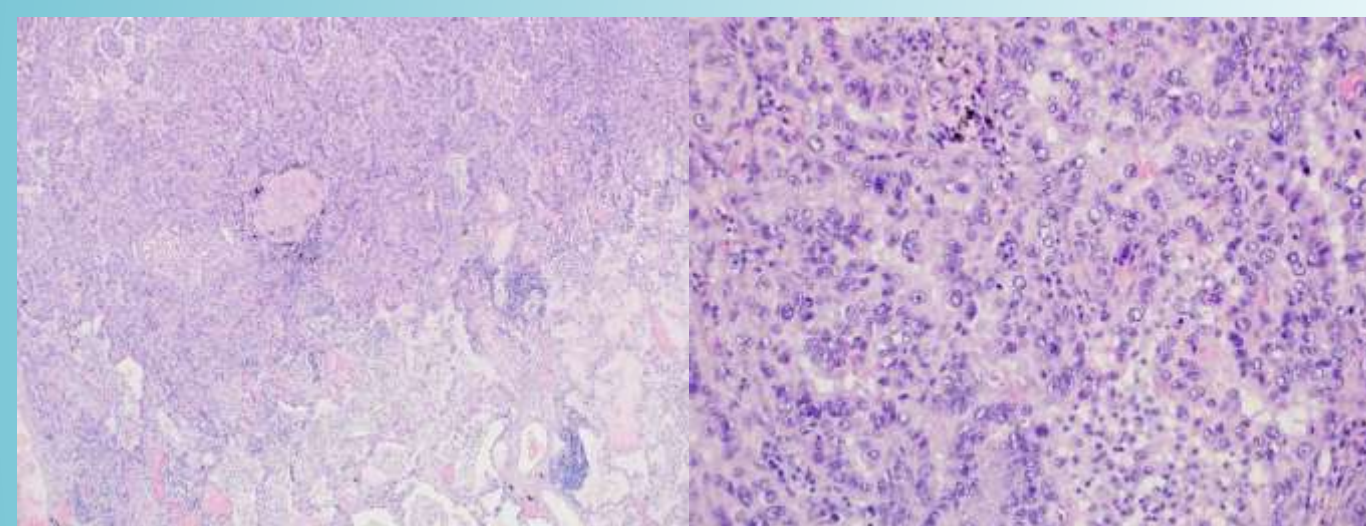


Matea Kos, Zorana Lipšanski, Kristina Štingl, Tea Grubišić, Arijana Pačić, Čedna Tomasović-Lončarić

Klinička bolnica Dubrava, Zagreb

## UVOD

Karcinom pluća jedan je od najčešće dijagnosticiranih vrsta karcinoma diljem svijeta. Histološki se dijeli na dvije velike skupine: karcinom pluća nemalih stanica (eng. non-small cell lung cancer - NSCLC) i karcinom pluća malih stanica (eng. small cell lung cancer - SCLC). Karcinom pluća nemalih stanica čini oko 85% dijagnosticiranih karcinoma pluća, od kojih je najčešći histološki podtip adenokarcinom (40%) (Slika 1. i 2.), 25-30% čine karcinom pluća pločastih stanica te 10-15% čine karcinomi velikih stanica. Jedan od glavnih uzroka NSCLC-a čine fuzije gena koje su posljedice kromosomskih preslagivanja (delecije, inverzije, translokacije ili duplikacije unutar istog kromosoma ili između 2 druga kromosoma) što dovodi do fuzije 2 neovisna gena. Fuzije gena su postale važan biomarker za dijagnozu karcinoma, prognozu i ciljanu terapiju te je njihova brza i točna dijagnoza ključna za učinkovito liječenje.



Slika 1. Adenokarcinom pluća – hemalaun-eozin bojenje (50x)

Slika 2. Adenokarcinom pluća – hemalaun-eozin bojenje (200x)

## CILJ

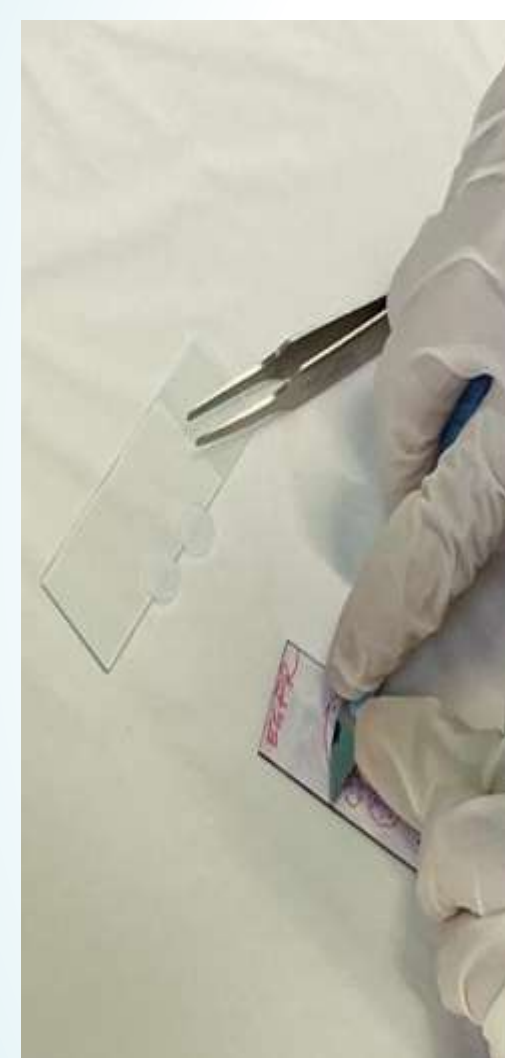
Međunarodne smjernice od strane ESMO i NCCN preporučuju testiranje na ALK, ROS1, RET, preskakanje eksona 14 MET gena i NTRK mutacije kod svakog pacijenta sa dijagnosticiranim NSCLC-om. Stoga molekularno testiranje ima ključnu ulogu u dijagnostici kod NSCLC-a za usmjeravanje izbora terapije i produljenje životnog vijeka. Na Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju u Kliničkoj bolnici Dubrava, GeneFusion se koristi za potvrdu IHC pozitivnih ALK i ROS-1.

## LITERATURA

- Gilson P, Pouget C, Belmonte R, Fadil S, Demange J, Rouyer M, Lacour J, Betz M, Dardare J, Witz A, Merlin JL, Harlé A. Validation of the Idylla GeneFusion assay to detect fusions and MET exon-skipping in non-small cell lung cancers. *Sci Rep.* 2023 Aug 9;13(1):12909. doi: 10.1038/s41598-023-39749-4. PMID: 37558711; PMCID: PMC10412571.
- Leone A, Muscarella LA, Graziano P, Tornese A, Grillo LR, Di Lorenzo A, Bronzini M, Scarpino S, Sparaneo A, Rossi G. Robust Performance of the Novel Research-Use-Only Idylla GeneFusion Assay Using a Diverse Set of Pathological Samples with a Proposed 1-Day Workflow for Advanced NSCLC Evaluation. *Cancers.* 2023; 15(1):292. <https://doi.org/10.3390/cancers15010292>
- Chu YH, Barbee J, Yang SR, Chang JC, Liang P, Mullaney K, Chan R, Salazar P, Benayed R, Offin M, Drilon A, Ladanyi M, Nafa K, Arcila ME. Clinical Utility and Performance of an Ultrarapid Multiplex RNA-Based Assay for Detection of ALK, ROS1, RET, and NTRK1/2/3 Rearrangements and MET Exon 14 Skipping Alterations. *J Mol Diagn.* 2022 Jun;24(6):642-654. doi: 10.1016/j.jmoldx.2022.03.006. Epub 2022 Apr 14. PMID: 35430374; PMCID: PMC9227998.

## MATERIJALI I METODE

GeneFusion Assay na Idylla™ platformi je potpuno automatiziran in vitro test za kvalitativno otkrivanje 16 specifičnih ALK fuzija, 13 ROS1 fuzija, 7 RET fuzija i preskakanje eksona 14 MET gena te nebalansiranu ekspresiju u ALK, ROS1, RET i NTRK 1/2/3 gena već na 10% tumorskih stanica. Idylla™ GeneFusion Panel pokriva cijeli proces od uzorka do rezultata, uključujući u potpunosti integriranu ekstrakciju RNK i DNK, reverzne transkripcije mRNK, PCR amplifikaciju u stvarnom vremenu te otkrivanje, analizu podataka i rezultate. Analiza je moguća na parafinskim blokovima i citološkim razmazima. Nakon što patolog na hemalaun-eozin staklu odredi područje sa najvećim postotkom tumorskih stanica, isti dio se izreže na prethodno dobro očišćenom i dezinficiranom mikrotomu, kako ne bi došlo do kontaminacije. Debljina reza mora biti 5 µm te ovisno o veličini uzorka, uzima se 2-3 reza. Uzorak se stavlja između dva filter papira te se nakapa 25 µl RNK ligaze, stavlja se u kazetu te zatim u aparat. Kod citoloških razmaza, nakon što citolog označi određeno područje sa najvećom celularnošću na stakalcu, sterilnim skalpelom se uzorak sastruže i stavi između dva filter papira te se nakapa RNK ligaza (Slika 3.), zatim se uzorak stavlja u kazetu (Slika 4.) i potom u aparat (Slika 5.). Test daje rezultate (Slika 6.) nakon 180 min te se preko softvera analiziraju krivulje (Slika 7.).



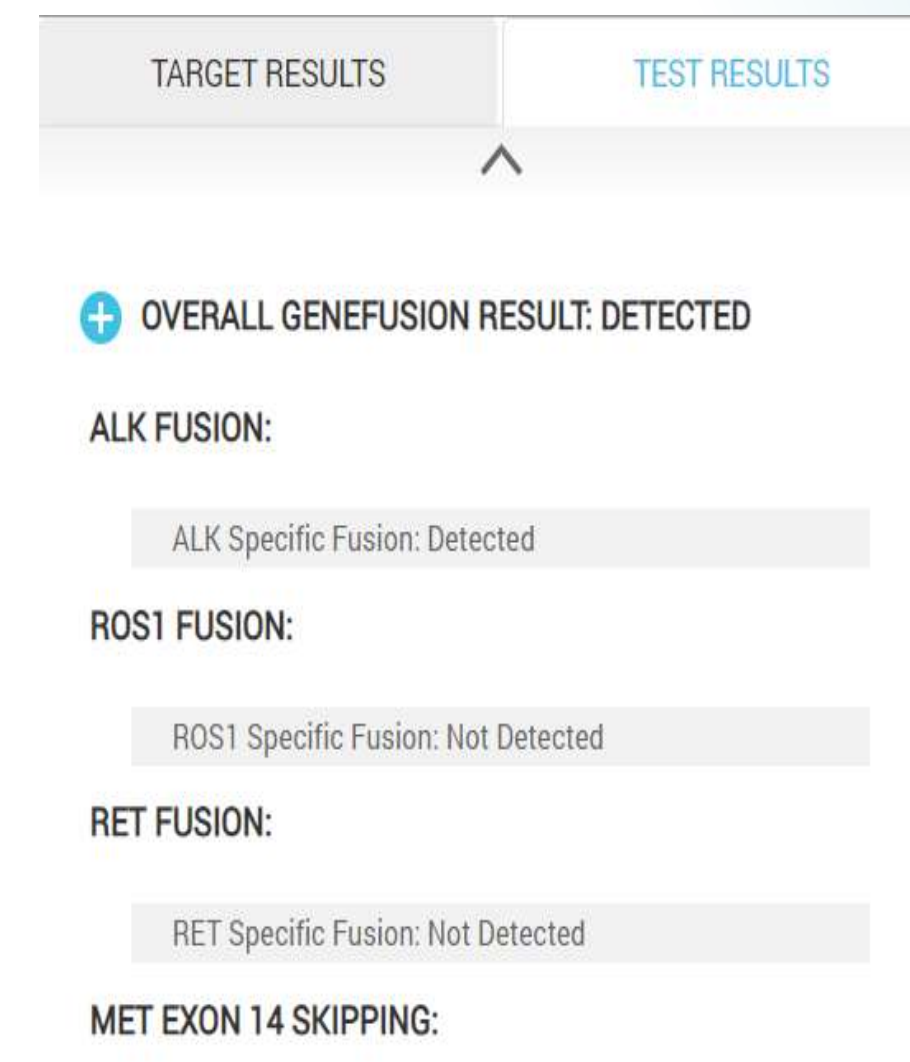
Slika 3. Struganje citološkog razmaza



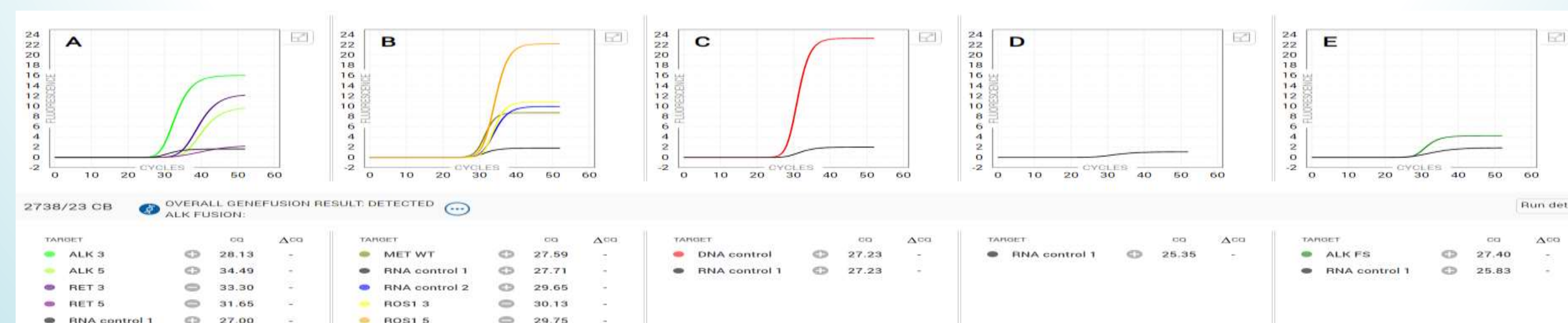
Slika 4. Stavljanje uzorka između dva filter papirića natopljena RNK ligazom



Slika 5. Idylla™ (Biocartis, Belgija) RT-PCR platforma



Slika 6. Prikaz rezultata



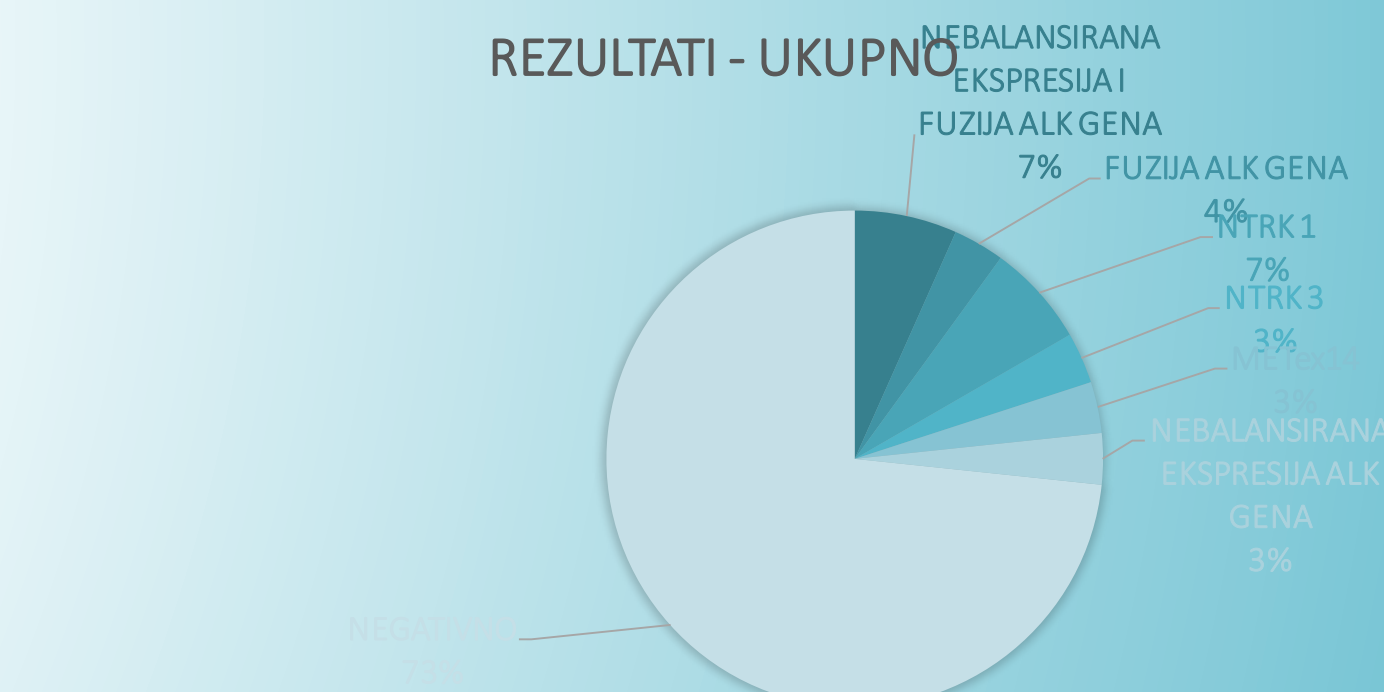
Slika 7. Prikaz PCR krivulja rezultata GeneFusion testa

## REZULTATI

U Kliničkoj bolnici Dubrava na Zavodu za patologiju i citologiju testirano je 28 histoloških i citoloških uzoraka, 22 uzorka dalo je negativan rezultat dok je 6 uzoraka bilo pozitivno (Tablica 1.). U jednom histološkom preparatu pronađena je fuzija i nebalansirana ekspresija ALK gena. U jednom citološkom razmazu je nađena fuzija ALK gena te u drugom razmazu nebalansirana ekspresija ALK gena. Nebalansirana ekspresija gena NTRK1 pronađena je u jednom citološkom razmazu, dok je u jednom histološkom uzorku pronađena nebalansirana ekspresija gena NTRK3. Na jednom histološkom uzorku koji je imunohistokemijski ROS1 bio pozitivan pronađeno je preskakanje eksona 14 MET gena (Graf 1.).

REZULTAT	BROJ UZORAKA
POZITIVNO	6
NEGATIVNO	22

Tablica 1. Prikaz rezultata



Graf 1. Grafički prikaz pozitivnih uzoraka

## ZAKLJUČAK

Svaki imunohistokemijski pozitivan ALK i ROS-1 uzorak potrebno je potvrditi molekularnom metodom. GeneFusion test na Idylla™ (Biocartis, Belgija) platformi pokazao se pouzdanim i visoko osjetljivim s pozitivnim rezultatima na 20% tumorskih stanica. Brzo i lako rukovanje te rezultat nakon 180 min daje veliku prednost nad uobičajenim molekularnim metodama.