



## **BIOPSIA LIQUIDA: INDICAZIONI E VADEMECUM TECNICO- METODOLOGICO**

### **Una proposta del Gruppo di Lavoro di Patologia Molecolare della Rete Oncologica**

#### **A cura di:**

Boldorini Renzo, Francia di Celle Paola, Maffè Antonella, Marchiò Caterina, Mariani Sara,  
Orecchia Sara, Sarotto Ivana, Veggiani Claudia

#### **Approvato dal Gruppo di Lavoro di Patologia Molecolare**

**Coordinatori:** Francia di Celle Paola, Venesio Tiziana

#### **Partecipanti:**

Boldorini Renzo, Cappia Susanna, Feyles Elda, Giustetto Doriana, Jocollè Jenny, Maffè Antonella,  
Marchiò Caterina, Mariani Narciso, Morettini Raffaella, Orecchia Sara, Patetta Roberta, Sapino  
Anna, Taraglio Stefano, Ungari Silvana, Veggiani Claudia, Volante Marco

Ultima versione: 12/2016

## Introduzione

### Definizione

Per biopsia liquida in paziente oncologico si intende un prelievo di liquido biologico contenente “tumoral cell free DNA” (tcfDNA), da sottoporre all'analisi molecolare per la ricerca di alterazioni genomiche clinicamente rilevanti. In questa definizione rientrano plasma e siero in prima istanza perché oggetto fino ad ora della maggior parte degli studi di validazione presenti in letteratura nell'ambito di diverse patologie tumorali. Attualmente l'indicazione ad usare questo materiale per scopi di diagnosi predittiva è circoscritto a pazienti affetti da carcinoma polmonare, ove sia previsto o in atto un trattamento con farmaci biologici anti-EGFR [1, 2].

### Indicazioni

L'esame della biopsia liquida rappresenta un test volto alla caratterizzazione molecolare di una lesione tumorale a scopo predittivo in alternativa al test tradizionale su biopsia tissutale in 2 circostanze.

- 1) Franca recidiva di malattia\*: monitoraggio della risposta terapeutica ad inibitore tirosina chinasi anti-EGFR tramite ricerca delle mutazioni di EGFR predittive di risposta riscontrate alla diagnosi oppure presenti *de novo*, in particolare quelle connesse a resistenza farmacologica (ad esempio T790M).
- 2) Alla diagnosi: prima caratterizzazione molecolare solo nel caso non sia possibile eseguire analisi su biopsia tissutale diagnostica [biopsia non tecnicamente effettuabile; oppure biopsia non idonea per quantità o qualità del materiale (ad esempio materiale posto in decalcificante)].

*\* N.B.: la recidiva deve essere franca (ovvero supportata da dati radiologici chiari) e non solo sospetta, dato che il test ha una sensibilità diagnostica che non raggiunge il 100% (un falso negativo su plasma richiederebbe una seconda biopsia solida).*

Per spiegare il punto 2, come riportato dal documento recentemente redatto dai membri della “Pulmonary Pathology Society” del College of American Pathologists (CAP) sulla biopsia liquida nel carcinoma del polmone, “Nonostante l’utilizzo della biopsia liquida possa essere potenzialmente di utilità clinica in una popolazione di pazienti con caratterizzazione molecolare nota effettuata su tumore solido primitivo, questa non sostituisce la convenzionale biopsia tissutale pretrattamento di carcinoma polmonare” [3]. Ciò significa che un risultato negativo alla diagnosi (ma anche in recidiva) è sempre da intendersi come potenziale falso negativo.

## **Metodologia e workflow lavorativo**

### **Materiale richiesto:**

- 10 ml di sangue venoso periferico fresco in EDTA (NO eparina), per purificazione del plasma (cfr. Allegato 1);
- 10 ml di sangue venoso periferico fresco senza anticoagulante, per ottenere il siero (cfr. Allegato 1).

Dati recenti dimostrano che nonostante il plasma contenga un maggiore arricchimento in tcfDNA, a parità di specificità l’aggiunta dell’analisi su siero a quella su plasma produce un aumento dal 65% all’87% della sensibilità diagnostica (valutata rispetto alla biopsia tissutale) [4]. Pertanto è preferibile l’invio di entrambi i materiali. Non mescolare plasma con siero, ma effettuare sempre due analisi separate.

**Tempistica di invio del campione:** entro 2 h dal prelievo a temperatura ambiente. Il tempo massimo di 2 h è dettato dalla necessità di evitare l’emolisi, che inficerebbe i risultati dell’analisi, e il rilascio di cfDNA dai globuli bianchi in apoptosi, che diluirebbe la percentuale di tcfDNA rispetto al DNA libero circolante totale [5]. Inoltre, il tempo stimato di dimezzamento del cfDNA è inferiore a 1 ora. Si ritiene opportuno segnalare sulla provetta inviata l’orario di prelievo espresso in ore e minuti (cfr. Allegato 1). Nel caso in cui non fosse possibile rispettare queste tempistiche (vedi trasferimento fra ospedali diversi) si rende necessario procedere in loco a plasmare e/o sierare il sangue, per poi inviare il plasma e il siero così ottenuti (cfr. paragrafo successivo) refrigerati a +4 °C se in giornata, oppure congelati a -20 °C se inviati nei giorni successivi.

### **Separazione del plasma e del siero:**

- per ottenere il plasma e il siero centrifugare il campione di sangue intero a 2000xg per 10 minuti, a 4°C (preferenzialmente) o a temperatura ambiente (non superiore a 25°C);
- recuperare il plasma e/o il siero in nuove provette (a scelta falcon da 15ml o più provette da 1,5-2ml);
- centrifugare nuovamente per rimuovere i “detriti” cellulari: a 2000xg per 10 minuti a 4°C o temperatura ambiente (per falcon da 15 ml); a 13.000 rpm (per eppendorf).

*NB: il plasma e il siero congelati non devono subire più di un ciclo di congelamento/scongelo. Se in seguito a scongelamento si osservano crioprecipitati nel campione centrifugare a 6.800xg per 3 minuti.*

**Estrazione DNA:** esistono in commercio diversi kit e sistemi di estrazione. Brevemente si citano quali esempio: QIAMP Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen); Maxwell 16 Circulating Nucleic Acid kit (Promega).

A seconda del kit è previsto un volume di partenza di plasma o di siero di 1-2 ml.

Evitare sistemi manuali perché poco riproducibili.

Il cfDNA va conservato a -80°C e scongelato per un massimo di 2 volte.

### **Metodiche applicabili**

Studio mutazionale delle principali mutazioni negli esoni 18, 19, 20, 21 del gene *EGFR*.

Le metodiche applicabili sono svariate: Real Time PCR, digital droplet PCR, BEAMing, next generation sequencing, ecc. Alcune metodiche consentono di individuare puntualmente la mutazione, altre consentono di identificare il codone coinvolto dalla mutazione, altre ancora permettono solo di identificare l'esone all'interno della quale si trova la mutazione senza specificarne posizione e/o caratteristiche.

Sensibilità richiesta per un kit specifico per cfDNA: 1%.

Evitare sistemi troppo sensibili (<0.1%) per possibilità di falsi positivi.



## **Refertazione**

*Modalità:* la refertazione può seguire le modalità già precedentemente introdotte per il referto molecolare su tessuto.

Data la sensibilità diagnostica globale dei risultati ottenuti su plasma e siero (circa 87%), per sensibilità analitiche dell'1%, i risultati negativi per mutazione non vanno identificati come “wild type”, essendo sempre possibile una falsa negatività.

La frase proposta potrebbe essere pertanto come segue:

“La ricerca della mutazione ha dato esito negativo.

N.B. Per effetto di una dinamica variabile di rilascio in circolo del cfDNA, l'esito della metodica su biopsia liquida non raggiunge il 100% di concordanza rispetto alla biopsia tissutale. In caso di negatività si consiglia pertanto di ripetere la ricerca di mutazioni in prima istanza su nuova biopsia liquida. Se confermato nuovamente l'esito negativo, sarebbe auspicabile ripetere definitivamente l'analisi su biopsia tissutale, se tecnicamente effettuabile”.

Le mutazioni rilevabili con la metodica utilizzata vanno dettagliate e insieme al riscontro di eventuali mutazioni nel campione analizzato vanno definite le loro caratteristiche di sensibilità e/o resistenza.

*Tempistica:* 7-10 giorni lavorativi.

## **Tariffazione**

Al momento non esiste una tariffa specifica, pertanto si suggerisce di costruirla con le tariffe delle singole voci che compongono il processo, in base al tipo di metodica impiegata in maniera analoga all'analisi su tessuto.

## RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. AIOM. *Neoplasia del Polmone*. 2015 [accessed June 2016]; Available from: <http://www.aiom.it/professionisti/documenti-scientifici/linee-guida/polmone/1,714,1,;>
2. EMA. *Guideline on good pharmacogenomic practice*. 2016 [accessed June 2016]; Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2016/05/WC500205758.pdf;](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2016/05/WC500205758.pdf;)
3. Sholl, L.M., et al., *Liquid Biopsy in Lung Cancer: A Perspective From Members of the Pulmonary Pathology Society*. Arch Pathol Lab Med, 2016;
4. Santarpia, M., et al., *Feasibility of cell-free circulating tumor DNA testing for lung cancer*. Biomark Med, 2016. **10**(4): p. 417-30;
5. Bronkhorst, A.J., J. Aucamp, and P.J. Pretorius, *Cell-free DNA: Preanalytical variables*. Clin Chim Acta, 2015. **450**: p. 243-53.



## **Allegato 1: Indicazioni pratiche per la modalità di prelievo e l'invio dei campioni.**

### **PRELIEVO**

Il campione deve essere prelevato preferibilmente al mattino in 2 provette contenenti EDTA (tappo viola per emocromo) e 2 provette prive di anticoagulante (tappo rosso o beige), sulle quali dovrà essere riportato, oltre al nome del paziente, anche l'ora di esecuzione del prelievo.

### **INVIO E DOCUMENTAZIONE**

Sarebbe ottimale che le provette pervenissero al laboratorio entro 1 ora e comunque non oltre le 2 ore dal prelievo, a temperatura ambiente o in alternativa a 4°C. Alle provette va allegata tutta la documentazione tra cui la richiesta e l'impegnativa. Se si utilizzano impegnative dematerializzate i codici del Decreto Ministeriale da inserire sono 91.36.5 (estrazione DNA) e 91.29.6 (Real Time).