

CENTRODIAGNOSTICOITALIANO



**Identificazione certa
e quantizzazione delle cellule tumorali
nelle displasie di basso grado mediante FISH
(Fluorescence In Situ Hybridization)
automatizzata**

A cura di:
dr. Vittorio Grazioli, *Direttore Laboratorio CDI Centro Diagnostico Italiano*
dr. Tshering Dorji, *Anatomopatologo CDI Centro Diagnostico Italiano*

MANAGEMENT DELLE LESIONI DI BASSO GRADO

Un Test di Papanicolaou (PAP test) positivo per Lesione Intraepiteliale Squamosa di Basso Grado - LSIL (fig.1) o per Cellule Squamose Atipiche di Significato Indeterminato - ASCUS (fig.2) [quest'ultimo se accompagnato da Papilloma Virus Umano ad alto rischio – HPV HR] non offre nessuna indicazione né sulla reale entità delle lesioni a livello istologico né sul rischio di progressione a Lesione Intraepiteliale Squamosa di Alto Grado - HSIL e a carcinoma invasivo (Ferris et.al, Schiffman et.al).

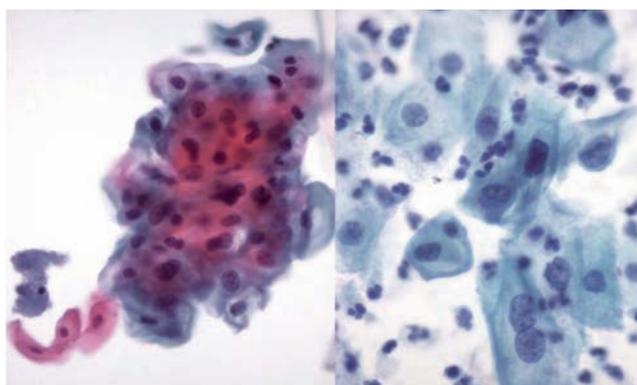


fig.1: LSIL (pap-test)

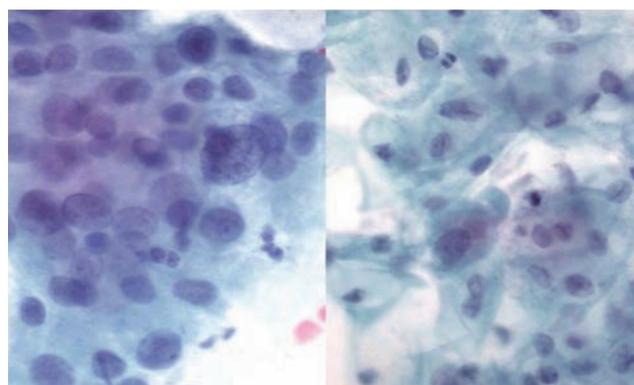


fig.2: ASCUS (pap-test)

Nelle lesioni di basso grado l'esame colposcopico ha una sensibilità e specificità piuttosto bassa (Belinson et.al, Mitchell et.al, Olaniyan et.al) mentre sappiamo come possano già essere presenti focali aree di Neoplasia Intraepiteliale Cervicale ad alto grado (CIN II-III) e, talora, anche di carcinoma in situ (Ferris et.al, Schiffman et.al).

Esiste uno strumento diagnostico in grado non solo di rafforzare l'eventuale negatività di una colposcopia (cioè ad alto valore predittivo negativo) ma anche di indurre ad ulteriori accertamenti sulla base di riscontri oggettivi?

UN AFFIDABILE ESAME BASATO SULLA CITOLOGIA CERVICOVAGINALE DI SECONDO LIVELLO:

LA FISH DELLE CELLULE CERVICALI

La tecnica FISH permette di contare le copie dei singoli cromosomi e/o geni e di identificare pertanto come sicuramente tumorali le cellule che ancora non appaiono tali all'esame morfologico.

Le cellule tumorali sono caratterizzate sia da un numero di cromosomi abnormemente elevato (poliploidia) che dalla comparsa di delezioni, duplicazione, inversione, traslocazione e amplificazioni geniche. Tutto inizia con un'erronea e sbilanciata separazione mitotica di alcuni cromosomi "figli" e, se non avviene la morte cellulare, questo fenomeno è in grado di progredire automantenendosi ed autoamplificandosi: è il cosiddetto caos cromosomico che accompagna la trasformazione della cellula in senso tumorale (Boveri T, Ferguson et.al, Knudson AG, Pihan GA et.al, Ried et.al, Wunderlich V.).

Nelle fasi iniziali di questo fenomeno, alcuni cromosomi sono più soggetti di altri ad errori di segregazione: è il caso, per esempio, del cromosoma 3, sul cui braccio lungo q è situato il gene che codifica per la componente RNA della telomerasi - TERC (3q26) e, quindi, un aumento del numero di copie del cromosoma 3 porta, tra l'altro, ad un eccesso di produzione di telomerasi (l'enzima fisiologicamente deputato alla riparazione delle estremità cromosomiche) con una conseguente "*immortalizzazione della cellula*" (Alameda et.al, Greider et.al, Caraway et al, Charames et.al, Heselmeyer-Haddad et.al, Jalali et.al, Olovnikov AM, Seppo et.al, Sui et.al, Vokac et.al).

Con il progredire della trasformazione tumorale della cellula, mitosi dopo mitosi, il numero di copie nel cromosoma 3 aumenta progressivamente e con esso anche quello di altri cromosomi (come ad esempio il cromosoma 7); il grado di poliploidia aumenta e correla pertanto con il grading della lesione (Mian et.al, Policht et.al).

Il rilievo di una poliploidia in una cellula permette di classificare sicuramente quest'ultima come cellula tumorale.

Nel cervicocarcinoma, le cellule sono tipicamente caratterizzate da una poliploidia che coinvolge i cromosomi 3 e 7.

UN NUOVO STRUMENTO DIAGNOSTICO DI SECONDO LIVELLO NELLO SCREENING DEL CERVICOCARCINOMA: LA FISH INTERFASICA QUANTITATIVA DELLE CELLULE CERVICALI PER LA RICERCA DELL'AUMENTO DEL NUMERO DI COPIE DEI CROMOSONI 3 (locus 3q26) E 7. (fig.3 A-B)

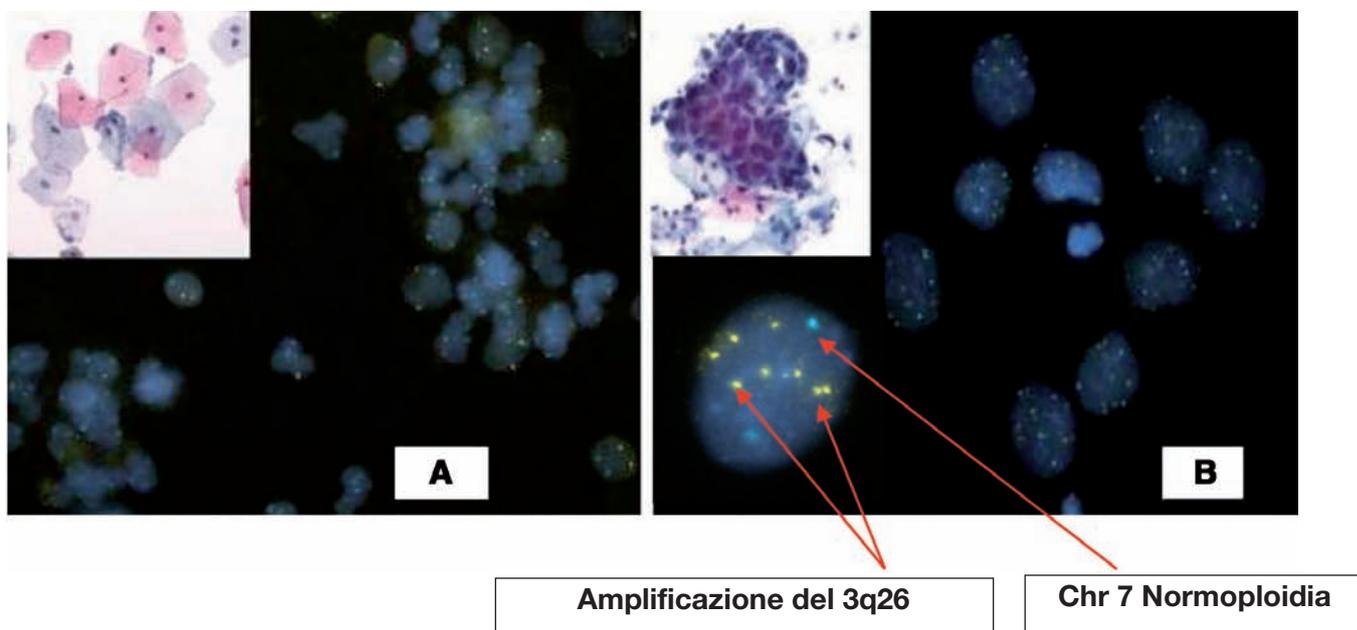
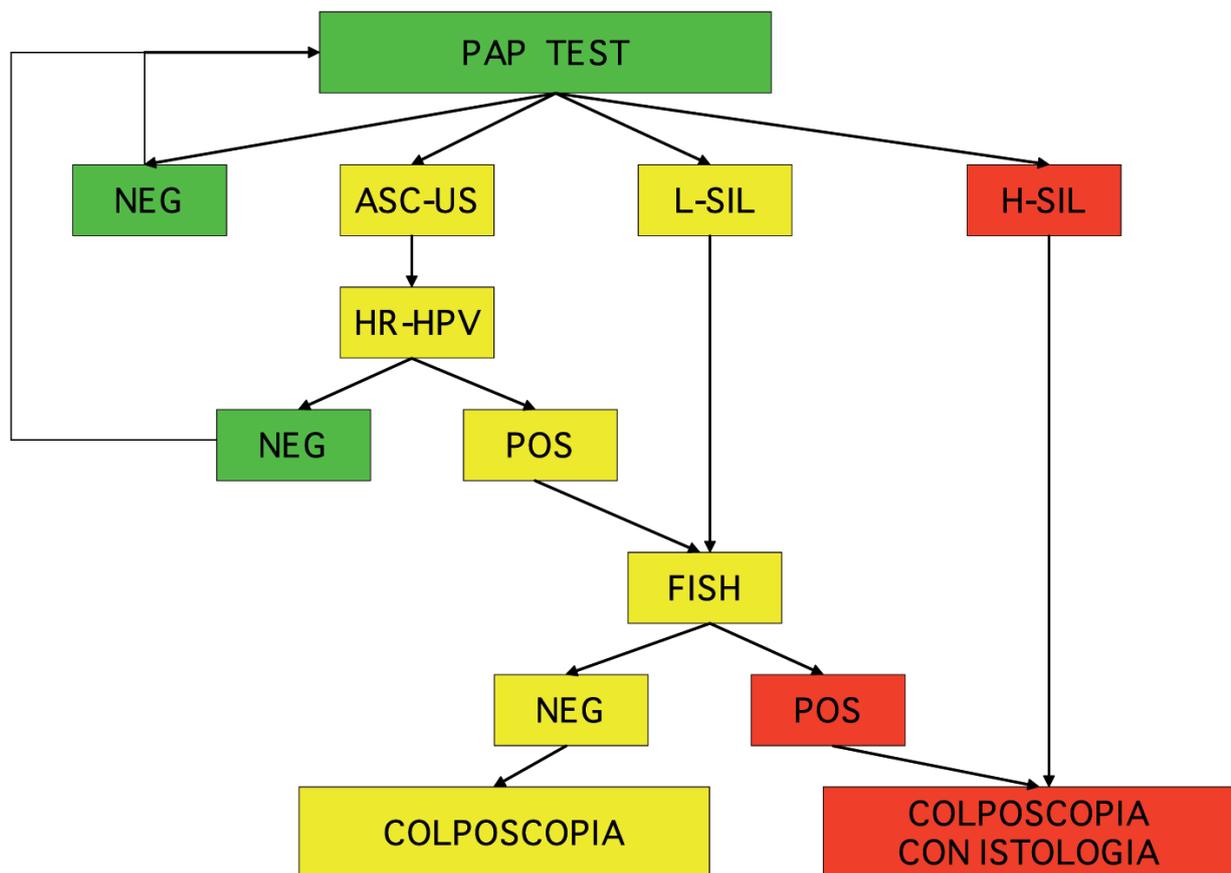


Fig 3 (A): NILM al pap-test e assenza di amplificazione del 3q26

Fig 3 (B): HSIL al pap-test con amplificazione del 3q26

QUANDO RICORRERE ALLA FISH?

Nei casi di LSIL e di HR-HPV+ASCUS, dopo la diagnosi citologica (pap-test) e prima della colposcopia.



INOLTRE

- Nel follow-up degli interventi ablativi, specialmente se i margini di resezione non risultano indenni: una FISH positiva costituisce una indicazione per il re-intervento
- Come approfondimento delle diagnosi istologiche di CIN I / CIN II : una FISH positiva, cioè la presenza di cellule sicuramente tumorali in un contesto displastico, costituisce una indicazione per il trattamento ablativo.

FAQ SULLA FISH DELLE CELLULE CERVICALI

D: si tratta di un esame eseguibile in convenzione con il SSN ?

R: certamente, nel caso delle cellule cervicali, le prestazioni del tariffario sanitario nazionale a cui fare riferimento sono due: 91.37.3 e 91.37.4

D: occorre sempre specificare sull'impegnativa SSN i due codici ai quali si riferisce la FISH?

R: no, basta la dicitura FISH DELLE CELLULE CERVICALI e, naturalmente, il quesito diagnostico.

D: che tipo di campione occorre raccogliere ? e come si conserva?

R: le cellule eso-endocervicali, raccolte mediante la spatola e cytobrush, vengono stemperate energeticamente nella fiala PreserveCyte (Thin Prep®) che garantisce la stabilità del campione per lungo tempo, anche a temperatura ambiente.

D: la FISH può essere eseguita anche su tessuto?

R: certamente, in tal caso occorre conservare il campione (es. biopsia) in formalina tamponata al 10%.

D: perché fare eseguire la FISH al Centro Diagnostico Italiano?

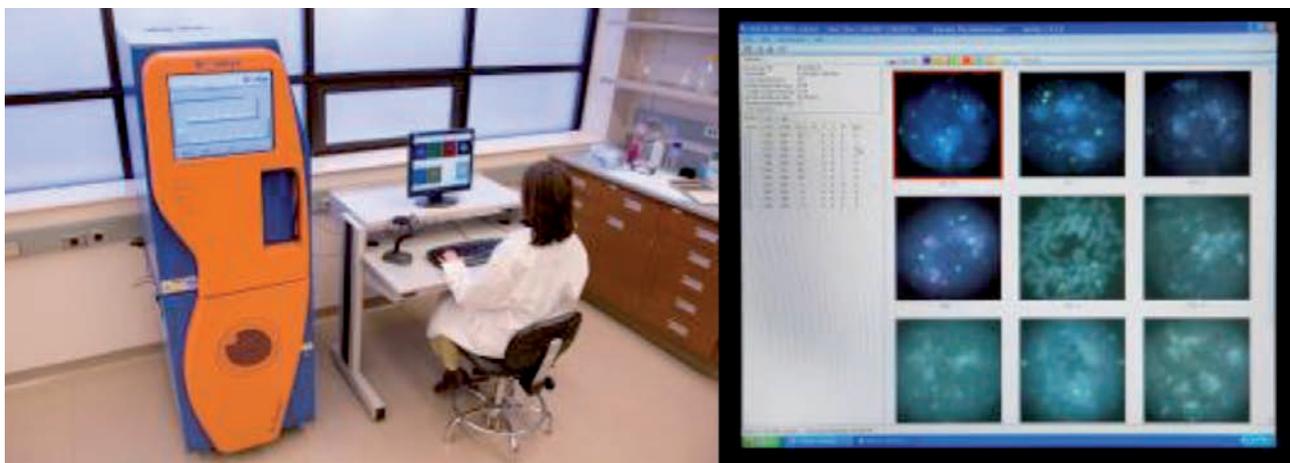
R: perché il CDI è l'unico centro in Italia a possedere la tecnologia Ikoniscope® che permette di eseguire la lettura dei preparati di FISH automaticamente e su un numero elevatissimo di cellule, garantendo una sensibilità praticamente pari al 100%.

IN COSA CONSISTE LA FISH INTERFASICA?

1. Il campione da analizzare (cellule, tessuto) viene deposto su un vetrino e viene messo in contatto con sonde di DNA fluorescenti e specifiche (perché ad esse complementari) per determinate regioni del DNA cromosomico (per esempio per le regioni centromeri che o per locus genici).
2. Il vetrino col campione adesivo viene sottoposto ad un programma termico che divide le due eliche del DNA e permette che le sonde si leghino alle regioni a loro complementari; ultimato il legame tra la sonda e la sua regione complementare, la doppia elica del DNA si richiude ed il cromosoma è così marcato e reso visibile dal segnale fluorescente della sonda.
3. Ultimata la fase precedente, detta ibridazione, il preparato viene letto al microscopio a fluorescenza, cercando innanzitutto il massimo numero di cellule atipiche (cosiddetto scanning) e poi valutandole ad una ad una sulla base del numero di segnali fluorescenti che emette (normalmente, essendoci solo due copie dello stesso cromosoma, appaiono due segnali fluorescenti).
4. La valutazione della fluorescenza delle singole cellule deve tener conto anche dei possibili artefatti; ad esempio, cellule normali in fase pre-mitotica possono presentare quattro segnali fluorescenti per singolo cromosoma, senza per questo essere considerate tumorali).

QUALI SONO I VANTAGGI DELLA TECNOLOGIA IKONISCOPE?

- Ikoniscope® è un sistema automatizzato per l'acquisizione di immagini in fluorescenza e per la loro analisi.
- In pratica, il vetrino ibridato, una volta caricato su Ikoniscope®, viene esaminato a tappeto e la posizione delle cellule atipiche eventualmente presenti (identificate come tali mediante algoritmi frattalici che tengono conto della dimensione nucleare, della sua forma e della disomogeneità cromatinica) viene determinata e registrata.
- Le cellule (oltre 200.000 per vetrino!) vengono successivamente analizzate singolarmente ad alto ingrandimento; le immagini vengono memorizzate su un supporto magnetico (hard disk) ed elencate in una galleria, visibile sullo schermo di un PC.



- La galleria di immagini viene rivista da un operatore esperto che la ripulisce dagli eventuali artefatti presenti e valida il risultato finale dell'esame (scoring dei segnali).
- Ikoniscope® permette uno scanning elevatissimo, mentre la stessa operazione eseguita manualmente al microscopio a fluorescenza tradizionale non va oltre le 25-50 cellule.
- Il grande numero di osservazioni, oltre a garantire una sensibilità virtualmente pari al 100%, permette una quantizzazione dei risultati statisticamente robusta che, a sua volta, consente valutazioni anche prognostiche.
- Le immagini registrate rappresentano un reperto oggettivo, indipendente dall'operatore, e consentono di apprezzare anche sul referto il grado di poliploidia (grading) della cellula.

COME LEGGERE IL REFERTO DELLA FISH DELLE CELLULE CERVICALI ESEGUITO CON IKONISCOPE

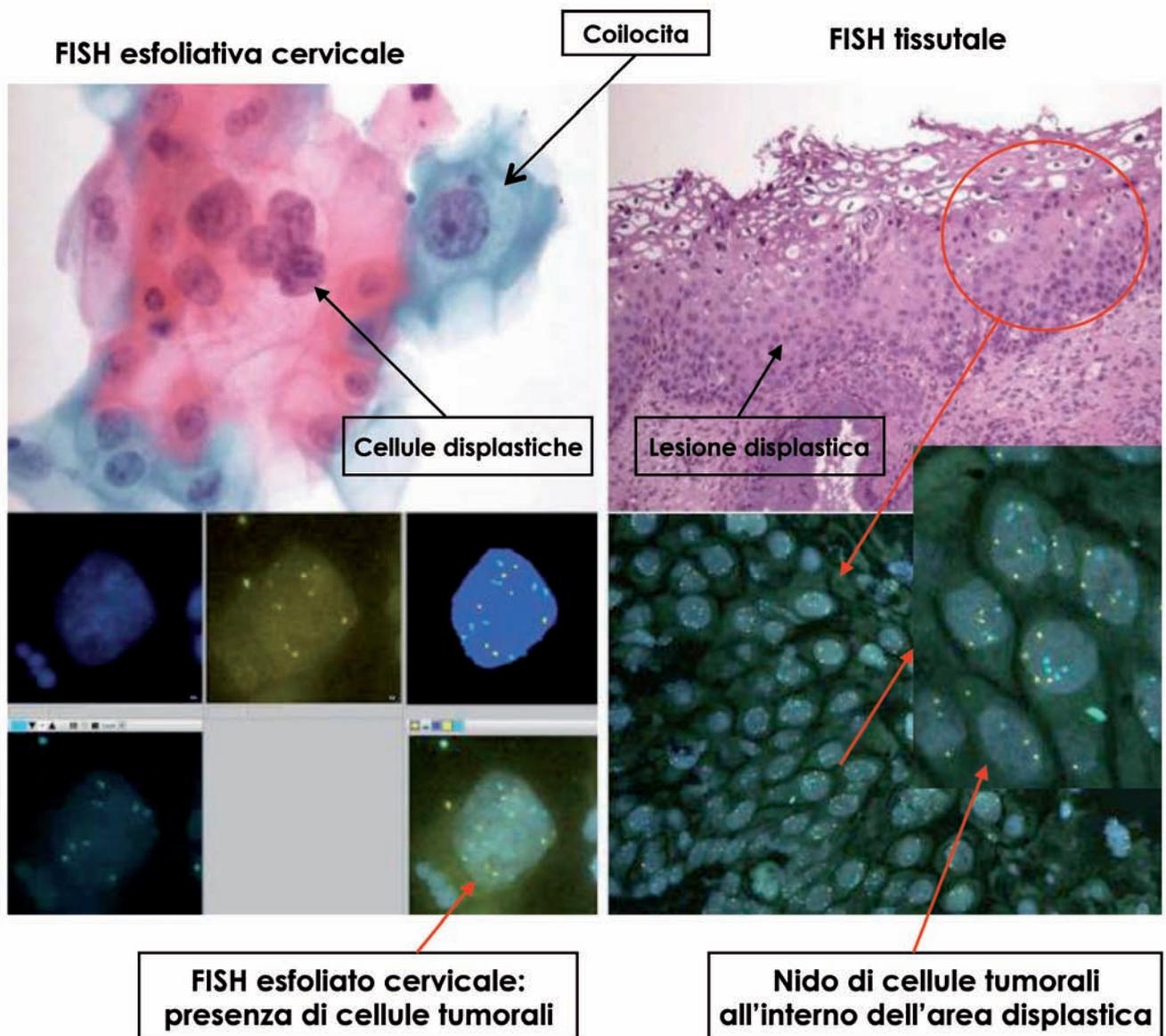
1. La ricerca è da considerarsi positiva se vengono evidenziate almeno 2 cellule aventi ognuna almeno 5 copie di 3q26.
2. Il rilievo di una sola cellula viene comunque evidenziato anche in caso di risultato negativo, perché si tratta comunque di una cellula tumorale e quindi di un caso da tenere sotto osservazione.
3. In caso di risultato positivo, viene comunque specificato se l'aumento delle copie riguarda anche il cromosoma 7: in tal caso, essendo almeno due i cromosomi coinvolti (il 3 ed il 7), saremo in presenza di una franca poliploidia che è il frutto di un processo che si auto-amplifica, mitosi dopo mitosi, in una cellula immortalizzata e quindi sempre più pericolosa.
4. Oltre al numero di cellule tumorali rilevate, viene riportato anche il numero delle cellule atipiche osservate ad alto ingrandimento e ciò permette di percentualizzare il risultato rendendolo paragonabile a quello di osservazioni successive.
5. Il referto include la fotografia di una cellula emblematica per il grado di atipia raggiunta.

BIBLIOGRAFIA:

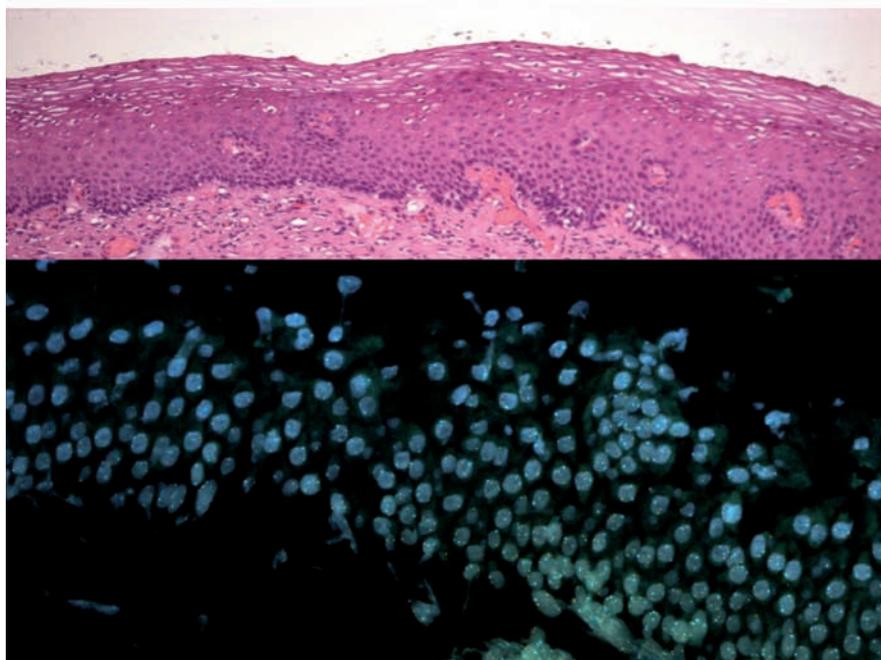
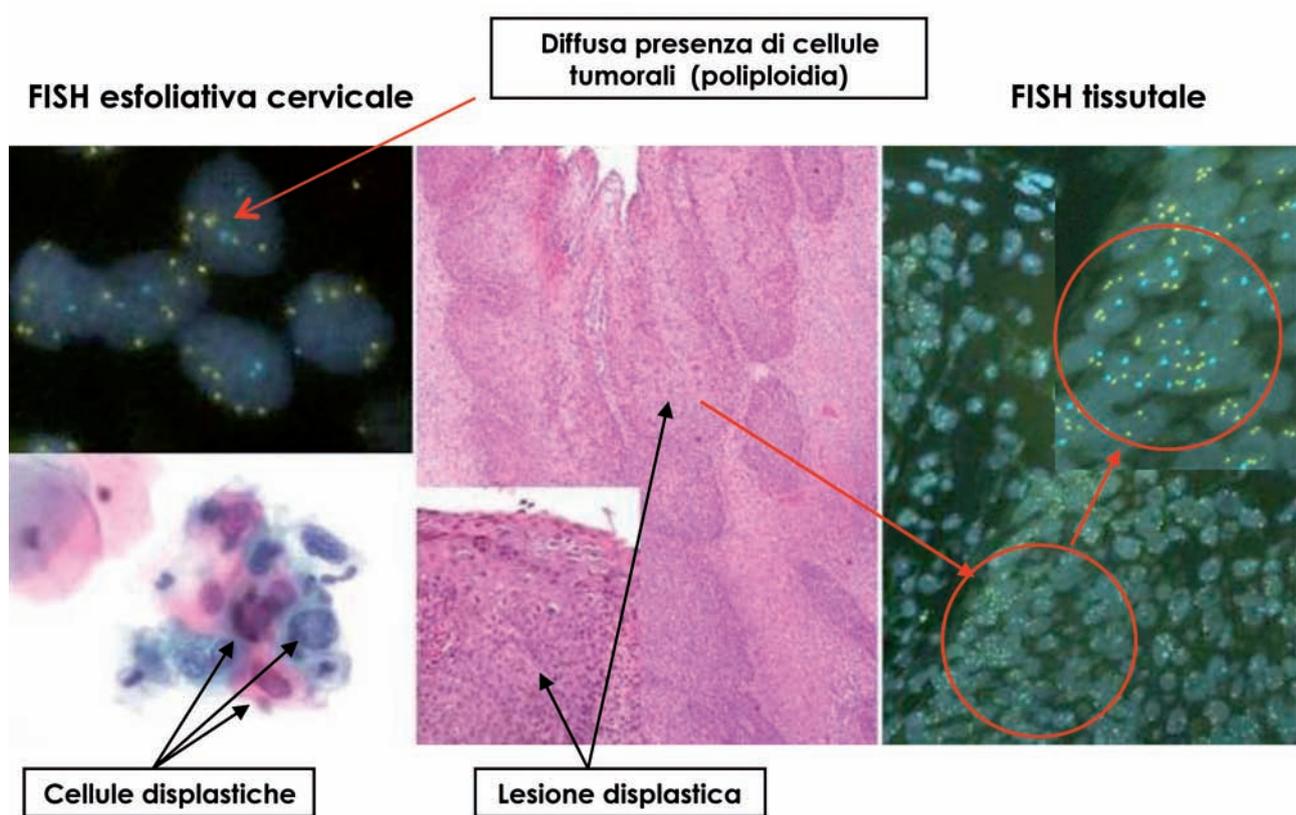
- Alameda F, Espinet B, Corzo C, Muñoz R, Bellosillo B, Lloveras B, Pijuan L, Gimeno J, Salido M, Solé F, Carreras R, Serrano S: 3q26 gain studied by fluorescence in situ hybridization as a persistence-progression indicator in low-grade squamous intraepithelial lesion cases. *Human Pathol* 2009;40:1474-8
- Belinson JL, Pretorius RG, Zhang WH, Wu LY, Qiao YL, Elson P: Cervical cancer screening by simple visual inspection after acetic acid. *Obstet Gynecol* 2001; 98:444-4
- Boveri T: The origin of malignant tumor. Williams and Wilkins, Baltimore; Baillière, Tindall&Cox, London 1929
- Caraway NP, Khanna A, Dawlett M, Guo M, Guo N, Lin E, Katz RL: Gain of the 3q26 region in cervicovaginal liquid-based pap preparations is associated with squamous intraepithelial lesions and squamous carcinoma. *Gynecologic Oncol* 2008;110: 37-42
- Charames GS, Bapat B: Genomic instability and cancer. *Curr Mol med* 2003; 3:589-96
- Ferguson DO, Alt FW: DNA double strand break repair and chromosomal translocation: Lessons from animal models. *Oncogene* 2001; 20:5572-9
- Ferris DG, Wright TC Jr, Litaker MS, Richart RM, Lorincz AT, Sun XW, Borgatta L, Buck H, Kramer L, Rubin R: Triage of women with ASCUS and LSIL on pap smear reports: management by repeat Pap smear, HPV DNA testing or colposcopy? *J Fam Pract* 1998; 46:125-34
- Greider CW, Blackburn EH: Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts. *Cell* 1985; 43: 405-413
- Heselmeyer-Haddad K, Sommerfeld K, White NM, Chaudhri N, Morrison LE, Palanisamy N, Wang ZY, Auer G, Steinberg W, Ried T: Genomic amplification of human telomerase gene (TERC) in pap smears predicts the development of cervical cancer. *Am J Pathol* 2005; 166:1229-1238
- Heselmeyer-Haddad K, Janz V, Castle PE, Chaudhri N, White N, Wilber K, Morrison LE, Auer G, Burroughs FH, Sherman ME, Ried T: Detection of genomic amplification of the human telomerase gene (TERC) in cytologic specimens as a genetic test for the diagnosis of cervical dysplasia. *Am J Pathol.* 2003; 163:1405-1416
- Jalali GR, Herzog TJ, Dziura B, Walat R, Kilpatrick MW. Amplification of the chromosome 3q26 region shows high negative predictive value for the nonmalignant transformation of LSIL cytologic finding. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 202:581.e1-5
- Knudson AG: Two genetic hits (more or less) to cancer: Nature review cancer 2001: 1:157-162
- Mian C, Bancher D, Kohlberger P, Kainz C, Haitel A, Czerwenka K, Stani J, Breitenacker G, Wiener H: Fluorescence in situ hybridization in cervical smears: Detection on numerical aberrations of chromosomes 7, 3 and X and relationship to HPV infection. *Gynecol Oncol* 1999;75:41-46
- Mitchell MF, Schottenfeld D, Tortolero-Luna G, Cantor SB, Richards-Kortum R: Colposcopy for the diagnosis of squamous intraepithelial lesion: A meta-analysis. *Obstet Gynecol* 1998; 91: 626-31
- Olaniyan OL: Validaty of colposcopy in the diagnosis of early cervical neoplasm – A review. *African J of Repro Health* 2002; 6:59-69
- Olovnikov AM : "A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon". *J. Theor. Biol.* 1973; 41: 181–90.
- Pihan GA, Doxsey SJ: The mitotic machinery as a source of genetic instability in cancer. *Semin cancer Biol* 1999; 9:289-302
- Policht FA, Song M, Sitailo S, O'Hare A, Ashfaq R, Muller CY, Morrison LE, King W, Sokolova IA: Analysis of genetic copy number changes in cervical disease progression. *BMC cancer* 2010;10:432
- Ried T, Heselmeyer-Haddad K, Blegen H, Schröck E, Auer G: Genomic changes defining the genesis, progression, and malignancy potential in solid human tumors: A phenotype/genotype correlation. *Genes, Chromosomes and Cancer* 1999;25: 195–204.
- Schiffman M, Solomon D: Findings to date from the ASCUS-LSIL triage study (ALTS). *Arch Path Lab Med* 2003;127(8):946-9.
- Seppo A, Jalali GR, Babkowski R, Symiakaki H, Rodolakis A, Tafas T, Tsipouras P, Kilpatrick MW: Gain of 3q26: A genetic marker in low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) of uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2009; 114:80-83
- Sui W, Ou M, Dai Y, Chen J, Lan H, Yan Q, Huang H: Gain of the human telomerase RNA gene TERC at 3q26 is strongly associated with cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2009; 19:1303-1306
- Vokac NK, Kodric T, Erjavec-Skerget A, Zagorac A, Takac I: Screening of TREC gene amplification as an additional genetic diagnostic test in detection of cervical preneoplastic lesions. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2009; 195:19-22
- Wunderlich V: Chromosomes and cancer: Theodor Boveri's predications 100 years later. *J Mol Med* 2002; 80:545-548

CASI CLINICI

CASO CLINICO 1: Donna di 42 anni con persistenza di LSIL al pap-test, HPV ad alto rischio e positività alla FISH dell'esfoliato cervicale (presenza di 30 cellule, pari al 15 % di quelle osservate). L'esame istologico da biopsia mostra aree di CIN I-II all'interno delle quali, tramite la FISH, è possibile evidenziare la presenza di "nidi" di cellule tumorali.



CASO CLINICO 2: Donna di 35 anni con HSIL al pap-test, HPV ad alto rischio (genotipo 16) e marcata positività alla FISH dell'esfoliato cervicale (presenza di 30 cellule, pari al 28 % di quelle osservate). All'esame istologico del cono, aree di CIN II-III nell'ambito delle quali la FISH mette in evidenza la presenza diffusa di cellule tumorali



Caso clinico 2:
Zona indenne da displasia con assenza di cellule tumorali

CDI CENTRO DIAGNOSTICO ITALIANO: da oltre 35 anni al servizio della salute

Il Centro Diagnostico Italiano, attivo a Milano da oltre 35 anni, è una struttura sanitaria ambulatoriale a servizio completo orientata alla prevenzione, diagnosi e terapia in regime di day hospital. È presente sul territorio lombardo attraverso un network di strutture, collocate in Milano, Corsico, Rho, Cernusco sul Naviglio, Corteolona, Pavia e Varese. Nel 2006 ha ricevuto il prestigioso accreditamento da parte di Joint Commission International.

All'interno di CDI vi lavorano oltre 800 persone tra medici specialisti, tecnici sanitari, infermieri e impiegati, al servizio di circa 600mila pazienti all'anno.

CDI dispone di un'area accreditata (laboratorio ed imaging), di un'area privata e di un'area a servizio delle aziende.

Il laboratorio del CDI si avvale della catena automatizzata più grande d'Italia garantendo sicurezza dei dati, e al contempo, un numero molto elevato di analisi che supera, in un anno, i 4.000.000. È inoltre l'unico laboratorio in Europa a disporre di Ikoniscope, un microscopio totalmente automatizzato e robotizzato utilizzato nella diagnosi precoce del cancro della cervice e della vescica.

La Diagnostica per Immagini e la Medicina Nucleare offrono le strumentazioni più evolute e innovative, quali la PET - tomografia ad emissioni di positroni, la TAC a 64 strati Dual Source e la Risonanza Magnetica Nucleare ad alto campo per un totale di 150.000 esami refertati all'anno. È stata inoltre recentemente introdotta, unica a Milano e Provincia, una Risonanza Magnetica completamente aperta.

Sempre alla ricerca dell'eccellenza clinica, in accordo con la propria mission, CDI si è dotato del Cyberknife, il rivoluzionario robot radiochirurgico, che pone il Centro Diagnostico all'avanguardia nella terapia dei tumori.

Attualmente, sono oltre 50 i servizi riguardanti numerose aree terapeutiche che, grazie all'altissima professionalità dei suoi medici, CDI mette a disposizione per la prevenzione, la diagnosi e la cura.

Tra questi: il CDI-Check, check up personalizzato, che si svolge sotto la tutela di uno Specialista internista Coordinatore (2.500 CDICheck all'anno); la Day Surgery e One Day Surgery (3.000 interventi all'anno), un'attività chirurgica che permette al paziente di tornare a casa propria il giorno stesso dell'intervento o, all'occorrenza, di trascorrere una notte nell'area riservata alla degenza notturna, senza entrare nel contesto della chirurgia in regime di ricovero; il Centro di Consulenza in Anatomia e Patologia Oncologica, vero e proprio punto di riferimento per la diagnosi delle patologie oncologiche, diretto dal Prof. Juan Rosai, un patologo riconosciuto a livello mondiale.

Ultima, ma non certo per importanza, l'area aziende: CDI, attraverso una struttura sanitaria tecnicamente e scientificamente avanzata è in grado di offrire ai propri clienti un servizio che ottempera – anche presso le aziende – a tutte le prescrizioni di medicina del lavoro obbligatorie per legge. CDI Ambiente Salute e Sicurezza mette anche a disposizione delle aziende che lo richiedessero, attività di monitoraggio ambientale, corsi di prevenzione etc.

CDI Centro Diagnostico Italiano

via Saint Bon 20 - 20147 Milano

Tel. 02.48317.444 (Privato e Fondi) - 02.48317.555 (SSN)

www.cdi.it

Direttore Sanitario: prof. Andrea Casasco

