



**SARDEGNA
RICERCHE**

Sardegna FESR 2014/2020 - ASSE PRIORITARIO I

“RICERCA SCIENTIFICA, SVILUPPO TECNOLOGICO E INNOVAZIONE”

Azione 1.1.4 Sostegno alle attività collaborative di R&S per lo sviluppo di nuove tecnologie sostenibili, di nuovi prodotti e servizi

Progetto cluster Top Down
“NIASMIC - Not Invasive Analysis of Somatic
Mutations In Cancer”

Rapporto Tecnico
Rilascio del protocollo per la gestione dei campioni,
dal sito di prelievo al laboratorio di sequenziamento

0/4



**SARDEGNA
RICERCHE**

RAPPORTO R3.2 Protocollo per la gestione dei campioni, dal sito di prelievo al laboratorio di sequenziamento.

Il progetto NIASMIC si propone di sviluppare un protocollo di analisi del profilo genetico del DNA estratto da biopsia liquida di pazienti oncologici, mediante l'applicazione del sequenziamento NGS, per fornire delle informazioni genetiche utili sia per una diagnosi precoce e più precisa, che per la personalizzazione della terapia.

Nel seguito sono riportate le procedure che sono state definite per la raccolta (alla diagnosi e durante il follow-up), la conservazione, la logistica e la tracciabilità dei campioni nel corso del progetto con lo scopo di ridurre le fonti di variabilità pre-analisi che potrebbero impattare sull'efficacia della tecnologia NIASMIC e garantire di conseguenza la riproducibilità sperimentale.

Con il termine di biopsia liquida si fa riferimento all'utilizzo di fluidi biologici come surrogato del tessuto neoplastico per ottenere informazioni utili a fini diagnostici, prognostici o per predire la risposta alla terapia con specifici farmaci antitumorali. L'analisi del DNA tumorale circolante (circulating tumor DNA, ctDNA) contenuto nel DNA libero circolante (cell free DNA, cfDNA) che può essere isolato dal sangue periferico, rappresenta ad oggi il principale approccio di biopsia liquida impiegato nella pratica clinica. Le procedure maggiormente standardizzate nella pratica clinica riguardano l'isolamento del cfDNA dal sangue periferico.

La quantità di DNA che è possibile estrarre dal sangue periferico è spesso molto limitata, nella misura di pochi ng/ml, di cui il ctDNA è solo una frazione. Infatti, la concentrazione del DNA target nel plasma dipende da diversi fattori, tra cui: il carico di malattia, i livelli di espressione della mutazione nelle cellule del tumore primitivo, la velocità di rilascio del ctDNA nel torrente circolatorio e i livelli di DNA rilasciati da cellule non trasformate (ad esempio, in conseguenza di processi infiammatori che si instaurano nel tessuto sano e che circonda il tumore o di lisi dei leucociti dopo il prelievo di sangue).

Il cfDNA può essere isolato dal siero o dal plasma. Tuttavia, diversi studi hanno dimostrato che l'uso del plasma è da preferirsi al siero; in quest'ultimo, infatti, il processo di coagulazione causa il rilascio di DNA genomico derivante dai leucociti.

La procedura di raccolta del sangue periferico che verrà adottata prevede pertanto l'utilizzo di provette con una formulazione specifica al fine di inibire la coagulazione, stabilizzare il cfDNA ed eludere la lisi cellulare. A questo scopo saranno acquistate e distribuite ai reparti che aderiscono al progetto i "Cell-Free DNA Collection Tube" commercializzati dalla Roche (1). Un primo problema



**SARDEGNA
RICERCHE**

che può inficiare la qualità del campione è costituito infatti dall'emolisi che può generarsi durante la flebotomia. Oltre all'utilizzazione di provette con formulazione specifica è necessario, pertanto, assicurarsi che il prelievo di sangue sia effettuato da personale altamente qualificato.

Per ogni paziente alla diagnosi e nelle successive visite di follow-up verranno raccolte 2 provette contenenti 8 ml di sangue. Il campione di sangue (8 ml in EDTA) deve essere processato entro 1 o massimo 2 ore dal prelievo perché il ctDNA è soggetto ad un elevato turn-over (15 minuti di emivita). Si esegue una prima centrifugazione a 1600 x g per 10 minuti, senza freno e a temperatura ambiente. Si effettua una seconda centrifugazione del plasma a 16000 x g per 15 minuti a temperatura ambiente per eliminare la parte corpuscolata residua, ed estrarre immediatamente o conservare a -80°C. Dalla provetta di sangue, dopo la prima centrifugazione, si recupera anche l'anello di linfociti. In due provette da 1,5 ml si trasferiscono 2 aliquote da 200 µl del buffy coat per l'estrazione del DNA costituzionale, estrarre immediatamente o conservare a -80°C.

Per i reparti che avessero difficoltà ad applicare il protocollo di preparazione del plasma indicato sopra abbiamo la possibilità di utilizzare provette per la raccolta del sangue che contengono uno stabilizzante per evitare la degradazione del ctDNA e la lisi cellulare. In questo modo si può posticipare la procedura di separazione del plasma fino a 4 giorni. Non è comunque preferibile usare questa procedura per evitare di sottoporre il campione ad altri fattori (temperature, sollecitazioni meccaniche, tempi di permanenza, ecc) che potrebbero compromettere la riproducibilità delle analisi.

Le provette saranno successivamente rese anonime con l'assegnazione di un codice univoco, tenute a temperatura ambiente e inviate al laboratorio di sequenziamento del CRS4 di Pula entro le successive 48 ore. Il laboratorio del CRS4 provvederà alla registrazione del campione sul database del progetto con l'assegnazione di un codice interno identificativo del campione e alla trascrizione dei dati clinici.

Quando disponibile, per ogni paziente e con il fine della validazione del protocollo di analisi oggetto di studio nel progetto, sarà inoltre raccolto anche il campione di DNA estratto dalla biopsia solida al fine della validazione del protocollo di analisi proposto nel progetto e verranno trasmessi al CRS4 anche i dati ottenuti dalle indagini cliniche e di laboratorio convenzionali ad esso associate per il confronto della sensibilità tra tecniche genetiche convenzionali e tecniche di sequenziamento di ultima generazione. Ogni campione sarà ricodificato e registrato nel database del progetto con la raccolta di dati clinici, istologici e genetici ottenuti con tecniche convenzionali.



**SARDEGNA
RICERCHE**

Referenze

1. Cell Free DNA Collection Tubes, Roche
<https://sequencing.roche.com/en/products-solutions/by-category/sample-collection/cell-free-dna-collection-tube.html>