

Presentazione documento intersocietario: SIBioC-AIOM-SIF-SIAPEC/IAP

Negli ultimi anni è ormai ampiamente accettato che l'analisi genomica giochi un ruolo di elevato potenziale nel chiarire le cause delle malattie e nel contribuire a migliorare la qualità di vita. Le conoscenze derivanti dal completamento del sequenziamento del genoma umano, inclusa l'individuazione di quelle varianti genetiche responsabili delle differenze fenotipiche tra gli individui, hanno permesso di acquisire nuovi dati importanti che permetteranno di cambiare anche molti approcci diagnostici e terapeutici nel prossimo futuro. In particolare, le tecnologie di sequenziamento massivo in parallelo (NGS) hanno espanso le nostre capacità di effettuare ricerche e studi clinici translazionali, arrivando ad un modello sempre più vicino alla cosiddetta Medicina di Precisione. Al momento attuale, lo screening di mutazioni definite *druggable*, cioè corrispondenti ad un target molecolare su cui indirizzare specifici farmaci, sta diventando una pratica quasi routinaria per i pazienti oncologici e per diversi tipi di tumori in molte parti del mondo. L'impiego di test di screening multigenici specifici per patologia, basati sulle tecnologie NGS, rappresenta un importante modello di efficienza in termini di valutazione costo/efficacia ed iniziano a diffondersi in modo popolare nelle comunità cliniche. Unitamente a queste tipologie di analisi, stanno entrando in clinica altre nuove promettenti metodiche, basate su tecnologie mini o non-invasive, che permettono di identificare mutazioni *druggable*, consentendo di seguire la malattia e la sua evoluzione, in termini di eventuale cambio del fenotipo correlato all'insorgenza di nuove varianti nel genoma o alla scomparsa di quelle che lo rendevano sensibile al trattamento. Questo approccio dinamico, basato su un concetto generalmente definito biopsia liquida altro non è che il monitoraggio molecolare, cellulare o subcellulare del paziente attraverso un prelievo di sangue, da cui isolare le diverse componenti molecolari (acidi nucleici, DNA tumorale) o subcellulari (esosomi, microparticelle o microvescicole) che rappresentano un potenziale informativo di importanza straordinaria per il futuro della medicina molecolare e di precisione. In realtà, tale concetto è vecchissimo perché l'esame emocromocitometrico è il primo esempio di biopsia liquida, e ha da sempre costituito un campo di attività proprio della medicina di laboratorio. Pertanto, nel prossimo futuro, più che parlare di biopsia liquida, sarà opportuno usare il concetto di "Profilazione molecolare di acidi nucleici circolanti, in diverse matrici biologiche liquide (sangue, saliva, urine, liquidi cavitari)".

Gli approcci tecnologici correlati a tali tipologie di analisi stanno mostrando margini enormi di sviluppo, non solo in termini di sensibilità e specificità, ma anche di armonizzazione delle procedure in un'ottica orientata alla diagnostica, oltre che alla ricerca translazionale. Il ruolo della medicina di laboratorio sarà quindi fondamentale nella definizione dei percorsi di standardizzazione e di validazione analitica e clinica dei nuovi biomarcatori tracciabili sulle suddette matrici.

Il documento intersocietario SIBioC-AIOM-SIF-SIAPEC/IAP, rappresenta lo stato dell'arte sull'impiego dei test su biopsia liquida prendendo in esame diversi aspetti: Definizione, Applicazioni cliniche, Problematiche pre-analitiche, Manipolazione del cell-free DNA (estrazione, quantificazione, conservazione), Metodiche per lo studio delle mutazioni, NGS, Refertazione. Al momento, le applicazioni cliniche riguardano i pazienti con *non-small cell lung carcinoma*, mentre le prospettive future sono relative al tumore metastatico del colon retto.

L'obiettivo del documento, che subirà periodici aggiornamenti sulla base delle nuove evidenze che emergeranno dalla scienza, è quello di armonizzare le procedure tra i centri che erogano tali tipologie di analisi.

Ettore Capoluongo, (Roma) Coordinatore del Gruppo di Studio SIBioC Biologia Molecolare
Francesco Salvatore, CEINGE, Università Federico II, Napoli

Raccomandazioni per l'esecuzione di indagini molecolari su biopsia liquida in oncologia

Ettore Capoluongo¹, Massimo Barberis², Lucio Crinò³, Romano Danesi⁴, Marzia Del Re⁴, Stefania Gori³, Antonio Marchetti², Caterina Marchiò², Nicola Normanno³, Carmine Pinto³, Antonio Russo³, Anna Sapino², Andrea Sartore Bianchi³, Mauro Truini², Tiziana Venesio²

¹Coordinatore del Gruppo di Studio Biologia Molecolare (SIBioC)

²Società Italiana di Anatomia Patologica e Citologia Diagnostica-Divisione Italiana della International Academy of Pathology (SIAPEC-IAP)

³Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM- SIBioC)

⁴Società Italiana di Farmacologia (SIF)

ABSTRACT

Recommendations for using of molecular assays on liquid biopsy: the first document provided by intersociety Group AIOM, SIF, SIAPEC-IAP, SIBioC. Liquid biopsy in cancer patients is mainly based on the analysis of circulating tumor DNA (ctDNA) enriched from biological fluids. This approach has more recently been proposed for the detection of oncogenic alterations in blood, cerebrospinal fluid (CSF), or urine through the use of sensitive technologies, mainly digital PCR (ddPCR) and massive parallel sequencing (MPS). Liquid biopsies have the advantage of overcoming some of the drawbacks associated with tumor biopsies, being blood samples easy to obtain from patients. Plasma ctDNA may better represent the total landscape of oncogenic alterations found across all tumor sites. Several commercially available liquid biopsy platforms based on MPS technology are currently analytically validated, with sensitivities, specificities, false negative rates, false positive rates, positive predictive values, and negative predictive values evaluated in comparison with tissue. The specificity of ctDNA is generally high while the sensitivity varies between different platforms. However, these data have not yet led to the incorporation of ctDNA into routine clinical practice. The present Recommendation represents a synthesis of the main evidences supporting use of liquid biopsy based assays in clinical setting. This inter-society approved document was prepared by a panel of expert belonging to four scientific societies who tried to provide the main useful information for the implementation of liquid biopsy-based test in clinical and laboratory practice.

BIOPSIA LIQUIDA: DEFINIZIONE

Con il termine di biopsia liquida si fa riferimento all'utilizzo di fluidi biologici come surrogato del tessuto neoplastico per ottenere informazioni utili a fini diagnostici, prognostici o per predire la risposta alla terapia con specifici farmaci antitumorali. L'analisi del DNA tumorale circolante (*circulating tumor DNA*, ctDNA) contenuto nel DNA libero circolante (*cell free DNA*, cfDNA) che può essere isolato dal sangue periferico, rappresenta ad oggi il principale approccio di biopsia liquida impiegato nella pratica clinica. Tuttavia, è possibile che nel futuro altri derivati del sangue, quali le cellule tumorali circolanti, l'RNA circolante ed i microRNA (miRNA), le piastrine, gli esosomi, come pure altri fluidi biologici quali le urine e il liquido cefalorachidiano, possano essere utilizzati nella pratica clinica

per avere ulteriori informazioni rispetto a quelle ottenibili mediante l'analisi del ctDNA. La quota di cf/ctDNA può risultare variabile sia dal punto di vista del momento di raccolta del campione che dalla condizione clinica del paziente.

Nell'attuale pratica clinica, l'analisi della biopsia liquida è generalmente riferita all'identificazione di mutazioni *driver* presenti nel ctDNA derivanti sia dal tumore che dalle cellule tumorali circolanti. Il ctDNA è tuttavia una frazione, a volte estremamente esigua, del cfDNA totale che è possibile isolare dal plasma dei pazienti neoplastici e che contiene anche DNA derivante da cellule non-trasformate.

Alcuni sistemi commerciali (con marchio CE-IVD) reperibili sul mercato europeo ed italiano riportano come target il ctDNA mentre altri il cfDNA, dato che quando si effettua l'analisi non si ha certezza della presenza di

Corrispondenza a: Ettore Capoluongo, Fondazione Policlinico Gemelli IRCCS, Università Cattolica, Roma
ettoredomenico.capoluongo@policlinicogemelli.it

Ricevuto: 25.11.2018

Accettato: 02.01.2019

Pubblicato on-line: 04.02.2019

DOI: 10.19186/BC_2019.005

DNA di origine tumorale fino all'eventuale rilevazione di una mutazione.

Per questo motivo, nel presente documento si farà riferimento al cfDNA più in generale, ed al ctDNA in caso di positività per le mutazioni oggetto dell'analisi.

La biopsia liquida presenta alcuni evidenti vantaggi rispetto a quella tradizionale effettuata sul tessuto, ovvero:

- la procedura non è invasiva, in quanto si tratta di un semplice prelievo di sangue pressoché privo di complicanze;
- può essere ripetuta nel tempo per monitorare l'evoluzione molecolare della malattia, sebbene non esista ad oggi evidenza che indirizzi a modificare la scelta terapeutica, in assenza di progressione clinica di malattia;
- è in grado di rappresentare in maniera più esaustiva rispetto alla biopsia tissutale l'eterogeneità molecolare della malattia contenendo, almeno potenzialmente, DNA tumorale derivante dalle diverse aree di uno stesso tumore e dalle possibili sedi di malattia.

La biopsia liquida presenta però anche alcuni limiti:

- la quantità di ctDNA nel contesto del cfDNA è spesso estremamente limitata, in funzione sia del volume che delle localizzazioni di malattia, e ciò può risultare in falsi negativi;
- in presenza di eterogeneità tumorale, la biopsia liquida fornisce scarse informazioni sulla rappresentatività nel contesto del tumore del biomarcatore individuato.

APPLICAZIONI CLINICHE DELLA BIOPSIA LIQUIDA

Il principale campo di applicazione della biopsia liquida ad oggi è rappresentato dall'identificazione di fattori predittivi in pazienti con malattia avanzata. Tuttavia, è possibile che nel prossimo futuro queste indicazioni vengano estese, con particolare riguardo all'identificazione della malattia minima residua in pazienti sottoposti ad intervento chirurgico radicale.

Per quest'ultima applicazione sono però necessari ulteriori studi e miglioramenti tecnici e di standardizzazione, prima che essa possa essere direttamente importata nella pratica clinica.

La biopsia liquida è al momento principalmente utilizzata per l'analisi mutazionale del gene dell'*epidermal growth factor receptor* (EGFR) in pazienti con carcinoma polmonare non a piccole cellule (*non-small cell lung cancer*, NSCLC) in stadio avanzato. In particolare, esistono due diversi scenari in cui il test EGFR su biopsia liquida trova attuale indicazione.

L'analisi mutazionale dell'EGFR al momento della diagnosi in pazienti *naïve* con NSCLC avanzato

La determinazione dello stato mutazionale del gene EGFR su campione tissutale/citologico ottenuto mediante biopsia o intervento chirurgico al momento della diagnosi è attualmente raccomandata in tutti i pazienti con NSCLC, stadio IIIB-C e IV, ad eccezione dei pazienti fumatori con istotipo squamoso, per la scelta della migliore strategia terapeutica (vedi Linee Guida AIOM Tumori toracici)¹. Tuttavia, dati recenti suggeriscono che circa il 25% delle biopsie polmonari standard non riesca a fornire una quantità/qualità di materiale adeguato all'analisi molecolare.

Molteplici studi e meta-analisi hanno valutato l'accuratezza diagnostica dell'analisi del ctDNA per l'identificazione delle più frequenti mutazioni attivanti del gene EGFR (delezioni esone 19, L858R dell'esone 21) in pazienti *naïve* con NSCLC avanzato.

Nel complesso questi studi hanno dimostrato una buona specificità del test EGFR su plasma, in genere superiore al 90%. La sensibilità risulta invece essere inferiore, con oscillazioni tra il 50% e l'80% in funzione della tecnologia impiegata.

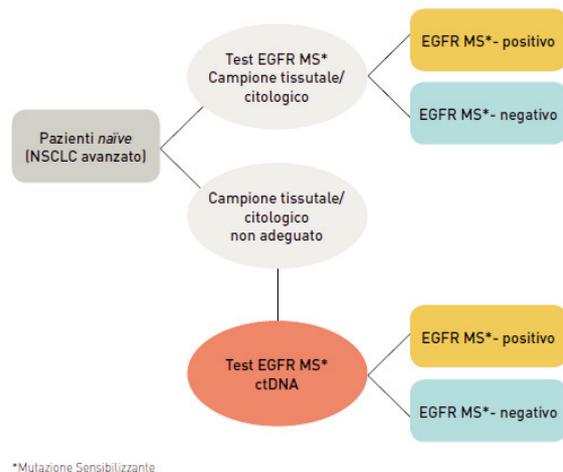


Figura 1. Algoritmo del test EGFR in pazienti *naïve* con NSCLC avanzato
*Mutazione Sensibilizzante

Raccomandazione 1

Sulla base di tali evidenze la valutazione dello stato mutazionale del gene EGFR su biopsia liquida è attualmente raccomandata come possibile alternativa all'analisi su tessuto tumorale nei pazienti con nuova diagnosi di NSCLC avanzato in cui la quantità e/o qualità del tessuto disponibile non siano sufficienti per effettuare le analisi molecolari previste.

¹Per le indicazioni terapeutiche, è possibile consultare la Linee Guida AIOM, disponibile come materiale supplementare (1S)

L'analisi mutazionale del gene EGFR al momento della progressione di malattia a EGFR-TKI (tyrosine kinase inhibitor) in pazienti con NSCLC avanzato

La recente approvazione ed ammissione a rimborsabilità da parte dell'Agenzia Italiana del Farmco (AIFA) del primo inibitore di terza generazione di EGFR (Determina AIFA Gazzetta Ufficiale n.184 dell'8.08.2017), per il trattamento di pazienti con NSCLC localmente avanzato o metastatico positivo per la mutazione T790M, rende necessaria la rivalutazione dello stato mutazionale del gene EGFR al momento della progressione radiologica dopo trattamento con un EGFR-TKI, in modo tale da definire la migliore strategia terapeutica.

I risultati dello studio AURA hanno dimostrato come la progressione libera da malattia dei pazienti stratificati per la presenza della mutazione T790M in base al test eseguito su tessuto oppure su biopsia liquida sia sovrapponibile, confermando quindi la possibilità di utilizzo del test su ctDNA. Va comunque considerato che la sensibilità e la specificità del test per la T790M appaiono in generale inferiori rispetto alle mutazioni sensibilizzanti dell'EGFR.

Raccomandazione 2

Data la sua non-invasività e rapidità di esecuzione, il test T790M mediante biopsia liquida è attualmente impiegato in diversi centri come primo approccio diagnostico in tutti i pazienti con NSCLC avanzato EGFR-positivo in progressione dopo trattamento con EGFR-TKI. Tuttavia, a causa del rischio di falsi negativi associati a tale metodica, tutti i pazienti nei quali l'analisi mutazionale su cfDNA risulti negativa devono essere sottoposti ad analisi mutazionale su tessuto tumorale prelevato mediante re-biopsia, in modo tale da definire la migliore strategia terapeutica. Prima di procedere alla biopsia tessutale, si può eventualmente prendere in considerazione la ripetizione della biopsia liquida.

Per garantire una migliore interpretazione del test, oltre alla T790M deve essere anche eseguita la valutazione della mutazione sensibilizzante di origine. In caso di assenza di tale mutazione, il test dovrà essere considerato non-informativo in quanto il prelievo non contiene quantità sufficienti di ctDNA. A tale riguardo, molteplici studi, e una recente meta-analisi, hanno chiaramente evidenziato come la sede delle metastasi tumorali influenzi in modo significativo l'accuratezza diagnostica dell'analisi mutazionale del gene EGFR eseguita su ctDNA. La sensibilità di tale metodica nella determinazione sia delle mutazioni attivanti che della mutazione di resistenza T790M del gene EGFR può infatti variare dall'80% in presenza di metastasi extra-toraciche al 50% in presenza di localizzazioni esclusivamente intra-toraciche.

Tabella 1
NSCLC avanzato: interpretazione del risultato del test EGFR su biopsia liquida in pazienti in progressione dopo EGFR TKI

Mutazione EGFR sensibilizzante	T790M	Interpretazione
+	+	T790M positivo
+	-	T790M negativo. La biopsia tessutale è raccomandata.
-	+	T790M positivo. L'analisi deve essere ripetuta per escludere possibili falsi positivi.
-	-	Campione non informativo. I livelli di ctDNA sono troppo bassi. Ripetere prelievo o procedere alla biopsia tessutale.

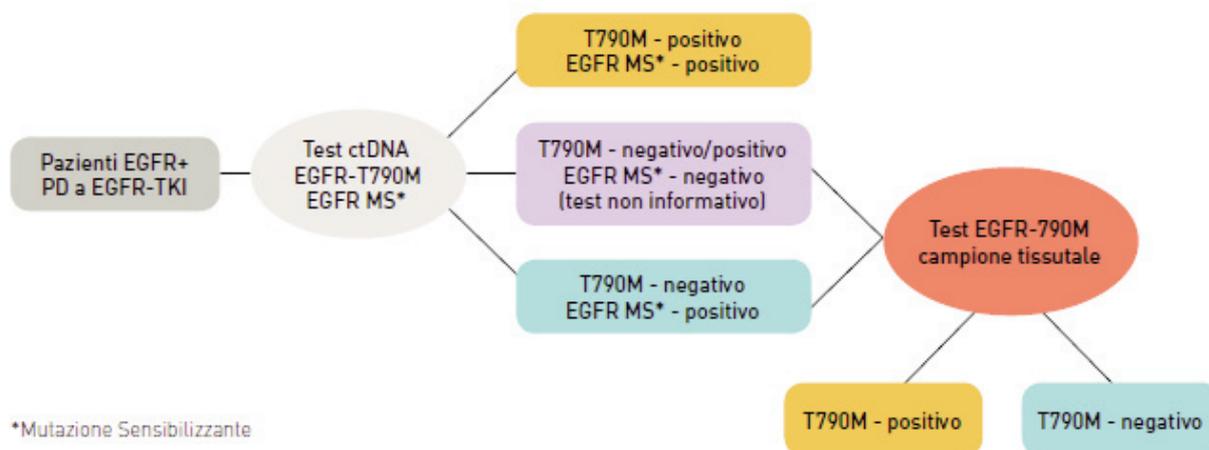


Figura 2.
Algoritmo del test EGFR in pazienti con NSCLC avanzato in progressione dopo EGFR-TKI

Al fine di incrementare le possibilità di successo della biopsia liquida, l'analisi dovrebbe essere eseguita al momento dell'evidente progressione di malattia, quando sono maggiori le possibilità che il DNA tumorale sia rilasciato nella circolazione.

Infine, non esistono ad oggi evidenze da studi prospettici sull'opportunità di interrompere il trattamento con EGFR-TKI in caso di comparsa di mutazione T790M nella biopsia liquida in assenza di progressione di malattia.

Prospettive future: applicazione clinica della biopsia liquida nel tumore del colon-retto metastatico

Numerosi studi hanno dimostrato la fattibilità di eseguire l'analisi *RAS* su biopsia liquida come potenziale sostituto dell'analisi su tessuto tumorale nel carcinoma del colon-retto (CCR) metastatico. La concordanza tra i due approcci è, negli studi più moderni, $\geq 90\%$ e, se da una parte vi è ulteriore margine di miglioramento in termini di sensibilità, dall'altra bisogna tenere conto che:

- il tumore e il sangue periferico sono due tessuti distinti e pertanto non è ragionevole attendersi una concordanza perfetta;
- le discrepanze osservate in termini di specificità, assumendo il tessuto tumorale come riferimento, trovano giustificazione nel fatto che la biopsia liquida è in grado di superare l'eterogeneità spaziale e temporale che limitano l'analisi tissutale. Inoltre, la biopsia liquida offre i vantaggi di un approccio relativamente non invasivo e più duttile, sia per la possibilità di effettuare più facilmente la determinazione dello stato mutazionale in base al momento esatto dell'intervento terapeutico con anti-*EGFR*, sia per il ridotto tempo di risposta.

Tuttavia, alcune importanti considerazioni limitano l'importazione *tout court* della biopsia liquida nella clinica quale sostituto per l'analisi mutazionale di *RAS* nel carcinoma del colon-retto ai fini dell'esclusione dalla terapia con cetuximab e panitumumab. In primo luogo, risulta difficile l'interpretazione dei risultati negativi del test che potrebbero essere condizionati dalle concentrazioni di cfDNA e dalla sensibilità delle metodiche ed essere quindi falsi negativi. Inoltre, quest'analisi non è ancora controllata da programmi di VEQ quali quelli messi in atto per l'analisi tissutale. Infine, non esistono sufficienti evidenze cliniche per stabilire in termini quantitativi quale sia la soglia percentuale di alleli *RAS* mutati determinata su sangue periferico che conferisca resistenza alla terapia con anti-*EGFR*, visto che la conoscenza attuale si basa su analisi svolte su tessuto tumorale. Pertanto, l'analisi dello stato di *RAS* del tumore per la scelta terapeutica deve essere effettuata come gold standard sul tessuto tumorale in tutti i casi in cui questo sia possibile e vicariata dall'analisi mediante biopsia liquida solo nei rari casi di tessuto insufficiente/inaccessibile. Infine, per quanto riguarda l'impiego della biopsia liquida per monitorare la

risposta a farmaci anti-*EGFR*, questa deve essere oggi considerata unicamente come indagine di ricerca e non trova attuale applicazione nella pratica clinica.

PROBLEMATICHE PRE-ANALITICHE: DAL PRELIEVO DI SANGUE AL cfDNA

Il cfDNA può essere estratto da diversi liquidi biologici. Tuttavia, le procedure maggiormente standardizzate nella pratica clinica riguardano l'isolamento del cfDNA dal sangue periferico.

La quantità di DNA che è possibile estrarre dal sangue periferico è spesso molto limitata, nella misura di pochi ng/mL, di cui il ctDNA è solo una frazione. Infatti, la concentrazione del DNA target nel plasma dipende da diversi fattori, tra cui: il carico di malattia, i livelli di espressione della mutazione nelle cellule del tumore primitivo, la velocità di rilascio del ctDNA nel torrente circolatorio e i livelli di DNA rilasciati da cellule non trasformate (ad esempio, in conseguenza di processi infiammatori che si instaurano nel tessuto sano che circonda il tumore o di lisi dei leucociti dopo il prelievo di sangue). Per questi motivi la fase pre-analitica deve essere attentamente controllata.

Un primo problema che può inficiare la qualità del campione è costituito dall'emolisi che può generarsi durante la flebotomia: è necessario, pertanto, che il prelievo di sangue sia effettuato da personale altamente qualificato.

Il cfDNA può essere isolato dal siero o dal plasma. Tuttavia, diversi studi hanno dimostrato che l'uso del plasma è da preferirsi al siero; in quest'ultimo, infatti, il processo di coagulazione causa il rilascio di DNA genomico derivante dai leucociti. Non esistono al momento indicazioni conclusive sulla quantità di sangue da impiegare ai fini diagnostici ed in routine di laboratorio. Tuttavia, molti kit diagnostici indicano la quantità minima di plasma necessaria per l'analisi.

Il prelievo può essere raccolto in tubi standard K2- o K3-EDTA oppure impiegando tubi contenenti speciali fissativi, in grado di stabilizzare il sangue e il cfDNA per diversi giorni. Se il prelievo è effettuato impiegando tubi standard, si deve tenere conto di due fattori importanti:

- il cfDNA ha una breve emivita, stimata in circa 2,5 ore;
- diversi studi hanno dimostrato che superate le 3 ore dal prelievo si può verificare una lisi dei leucociti con conseguente rilascio di DNA germinale che determina una diluizione del DNA tumorale. Pertanto, il sangue raccolto in tubi contenenti solo EDTA può essere conservato prima dell'isolamento del plasma per un massimo di 3 ore a temperatura ambiente. La conservazione del sangue alla temperatura di 4 °C non previene la lisi dei leucociti.

Nei casi in cui non sia possibile processare il campione entro le 3 ore dal prelievo, si raccomanda l'utilizzo di tubi contenenti specifici conservanti in grado di stabilizzare sia il cfDNA che i leucociti. Tuttavia, questi tubi garantiscono, in genere, la conservazione del prelievo solo in un range limitato di temperatura (16-

24°C). Pertanto, è importante assicurarsi che queste temperature siano rispettate in caso di trasporto del campione.

Per l'eliminazione dei residui cellulari e per ottenere un campione idoneo alle successive analisi, il plasma deve essere isolato mediante centrifugazione, assicurandosi di aver completamente allontanato il contaminante leucocitario derivante dal *buffy coat*. Esistono diversi protocolli di centrifugazione. È consigliabile eseguire una prima centrifugazione a bassa velocità (1200-1600 g) per evitare la lisi dei leucociti ed una successiva centrifugazione del soprannatante ad elevata velocità (≥ 3000 g) per rimuovere tutti i contaminanti. Le centrifugazioni devono essere eseguite senza freno. È suggerito anche l'impiego di una centrifuga refrigerata (4°C).

Il plasma ottenuto può essere conservato a -20 °C per brevi periodi (~ 1 mese) o, per periodi più prolungati, a -80 °C, temperatura che garantisce una maggiore stabilità del DNA. Tuttavia, all'aumentare del periodo di conservazione diminuisce la quantità totale di cfDNA che è possibile estrarre, soprattutto se il campione dovesse essere sottoposto a cicli di congelamento e scongelamento.

ESTRAZIONE, QUANTIFICAZIONE E CONSERVAZIONE DEL cfDNA

Esistono molti metodi per l'estrazione del cfDNA, che comprendono sia l'utilizzo di kit commerciali che di protocolli sviluppati dai laboratori. A causa della piccola quantità e della natura molto frammentata del cfDNA nel plasma (<1.000 bp), non dovrebbero essere utilizzate metodiche di estrazione validate su campioni tissutali o su altre matrici biologiche. Il metodo di estrazione deve essere molto affidabile e deve generare quanto più DNA possibile del campione in esame, per non compromettere il risultato dell'analisi e generare risultati falsi negativi o positivi.

Per l'estrazione e la purificazione del cfDNA da plasma sono oggi disponibili vari kit commerciali dedicati a questo specifico uso. Questi kit sono in genere basati sull'utilizzo di colonnine dotate di membrane di silice, in associazione con pompa a vuoto, oppure sull'impiego di biglie magnetiche, per la cattura degli acidi nucleici.

Questi sistemi sono corredati da protocolli di semplice esecuzione e permettono di estrarre da 1 a 24 campioni, freschi o congelati, simultaneamente, e catturare frammenti di cfDNA da plasma a partire da un minimo di 10 μ L a un massimo di 10 mL di campione. In generale, si ritiene che 2 mL di plasma sia la quantità minima necessaria in grado di fornire risultati accurati utilizzando le diverse metodiche di estrazione. Inoltre, la maggior parte dei kit sopra citati contiene reagenti o, in generale, dispositivi, in grado di concentrare l'eluato in un volume flessibile di eluizione (20-150 μ L).

Una volta estratto, il cfDNA deve essere sottoposto a quantificazione, in modo da ottimizzare il processo di amplificazione e di conoscere se le successive analisi molecolari a partire dal cfDNA estratto possono essere

possibili.

L'accuratezza nella fase di quantificazione può essere ottenuta con sistemi di elettroforesi capillare oppure fluorimetrici. In generale, i kit di estrazione sopra citati consentono di ottenere campioni di cfDNA di alta qualità e con una concentrazione superiore a 5 ng/ml. La quantità di DNA estratto è comunque influenzata dallo stato di malattia e dal momento del prelievo.

La conservazione ottimale del cfDNA ne consente un utilizzo anche a distanza di tempo per poter eseguire ulteriori indagini molecolari, previo esplicito consenso informato da parte del paziente. Il processo richiede una strumentazione adeguata, tra cui congelatori a -20°C/-80°C, dispositivi di controllo grafico della temperatura, sistemi di allarme acustico, controlli di qualità del materiale biologico conservato.

METODICHE PER LO STUDIO DELLE MUTAZIONI NEL ctDNA

Polymerase Chain Reaction Real Time (Real Time PCR)

L'analisi di mutazioni puntiformi oppure di piccole inserzioni/delezioni su ctDNA può essere condotta tramite utilizzo di tecnologie di *Real Time PCR*, spesso modificate per incrementare la sensibilità dell'analisi. Ad esempio, esistono in commercio kit per ctDNA basati sulla tecnologia *Amplification Refractory Mutation System (ARMS)/SCORPION* che rilevano le mutazioni a carico degli esoni 19, 20 e 21 di *EGFR*. Questi kit permettono la co-amplificazione di uno o più alleli mutati e di un gene di controllo endogeno. Inoltre, una specifica miscela di oligonucleotidi di controllo consente la valutazione della qualità e quantità del DNA presente nei campioni. L'analisi con questi kit permette di rilevare basse percentuali di allele mutato in presenza di elevate quantità di DNA genomico *wild-type* mediante amplificazione con sonde sequenza-specifiche marcate con FAM ed HEX, che possono raggiungere un limite di rilevazione (LOD) anche inferiore allo 0,5%, con differenze tra le varie mutazioni identificate.

PCR digitale

La PCR digitale (dPCR) è un'evoluzione di ultima generazione della PCR di cui esistono due piattaforme tecnologiche: *droplet digital PCR* – (ddPCR) e *Beam, Emulsion, Amplification, Magnetics* (BEAMing dPCR). Entrambe le metodiche si basano sulla ripartizione del campione in migliaia di goccioline (*droplets*) omogenee in un'emulsione olio-acqua; la successiva amplificazione dell'emulsione contenente il DNA permette la discriminazione del DNA target grazie all'uso di sonde fluorescenti.

Queste caratteristiche sono di grande rilevanza nell'ambito dell'analisi del ctDNA, laddove è necessario ricercare ed amplificare rare molecole di DNA tumorale in presenza di un grande eccesso di DNA germinale *wild-type*. Infatti, la ripartizione del campione in

goccioline ha la funzione di ridurre la competizione tra il DNA mutato tumorale e il DNA *wild-type*, aumentando la specificità e la sensibilità dell'analisi. In questo modo l'abbondanza relativa del DNA target mutato rispetto al *wild-type* viene aumentata.

La quantità di DNA richiesta per l'amplificazione in dPCR è di 3 ng (con un intervallo di 50 fg-100 ng) e di 3-30 ng per la BEAMing dPCR.

La ddPCR è caratterizzata da un'unica fase di amplificazione del DNA target, che avviene all'interno di circa 20.000 goccioline, uguali per dimensione e volume, formatesi dall'emulsione olio-acqua, e dall'elaborazione finale dei dati tramite la statistica di Poisson. La BEAMing dPCR, invece, prevede una fase di pre-amplificazione del cfDNA utilizzando PCR convenzionale per amplificare il target di interesse; successivamente i prodotti di amplificazione generati vengono ripartiti in migliaia di goccioline omogenee in un'emulsione olio-acqua con aggiunta di microsferiche magnetiche a cui i prodotti di PCR restano fisicamente legati per poi essere facilmente separati usando un magnete. L'elaborazione finale dei dati avviene tramite citometria a flusso.

Esistono in commercio saggi per la determinazione delle mutazioni a carico degli esoni 18-21 di EGFR mediante le tecniche di dPCR. La sensibilità e la specificità dei test con ddPCR e BEAMing dPCR sono, rispettivamente, dello 0,1% e dello 0,01%. Seppur l'approccio con BEAMing dPCR sembri avere sensibilità più elevata, in letteratura è frequentemente riportata una specificità più bassa rispetto alla ddPCR (87% versus 97%, rispettivamente).

Raccomandazione 3 Protocollo di dPCR

- Le reazioni dPCR devono essere allestite sotto cappa a flusso laminare, in un ambiente diverso da quello utilizzato per la fase di estrazione del cfDNA e dell'analisi dei prodotti di amplificazione, usando opportune precauzioni per evitare contaminazioni (camice dedicato, guanti, puntali con filtro e così via). In ogni caso, va predisposta un'area dedicata alle procedure di preparazione in dPCR.

- L'esecuzione della ddPCR prevede una prima fase in cui si prepara la soluzione contenente il DNA, la "master mix" e le sonde. Questa soluzione viene poi trasferita in un'apposita cartuccia, all'interno della quale viene dispensato l'olio per formare l'emulsione. La cartuccia viene poi introdotta nell'apposito generatore di goccioline a formare le gocce contenute nell'emulsione olio-acqua. Il passaggio successivo prevede il trasferimento dell'emulsione dalla cartuccia alla piastra da 96 pozzetti, per procedere poi con la reazione di amplificazione.

- Per ogni analisi devono essere previsti un controllo positivo di amplificazione (ad esempio, utilizzando un campione di cfDNA precedentemente validato) e un controllo negativo (ossia, la miscela di reazione priva di "template" di DNA).

- Ogni laboratorio dovrebbe validare la metodica di dPCR in via preventiva utilizzando diluizioni di DNA mutato in DNA non mutato da linee cellulari nelle quali lo stato mutazionale di EGFR sia noto. In alternativa, si può ricorrere a campioni di riferimento certificati che garantiscono una corretta determinazione di sensibilità, specificità e LOD.

- L'analisi dei risultati avviene grazie all'uso di un lettore connesso a un computer in cui uno specifico software è in grado di trasformare il segnale da analogico a digitale e rilevare le goccioline negative (prive del DNA target e/o del DNA di riferimento) e positive (che contengono l'allele target) in ciascun campione grazie alle varie fluorescenze rilevate.

Nella ddPCR, le goccioline negative e quelle positive, vengono contate singolarmente e la frazione di goccioline positive in un campione determina la concentrazione del DNA target espresso in copie/μl. Il software di analisi è in grado di dare informazioni riguardo al numero totale di goccioline generate (per una buona reazione queste dovrebbero essere >11.000) considerando il numero di gocce positive per la mutazione e positive per l'allele *wild-type*. I risultati possono essere elaborati per fornire la concentrazione della mutazione come copie/ml, frazione allelica, rapporto tra gli alleli e *fractional abundance*.

Infine, la presenza di componenti come etanolo o paraffina (come quella utilizzata in alcuni tubi per preservare la lisi cellulare) possono interferire con la formazione dell'emulsione rendendo l'analisi non valutabile.

Nuove metodologie di sequenziamento

Le nuove metodologie di sequenziamento definite come *next generation sequencing* (NGS) sono caratterizzate da un'enorme produttività che varia da poche giga-basi (gb) per i sequenziatori da banco, a 6.000 gb per i sequenziatori di maggiori dimensioni. Con NGS è possibile sequenziare simultaneamente milioni di differenti molecole di DNA potendo individuare in una singola analisi mutazioni, variazioni del numero di copie geniche, fusioni e espressione genica. Inoltre, la sua flessibilità consente di valutare simultaneamente pannelli di geni (da poche unità a centinaia), l'intero esoma umano (circa 30 mb), l'intero genoma (circa 3,3 gb) o l'intero trascrittoma.

La marcatura con codici a barre molecolari permette il sequenziamento contemporaneo di campioni provenienti da diversi pazienti.

L'impiego di pannelli di NGS consente una migliore interpretazione di indagini eventualmente negative per mutazioni *driver* di interesse. Infatti, l'individuazione di almeno una variante genica nella biopsia liquida rappresenta la prova della presenza di ctDNA e consente di refertare con maggiore sicurezza un risultato negativo per la mutazione di interesse.

Le due tecnologie con maggiore diffusione sono prodotte da Illumina (San Diego, CA, USA) e da ThermoFisher (Ion Torrent, Waltham, MA, USA). La prima prevede la fissazione e l'amplificazione clonale *in situ* delle molecole di DNA su sottile supporto vitreo. Nella seconda, il DNA è separato e amplificato in goccioline lipidiche e quindi distribuito in pozzetti microscopici al fondo dei quali vi è un sottile chip semiconduttore. In entrambi i casi l'insieme delle singole molecole di DNA da sequenziare è chiamato *library*. La *library* è generata da amplificazione selettiva delle regioni target con reazioni PCR

multiple oppure con la tecnologia *hybrid capture* con DNA *baits* (esche).

L'uso della NGS per la biopsia liquida richiede modifiche dei protocolli normalmente usati per analisi su sangue e tessuti. Il tasso di errore dell'NGS varia da 0,1 a 1% quindi, ad esempio, una mutazione con una frequenza allelica sotto tale soglia non può essere differenziata dal cosiddetto rumore di fondo. I protocolli operativi dedicati alla biopsia liquida riducono il tasso di errore. Un esempio classico di tale modifica è l'incorporamento di uno specifico identificatore molecolare prima della fase di amplificazione del DNA.

Sono state sviluppate tecniche ultrasensibili di NGS dedicate all'analisi del ctDNA. *Il Cancer Personalized Profiling by deep Sequencing (CAPP-Seq)* ha come elemento caratterizzante un selettore che identifica diverse classi di mutazioni somatiche con sensibilità e specificità superiori al 90%. Risultati simili in termini di sensibilità e specificità sono stati raggiunti con le tecniche *Tagged-amplicon deep sequencing (Tam-Seq)* e *Safe-Sequencing System (Safe-SeqS)*.

In conclusione, la tecnica NGS per lo studio del ctDNA per quanto sensibile e specifica, è ancora molto costosa e richiede un flusso di lavoro complesso da parte di personale altamente specializzato. L'uso in clinica di pannelli multigene su questa matrice biologica richiede, inoltre, l'uso di software sofisticati e, talora, l'ausilio di personale bioinformatico.

È quindi evidente che la scelta tra le diverse tecnologie deve tenere conto della loro sostenibilità e dell'uso clinico richiesto nel contesto in cui si opera.

LA REFERTAZIONE

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

- l'identificazione del paziente;
- l'identificazione del clinico e della struttura che ha richiesto l'analisi;
- il materiale utilizzato per l'analisi (tipologia, volume);
- il momento del prelievo (diagnosi, periodo intra/post chemioterapia o terapia biologica);
- la data del prelievo del materiale utilizzato per l'analisi;
- le modalità di conservazione del prelievo;
- la data di arrivo del campione nel laboratorio che esegue l'analisi;
- la metodica impiegata per l'esecuzione dell'analisi con indicazione della sensibilità e dei limiti del test;
- le mutazioni indagate;
- i risultati del test, con specificazione del tipo di mutazione eventualmente rilevata;
- l'interpretazione del dato e una valutazione complessiva dell'analisi con le eventuali problematiche legate al caso;

Il referto deve essere compilato su un modello prestabilito, datato e firmato dal responsabile del servizio.

In considerazione dell'impatto sulla strategia terapeutica, il tempo per la refertazione non deve superare i 5 giorni lavorativi dalla richiesta della determinazione.

BIBLIOGRAFIA

- Abbosh C, Birkbak NJ, Wilson GA et al. Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution. *Nature* 2017; 545: 446-51.
- Cai X, Janku F, Zhan Q, et al. Accessing genetic information with liquid biopsies. *Trends Genet.* 2015;31:564–75.
- Chaudhuri AA, Chabon JJ, Lovejoy AF et al. Early detection of molecular residual disease in localized lung cancer by circulating tumor DNA profiling. *Cancer Discov.* 2017 ;7:1394-403.
- El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, et al. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin Chim Acta* 2013; 424:222-30.
- Garcia-Murillas I, Schiavon G, Weigelt B et al. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci Transl Med* 2015; 7: 302ra133.
- Karlovich C, Goldman JW, Sun JM, et al. Assessment of EGFR Mutation Status in Matched Plasma and Tumor Tissue of NSCLC Patients from a Phase I Study of Rociletinib (CO-1686). *Clin Cancer Res.* 2016;22:2386-95.
- Luo J, Shen L, Zheng D. Diagnostic value of circulating free DNA for the detection of EGFR mutation status in NSCLC: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2014;4:6269.
- Merker JD, Oxnard GR, Compton C, et al. Circulating tumor DNA analysis in patients with cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. *J Clin Oncol* 2018;36:1631-41.
- Normanno N, Denis MG, Thress KS, et al. Guide to detecting epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in ctDNA of patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Oncotarget* 2017;8:12501-16.
- Novello S, Barlesi F, Califano R, et al. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2016;27(suppl 5):v1-v27.
- Oxnard GR, Thress KS, Alden RS, et al. Association between plasma genotyping and outcomes of treatment with osimertinib (azd9291) in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2016;34:3375-82.
- Qiu M, Wang J, Xu Y, et al. Circulating tumor DNA is effective for the detection of EGFR mutation in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2015;24:206-12.
- Rosell R, Moran T, Queralt C et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med* 2009; 361: 958–67.
- Sacher AG, Paweletz C, Dahlberg SE, et al. Prospective validation of rapid plasma genotyping for the detection of EGFR and KRAS mutations in advanced lung cancer. *JAMA Oncol* 2016;2:1014-22.
- Siravegna, G. & Bardelli, A. Blood circulating tumor DNA for non-invasive genotyping of colon cancer patients. *Mol Oncol* 2016;10:475–80.
- Ten Bosch JR, Grody WW. Keeping up with the next generation:

massively parallel sequencing in clinical diagnostics. *J Mol Diagn* 2008;10:484–92.

Tie J, Wang Y, Tomasetti C et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med* 2016;8:346ra392.

Thress KS, Brant R, Carr Th, et al. EGFR mutation detection in ctDNA from NSCLC patient plasma: A cross-platform comparison of leading technologies to support the clinical development of AzD9291. *Lung Cancer* 2015;90:509-15.

Thompson JC, Yee SS, Troxel AB, et al. Detection of Therapeutically Targetable Driver and Resistance Mutations in Lung Cancer Patients by Next-Generation Sequencing of Cell-Free Circulating Tumor DNA. *Clin Cancer Res* 2016;22:5772-82.

Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin Chem* 2009;55:641–58.

Zhu G, Ye X, Dong z, Lu YC, et al. Highly sensitive droplet digital PCR method for detection of EGFR-activating mutations in plasma cell-free DNA from patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Mol Diagn* 2015;17:265–72.