

GISCOR2014

Lo studio DNA fecale

Francesca Maria Carozzi
 Laboratorio HPV e Diagnostica Molecolare
 Laboratorio Prevenzione Oncologica
 ISPO – Firenze



GISCOR
 Reggio Emilia 13-14 Novembre 2014

La Biologia molecolare nello screening del colon-retto

Nonostante le evidenze esistenti sull'efficacia nella riduzione di mortalità per cancro colon-rettale di programmi di screening basati sul FOBT, è noto che almeno il 60% dei soggetti FOBT positivi risulta sostanzialmente negativo alla colonscopia di approfondimento.

- ➡ Un test di triage efficiente potrebbe evitare approfondimenti colonscopici, con una perdita minima di lesioni di alto grado.
- ➡ Screening Primario

F. Carozzi Giscor
 Reggio Emilia 13-14 Novembre 2014

DNA fecale

- Cellule tumorali di carcinomi colonrettali e di adenomi si possono ritrovare nelle feci e fornire un possibile utilizzo per l'identificazione precoce della neoplasia senza utilizzare tecniche invasive;
- Rispetto alla ricerca del sangue occulto nelle feci (FOBT), possono essere ipotizzati una serie di vantaggi teorici di questo tipo di approccio



- le cellule esfoliano continuamente nel lume intestinale (mentre per il sangue occulto si possono verificare sanguinamenti intermittenti);
- la neoplasia tende a esfoliare in quantità superiore rispetto alla mucosa normale e il DNA derivante dalle cellule tumorali ha alcune alterazioni caratteristiche che possono permettere di incrementare la specificità del test
- A causa della eterogeneità del cancro, nessun singolo marcatore molecolare ha una sensibilità ottimale, mentre combinazioni di diversi marcatori hanno consentito nei primi studi una elevata detection rate sia per CCR che per adenomi avanzati. Pannelli di biomarcatori significativi in analisi multiparametriche

F. Carozzi Giscor
 Reggio Emilia 13-14 Novembre 2014

DNA fecale criticità

- La percentuale di cellule tumorali che esfoliano nelle feci varia in base allo stadio del tumore, mediamente rappresentano circa l'1% di tutte le cellule esfoliate;
- In 2 grammi di feci sono presenti tra i 10 e i 1000 colonociti; considerando che il genoma di una cellula diploide pesa 0.0066 ng possiamo stimare di recuperare da 2 grammi di feci una quantità di DNA umano compresa tra 0.006 e 6.6 ng;
- Dalla letteratura emerge che il rapporto tra DNA umano e DNA totale estratto dalle feci è compreso tra 0.01-0.1%;
- Nei primi studi la ricerca di alterazioni molecolari è stata condotta su feci immediatamente congelate dopo la raccolta, ma questa procedura non è trasferibile in ambito di programmi di screening perché comporta che il campione sia consegnato al laboratorio in tempi molto brevi e necessariamente entro le 24 ore dalla raccolta.

Author (Ref) year	Controls	CRC	Sampling time	Detection method	Target gene	Sensitivity CRC	Specificity CRC	Sensitivity Advanced Adenomas	Specificity Advanced Adenomas
Almqvist DA et al () 2000	28	22	preoperative	PCR	K-ras, p53, APC, Bax-26, L-DNA	91%	100%	82%	93%
Kuipers ME et al () 2002	15	30	preoperative	PCR	APC, p53, DSS12	100%	97%	-	-
Callan D et al () 2003	38	53	preoperative	DOGESSCP	L-DNA, K-ras, p53, MSL, APC	11%	100%	-	-
Tagore KS et al () 2003	212	52	preoperative	PCR	K-ras, APC, p53, DIA, Bax-26	83%	96%	57%	96%
Impejale TP et al () 2004	1403	31	preoperative	PCR	p53, K-ras, APC, Bax-26, L-DNA	82%	94%	18%	94%
Leung WK et al () 2004	20	20	preoperative	PCR	ATM, APC, Hmh1, HLF, MGMT	70%	100%	-	-
Matsushita H et al () 2005	116	83	preoperative	PCR	APC, K-ras, p53, Bax-26	71%	88%	-	-
Kidner N et al () 2005	44	57	preoperative	PCR	APC, Bax-26, L-DNA	69%	91%	-	-
Holowitz SH et al () 2007	122	40	preoperative	MSP	DIA, HLF, Vimentin, K-ras, APC, p53, Bax-26	86%	82%	-	-
Wai K et al () 2007	30	20	preoperative	MSP	APC, ATM, MSH1, SFRP2, HLF, MGMT, GSTP1	73%	90%	63%	90%
Huang ZH et al () 2007	24	52	preoperative	MSP	SFRP2, HP1, MGMT	71%	96%	80%	96%
Almqvist DA et al () 2008	75	19	preoperative	PCR	K-ras, APC, p53, Bax-26, L-DNA	58%	84%	45%	94%
Koga Y et al () 2008	134	166	preoperative + postoperative	RT-PCR	CEA, MRP1, MIB2, PTGS2, qct3	58%	88%	-	-
Wang DR et al () 2008	30	69	preoperative + postoperative	MSP	SFRP2	62%	93%	62%	93%
Tang D et al () 2008	20	39	preoperative + postoperative	MSP	SFRP2	62%	80%	84%	80%
Blank YH et al () 2009	37	60	preoperative	MSP	Vimentin	73%	86%	45%	86%
Chang E et al () 2010	31	30	preoperative	MSP	SFRP2, p16, TSG4	70%	97%	86%	97%
Zhang J et al () 2011	30	60	preoperative	PCR (MSP)	TSP2, L-DNA	67%	83%	44%	83%

Impejale TP et al () 2014

N Engl J Med. 2014 Apr 3;370(14):1287-97. doi: 10.1056/NEJMoA1311984. Epub 2014 Mar 19.

Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening.

Impejale TP¹, Haenschel DE, Holowitz SH, Levin TR, Levin P, Liddiard GE, Ahlquist DS, Benzer BM

Table 1. Sensitivity and Specificity of the Multitarget Stool DNA Test and the Fecal Immunochemical Test (FIT) for the Most Advanced Findings on Colonoscopy.

Most Advanced Finding	Colonoscopy (N=9589)		Multitarget DNA Test (N=9689)		FIT (N=9589)	
	no.	%	Positive Results (95% CI)	%	Positive Results (95% CI)	%
Colorectal cancer						
Any	65	60	92.3 (83.0-97.5)	48	73.8 (61.5-84.0)	
Stage I to III ^a	60	56	93.3 (83.8-98.2)	44	73.3 (60.3-83.9)	
Colorectal cancer and high-grade dysplasia	104	87	83.7 (75.1-90.2)	66	63.5 (53.5-72.7)	
Advanced precancerous lesions ^b	757	321	42.4 (38.9-46.0)	180	23.8 (20.8-27.0)	
Nonadvanced adenoma	2893	498	17.2 (15.9-18.6)	220	7.6 (6.7-8.6)	
			Specificity (95% CI)		Specificity (95% CI)	
All nonadvanced adenomas, non-neoplastic findings, and negative results on colonoscopy	9167	1231	86.6 (85.9-87.2)	472	94.9 (94.4-95.3)	
Negative results on colonoscopy	4457	455	89.8 (88.9-90.7)	162	96.4 (95.8-96.9)	

^a These stages of colorectal cancer, as defined by the system recommended by the American Joint Committee on Cancer, are associated with an increased rate of cure.
^b Advanced precancerous lesions include advanced adenomas and sessile serrated polyps measuring 1 cm or more.

- **MLH1** promoter DNA hypermethylation
- **KRAS** gene DNA point mutations
- quantitative hemoglobin.

F. Carozzi Giscor
 Reggio Emilia 13-14 Novembre 2014

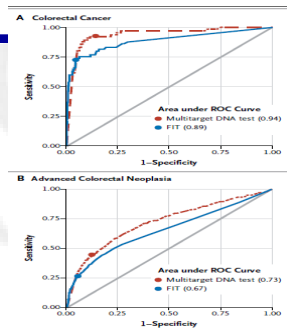


Figure 3. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curves Comparing DNA Testing and FIT for the Detection of Colorectal Cancer and Advanced Colorectal Neoplasia.

F. Carozzi Giscor

Reggio Emilia 13-14 Novembre 2014

Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening.

Imperiale TF¹, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Levin TR, Lavin P, Lidgard GP, Ahlquist OA, Rosner RM

Table 2. Positive and negative predictive values of multi-target stool DNA and fecal immunochemical test for colorectal cancer and advanced colorectal neoplasia*

Outcome	n of lesions / N of subjects	Positive Predictive Value (95% CI)		Negative Predictive Value (95% CI)	
		Multi-target stool DNA	Commercial FIT	Multi-target stool DNA	Commercial FIT
Colorectal cancer	65 / 9989	0.037 (0.029-0.048)	0.069 (0.051-0.090)	0.999 (0.998-1.00)	0.998 (0.997-0.999)
Advanced colorectal neoplasia*	822 / 9989	0.236 (0.216-0.256)	0.326 (0.291-0.362)	0.947 (0.942-0.952)	0.936 (0.931-0.941)

F. Carozzi Giscor

Reggio Emilia 13-14 Novembre 2014

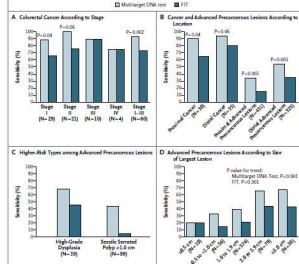


Figure 3. Sensitivity of the Multitarget Stool DNA Test and the Commercial Fecal Immunochemical Test (FIT), According to Subgroup.
 Shown are the sensitivities of the DNA test and FIT for the detection of colorectal cancer according to tumor stage (Panel A), for the detection of colorectal cancer and advanced neoplasia lesions according to the location in the colon (Panel B), and for the detection of higher risk adenomas among participants with advanced neoplasia lesions (Panel C) and according to lesion site (Panel D). The numbers in parentheses are the number of participants in each category. In Panel A, the stage of 1 of all colorectal cancers was not available. In Panel B, the location of 1 of 70 advanced neoplasia lesions was not available.

F. Carozzi Giscor

Reggio Emilia 13-14 Novembre 2014

EDITORIAL

Stool DNA and Colorectal-Cancer Screening

Giuseppe J. Giblin, M.D., M.P.H., and Joseph A. DiSanto, M.D., M.P.H.

- First, the number of participants who were excluded from the study because of problems with sample collection or assay application was far greater in the stool DNA group (689 participants, or 6.3% of the total number) than in the FIT group (34 participants, or 0.3%).
- Second, this study compared only the one-time expense of stool DNA testing as compared with FIT, it is unlikely that the test would be performed annually in the way that FIT testing is recommended.
- Third, an even more important issue may be related to the specificity of stool DNA testing. Roughly 10% of the cohort had a positive stool DNA result and entirely negative results on colonoscopy. This false positive rate is an important consideration when determining the appropriate interval for screening.
- Finally, Imperiale et al. evaluated stool DNA testing among participants who had complete data for all three screening tests. However, realworld effectiveness may be different, particularly given the higher technical failure rate with stool DNA testing. The importance of compliance to the effectiveness of screening was evidenced.

F. Carozzi Giscor

Reggio Emilia 13-14 Novembre 2014

Per valutare se la ricerca di alterazioni molecolari nel DNA fecale
 possa essere di ausilio agli attuali metodi di screening

1. Valutare il miglior sistema di raccolta delle feci per garantire la maggiore stabilità del campione;
2. Valutare metodi di estrazione in termini di resa di DNA;
3. Valutare la resa in DNA umano mediante real-time PCR;

F. Carozzi Giscor

Reggio Emilia 13-14 Novembre 2014

Valutazione stabilità materiale fecale per analisi molecolare

- Tutti i campioni di feci utilizzati sono stati raccolti da soggetti aderenti al programma di screening per il carcinoma del colon-retto con un risultato FOBT positivo e per questo invitati ad eseguire una colonoscopia.
- A tutti i pazienti che accettavano di aderire veniva fatto firmare il consenso informato e veniva consegnata una busta contenente le istruzioni ed i contenitori per la raccolta delle feci (un barattolo per la raccolta delle feci fresche, una provetta con tampone commerciale e una provetta con EDTA a diverse concentrazioni mM)
- Ai pazienti veniva chiesto di raccogliere le feci prima di iniziare la preparazione per la colonoscopia e di riportarle in laboratorio al più presto e tassativamente entro le 24 ore dalla raccolta.

F. Carozzi Giscor

Reggio Emilia 13-14 Novembre 2014

Valutazione metodi di conservazione del campione (2)

Per valutare la stabilità del campione nel tempo, per ciascun metodo di conservazione sono state preparate aliquote (giorno 0, giorno 1, giorno 2, giorno 3, giorno 5);

Dalle nostre analisi emerge che per i campioni di feci fresche, la quantità di DNA umano recuperabile nel campione al giorno 1 (dopo circa 30 ore dalla raccolta) si riduce notevolmente (mediamente di oltre il 50%) rispetto alla quantità di DNA umano misurata sui campioni congelati al giorno 0 (quindi entro 6 ore dalla raccolta);

Al giorno 0 la resa in DNA genomico del tampone EDTA 100 mM è del 278,91%, mentre quella del tampone commerciale è del 373,40%. Dati molto simili a quelli ottenuti da noi, sono stati ottenuti anche da Zou et al. che utilizza il tampone EDTA 100 mM e che ottiene una resa media del 121% al giorno 1, del 118% al giorno 2 e del 100% al giorno 3;

F.Carozzi Giscor

Reggio Emilia 13-14 Novembre 2014

VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DELL'USO DEI TAMPONI CONSERVANTI PER LA RACCOLTA E LA STABILIZZAZIONE DEL DNA FECALE

	ISPO			CHEN et al.		
	N°	Valori compresi tra:	media GE	N°	Valori compresi tra:	media GE
ADENO-CARCINOMI	15	68 - 108560	17259	94	32-3700	1014
NEGATIVI	134	1 - 58484	2515	198	33-18560	936

F.Carozzi Giscor

Reggio Emilia 13-14 Novembre 2014

"Prevenzione secondaria in oncologia: sviluppo dei modelli organizzativi, innovazione tecnologica e miglioramento della performance",

Attività E: DNA fecale
PI Francesca Carozzi ISPO

Valutazione di strategia di triage molecolare per i soggetti con FOBT di screening positivo per selezionare i pazienti ad alto rischio
Da inviare in colonscopia

Lo studio è stato condotto nel contesto dei programmi di screening di popolazione di Firenze, Milano e Torino

F.Carozzi Giscor

Reggio Emilia 13-14 Novembre 2014

Prevenzione secondaria in oncologia: sviluppo dei modelli organizzativi, innovazione tecnologica e miglioramento della performance", Attività E: DNA fecale

- I soggetti con esito positivo al test di screening sono contattati e informati della necessità di eseguire un approfondimento diagnostico mediante colonscopia totale.
- A questi soggetti è stato chiesto di raccogliere un campione di feci aggiuntivo per eseguire un test di DNA fecale prima di eseguire la colonscopia totale.
- Il protocollo dello studio è stato approvato dai Comitati Etici Locali dei tre centri partecipanti e ogni soggetto che ha accettato di aderire allo studio ha letto e sottoscritto un consenso informato.
- Sono stati inclusi nello studio solo i pazienti con colonscopia completata che hanno eseguito un campionamento adeguato per il test del DNA (cioè campione raccolto prima di iniziare ad assumere la preparazione per la colonscopia, riconsegnato in laboratorio e congelato entro le 24 ore dalla raccolta).

F.Carozzi Giscor

Reggio Emilia 13-14 Novembre 2014

Prevenzione secondaria in oncologia: sviluppo dei modelli organizzativi, innovazione tecnologica e miglioramento della performance", Attività E: DNA fecale **Metodi**

- Raccolta di un campione di feci in tampone conservante validato prima dell'inizio dello studio in grado di fornire una modalità di raccolta standardizzata per la popolazione e ottimizzato per ridurre la possibile degradazione del DNA.
- Analisi sul DNA fecale un pannello di marcatori genetici ed epigenetici:
 - Quantificazione del DNA umano in real time PCR
 - Quantificazione del LONG DNA in real time PCR
 - Mutazioni del gene K-ras codoni 12 e13 in pyrosequenziamento
 - Mutazioni del gene p 53 esoni: 5, 6, 7 e 8 in pyrosequenziamento
 - Mutazioni del gene APC esone 15 codoni : 876, 1306, 1309, 1312, 1367p1, 1378p1, 1379, 1450p1, 1465 in pyrosequenziamento
 - Valutazione della instabilità genomica mediante analisi delle alterazioni dei micro satelliti Bat26, Bat25 e Bat 40 mediante analisi con AB PRISM 310 Genetic Analyzer e GeneScan software.
 - Valutazione dello stato di metilazione dei geni: Vimentina, SPRF2, MGMT e HTLF in pyrosequenziamento

F.Carozzi Giscor

Reggio Emilia 13-14 Novembre 2014

Prevenzione secondaria in oncologia: sviluppo dei modelli organizzativi, innovazione tecnologica e miglioramento della performance", Attività E: DNA fecale

- Automation of molecular analytic processes are paramount for high volume analysis in daily clinical laboratory practice. Automation adds to assay precision, speed, and affordability.
- Biobanks from screening program of stool samples and Blood samples to evaluate molecular panel as a primary screening tool

F.Carozzi Giscor

Reggio Emilia 13-14 Novembre 2014

**LE BIOBANCHE e i Programmi di Screening
Dalla RICERCA E NELLA PRATICA CLINICA**

- Le biobanche oncologiche rappresentano uno strumento relativamente recente nel sistema sanitario italiano, ma le loro potenzialità di supporto alla ricerca e alla pratica clinica sono ampiamente comprovate dall'esperienza internazionale.
- La consapevolezza che le banche biologiche sono risorse fondamentali per l'avanzamento delle conoscenze scientifiche in campo biomedico è sottolineata dal fatto che, in molti contesti, l'avvio di grandi collezioni biologiche non è più dovuto all'iniziativa di singoli ricercatori, ma programmata dai governi.

F.Carozzi Giscor

Reggio Emilia 13-14 Novembre 2014

BANCA BIOLOGICA

Una biobanca è definita come la raccolta di campioni biologici e dei dati clinici associati (**informazioni anamnestico/cliniche/biologiche**).

I **biomateriali** prelevati e conservati secondo le modalità ottimali devono essere raccolti secondo **norme etiche e di biodiritto** che tutelino in modo completo i soggetti donatori dei tessuti.

I **sogetti a cui viene proposto di donare i campioni biologici** per la biobanca vengono **adeguatamente informati** sulle finalità della ricerca e **devono firmare un consenso informato ad hoc (approvato dal CE)**



F.Carozzi Giscor

Reggio Emilia 13-14 Novembre 2014

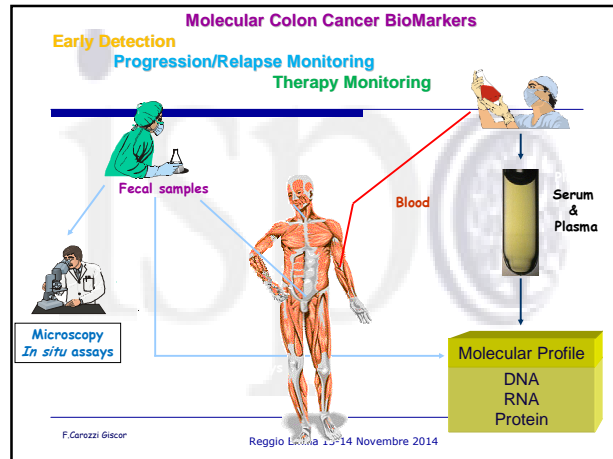
**Quali campioni biologici in una biobanca?
Quali campioni in una biobanca associata ad un programma di screening**

Raccogliere materiale raccolto con modalità semplici di modo che ci sia una forte accettabilità da parte dei soggetti a cui viene richiesto di donare il materiale biologico

Prevedere modalità di stoccaggio e conservazione del materiale donato in modo da avere le disponibilità di tutte le frazioni cellulate e acellulate per ulteriori studi e valutazioni (genomica, proteomica...)

F.Carozzi Giscor

Reggio Emilia 13-14 Novembre 2014



F.Carozzi Giscor

Reggio Emilia 13-14 Novembre 2014

Biobanca Save

Nella cornice di uno studio di valutazione di nuove modalità di screening con un ben preciso endpoint, la costituzione di una banca di soggetti arruolati nello studio "SAVE" permetterà successivi **studi su materiale fecale e sul plasma finalizzati alla diagnosi precoce dei tumori del colon mediante l'identificazione di marcatori molecolari, profili proteici e molecole coinvolte nella patogenesi, progressione e sensibilità a specifiche terapie.**

F.Carozzi Giscor

Reggio Emilia 13-14 Novembre 2014

IL PROGETTO SAVE E LA BANCA BIOLOGICA ASSOCIATA

La raccolta dei campioni di sangue e feci per lo stoccaggio nella banca biologica avviene:

❖ Solo in seguito alla firma, da parte del paziente, del consenso informato

❖ con modalità "operative" di prelievo e raccolta leggermente diversificate nei diversi bracci dello studio :

- Braccio 1 : FOBT
- Braccio 2 : colonscopia virtuale preparazione leggera
- Braccio 3 : colonscopia virtuale preparazione standard
- Braccio 4 : invio diretto a colonscopia

F.Carozzi Giscor

Reggio Emilia 13-14 Novembre 2014

IL PROGETTO SAVE E LA BANCA BIOLOGICA ASSOCIATA

Quindi per ogni soggetto abbiamo a disposizione in banca: 25 criotubi contenenti diverse tipologie di materiale derivate dal prelievo di sangue e 8 criotubi di feci.

I criotubi sono poi crioconservati a -80°C , in speciali congelatori biologici dedicati, nella scatola corrispondente. A fine seduta ogni campione stoccato viene registrato registro "Save" cartaceo e in formato elettronico, segnalando eventuali note o anomalie.



F.Carozzi Giscor

Reggio Emilia 13-14 Novembre 2014

Centri partecipanti Studio PIO

ISPO Firenze
Laboratorio Prevenzione Oncologica
 Carozzi Francesca
 Sani Cristina
SC Epidemiologia Clinica e Descrittiva
 Zappa Marco
 Ventura Leonardo

CPO PIEMONTE
 Senore Carlo
SC Epidemiologia dei Tumori 2
 Martinasso Germana
 Anatronne Caterina

ASL Milano
Servizio Epidemiologia
 Bisanti Luigi
 De Andrea Silvia
Laboratorio Prevenzione
 Casa Roberta
 Archienti Anna

Centri partecipanti Studio SAVE

Azienda Universitaria Careggi
 Milani Stefano
 Sali Lapo

ISPO Firenze
Prevenzione Secondaria Screening
 Grazzini Grazia
 Paola Mantellini
Laboratorio Prevenzione Oncologica
 Carozzi Francesca
 Sani Cristina
 Massimo Confortini
 Tiziana Rubeca
SC Epidemiologia Clinica e Descrittiva
 Zappa Marco
 Ventura Leonardo

Im3D S.p.A. Torino

F.Carozzi Giscor

Reggio Emilia 13-14 Novembre 2014

Grazie per l'attenzione

f.carozzi@ispo.toscana.it

F.Carozzi Giscor

Reggio Emilia 13-14 Novembre 2014