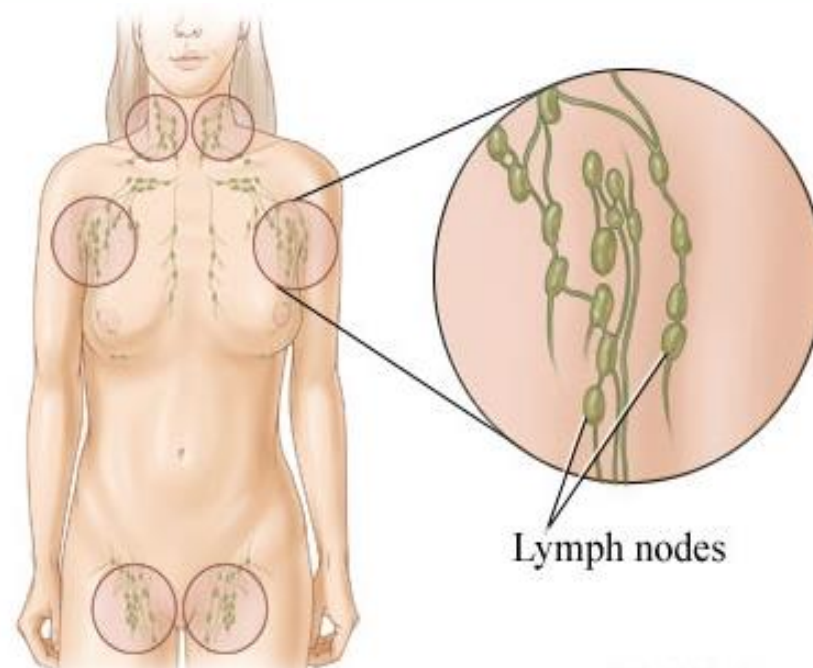


11.-12. NOVEMBER 2022
XXVIII. MARTINSKÝ BIOPTICKÝ SEMINÁR SD-IAP
HOTEL VICTORIA, MARTIN

PEROPERAČNÉ VYŠETRENIE
SENTINELOVÝCH LYMFATICKÝCH UZLÍN
METÓDOU OSNA,
NAŠE PRVÉ SKÚSENOSTI

Iveta Mečiarová



PEROPERAČNÉ VYŠETRENIE SENTINELOVÝCH LU

Štandardné vyšetrenie axilárnych LU u väčšiny pacientiek v kategórii cN0

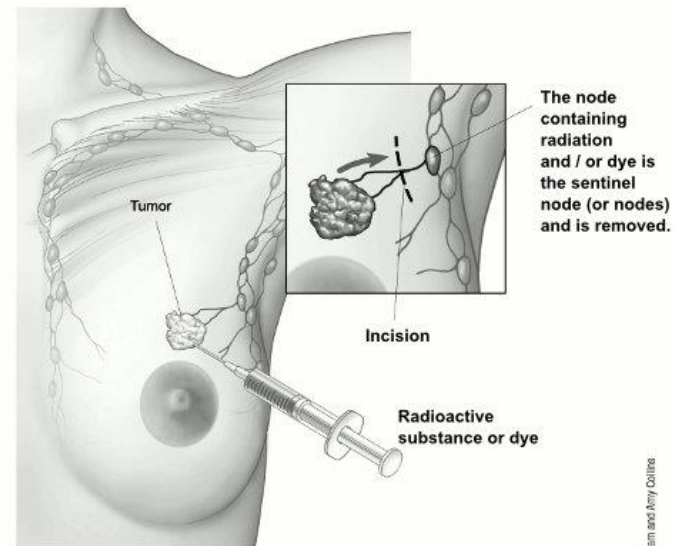
Indikácie:

- Štádium T1 – T2 invazívneho karcinómu s klinicky negatívnou axilou
- DCIS vyžadujúci mastektómiu alebo DCIS so suspektnou alebo dokázanou mikroinváziou
- Pacienti po neoadjuvantnej chts klinicky negatívnou axilou

SLNB je možná aj u selektovaných pacientov:

- S multicentrickým karcinómom
- V istých prípadoch T3 štádia
- V tehotenstve

SLNB nie je indikovaná pri inflamatórnom karcinóme



Sentinel lymph node biopsy

PROCES SLNB

Vyšetrenie:

- predoperačné označenie (isosulfánovou modrou, rádiokolloidom, magneticky, nanopartikulami)
- peroperačná detekcia (vizualizáciou alebo špeciálnou sondou)

Zvyčajný počet SLN je 1-3, medián 2

Presnosť stagingu nezvyšuje počet SLN viac ako 3-4

LU odoslané na pracovisko patológie

Okamžité spracovanie

- sériové rezy, odtlačková cytológia



SLNB

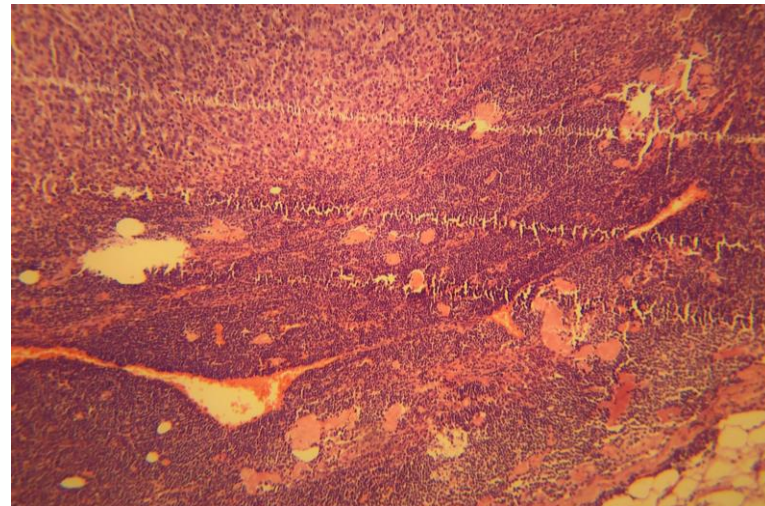
Pri použití štandardných protokolov SLNB identifikované u >95% indikovaných pacientov

Falošná negativita – 5%-10% LN pozitívnych pacientov

Iné štúdie: 10-55%

Riziko dodatočnej axilárnej disekcie

Axilárna lokorecidíva u SLN negatívnych pacientov okolo 1 % - opäť sa % líši – v niektorých štúdiách 10% aj viac



OSNA - ONE-STEP NUCLEIC ACID AMPLIFICATION

- Zavedená metóda, ktorá sa už roky používa rutinne na analýzu LU pri karcinóme prsníka
- Používa sa aj pri iných typoch karcinómov - ca hrubého čreva, pľúc, žalúdka, endometria, krčka maternice a prostaty
- Množstvo štúdií a meta analýz porovnávajúcich konvenčnú SLNB s OSNA metódou (>100)
- Presné stanovenie nádorovej nálože v LU pomáha optimalizácii operačného postupu

PEROPERAČNÁ DETEKČIA METASTÁZ V SENTINELOVÝCH UZLINÁCH METÓDOU OSNA

ONE-STEP NUCLEIC ACID AMPLIFICATION (OSNA)

- OSNA je automatizovaný molekulárny diagnostický test
Využíva technológiu rýchlej amplifikácie nukleovej kyseliny (RT-LAMP)
Detekcia a kvantifikácia mRNA CK19 (nádorový marker) v chirurgicky odstránených lymfatických uzlinách (pri ich pozitivite)
Umožňuje citlivú a presnú detekciu metastáz
Množstvo expresie CK19 mRNA koreluje s veľkosťou metastatických ložísk v LU
Jasne definuje metastatickú nádorovú záťaž v lymfatických uzlinách



NÁŠ PROJEKT – CIELE

- **PLÁN: VYŠETRIŤ 20 PACIENTOV METÓDOU FS A PARALELNE AJ METÓDOU OSNA**
- **POROVNAŤ CITLIVOSŤ VYŠETRENIA SLN KONVENČNÝM HISTOPATOLOGICKÝM VYŠETRENÍM A METÓDOU OSNA**
- **URČIŤ MIERU ZHODY**
- **EVENT PLUSY / MÍNUSY METÓDY OSNA VS KLASICKÉ “FROZEN” VYŠETRENIE**

DETAŠOVANÉ PRACOVISKO V RUŽINOVE

Štúdie porovnávali vyšetrenie na stovkách pacientov

Náš plán – vyskúšať a porovnať metódu na súbore 20 pacientov

Povinné zaškolenie laborantiek a patológa

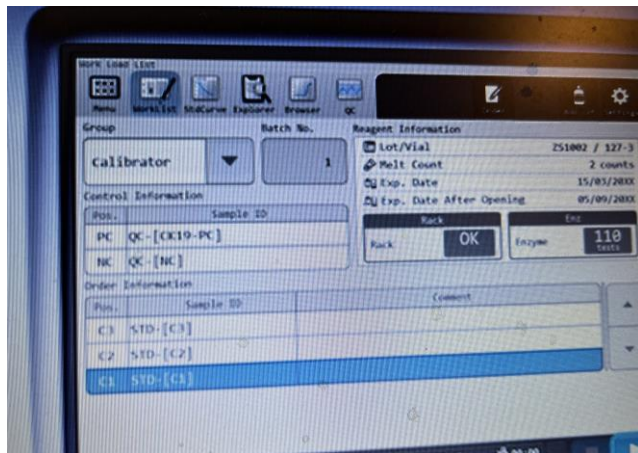
Bez štatistického vyhodnotenia

Provizórne podmienky



NUTNÁ KALIBRÁCIA A VALIDÁCIA KAŽDÝ DEŇ – PRED ZAHÁJENÍM VYŠETRENIA

KAŽDÉ VYŠETRENIE BEŽÍ S POZITÍVNOU A NEGATÍVNOU KONTROLOU

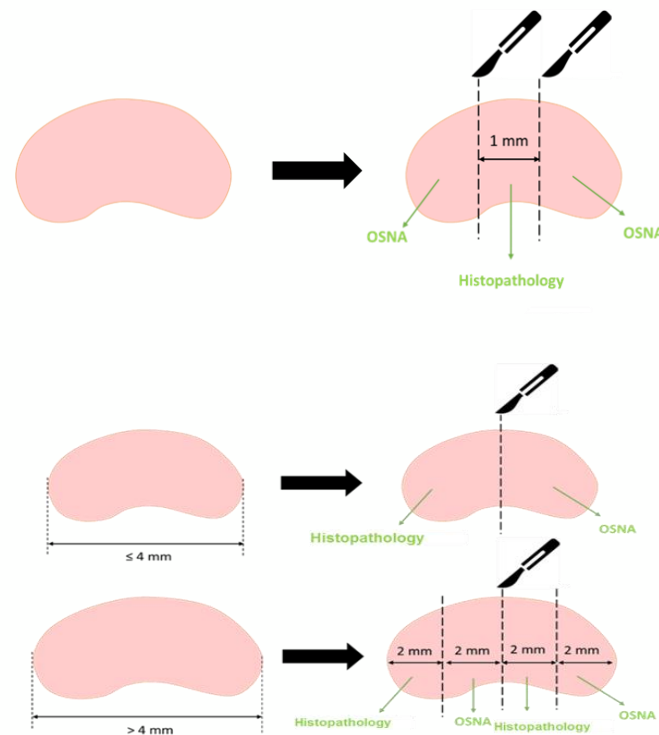


PROCES OSNA

- OSNA SA VYKONÁVA NA NATÍVNYCH VZORKÁCH LYMFATICKÝCH UZLÍN
- VZORKY MUSIA BYŤ CHLADENÉ / MRAZENÉ
- MARKER JE mRNA CYTOKERATÍNU 19, KTORÝ JE PRÍTOMNÝ V POZITÍVNYCH LU

SPRACOVANIE LU

- Odobraté SLN sa musia okamžite schladiť (2 až 8 ° C), resp. uložiť na ľade (0 až 4 ° C) bez sušenia, aby sa zabránilo degradácii RNA
- Odporúčaná doba prepravy medzi chirurgickým zákrokom a laboratóriom je do 15 minút
- Paralelné spracovanie na konvenčnou SLNB a OSNA – obrázok
- Hmotnosť lymfatických uzlín pre homogenizáciu musí byť v rozmedzí od 25 do 600 mg, pri vyššej hmotnosti nutné uzliny rozdeliť na viac čiastkových vzoriek



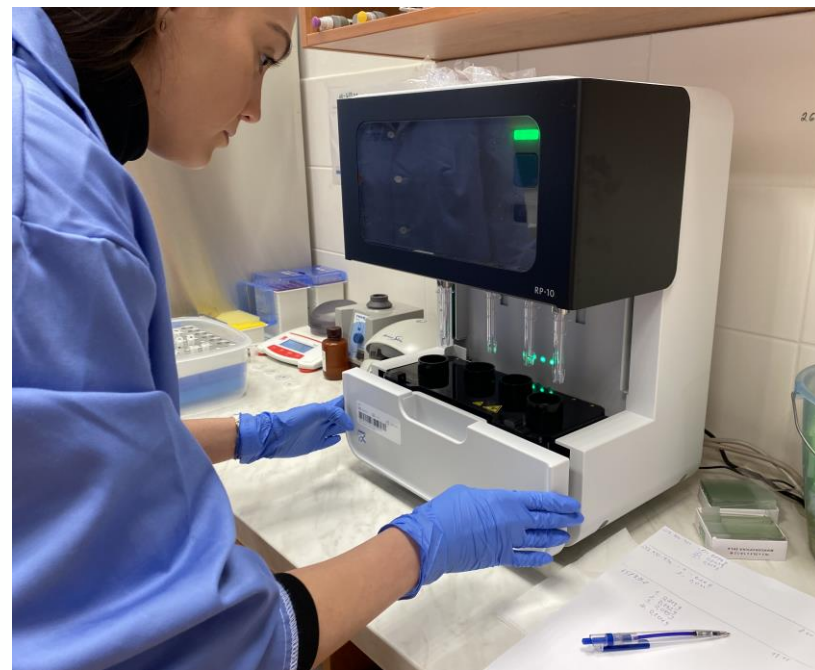
NAŠE PODMIENKY

- Transport v uzavretej nádobe uloženej v ľade - každá LU v samostatnej nádobe
- Excidácia na ľade (použili sme ľadové sety zabalené vo vymieňateľnom papieri na pečenie)
- Nutné!!! Použitie jednorázových setov inštrumentov na každú jednu LU
- Rovnako jednorázová podložka, výmena rukavíc po každej LU
 - metóda je citlivá, vysoké riziko kontaminácie



SPRACOVANIE V ZARIADENÍ OSNA

- Chladené/mrazené vzorky sú homogenizované v 4 ml lyzačného pufra
- Následne sa centrifugujú, pipetuje sa relevantná časť
- Nasleduje amplifikácia mRNA cytokeratínu 19 (priamo z lyzátu) izotermickou „loop-mediated“ amplifikáciou s reverznou transkripciou (RT-LAMP) v **RD-210**
- Automatizované procesy



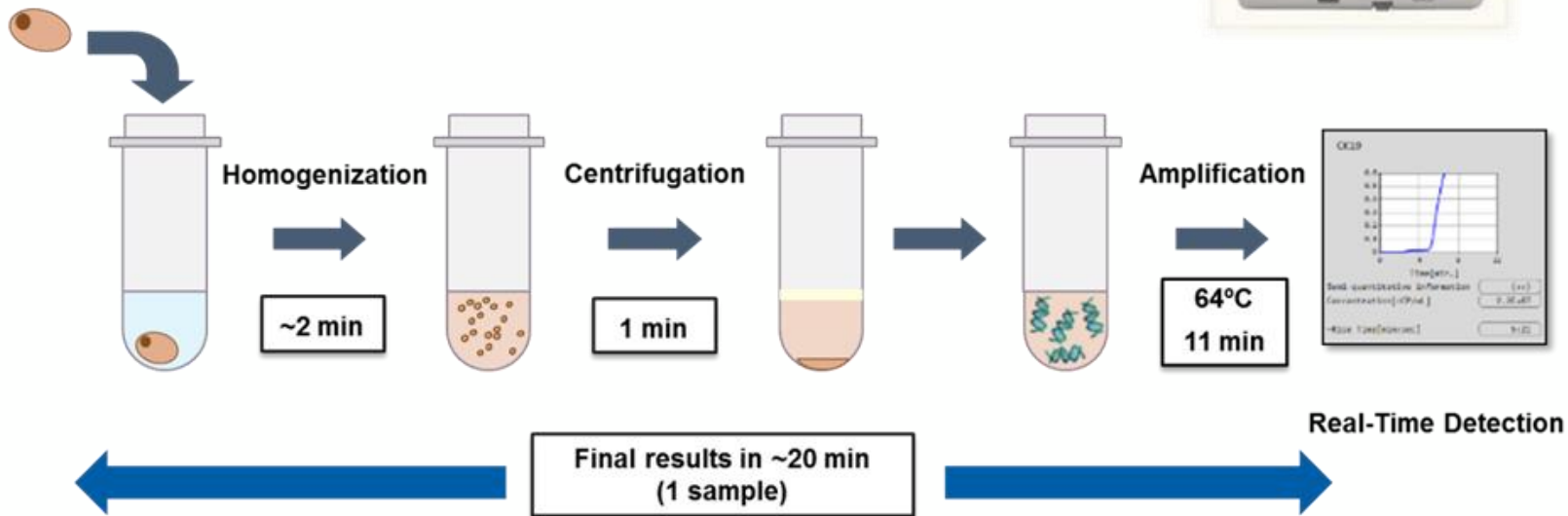
LYNORHAG™



LYNOAMP CK19E™

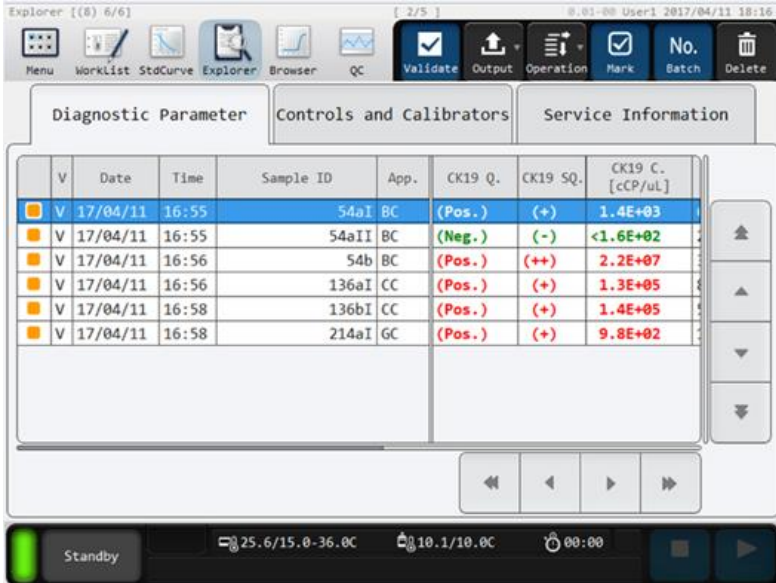


RD-210



VYHODNOTENIE

- LU definované ako „negatívne“ alebo „pozitívne“ podľa stanovených medzných hodnôt
- Ako **negatívne** uzliny klasifikované ako menej ako 250 kópií CK19 mRNA / μ l
- Ako pozitívne na **mikrometastázy (+)** vykazujú hladiny 250 - 4 999 kópií CK19 mRNA / μ l
- LU s **makrometastázami (++)** vykazujú >5 000 kópií CK19 mRNA / μ l
- Na obrázku príklad tabuľky výsledkov



The screenshot shows a software interface with a table of diagnostic results. The table has columns for V, Date, Time, Sample ID, App., CK19 Q., CK19 SQ., and CK19 C. [cCP/uL]. The results are as follows:

| V | Date | Time | Sample ID | App. | CK19 Q. | CK19 SQ. | CK19 C. [cCP/uL] |
|---|----------|-------|-----------|------|---------|----------|------------------|
| V | 17/04/11 | 16:55 | 54aI | BC | (Pos.) | (+) | 1.4E+03 |
| V | 17/04/11 | 16:55 | 54aII | BC | (Neg.) | (-) | <1.6E+02 |
| V | 17/04/11 | 16:56 | 54b | BC | (Pos.) | (++) | 2.2E+07 |
| V | 17/04/11 | 16:56 | 136aI | CC | (Pos.) | (+) | 1.3E+05 |
| V | 17/04/11 | 16:58 | 136bI | CC | (Pos.) | (+) | 1.4E+05 |
| V | 17/04/11 | 16:58 | 214aI | GC | (Pos.) | (+) | 9.8E+02 |

The interface also includes a menu bar with options like Menu, Worklist, StoCurve, Explorer, Browser, QC, Validate, Output, Operation, Mark, Batch, and Delete. At the bottom, there is a status bar with a Standby indicator, a signal strength icon, and the text '25.6/15.0-36.0C', '10.1/10.0C', and '00:00'.

| číslo biopsie | vek | typ tumoru | GR | veľkosť tumoru | typ operácie | SLN počet | výsledok FS | výsledok OSNA | definitívny stav LU | definitívny stage TNM | molekulárna klasifikácia | STAGE |
|---------------|-----|------------|----|----------------|--------------|-----------|--------------------|------------------------|--|-----------------------|--------------------------|-------|
| 558721 | 75 | M-8480/32 | 2 | 28 mm | QE | 3 | negat | negat | negat | pT2 pN0(sn) MX | luminálny A | II A |
| 558736 | 72 | M-8500/33 | 3 | 16 mm | QE | 2 | negat | negat | negat | pT1c(m) pN0(sn) MX | luminálny B | I A |
| 558738 | 75 | M-8500/32 | 2 | 28 mm | QE | 4 | negat | negat | negat | pT2 pN0(sn) MX | luminálny A | II A |
| 558740 | 41 | M-8500/33 | 3 | 10 mm | SE | 3 | negat | 1 pozit ++ | 1 pozit mikromts (1,017 mm) | pT1b pN1mi(sn) MX | HER-2 pozitívny | I B |
| 558810 | 42 | M-8500/33 | 3 | 35 mm | ME | 3 | negat | negat | negat | pT2(m) pN0(sn) MX | TNBC | II A |
| 560219 | 42 | M-8500/31 | 1 | 19 mm | SE | 6 | negat | negat | negat | pT1c pN0(sn) MX | luminálny A | I A |
| 563512 | 43 | M-8520/32 | 2 | 50 mm | ME | 5 | 3 pozit - makromts | 3 pozit - makromts | AE ďalších 17 LU-negat, 3 pozit SLN - makromts | pT2 pN1a MX | luminálny A | II B |
| 565938 | 67 | M-8480/32 | 2 | 30 mm | SE | 4 | negat | negat | negat | pT2 pN0(sn) MX | luminálny A | II A |
| 566764 | 49 | M-8500/33 | 3 | 30 mm | QE | 4 | 1 s mikromts | 1 pozit s mikromts (+) | definitívne 6 LU, 1 s mikromts, dodatočná LU s makromts (4 mm) | pT2 pN1a MX | luminálny B | II B |
| 566766 | 32 | M-8500/33 | 3 | 25 mm | QE | 6 | 4 s makromts | 5 s makromts | 6 s makromts, AE ďalších 16 LU, 4 s mts. | pT2 pN2a MX | luminálny B | IIIA |
| 567697 | 59 | M-8500/32 | 2 | 4 mm | QE | 2 | negat | negat | negat | pT1a pN0(sn) MX | luminálny A | I A |
| 567699 | 69 | M-8500/33 | 3 | 13 mm | SE | 2 | negat | negat | negat | pT1c pN0(sn) MX | luminálny B | I A |
| 580184 | 40 | M-8500/32 | 2 | 14 mm | ME | 6 | negat | negat | negat | pT1c(m) pN0(sn) MX | luminálny A | I A |
| 580186 | 46 | M-8500/33 | 3 | 40 mm | QE | 5 | negat | negat | negat | pT2 pN0(sn) MX | luminálny B | II A |

NAŠE VÝSTUPY

- BEZ ŠTATISTICKÉHO SPRACOVANIA
- Súbor 16 pacientov
- **Zhoda u 14**
- **1 pac vylúčená – kontaminácia**
- **1 pac nezhoda, dodatočne v paraf bl mikromts**

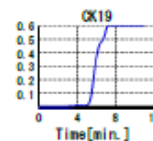
Kontaminácia:

- Nutná výmena sady inštrumentov, rukavíc aj podložky
- Po každej jednej spracovanej LU

Batch No. 2 Lot No. ZS1015 RD-210 rd

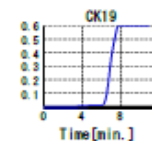
Establishment :
 Department/ Division :
 Responsible Person :
 Samples Tested By :

Sample ID 560217-1 App. BC
 Date/Time 2022/04/26 09:49:13
 Comment



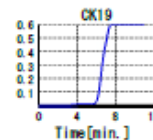
Qualitative (Pos.)
 Semi-quantitative (++)
 Conc. [cCP/uL] 4. 2E+06
 ~Time[min:sec] 5:29

Sample ID 560217-2 App. BC
 Date/Time 2022/04/26 09:49:13
 Comment



Qualitative (Pos.)
 Semi-quantitative (+)
 Conc. [cCP/uL] 1. 8E+03
 ~Time[min:sec] 6:35

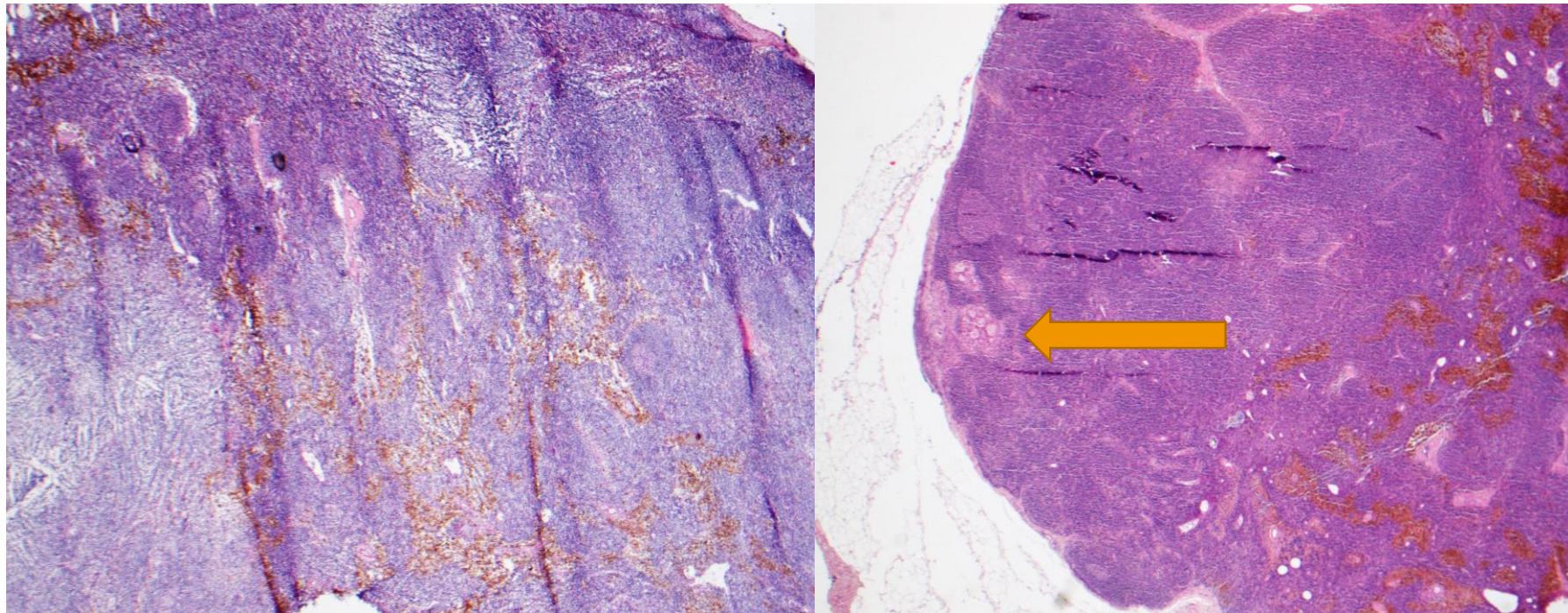
Sample ID 560217-3 App. BC
 Date/Time 2022/04/26 09:50:44
 Comment

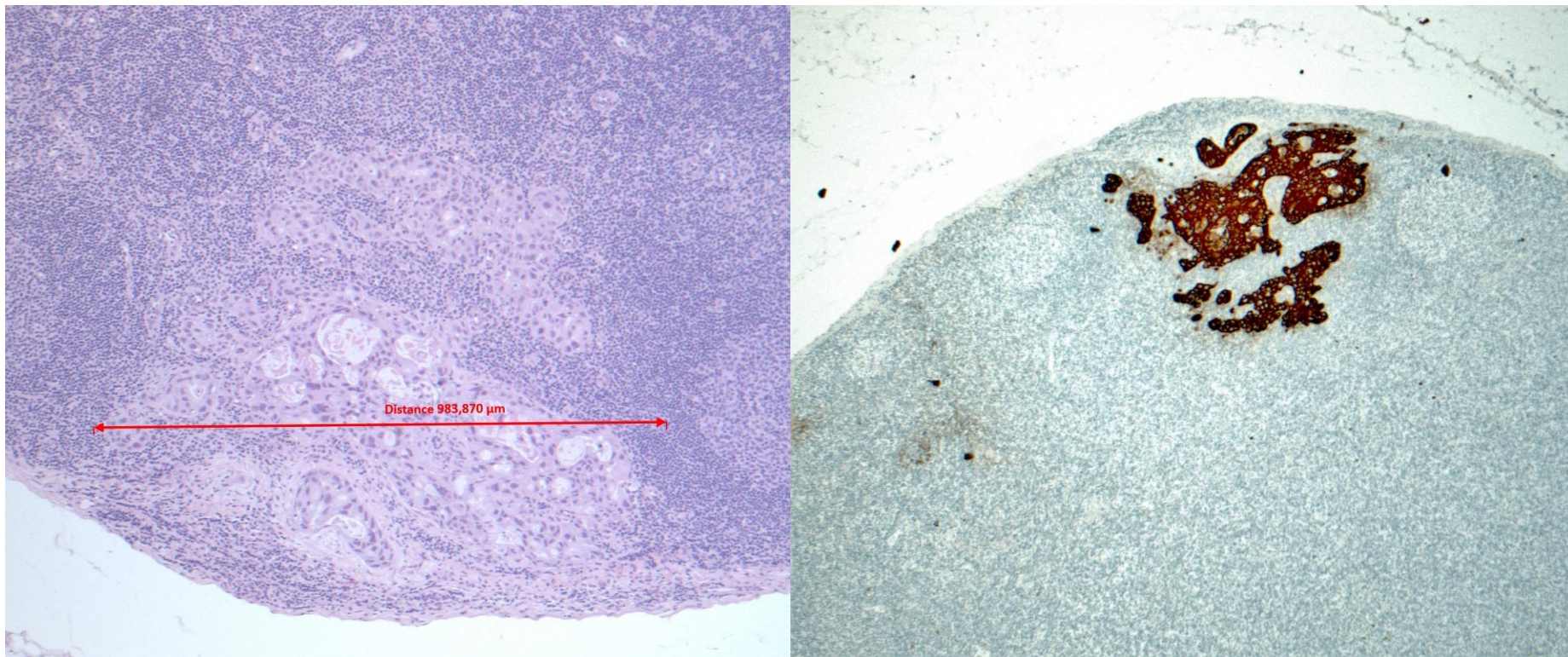


Qualitative (Pos.)
 Semi-quantitative (++)
 Conc. [cCP/uL] 1. 3E+04
 ~Time[min:sec] 6:17

**Prípud
 kontaminácie**

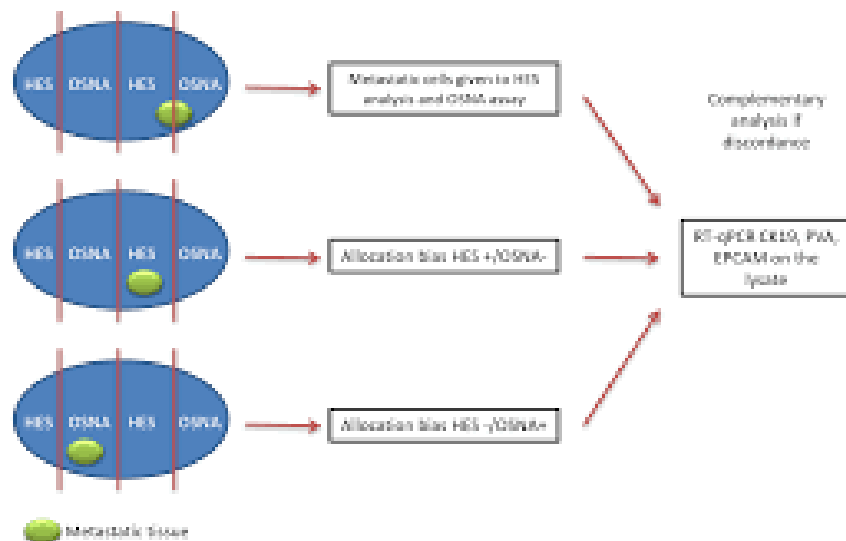
PRÍPAD NEZHODY





PRAVDEPODOBNÝ DÔVOD NEZHODY

- Skreslenie „tissue allocation bias“
- Rôzne rezy tej istej lymfatickej uzliny sa analyzujú pomocou dvoch rôznych prístupov, mohlo by sa stať, že metastázy sú prítomné v jednom reze, ale nie v druhom
- Nestalo by sa pri kompletnom vyšetrení OSNA metódou



TURNAROUND TIME

Odhadovaný 40 – 50 min / pacienta

Skreslený paralelným spracovaním na FS

SLN neboli chirurgom odpreparované, ale väčšinou v množstve tukového tkaniva

Po viacerých procedúrach/ten istý deň resp týždeň, sa zlepšovala technika aj celkový workflow a TAT sa znižoval



KALKULÁCIA CENY VYŠETRENIA

Špecifické reagensie a spotrebný materiál

Generický spotrebný materiál

Celková suma: 7 286,89 € / 20 pacientov

Reálne cca 300-350€ / 1 pac

Pri bezplatnom poskytnutí zariadenia



Senzitívna a špecifická
metóda

Menej falošne negatívnych
výsledkov zo SLNB

Objektívne vyhodnotenie

Nehrozí zle hodnotiteľné
spracovanie

Záznam je uložený

Spracovanie je náročnejšie

Vyvarovať sa kontaminácii

Dlhší TAT

Nemožnosť histologického

vyšetrenia a príp. ďalšieho IHC z LU

Nemožnosť archivácie bloku

Cena

DOTERAJŠIE SKÚSENOSTI A PLÁNY

Ide o vysoko senzitivnu a špecifickú metódu

Možnosť intraoperatívnej jednoznačnej detekcie stavu SLN

Presné informácia o nádorovej náloži v SLN

Intraoperatívne správne rozhodnutie o ďalšom postupe a príp. ALNB

Náročnejšia manipulácia, nároky na laborantov

Problematický TAT

Otázka zaradenia ako validovanej metódy v rámci vyšetrenia SLNB

Otázka hradenia ZP???

Na exaktnú detekciu SLN vhodné/potrebné spracovať metódou celú SLN

Pokračujeme súborom ďalších 20 pacientov

O skúsenosti sa radi podelíme



*ONE-STEP NUCLEIC ACID AMPLIFICATION ASSAY IS AN ACCURATE
TECHNIQUE FOR SENTINEL LYMPH NODE BIOPSY OF BREAST
CANCER PATIENTS: A **META-ANALYSIS***

- [Fang Shi,](#)
- [Qian Zhang,](#)
- [Zhenzhen Liang,](#)
- [Mengmeng Zhang](#) &
- [Xin Liu](#)

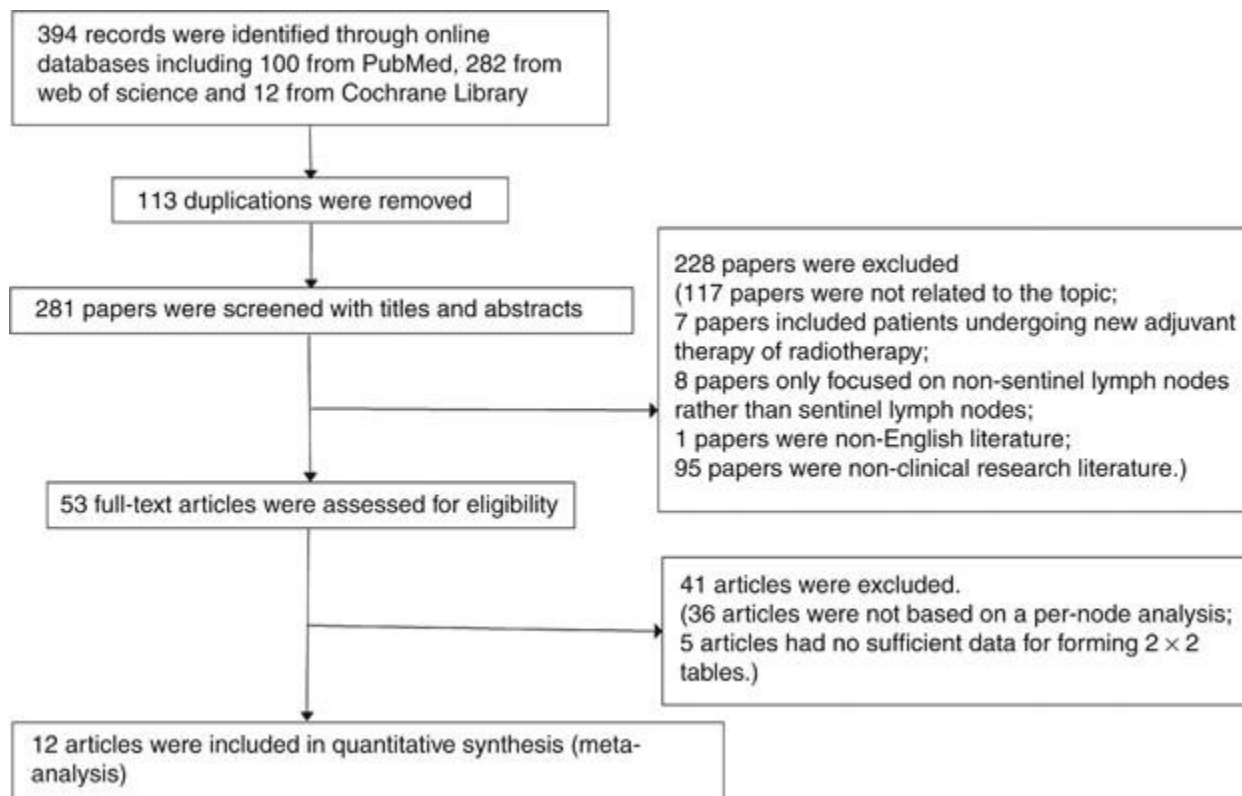
[British Journal of Cancer](#) volume 117, pages1185–1191 (2017)

Background:

To estimate the accuracy of one-step nucleic acid amplification (OSNA) assay as an intra-operative sentinel lymph node biopsy (SLNB) for sentinel lymph node (SLN) metastasis in breast cancer.

The inclusion criteria were as follows:

- (1) patients included in the studies were diagnosed with breast cancer
- (2) patients did not undergo any new adjuvant therapy or radiotherapy
- (3) the diagnostic purpose was to detect SLN metastasis
- (4) the specimens detected were fresh SLNs
- (5) the reference standard method for the detection of SLN metastasis was post-operative histopathology
- (6) the same patient was detected by OSNA and post-operative histopathology together
- (7) detailed method of post-operative histopathology was described in detail
- (8) data analysis of study was based on per-patient
- (9) extracted data were available for calculating true-positive, false-positive, false-negative, and true-negative values.

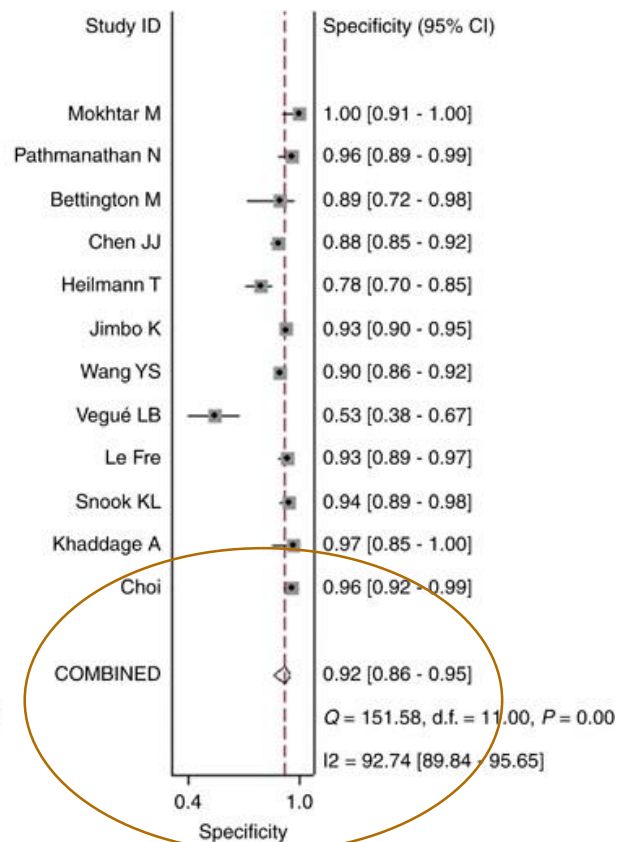
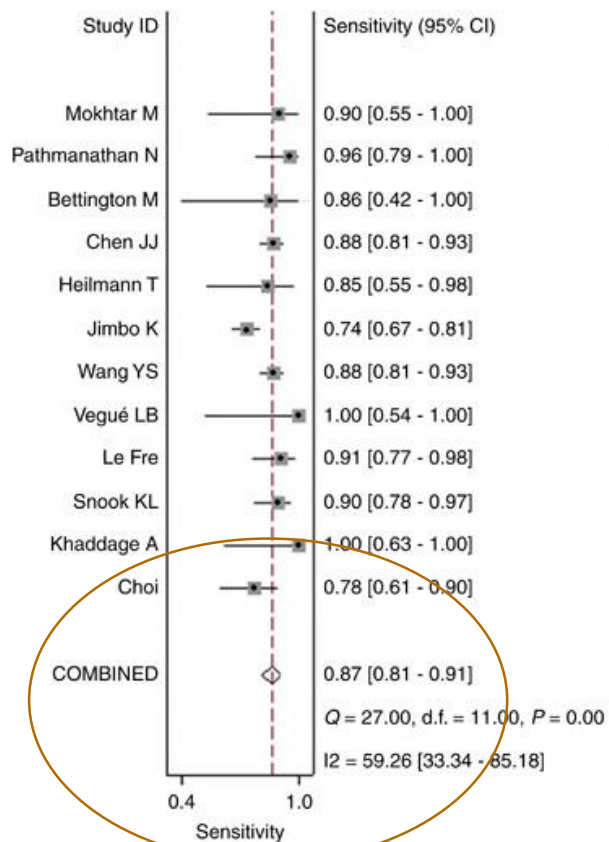


2833 patients with a mean sample size of 218 (range: 35–772) were included in this meta-analysis.

All studies **were designed by prospective methods**. There were two adopted approaches of reference pathology: the detection of formalin-fixed tissue sections with H&E staining (8/12), as well as combined detection of H&E and IHC (4/12). Among the four studies taken with IHC, three studies utilised IHC for CK19 while one utilised IHC for anti-cytokeratin antibody AE1 and AE3.

One whole node was commonly cut into four parts and divided equally between OSNA assay and pathology. The thicknesses of the slices used for pathological examination were mostly more than 1 mm, and the interval between the slices for pathological examination in most studies was 200 μm . Three studies adjusted the result for excluding TAB.

The **turnaround time** of OSNA assay for detecting one node was all **less than 40 min**.



However, no consistent conclusion has ever been made up to present. A meta-analysis based on a per-node analysis suggested the **sensitivity and specificity of OSNA is 0.87 and 0.98** ([Tiernan et al, 2014](#)), whereas the sensitivity of 0.85 and specificity of 0.92 were observed by Huxley N *et al* ([Huxley et al, 2015](#)); however, as Huxley N *et al* only included five studies based on per-patient analysis, the small number of included studies limited the quality of evidence.

This meta-analysis demonstrates that OSNA assay is a reliable and accurate diagnosis method for SLNs.

Discordant cases between OSNA and reference pathology are analysed in detail.

The false-positive results may be potentially **due to TAB**. TAB refers to a sample bias yielding because of the uneven distribution of metastatic foci throughout the node ([Chen et al, 2013](#)).

In all studies included in our meta-analysis, one whole node is divided into several alternate slices and a same slice cannot be detected by both OSNA assay and pathological examination; thus a TAB inevitably yields.

The false-negative results usually exist owing to low CK19 expression. CK19 is an epithelial marker highly expressed in up to approximately 98% of breast cancers, which means **approximately 2% of breast cancer patients lack CK19 expression**; moreover, certain subtypes such as metaplastic cancers, lobular cancers, luminal (ER+) cancers and triple-negative phenotype breast cancer are more prone to the lack of CK19 expression ([Abd El-Rehim et al, 2004](#); [Bettington et al, 2014](#)).

The **turnaround time** of OSNA assay was all **less than 40 min** for detecting one node and ranges from 50 to 62 min for detecting four nodes, demonstrating that OSNA assay can meet the time demand for rapid diagnosis of SLNs and can be incorporated into intra-operative clinical setting.

Moreover, the turnaround time can be reduced with an accumulating experience of technicians.

The **results of pathological examination depend on the subjective judgments of pathologist**, which means accuracy of results may be influenced by experience and expertise of pathologists ([Chen et al, 2013](#)). As OSNA assay quantitatively evaluates the number of CK19 mRNA copies and outcomes correlate well with the number of cancer cells in a node as well as **all procedure of OSNA follows a uniform protocol, the result is objective and repeatable**.

Although OSNA assay has many advantages, it still has some inherent limitations. One-step nucleic acid amplification assay **does not provide histological information**, such as extra capsular extension and occult pathology, which is associated with the patient's prognosis ([Bettington et al, 2014](#)).

In conclusion, **our meta-analysis** adds the evidence that OSNA assay is a rapid and accurate molecular method for intra-operatively detecting SLN metastasis in breast cancer.

One-step nucleic acid amplification assay can be introduced into routine clinical setting and replace FS as well as IC in intra-operative SLNB.

OSNA in Clinical Guidelines

OSNA is officially included in the guidelines in five countries and in European guidelines:

SPAIN:

BC →Oncoguía SEGO – Cáncer infiltrante de Mama 2017 – Guías de práctica clínica en cáncer ginecológico y mamario

This new version recommends the use of the TTL value provided by OSNA as a parameter for surgical decision – to perform an ALND YES or NO.

ITALY:

BC →The AIOM (Associazione Italiana Oncologia Medica) guidelines (2020):

“In some centers, a molecular method for the analysis of the entire sentinel lymph node tissue is currently used, i.e. One Step Nucleic Acid amplification (OSNA), which is based on the analysis of the presence of RNA for CK19 expressed electively by breast cancer. OSNA defines 3 diagnostic categories: OSNA-: negative lymph node with RNA levels attributable to isolated tumor cells; OSNA+: presence of micrometastases; OSNA++: presence of macrometastases. The diagnostic value of this test has been proven in some studies.”

FRANCE:

BC →Consensus Meeting St. Paul de Vence - 2015

11. The OSNA method is a valid alternative to the extemporaneous examination of the SLNs. (71% yes, jury; and 50% yes cours)

11a. The extemporaneous examination of the SLNs can replace the OSNA technique.

UK:

BC →NICE Guidance published beginning of August 2013

“Whole lymph node analysis using the RD-100i OSNA system is recommended as an option for detecting sentinel lymph node metastases in people with early invasive breast cancer who have a sentinel lymph node biopsy and in whom axillary lymph node dissection will be considered. The accuracy of histopathology in any setting could not be 100% because time and resources did not allow every slice of a node to be analysed for metastases. Whole node analysis should be fully implemented in local clinical practice to reduce the risk of tissue allocation bias.” Update in 2020 which includes the RD-210 system.

BC →The Royal College of Pathologists 2016

“Molecular techniques: Two molecular assays have been widely tested, but only one of these, one-step nucleic acid amplification (OSNA), is still commercially available.¹⁰ Conventional histology has excellent specificity, but may miss small metastases. OSNA has about 96% agreement with alternate slice histology. The OSNA assay was formally approved by NICE in August 2013.”

Europe:

BC→In the “European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis”, 4th Edition, Supplements. Review of the European Working Group in Breast Screening Pathology.

Komplikované – veľa podmienok a výnimiek

ĎAKUJEM ZA POZORNOST

