



AlphaLung EGFR

Scheda Tecnica

Prodotto/Servizio: AlphaLung EGFR
Codice prodotto: SQ 916.40.90
Adempimenti regolatori: IVDD 98/79/CE
N° Tests: 40

Destinazione d'uso - Impatto clinico

EGFR codifica per il recettore del fattore di crescita epidermico (EGF). La famiglia dell'EGFR include 4 differenti recettori di membrana indicati come HER1 (o EGFR propriamente detto), HER2, HER3 e HER4. Per ciascuno di questi 4 recettori si identifica un dominio extracellulare, una porzione transmembrana e un dominio intracellulare. Il dominio extracellulare interagisce con uno specifico ligando. L'unico recettore per il quale il ligando non è noto, e per tale motivo viene definito orfano, è HER2. Con la sola eccezione di HER3, il dominio intracellulare è dotato di attività tirosin-chinasica. Il legame tra ligando e il dominio extracellulare del recettore induce la formazione di un omodimero, cioè del legame di un recettore con un recettore dello stesso tipo (es. EGFR con EGFR) o di un eterodimero, ovvero il legame di un recettore con un altro della stessa famiglia (es. EGFR con HER2). Una volta legatosi allo specifico ligando e una volta formato un omodimero o un eterodimero, il recettore è pronto ad attivare una cascata di eventi, che in ultimo porta a due principali conseguenze: la stimolazione della proliferazione cellulare, dovuta all'attivazione di RAS-RAF-MAPK e il blocco del processo di morte cellulare programmata noto come apoptosi, mediante l'attivazione di PI3KCA-AKT.

Il segnale trasmesso dall'attivazione del recettore per il fattore di crescita epidermico (EGFR) è coinvolto nella regolazione di importanti processi biologici tra cui la proliferazione cellulare, l'apoptosi, l'angiogenesi e la capacità di invasione. Una volta attivato, il complesso ligando-recettore viene internalizzato e degradato o riciclato alla membrana cellulare. EGFR è l'unico membro della famiglia che anche se sottoposto ad internalizzazione, dopo il legame con il ligando, può continuare a stimolare la trasduzione del segnale.

Nei tumori polmonari, l'EGFR può essere iperespresso, amplificato o mutato. L'espressione o iperespressione di EGFR si riscontra in circa l'80% dei NSCLC (non small cell lung cancer) e il potenziale effetto prognostico di tale evento rimane controverso. Tuttavia, una metanalisi condotta su un numero complessivo di 2972 pazienti con NSCLC ha dimostrato come l'espressione di EGFR sia maggiore nei carcinomi squamosi rispetto agli adenocarcinomi e non si associ ad una prognosi peggiore.

Il rilevante ruolo biologico insieme alla frequente deregolazione riscontrata in vari tumori, incluso il NSCLC, fanno sì che l'EGFR sia un ideale bersaglio terapeutico. L'EGFR può essere bloccato mediante l'impiego di anticorpi monoclonali che agiscono legandosi al dominio extracellulare del recettore, o mediante piccole molecole che interferiscono con l'attività tirosin-chinasica del dominio intracellulare (EGFR-TKI). Tra gli anticorpi monoclonali quello maggiormente studiato è cetuximab, un anticorpo chimerico che blocca il dominio extracellulare dell'EGFR. Gli EGFR-TKI sono piccole molecole che interferiscono con l'attività tirosin-chinasica dell'EGFR. Si distinguono due principali classi: gli inibitori reversibili e gli inibitori irreversibili. Tra gli inibitori reversibili uno dei farmaci maggiormente studiati è gefitinib, un'anilinoquinazolina che inibisce in modo reversibile la fosforilazione del dominio intracellulare dell'EGFR. Sin dalla loro identificazione, avvenuta nel

2004, le mutazioni di EGFR si sono rivelate il più importante fattore predittivo per la risposta agli EGFR-TKI. I primi studi hanno dimostrato che le mutazioni di EGFR sono somatiche e si osservano più comunemente in pazienti con le caratteristiche cliniche predittive per la sensibilità a gefitinib, ovvero nei non fumatori, nelle donne, negli adenocarcinomi e nei pazienti asiatici (3,4). La delezione nell'esone 19 e la sostituzione L858R nell'esone 21 rappresentano le più comuni mutazioni e insieme costituiscono circa l'85% di tutte le mutazioni di EGFR. Tali mutazioni aumentano la sensibilità agli EGFR-TKI molto probabilmente inducendo modificazioni del sito di legame con l'ATP nel dominio tirosin-chinasico. Il metodo più comunemente utilizzato per identificare la presenza di mutazioni di EGFR è il sequenziamento diretto degli esoni esoni 18-19-20-21.

Principio del metodo

Il kit AlphaLung EGFR è un dispositivo diagnostico in vitro che ha lo scopo di valutare la sequenza del gene EGFR come indicatori della risposta di tumori, incluso il NSCLC (non small cell lung cancer) al trattamento con inibitori di EGFR (EGFR TKI) (gefitinib e erlotinib). Il kit permette l'identificazione di tutte le mutazioni presenti a carico degli esoni 18-19-20-21 del gene EGFR.

Il protocollo prevede un'estrazione del DNA tumorale da: tessuti fissati in formalina e incluse in paraffina, citologici colorati su vetro. Seguono 4 PCR per ogni campione testato con enzimi ad alta fedeltà. Infine si trattano gli amplificati con ExoSAP per la marcatura. Il kit non fornisce il necessario per procedere alla marcatura e caricamento su sequenziatore automatico di prima generazione (Sanger).

Strumentazione

Sequenziatore Automatico Beckman Coulter (CEQ2000XL, CEQ8000, CEQ8800) o Sequenziatore Automatico Applied Biosystems.

Limitazioni nell'uso del prodotto

Questo kit è utilizzabile esclusivamente per diagnosi in vitro. Il prodotto non può essere rivenduto alterandone il contenuto senza il consenso scritto da parte dell'azienda. Il prodotto deve essere utilizzato solo da personale specificamente istruito e formato sulle procedure diagnostiche in vitro.

In caso di temperature, quantità e condizioni diverse da quelle indicate nelle istruzioni d'uso, il test genera risultati non attendibili. E' necessario in questi casi ripetere il saggio.

I reagenti presenti in ogni kit sono da considerarsi un'unità indivisibile. Non frazionare o utilizzare reagenti appartenenti a kit o lotti diversi.

Gli acidi nucleici sono facilmente degradabili alle nucleasi presenti nell'ambiente e sulla pelle. Utilizzare sempre guanti, manicotti, camice e occhiali per evitare contaminazioni del campione da fluido biologico e di RNAsi e DNAsi.

Limitazioni del metodo

Il kit AlphaLung EGFR è stato ottimizzato per compiere 4 sedute da 10 campioni. Nel caso in cui si intenda procedere all'esecuzione del saggio con un numero di campioni inferiore, la quantità di reattivi prevista non sarà sufficiente per l'esecuzione di tutti i 40 test indicati.

Per evitare contaminazioni è consigliabile dividere la zona di estrazione, amplificazione e rivelazione in tre camere separate e utilizzare due set di micropipette tarate: uno per la fase di estrazione e l'altro per la fase di amplificazione.

Sensibilità analitica

Il limite di individuazione analitica (limite di sensibilità) del kit AlphaLung EGFR è di 20 cellule mutate su 100 cellule analizzate ed è strettamente dipendente dal sequenziatore automatico utilizzato.

Controllo di qualità

In accordo con il Sistema di Gestione della Qualità UNI EN ISO 13485:2012 dell'azienda, ogni lotto del kit AlphaLung EGFR è testato a fronte di specifiche predeterminate in modo da garantire la qualità del prodotto.

Tempistiche del saggio

PCR ad alta fedeltà: 2 ore

Trattamento con ExoSAP: 1 ora

Totale: 3 ore

Nota 1: Le tempistiche descritte escludono il processo di estrazione

Nota 2: Il tempo indicato si riferisce al processamento di un singolo campione

Nota 3: La tempistica del saggio dipende dal numero di campioni da processare

AlphaGenetics Biotech

AREA Science Park- Basovizza
Edificio Q1- Statale 14 Km 169,5
34149 Trieste

Tel: +390403755682- Fax: +390403755681

Email: info@alphageneticsbiotech.com

P.I.C.F 01251340327