

## Modulo 4

### IL LABORATORIO DI DIAGNOSTICA MOLECOLARE: LA FASE ANALITICA

---

Il laboratorio di diagnostica molecolare in anatomia patologica:  
la fase analitica

# Modulo 4

## IL LABORATORIO DI DIAGNOSTICA MOLECOLARE: LA FASE ANALITICA

---

La fase analitica comprende l'analisi del campione e la fase di elaborazione del referto finale

### 1. Analisi del campione

- analisi
- validazione
- eventuale ripetizione

### 2. Fase post-analitica

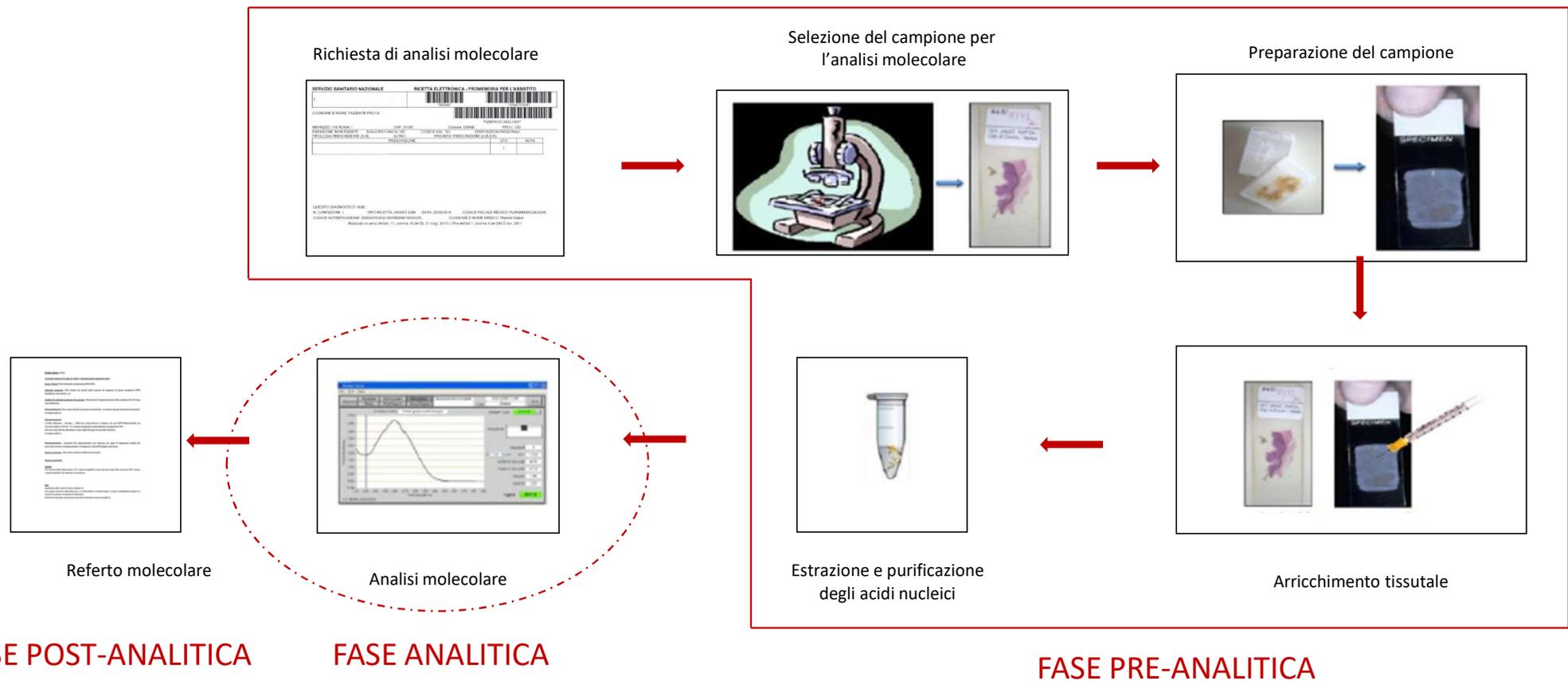
→ comprende le tappe che seguono l'ottenimento del risultato:

- interpretazione del risultato (mutazione T790M in pt *EGFR* mutato trattato con TKIs di prima o seconda generazione)
- trascrizione del risultato
- convalida
- trasmissione del referto
- interpretazione del risultato da parte del medico

# Il laboratorio di diagnostica molecolare

## IL FLUSSO DI LAVORO

Nel laboratorio di diagnostica molecolare possiamo distinguere una **FASE PRE-ANALITICA** e una **FASE ANALITICA**



# Il laboratorio di diagnostica molecolare

## IL FLUSSO DI LAVORO

---



La scelta del metodo analitico deriva

- ✓ dalle esigenze di giungere ad una **definizione diagnostica** o
- ✓ dalla disponibilità di farmaci diretti contro specifiche varianti mutazionali o alterazioni molecolari definite "**actionable mutations**".

# Il laboratorio di diagnostica molecolare

## IL FLUSSO DI LAVORO: LA SCELTA DEL METODO

Altri fattori importanti per la scelta del metodo analitico sono:

- Saggi predeterminati (mirati) o indeterminati (estesi)

I saggi predeterminati e/o di screening → analizzano **solo gli esoni o i loci sede di mutazioni rilevanti** per la sensibilità o la resistenza alle terapie e permettono di identificare **solo le mutazioni più frequenti** (come ad esempio i kit basati su real time PCR, pirosequenziamento o spettrometria di massa).

I metodi di sequenziamento indeterminato (sequenziamento diretto o sequenziamento NGS) → analizzano regioni esoniche più estese, permettendo di identificare **tutte le possibili varianti**, anche le più rare.

Entrambe le strategie hanno pro e contro, la scelta dipende dal laboratorio e dalle applicazioni cliniche cui i saggi sono destinati. I saggi predeterminati sono in genere kit certificati per diagnostica in vitro e più costosi. I test indeterminati sono di solito basati su metodi sviluppati nei singoli laboratori e meno costosi, anche se esistono già kit certificati per diagnostica in vitro. I pannelli utilizzati dalle piattaforme di NGS hanno il miglior rapporto costo/efficienza, ma richiedono strumenti e personale dedicato e la certificazione dell'interpretazione dei dati bioinformatici.

Il sequenziamento diretto secondo Sanger, resta ancora il gold standard metodologico per la conferma di varianti rare o mutazioni complesse.

## Il laboratorio di diagnostica molecolare

### IL FLUSSO DI LAVORO: LA SCELTA DEL METODO

- **Sensibilità:** La sensibilità dei metodi è crescente a partire dal sequenziamento diretto (20- 30%), fino all'1-5% del sequenziamento NGS e della real-time PCR.

La scelta dipende dall'**arricchimento in cellule neoplastiche** del campione. Sarebbe ottimale avere a disposizione in laboratorio un metodo sensibile per i campioni poco arricchiti (biopsie, citologia) e uno meno sensibile per quelli più arricchiti (pezzi chirurgici). Sul DNA estratto da tessuti o campioni citologici, non è consigliabile utilizzare metodi con sensibilità inferiore all'1%.



## Diapositiva 6

---

u1

utente; 19/06/2024

# Il laboratorio di diagnostica molecolare

## IL FLUSSO DI LAVORO: LA SCELTA DEL METODO

---

- **Marcatura CE-IVD:** La norma ISO15189 richiede che i test diagnostici sviluppati internamente nei laboratori siano rigorosamente validati e, se disponibili, sostituiti con altri test **coperti dalla marcatura CE-IVD**. In linea di principio i test marcati CE-IVD sono da preferire nei laboratori diagnostici.
- **Variabilità analitica.** Come tutti i test di laboratorio anche quelli mutazionali richiedono standard di **accuratezza e precisione** basati sui risultati attesi per quel determinato test e campione. I kit commerciali includono sempre parametri di riferimento (**controlli interni**) all'interno dei quali il test è considerato affidabile. I test sviluppati internamente nei laboratori devono comprendere allo stesso modo controlli interni positivi e negativi e le sedute ripetute in duplicato.
- **Tempo di esecuzione (TAT).** Per motivi etici non è accettabile che un singolo test diagnostico predittivo per la risposta a un farmaco oncologico venga refertato in >10 giorni lavorativi.