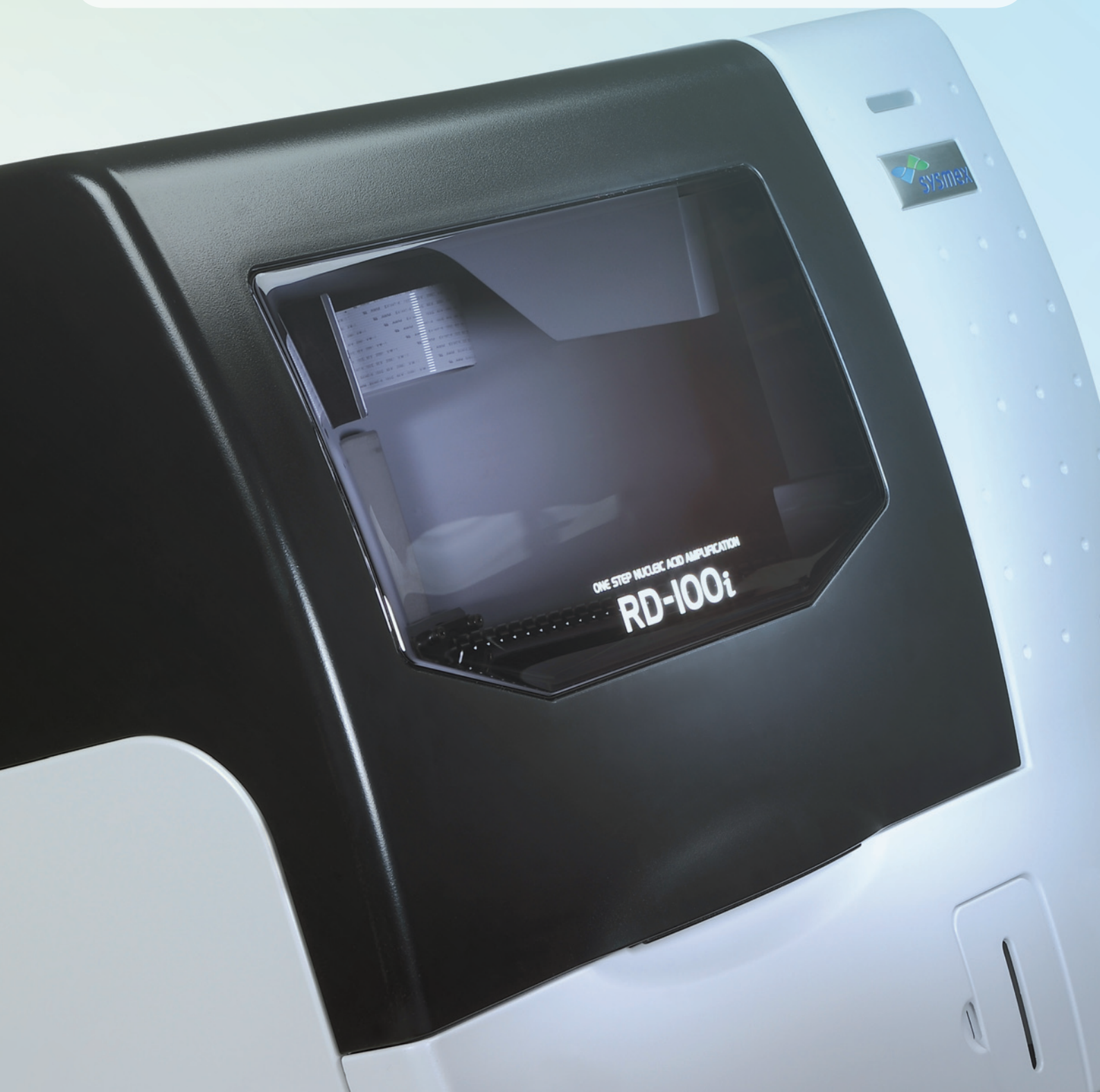




## **RD-100i**

OSNA – la nuova generazione  
nell'analisi del linfonodo sentinella  
nel carcinoma mammario



## RD-100i

# OSNA – la nuova generazione nell'analisi del linfonodo sentinella nel carcinoma mammario

La biopsia del linfonodo sentinella si sta rapidamente affermando come la procedura chirurgica d'elezione per pazienti affette da carcinoma mammario in stadio precoce con linfonodi clinicamente negativi. L'analisi intraoperatoria tradizionale del linfonodo sentinella (SLN) è stata finora eseguita effettuando sezioni congelate oppure tramite analisi citologia di imprint con rapida colorazione E-E (ematossilina ed eosina). La sensibilità di questi metodi istopatologici non è particolarmente elevata, e dipende dal numero di sezioni e livelli che si analizzano. Infatti, soltanto una piccola proporzione del tessuto linfonodale può essere esaminata in dettaglio durante la fase intraoperatoria. Di conseguenza, esiste un rischio considerevole di ottenere risultati falsi negativi che possono essere identificati soltanto da un successivo esame post-operatorio.

OSNA (One Step Nucleic Acid Amplification, amplificazione in un'unica fase degli acidi nucleici) è una procedura diagnostica già affermata su ampia scala che, per la prima volta, consente l'analisi dell'intero linfonodo durante la fase intraoperatoria. È possibile prendere una decisione clinica definitiva, sicura ed informata, senza la necessità di ricorrere a un secondo intervento chirurgico oppure ad un'analisi istopatologica postoperatoria di conferma.



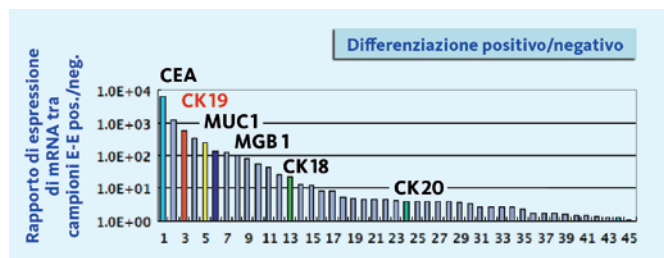
## Tecnologia avanzata

OSNA è un saggio di dosaggio diagnostico molecolare automatizzato che utilizza una tecnologia di amplificazione rapida degli acidi nucleici (RT-LAMP\*) per rilevare il livello di espressione di mRNA della citocheratina 19 (CK19). La citocheratina 19 è un marcatore delle cellule epiteliali normalmente non presente nel tessuto dei linfonodi. La quantità di mRNA della CK19 è correlata alle dimensioni dei foci metastatici. La base per la valutazione del risultato del paziente è una curva standard con tre diversi calibratori.

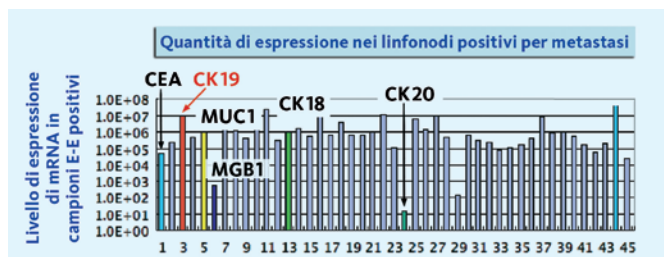
## Selezione del marcatore

Durante lo sviluppo del metodo OSNA, Sysmex ha selezionato 45 mRNA di marcatori candidati, da una banca dati pubblica dell'espressione del gene umano. I criteri di selezione sono stati l'elevato livello di espressione dell'mRNA nei tessuti della ghiandola mammaria in abbinamento con l'espressione minima o assente nel normale tessuto del linfonodo. Il rapporto del livello di espressione di mRNA di questi marcatori è stato valutato utilizzando linfonodi istopatologicamente positivi e negativi (Fig. 1 a+b).

## Test di 45 geni di marcatori potenziali



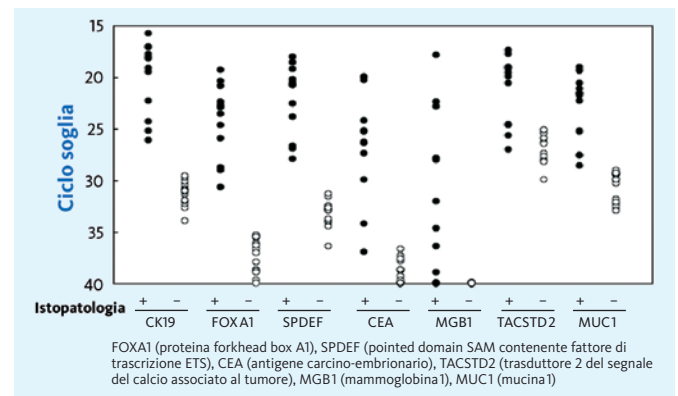
**Fig. 1a** Rapporto di espressione di mRNA tra linfonodi istopatologicamente positivi e negativi



**Fig. 1b** Espressione di mRNA di ciascun marcatore nei linfonodi istopatologicamente positivi

In una seconda fase, i sette marcatori candidati più promettenti con livello elevato di espressione di mRNA in linfonodi positivi a metastasi ed espressione minima in linfonodi negativi, sono stati ulteriormente valutati in un numero maggiore di linfonodi (Fig. 2).

Di conseguenza, la CK19 è stato identificato come il marcatore più idoneo, mostrando elevati livelli di espressione di mRNA in linfonodi metastatici e bassi livelli di espressione in linfonodi non metastatici, offrendo un potenziale di elevata sensibilità e la capacità di discriminare i linfonodi metastatici da quelli non metastatici.



**Fig. 2** Espressione di mRNA di marcatori nei linfonodi istopatologicamente positivi e negativi

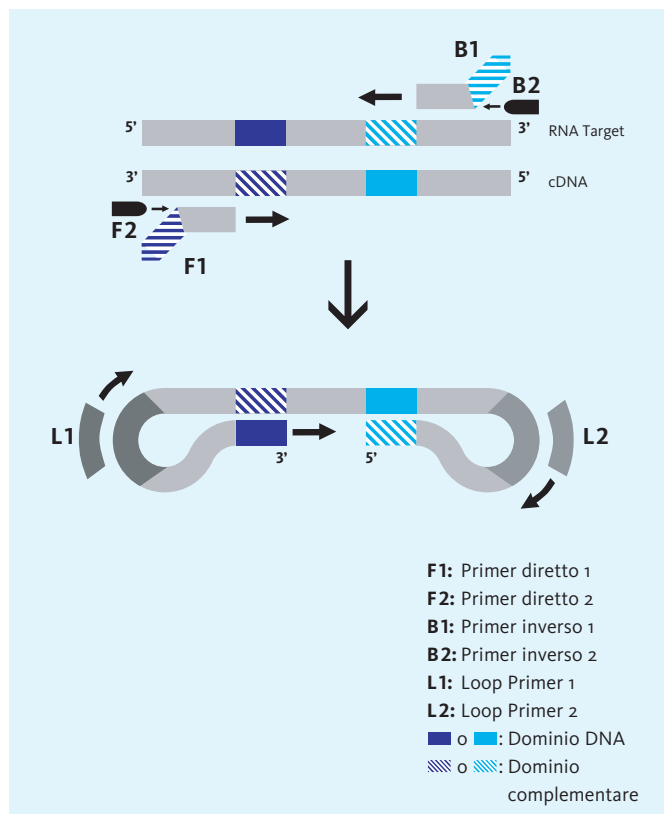
\* RT-LAMP = amplificazione isoterma mediata da loop a trascrizione inversa; utilizzo della licenza su autorizzazione di Eiken Chemical CO., LTD

## Tecnologia RT-LAMP

L'innovativa tecnologia di amplificazione «RT-LAMP» è una rapida procedura isotermica che presenta numerosi vantaggi rispetto ai metodi di amplificazione PCR tradizionali. La reazione di amplificazione avviene in 16 minuti, senza richiedere alcuna estrazione e preventiva purificazione dell'RNA. Le condizioni per la preparazione dei campioni e la particolare struttura del primer sono appositamente studiate per garantire elevata specificità ed evitare risultati falsi positivi.

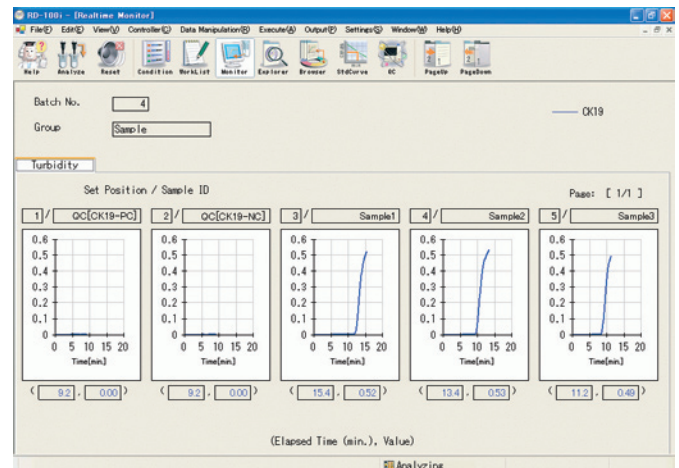
In RT-LAMP si utilizzano sei diversi primers, scelti appositamente al fine di evitare l'amplificazione degli pseudogeni della CK19 o dei loro trascritti, nonché accelerare la reazione del dosaggio.

## Primer LAMP



L'amplificazione indesiderata del DNA genomico viene evitata dalla precipitazione del DNA a basso pH (3,5) durante la preparazione dei campioni e dalla temperatura di reazione isotermica di 65°C.

Il processo viene monitorato in tempo reale nel sistema automatico di amplificazione e rilevamento RD-100i. I risultati sono disponibili in circa 30–45 minuti, a seconda del numero di SLN analizzati (Fig. 3).



**Fig. 3** Monitoraggio della reazione in tempo reale

Tutti i reagenti sono pronti per l'uso.

I coloranti blu o i colloidi marcati con radioisotopi utilizzati nell'identificazione del SLN non interferiscono con la reazione OSNA.

- procedura isotermica a 65°C
- reazione veloce (16 minuti)
- non occorre purificazione dell'RNA
- nessuna amplificazione indesiderata di pseudogeni e DNA genomico
- elevata specificità dovuta a 6 diversi primer

## Studi di validazione e dati clinici

Il metodo OSNA è stato valutato in numerosi studi multicentrici condotti in diversi paesi [1-5]. In ciascuno di questi studi, OSNA è stato posto a confronto con un esame istopatologico approfondito. Dai linfonodi sono state tagliate 4 sezioni di 1 o 2 mm di spessore. Le sezioni sono state utilizzate alternativamente al dosaggio OSNA oppure sottoposte a esame istologico multilivello su sezioni permanenti. Sono state prelevate sezioni da 5 livelli con porzioni di cute di 100, 200 o 250 µm.

Per riassumere, sono stati analizzati 2313 linfonodi e ottenuti i seguenti dati di prestazione:

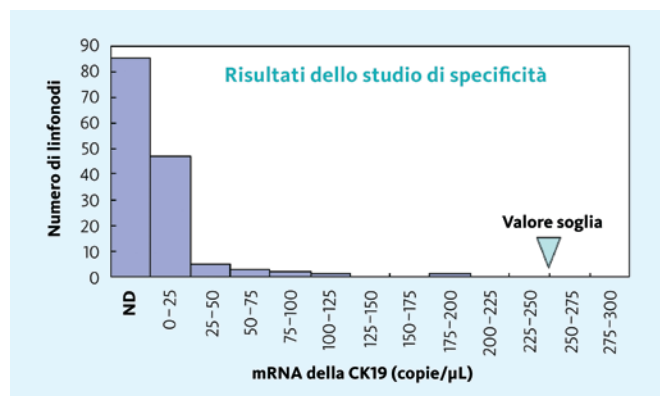
Tasso di concordanza	96.5%
Sensibilità	95.6%
Specificità	96.7%

Come parte dello studio giapponese, si è potuto dimostrare che la specificità di OSNA in pazienti pNO (144 linfonodi analizzati) è stata del 100% (Tabella 1).

n = 144		Esame patologico		
		positivo		negativo
		macro	micro	-
OSNA	(++)	0	0	0
	(+)	0	0	0
	(-)	0	0	144
Specificità: 100% (I.C. 95%: 0.935 ~ 0.993)				

**Tabella 1** L'analisi di 144 linfonodi derivanti da 60 pazienti pNO ha mostrato una specificità del 100%

Il numero di copie di mRNA della CK19 dei linfonodi negativi analizzati in questo studio di specificità è stato sensibilmente inferiore rispetto al valore di cut-off del dosaggio OSNA. Ciò indica chiaramente che si può quasi escludere il rischio di risultati falsi positivi (Fig. 4).



**Fig. 4** Distribuzione del numero di copie dell'mRNA della CK19 di 144 linfonodi prelevati da 60 pazienti pNO

I risultati di tutte le valutazioni cliniche mostrano che l'mRNA della CK19 è un eccellente marcatore molecolare per la rivelazione di metastasi dei linfonodi nel carcinoma mammario. In conclusione, il dosaggio tramite il metodo OSNA può essere applicato come strumento diagnostico per il rilevamento rapido delle metastasi nei campioni biotici dei linfonodi sentinella, prelevati da pazienti con carcinoma mammario.

È conforme alla direttiva europea per la diagnostica in vitro 98/79/CE (marchio CE-IVD) e quindi interamente approvato per uso diagnostico nell'intera UE.

## Pubblicazioni

[1] Tsujimoto M et al. 2007 – *Clin Cancer Res* 13(16): 4807 – One-Step Nucleic Acid Amplification for Intraoperative Detection of Lymph Node Metastasis in Breast Cancer Patients.

[2] Visser M et al. 2008 – *Int. J. Cancer*: 122.2562 – Intra-operative rapid diagnostic method based on CK19 mRNA expression for the detection of lymph node metastases in breast cancer.

[3] Schem C et al. 2009 – *Virchows Arch* (454.203) – One Step Nucleic Acid Amplification – a molecular method for the detection of lymph node metastases in breast cancer patients; results of the German study group.

[4] Tamaki Y et al. 2009 – *Clin Can Res* 15: 2879–84 – Molecular detection of lymph node metastases in breast cancer patients: Results of a multicenter trial using one-step nucleic acid amplification assay.

[5] Snook KL et al. 2010 – *Br J Surg*, (epub ahead of print) – Multicentre evaluation of intraoperative molecular analysis of sentinel lymph nodes in breast carcinoma.

# RD-100i



<b>Strumento</b>	sistema di rilevamento RD-100i dell'amplificazione genica
<b>Metodo</b>	OSNA (One Step Nucleic Acid Amplification, amplificazione in un'unica fase degli acidi nucleici)
<b>Parametro</b>	mRNA della CK19
<b>Tecnologia</b>	RT-LAMP (amplificazione isoterma mediata da loop della transcriptasi inversa)
<b>Rilevamento</b>	variazione della luce trasmessa causata dalla precipitazione di pirofosfato di magnesio a seconda del grado della reazione
<b>Parametri visualizzati</b>	CK19 Q (risultato qualitativo per la CK19) CK19 (tempo di salita della CK19) CK19 C (concentrazione dell'mRNA della CK19)
<b>Cadenza analitica</b>	4 campioni / lotto
<b>Range tessuto/campione</b>	50 - 600 mg
<b>Volume campione</b>	2 µL
<b>Reagenti</b>	LYNORHAG, reagente di omogeneizzazione LYNOAMP BC, reagente di amplificazione Tutti i reagenti pronti per l'uso
<b>Salvataggio dati</b>	2000 campioni
<b>Controllo Qualità</b>	controllo positivo e negativo 180 punti di controllo dati/file
<b>Interfacce</b>	collegamento computer host (RS232, LAN) collegamento stampante (USB)
<b>Dimensioni dell'analizzatore</b>	596 x 548 x 622
l x h x p [mm]	
<b>Peso dell'analizzatore</b>	circa 66 kg

SNSC opzionale con il Servizio «Sysmex Service Agent» e l'accesso remoto.



Eventuali variazioni potrebbero essere dovute a ulteriore sviluppo del prodotto.

**Produttore: Sysmex Corporation**

1-5-1, Wakinohama-Kaigandori, Chuo-ku, Kobe 651-0073, Japan · Phone +81 78 265-0500 · Fax +81 78 265-0524 · [www.sysmex.co.jp](http://www.sysmex.co.jp)

**Rappresentante legale per l'Europa: Sysmex Europe GmbH**

Bornbarch 1, 22848 Norderstedt, Germania · Phone +49 40 52726-0 · Fax +49 40 52726-100 · [www.sysmex-lifescience.com](http://www.sysmex-lifescience.com)

**Distributore: DASIT S.P.A.**

Via Merendi, 22, 20010 Cornaredo (MI) · Phone 02 93 991 1 · Fax 02 93 991 390 · [www.dasit.it](http://www.dasit.it)