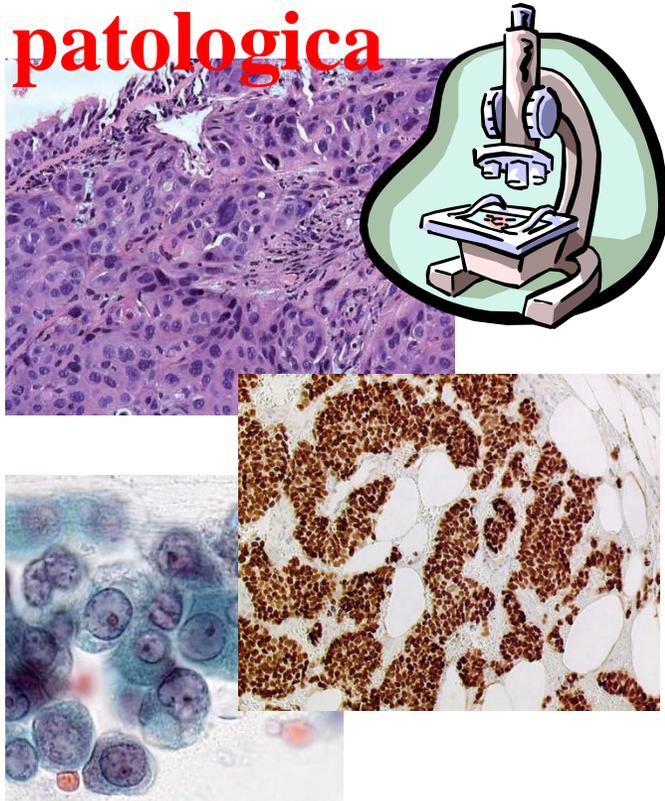


# Diagnostica molecolare

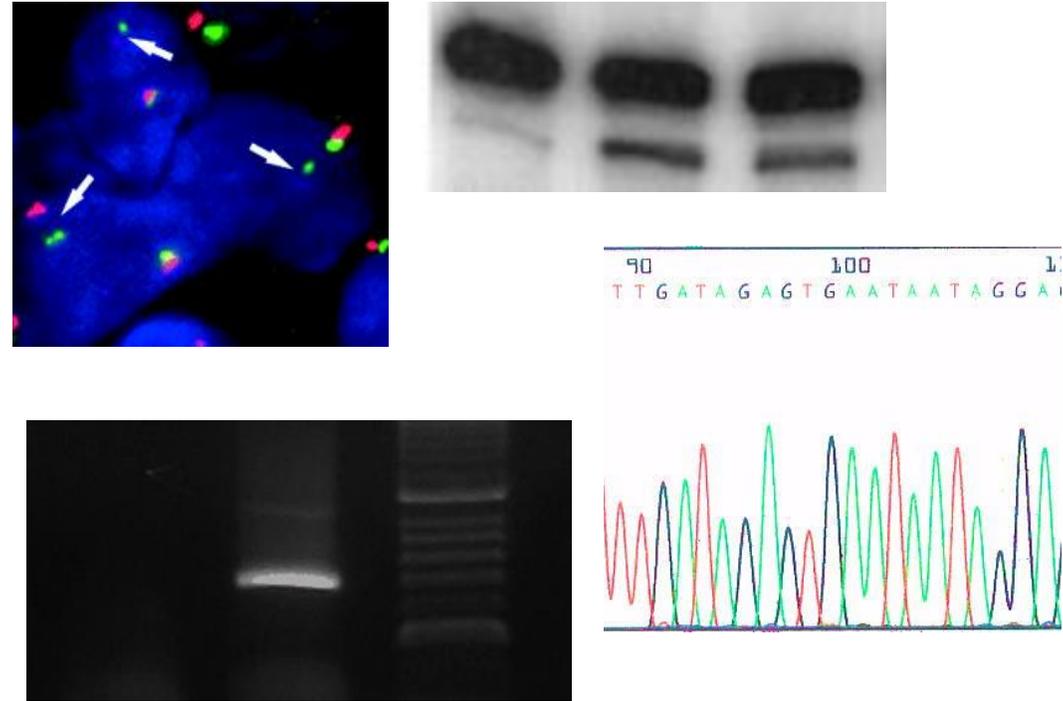
Ruolo fondamentale nella caratterizzazione dei processi patologici, permettendo di effettuare una diagnosi più accurata e adeguata agli sviluppi clinici attuali.

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”) FASE PRE-PCR 1-2
- B. Contaminazione da riporto** (“Carryover contamination”) FASE POST-PCR 2-3

## **Cross-contaminazione (“Target template contamination”)**

contaminazione da DNA genomico associata alle fasi Pre-PCR,

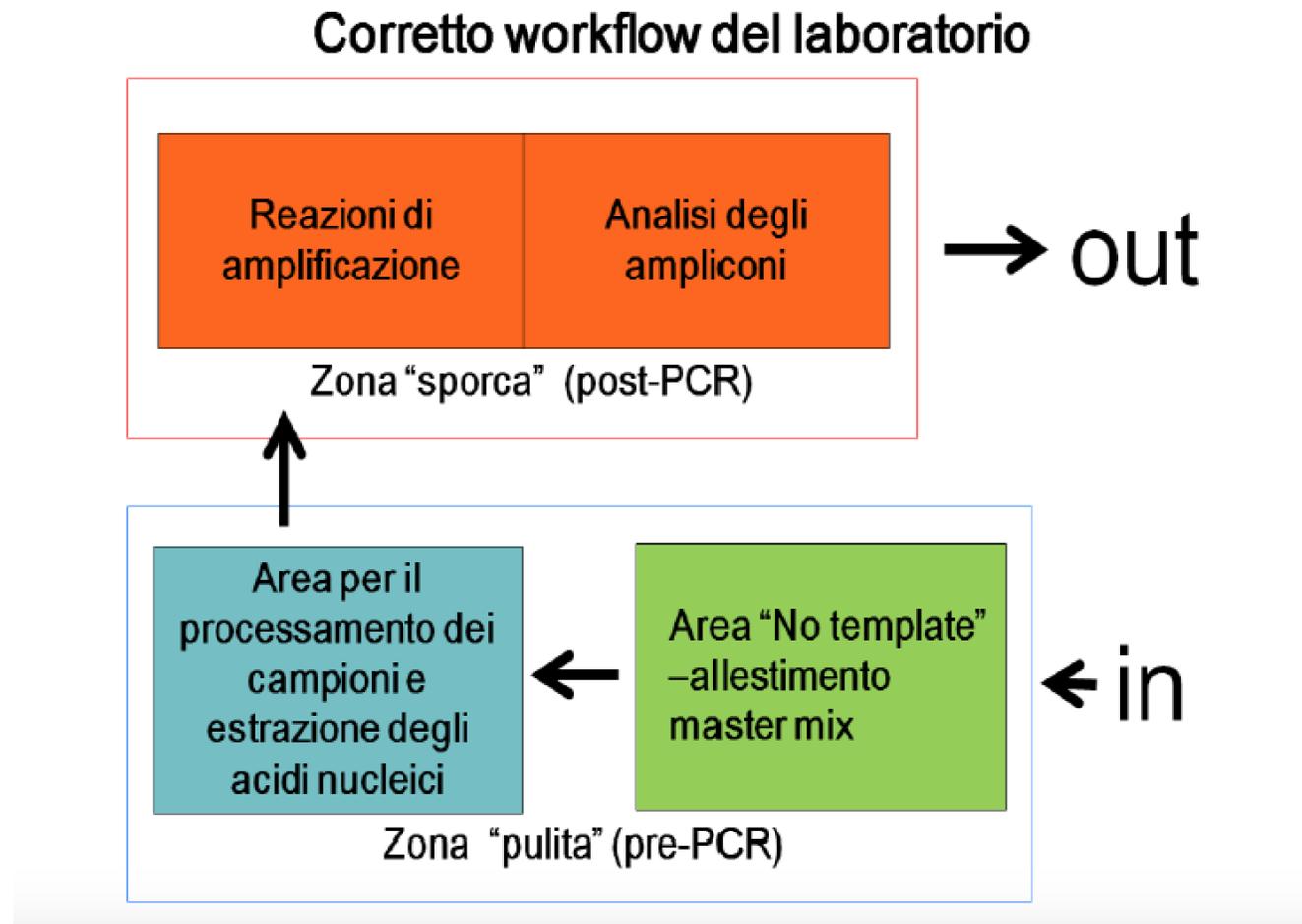
spesso dovuta alla presenza di microparticelle di tessuto  
o di microgoccioline di acidi nucleici

## **Contaminazione da riporto (“Carryover contamination”)**

contaminazione da prodotti di DNA amplificato, associata alle fasi Post-PCR,

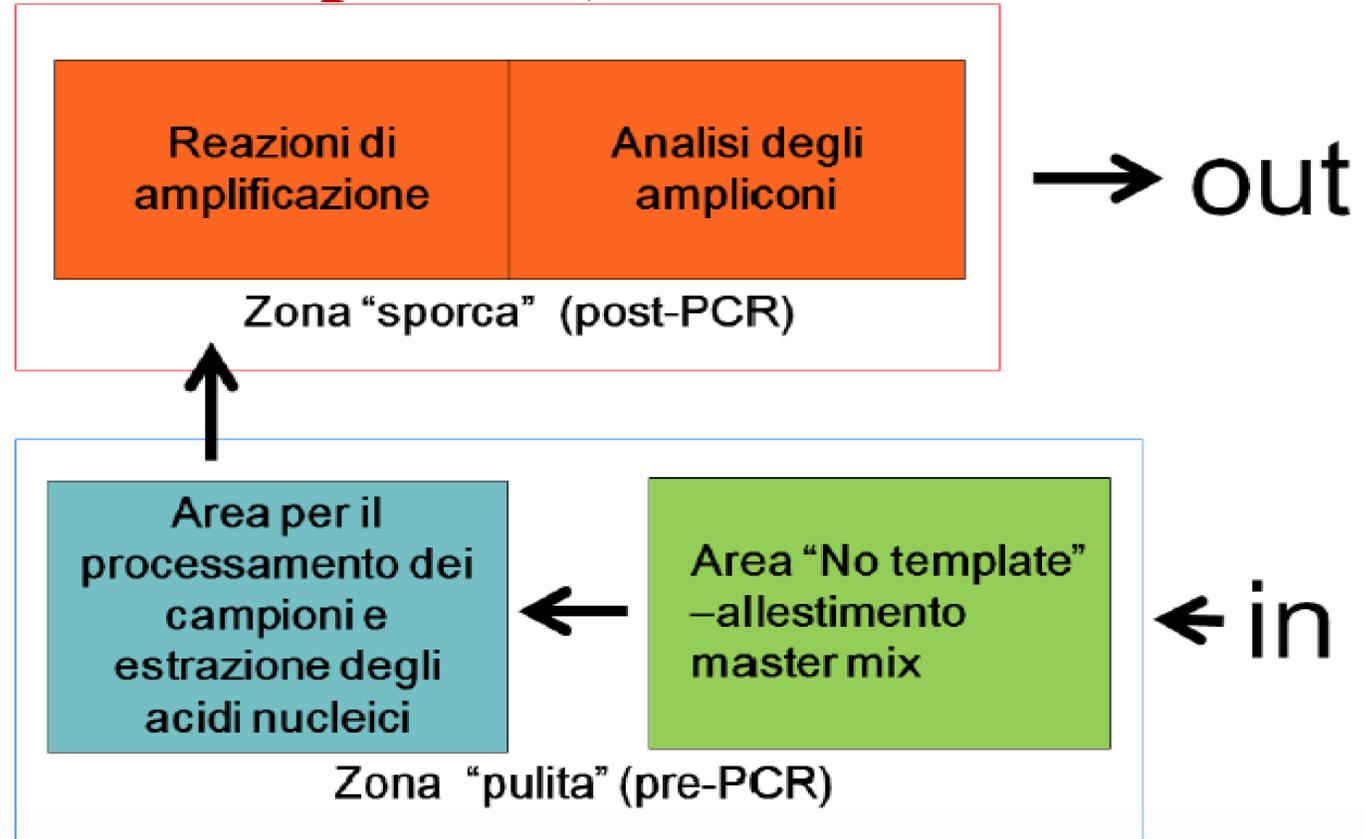
dovuta alla aerosolizzazione degli ampliconi, la più rischiosa in quanto gli ampliconi non possono essere identificati prima che si verifichi la contaminazione

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:



# 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:

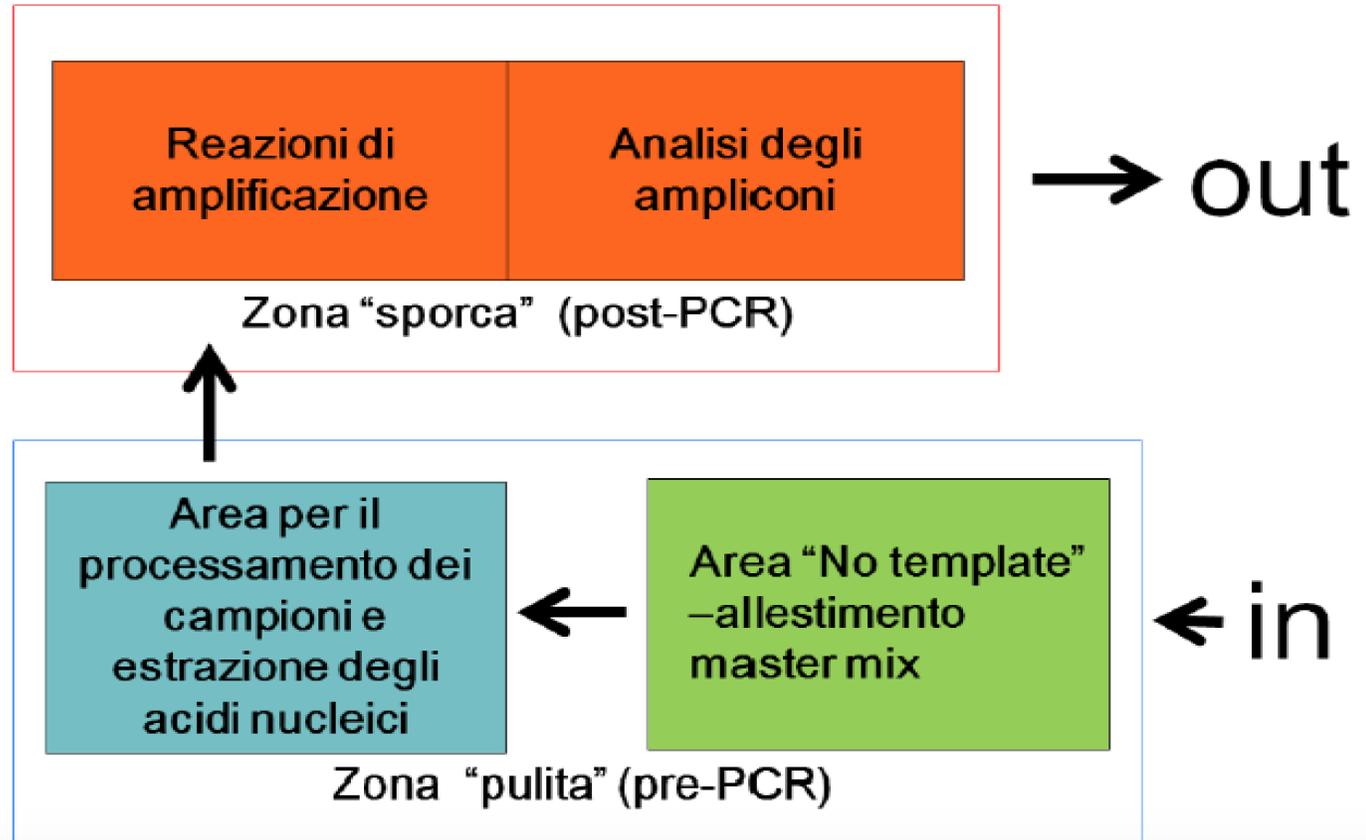
1. dissezione del materiale biologico, paraffinato o meno
2. estrazione degli acidi nucleici
3. allestimento delle reazioni con aggiunta degli acidi nucleici alle mastermix per amplificazione del DNA e preparazione alle analisi di sequenza.

# 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.

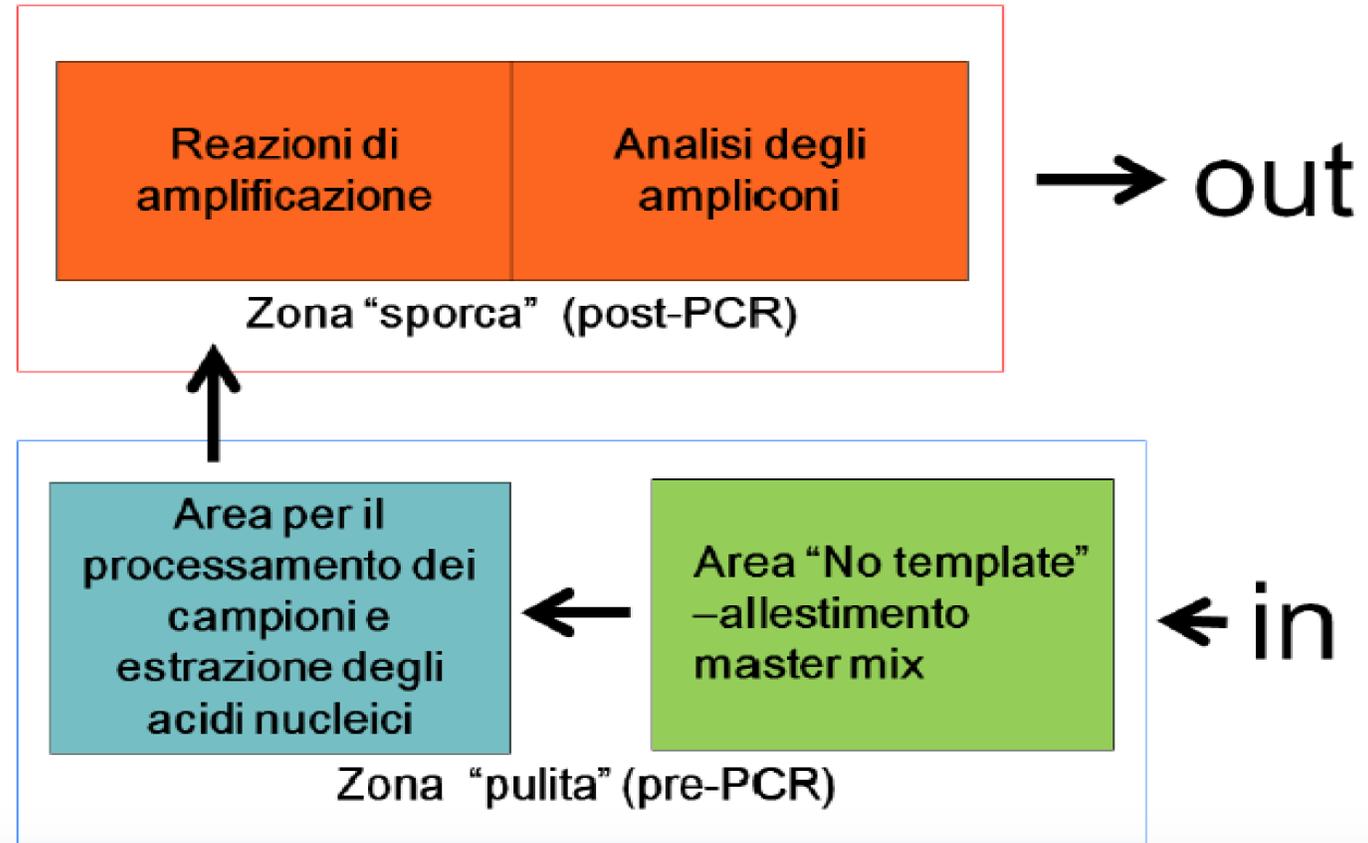


# Area “Post PCR”

**Aree 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.

**É 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

# *PATOLOGIA MOLECOLARE*

*fase pre - analitica*

*estrazione*

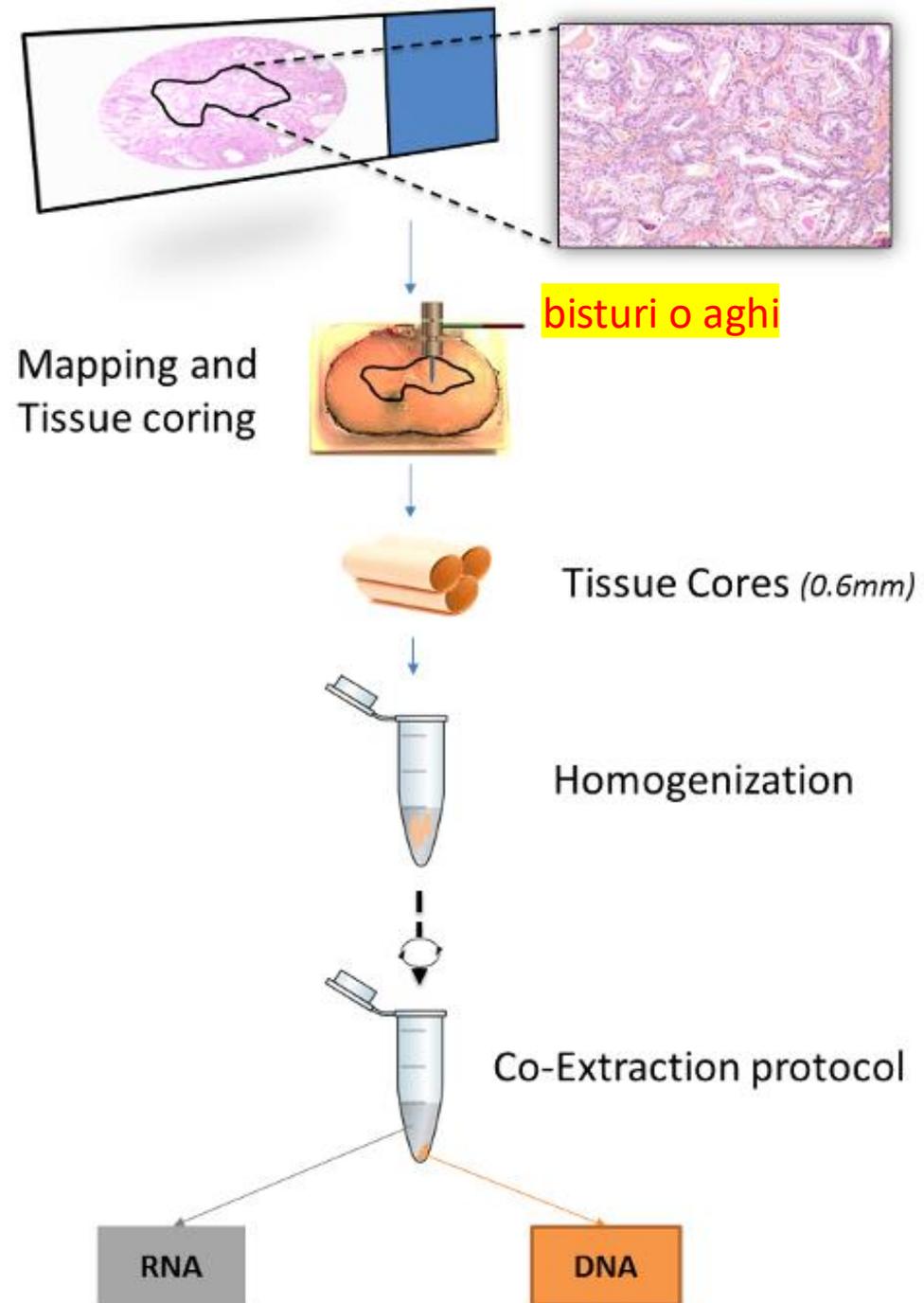
- *tessuto fresco / congelato*
- *tessuto fissato ed incluso in paraffina*

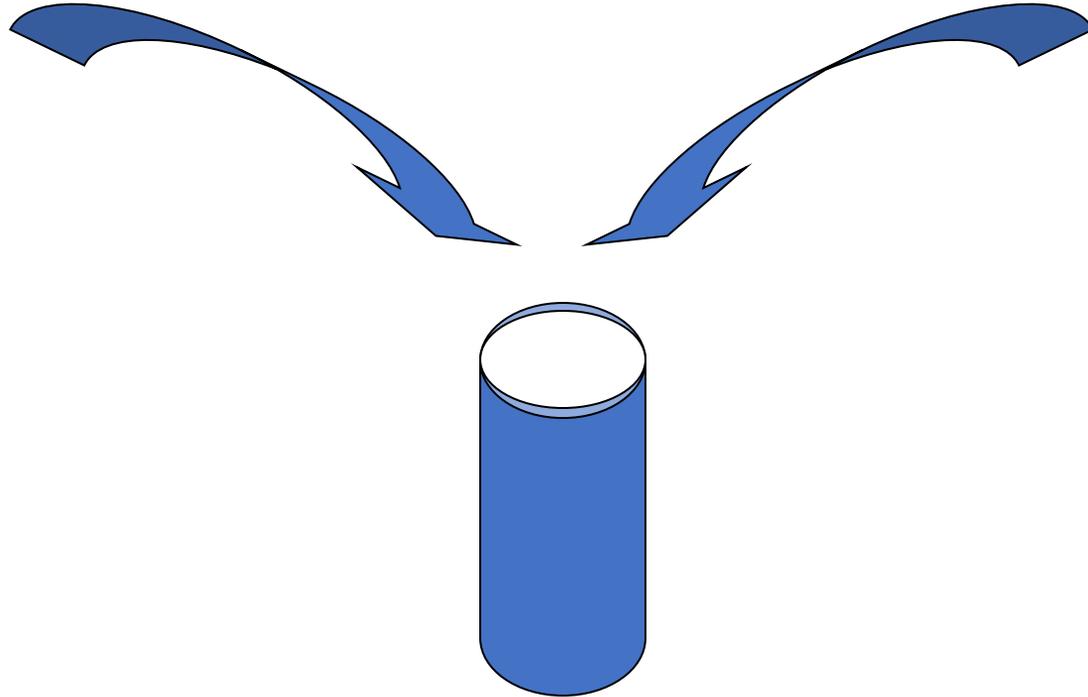
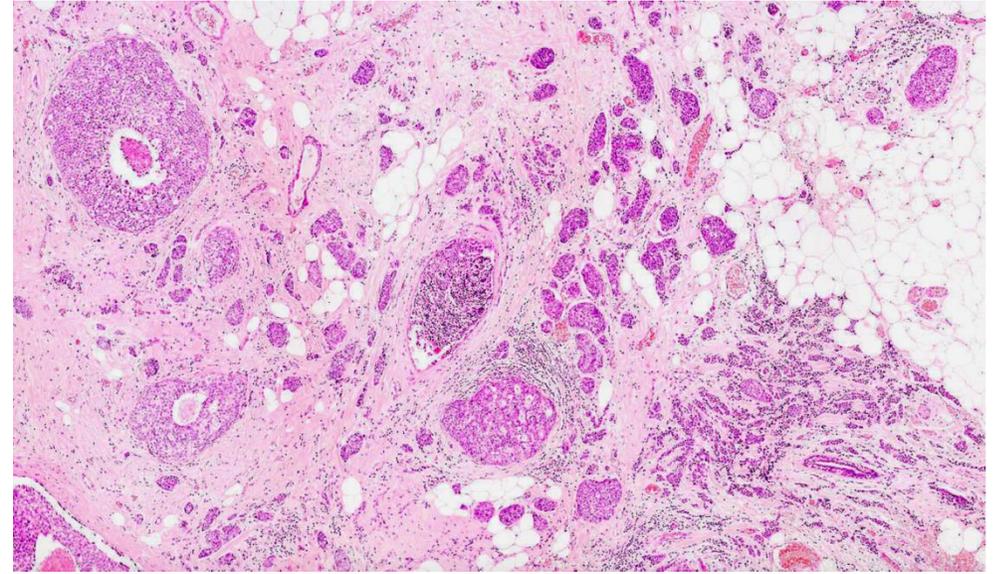
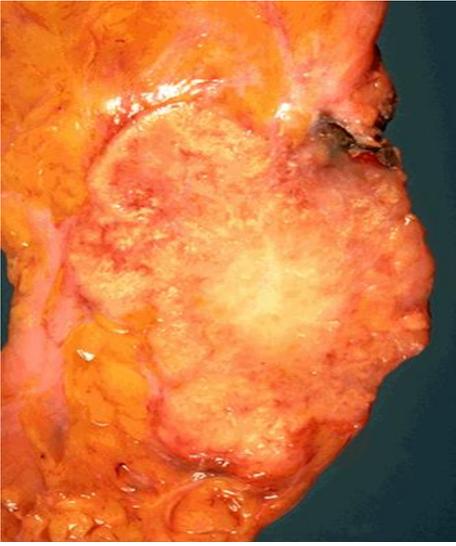
## Fase pre-analitica

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.)



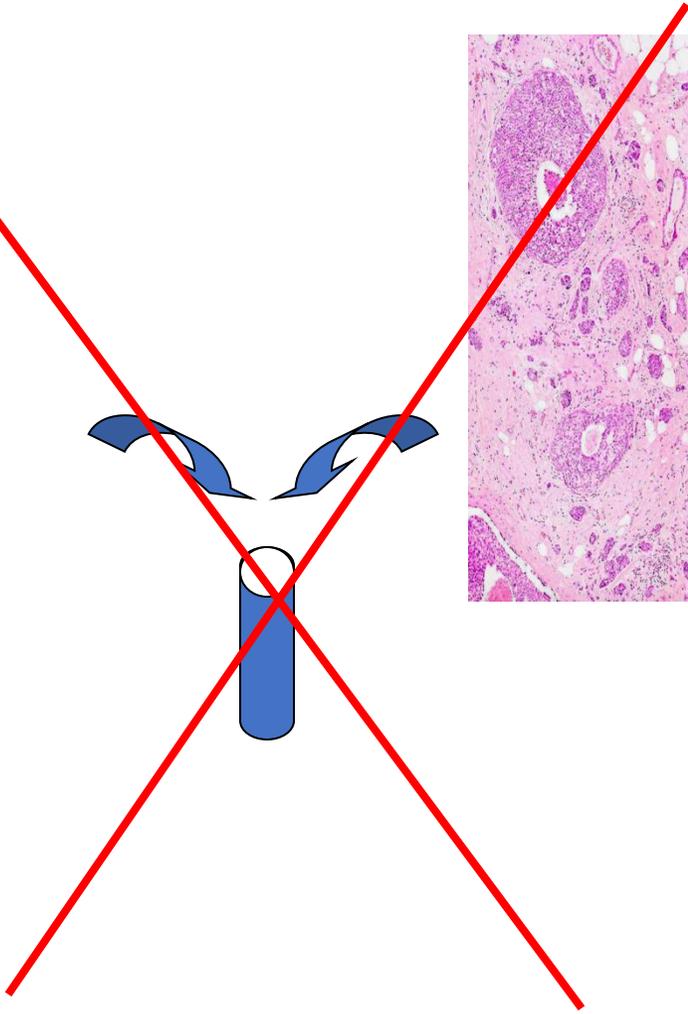
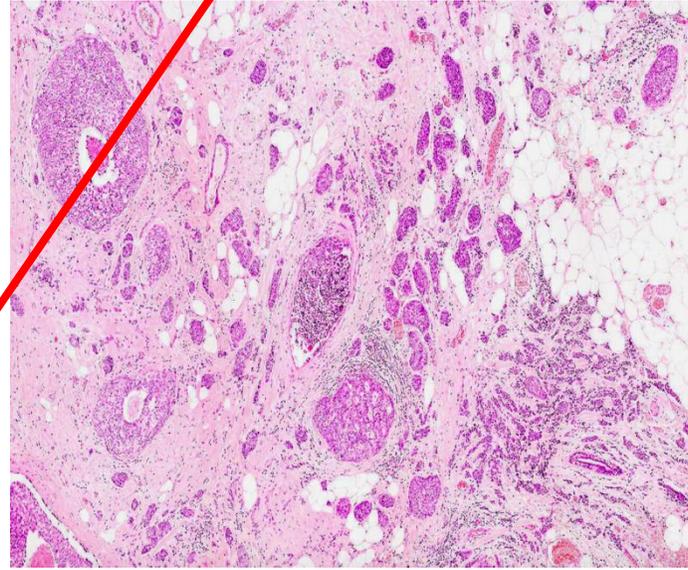
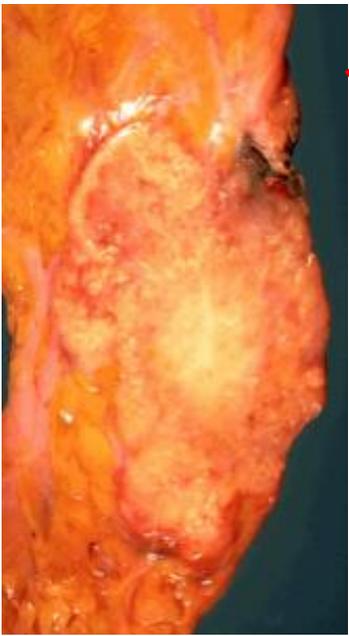


# PATOLOGIA MOLECOLARE

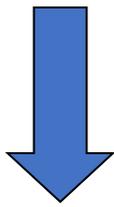
fase pre - analitica

estrazione

selezionare ed “arricchire” la  
popolazione cellulare da studiare

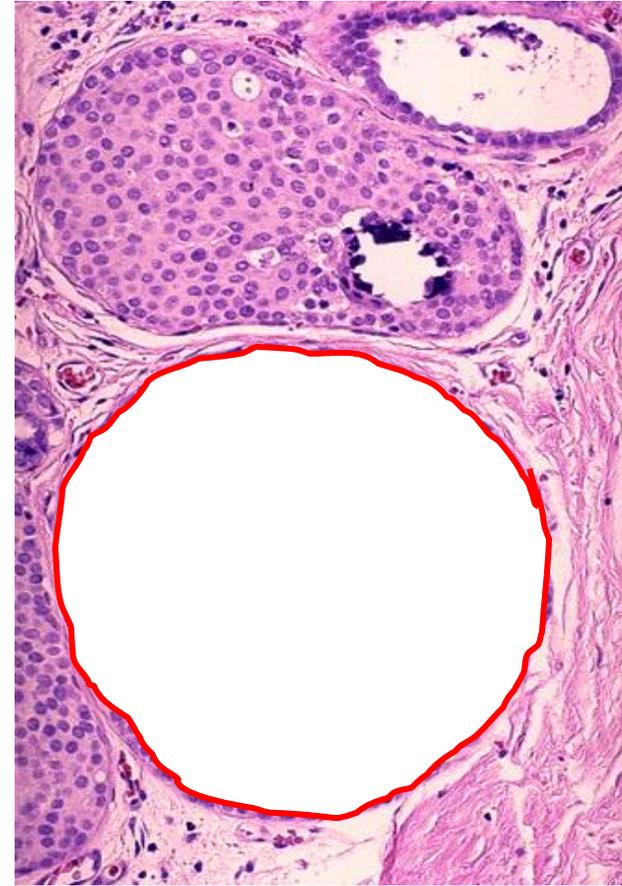
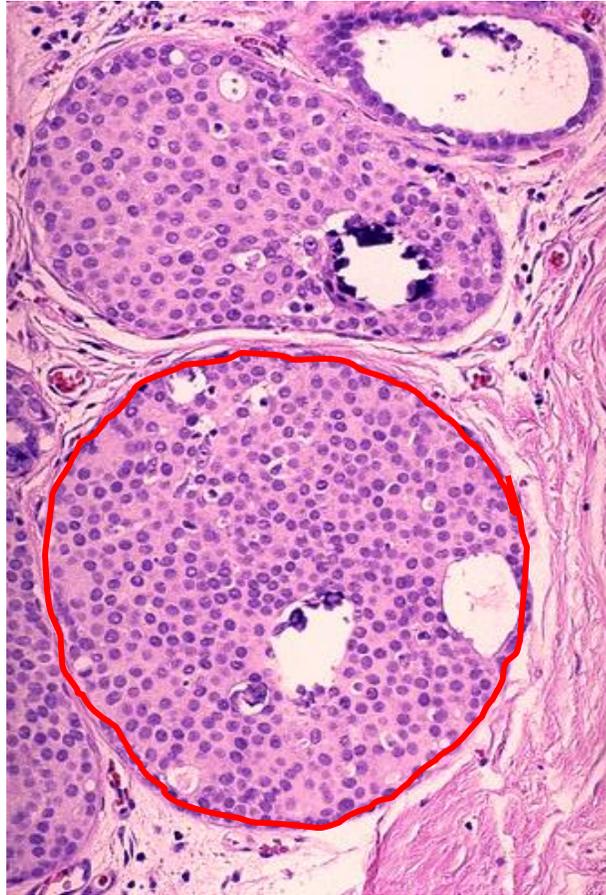


le “molecole” delle popolazioni cellulari diverse da quella da studiare contaminano quest’ultima

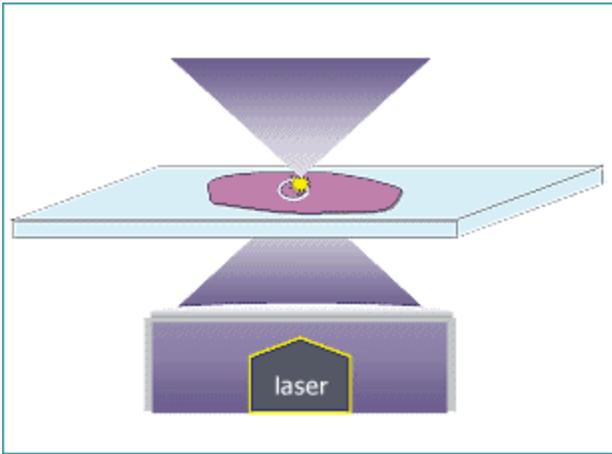
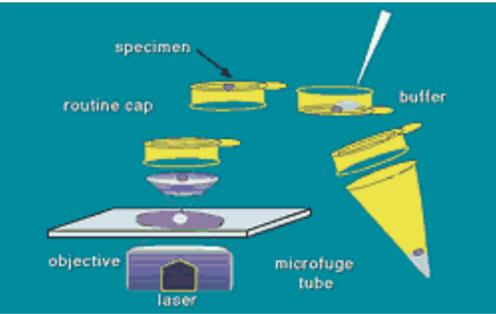
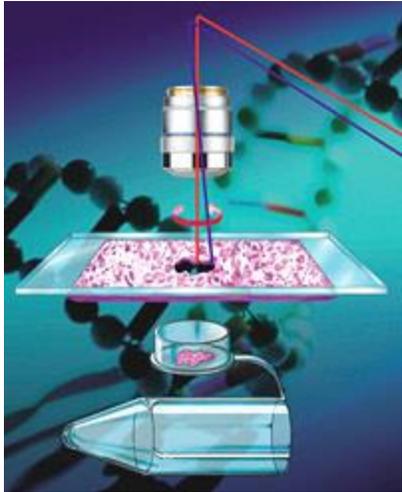
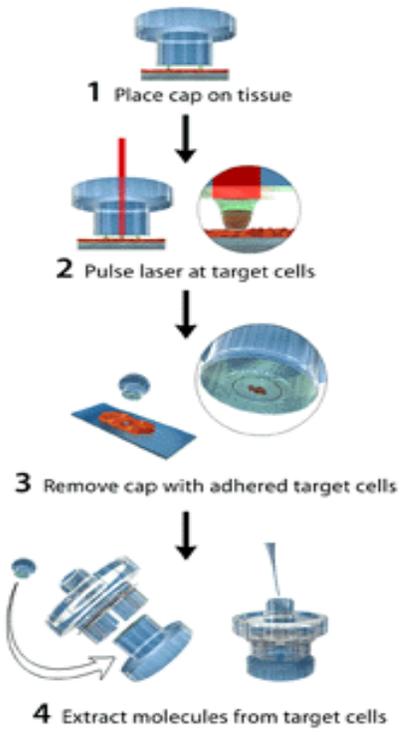


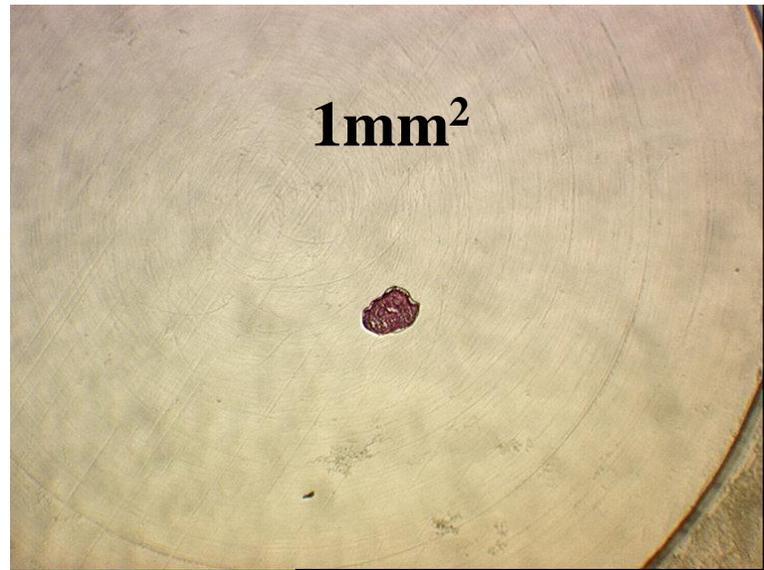
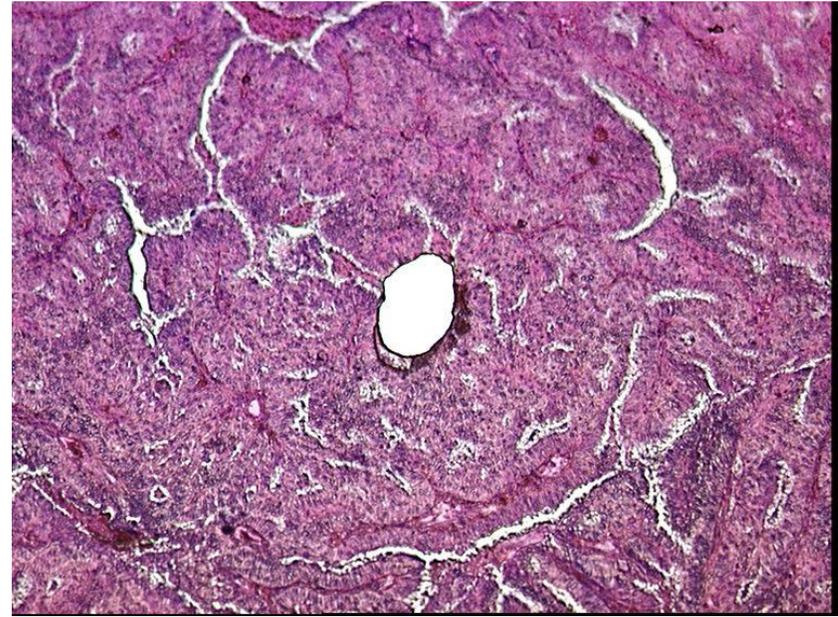
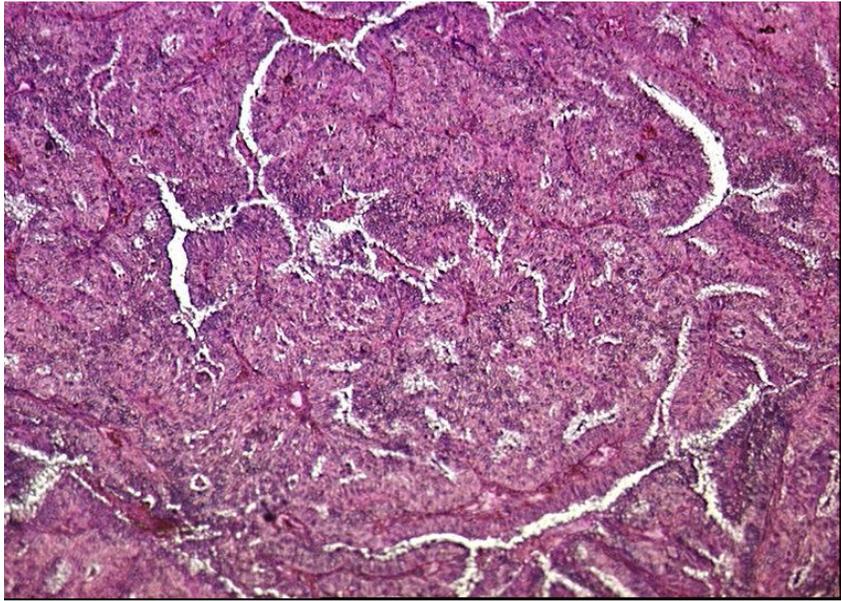
risultato falsato

# *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).
  - I **metodi di sequenziamento indeterminato** (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** possono essere basati su metodi sviluppati nei singoli laboratori o 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.

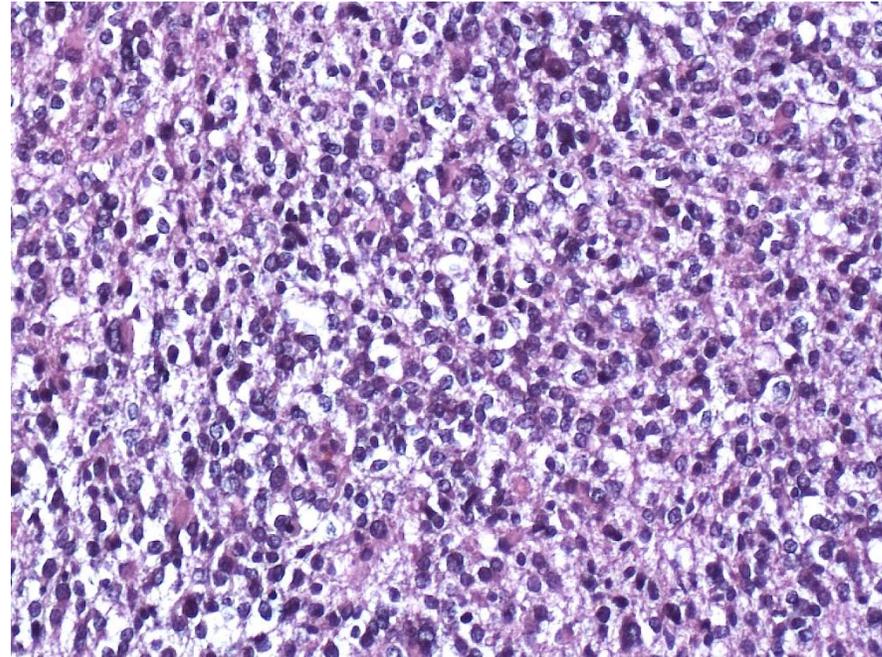
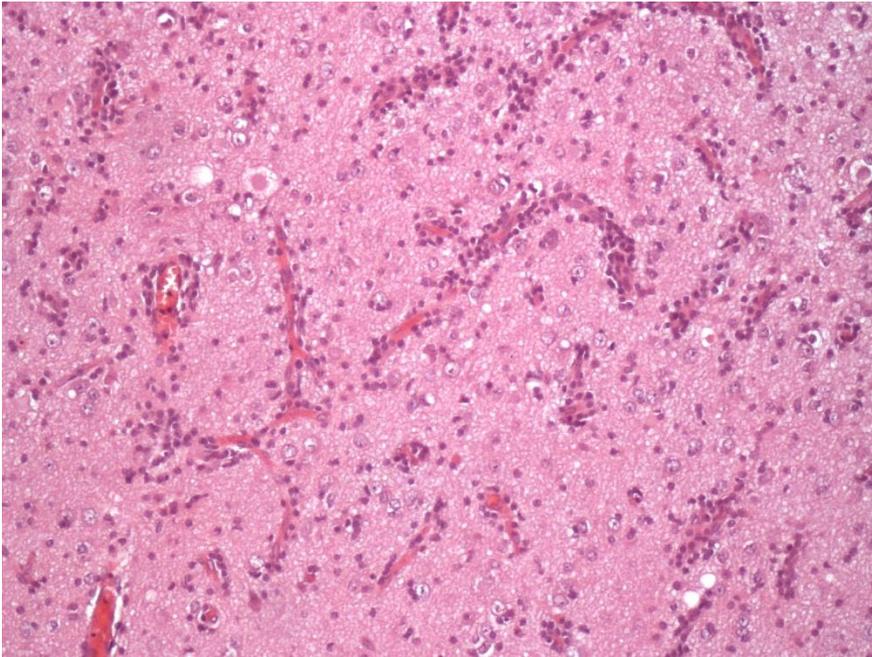
## Altri fattori importanti per la scelta del metodo analitico sono:

### Sensibilità

La sensibilità dei metodi è crescente a partire dal sequenziamento diretto (20-30%), pirosequenziamento, fino al 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).



**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

- **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.

**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*** Sequenziamento DNA / RNA

***b) analisi predittive in situ*** FISH CISH

*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:

MARZIA GIANNACCONE

La copia della presente relazione è documento originale e conservata 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 (IHC), con particolare riferimento per la FISH al tipo di sonda e alla ditta produttrice, per l'IHC 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, Kretech Diag

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 2000; 101:401-405).

Analisi FISH della regione cromosomica 1p36:

Il rapporto tra i segnali della sonda specifica per la regione 1p36 e quella di riferimento (gene HIPK2, spectrum Aqua) è di 0,85 su 100 nuclei analizzati (Smith et al. JCO 18:636-645, 2000). L'ibridazione in tandem del gene BRAF e KIAA1549 è presente in 30% dei nuclei.

Refert

I tumori in fase di crescita avanzata, infiltranti e/o metastatizzanti, rappresentano una delle principali sfide della medicina moderna. Oltre ai classici approcci chemioterapici sono stati progressivamente sviluppati nuovi protocolli basati sull'uso di farmaci innovativi a bersaglio molecolare.

Studio delle mutazioni geniche:

- Non Small-Cell Lung Cancer (NSCLC),
- carcinoma del colon-retto
- tumore stromale gastrointestinale (GIST)
- melanoma in stadio avanzato.
- Carcinoma mammella

## Esami predittivi di risposta alla terapia

1. Esami predittivi di risposta alla terapia su **Tessuto Tumorale**
2. Esami predittivi di risposta alla terapia su **Biopsia Liquida**
3. Esami di **Farmacogenetica**
4. Analisi dell'**Instabilità dei Microsatelliti (MSI)**

## Test genetici

1. Analisi di **BRCA1 e 2**
2. **Test genetici** per la predisposizione al cancro

- Tumore del polmone (Non Small-Cell Lung Cancer-NSCLC): analisi mutazionale dei geni *EGFR* e *KRAS*, analisi dei trascritti di fusione *ALK*, *ROS1*

Tra le alterazioni molecolari più frequenti nel NSCLC vi sono: le mutazioni del gene *EGFR* (10-15% dei pazienti caucasici), *KRAS* (20-30%), i riarrangiamenti di *ALK* (3-7%), *ROS1* (1-2%), *RET* (1-2%) e *NTRK* (0.5-1%), le mutazioni del gene *BRAF* (2-4%), *ERBB2* (1-2%) e le amplificazioni o mutazioni del gene *MET* (2-4%). In Italia ad oggi sono approvati e rimborsati solo i farmaci inibitori delle tirosino-chinasi di EGFR, ALK e ROS1, le altre alterazioni possono essere utili ai fini dell'accesso a studi clinici o ai programmi di accesso allargato.

Tra le mutazioni di *EGFR*, sono state identificate mutazioni attivanti a carico degli esoni 18, 19, 20 e 21. Le più frequenti, anche definite come comuni o classiche, sono le delezioni dell'esone 19 (*Ex19dels*) e la mutazione puntiforme dell'esone 21 (*L858R*), che insieme rappresentano circa il 90% di tutte le mutazioni di *EGFR* riscontrate in questi pazienti. Gli inibitori tirosino-chinasici di EGFR (TKI) rappresentano il trattamento di I linea raccomandato nei pazienti con NSCLC avanzato e mutazioni classiche.

Altri marcatori molto importanti in questi pazienti ai fini della scelta del regime terapeutico più appropriato sono *ALK* e *ROS1*. La presenza del riarrangiamento identifica un sottogruppo di pazienti candidabili al trattamento con inibitori tirosino-chinasici di ALK.

- **Tumore colon-retto: analisi mutazionale dei geni *KRAS*, *NRAS* e *BRAF***

Nel paziente con carcinoma del colon-retto metastatico, al momento di intraprendere un trattamento, per impostare una corretta programmazione terapeutica, deve essere effettuata la valutazione dello stato mutazionale dei geni *KRAS* (esoni 2, 3 e 4) e *NRAS* (esoni 2, 3 e 4). La presenza di mutazioni somatiche nei suddetti geni infatti, è un meccanismo di resistenza alla terapia con anticorpi monoclonali anti-EGFR.

Circa il 35% dei pazienti con tumore metastatico del colon-retto presentano mutazioni somatiche a carico del gene *KRAS* mentre il 3-5% di questi pazienti presentano mutazioni somatiche a carico del gene *NRAS*.

Pertanto EMA e AIFA hanno ristretto l'impiego di anticorpi monoclonali anti-EGFR ai soli pazienti *RAS* wild type.

Le mutazioni di *BRAF* invece sono presenti in circa il 10% dei pazienti con carcinoma del colon-retto, la mutazione più frequente è la V600E e la presenza di tale mutazione è associata ad una peggiore prognosi.

- **Melanoma: analisi mutazionale del gene *BRAF***

Nel melanoma, il gene *BRAF* è mutato nel 45-50% dei casi; la mutazione più diffusa (85-90% dei casi) è rappresentata dalla sostituzione V600E. Le rimanenti mutazioni *BRAF* si verificano spesso sullo stesso codone: V600K (la più frequente <10% dei casi), V600D e V600R.

La mutazione *BRAF*-V600 ha oggi un significato prevalentemente predittivo nella gestione del paziente con melanoma, in quanto identifica una potenziale sensibilità al trattamento con la combinazione di BRAF e MEK inibitori.

- **Tumore stromale gastrointestinale (GIST): analisi mutazionale del gene *KIT***

L'analisi degli esoni 9 e 11 del gene *KIT* è necessaria per selezionare la migliore strategia terapeutica nei pazienti con tumore stromale gastrointestinale (GIST) in stadio avanzato. Più del 80% dei GIST è caratterizzato da una mutazione specifica a carico del gene *KIT*, di queste circa il 65% è presente sull'esone 11. Tali mutazioni sono responsabili di un'attivazione costitutiva del recettore, che sembra rivestire un ruolo cardine nel processo di sviluppo di questi tumori. Lo stato mutazionale di *KIT* sembra essere predittivo della risposta clinica agli inibitori tirosin-chinasici di KIT.

## Metodiche per lo studio delle alterazioni molecolari del DNA

I test sono effettuati su DNA di pazienti con **tumore del polmone NSCLC, tumore del colon-retto e melanoma**, estratto da sezioni di tessuto tumorale fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE), in cui sia indicata la zona tumorale e la relativa percentuale di cellule tumorali presenti.

Le tecnologie utilizzate sono:

- Analisi NGS mediante il pannello *Ion AmpliSeq Colon and Lung Cancer Research Panel V2*
- Analisi mediante sequenziamento automatizzato diretto
- Analisi mediante Real-Time PCR

- **Analisi NGS mediante il pannello *Ion AmpliSeq Colon and Lung Cancer Research Panel V2***

Presso il Laboratorio di Biologia Molecolare viene utilizzato il Pannello *Ion AmpliSeq Colon and Lung Cancer Research Panel V2* (Thermo Fisher Scientific) che prevede l'analisi molecolare per la ricerca di mutazioni in 22 geni (*KRAS, EGFR, BRAF, PIK3CA, AKT1, ERBB2, PTEN, NRAS, STK11, MAP2K1, ALK, DDR2, CTNNB1, MET, TP53, SMAD4, FBXW7, FGFR3, NOTCH1, ERBB4, FGFR1, FGFR2*) potenzialmente associati allo sviluppo neoplastico.

Il sequenziamento NGS viene eseguito su piattaforma Ion Torrent PGM o Ion Torrent S5 (Thermo Fisher Scientific), l'analisi dei dati viene effettuata tramite le pipeline dei software Ion Reporter e Torrent Suite, per la visualizzazione delle "reads" viene utilizzato IGV (Integrative Genomics Viewer), l'allineamento e la chiamata delle varianti viene fatto rispetto al genoma di riferimento hg19.

La sensibilità analitica del test consente la visualizzazione delle varianti fino ad una frequenza allelica del 3%.

- **Analisi mediante sequenziamento automatizzato diretto**

L'analisi dei principali esoni dei geni *EGFR* (esoni 18-19-20-21), *KRAS* (esoni 2-3-4), *BRAF* (esoni 11-15), *MET* (esoni 14-15), *ERBB2* (esone 20), *PIK3CA* (esoni 10-21), *KIT* (esoni 9-11) può essere eseguita inoltre, nei casi selezionati per le conferme anche mediante sequenziamento automatizzato diretto Sanger, utilizzando il Sequenziatore 3500 GA (Thermo Fisher Scientific). La sensibilità analitica di questa metodica consente la visualizzazione delle varianti fino ad una frequenza allelica del 10-15% a seconda della mutazione.

- **Analisi mediante Real-Time PCR**

L'analisi delle principali mutazioni del gene *EGFR* può essere eseguita inoltre, per le conferme dei casi dubbi e/o nei casi urgenti anche mediante real-time PCR utilizzando il kit CE IVD Easy PGX Ready e relativo apparecchio EasyPGX qPCR instrument (Diatech Pharmacogenetic) e l'Easy PGX Software per l'analisi dei dati. La sensibilità analitica di questo kit consente la visualizzazione delle varianti fino ad una frequenza allelica che va dal 5% allo 0.5%, a seconda della mutazione che si sta analizzando.

## **Metodiche per lo studio dei Trascritti di Fusione**

I test sono eseguiti principalmente su RNA di pazienti con **tumore del polmone NSCLC**, estratto da sezioni di tessuto tumorale fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE) in cui sia indicata la zona tumorale e la relativa percentuale di cellule tumorali presenti.

Le tecnologie utilizzate sono:

- **Analisi NGS mediante il pannello *Ion AmpliSeq RNA Fusion Lung Cancer Research Panel***
- **Analisi mediante Real-Time PCR**

- **Analisi NGS mediante il pannello *Ion AmpliSeq RNA Fusion Lung Cancer Research Panel***

Il sequenziamento NGS può essere utilizzato anche per la ricerca dei riarrangiamenti, in particolare presso il Laboratorio di Biologia Molecolare viene utilizzato il Pannello *Ion AmpliSeq RNA Fusion Lung Cancer Research Panel* (Thermo Fisher Scientific). È un test NGS che consente di ricercare e analizzare più di 70 trascritti di fusione relativi a quattro geni rilevanti nel tumore del polmone: *ALK, ROS1, RET, NTRK1*. Il pannello include anche 5 geni che fungono da controlli positivi.

L'analisi viene eseguita su RNA estratto da sezioni di tessuto tumorale fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE) mediante NGS su piattaforma Ion Torrent PGM o Ion Torrent S5 (Thermo Fisher Scientific). L'analisi dei dati è effettuata tramite le pipeline dei software Ion Reporter e Torrent Suite e la visualizzazione delle "reads" tramite IGV.

- **Analisi mediante Real-Time PCR**

L'analisi dei principali trascritti di fusione può essere eseguita inoltre, per le conferme dei casi dubbi e/o nei casi urgenti, anche mediante real-time PCR utilizzando il kit CE-IVD Easy PGX Ready ALK/ROS1/RET/MET e relativo apparecchio EasyPGX qPCR instrument (Diatech Pharmacogenetic) e l'Easy PGX Software per l'analisi dei dati.

## 2. ESAMI PREDITTIVI DI RISPOSTA ALLA TERAPIA SU BIOPSIA LIQUIDA

### Cosa si intende per Biopsia Liquida

Per biopsia liquida si intende l'analisi di biomarcatori tumorali mediante un prelievo di fluidi biologici (sangue, urine, liquor...) come surrogato del tessuto neoplastico, per ottenere informazioni utili ai fini diagnostici, prognostici o predittivi di risposta alla terapia.

L'analisi del ctDNA isolato dal plasma separato dal sangue periferico, rappresenta oggi la principale applicazione della biopsia liquida nella pratica clinica.

### Applicazioni cliniche della biopsia liquida

Il principale campo di applicazione della biopsia liquida ad oggi è rappresentato dall'identificazione di fattori predittivi di risposta alla terapia in pazienti con malattia avanzata, in particolare per l'analisi mutazionale del gene *EGFR* in pazienti con NSCLC in stadio avanzato.

Esistono due diversi scenari clinici in cui questo test trova applicazione:

**1.L'analisi mutazionale del gene *EGFR* in pazienti *naïve* con NSCLC avanzato al momento della DIAGNOSI**

**2.L'analisi mutazionale del gene *EGFR* in pazienti con NSCLC avanzato al momento della PROGRESSIONE di malattia a EGFR-TKIs**

## 1. L'analisi mutazionale del gene **EGFR** in pazienti **naïve** con NSCLC avanzato al momento della DIAGNOSI

La determinazione dello stato mutazionale di **EGFR** per la scelta della migliore strategia terapeutica è attualmente raccomandata in tutti i pazienti selezionati con NSCLC avanzato. Nonostante il tessuto tumorale rappresenti il campione d'elezione su cui eseguire l'analisi, in circa il 20% dei casi non è disponibile o non è sufficiente per qualità e/o quantità per effettuare le analisi molecolari previste.

Nel 2014 l'EMA (European Medicines Agency), ha approvato l'utilizzo del ctDNA per la determinazione dello stato mutazionale di **EGFR** su biopsia liquida come possibile alternativa all'analisi su tessuto tumorale, in pazienti con NSCLC avanzato in cui la quantità/qualità del tessuto disponibile non siano sufficienti per eseguire il test.

## 2. L'analisi mutazionale del gene **EGFR** in pazienti con NSCLC avanzato al momento della PROGRESSIONE di malattia a EGFR-TKIs

L'approvazione e la rimborsabilità da parte di AIFA dell'inibitore di terza generazione di EGFR per il trattamento di pazienti con NSCLC localmente avanzato o metastatico, positivo per la mutazione **T790M**, rende necessaria la rivalutazione dello stato mutazionale del gene **EGFR** al momento della progressione radiologica dopo trattamento con EGFR-TKIs per definire la migliore strategia terapeutica.

A causa dell'inferiore sensibilità del test, nel caso di un risultato negativo, l'analisi deve essere ripetuta sul tessuto tumorale prelevato mediante re-biopsia.

## Metodiche per lo studio delle alterazioni molecolari del ctDNA

Vista la scarsa quantità e la natura molto frammentata del ctDNA, la ricerca di biomarcatori di origine tumorale richiede metodiche dedicate e molto efficienti per l'estrazione e molto sensibili per la fase analitica. Tra le più utilizzate vi sono l'NGS, la Digital PCR e la Real-Time PCR.

- **Analisi NGS mediante il pannello *Oncomine™ Lung Cell-Free Total Nucleic Acid Research***

Presso il Laboratorio di Biologia Molecolare per l'analisi NGS su biopsia liquida, viene utilizzato il pannello NGS *Oncomine™ Lung Cell-Free Total Nucleic Acid Research* (Thermo Fisher Scientific) che analizza il Total Nucleic Acid (TNA) estratto da plasma. Questo saggio prevede la ricerca di mutazioni su 12 geni (*ALK, BRAF, EGFR, ERBB2, KRAS, MAP2K1, MET, NRAS, PIK3CA, RET, ROS1, TP53*) valutati per specifiche regioni target potenzialmente associati allo sviluppo neoplastico, l'analisi di trascritti di fusione relativi a 3 geni rilevanti nel tumore del polmone (*ALK, ROS1, RET*, per un totale di 49 fusioni) e lo studio del Copy Number Variation (CNV) e dello skipping dell'esone 14 del gene MET, con una LOD (Limite di Determinazione) che può arrivare allo 0.05% di frequenza allelica, una sensibilità di circa 90% e una specificità maggiore del 99%.

Il sequenziamento NGS viene eseguito su piattaforma Ion Torrent PGM o S5 (Thermo Fisher Scientific), l'analisi dei dati viene effettuata tramite le pipeline dei software Ion Reporter e Torrent Suite, per la visualizzazione delle "reads" viene utilizzato IGV (Integrative Genomics Viewer), l'allineamento e chiamata delle varianti viene fatto rispetto al genoma di riferimento hg19.

#### 4. Analisi dell'Instabilità dei Microsatelliti (MSI)

##### **Cosa si intende per Analisi dell'Instabilità dei Microsatelliti (MSI)**

I microsatelliti sono brevi sequenze di DNA ripetute da 15 a 30 volte e disperse nel genoma umano. Proprio per la loro natura, sono maggiormente esposti a variazioni della loro lunghezza durante la replicazione. Il mancato funzionamento del sistema di riparazione del MisMatch Repair (MMR) impedisce la correzione di questi errori favorendo l'instabilità delle sequenze microsatellite. Pertanto, l'instabilità dei microsatelliti (microsatellite instability, MSI) può essere considerata come un marcatore del mancato funzionamento del sistema di riparazione del MMR presente in diversi tipi di tumori, tra i quali i più rappresentati sono il tumore del colon, dell'endometrio ed i tumori gastrici. La MSI rappresenta la principale alterazione genetica (~90-95%) nella sindrome di Lynch (o cancro colon-rettale ereditario non poliposico, HNPCC) ed è riscontrata nel 15% dei tumori colon-rettali sporadici.

## **Applicazioni cliniche dell'Instabilità dei Microsatelliti**

Gli scenari clinici in cui viene richiesta l'analisi dell'instabilità dei microsatelliti (MSI) sono principalmente due:

- 1. come test di screening in tutti i pazienti con sospetta Sindrome di Lynch per identificare un deficit del MMR che la caratterizza (Vedi anche TEST GENETICI-Test genetici per la predisposizione al cancro).**
- 2. nei pazienti con carcinoma del colon-retto (CRC) in stadio II, come ausilio nella decisione della somministrazione o meno della terapia adiuvante, vista la prognosi estremamente favorevole di questi pazienti.**

In base all'analisi della MSI, il CRC può essere distinto in due diverse categorie: tumori con MMR difettivo e con alti livelli di instabilità dei microsatelliti (MSI-H, circa il 15%) e tumori con MMR funzionante e con bassi livelli di MSI (MSI-L, circa l'85%). I CRC MSI-H sono associati ad un elevato tasso di mutazione, infiltrazione di cellule immunitarie e prognosi migliore rispetto ai tumori con MSI basso o assente.

## **Come viene eseguito il test**

Il test viene eseguito su DNA estratto da sezioni di tessuto tumorale fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE), in cui sia indicata la zona tumorale e la relativa percentuale di cellule tumorali presenti, mediante l'utilizzo del kit CE-IVD Easy PGX Ready MSI e relativo apparecchio EasyPGX qPCR instrument (Diatech Pharmacogenetic).

Questo kit consente il rilevamento di 8 marcatori "quasi-monomorfici" mononucleotidici: BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-22, NR-24, NR-27, CAT-25 e MONO-27 mediante PCR Real Time e successiva analisi dei target mediante l'utilizzo del Easy PGX Software.

Talvolta potrebbe essere necessario anche il DNA estratto da sangue periferico raccolto in una provetta con anticoagulante (EDTA).

## Test genetici

La Genetica Clinica Oncologica (GCO) si occupa dello studio dei geni responsabili di alcune forme non rare di tumori ereditari quali il tumore ereditario del colon-retto non associato a poliposi (o sindrome di Lynch) ed il tumore ereditario della mammella e dell'ovaio. A oggi, le alterazioni genetiche associate ad un aumentato rischio ereditario di tumore sono: *BRCA1* e *BRCA2* per le neoplasie della mammella e dell'ovaio e *MHL1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *APC* e *MUTYH* per i tumori ereditari del colon-retto. Recentemente è stata definita una rara forma di cancro gastrico diffuso ereditario, legata a mutazioni germinali del gene *CDH1* che conferiscono un aumentato rischio di sviluppare non solo questo particolare tipo di carcinoma gastrico ma anche, nelle donne, il carcinoma lobulare della mammella.

## Analisi di *BRCA1* e *2*

*BRCA1* e *BRCA2*, due geni oncosoppressori, codificano per proteine coinvolte nella riparazione e nella ricombinazione de DNA, nel controllo del ciclo cellulare e nella trascrizione. Le mutazioni nei geni *BRCA1* e *BRCA2* possono essere ereditate secondo un modello autosomico dominante, oppure insorgere *de novo* e sono associate ad un aumentato rischio di sviluppare tumore della mammella o dell'ovaio.

Recenti studi hanno riportato che le mutazioni ereditarie dei geni *BRCA1* o *BRCA2* aumentano sensibilmente il rischio di tumori alla prostata, di tumori al colon, ma anche di tumori al pancreas, alle tube di Falloppio e di melanoma.

## Analisi di **BRCA1-2** nel carcinoma della mammella

Per quanto riguarda il carcinoma mammario, l'analisi del BRCA1-2 viene eseguita principalmente con lo scopo di valutare l'eventuale **predisposizione ereditaria allo sviluppo di tumori**.

I/le pazienti (donne sane o donne e uomini già con una diagnosi di carcinoma mammario) che rispondano a determinati requisiti clinici e/o familiari, vengono indirizzati verso una consulenza genetica con lo scopo di stabilire se il/la paziente possa essere o meno candidabile al test **BRCA**.

I criteri per l'invio alla consulenza genetica oncologica, secondo le linee guida AIOM 2019 sono:

- **Storia personale di:**

- Carcinoma mammario maschile
- Donna con carcinoma mammario e carcinoma ovarico;
- Donna con carcinoma mammario < 36 anni
- Donna con carcinoma mammario triplo negativo < 60 anni;
- Donna con carcinoma mammario bilaterale < 50 anni;

- **Storia personale di carcinoma mammario < 50 anni e familiarità di primo grado per:**

- Carcinoma mammario < 50 anni;
- Carcinoma ovarico non mucinoso o borderline a qualsiasi età;
- Carcinoma mammario bilaterale;
- Carcinoma mammario maschile;

- **Storia personale di carcinoma mammario > 50 anni e familiarità per carcinoma mammario, ovarico in 2 o più parenti in primo grado\* tra loro (di cui uno in primo grado con lei)**

- **Storia familiare di:**

## Analisi di *BRCA1-2* nel carcinoma ovarico

Per quanto riguarda i carcinomi dell'ovaio, due sono le possibili applicazioni del test BRCA: come test di predisposizione ereditaria allo sviluppo di tumori e come test predittivo di efficacia alle terapie antitumorali.

1. Il **test per la predisposizione ereditaria** allo sviluppo di tumori è consigliato alla diagnosi a tutte le pazienti con carcinoma ovarico non mucinoso e non borderline, carcinoma delle tube di Falloppio o carcinoma peritoneale primitivo.

L'eventuale identificazione di una variante patogenetica germinale nei geni BRCA permette di intraprendere un percorso di consulenza oncogenetica nei familiari al fine di identificare i portatori ad alto rischio, cui proporre programmi mirati (sorveglianza clinico-strumentale) di diagnosi precoce dei tumori associati alle sindromi a trasmissione eredo-familiare BRCA-relate e strategie finalizzate alla riduzione del rischio (chirurgia preventiva).

## Analisi del *BRCA1-2* nell'adenocarcinoma del pancreas metastatico

Per quanto riguarda i pazienti con adenocarcinoma del pancreas metastatico, due sono le possibili applicazioni del test BRCA: come test di predisposizione ereditaria allo sviluppo di tumori (pancreas, mammella, ovaio e prostata) e come test predittivo di efficacia alle terapie antitumorali.

1. Come **test di predisposizione ereditaria allo sviluppo di tumori**, la presenza di una variante patogena (VP) del gene *BRCA* in questi pazienti consente ai loro familiari sani l'accesso alla consulenza genetico-oncologica e al test preventivo per la ricerca mirata della VP familiare.

Nel caso di esito positivo, saranno avviati a percorsi di prevenzione primaria (farmacoprevenzione, mastectomia e salpingo-ovariectomia) e secondaria (sorveglianza clinico-strumentale) per la riduzione del rischio di carcinoma mammario e ovario, mentre non esistono ad oggi percorsi definiti di prevenzione del carcinoma pancreatico.

1. È inoltre indicato eseguire il test BRCA come **test predittivo di efficacia alle terapie antitumorali** nei pazienti con adenocarcinoma pancreatico metastatico al momento della diagnosi, giudicati clinicamente in grado di poter tollerare una prima linea contenente un derivato del platino.

## Come viene eseguito il test

Il pannello NGS utilizzato è il *Myriapod NGS-IL BRCA 1-2 panel (Diatech Pharmacogenetic)* che prevede la preparazione di librerie NGS compatibili con la piattaforma Illumina MiSeq e l'analisi dei dati mediante il software Myriapod NGS Data Analysis, per la ricerca di mutazioni dei geni *BRCA1*, *BRCA2* e *PALB2* correlate con la predisposizione genetica al tumore alla mammella e all'ovaio. Il pannello permette di ottenere 302 ampliconi che coprono l'intera sequenza dei geni *BRCA1* e *BRCA2* e tutti gli esoni codificanti e regioni 5' e 3' UTR del gene *PALB2*. Il pannello include quindi anche l'analisi mutazionale di *PALB2*, gene che se mutato innalza il rischio di tumore alla mammella di circa dieci volte rispetto alla media.

La tecnologia NGS ha il vantaggio di consentire la rilevazione di un numero molto ampio di mutazioni, anche in geni diversi, anche quando presenti ad una bassa frequenza allelica.