

FISH test

IDENTIFICAZIONE SICURA DELLE CELLULE TUMORALI DI
ORIGINE UROTELIALE MEDIANTE FISH AUTOMATIZZATA



FISH test

**IDENTIFICAZIONE SICURA DELLE CELLULE TUMORALI DI
ORIGINE UROTELIALE MEDIANTE FISH AUTOMATIZZATA**

*A cura del Dott. Vittorio Grazioli, Direttore Laboratorio CDI
e del Dott. Tsbering Dorji, Anatomopatologo CDI*

Ruolo e significato di un nuovo approccio con citogenetica molecolare di secondo livello

In Italia, ogni anno, vengono diagnosticati circa 17.000 (dati CNR MIUR, 2005) nuovi casi di carcinoma uroteliale con una mortalità che raggiunge circa i 5.000 casi/anno (GLOBOCAN 2008).

Tale patologia ha una incidenza maggiore nelle fasce più avanzate di età e tra i fumatori; altro fattore di rischio è rappresentato dall'esposizione occupazionale ad amine aromatiche, tuttavia le recenti norme di in materia di sicurezza e prevenzione sul lavoro hanno notevolmente ridotto l'esposizione occupazionale a queste sostanze (Auerbach O et.al, Freedman ND et.al, Morrison AS et.al, Schulte PA et.al)

La sede più frequente d'insorgenza è la vescica (90% dei casi). Si tratta di un tumore generalmente poco aggressivo e che si limita agli strati più superficiali della mucosa vescicale (circa 70 -75% dei casi) ma che in alcuni casi (circa 10-30%) può infiltrare la parete muscolare, i tessuti circostanti e metastatizzare. La probabilità di recidiva varia dal 50 al 70% a seconda del grado di malignità del tumore (Kipp BR et.al).

Il riscontro di sangue nelle urine (ematuria), in particolare se in assenza di infezione delle vie urinarie, è il sintomo che rende consigliabile intraprendere accertamenti diagnostici mirati, il primo dei quali è rappresentato dall'esame citologico delle urine per la ricerca di cellule tumorali maligne (CTM). Per minimizzare il rischio di falsi negativi, l'esame deve essere eseguito su almeno tre campioni di urina provenienti da altrettante separate minzioni (Geisse LJ et. al, Park CH et.al).

Non sempre l'esame microscopico consente di identificare sicuramente come tumorale la cellula osservata. In realtà, nella stragrande maggioranza dei casi anormali, le cellule presentano solo atipie di lieve-media entità che, nel 65% dei casi, non sono di origine neoplastica (Fig.1 e Fig. 2).

FISH Test

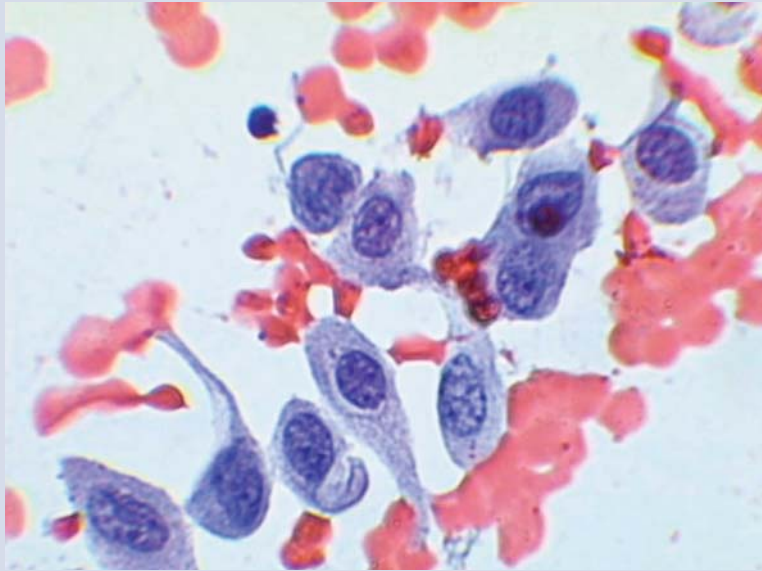


Fig.1: Cellule uroteliali con atipie di grado lieve-moderato frammiste a sangue.
(sospette per tumore di basso grado)

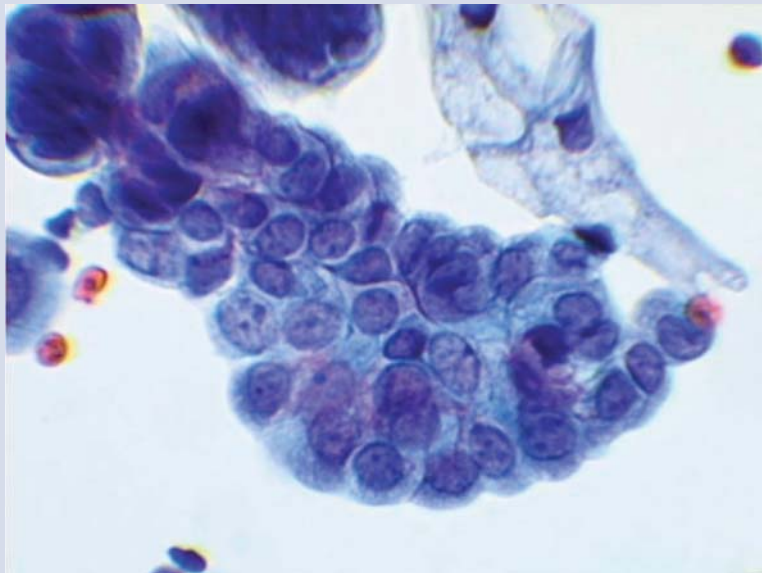


Fig.2: Aggregato papillare di cellule uroteliali con atipie di natura reattiva (non tumorale)
Anche se potrebbe non avere significato patologico, il riscontro di atipie cellulari di lieve-media entità non deve tuttavia essere trascurato, rendendo obbligatorio il ricorso ad ulteriori approfondimenti strumentali, anche invasivi, che spesso si rivelano inutili.

FISH Test

Esiste un modo sicuro per identificare come tumorali le cellule atipiche?

Si, contando i loro cromosomi

È noto, da oltre 100 anni, che molte delle cellule tumorali sono caratterizzate da aneuploidia, ossia dalla diminuzione e/o dall'aumento del numero di copie di alcuni cromosomi. 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. L'aneuploidia nasce inizialmente da un errore nella segregazione mitotica dei cromosomi durante la metafase. La mancata equa divisione di due cromosomi tra le due cellule figlie porta, da una parte, ad una cellula con una sola copia del cromosoma (destinata a morte sicura) e, dall'altra, ad una cellula trisomica; da questo punto in avanti, se la cellula "difettosa" non muore, si innesca un fenomeno irreversibile in grado di automantenersi e che porta, mitosi dopo mitosi, alla completa aneuploidia (caos cromosomico) (Boveri T, Ferguson DO et.al, Knudson AG et.al, Pihan GA et.al, Wunderlich V et.al).

Mediante la tecnica di citogenetica molecolare interfascica denominata FISH (Fluorescence In Situ Hybridization), è possibile contare i cromosomi ed i geni; nel caso delle cellule uroteliali vengono contate le copie dei cromosomi 3, 7 e 17 e valutata la perdita del gene dell'oncosoppressore (9p21). Dati della letteratura hanno infatti dimostrato il costante coinvolgimento di tali cromosomi nella progressione della neoplasia uroteliale (Bergman J et.al, Bubendorf L et.al, Halling KC et.al, Kipp BR et.al, Riesz P et.al, Sokolova IA et.al, Yoder BJ et.al) (Fig. 3 e Fig. 4).

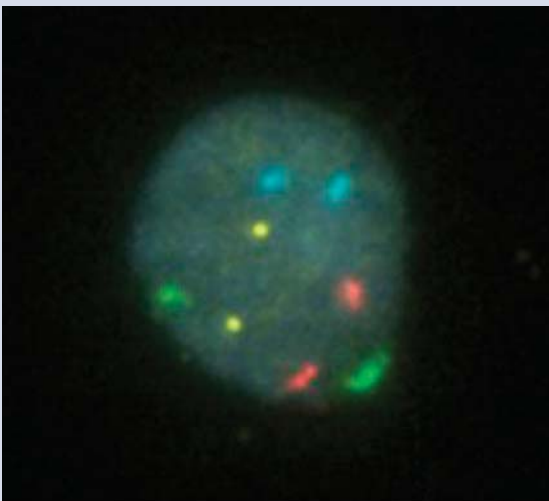


Fig. 3: Cellula normale con due copie di ciascun cromosoma

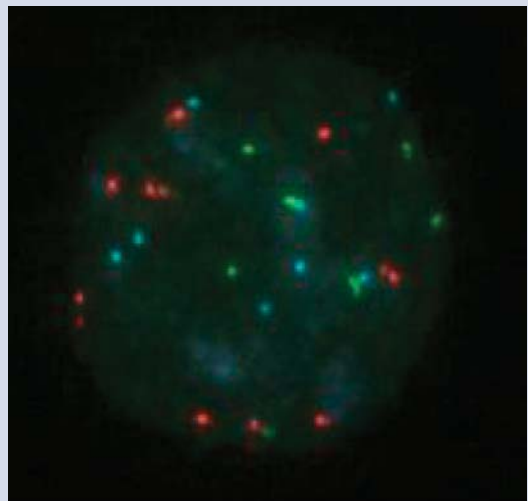


Fig.4: Cellula tumorale con aumento del numero di copie dei cromosomi

Come mai, nonostante la sua specificità, la FISH è stata finora scarsamente utilizzata?

- Perché, normalmente, viene eseguita manualmente, cioè l'anatomopatologo e/citogenetista deve esaminare il vetrino al microscopio a fluorescenza; tale operazione è particolarmente indaginosa e consente di esaminare solo un esiguo numero di cellule sospette (solitamente 25).
- Così facendo, la sensibilità della FISH è insufficiente per ricoprire un ruolo nella diagnostica.

In cosa si differenzia la FISH eseguita presso il Centro Diagnostico Italiano?

Presso il Centro Diagnostico Italiano di Milano viene eseguita (anche in convenzione con il Sistema Sanitario Nazionale) la FISH interfascia quantitativa delle cellule uroteliali. L'esame viene effettuato mediante l'utilizzo di un sistema automatico di acquisizione ed elaborazione di immagini in microscopia a fluorescenza (Ikoniscope®) che permette di esaminare oltre 200.000 cellule per vetrino, selezionando da queste almeno 500 cellule sospette; grazie ad Ikoniscope® la FISH diventa una tecnica sensibilissima (virtualmente pari al 100%), oggettiva, ma soprattutto **quantitativa**.

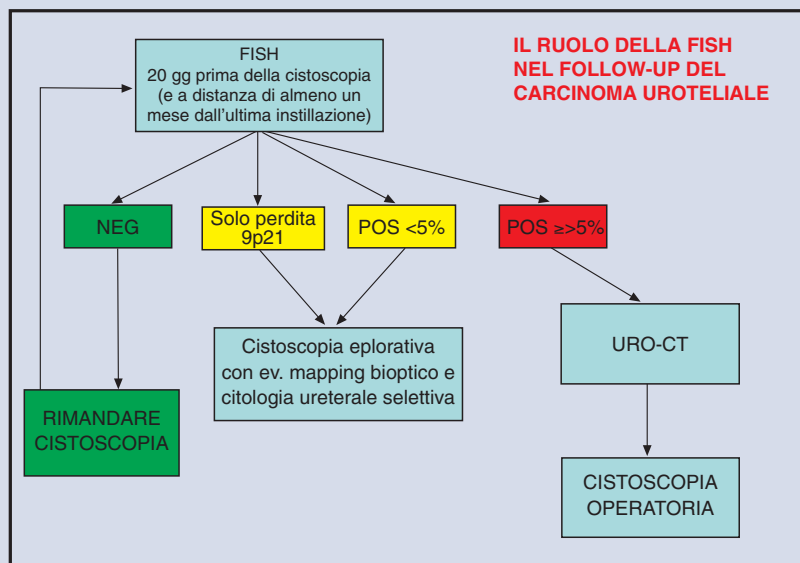
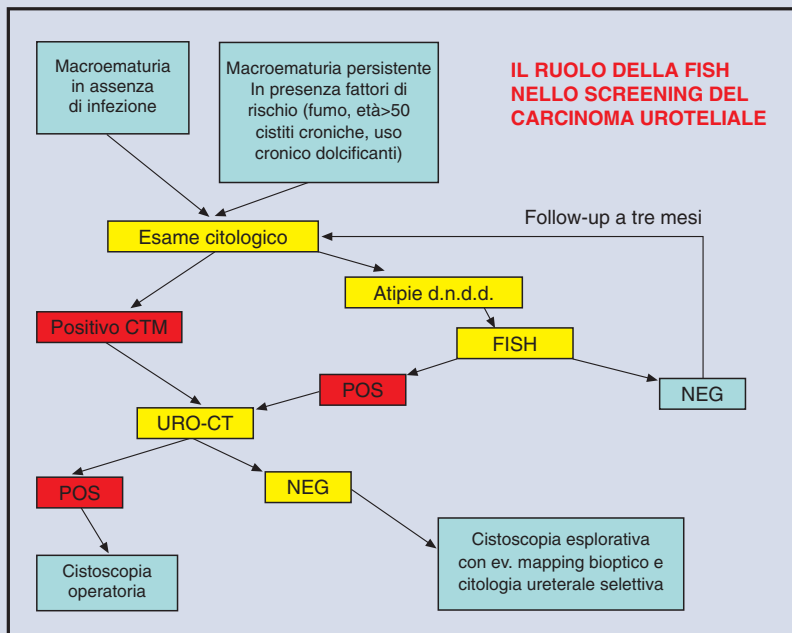
La percentuale di cellule tumorali sul totale di quelle osservate correla infatti con la probabilità che la lesione sia effettivamente presente e con la sua invasività, mentre il grado di polisomia (numero di copie dei cromosomi 3, 7 e 17) e perdita di oncosoppressore (9p21) correla con il grading. Infine, il numero di cellule osservabili è indicativo del grado di esfoliazione della lesione (Kipp BR et.al, Krüger S et.al, Yoder BJ et.al).

FISH Test

Quando una FISH è positiva nonostante la contestuale cistoscopia sia negativa, che probabilità abbiamo che sia comunque presente un carcinoma (Kipp BR et.al)

Dipende dalla percentuale di cellule tumorali!

FISH pos < 4%	29%
FISH pos 5% - 10%	39%
FISH pos 11% - 30%	64%
FISH pos > 31%	75%



Concludendo

- ✓ La FISH delle cellule uroteliali è semplicemente una valida tecnica di anatomia patologia di secondo livello.
- ✓ Per essere appropriata, va applicata solo nel caso di riscontro di atipie nelle cellule uroteliali.
- ✓ Deve essere eseguita su un grande numero di cellule ma soprattutto deve essere quantitativa.

Bibliografia

Auerbach O, Garfinkel L. Histologic changes in the urinary bladder in relation to cigarette smoking and use of artificial sweeteners. *Cancer* 1989; 64:983-987.

Bergman J, Reznichuk RC, Rajfer J. Surveillance of patients with bladder carcinoma using fluorescent in-situ hybridization on bladder washings. *BJU International* 2007; 101:26 -2.

Boveri T. The origin of malignant tumor. Williams and Wilkins, Baltimore; Baillière, Tindall&Co, London 1929.

Bubendorf L, Grilli B, Sauter G, Mihatsch MJ, Gasser TC, Dalquen P. Multiprobe FISH for Enhanced Detection of Bladder Cancer in Voided Urine Specimens and Bladder Washings. *Am J Clin Pathol* 2001; 116:79-86.

Ferguson DO. DNA double strand break repair and chromosomal translocation: Lessons from animal models. *Oncogene* 2001; 20:5572-9.

Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA*. 2011; 306(7):737-45.

Geisse LJ, Tweeddale DN. Pre-clinical cytological diagnosis of bladder cancer. *J Urol*. 1978; 120(1):51-6.

GLOBOCAN 2008: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2008.

Kipp BR, Tanasescu M, Else TA, Bryant SC, Karnes RJ, Sebo TJ, Halling KC. Quantitative Fluorescence in Situ Hybridization and its ability to predict bladder cancer recurrence and progression to muscle-invasive bladder cancer. *Journal of Molecular Diagnostic* 2009; 11(2):148-154.

Knudson AG: Two genetic hits (more or less) to cancer: *Nature review cancer* 2001; 1:157-162.

Krüger S, Mess F, Böhle A, Feller AC. Numerical aberrations of chromosome 17 and the 9p21 locus are independent predictors of tumor recurrence in non-invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Int J Oncol*. 2003; 23(1):41-8.

FISH Test

Halling KC, Kipp BR. Bladder Cancer Detection Using FISH (UroVysion Assay). *Adv Anat Pathol*. 2008; 15 (5):279-286.

Morrison AS, Buring JE, Verhoek WG, Aoki K, Leck I, Ohno Y, Obata K. An international study of smoking and bladder cancer. *J Urol* 1984; 131:650-654.

Park CH, Britsch C, Uson AC, Veenema RJ. Reliability of positive exfoliative cytologic study of the urine tract malignancy. *J Urol* 1969; 102:91-92.

Pihan GA. The mitotic machinery as a source of genetic instability in cancer. *Semin cancer Biol* 1999; 9:289-302.

Ried T. 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.

Riesz P, Lotz G, Paska C, Szendroi A, Majoros A, Nemeth Z, Torzsok P, Szarvas T, Kovalszky I, Schaff Z, I. Romics, Kiss. A Detection of Bladder Cancer from the Urine using Fluorescence in situ Hybridization Technique. *Pathology Oncology Research* 2007; 13:187-194.

Skacel M, Fahmy M, Brainard JA, Pettay JD, Biscotti CV, Liou LS, Procop GW, Jones JS, Ulchaker J, Zippe CD, Tubbs RR. Multitarget fluorescence in situ hybridization assay detects transitional cell carcinoma in the majority of patients with bladder cancer and atypical or negative urine cytology. *J Urol*. 2003;169 (6):2101-5.

Sokolova IA, Halling KC, Jenkins RB, Burkhardt HM, Meyer RG, Seelig SA, King W. The development of a multitarget, multicolor fluorescence in situ hybridization assay for the detection of urothelial carcinoma in urine. *J Mol Diagn*. 2000; 2(3):116-23.

Schulte PA, Ringen K, Hemstreet GP, Altekruze EB, Gullen WH, Tillett S, Allsbrook Jr WC, Crosby JH, Witherington R, Stringer W, Brubaker MM. Risk factors for bladder cancer in a cohort exposed to aromatic amines. *Cancer* 1986; 58:2156-2162.

Varella-Garcia M, Akduman B, Sunpaweravong P, Di Maria MV, Crawford ED. The UroVysion fluorescence in situ hybridization assay is an effective tool for monitoring recurrence of bladder cancer. *Urol Oncol*. 2004; 22(1):16-9.

Wunderlich V. Chromosomes and cancer: Theodor Boveri's predications 100 years later. *J Mol Med* 2002; 80:545-548.

Yoder BJ, Skace M, Hedgepeth R, Babineau D, Ulchaker JC, Liou LS, MD, Brainard JA, Biscotti CV, Jones JS, Tubbs RR. Reflex UroVysion Testing of Bladder Cancer Surveillance Patients With Equivocal or Negative Urine Cytology: A Prospective Study With Focus on the Natural History of Anticipatory Positive Findings. *Am J Clin Pathol* 2007; 127:295-301.

FISH Test

Procedura

L'esame viene eseguito sulle urine

Vengono scartate le prime urine del mattino poiché la lunga permanenza nella vescica danneggia le cellule. Le urine emesse con le successive minzioni vengono versate in appositi contenitori al fine di fissare e conservare le cellule. I contenitori possono essere conservati in frigorifero ed inviati al Centro Diagnostico Italiano entro una settimana.

RICHIESTA DI FISH SU CELLULE UROTELIALI

Prescrivere “FISH cellule uroteliali” oppure “Ricerca aneuploidie cellule uroteliali con FISH”, compilare il modulo anamnestico di accompagnamento contenuto nel kit e consegnare al paziente il kit completo.

IL KIT PER L'INVIO È COSTITUITO DA:

- ▣▣▣▣ ➔ Foglio di informazioni al paziente
- ▣▣▣▣ ➔ Modulo anamnestico di accompagnamento alla richiesta per ricerca di aneuploidie nelle cellule uroteliali (FISH)
- ▣▣▣▣ ➔ Modulo per richiesta di autorizzazione all'invio di campioni diagnostici che non necessitano di temperatura controllata
- ▣▣▣▣ ➔ Modulo di spedizione DHL, pre-compilato
- ▣▣▣▣ ➔ Contenitore DHL a norma per il trasporto
- ▣▣▣▣ ➔ Contenitori per la raccolta del campione urinario
- ▣▣▣▣ ➔ Bollettino postale, come una possibile modalità di pagamento della prestazione (se dovuta)

- ✓ La prestazione è erogabile in regime di Servizio Sanitario Nazionale, mediante impegnativa da parte del medico curante.
- ✓ Controllare sempre che l'impegnativa riporti l'eventuale codice di esenzione e la relativa firma di autocertificazione sul fronte; sul retro la firma dell'assistito deve essere sempre presente.
- ✓ Una volta completato l'esame, il referto sarà inviato per raccomandata al Paziente, unitamente alla fattura del ticket (se dovuto) ed al bollettino postale precompilato per pagarlo; copia del referto sarà inviato per posta ordinaria allo Specialista Urologo richiedente.

CDI CENTRO DIAGNOSTICO ITALIANO

da oltre 30 anni al servizio della salute

Il Centro Diagnostico Italiano, attivo a Milano da oltre 30 anni, è una struttura sanitaria ambulatoriale a servizio completo orientata alla prevenzione, diagnosi e terapia in regime di day hospital. E' 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. E' 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. E' stata inoltre recentemente introdotta 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 CDI Check 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 a tutte le prescrizioni di medicina del lavoro obbligatorie per legge. CDI Servizi per le Aziende mette anche a disposizione attività di monitoraggio ambientale, corsi di prevenzione etc.





CDI Centro Diagnostico Italiano

Direttore Sanitario: Prof. Andrea Casasco

Sede Centrale - Via Saint Bon, 20 - 20147 Milano
Tel. 02.48317444 (Privati e Fondi) - Tel. 02.48317555 (SSN)

e-mail: info@cdi.it

www.cdi.it/it/nostriservizi/laboratorio/ikoniscope.html