



Linfoma a cellule B:
Paragone tra due metodiche
di Biologia Molecolare per
una diagnosi più efficace

Linda Olsson

Scuola Superiore Medico Tecnica

Locarno

Anno 2008/09

Lavoro di Diploma eseguito presso:
Laboratorio di Diagnostica Molecolare
dell'Istituto Cantonale di Patologia
Locarno

Responsabile: **Dr. Milo Frattini**

Indice

- Riassunto/Abstract..... Pag. 3
- Scopo del lavoro..... Pag. 4
- Introduzione..... Pag. 5
- Pazienti materiali e metodi..... Pag. 8
 - i. Casistica campioni..... Pag. 8
 - ii. Materiale e metodi..... Pag. 9
 - a) Estrazione DNA da paraffina..... Pag. 9
 - b) Amplificazione mediante PCR..... Pag. 11
 - c) PCR *KRAS*..... Pag. 12
 - d) Preparazione gel d'agarosio 1,8% e visualizzazione PCR *KRAS*..... Pag. 13
 - e) PCR per linfoma a cellule B metodica LDM-ICP..... Pag. 15
 - f) PCR per linfoma a cellule B metodica BIRD..... Pag. 16
 - g) Analisi dei frammenti..... Pag. 17
- Risultati..... Pag. 20
 - i. Falsi negativi..... Pag. 20
 - ii. Positivi certi..... Pag. 20
 - iii. Negativi certi..... Pag. 21
 - iv. Non analizzabili..... Pag. 22
- Osservazioni..... Pag. 24
- Conclusioni..... Pag. 25
- Ringraziamenti..... Pag. 27
- Bibliografia..... Pag. 28
- Allegati..... Pag. 29
 - i. Registro tumori Ticino 2005. Alcuni dati epidemiologici del linfoma.. Pag. 29
 - ii. Diss et al, J Clin Pathol 1994;47:493-496..... Pag. 31
 - iii. Protocollo LDM-ICP Fr3-JH..... Pag. 35
 - iv. Protocollo LDM-ICP Fr2-JH..... Pag. 41
 - v. Protocollo ditta BIRD..... Pag. 47

Riassunto

Lo scopo di questo lavoro di diploma è stato quello di verificare, tramite tecniche di biologia molecolare, l'efficacia d'individuazione di linfomi a cellule B con una nuova metodica, registrata con marchio CE (Comunità Europea), della ditta BIRD (Biotechnologia Innovativa per Ricerca e Diagnostica, Dia-chem S.r.l. Napoli) per confronto con quella già utilizzata dal Laboratorio di Diagnostica Molecolare dell'Istituto cantonale di Patologia (ICP-LDM), la quale da un 30% di falsi negativi.

Durante la differenziazione, e dunque la maturazione dei linfociti a cellule B, avviene un processo chiamato riarrangiamento che permette la creazione di sequenze uniche di DNA per la codificazione delle immunoglobuline. Tali riarrangiamenti sono sfruttati come marker clonali nei linfomi a cellule B.

Entrambe sfruttano l'amplificazione di acidi nucleici mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) e l'analisi dei frammenti su sequenziatore.

La metodica utilizzata ora dal ICP-LDM si basa su due distinte PCR che amplificano due distinte regioni, e che originano due frammenti di lunghezza differente, mentre la metodica del Kit BIRD prevede una semi-nested-PCR, basata comunque sull'amplificazione di due distinte regioni.

Le regioni oggetto dell'amplificazione sono uguali tra i due metodi, anche se i primers ibridano in posizioni differenti.

L'analisi è stata condotta su un totale di 35 campioni biotipici fissati in formalina ed inclusi in paraffina così riportati: 11 campioni falsi negativi, 12 campioni positivi certi, 10 campioni negativi certi e 3 campioni non analizzabili.

Il Kit BIRD è riuscito ad identificare un unico campione in più rispetto alla metodica LDM-ICP, tuttavia ha anche dato 3 falsi positivi. In campioni negativi certi ha identificato picchi monoclonali; per di più i costi di un kit sono molto maggiori. Ciò ci ha indirizzati sul mantenimento della metodica attualmente in uso presso l'ICP-LDM, e poter affermare che è paragonabile, se non migliore, della metodica della ditta BIRD registrata CE.

Abstract

The Aim of this diploma work was to evaluate, with molecular biology techniques, a new method (European Union registered) from the company BIRD (Biotechnology Innovation for Research and Diagnostics) for the detection of B cell monoclonality, in comparison with the method currently in use at the Laboratory of Molecular Diagnostics of the Institute of Pathology Locarno (LDM-ICP), which currently gives a false negative rate of 30%.

Normal lymphoid cells undergo rearrangements causing specificity for the immunoglobulin that they produce. Monoclonal proliferations are presumed to be neoplastic; polyclonal populations are not.

Both methods use amplification of nuclear acid with Polymerase chain reaction (PCR) and analysis of fragments with automated DNA sequencing

LDM-ICP method use 2 PCR instead of the BIRD method use 2 semi-nested-PCR.

Both amplified the same regions, (framework 2 to joining region [Fr2/JH] and framework 3 to joining region [Fr3/JH]) but use different primers.

The study was carried out on 36 tissue samples fixed in formalin and wax embedded 6-7 section 3 μ m. They were divided into 4 classes: 12 false negative samples, B cell Lymphomas in histology analysis but without monoclonal rearrangements of IgH; 11 true Positive samples, B cell Lymphomas in histology and molecular analysis; 12 true negative samples, T cell Lymphomas or inflammations and 3 not analysable samples, in this sample the DNA was too fragmented for LDM-ICP method.

The kit BIRD detected only one sample of true cell B lymphoma more than method LDM-

ICP; however it also produced 3 false positives, that is monoclonality in samples with T cell Lymphomas or inflammations.

Both significantly higher costs and other increased problems associated with the kit in comparison with the older method led to the decision to maintain the LDM-ICP method and affirm that it is comparable or better than the BIRD method.