

OSNA

(One Step Nucleic Acid Amplification)

intraoperatives, molekularbiologisches Konzept zur Lymphknotendiagnostik beim Mammakarzinom. Ergebnisse der deutschen Studiengruppe

C. Schem¹, N. Maass¹, D. O. Bauerschlag¹, C. Mundhenke¹, W. Jonat¹, T. Löning³, M. Carstensen⁴, K. Tiemann²

¹UNIVERSITÄTSKLINIKUM Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe; ²UNIVERSITÄTSKLINIKUM Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Institut für Allgemeine Pathologie;
³Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, Gynäkopathologie; ⁴Albertinen Krankenhaus, Hamburg, Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe

HINTERGRUND

Die Biopsie des Sentinellymphknotens wird routinemäßig zur Stadienbestimmung von Patienten mit klinisch nodalnegativem Mammakarzinom durchgeführt. Die intraoperative Detektion von Lymphknotenmetastasen ermöglicht eine axilläre Dissektion während derselben Operation und erspart der Patientin auf diese Weise einen zweiten operativen Eingriff. Der Sentinellymphknoten kann durch Gefrierschnittdiagnostik oder Touch Imprint Zytologie intraoperativ bewertet werden. Beide Methoden sind mit falsch negativen Ergebnissen assoziiert, da nur ein kleiner Teil des Lymphknotens untersucht wird. Die sogenannte One Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) ist ein innovativer molekularbiologischer Ansatz für die intraoperative Lymphknotendiagnostik. Das Testverfahren ist automatisiert (Abb. 1) und beruht auf einer Amplifikation von CK19 mRNA direkt aus dem Lymphknotenhomogenisat durch eine isothermale Amplifikationstechnik RT-LAMP (Reverse Transcription Loop-Mediated Amplification). Die gesamte Analysezeit inklusive Homogenisation und Amplifikation beträgt nur 30 Minuten. Somit könnte OSNA eine geeignete Methode für die intraoperative Diagnostik von Lymphknotenmetastasen beim Mammakarzinom sein.

(Abb. 1)

Das OSNA-System



OSNA = One Step Nucleic Acid Amplification

- Molekularbiologische Diagnostik
- Detektion von CK19 m-RNA
- Isothermale Prozedur
- Keine Extraktion von Nukleinsäuren nötig
- Ergebnisse in 30 Minuten bieten die Möglichkeit eines intraoperativen Einsatzes

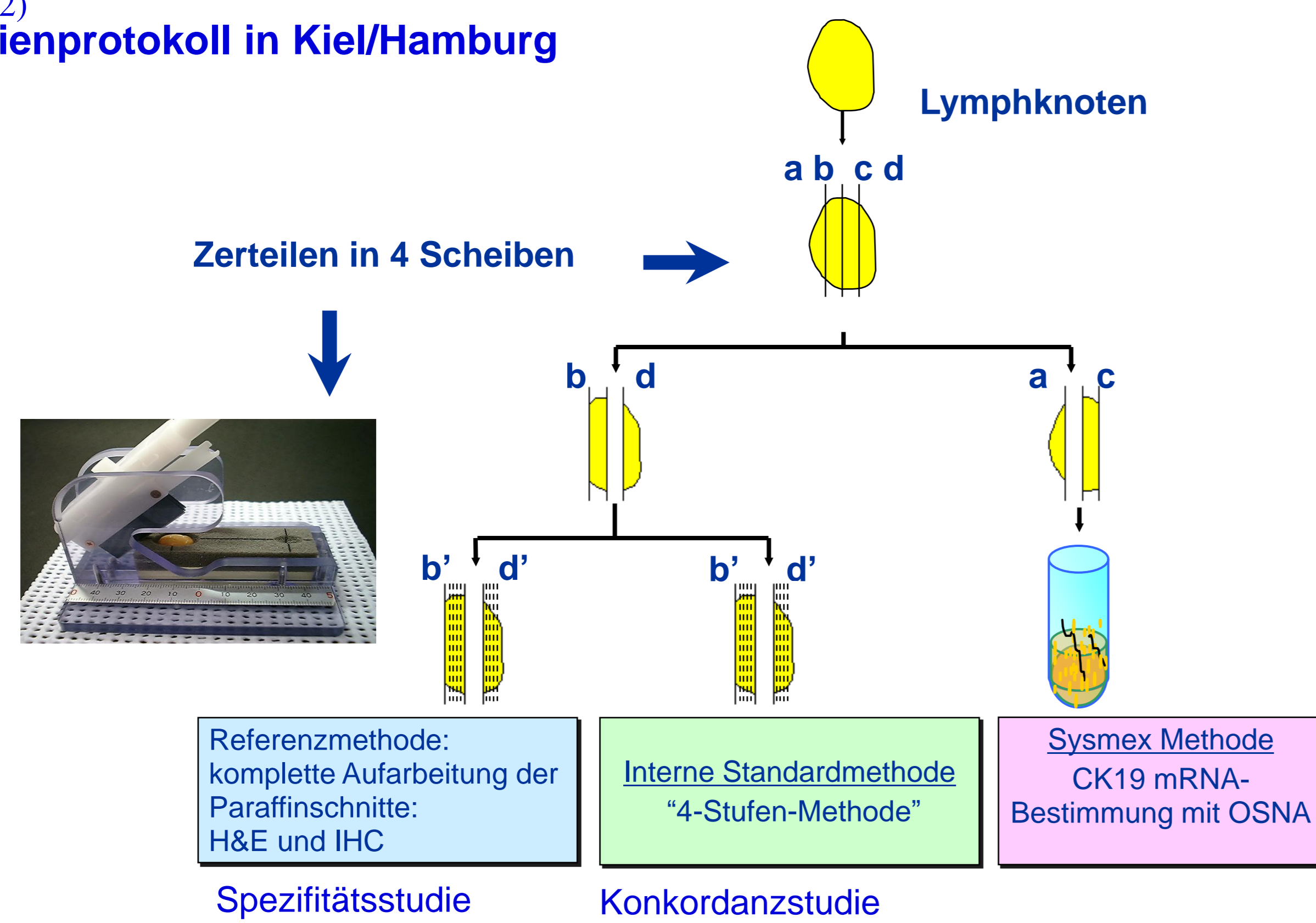


MATERIAL UND METHODEN

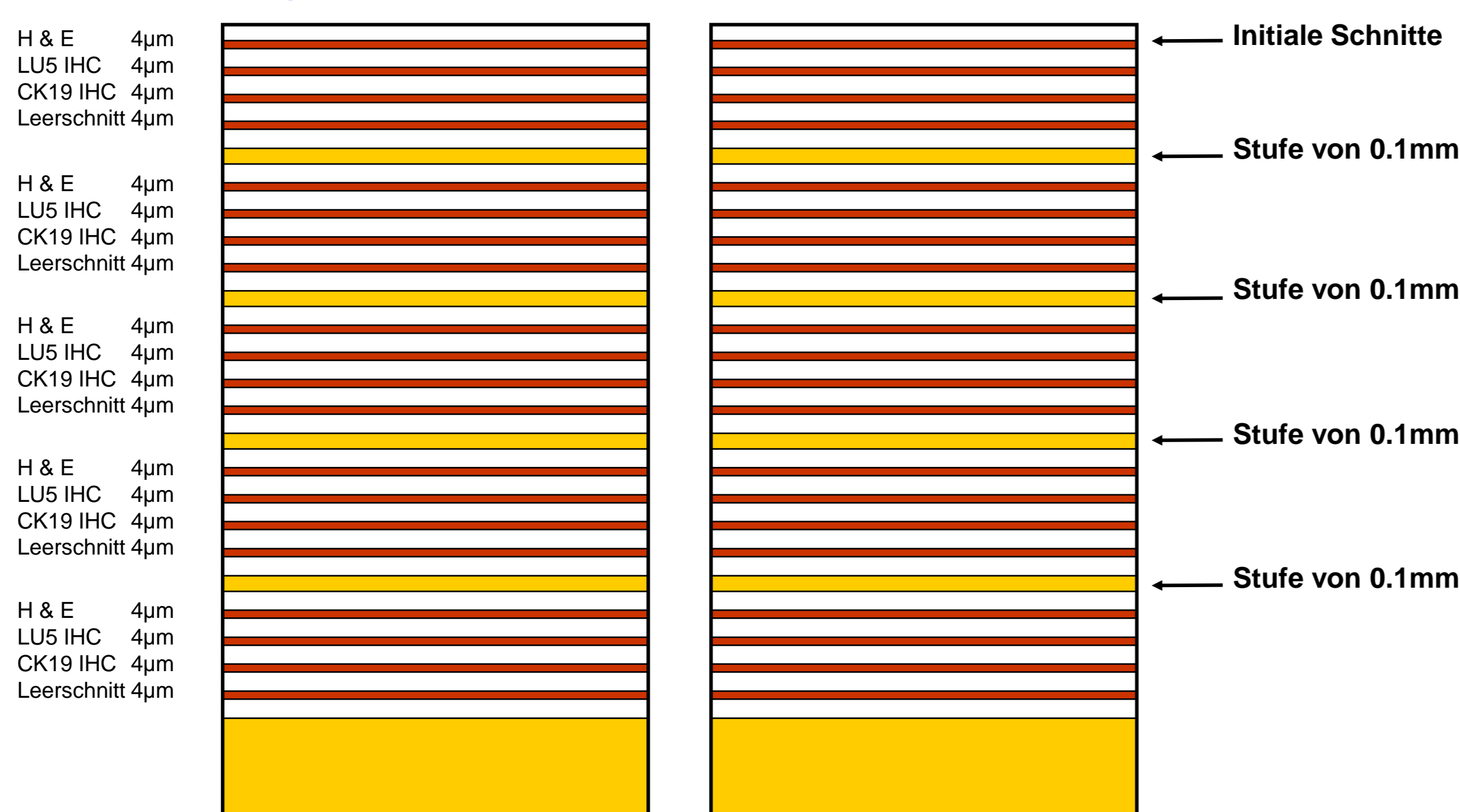
Um OSNA mit der konventionellen immunhistochemischen Färbung zu vergleichen, wurden 342 axilläre Lymphknoten von Brustkrebspatientinnen mit beiden Methoden untersucht. Die Lymphknoten wurden dafür mit einem speziellen Schneideutensil (Abb. 2) in 4 Scheiben geteilt. 2 Scheiben (b&d) wurden mit immunhistochemischen Methoden (Färbung mit H&E, dem Pan-Zytokeratin Antikörper LU5 und einem CK19-spezifischen Antikörper) untersucht, die beiden anderen Scheiben (a&c) mit OSNA analysiert. Wenn die Ergebnisse der beiden Methoden unterschiedlich ausfielen, wurde mit der betreffenden Probe zusätzlich eine QRT-PCR für 3 Epithelzell-spezifische Marker (CK19-, SPDEF- und FOXA1-mRNA) und Western Blot (WB) für CK19 durchgeführt.

(Abb. 2)

Studienprotokoll in Kiel/Hamburg



Histologische Aufarbeitung



ERGEBNISSE

Von 342 untersuchten Proben lieferten 104 positive und 210 negative Ergebnisse mit beiden Methoden. 2 Proben hatten ein positives Ergebnis in der Immunfärbung und ein negatives OSNA Ergebnis. Diese beiden Proben waren auch in der QRT-PCR und im Western Blot negativ und wurden aufgrund der ungleichmäßigen Verteilung von Metastasen (Lokalisationsdiskrepanz, LD) in den vier jeweiligen Scheiben von der Probenkohorte ausgeschlossen. 26 Proben lieferten ein negatives Ergebnis in der Immunfärbung und ein positives OSNA Ergebnis. 12 von diesen Proben waren auch in der QRT-PCR und Western Blot-Analyse positiv (LD). In 6 weiteren Proben konnte keine intakte RNA isoliert werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch in diesen Proben eine ungleichmäßige Metastasenverteilung vorlag. Die "Sensitivität" der Methode betrug 98,1 vor und 100% nach Ausschluss der Proben mit LD, die Konkordanzrate 91,8 bzw. 95,7%, und die Spezifität 91,7% bzw. 96,5%.

Spezifitätsstudie

n = 120	Komplette Aufarbeitung		n = 114	Komplette Aufarbeitung	
	Negativ			Negativ	
OSNA	Positiv	10	OSNA	Positiv	4
	Negativ	110		Negativ	110

vorläufige Spezifität 91.7 %

Spezifität 96.5 %

Lokalisationsdiskrepanz

n=6 (pos. in OSNA, QRT-PCR and WB, neg. in IHC)

Konkordanzstudie

n = 342	4-Stufen Methode		n = 328	4-Stufen-Methode	
	Positiv	Negativ		Positiv	Negativ
OSNA	Positiv	104	OSNA	Positiv	104
	Negativ	2		Negativ	14
			OSNA	Positiv	0
				Negativ	210

Konkordanz 91.8 %

Sensitivität 98.1%

Konkordanz 95.7 %

Sensitivität 100%

Lokalisationsdiskrepanz

n=14 (12 OSNA, QRT-PCR und WB pos., IHC neg.
2 OSNA, QRT-PCR und WB neg., IHC pos.)

SCHLUSSFOLGERUNG

Die Konkordanzrate zwischen beiden Methoden betrug 95,1%, womit diese Ergebnisse verdeutlichen, dass OSNA, basierend auf der Detektion von CK19 mRNA, eine standardisierte und validierte Methode zur intraoperativen Detektion von Lymphknotenmetastasen beim Mammakarzinom darstellt. Als intraoperative Diagnostikmethode kann OSNA die Anzahl an Zweitoperationen bei Mammakarzinompatientinnen möglicherweise so reduzieren. Der Einsatz der OSNA Methode im Rahmen des Sentinelkonzeptes ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.