetti fondamentali per un risultato ottimale

1. **Fase preanalitica** in funzione delle attività diagnostiche sia morfologiche e immunoistochimiche che molecolari
2. **Fase analitica** l'utilizzo delle più innovative ed adeguate tecnologie per la diagnostica degli specifici marcatori
3. **Controllo di qualità** sia esterni, condotti da enti riconosciuti a livello nazionale e/o internazionale, sia interni al laboratorio con lo scopo di mantenere nel tempo i livelli di qualità riconosciuti dai controlli esterni
4. **Referto diagnostico** secondo i criteri di refertazione internazionali al fine di fornire risultati facilmente interpretabili e applicabili alla pratica clinica

Fase analitica

- Utilizzo delle più innovative ed adeguate tecnologie per la diagnostica degli specifici marcatori.
- La scelta del metodo analitico deriva dalle esigenze di giungere ad una definizione diagnostica o dalla disponibilità di farmaci diretti contro specifiche varianti mutazionali o alterazioni molecolari

Fattori importanti per la scelta del metodo analitico sono:

- **Test predeterminati o indeterminati**
 - Metodi predeterminati riconoscono a priori solo le mutazioni più frequenti (come ad esempio i kit basati su real time PCR, pirosequenziamento o spettrometria di massa).
 - I metodi di sequenziamento indeterminato (sequenziamento diretto o sequenziamento NGS) sono in grado di identificare tutte le possibili varianti, anche le più rare.

Test predeterminati sono in genere kit certificati per diagnostica in vitro e più costosi.

Test indeterminati sono di solito basati su metodi sviluppati nei singoli laboratori e meno costosi, anche se esistono già kit certificati per diagnostica in vitro.

I pannelli utilizzati dalle piattaforme di NGS hanno il miglior rapporto costo/efficienza ma richiedono strumenti e personale dedicato e la certificabilità dell'interpretazione dei dati bio-informatici.

Sensibilità analitica dei test

Valutazione della sensibilità delle metodiche

Per **sensibilità analitica** si deve intendere la più bassa concentrazione di cellule tumorali in cui è possibile identificare una mutazione target con il 100% di precisione nei replicati.

Considerato il problema della eterozigosi, la minima componente neoplastica presente nella sezione dovrebbe essere quantitativamente doppia rispetto al limite di rilevazione strumentale.

Per esempio un campione con il 10% di cellule tumorali dovrebbe essere testato con un assay con limite di rilevazione di almeno il 5%.

Altri fattori importanti per la scelta del metodo analitico sono:

Sensibilità

La sensibilità dei metodi è crescente a partire dal sequenziamento diretto (20-30%), pirosequenziamento, spettrometria di massa, fino all'1-5% del sequenziamento NGS e della real time PCR.

La scelta dipende dall'arricchimento in cellule neoplastiche del campione.

- Metodo sensibile per i campioni poco arricchiti (biopsie, citologia)
- Metodo meno sensibile per quelli più arricchiti (pezzi chirurgici).

Sul DNA estratto da tessuti o campioni citologici, non è consigliabile utilizzare metodi con sensibilità inferiore all'1%.

Il flusso di lavoro NELLA DIAGNOSTICA MOLECOLARE prevede una serie di aspetti fondamentali per un risultato ottimale

1. **Fase preanalitica** in funzione delle attività diagnostiche sia morfologiche e immunoistochimiche che molecolari
2. **Fase analitica** l'utilizzo delle più innovative ed adeguate tecnologie per la diagnostica degli specifici marcatori
3. **Controllo di qualità** sia esterni, condotti da enti riconosciuti a livello nazionale e/o internazionale, sia interni al laboratorio con lo scopo di mantenere nel tempo i livelli di qualità riconosciuti dai controlli esterni
4. **Referto diagnostico** secondo i criteri di refertazione internazionali al fine di fornire risultati facilmente interpretabili e applicabili alla pratica clinica

Altri fattori importanti per la scelta del metodo analitico

sono:

Marcatura CE-IVD

La norma ISO15189 richiede che i test diagnostici sviluppati internamente nei laboratori siano rigorosamente validati con altri test coperti dalla marcatura CE-IVD, da preferire nei laboratori diagnostici.

L'utilizzo di reagenti di rilevazione diversi non IVD, utilizzati nei metodi sviluppati in laboratorio, richiede obbligatoriamente che ciascun nuovo lotto venga validato internamente e l'intera procedura sia sottoposta a controllo di qualità esterno

ACRONIMO IVD

In Vitro Diagnostics, tradotto in Italia con il termine "Diagnostica in vitro".

Altri fattori importanti per la scelta del metodo analitico sono:

- **Variabilità analitica**. I kit commerciali includono sempre controlli interni all'interno dei quali il test è considerato affidabile. I test sviluppati internamente nei laboratori devono comprendere allo stesso modo controlli interni positivi e negativi e le sedute ripetute in duplicato.
- **Tempo di esecuzione (TAT)**. Test diagnostico predittivo per la risposta a un farmaco oncologico venga refertato in >10 giorni lavorativi.
Tempi più lunghi sono ammissibili solo in caso di validazioni di risultati equivoci o per l'esecuzione di pannelli mutazionali NGS ad ampio spettro.

Indipendentemente dal metodo certificato IVD o meno e dalle strumentazioni disponibili è obbligatorio per l'operatività dei laboratori di patologia molecolare diagnostica partecipare a controlli di qualità esterni riconosciuti e specifici per i diversi marcatori analizzati.

Una volta superato il controllo di qualità esterno per un determinato marcatore, il laboratorio ha l'obbligo di mettere in atto una serie di procedure per mantenere nel tempo un costante livello di qualità.

Il flusso di lavoro NELLA DIAGNOSTICA MOLECOLARE prevede una serie di aspetti fondamentali per un risultato ottimale

1. **Fase preanalitica** in funzione delle attività diagnostiche sia morfologiche e immunoistochimiche che molecolari
2. **Fase analitica** l'utilizzo delle più innovative ed adeguate tecnologie per la diagnostica degli specifici marcatori
3. **Controllo di qualità** sia esterni, condotti da enti riconosciuti a livello nazionale e/o internazionale, sia interni al laboratorio con lo scopo di mantenere nel tempo i livelli di qualità riconosciuti dai controlli esterni
4. **Referto diagnostico** secondo i criteri di refertazione internazionali al fine di fornire risultati facilmente interpretabili e applicabili alla pratica clinica

Risultato del test molecolare.

- a) analisi predittive mutazionali*
- b) analisi predittive in situ*

a) analisi predittive mutazionali:

- i risultati del test espressi in termini di assenza o presenza di mutazione; in quest'ultimo caso descrivere la mutazione sia a livello di Dna che di proteina secondo la nomenclatura internazionale; in caso di campione non idoneo per l'analisi riportare il motivo dell'inadeguatezza.
- la percentuale di cellule neoplastiche relativa all'area del campione biologico selezionata per l'analisi;
- la metodica ed il test commerciale impiegati per l'esecuzione dell'analisi e la sensibilità analitica del metodo;
- gli esoni sottoposti ad analisi o le mutazioni indagate in caso di metodiche a bersaglio molecolare;



"Ospedale Sant'Anna di Como"
Presidio di San Fermo della Battaglia

Sistema Socio Sanitario
Regione
Lombardia
ASST Lariana

Presidio Ospedaliero Sant'Anna
U.O. Anatomia Patologica - U.O.S. Genetica
Direttore: Dr. Carlo Patriarca

Tel: 031/5859079 Fax: 031/5859829
citogenetica@asst-lariana.it

B 1344/16

Es. CITOGENETICA E GENETICA MOLECOLARE

VIA FRANZI 23
24060 FORESTO SPARSO BG

Tel. 3400747036

Provenienza: OSA-GENETICA

Rich.Dr.: dr Giangaspero Anatomia PUI-RM
Acc. 04-11-2016

TIPO DI PRESTAZIONE: ESAME GENETICO MOLECOLARE
ANALISI MUTAZIONALE DEI GENI H3F3A; HIST1H3B; BRAF.

MATERIALE ANALIZZATO: Vetrini di sezioni istologiche di tessuto tumorale fissato in formalina e incluso in paraffina (8 vetrini EE, 6 vetrini colorati in IHC). Preparati istologici contrassegnati con il n. I16/18513 provenienti da ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo. I preparati pervengono in seguito a consulenza per centralizzazione isto-patologica tumori pediatrici del SNC (Ref. n° F2016-015611, UOC Anatomia, Policlinico Umberto I, Roma).

INDICAZIONE ALL'ANALISI: valutazione di mutazioni di interesse prognostico/predittivo; analisi eseguibile solo su sezioni già immunocolorate per assenza di materiale tessutale residuo nei blocchetti FFPE.

METODO UTILIZZATO: estrazione del DNA (kit QIAamp DNA FFPE Tissue, Qiagen), amplificazione e sequenziamento bidirezionale mediante elettroforesi capillare su AB310 Genetic Analyzer dell' esone 2 del gene istonico H3F3A (sequenza di riferimento NM_002107.4); esone 1 del gene istonico HIST1H3B (NM_003537.3); esone 15 di BRAF (NM_004333.4). Sensibilità della metodica, intesa come percentuale minima di allele mutato rilevabile, compresa tra 10% e 20% . La mutazione K27M dei geni H3F3A e HIST1H3B e' stata indagata inoltre con metodica mutazione-specifica di PCR+digestione enzimatica (sensibilità 5%).

RISULTATO:

Assenza di mutazioni nelle regioni geniche indagate.

CONCLUSIONE:

Assenza nel campione in esame di mutazioni a carico dei marcatori prognostici H3F3A e HIST1H3B.
Assenza nel campione in esame di mutazione che conferisce sensibilità al trattamento con inibitori di BRAF.

REFERTO VALIDATO IL 15-11-2016 alle ore 10:41

Tecnici di laboratorio:

[Redacted signature area]

La copia della presente certificazione è un documento originale e conservato digitalmente presso gli archivi informatici dell'azienda socio-sanitaria territoriale lariana.

Il personale medico è disponibile per ulteriori informazioni, telefonando al numero indicato nell' intestazione.

b) analisi predittive in situ: 1

- i risultati del test FISH devono essere espressi in termini di assenza o presenza di alterazioni genomiche (es. amplificazione del gene HER2 o riarrangiamento del gene ALK-1).
- Per l'analisi immunoistochimica il risultato, a seconda del marcatore e dell'anticorpo utilizzato, deve essere espresso mediante:
 - valutazione binaria (positivo/negativo)
 - un opportuno score system con la possibile aggiunta della percentuale di cellule positive,
 - la localizzazione dell'immunoreattività (di membrana, citoplasmatica o nucleare) e dell'intensità della colorazione.

b) analisi predittive in situ: 2

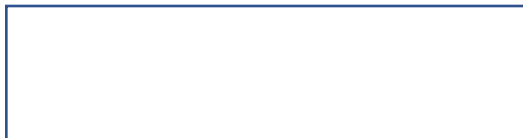
La percentuale di cellule neoplastiche nel campione biologico in esame;

- la procedura impiegata per l'esecuzione dell'analisi, ibridazione in situ a fluorescenza (FISH) e/o immunohistochimica (ICH), con particolare riferimento per la FISH al tipo di sonda e alla ditta produttrice, per l'ICH al clone anticorpale, all'eventuale sistema di amplificazione, alla ditta produttrice ed al sistema di rivelazione adottato;
- in caso di materiale non idoneo per l'analisi riportare il motivo dell'inadeguatezza.



LABORATORIO DI PATOLOGIA MOLECOLARE
Responsabile Prof. G. Tallini

Referto n. 20M012830



Analisi di Patologia molecolare

Indagine eseguita sul caso 20B009019 - Anatomia Patologica, Ospedale Bellaria.

Diagnosi:

1. ANALISI FISH PER IL RIARRANGIAMENTO DEL GENE BRAF (7q34):
RIARRANGIAMENTO CON DUPLICAZIONE IN TANDEM BRAF/KIAA1549

2. ANALISI FISH PER LA REGIONE CROMOSOMICA 1p36:
ASSENZA DI DELEZIONE.

3. ANALISI FISH PER LA REGIONE CROMOSOMICA 19q13:
ASSENZA DI DELEZIONE.

4. Valutazione del materiale:

Sede del prelievo: cervelletto.

La rappresentatività del campione è limitata dalla natura del prelievo (biopsia).

Cellularità lesionale ai limiti dell'adeguatezza - scarsità delle cellule lesionali residue.

Analisi FISH eseguita sul caso numero: 20B009019-1A.

Analisi del riarrangiamento BRAF/KIAA1549:

L'analisi FISH è stata effettuata con sonde specifiche per i geni BRAF e KIAA1549 e, HIPK2 (Poseidon BRAF-KIAA1549 (7q34) Triple-Color Fusion Probe, Kreatech Diagnostics).

La percentuale di nuclei lesionali con riarrangiamento con duplicazione in tandem dei geni BRAF e KIAA1549 su un totale di 100 nuclei è: 30%

Parametri di valutazione: il campione si considera positivo per il riarrangiamento dei geni BRAF e KIAA1549 quando il numero di nuclei neoplastici con 1 o più segnali di fusione e 3 o più segnali di controllo (gene HIPK2, spectrum Aqua) è > 10% (Korshunov et al., Acta Neuropathol 2001;10:401-405).

Analisi FISH della regione cromosomica 1p36:

Il rapporto tra i segnali della sonda specifica per la regione 1p36 e quella di riferimento (1p36) è di 0,85 su 100 nuclei analizzati (Smith et al. JCO 18:636-645, 2000). L'ibridazione in tandem di 1p36 è assente.

Referto