



ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στόχος: Η αξιολόγηση της διαγνωστικής απόδοσης της πλατφόρμας Idylla, σε σύγκριση με την καθιερωμένη εργαστηριακή πρακτική, για την ανίχνευση μεταλλάξεων κλινικής σημασίας στο *EGFR* σε ιστολογικά δείγματα ΜΜΚΠ.

Μέθοδοι: Μεταξύ 2022-2023, συμπεριλήφθησαν 100 ασθενείς με ΜΜΚΠ που παρακολουθούνται στην Παθολογική Ογκολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου. Η ανάλυση σωματικών μεταλλάξεων στο γονίδιο *EGFR* πραγματοποιήθηκε με τη πλατφόρμα Idylla, και σε μια υποομάδα 41 ασθενών με διαθέσιμο υλικό μέσω στοχευμένης αλληλούχησης και προσδιορίστηκαν: Α) η συμφωνία των μεθόδων, Β) η ευαισθησία και ειδικότητα, και Γ) ο χρόνος διεκπεραίωσης της ανάλυσης από τη λήψη του δείγματος μέχρι την αναφορά των αποτελεσμάτων.

Αποτελέσματα: Στο 20% των δειγμάτων που ελέγχθηκαν με το Idylla, ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο *EGFR*. Συγκεκριμένα, στο 9% ανιχνεύθηκαν ελλείψεις στο εξώνιο 19 (Del 19), στο 6% η μετάλλαξη L858R στο εξώνιο 21, στο 3% ανιχνεύθηκαν ενθέσεις του εξωνίου 20 και στο 2% η G719X στο εξώνιο 18 του *EGFR*. Οι μεταλλάξεις του *EGFR* βρέθηκαν συχνότερα σε γυναίκες (P=0.007). Υπήρχε υψηλή συνολική συμφωνία (~95.12%) μεταξύ του Idylla και της στοχευμένης αλληλούχησης κατά Sanger. Σε 3 περιπτώσεις ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις μόνο με τη πλατφόρμα Idylla και δεν ανιχνεύθηκαν ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Ο χρόνος διεκπεραίωσης της εξέτασης με το Idylla ήταν σημαντικά μειωμένος σε σχέση με τη στοχευμένη αλληλούχηση.

Συμπέρασμα: Η χρήση του Idylla μπορεί να καλύψει τις ανάγκες για την ταχεία και με υψηλή αξιοπιστία μοριακή ανάλυση μεταλλάξεων με κλινική σημασία στο *EGFR* για τους ασθενείς με ΜΜΚΠ.

CONTACT

Σοφία Αγγελάκη MD, PhD
Καθηγήτρια Παθολογικής Ογκολογίας,
Εργαστήριο Μεταφραστικής Ογκολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης,
Παθολογική Ογκολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου
Email: agelakisofia@gmail.com
Phone: 2810392438

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *EGFR* ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΜΗ ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ (ΜΜΚΠ)

Μιχαηλίδου Κλείτα¹, Κουτουλάκη Χαρά¹, Καρνιαδάκης Ιωάννης¹, Μαυρίδης Κωνσταντίνος³, Κυριακίδου Αθηνά^{1,2}, Παπαδάκη Μαρία¹, Βορριάς Ελευθέριος^{1,2}, Αλεξόπουλος Παναγιώτης⁴, Κεφαλογιάννης Εμμανουήλ⁴, Μαυρουδής Δημήτριος^{1,2}, Αγγελάκη Σοφία^{1,2}

1. Εργαστήριο Μεταφραστικής Ογκολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης; 2. Παθολογική-Ογκολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου, Κρήτη; 3. Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας, Ηράκλειο, Κρήτη; 4. Θωρακοχειρουργική Κλινική, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου, Κρήτη

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η **μοριακή ανάλυση του όγκου** για την ανίχνευση σωματικών μεταλλάξεων στα **εξώνια 18-21 του γονιδίου *EGFR***, συνιστάται σε **όλους ασθενείς** με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (ΜΜΚΠ).

Οι μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται για τη μοριακή ανάλυση διακρίνονται σε δυο ευρείες κατηγορίες: **α) μεθοδολογίες αλληλούχησης** όπως οι τεχνολογίες αλληλούχησης νέας γενιάς (NGS) και **β) μεθοδολογίες που βασίζονται στην PCR**. Η αλληλούχηση κατά Sanger θεωρείται η μέθοδος αναφοράς (gold standard) αν και το όριο ανίχνευσης της μεθόδου φτάνει σε συχνότητα μεταλλαγμένου αλληλομόρφου (MAF) 20%. Από την άλλη, η τεχνολογία **NGS**, καθιστά δυνατή την ταυτόχρονη αλληλούχηση πολλαπλών γονιδίων με βελτιωμένη ευαισθησία ανίχνευσης μεταλλάξεων, ωστόσο, αποτελεί **ιδιαίτερα απαιτητική διαδικασία** όσον αφορά την ποσότητα και την ποιότητα του DNA, την εξειδίκευση του προσωπικού και στο χρόνο πραγματοποίησής της.

Μια εναλλακτική λύση αποτελεί η πλατφόρμα **Idylla της Biocartis** που αποτελεί ένα νέο, πλήρως αυτοματοποιημένο σύστημα μοριακής διαγνωστικής που **βασίζεται στην PCR πραγματικού χρόνου**. Η πλατφόρμα Idylla έχει πιστοποιηθεί με CE-IVD για την ανίχνευση **51 διαφορετικών μεταλλάξεων στα εξώνια 18-21 του γονιδίου *EGFR***, τόσο σε τομές παραφινωμένου ιστού (FFPE) όσο και σε δείγματα υγρής βιοψίας.

Σημαντικό είναι επίσης το γεγονός ότι η ανάλυση με την πλατφόρμα Idylla έχει ευαισθησία ανίχνευσης που φτάνει τουλάχιστον σε **συχνότητα μεταλλαγμένου αλληλομόρφου 5%** όταν χρησιμοποιείται μια **μόνο τομή FFPE ιστού 5μm με περιεκτικότητα >10% σε καρκινικά κύτταρα**

ΣΚΟΠΟΣ

Α) Η αξιολόγηση της απόδοσης του πλήρως αυτοματοποιημένου συστήματος **Idylla** για την ανίχνευση κλινικά σημαντικών σωματικών μεταλλάξεων στο γονίδιο *EGFR* σε δείγματα **ιστού από ασθενείς με ΜΜΚΠ**.

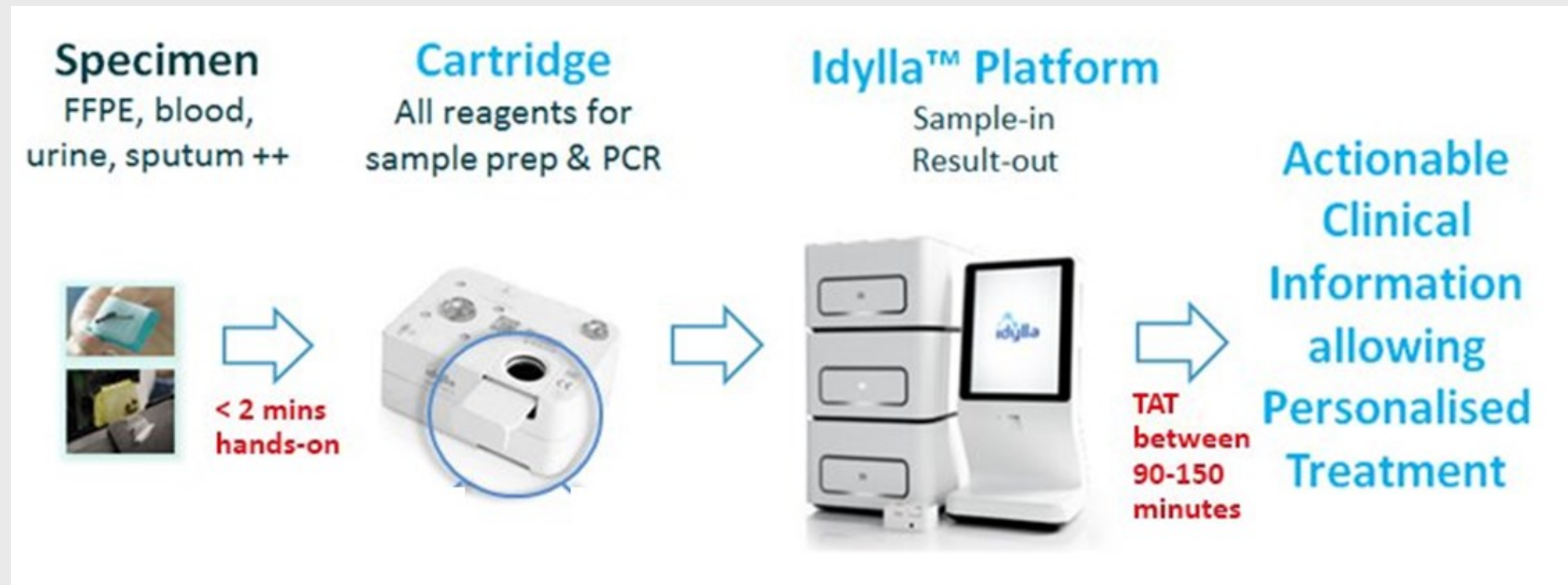
Β) Να εκτιμηθούν τα ποσοστά συμφωνίας και να συγκριθεί ο **χρόνος μέχρι το αποτέλεσμα** μεταξύ της στοχευμένης αλληλούχησης κατά Sanger και της πλατφόρμας Idylla για την ανάλυση των μεταλλάξεων στο γονίδιο *EGFR*

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

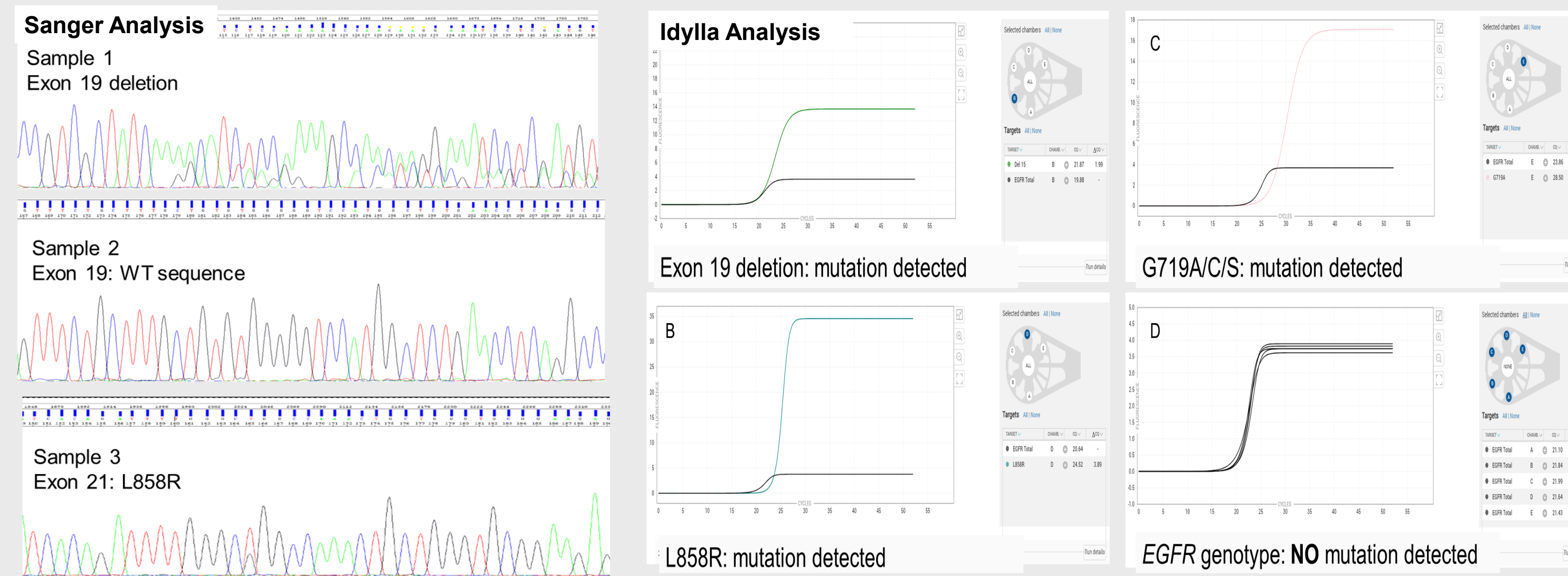
Συλλογή βιολογικών δειγμάτων ασθενών με ΜΜΚΠ: Στη μελέτη συμπεριλήφθησαν 100 ασθενείς με ΜΜΚΠ που παρακολουθούνται στην Παθολογική Ογκολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου (ΠαΓΝΗ) μεταξύ 2022-2023.

Σε μια υποομάδα 50 ασθενών έγινε και μοριακή ανάλυση του γονιδίου *EGFR*, με τη συνήθη εργαστηριακή πρακτική χρησιμοποιώντας 5-10 τομές FFPE για μικροεκτομή και εμπλουτισμό των καρκινικών κυττάρων και την απομόνωση DNA. Σε αυτή τη περίπτωση, ο ιστός που θα χρησιμοποιηθεί για τη σύγκριση των μεθόδων προέρχεται από το ίδιο μπλοκ για να έχει τα ίδια χαρακτηριστικά. **Ανάλυση σωματικών μεταλλάξεων με την αυτοματοποιημένη πλατφόρμα Idylla της Biocartis:** Για τα δείγματα που θα αναλυθούν με την πλατφόρμα Idylla, απαιτείται μια τομή FFPE 5μm με περιεκτικότητα >10% σε καρκινικά κύτταρα η οποία τοποθετείται σε ειδική κασέτα λυοφιλοποιημένων αντιδραστηρίων, για την αυτόματη απομόνωση DNA και την ανίχνευση των μεταλλάξεων ενδιαφέροντος με PCR-based μέθοδο. Το λογισμικό του συστήματος Idylla μετατρέπει τα σήματα φθορισμού, που παράγονται από το ενισχυμένο DNA, σε καμπύλες PCR και υπολογίζει το ΔCq για κάθε μετάλλαξη που ανιχνεύεται σε σχέση με το πρότυπο δείγμα. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ποιοτικό για την ανίχνευση ή όχι μιας συγκεκριμένης μετάλλαξης **ΜΜΚΠ:** Η συμφωνία των αποτελεσμάτων ανίχνευσης σωματικών μεταλλάξεων μεταξύ των διαγνωστικών μεθόδων ρουτίνας και της πλατφόρμας Idylla θα αξιολογηθεί και θα προσδιοριστεί ο χρόνος διεκπεραίωσης των αναλύσεων

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 1. Πορή εργασίας για την πραγματοποίηση της ανάλυσης σωματικών μεταλλάξεων με την πλατφόρμα Idylla. Μια τομή 5μm τοποθετείται στην ειδική κασέτα και φορτώνεται στην πλατφόρμα στην οποία πραγματοποιούνται όλες οι διαδικασίες για την απομόνωση του DNA, την ενίσχυση με PCR και την ανίχνευση μεταλλάξεων με ειδικούς φθορίζοντες ιχνηθέτες. Με τη συγκεκριμένη πλατφόρμα μπορεί να αναλυθεί και δείγμα υγρής βιοψίας (π.χ. πλάσμα αίματος)

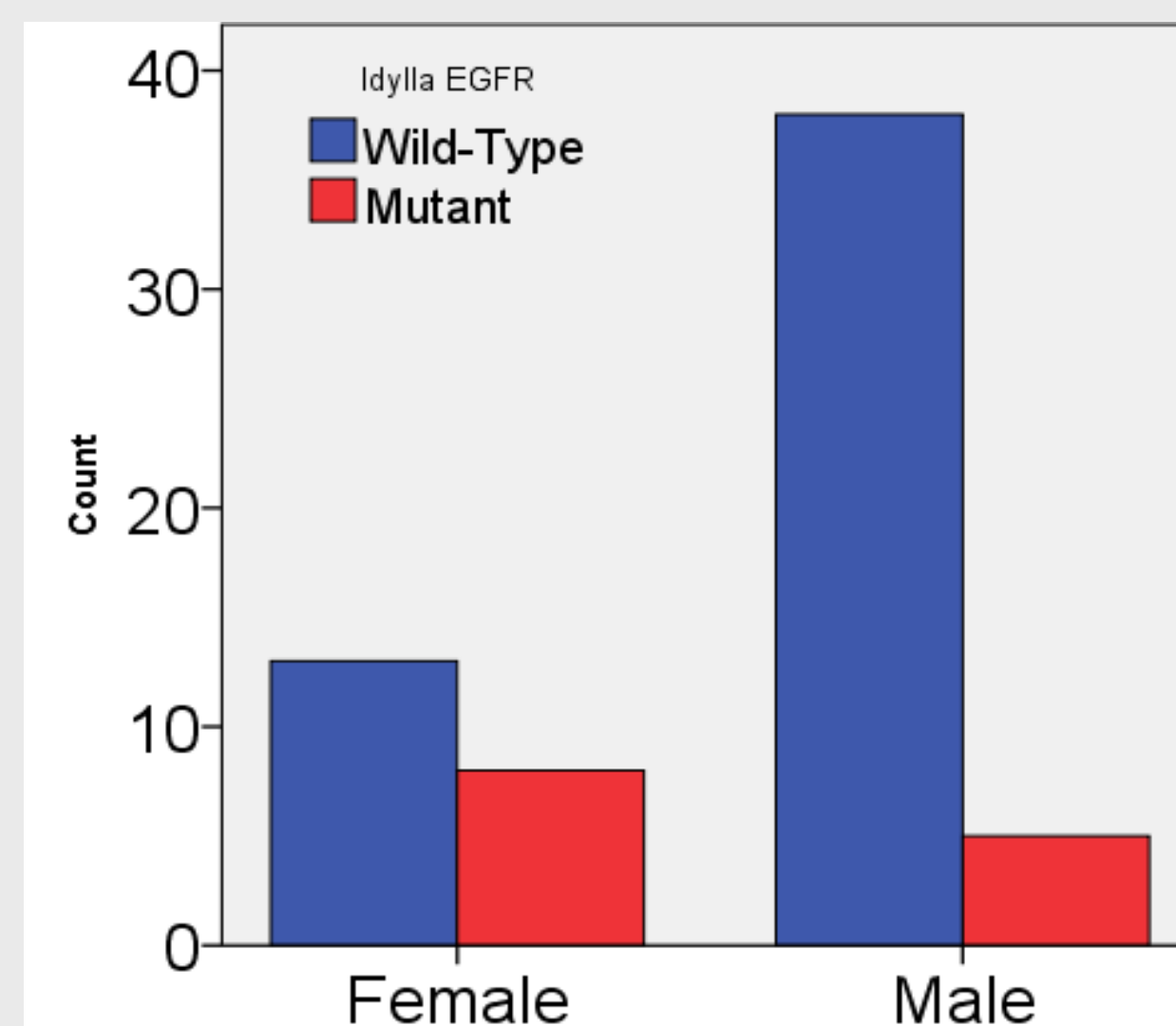


Εικόνα 2. Στο αριστερό μέρος της εικόνας φαίνεται το αποτέλεσμα της ανάλυσης κατά Sanger. Στο δεξί μέρος της εικόνας φαίνεται το αποτέλεσμα της ανάλυσης με το Idylla. Το λογισμικό του συστήματος Idylla μετατρέπει τα σήματα φθορισμού, που παράγονται από το ενισχυμένο DNA, σε καμπύλες PCR και υπολογίζει το ΔCq για κάθε μετάλλαξη που ανιχνεύεται σε σχέση με το πρότυπο δείγμα. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ποιοτικό για την ανίχνευση ή όχι μιας συγκεκριμένης μετάλλαξης

Idylla	Sanger		
	Mutant	Wild-type	Total
Mutant	9	3	12
Wild-Type	0	38	38
Total	9	41	50

Cohen's kappa value =0.868 (good assay concordance)

Πίνακας 1. Υπήρχε υψηλή συνολική συμφωνία (~95.12%) μεταξύ του Idylla και της στοχευμένης αλληλούχησης κατά Sanger. Σε 3 περιπτώσεις ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις μόνο με τη πλατφόρμα Idylla και δεν ανιχνεύθηκαν ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Ο χρόνος διεκπεραίωσης της εξέτασης με το Idylla ήταν σημαντικά μειωμένος σε σχέση με τη στοχευμένη αλληλούχηση.



Εικόνα 3. Οι μεταλλάξεις του *EGFR* βρέθηκαν συχνότερα σε γυναίκες (P=0.007) και σε μη καπνιστές ή πρώην καπνιστές, αν και αυτή η παρατήρηση δεν ήταν στατιστικά σημαντική (P=0.135)

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

✓ Στο 20% των δειγμάτων που ελέγχθηκαν με το Idylla, ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο *EGFR*. **Οι πιο συχνές μεταλλάξεις** στο γονίδιο *EGFR* αφορούσαν ελλείψεις στο εξώνιο 19 (**Del 19**),

✓ **Οι μεταλλάξεις του EGFR βρέθηκαν συχνότερα σε γυναίκες (P=0.007).**

✓ Υπήρχε **υψηλή συνολική συμφωνία (~95.12%) μεταξύ του Idylla και της στοχευμένης αλληλούχησης κατά Sanger**. Σε 3 περιπτώσεις ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις μόνο με τη πλατφόρμα Idylla και **δεν ανιχνεύθηκαν ψευδώς θετικά αποτελέσματα**. **Επομένως η ανάλυση με την πλατφόρμα Idylla αυξάνει το ποσοστό θετικότητας, λόγω αυξημένης ευαισθησίας ανίχνευσης (5% MAF)**

✓ Ο χρόνος διεκπεραίωσης της εξέτασης με το Idylla ήταν σημαντικά μειωμένος σε σχέση με τη στοχευμένη αλληλούχηση.

✓ **Η χρήση του Idylla μπορεί να καλύψει τις ανάγκες για την ταχεία και με υψηλή αξιοπιστία μοριακή ανάλυση μεταλλάξεων με κλινική σημασία στο *EGFR* για τους ασθενείς με ΜΜΚΠ.**

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Mosele, F., et al., Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol*, 2020. 31(11): p. 1491-1505. 2. Yuan, M., et al., The emerging treatment landscape of targeted therapy in non-small-cell lung cancer. *Signal Transduct Target Ther*, 2019. 4: p. 61. 3. Khoo, C., et al., Molecular methods for somatic mutation testing in lung adenocarcinoma: EGFR and beyond. *Transl Lung Cancer Res*, 2015. 4(2): p. 126-41. 4. Bocciarelli, C., et al., Evaluation of the Idylla system to detect the EGFR(T790M) mutation using extracted DNA. *Pathol Res Pract*, 2020. 216(1): p. 152773. 5. De Luca, C., et al., Is the Idylla EGFR Mutation Assay feasible on archival stained cytological smears? A pilot study. *J Clin Pathol*, 2019. 72(9): p. 609-614. 6. Delgado-Garcia, M., et al., Clinical performance evaluation of the Idylla EGFR Mutation Test on formalin-fixed paraffin-embedded tissue of non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*, 2020. 20(1): p. 275.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστούμε την εταιρεία *AstraZeneca Greece* για την ευγενική χορηγία της πλατφόρμας *Idylla* και τη δωρεά των ειδικών *cartridges* για τον έλεγχο σωματικών μεταλλάξεων στο γονίδιο *EGFR*

Μέρος της έρευνας έλαβε χρηματοδότηση από τον *ΕΛΚΕ του Πανεπιστημίου Κρήτης (ΚΑ. 11026)*