

- Il controllo qualitativo viene effettuato mediante assemblaggio delle sequenze con un software dedicato all'analisi delle sequenze, lettura dell'elettroferogramma e confronto con la sequenza wild type.
- I software per l'analisi di sequenza devono essere impostati con livelli soglia più bassi di quelli utilizzati per l'analisi dei polimorfismi nel DNA della linea germinale.
- Un campione può essere definito positivo per mutazione se questa è presente in almeno due diverse sequenze (una forward ed una reverse) ottenute da PCR indipendenti.
- Nel caso venga evidenziata una nuova mutazione (mai riportata precedentemente) o una mutazione rara (riportata 1-2 volte nei database internazionali) questa deve essere verificata in due ulteriori amplificati PCR.
- Ad intervalli di 25-30 sequenze, deve essere sequenziato un DNA di controllo per verificare l'assenza di contaminazioni e la qualità della procedura.

Raccomandazioni per altre metodiche d'analisi

Analisi mediante REAL-TIME PCR

Diverse metodiche basate sull'impiego della Real Time PCR possono essere utilizzate per la individuazione delle mutazioni dell'EGFR. È attualmente disponibile in commercio un kit basato sulla tecnologia ARMS/Scorpion in grado di individuare 29 diverse mutazioni dell'EGFR tra cui quelle più frequentemente descritte in letteratura nei pazienti con NSCLC (TheraScreen: EGFR29 Mutation Kit). La sensibilità teorica della metodica è tale da individuare mutazioni quando le copie di DNA mutato rappresentano circa l'1% del DNA totale. Tuttavia, è da sottolineare che la metodica individua una mutazione se nel campione sono presenti almeno 5-10 copie di DNA mutato. Pertanto, l'analisi effettuata su di un numero esiguo di cellule potrebbe comunque risultare in un falso negativo.

È possibile sviluppare metodiche alternative di Real Time PCR basate su discriminazione allelica per la individuazione di mutazioni dell'EGFR. Queste dovrebbero essere in grado di individuare le principali mutazioni dell'EGFR riportate in letteratura negli esoni 19 e 21 ed, eventualmente, negli esoni 18 e 20.

Raccomandazioni generali:

- Le reazioni devono essere allestite sotto cappa a flusso laminare, in un ambiente diverso da quello utilizzato per l'analisi dei prodotti di amplificazione, impiegando materiali dedicati e con le opportune precauzioni onde evitare contaminazioni (guanti, puntali con filtro, ecc.)
- Appropriati controlli positivi e negativi devono essere inclusi in ogni singola determinazione
- Le reazioni devono di norma essere eseguite in duplicato. Per il kit Therascreen, provvisto di una serie di controlli interni, i centri possono anche eseguire la determinazione su singolo pozzetto, dopo una opportuna fase di apprendimento
- Ogni laboratorio dovrebbe validare la metodica di Real Time PCR in via preventiva utilizzando diluizioni di DNA mutato in DNA non-mutato da linee cellulari il cui stato mutazionale di EGFR sia conosciuto. La sensibilità delle metodiche basate sulla tecnologia ARMS dovrebbe raggiungere l'1%; per i saggi basati sulla discriminazione allelica è stata descritta una sensibilità di circa il 10%.

Analisi mediante Pirosequenziamento

Il Pirosequenziamento è una tecnologia di sequenziamento mediante sintesi. La tecnica consente il monitoraggio in tempo reale della sintesi di DNA mediante il rilevamento della bioluminescenza prodotta al termine di una cascata di reazioni enzimatiche innescata dall'incorporazione di un nucleotide.

Le metodiche di pirosequenziamento hanno in teoria alcuni vantaggi rispetto al sequenziamento standard, tra cui la maggiore sensibilità (riportata tra il 5 ed il 10%) e la possibilità di sequenziare frammenti piuttosto corti di DNA, superando in tal modo eventuali problematiche legate alla frammentazione del DNA.

Sono stati recentemente commercializzati anche kit per uso clinico per la determinazione dello stato mutazionale dell'EGFR mediante tecniche di pirosequenziamento. Tuttavia, non sono disponibili in letteratura esperienze già condotte con tale metodica, la cui sensibilità e specificità dovrebbero pertanto essere determinate in ogni singolo laboratorio prima di procedere al loro impiego clinico. Come per le metodiche sopradescritte, particolare attenzione deve essere tenuta nella preparazione dei campioni ed opportuni controlli positivi e negativi devono essere impiegati in ogni reazione.

Refertazione

La refertazione è parte integrante della procedura diagnostica e dovrebbe contenere le seguenti informazioni:

- L'identificazione del paziente e del medico/struttura che ha richiesto l'analisi.
- Il materiale utilizzato per l'analisi e la percentuale di cellule tumorali.
- La metodica impiegata per l'esecuzione dell'analisi.
- Gli esoni sottoposti ad analisi.
- Le mutazioni indagate nel caso delle metodiche a bersaglio molecolare.
- I risultati del test, con specificazione del tipo di mutazione eventualmente rilevata.

Il referto deve essere compilato su un modello prestabilito e firmato dall'anatomo patologo e dall'esecutore del test molecolare. In considerazione dell'impatto sulla strategia terapeutica, il tempo per la refertazione non deve superare le due settimane dalla richiesta della determinazione

Referenze bibliografiche

- Ciardiello F, Tortora G: EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 358: 1160-74, 2008.
- Eberhard DA, Giaccone G, Johnson BE: Non-Small-Cell Lung Cancer Working Group. Biomarkers of response to epidermal growth factor receptor inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer Working Group: standardization for use in the clinical trial setting. *J Clin Oncol* 26: 983-94, 2008
- Marchetti A, Martella C, Felicioni L, et al: EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. *J Clin Oncol* 23: 857-65, 2005.
- Mok TS, Wu YL, Thongprasert S et al.: Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 361: 947-57, 2009.
- Normanno N, De Luca A, Bianco C, et al: Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 366: 2-16, 2006.
- Sharma SV, Bell DW, Settleman J, et al: Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 7: 169-81, 2007

Realizzato con il contributo di  AstraZeneca

Raccomandazioni per l'analisi mutazionale del gene EGFR nel carcinoma polmonare

Antonio Marchetti e Nicola Normanno

A cura del gruppo di lavoro AIOM - SIAPEC-IAP

Carmine Pinto (Bologna), Gian Luigi Taddei (Firenze), Vincenzo Adamo (Messina), Andrea Ardizzoni (Parma), Gerardo Botti (Napoli), Alberto Bardelli (Candiolo, Torino), Camilla Comin (Firenze), Lucio Crinò (Perugia), Gabriella Fontanini (Pisa), Marcello Gambacorta (Milano), Antonio Marchetti (Chieti), Bruno Murer (Mestre-Venezia), Nicola Normanno (Napoli), Oscar Nappi (Napoli)



Raccomandazioni per l'analisi mutazionale del gene EGFR nel carcinoma polmonare

Indicazioni cliniche

La determinazione dello stato mutazionale di EGFR si rende necessaria per la scelta della migliore strategia terapeutica in pazienti selezionati con carcinoma polmonare non a piccole cellule (Non-small Cell Lung Cancer: NSCLC) in stadio IIIB e IV. Possono essere sottoposti ad esame mutazionale del gene EGFR i pazienti con NSCLC e istotipo adenocarcinoma, carcinoma a grandi cellule, carcinoma misto con adenocarcinoma, e NSCLC non altrimenti specificato (NAS) che presentano la più alta probabilità di riscontro di mutazioni.

La determinazione delle mutazioni di EGFR può essere eseguita su pezzo operatorio oppure su prelievo biotipico o citologico del tumore primitivo e/o della metastasi. Nei pazienti non fumatori, deboli fumatori (< 15 pacchetti/anno o ≤ 5 sigarette al giorno) ed ex-fumatori (da ≥ 15 anni) con gli istotipi suddetti, in cui non è disponibile un adeguato materiale, può essere indicato un ulteriore prelievo biotipico per permettere la successiva determinazione molecolare quando clinicamente indicato.

Il materiale biologico per l'analisi molecolare

Un campione di tessuto è disponibile in circa il 50% dei pazienti con NSCLC ed è ottenuto al momento della diagnosi (biopsia bronchiale), o nel corso di intervento chirurgico (campione chirurgico). Il tessuto, fissato in formalina ed incluso in blocco di paraffina, è indispensabile per la diagnosi istologica ed è conservato negli archivi delle Anatomie Patologiche. Purtroppo, in una elevata percentuale di pazienti non è disponibile un campione tissutale. In molti di questi casi dispone di materiale citologico, ottenuto mediante agoaspirazione, lavaggio broncoalveolare o "scraping" bronchiale. I campioni citologici possono essere archiviati diversamente a seconda dei centri: striscio citologico su vetrino, citoinclusione, cellule in sospensione in fissativi a base alcolica (cytolit). In rari casi nessun materiale biologico è disponibile.

L'esame mutazionale di EGFR può essere condotto, con alta probabilità di successo, su tessuti fissati ed inclusi. L'assenza di tessuti disponibili per molti pazienti, ha indotto ad esplorare la possibilità di effettuare esami molecolari su materiale citologico, siero o plasma. Relativamente ai prelievi citologici, i risultati ottenuti in alcuni studi esplorativi sono incoraggianti tanto da suggerire l'introduzione delle procedure nella pratica clinica, almeno nei casi con maggiore disponibilità di cellule neoplastiche. Pertanto i campioni citologici possono essere utilizzati, se adeguati secondo l'esperienza del centro di analisi. A tale riguardo, va però sottolineato che l'analisi di campioni con basso contenuto di cellule neoplastiche può produrre falsi negativi, legati ai limiti di detezione delle metodiche impiegate, e falsi positivi, per la elevata probabilità di artefatti. I dati ottenuti su siero e plasma sono ancora da considerarsi solo di interesse speculativo per una serie di motivi quali la sensibilità delle analisi risultata non superiore al 50-60%, l'assenza di validazione dei dati in ampi studi, la necessità di utilizzare tecnologie al momento di complessa gestione e ad alto costo.

Quantità di tessuto/cellule neoplastiche per l'analisi molecolare

Le comuni metodiche per la determinazione di mutazioni somatiche su tessuto prevedono la purificazione e la quantificazione del DNA prima dell'amplificazione mediante PCR. Ciò è possibile solo se si dispone di una sufficiente quantità di tessuto neoplastico, in pratica corrispondente a circa cinque sezioni di 10 micron di una biopsia bronchiale di medie dimensioni. In presenza di poche cellu-

le neoplastiche (ad esempio nel caso di piccole biopsie o particolari preparati citologici) possono essere utilizzati protocolli alternativi che non prevedono la purificazione del DNA. È difficile indicare qual è il minimo quantitativo di cellule per l'analisi molecolare in tali casi, anche perché ciò che conta è l'amplificabilità del DNA del campione che può dipendere oltre che dalla quantità, anche dalla qualità del materiale biologico e da una serie di altri parametri, in particolare il tempo di permanenza del campione nel fissativo. Alcuni studi hanno utilizzato il limite minimo di 100 cellule tumorali per la esecuzione della analisi mutazionale dell'EGFR.

Preparazione del campione di tessuto

Il campione di tessuto da sottoporre ad analisi molecolare risulta frequentemente eterogeneo: accanto ad aree di carcinoma polmonare possono essere presenti aree di necrosi, aree flogistiche e componenti tissutali normali. La possibilità di individuare mutazioni geniche è condizionata dalla percentuale di cellule neoplastiche nel campione. La percentuale minima per l'espletamento dell'esame non è facilmente quantificabile e dipende dalla sensibilità della metodica d'analisi. Se si utilizzano procedure di analisi mutazionale standard (sequenziamento diretto) si suggerisce la presenza di almeno il 50% di cellule neoplastiche. Pertanto, prima dell'estrazione del DNA, l'anatomopatologo deve valutare le caratteristiche del tessuto in esame ai fini di una eventuale macrodissezione e, nel caso questa si rendesse necessaria, selezionare le aree del campione più ricche di cellule tumorali. La macrodissezione viene eseguita su sezioni di tessuto paraffinato dello spessore di 10 micron montate su vetrino portaoggetti. La raccolta delle sezioni su vetrino si effettua in acqua distillata priva di gelatina in recipienti monouso (capsula Petri, beaker) per evitare inquinamenti. Quindi le sezioni vengono fatte essiccare sul vetrino a temperatura ambiente e sottoposte a macrodissezione manuale mediante la lama di un bisturi o un ago da siringa. Il tessuto dissezionato viene raccolto in un tubo Eppendorf, sparaffinato in appropriato solvente, lavato in alcool e disidratato prima di iniziare l'estrazione del DNA. Nel caso di piccole biopsie potrebbe rendersi necessaria la microdissezione laser. Quest'ultima metodica, per quanto utile in mani esperte, ha al momento alcune principali limitazioni: a) prevede una costosa strumentazione e personale dedicato (anatomopatologi) con esperienza nel settore specifico; b) richiede lunghi tempi di esecuzione; c) può favorire l'insorgenza di artefatti, (falsi positivi e falsi negativi) per la scarsa quantità e la qualità non ottimale del DNA ottenuto.

Preparazione del campione citologico

Il materiale d'archivio è di solito rappresentato da preparati citologici strisciati, colorati e montati su vetrino o da materiale citologico incluso in blocchi di paraffina (citoincluso). Nel caso del materiale strisciato su vetrino, è necessaria la rimozione del coprioggetto in xilolo per circa 72 ore seguita da lavaggi delle cellule in etanolo. Le aree del vetrino contenenti il maggior numero di cellule neoplastiche vengono quindi demarcate e le cellule presenti in tali aree rimosse dal vetrino mediante la lama di un bisturi o un ago da siringa e poste in un tubo Eppendorf. Se il campione contiene isolati gruppi microscopici di cellule tumorali la migliore soluzione è la dissezione laser, purtroppo non disponibile in tutti i centri.

Per il materiale citoincluso si effettua un congruo numero di sezioni da 10 micron che vengono raccolte in un tubo Eppendorf. Le sezioni vengono sparaffinate (vedi sopra), lavate in alcool e disidratate pri-

ma di proseguire con le procedure di analisi. Anche in questo caso, se necessario possono essere effettuate dissezioni manuali o laser.

Metodi di estrazione e quantificazione del DNA

La qualità e la quantità del DNA estratto dai campioni biologici è di notevole importanza per le successive analisi molecolari. Un DNA di scadente qualità può ostacolare l'amplificazione PCR e inficiare il risultato dell'analisi generando risultati falsi negativi o falsi positivi. Il metodo di estrazione deve essere molto affidabile e deve generare quanto più DNA possibile dal campione in esame. Per l'estrazione e la purificazione del DNA da tessuto paraffinato sono oggi disponibili vari kit commerciali, in genere basati sul principio della cromatografia, che hanno il vantaggio di accorciare notevolmente i tempi tecnici rispetto alla metodica classica basata sull'estrazione in fenolo-cloroformio e la purificazione mediante precipitazione in alcool. Sono anche disponibili kit per estrazione di DNA da micro campioni quali piccole biopsie o materiale citologico. Il vantaggio principale nell'utilizzo di tali kit è che essi sono corredati di protocolli di semplice esecuzione e consentono una standardizzazione delle procedure. Una volta estratto, il DNA viene risospeso in un tampone adeguato.

La quantificazione del DNA è una pratica utile perché può permettere di ottimizzare il processo di amplificazione e di conoscere quanti esami sono possibili a partire dal DNA estratto. Tuttavia la procedura non è indispensabile e può essere evitata nel caso in cui la quantità di DNA disponibile sia molto limitata. Per la quantificazione del DNA estratto da tessuti in paraffina, una PCR quantitativa è molto più accurata della spettrofotometria, in quanto permette di valutare direttamente l'amplificabilità del DNA estratto.

Protocolli alternativi in carenza di materiale.

Qualora le cellule neoplastiche nel materiale biotipico o citologico siano ritenute insufficienti per la purificazione del DNA è possibile procedere con metodiche alternative che prevedono la sospensione e lisi delle cellule tumorali in tamponi contenenti proteasi (95°C). Dopo inattivazione enzimatica tramite calore (10 min a 95°C) il campione viene direttamente sottoposto ad amplificazione mediante PCR.

Amplificazione mediante PCR del gene EGFR

La presenza di mutazioni attivanti il dominio tirosino-chinasico del gene EGFR è attualmente indispensabile per l'uso di farmaci anti-EGFR nella I linea di trattamento del NSCLC. Poiché mutazioni attivanti sono state descritte negli esoni 18-21, questi 4 esoni dovrebbero essere sottoposti ad amplificazione mediante PCR e successiva analisi mutazionale. Considerata la scarsità del materiale biologico disponibile in alcuni casi, la priorità va data alla determinazione delle mutazioni degli esoni 19 e 21 che risultano le più frequenti; in caso di negatività e di disponibilità di DNA, anche gli esoni 18 e 20 dovrebbero essere analizzati. Il prodotto della PCR può essere utilizzato per il sequenziamento diretto del tratto amplificato o sottoposto ad altre metodiche per l'identificazione di mutazioni geniche.

Metodiche per lo studio delle mutazioni.

Varie tecniche sono disponibili per l'analisi delle mutazioni del gene EGFR. Queste possono essere distinte in metodiche di screening che possono evidenziare tutte le mutazioni, incluse nuove mutazioni e metodiche a bersaglio mutazionale che permettono la diagnosi di specifiche mutazioni già note. Tra le più diffuse

metodiche di screening ricordiamo nell'ordine:

- il sequenziamento diretto del prodotto della PCR secondo il metodo di Sanger;
- il pirosequenziamento;
- metodiche basate sulla denaturazione "melting" del DNA, come l'HRMA (high resolution melting analysis);
- l'analisi SSCP (single strand conformation polymorphism).

Il sequenziamento diretto ed il pirosequenziamento permettono di effettuare diagnosi del tipo specifico di mutazione, mentre l'HRMA e l'SSCP forniscono solo il dato di assenza o presenza di mutazione che dovrà essere poi caratterizzata. Essendo queste ultime due metodiche rapide e sensibili, esse possono risultare utili per selezionare i casi da sequenziare, riducendo notevolmente la mole di lavoro. La caratterizzazione della mutazione risulta comunque indispensabile, sia perché mutazioni diverse possono avere differente significato biologico, sia perché sono state descritte in letteratura false positività con la metodica HRMA, quantomeno per le mutazioni di KRAS. Tra le metodiche a bersaglio molecolare le più diffuse risultano essere la Scorpion-ARMS (TheraScreen: EGFR29 Mutation Kit), la PNA/LNA clamp, la SNAPshot PCR e la mutant-Enriched PCR. In genere queste metodiche sono più rapide e sensibili del sequenziamento diretto, presentano, tuttavia, lo svantaggio di evidenziare solo le mutazioni previste a priori. Inoltre, sono meno diffuse e i costi per i reagenti sono in genere superiori a quelli utilizzati per le metodiche di screening. Al momento la metodica più diffusa nei laboratori e, pertanto, da considerarsi di riferimento, è il sequenziamento diretto del prodotto della PCR. Le altre metodiche possono essere utilizzate secondo l'esperienza dei centri.

Raccomandazioni per il protocollo PCR-sequenziamento PCR

- Le reazioni devono essere allestite sotto cappa a flusso laminare, in un ambiente diverso da quello utilizzato per l'analisi dei prodotti di amplificazione, impiegando materiali dedicati e con le opportune precauzioni onde evitare contaminazioni (guanti, puntali con filtro, ecc.).
- Per ogni determinazione devono essere previsti almeno un controllo positivo di amplificazione (campione di DNA genomico precedentemente validato) ed un controllo negativo (miscela di reazione priva di template).
- Per ogni campione da analizzare è opportuno produrre due amplificati, in modo da effettuare la sequenza di due distinti prodotti di PCR.
- Il controllo qualitativo/quantitativo del prodotto della reazione viene effettuato mediante elettroforesi in gel di agarosio e colorazione con etidio bromuro o con altro intercalante, che consente di valutare l'efficienza della PCR e la specificità del risultato.
- Ogni laboratorio dovrebbe validare la metodica di PCR/sequenziamento in via preventiva utilizzando diluizioni di DNA mutato in DNA non-mutato da linee cellulari il cui stato mutazionale di EGFR sia conosciuto. La sensibilità della metodica dovrebbe essere tale da individuare mutazioni quando le copie di DNA mutato rappresentano il 25% circa del totale.

Sequenziamento

- I prodotti di due distinte PCR devono essere sequenziati in forward e reverse, in modo da ottenere un numero di 3-4 sequenze per campione.