



OSNA

Gestión del Cáncer
de Mama

Vaya un paso por delante
en el análisis
de ganglio centinela

*Sysmex Life Science –
Adding quality to life!*



Cáncer de mama – nuevas herramientas diagnósticas

El cáncer de mama es la enfermedad maligna más frecuente en mujeres, causando alrededor de 465.000 muertes al año en todo el mundo. El estado de los ganglios linfáticos de la axila es el factor pronóstico más importante. SYSMEX ha desarrollado un nuevo método intraoperatorio para el análisis de linfáticos centinela llamado OSNA (One Step Nucleic Acid Amplification, amplificación de ácido nucleico en un sólo paso).

Ensayos clínicos en Europa y Japón indican que la sensibilidad y la especificidad del ensayo OSNA es comparable a la de un examen histopatológico muy extenso. Como los resultados pueden estar disponibles en menos de 30 minutos, la prueba se puede realizar de modo intraoperatorio y por lo tanto tiene la capacidad de evitar segundas cirugías.

Análisis intraoperatorio convencional de ganglios linfáticos

La biopsia de ganglio centinela está emergiendo como el procedimiento quirúrgico de elección en pacientes de cáncer de mama clínicamente ganglio-negativos, de fase temprana. Cuando se realiza un diagnóstico intraoperatorio del ganglio centinela, las metástasis se detectan mediante criocorte o impronta citológica con una tinción rápida hematoxilina y eosina (H&E). Sin embargo con estos métodos solamente una pequeña parte del tejido del ganglio linfático se analiza en un entorno intraoperatorio, lo que impacta sobre la exactitud del resultado. Numerosos investigadores han publicado que el examen histopatológico intraoperatorio basado en H y E tiene un índice de falsos negativos entre el 5 y el 52%.

OSNA – análisis intraoperatorio de ganglios linfáticos

El método OSNA, establecido recientemente, amplifica el ARNm de la CK19 por un procedimiento isotérmico, específico y sensible, llamado RT-LAMP* (Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification). El progreso de la amplificación se monitoriza en tiempo real. Las tinciones azules o coloides de radioisótopos utilizados para la identificación del ganglio centinela no interfieren con la reacción OSNA.

En el ensayo OSNA no se requiere de la purificación del ARN. En consecuencia, el proceso total del ensayo OSNA se puede completar en alrededor de 30 minutos cuando se utiliza el RD-100i, un instrumento automático para la amplificación y la detección de ARNm de CK19. El ensayo OSNA mide cuantitativamente la cantidad de ARNm de CK19 que correlaciona directamente con el tamaño de los focos metastásicos. Además, el ensayo OSNA tiene la capacidad de analizar el ganglio linfático completo. Por lo tanto, en principio el ensayo OSNA puede analizar el tamaño de focos metastásicos en un ganglio linfático, lo que quiere decir que puede discriminar entre macrometástasis, micrometástasis y no-metástasis. Tanto macrometástasis de micrometástasis como micrometástasis frente a no-metástasis. Los resultados se muestran como (++) para las macrometástasis, (+) para micrometástasis y (-) para negativos.

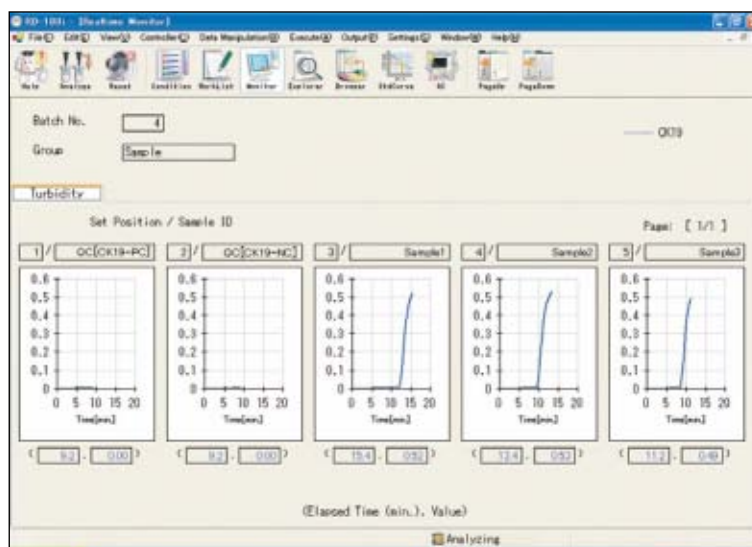


Fig. 1: Control de la reacción en tiempo real

Características de OSNA

- El corto tiempo de amplificación permite la detección intraoperatoria de metástasis de nódulos centinela.
- Su sensibilidad y precisión en combinación con la capacidad de analizar la totalidad del ganglio linfático conduce a la discriminación entre macrometástasis, micrometástasis y no-metástasis.
- Disponibilidad de resultados fiables durante el procedimiento operatorio que ayuda a evitar segundas cirugías.
- Su alto grado de automatización y un procedimiento fácil de usar permite a los usuarios sin experiencia en biología molecular realizar el análisis.

* RT-LAMP = Reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification; bajo licencia EIKEN CHEMICAL CO., LTD.

Selección de marcadores

Durante el desarrollo del método OSNA, SYSMEX seleccionó 45 marcadores de ARNm como candidatos, a partir de la base de datos pública EST. El índice de expresión de estos marcadores de ARNm fue evaluado utilizando ganglios linfáticos histopatológicamente positivos y negativos (Fig. 2).

Ensayo de 45 genes marcadores potenciales y β -actina como genes de mantenimiento

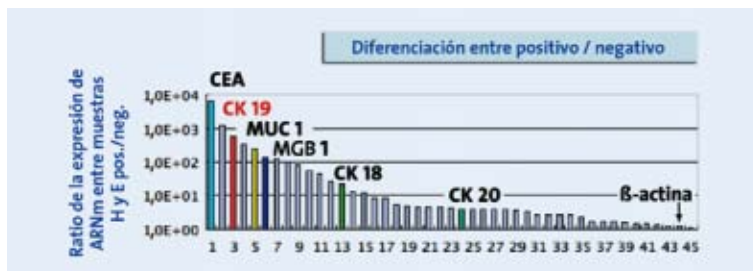


Fig. 2a: Ratio de expresiones de ARN entre ganglios linfáticos histopatológicamente positivos y negativos

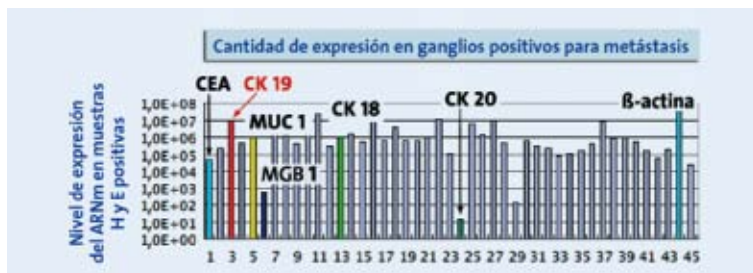


Fig. 2b: Expresión de cada marcador de ARNm en ganglios linfáticos histopatológicamente positivos

Se seleccionaron 7 marcadores y se continuó la evaluación en ganglios linfáticos individuales (Fig. 3). El ARNm de CK19 fue identificado como el mejor marcador, mostrando elevados niveles de expresión y ganglios linfáticos metastásicos y bajos niveles en ganglios linfáticos no metastásicos, ofreciendo por tanto el potencial de una alta sensibilidad y también la capacidad de discriminar ganglios linfáticos metastásicos de los no metastásicos.

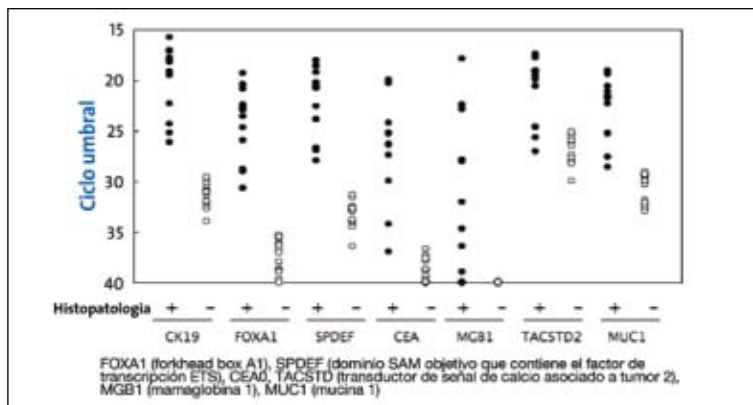


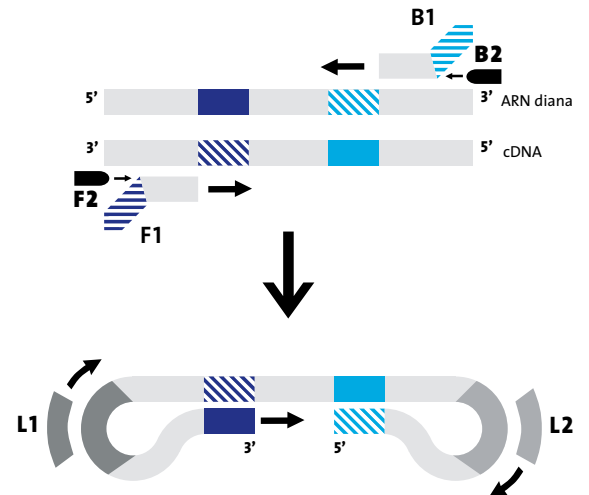
Fig. 3: Expresión de marcadores de ARNm en ganglios linfáticos histopatológicamente positivos y negativos

Diseño de cebadores y elusión de pseudogenes de CK19

Los cebadores actúan como moléculas iniciadoras para la amplificación de la diana de interés. Los procedimientos moleculares convencionales utilizan solamente 2 cebadores. El ensayo OSNA utiliza seis cebadores diferentes que han sido diseñados específicamente para evitar la amplificación de pseudogenes de CK19 o de sus productos de transcripción, lo que puede conducir a resultados falso-positivos.

Además, se evita la amplificación no deseada del ADN genómico debido a la precipitación del ADN a bajo pH durante la preparación de la muestra y la temperatura de reacción isotérmica de 65°C.

Cebador LAMP



- F1: Cebador directo 1
- F2: Cebador directo 2
- B1: Cebador inverso 1
- B2: Cebador inverso 2
- L1: Cebador bucle 1
- L2: Cebador bucle 2
- o ■: Dominio ADN
- ▨ o ▨: Dominio ADN complementario

Estudios clínicos y datos

El método OSNA ha sido evaluado en varios estudios multicéntricos en diferentes países. En todos estos estudios OSNA se comparó con un examen histopatológico muy extenso. Los ganglios linfáticos se cortaron en 4 láminas de 1 o 2 mm de espesor, utilizándose 2 láminas para el ensayo OSNA y 2 láminas para una investigación histoquímica multinivel.

En un estudio multicéntrico en Japón, realizado en 6 centros, se analizaron 325 ganglios linfáticos de 101 pacientes. 43 ganglios resultaron positivos con ambos métodos, 276 ganglios fueron negativos en OSNA y en la histopatología. Estos datos dieron como resultado un índice de concordancia del 98,2% (Tabla 1).

N = 325		Examen patológico		
		positivo		negativo
		macro	micro	-
OSNA	(++)	34	0	0
	(+)	6	3	4
	(-)	0	2	276

Índice de concordancia: 98,2% (95% C.I.: 0,919 ~ 0,958)

Índice de detección de macrometástasis: 100%

Tabla 1: Tabla de resultados de un estudio multicéntrico intraoperatorio en Japón*. Los resultados de OSNA se muestran como (++) para macrometástasis, (+) para micrometástasis y (-) para negativos

La especificidad en pacientes pN0 (144 ganglios linfáticos analizados) del estudio intraoperatorio japonés fue del 100% (Tabla 2).

N = 144		Examen patológico		
		positivo		negativo
		macro	micro	-
OSNA	(++)	0	0	0
	(+)	0	0	0
	(-)	0	0	144

Especificidad: 100% (95% C.I.: 0,935 ~ 0,993)

Tabla 2: El análisis de 144 ganglios linfáticos de 60 pacientes con pN0 proporcionó una especificidad del 100%. Los resultados de OSNA se muestran como (++) para macrometástasis, (+) para micrometástasis y (-) para negativos

El diseño y especificaciones del test pueden modificarse debido a mejoras del producto.

El número de copias de ARNm de CK19 de estos ganglios linfáticos negativos fue considerablemente inferior al valor de corte para el ensayo OSNA (Fig. 4). La probabilidad de que el número de copias de un ganglio linfático histopatológicamente negativo supere el valor de corte del ensayo OSNA es por lo tanto extremadamente baja (menor de 0,5%). Los resultados indican claramente que el ensayo OSNA no proporciona resultados falsos positivos.



Fig. 4: Distribución del número de copias de ARNm de CK19 en 144 ganglios linfáticos de 60 pacientes con pN0

Se han realizado otros estudios en Holanda**, Alemania***, Inglaterra y Francia****.

En resumen, en el momento de la redacción del estudio, 2313 ganglios linfáticos han sido analizados con una especificidad del 96,7% y un índice de concordancia del 96,5%.

Estos resultados muestran que el ARNm de CK19 es un marcador molecular excelente para la detección de metástasis de ganglios linfáticos de cáncer de mama y que el ensayo OSNA se puede aplicar como herramienta diagnóstica para la detección rápida de metástasis en biopsias de ganglio centinela en pacientes de cáncer de mama.

* 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

** 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

*** Schem et al. – Virchows Archiv (in press) – 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

**** Publicaciones en preparación