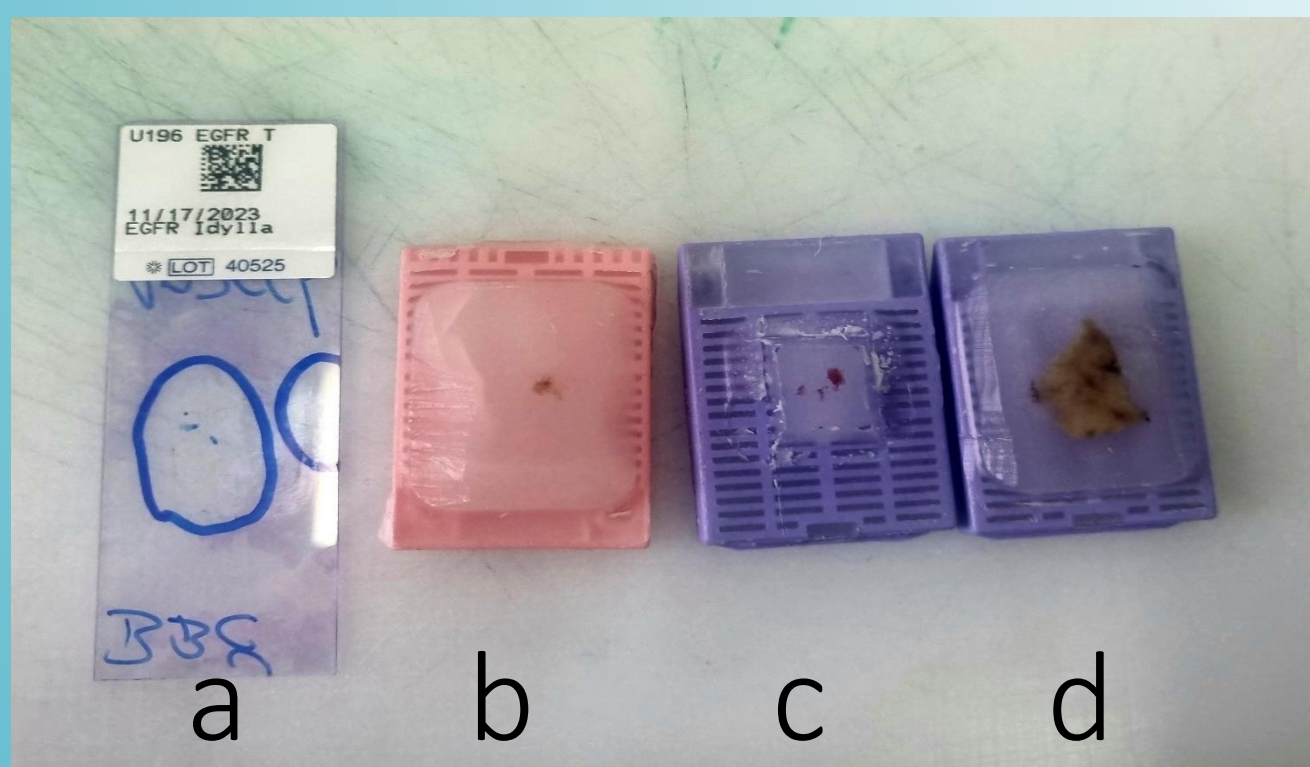


UVOD

Metode dijagnostike i terapijski pristup neoplazmama pluća dinamično se mijenjaju i dopunjuju. Novi modaliteti liječenja ujedno su pokrenuli i nove dijagnostičke pristupe koji se više ne temelje isključivo na analizi morfologije i definiranju tipa diferenciranosti već i na molekularnoj analizi tumora te proteinskih produkata koji se stvaraju na razini mRNA. Patološka i citološka dijagnostika, uključujući i molekularnu dijagnostiku, zahtjeva visoko organiziran te dobro educiran multidisciplinarni tim, kao i dobro definirane radne algoritme. Kompletna dijagnostika uključuje analizu prediktivnih biomarkera: ALK; ROS; PDL1 te analizu mutacije EGFR gena.

CILJ

Cilj ovog rada je bio usporediti rezultate analize mutacije EGFR gena iz različitih uzoraka kod istog pacijenta u svrhu validacije i uspostavljanje unutarnje kontrole kvalitete različitih uzoraka: citoloških razmaza, staničnih blokova, parafinskih blokova s biopatom reznja te parafinskih blokova nakon resekcije plućnog krila (slika 1). Molekularna testiranja KB Dubrava su u sustavu vanjske kontrole kvalitete QUIP (ESP) za histološke preparate, no s obzirom da je ponekad citološko staklo jedini materijal koji bolesnik ima potrebno je utvrditi postojanje lažno pozitivnih ili lažno negativnih rezultata u citološkim razmazima.



Slika 1. S lijeva na desno: citološki razmaz (nakon struganja za rad u aparatu), stanični blok, parafinski blok s biopatom reznja, te parafinski blok s resekiranim plućnim krilom.



Slika 2. Idylla™ (Biocartis)

MATERIJALI I METODE

Na aparatu Idylla™ (Biocartis, Belgija) platformi (slika 2) koji radi na principu real time PCR metode, u KB Dubrava rade se molekularne analize različitih vrsta tumora. iz citoloških i histoloških uzoraka. Histološki uzorci koji se dobiju nakon resekcije plućnog krila su bogat izvor materijala za dijagnostiku. Histološki uzorci su i manji koji se dobiju nakon transbronhalne ili transtorakalne biopsije. Citološki uzorci su razmazi koji se dobiju na različite načine: bronhoskopsijom, punkcije EBUS, TBNA, sedimenti pleuralnih izljeva. Kad god je moguće, iz takvih uzoraka se rade stanični blokovi jer se iz njih može napraviti više rezova za različite metode. Potrebno je izrezati 1-2 reza za parafinske kocke, a za citološke razmaze oko 300 tumorskih stanica. Idylla™ EGFR mutacijski test je dijagnostički test za kvalitativnu detekciju egzona 18 (G719A/C/S), egzona 21 (L858R, L861Q), mutacije eksona 20 (T790M,S768I), delecija eksona 19 i insercije egzona 20. Interpretaciju rezultata omogućava softverska analiza PCR krivulja. Nalazi mogu biti bez mutacije, a rezultat je valjan ukoliko je CQ manje od 24. (Slika 3) Ukoliko je veći od 24 analiza se treba ponoviti ili provjeriti drugom mogućom PCR metodom. Nalazi mogu biti s točno definiranom mutacijom, a rezultat može biti i invalid, što upućuje na nedostatnu količinu DNA za PCR analizu.

REZULTATI

Od 2020. godine načinjeno je 420 EGFR analiza (uz prekid trajanja KB Dubrave kao Covid bolnice). Od toga je bilo 240 citoloških uzoraka. U nekim slučajevima pacijent ima sva 3 uzorka te je bilo moguće usporediti nalaze EGFR testiranja. Usporedbe sve tri vrste uzoraka su učinjene kod 4 pacijenta. Rezultati pokazuju potpuna poklapanja kod 3 pacijenta, a kod 4. su nađene 2 mutacije u citološkom razmazu, a u parafinskoj kocki i staničnom bloku je nađena jedna mutacija, što nije imalo utjecaja na izbor terapije.

Bolesnik	Citološki razmaz	Stanični blok	Parafinski blok
1	Nema mutacije	Nema mutacije	Nema mutacije
2	Mutacija L858R	Mutacija L858R	Mutacija L858R
3	Mutacija L858R	Mutacija L858R	Mutacija L858R
4	MUT. L858R MUT. L861Q	Mutacija L858R	Mutacija L858R

Test Result (1) In Vitro Diagnostic Medical Device. For use in diagnostic procedures.

Idylla™ EGFR Mutation Test

EGFR GENOTYPE	MUTATION DETECTED
L858R	MUTATION DETECTED
Protein change	p.Leu858Arg
Nucleotide change	c.2573T>G,c.2573_2574delinsGT,c.2573_2574delinsGA
EXON 19 DELETION	NO MUTATION DETECTED
T790M	NO MUTATION DETECTED
G719A/C/S	NO MUTATION DETECTED
EXON 20 INSERTION	NO MUTATION DETECTED
S768I	NO MUTATION DETECTED
L861Q	NO MUTATION DETECTED
CQ OF EGFR CONTROL	23.0

Comments/Annotations

Slika 5. Rezultat u kojem je nađena mutacija gena u egzonu 21 (L(858R)

Test Result (1) In Vitro Diagnostic Medical Device. For use in diagnostic procedures.

Idylla™ EGFR Mutation Test

EGFR GENOTYPE	MUTATION DETECTED
L858R	NO MUTATION DETECTED
EXON 19 DELETION	NO MUTATION DETECTED
T790M	NO MUTATION DETECTED
G719A/C/S	NO MUTATION DETECTED
EXON 20 INSERTION	NO MUTATION DETECTED
S768I	NO MUTATION DETECTED
L861Q	NO MUTATION DETECTED
CQ OF EGFR CONTROL	19.5

Comments/Annotations

Slika 3. Rezultat u kojem nije dobivena mutacija.

Test Result (1) In Vitro Diagnostic Medical Device. For use in diagnostic procedures.

Idylla™ EGFR Mutation Test

EGFR GENOTYPE	MUTATION DETECTED
L858R	INVALID
EXON 19 DELETION	INVALID
T790M	INVALID
G719A/C/S	INVALID
EXON 20 INSERTION	INVALID
S768I	INVALID
L861Q	INVALID

Comments/Annotations

Slika 5. Rezultat kojim nije dobiven valjan nalaz (invalid)

ZAKLJUČAK

Usporedni rezultati različitih uzoraka su dali zadovoljavajuće rezultate te je neophodno uz citološke razmaze raditi i stanične blokove kad je moguće da se dobije više uzorka za sve potrebne dodatne metode. Suradnja sa liječnicima citolozima i patolozima je neophodna da bi se utvrdio najbolji uzorak kad ih je dobiveno više kod istog pacijenta. Biocartis Idylla™ pokazao se kao pouzdan i jednostavan sustav za brzo otkrivanje relevantnih mutacija. Zbog visoke osjetljivosti sustav je dao pozitivne rezultate već na 20% udjela tumorskih stanica, što također uključuje i oskudnije materijale kao što su citološki razmazi. Brzim rukovanjem i rezultatima gotovim već za 150 min, ovom metodom se znatno ubrzala analiza te samim time i mogućnost primjene ciljane terapije.