

Modulo di Diagnostica molecolare su tessuto

LEZIONE 30 ottobre 2019 – Argomenti della lezione

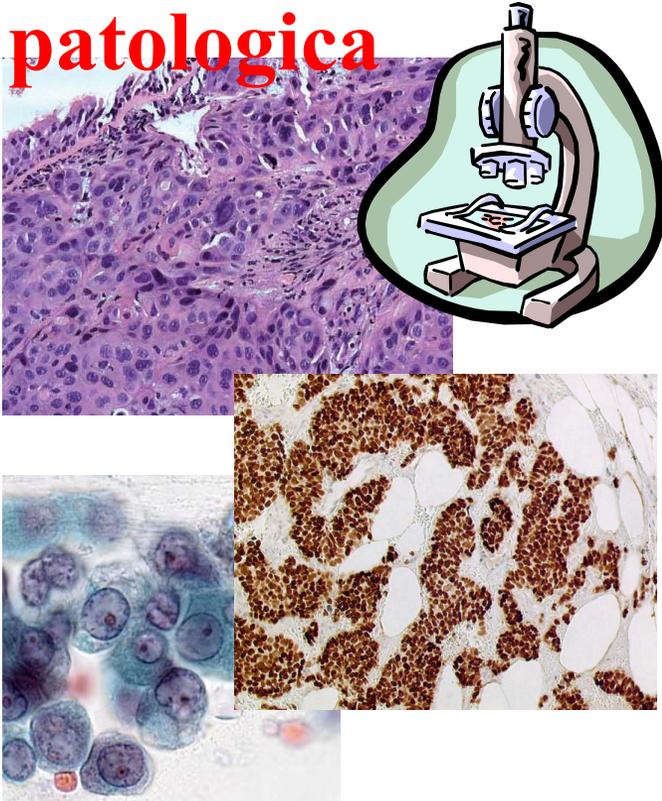
Il flusso di lavoro NELLA DIAGNOSTICA MOLECOLARE

Diagnostica molecolare

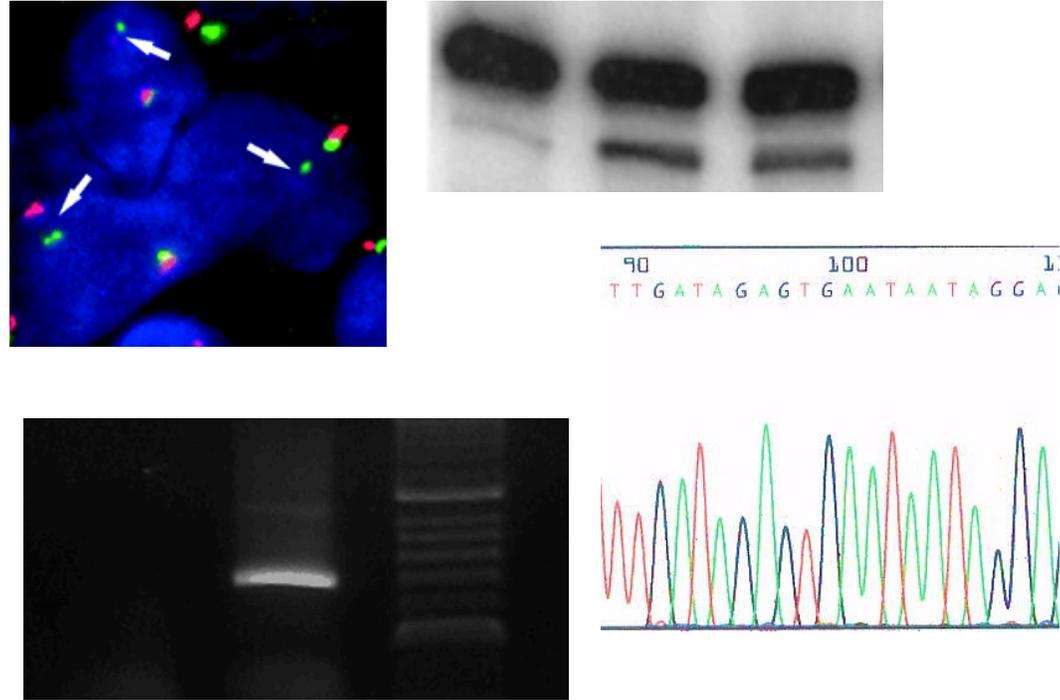
Ruolo fondamentale nella caratterizzazione dei processi patologici, permettendo di effettuare una diagnosi più accurata e adeguata agli sviluppi clinici attuali.

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

Le fasi 1 e 2 sono “Pre-PCR”

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”)

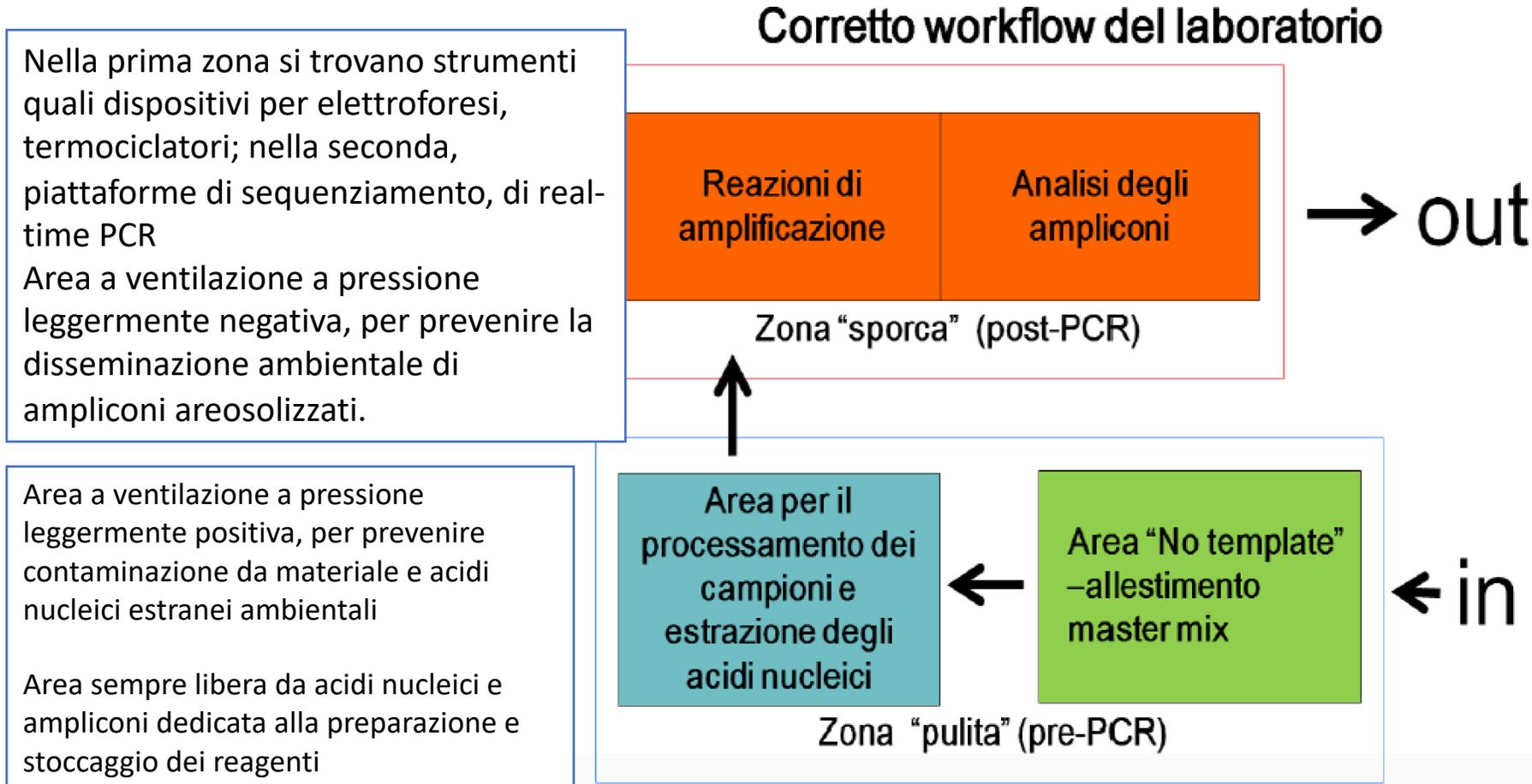
Cross-contaminazione, (“Target template contamination”)

- 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:



Fase pre-analitica

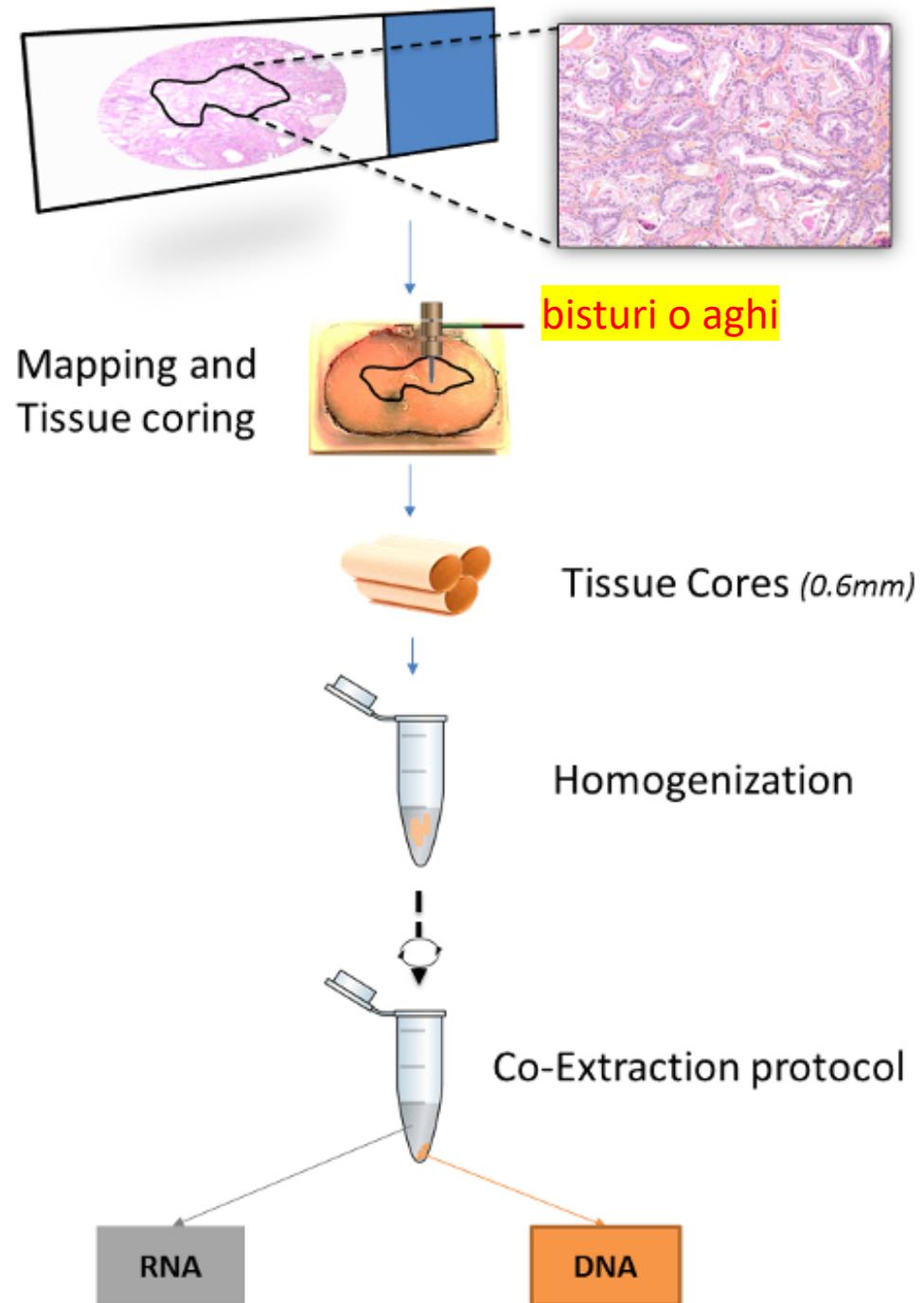
La fase pre-analitica ha inizio con la richiesta dell'esame molecolare.

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).

Fase pre-analitica

Nella fase successiva 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.)



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

Fase analitica

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

Altri 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.

Il sequenziamento diretto secondo Sanger, resta ancora il gold standard metodologico per la conferma di varianti rare o mutazioni complesse

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.

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%.

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

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.

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;

b) analisi predittive in situ:

- 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:

La percentuale di cellule neoplastiche nel campione biologico in esame;

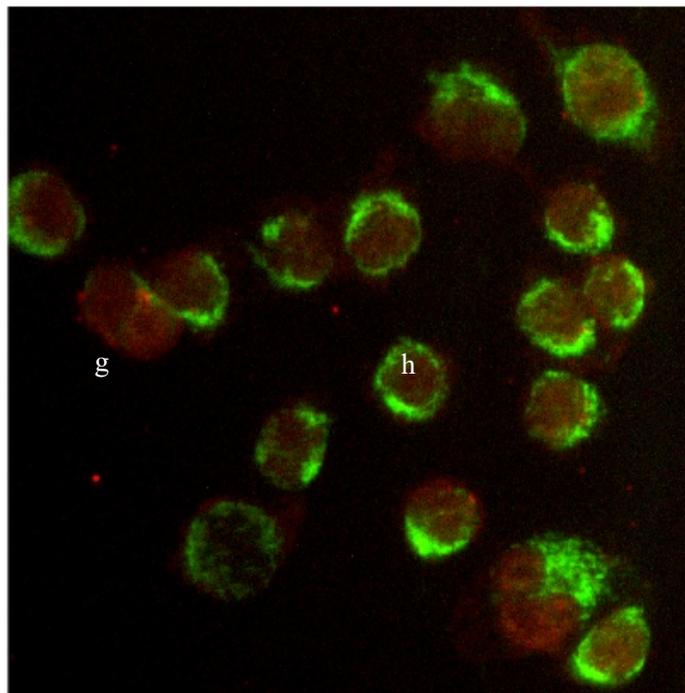
- la procedura impiegata per l'esecuzione dell'analisi, ibridazione in situ a fluorescenza (FISH) e/o immunohistochimica (ICH), con particolare riferimento per la FISH al tipo di sonda e alla ditta produttrice, per l'ICH al clone anticorpale, all'eventuale sistema di amplificazione, alla ditta produttrice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

Tecniche di patologia molecolare

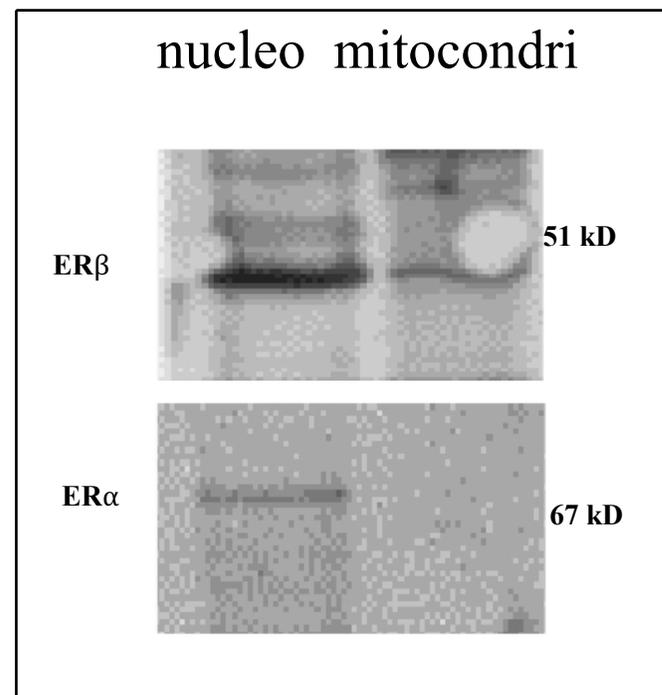
- 1) *morfolologia molecolare*
- 2) *biologia molecolare*

Analisi di proteine

morfologia molecolare
in situ:
immunofluorescenza



biologia molecolare
in vitro:
western blot

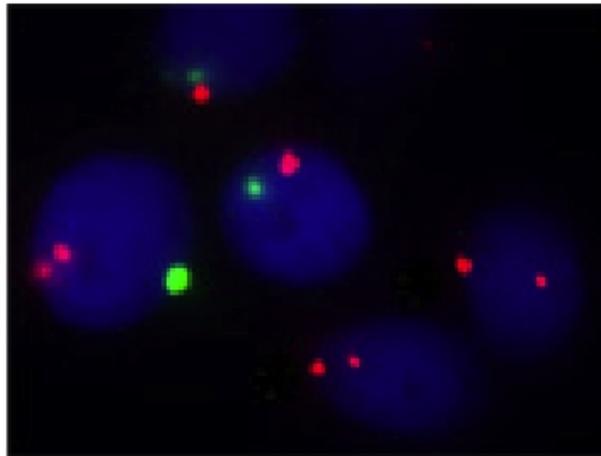


Analisi del DNA

morfologia
molecolare



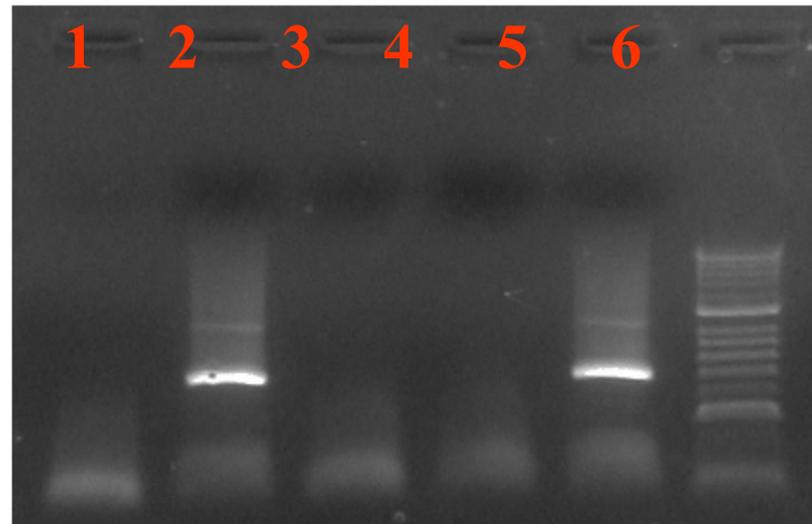
in situ: FISH



biologia
molecolare



in vitro: elettroforesi su gel di
agarosio del prodotto di una PCR



Tecniche di patologia molecolare

1) *morfolologia molecolare*

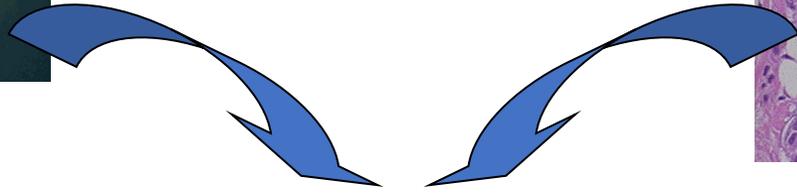
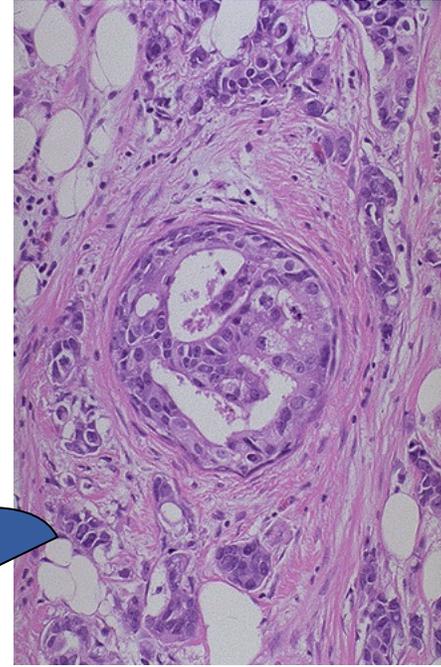
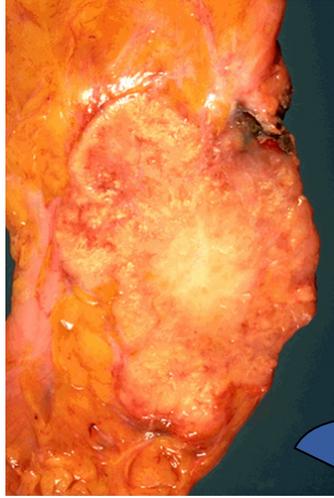
2) *biologia molecolare*

PATOLOGIA MOLECOLARE

fase pre - analitica

estrazione

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



Modulo di Diagnostica molecolare su tessuto

LEZIONE 6 novembre 2019 – Argomenti della lezione

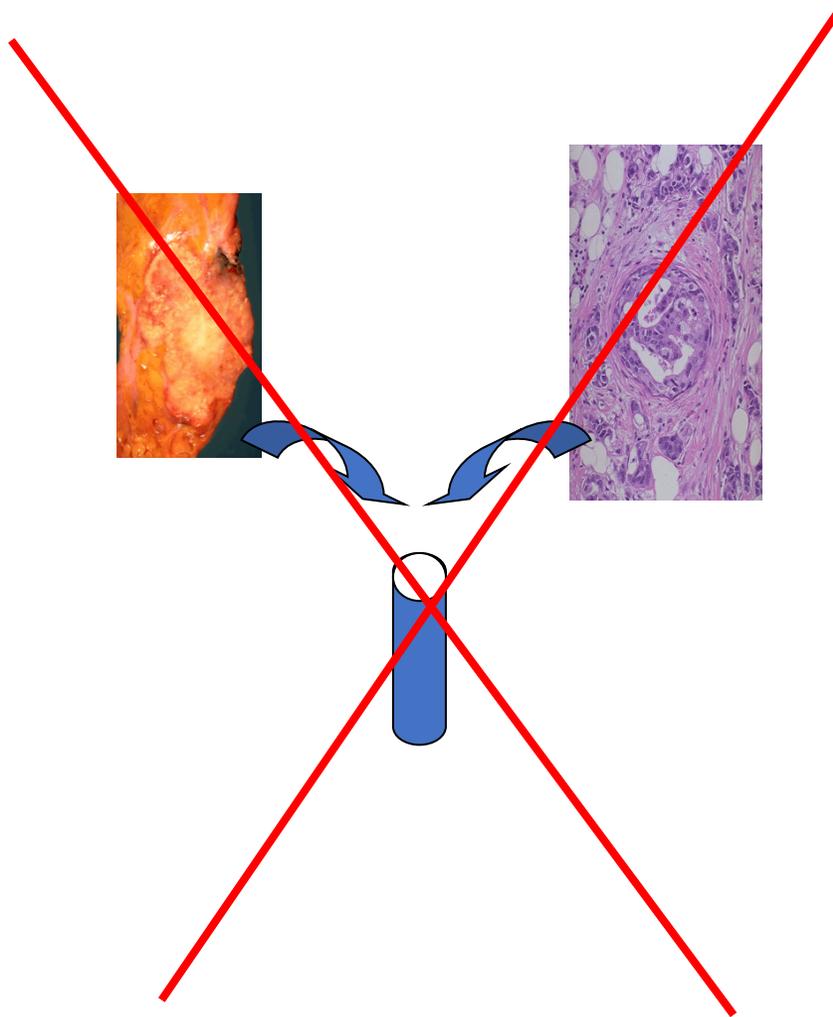
1. Applicazione della diagnostica molecolare nel GIST gastrico.
2. Applicazione della diagnostica molecolare nei tumori della mammella

PATOLOGIA MOLECOLARE

fase pre - analitica

estrazione

*selezionare ed “arricchire” la
popolazione cellulare da
studiare*

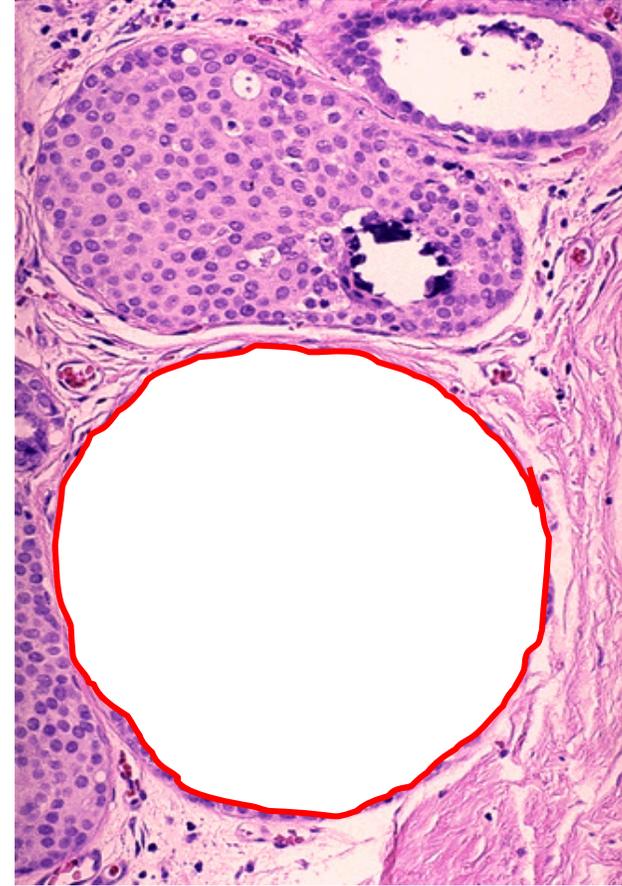


*le “molecole” delle
popolazioni
cellulari diverse da
quella da studiare
contaminano
quest’ultima*

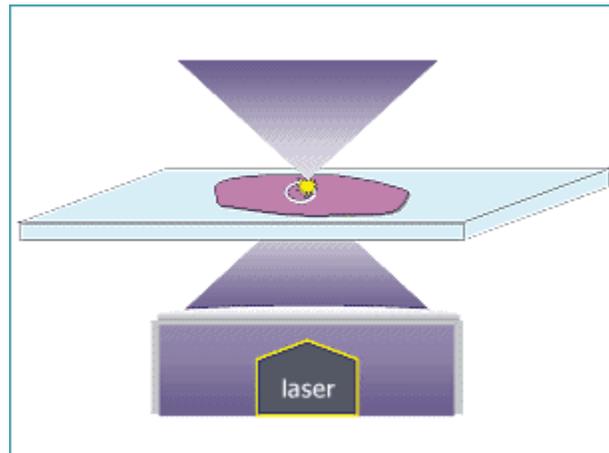
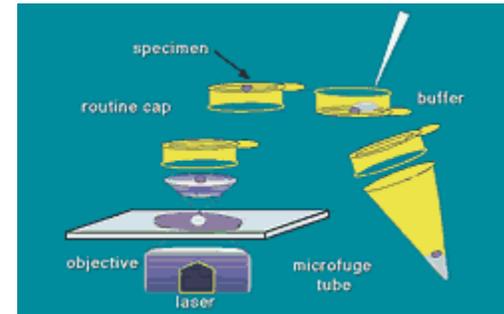
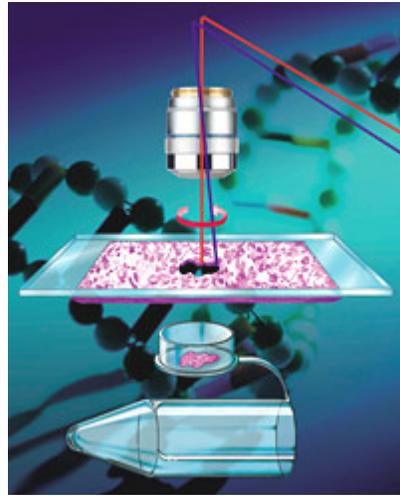
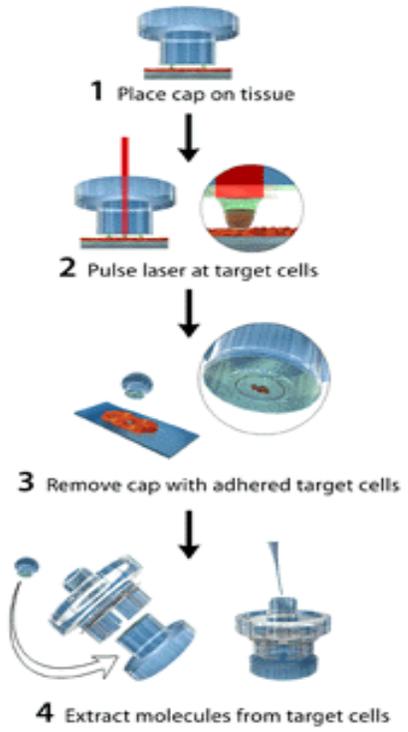


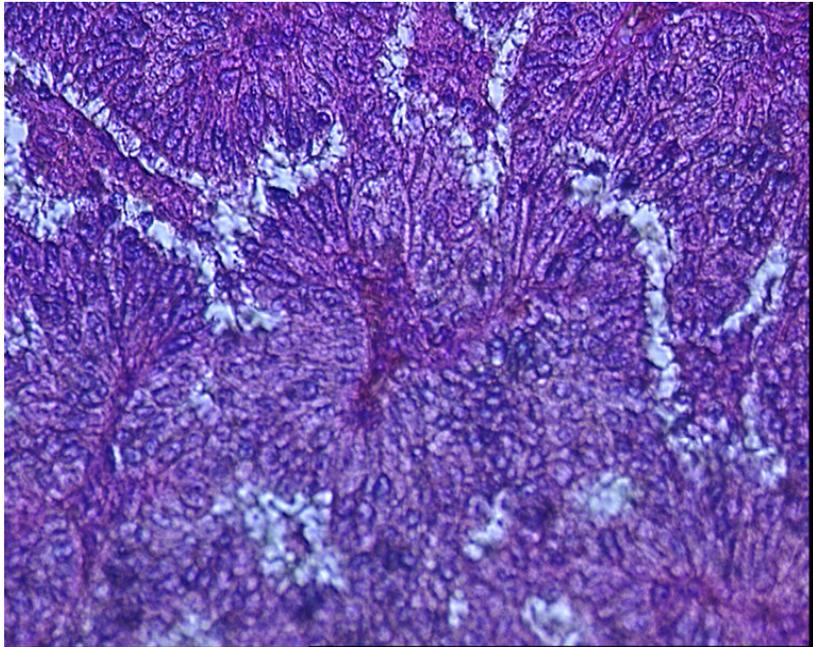
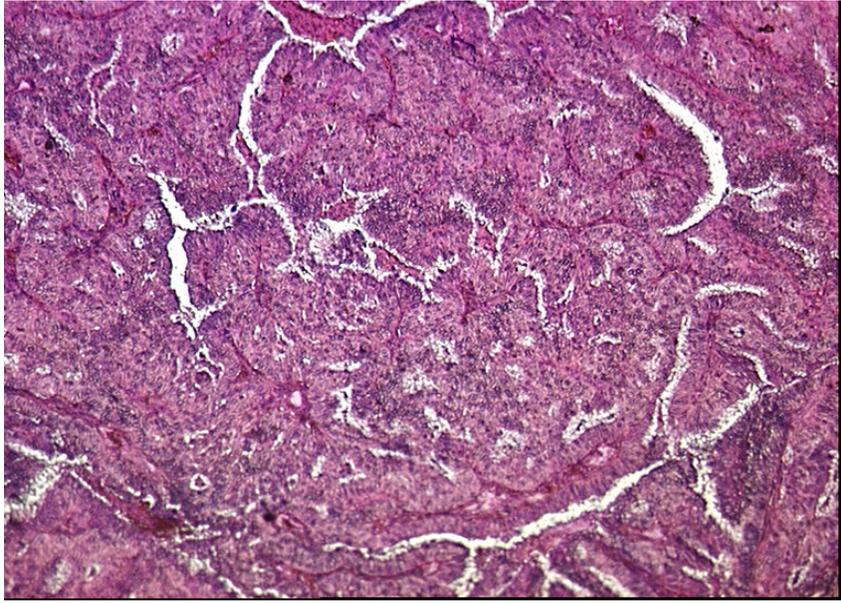
risultato falsato

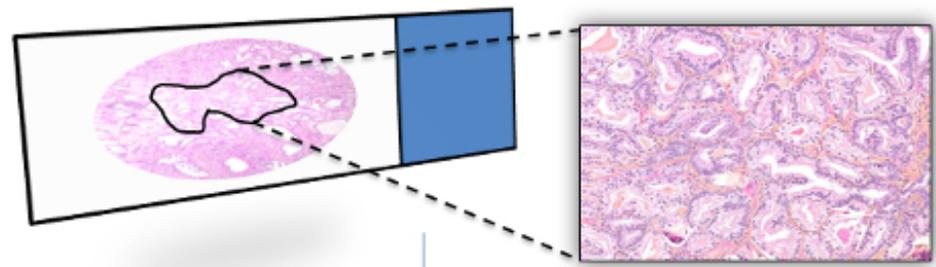
micro-dissezione laser



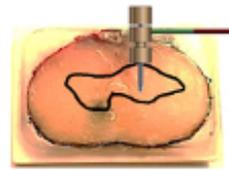
The Laser Capture Microdissection Process







Mapping and
Tissue coring



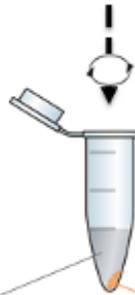
Tissue Cores (*0.6mm*)



Homogenization



Co-Extraction protocol



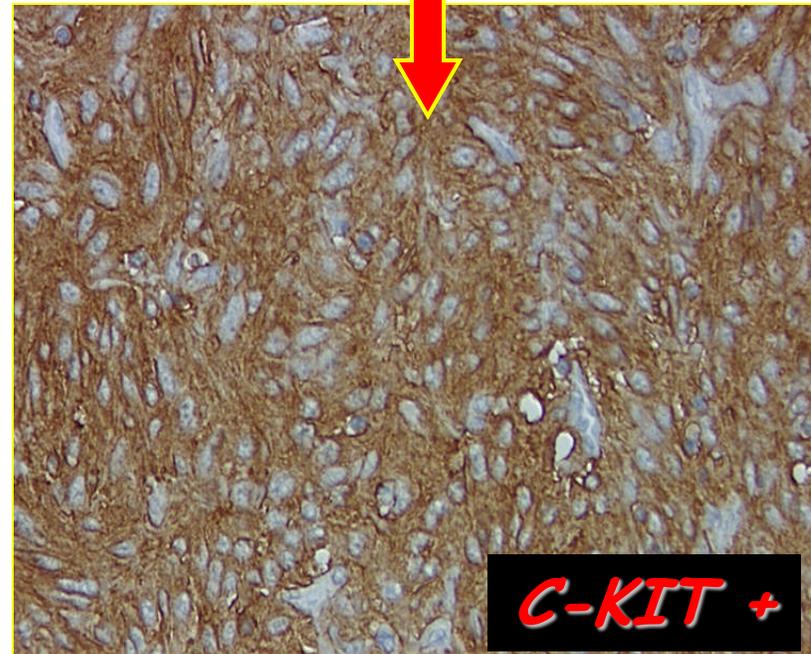
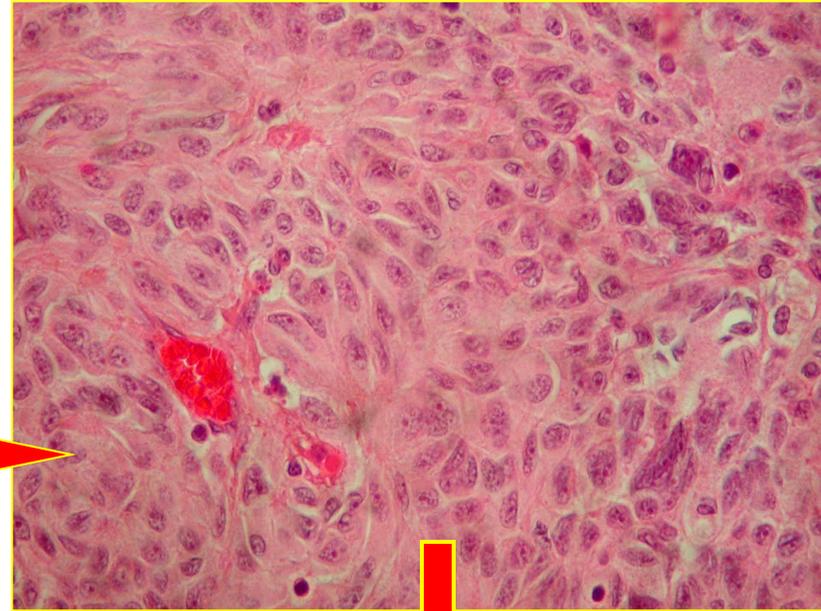
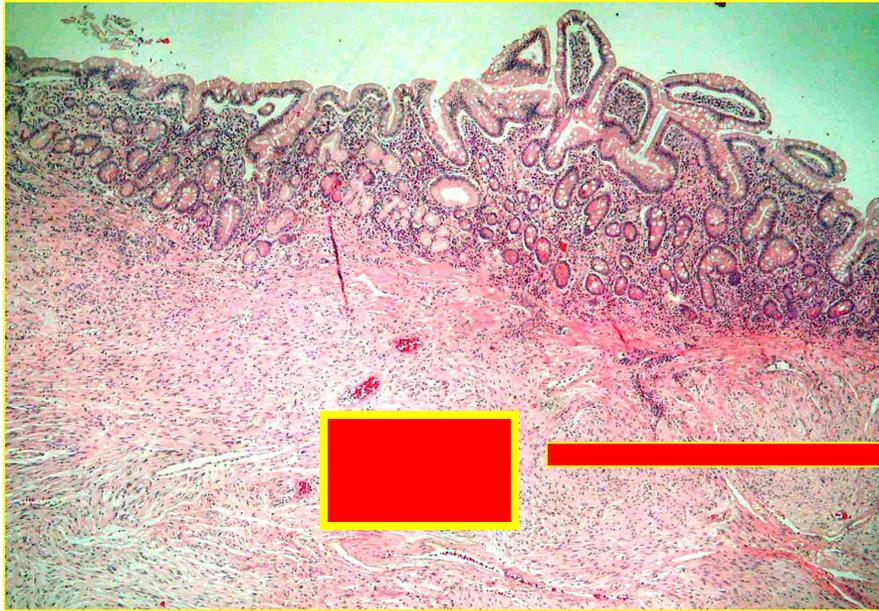
RNA

DNA

Esempi

La caratterizzazione biomolecolare
dei tumori solidi

Applicazioni

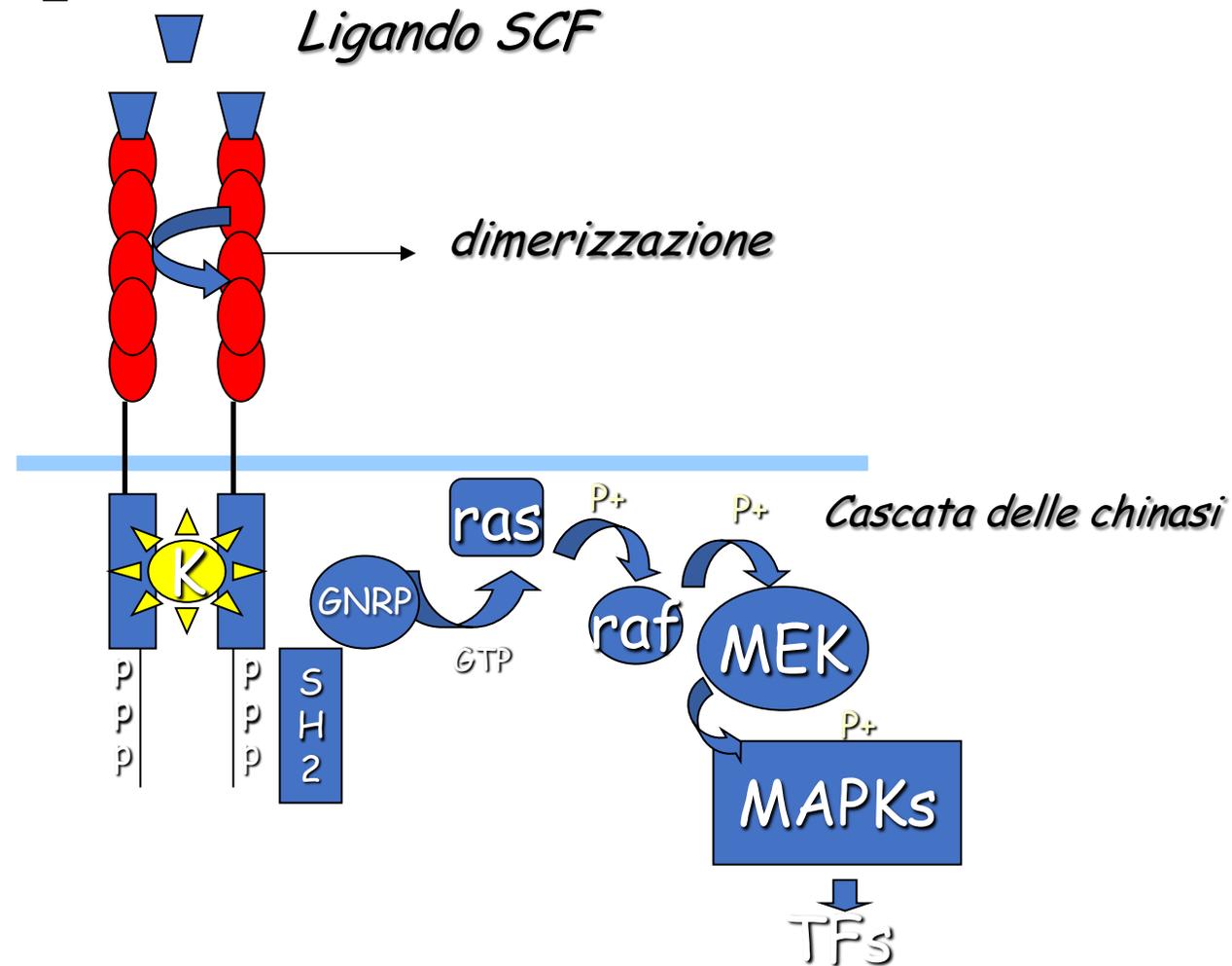


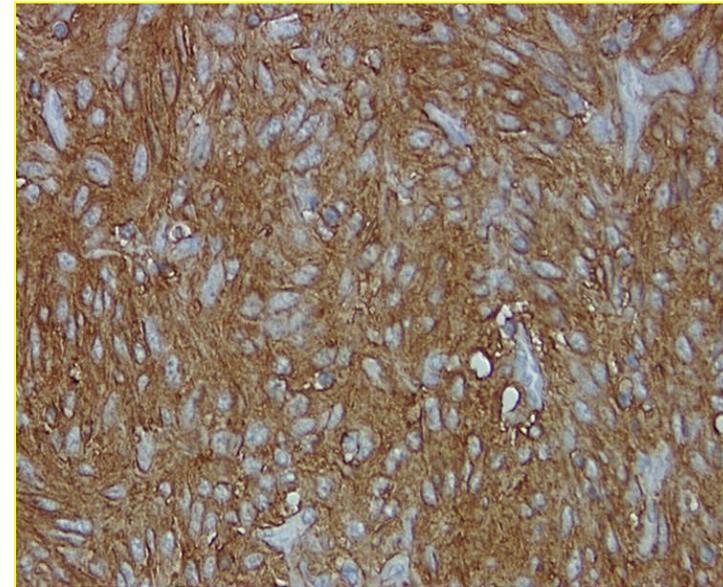
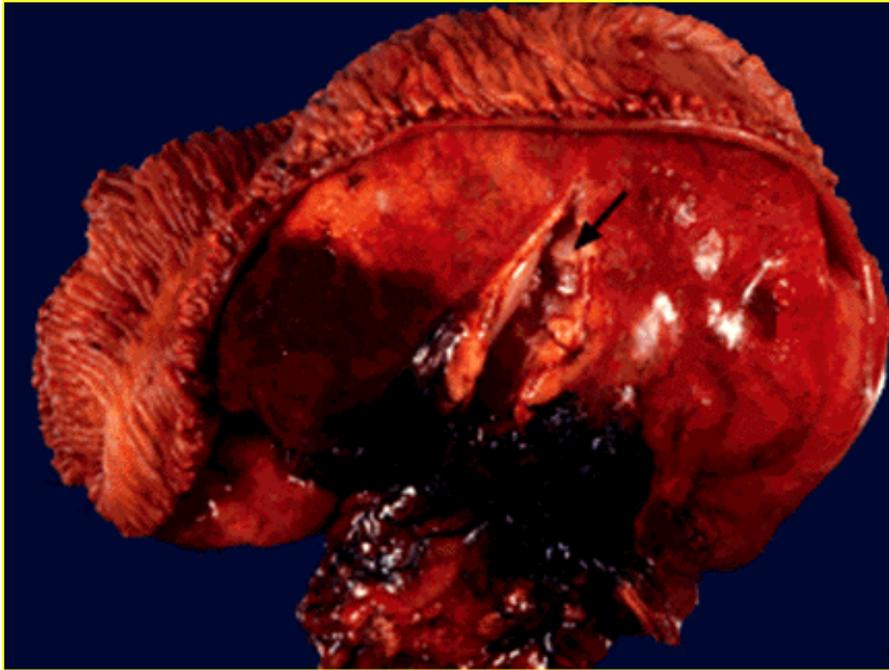
Conferma diagnostica
GIST

C-KIT +

Il c-kit è un recettore delle tirosin chinasi che quando interagisce con il suo ligando, il fattore di crescita della cellule staminali, dimerizza e attiva il suo sito catalitico che attiva per fosforilazione la cascata delle chinasi con l'attivazione ultima di fattori di trascrizione nucleare che stimolano la proliferazione cellulare.

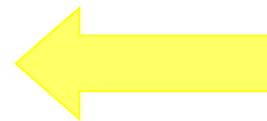
Struttura e Funzione





Somministrazione
Farmaco bersaglio specifico

**Imatinib
Gleevec**

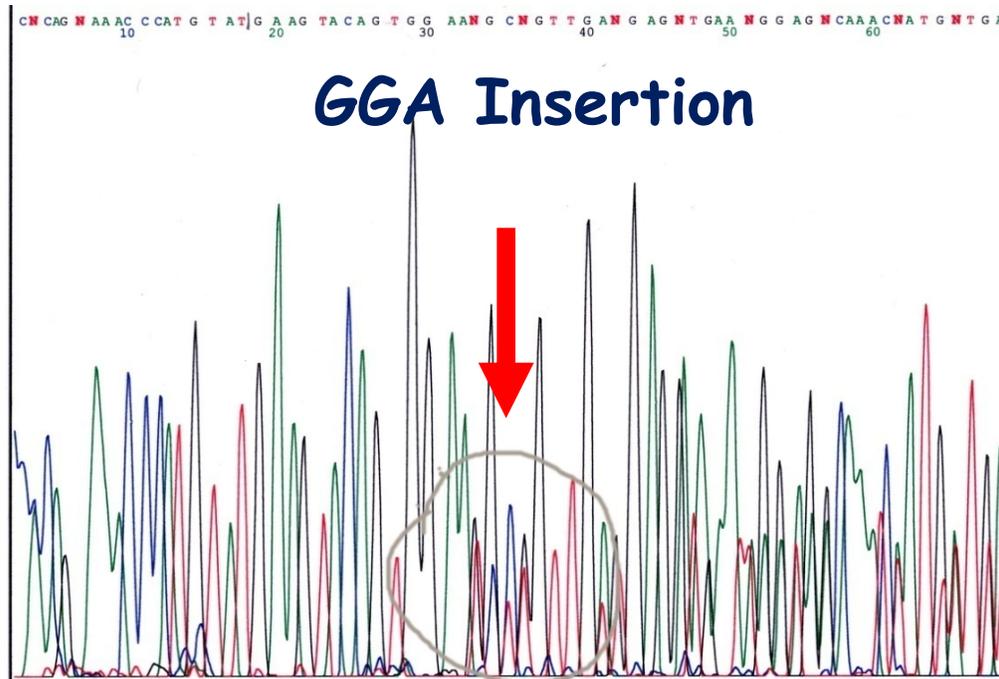


GIST



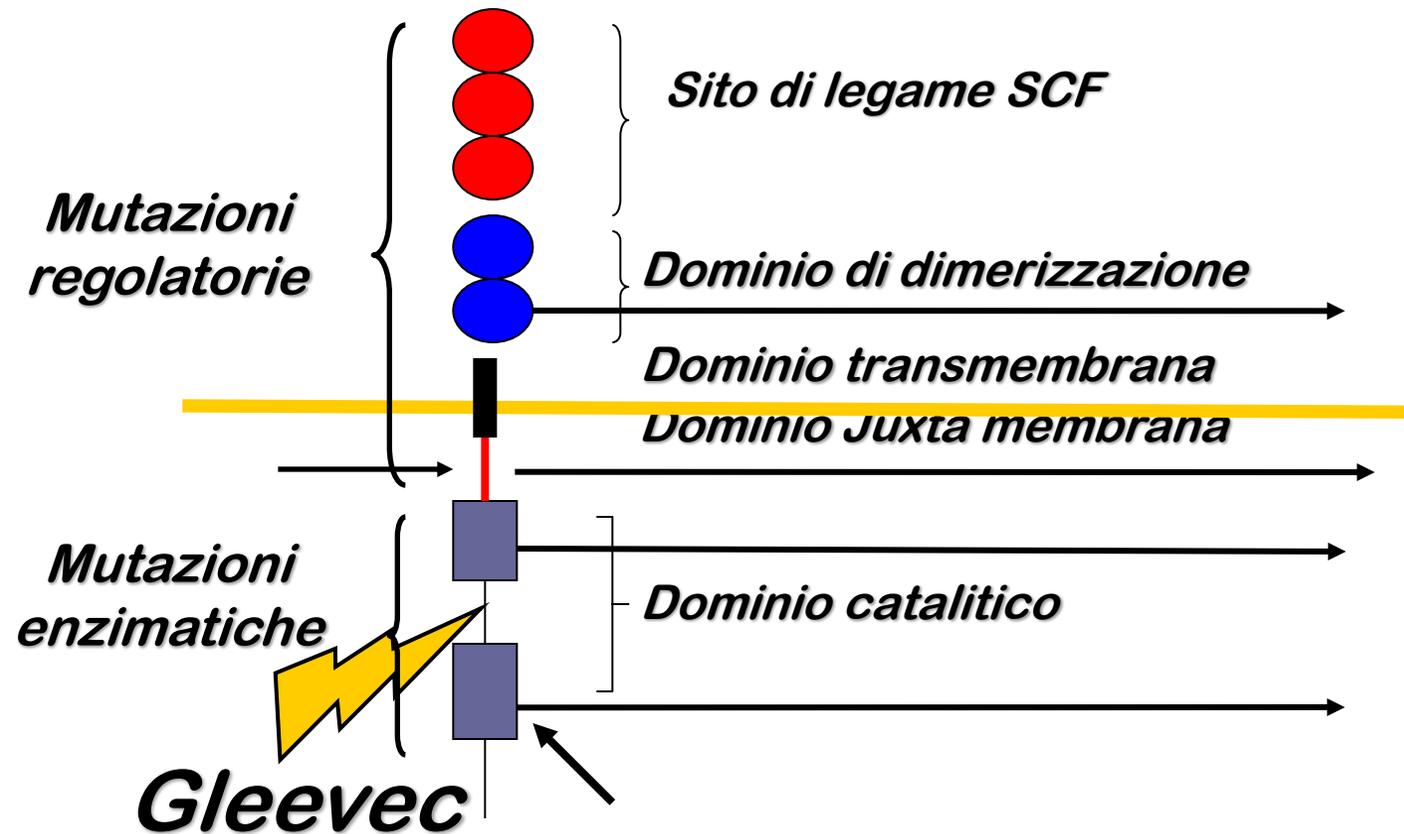
Inibitore dei recettori ad attività tirosin-chinasica

KIT Activation Is a Ubiquitous Feature of Gastrointestinal Stromal Tumors

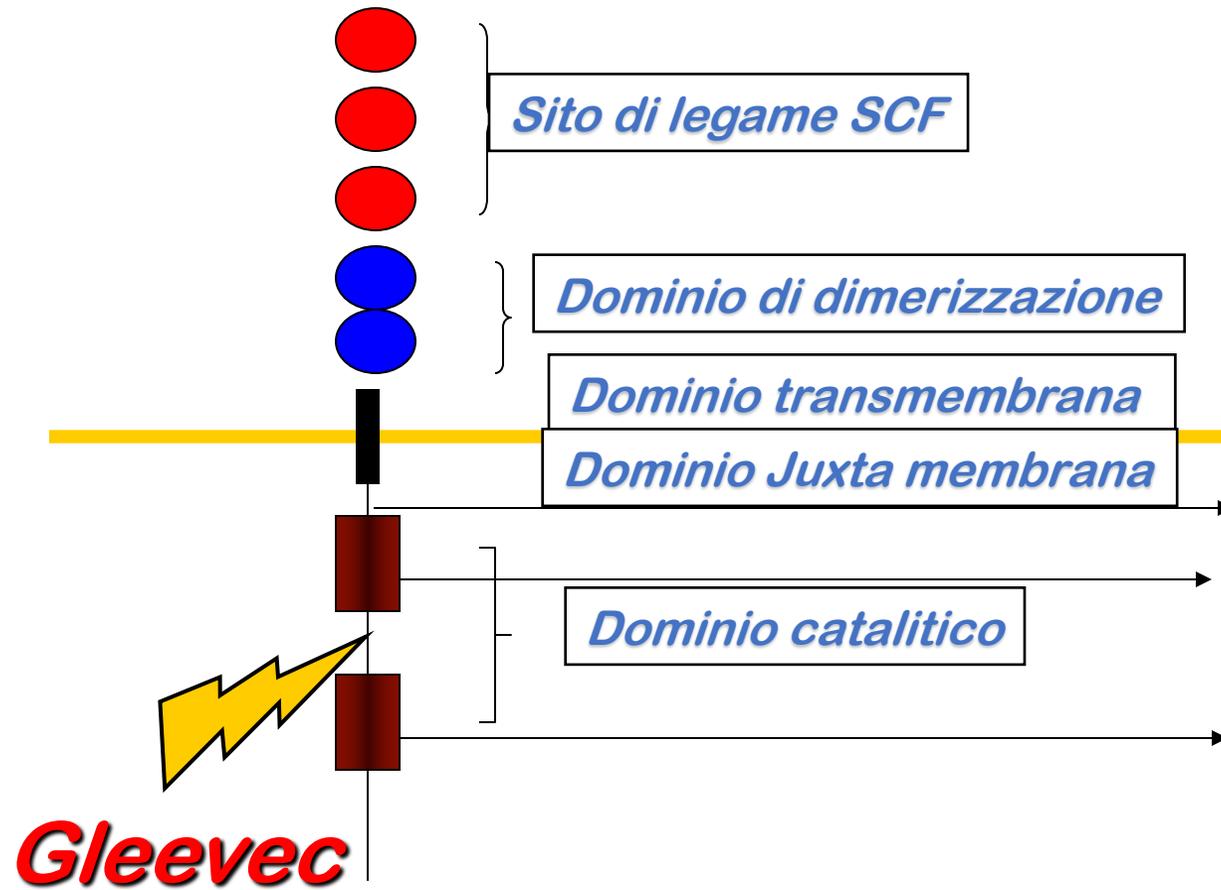


Esone 11
C-kit

Queste mutazioni sono distribuite prevalentemente nell'Esone 11 che codifica per il dominio transmembrana,
Il gleevec inibisce l'attività catalitica del recettore evitando l'attivazioni della cascata della map chinasi
La presenza della mutazione, condiziona la risposta alla terapia

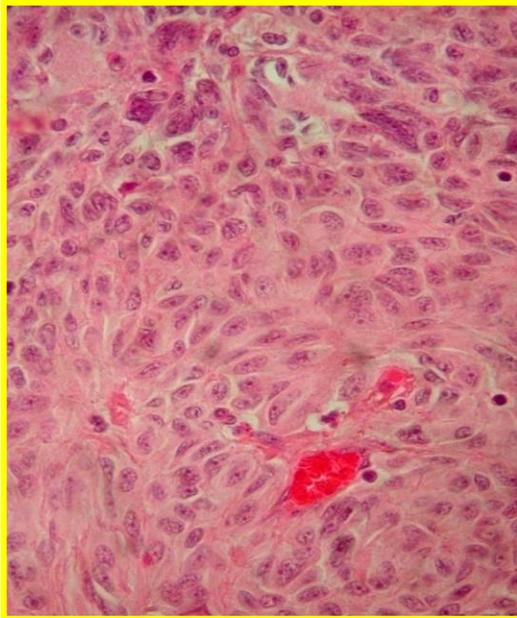


Mutazioni di PDGFRA nei GIST



DIAGNOSI MOLECOLARE GIST

applicazione diagnostica



90-95%

Morfologia + CD117 + → GIST

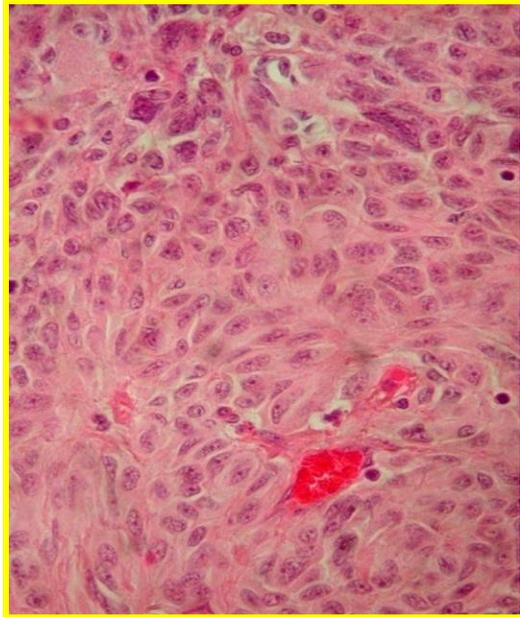
**5-10% CD117 - → Analisi molecolare
Kit/PDGFRA +
(88%-100%)**

Kit/PDGFRA -

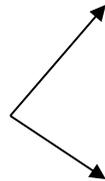
**0-5% GIST CD117 -
(Morfologia)**

DIAGNOSI MOLECOLARE GIST

a scopo prognostico terapeutico

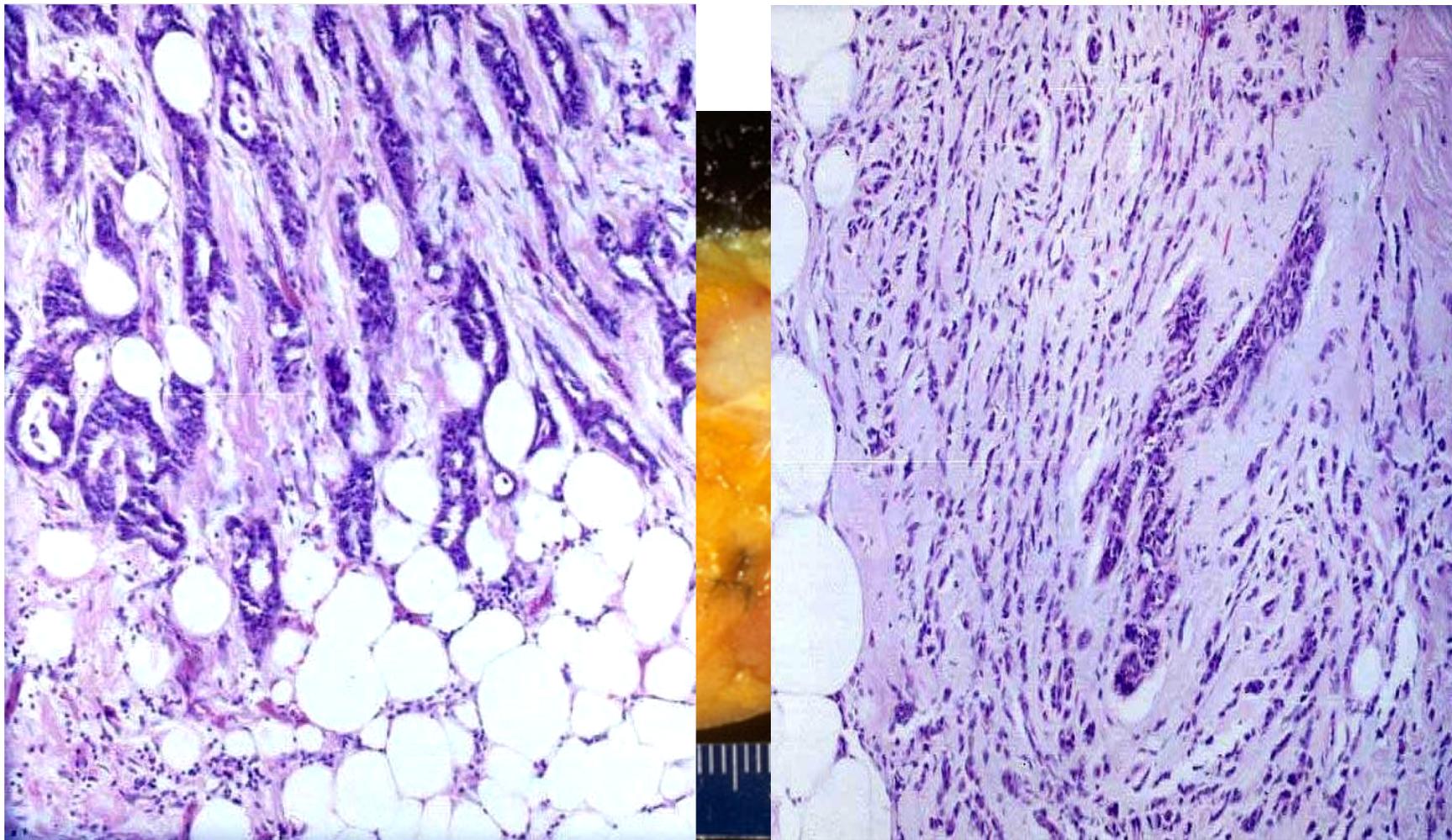


Giudizio prognostico e predittivo di risposta alla terapia: studio delle mutazioni attivanti responsive al trattamento

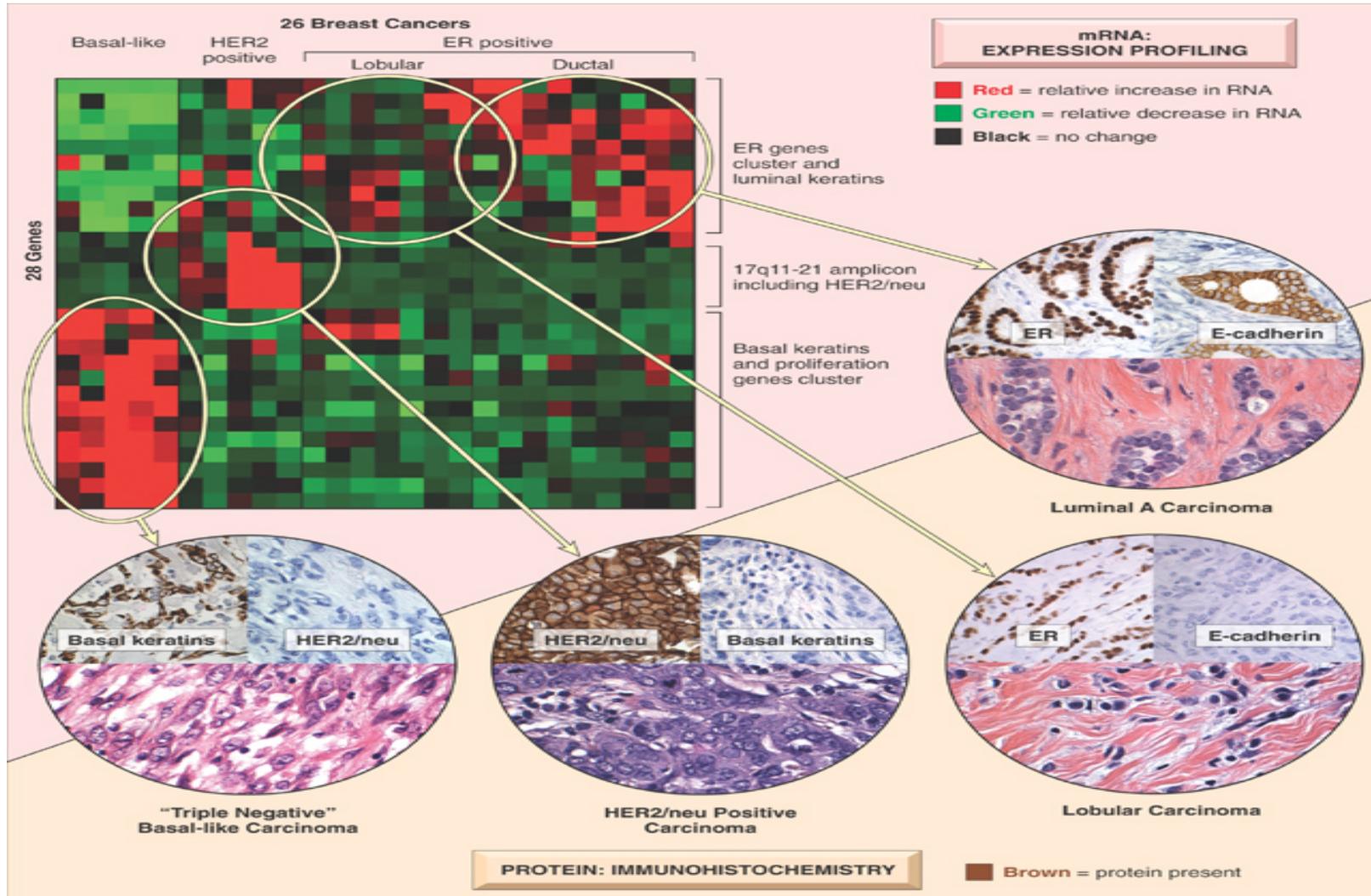


Studio della resistenza: seconde mutazioni dopo trattamento

Carcinoma della mammella

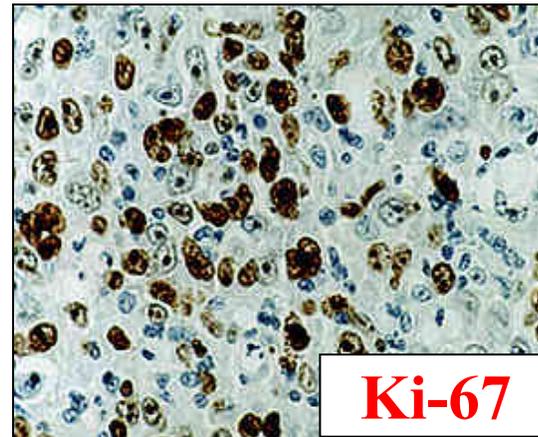
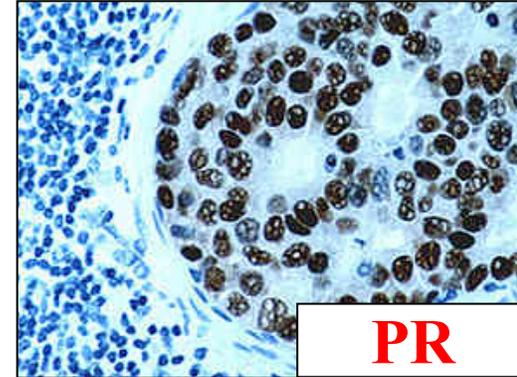
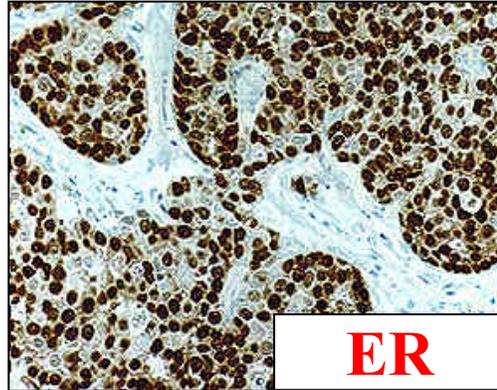


La classificazione molecolare del carcinoma della mammella



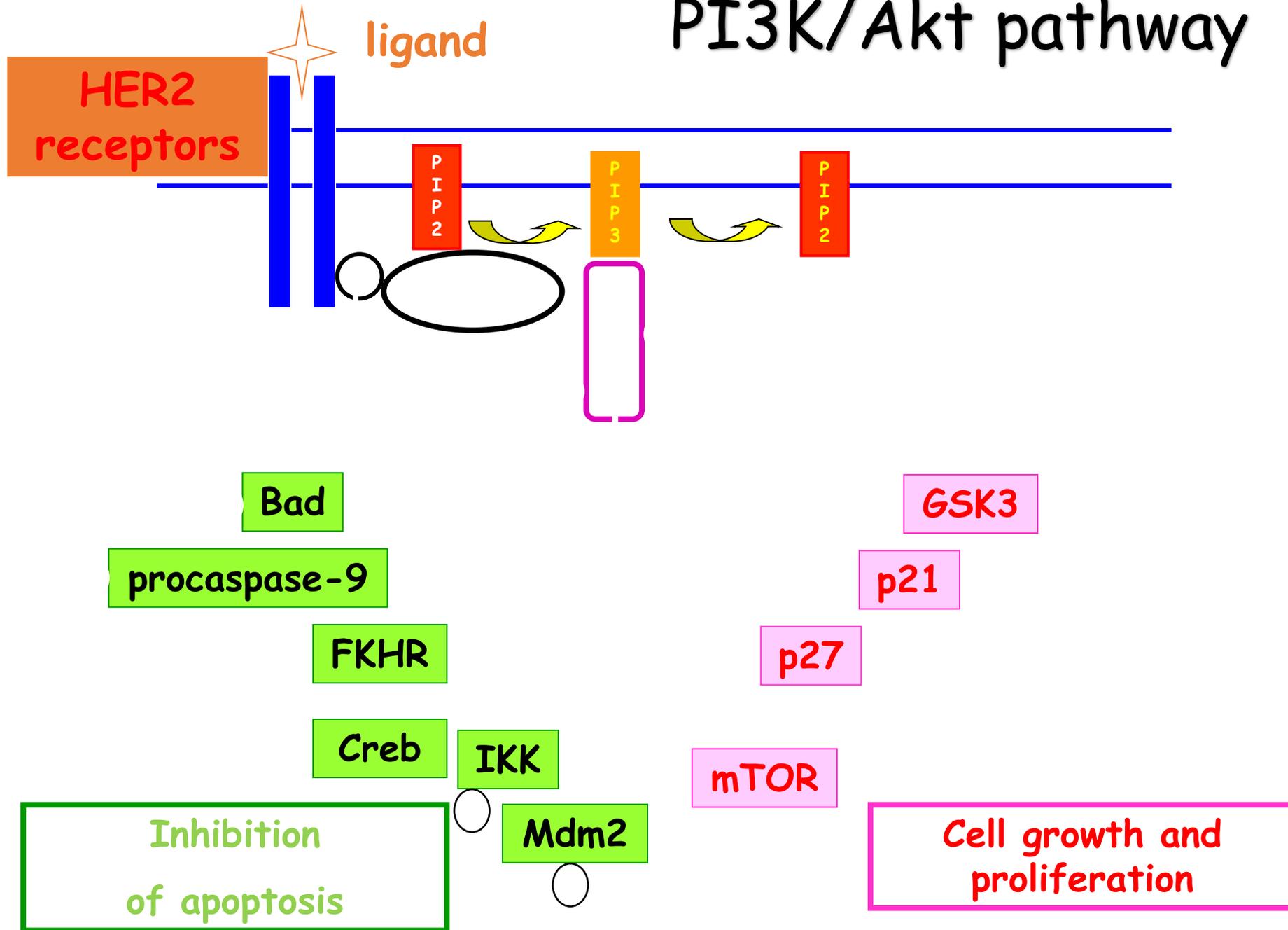
Fattori prognostico-predittivi

- Istotipo
- Grado
- Stadio
- Estrogeni
- Progesterone
- Ki-67
- HER2



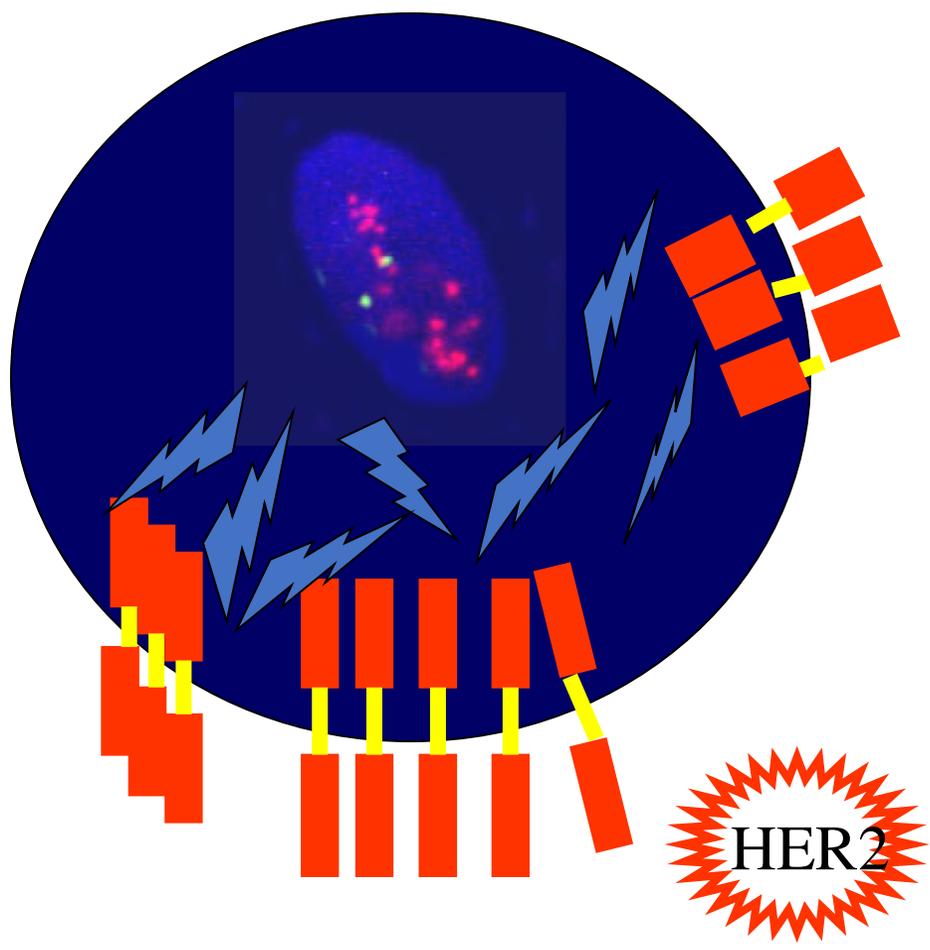
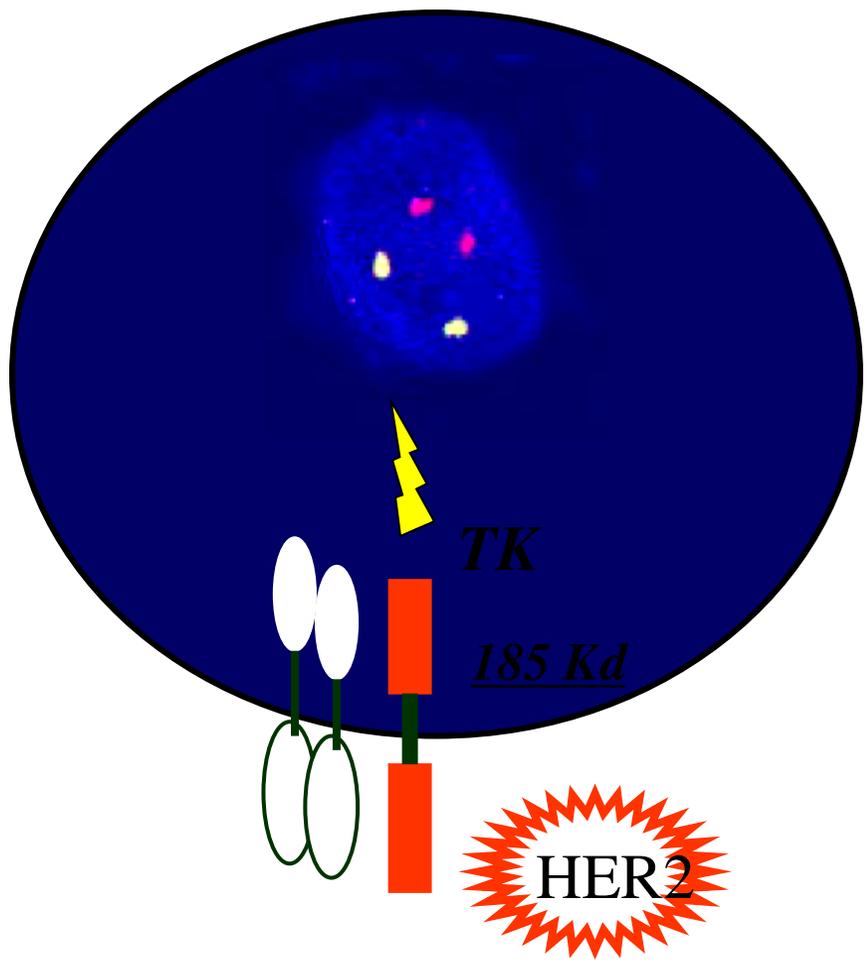
HER2

PI3K/Akt pathway



Iperespressione/Amplificazione di HER-2/Neu

- HER-2/Neu risulta iperespresso nel 20-30% dei casi di carcinoma mammario
- L'iperespressione di HER-2 è dovuta nel 95% circa dei casi all'amplificazione del gene

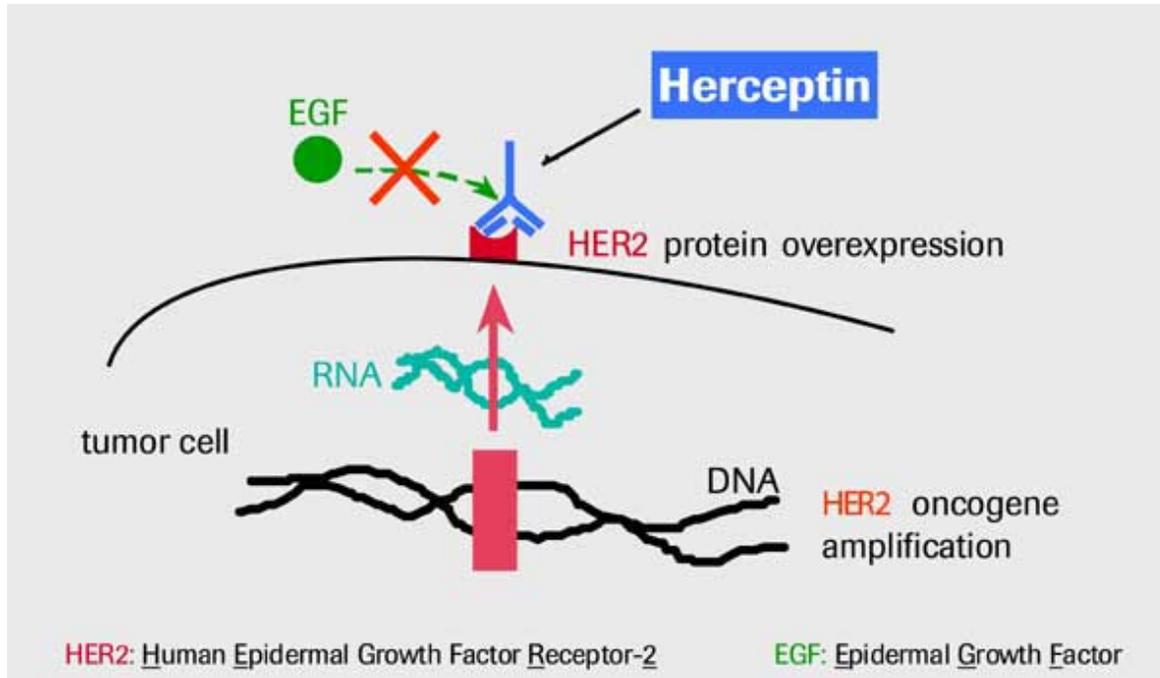


Iperespressione/Amplificazione di Her-2/neu

Rilevanza clinica

- L'amplificazione è un fattore prognostico negativo in termini di OS e DFS; è marcatore di recidiva precoce
- Correla positivamente con la risposta alla terapia antitumorale (taxani e antracicline) e negativamente con quella ormonale (tamoxifene)
- L'iperespressione/amplificazione condizionano la somministrazione e la risposta terapeutica dell'anticorpo monoclonale anti-Her2 (es. Trastuzumab)

Herceptin (TrastuzuMAb) (anti-HER MAb)



Valutazione dello stato di HER-2/Neu

IHC

HercepTest *

A085

Dako

Pathway *

CB11

Ventana

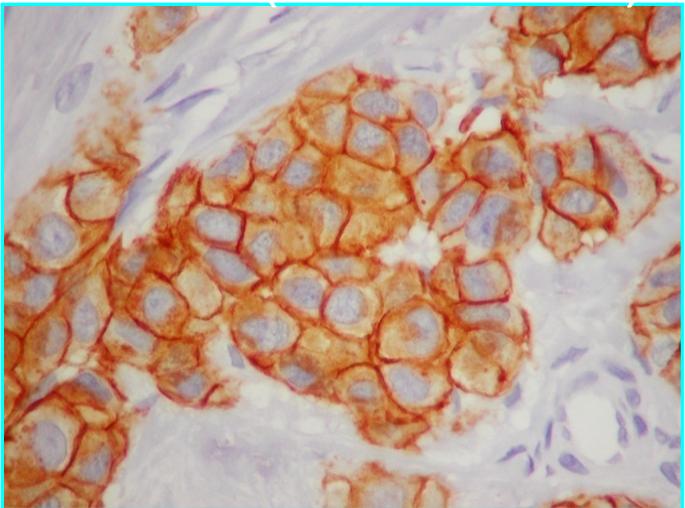
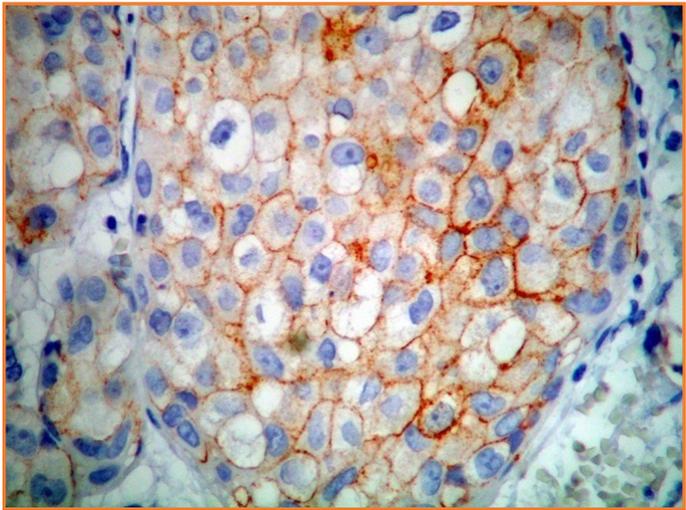
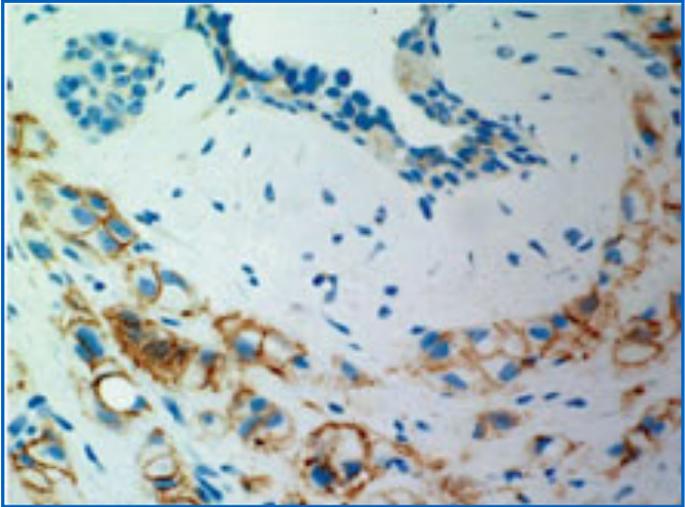
* FDA approved

*ASCO/CAP 2006;
GU 01-08-2006 n.177

HER2/IHC

valutazione

- ▶ Score 0 **negativo**
 - ▶ No pos; pos membrana <30%
- ▶ Score 1+ **negativo**
 - ▶ Appena percettibile pos membrana >30%, incompleta
- ▶ Score 2+ **dubbio**
 - ▶ debole.-moderata pos membrana >30%, completa
- ▶ Score 3+ **positivo**
 - ▶ Intensa pos membrana >30%, completa



Valutazione dello stato di HER-2/Neu

- Testati mediante IHC
- Intensa positività per HER-2 (IHC 3+)
- in più del 30% delle cellule neoplastiche
terapia con Herceptin
- IHC 2+ rivalutati FISH

Perché si richiede la valutazione FISH HER-2/Neu

80-90% dei casi ICH 2+
non sono amplificati
Falsi positivi

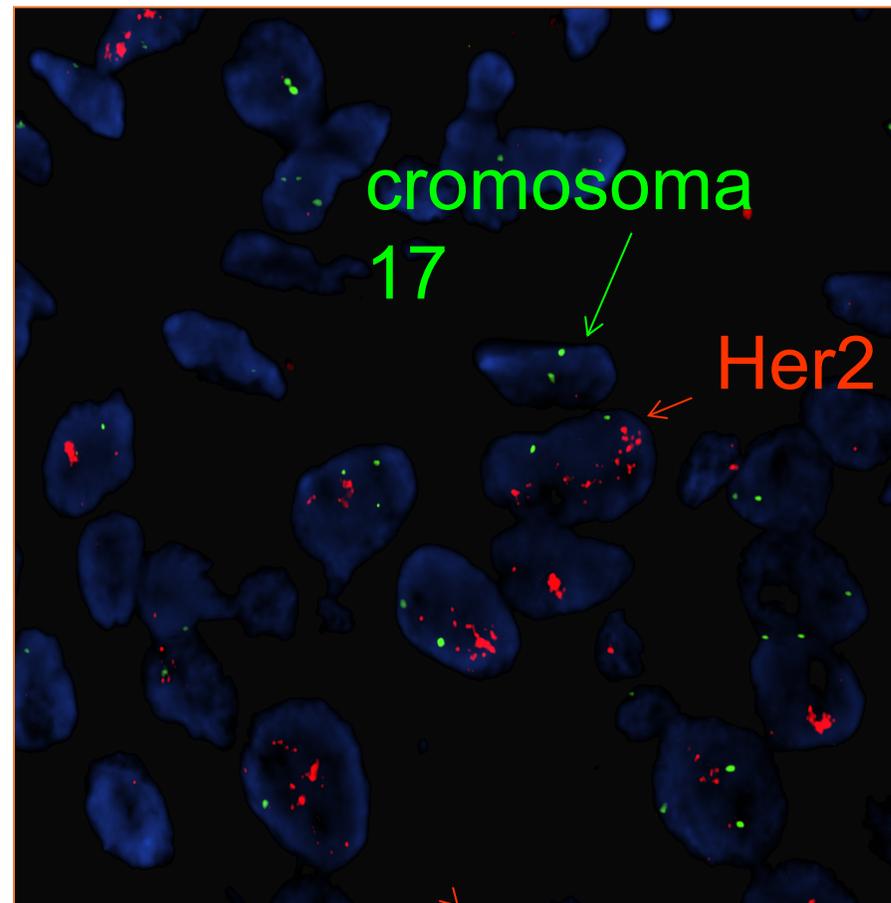
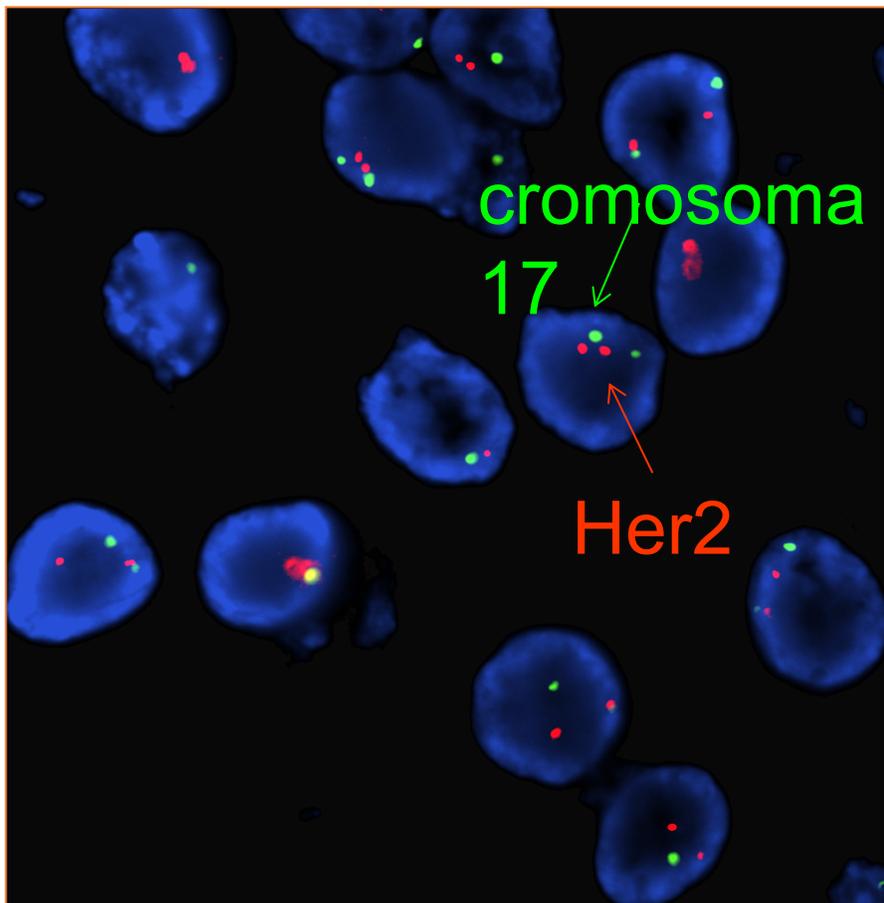
Quando si richiede la valutazione FISH HER-2/Neu

- IHC 2+ (sempre)*
- IHC 3+ (10% -30%)
- Controlli di qualità IHC su 3+ e negativi

FISH

- conta (100X) dei segnali relativi a HER-2 e CEP 17 in 60 nuclei neoplastici ben preservati e non sovrapposti
- ratio tra la somma dei segnali relativi alle due sonde

FISH Istologia



Valutazione FISH

Amplificazione: Her-2/C17 > 2,2

Borderline: Her-2/C17 1,8-2,2

Non amplificato: Her-2/C17 < 1,8