

## OSNA – Standardisierte Erkennung von Metastasen in Lymphknoten bei Brustkrebs

Xtra Austria | August 2012 | Nr. 09



RD-100i

Der axilläre Lymphknotenstatus (Nodalstatus) ist der wichtigste Prognosefaktor beim Mammakarzinom und ermöglicht eine Aussage darüber, wie weit die Erkrankung fortgeschritten ist. Somit ist er ein wichtiges Kriterium bei der Entscheidung für die richtigen therapeutischen Maßnahmen. Lange Zeit war die komplette Ausräumung der axillären Lymphknoten und deren pathologische Beurteilung die klassische Behandlungsmethode. In vielen Fällen hat sich jedoch gezeigt, dass die Lymphknoten nicht von Tumorzellen befallen waren und deren Entfernung (Lymphadenektomie) somit unnötig. Dieser Aspekt ist besonders wichtig, da eine Lymphadenektomie häufig zu einer eingeschränkten Schulter-Arm-Funktionalität mit schmerzhaften Komplikationen, wie dem Lymphödem, führt. Seit den 90er Jahren ist diese radikale chirurgische Herangehensweise durch eine selektive und weniger invasive Methode, die Wächterlymphknotenbiopsie (oder Sentinellymphknotenbiopsie), ersetzt worden und als Behandlungsstandard bei Patientinnen mit klinisch unauffälligen Lymphknoten etabliert.

### Konzept der Wächterlymphknotenbiopsie

Ein Wächterlymphknoten (Sentinellymphknoten) ist der erste Lymphknoten im Lymphabflussgebiet eines Mammakarzinoms und repräsentativ für den Status der restlichen axillären Lymphknoten [1]. Er wird während der Operation über entsprechende Markierungstechniken identifiziert und entnommen. Werden Tumorzellen im Lymphknotengewebe gefunden, müssen oft weitere Lymphknoten der Achselhöhle entfernt werden. Ist der Wächterlymphknoten negativ, kann davon ausgegangen werden, dass weitere Lymphknoten metastasenfrem sind.

### Analyse des Wächterlymphknotens

Optimalerweise wird der Wächterlymphknoten bereits während der Operation zur Entfernung des Primärtumors analysiert, damit im Falle eines positiven Ergebnisses die Entscheidung über die Entfernung weiterer axillärer Lymphknoten sofort getroffen werden kann. Ein weiterer chirurgischer Eingriff kann so vermieden werden.



Reagenzien: LYNOAMP und LYNORHAG

Die intraoperative Beurteilung des Lymphknotengewebes erfolgt mittels histologischer Schnellschnittanalyse oder Imprintzytologie (die Zellen werden angefärbt und unter dem Mikroskop begutachtet). Diese Methoden haben jedoch eine eingeschränkte Sensitivität, da aus Zeitgründen nur ein geringer Teil des Lymphknotens analysiert werden kann. Da die Verfahrensweise zudem nicht standardisiert ist, werden speziell kleinere metastatische Herde erst während der weiterführenden und detaillierteren postoperativen Untersuchung am Paraffinschnitt entdeckt. Dies führt intraoperativ zu einer beträchtlichen Anzahl falsch negativer Ergebnisse (lt. Literatur zwischen 5–45% [2]) und einer entsprechenden Rate an Zweitoperative Ergebnis liegt erst nach einigen Tagen Wartezeit und Ungewissheit vor, und die Zweitoperation stellt eine erneute körperliche Beanspruchung dar.

Mit dem molekularbiologischen Diagnoseverfahren OSNA (One Step Nucleic Acid Amplification) ist eine standardisierte Analyse des gesamten Lymphknotens intraoperativ möglich. Eine verlässliche Diagnose des Sentinels erfolgt während der Erstoperation. Eine bislang notwendige postoperative histologische Analyse kann entfallen und den betroffenen Brustkrebspatientinnen wird die psychische Belastung der Ungewissheit während des Wartens sowie ein zweiter chirurgischer Eingriff erspart.

### Das OSNA Verfahren im Detail

OSNA (One Step Nucleic Acid Amplification) Assay ein automatisiertes System, mit dem der gesamte Lymphknoten bezüglich seiner Tumormast charakterisiert werden kann. Die molekulardiagnostische Methode ermöglicht eine semi-quantitative Bestimmung der zellulären Zytokeratin 19 (CK19) mRNA-Expression. CK19 ist als Epithelzellmarker im tumorfreien axillären Lymphknotengewebe nicht nachweisbar. OSNA ist ein isothermes Reaktionsverfahren, welches auf einer speziellen Technologie zur Amplifizierung von Nukleinsäuren basiert: Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP)[3].

Gegenüber herkömmlichen PCR-Methoden bietet die Anwendung der RT-LAMP Technologie deutliche Vorteile. Der Assay wurde so optimiert, dass hohe Spezifität und Sensitivität gewährleistet sind. Durch die isotherme Reaktionstemperatur wird die unerwünschte Amplifizierung genomischer DNA verhindert. Die Amplifizierung erfolgt über eine Strand-displacement Polymerase, deren Reaktionsoptimum bei 65°C liegt. Während für die RT-PCR nur zwei Primer zur Erkennung der Zielsequenz eingesetzt werden, wurden für die RT-LAMP sechs Exon-übergreifende Primer so konzipiert, dass einerseits die Amplifizierung von Pseudogenen ausgeschlossen, andererseits die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht wird. Falsch-positive Ergebnisse werden vermieden.

Die Reaktionszeit für eine Probe beträgt 16 Minuten und der Amplifizierungsverlauf wird in Echtzeit überwacht (Abb. 1). Als Messgröße dient ein Nebenprodukt der Reaktion: Magnesiumpyrophosphat bildet sich mengenmäßig proportional zum Amplifikat und führt zu einer Trübung im Reaktionsgemisch, die photometrisch bei 465 nm gemessen wird. Das Präzipitat bildet sich aus Pyrophosphationen, die bei der Amplifizierung aus den Nukleotiden freigesetzt werden und in der Reagenzlösung vorhandenem Magnesium. Zur Ergebnisermittlung dient eine Standardkurve mit drei Kalibratoren unterschiedlicher CK19 mRNA-Konzentrationen, welche im gebrauchsfertigen Reagenzienkit LYNOAMP BC enthalten sind.

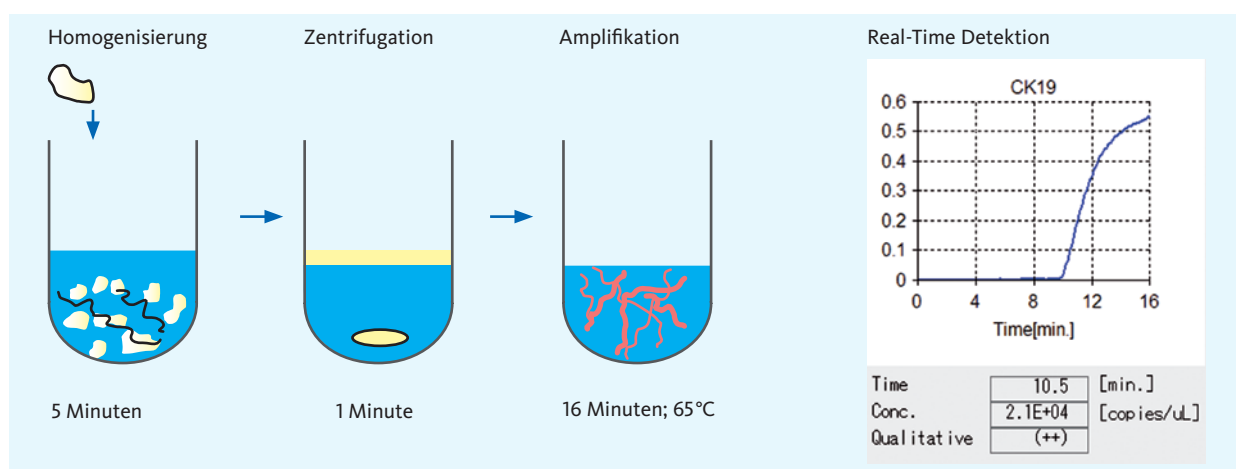


Abb. 1: OSNA Workflow

Nach der Homogenisierung (90 Sekunden) des Lymphknotengewebes mit dem Homogenisierungspuffer LYNORHAG erfolgt ein kurzer Zentrifugationsschritt (Abb. 1). Im Gegensatz zur RT-PCR entfällt ein vorheriger Aufreinigungsschritt der RNA. Die Amplifizierung erfolgt direkt aus dem Lysat. Der Reaktionsansatz wird durch einen Pipettierroboter im RD-100i vorbereitet. Anschließend erfolgt die Amplifizierung und Detektion in dem automatisierten Real-Time System unter standardisierten Bedingungen. Eine CK19 mRNA Negativ- und Positivkontrolle, ebenfalls Bestandteile des Reagenzienkits, werden in jedem Analysenlauf mitgeführt und gewährleisten die Ergebnisqualität. Bis zu vier Lymphknoten können parallel analysiert werden. Die Ergebnisse stehen nach etwa 30–40 Minuten zur Verfügung, je nach Anzahl der zu analysierenden Lymphknoten. Dies schließt die kurze manuelle Vorbereitungszeit ein. Die semi-quantitative Bestimmung der CK19 mRNA-Kopienzahl differenziert positive und negative Ergebnisse. Zudem wird die Größe der metastatischen Herde indiziert. Abhängig von der gemessenen Kopienzahl der Marker-mRNA werden die Ergebnisse in drei Kategorien unterteilt:

- ++ (>5000 CK19 mRNA Kopien/ $\mu$ L), entspricht einer Makrometastase
- + (250–5000 CK19 mRNA Kopien/ $\mu$ L), entspricht einer Mikrometastase
- – (<250 CK19 mRNA Kopien/ $\mu$ L), keine Metastasen

## OSNA in der Anwendung – Klinische Studien

Der Beleg für die Wirksamkeit dieser neuen Methode erfolgte weltweit in mehreren klinischen Studien [4–8]. Hierzu wurde der Lymphknoten mit einem speziell entwickelten Schneidegerät in 4 gleich große Scheiben zerteilt. Zwei alternierende Scheiben wurden mit OSNA untersucht und die beiden Vergleichsproben histologisch aufgearbeitet. Die beiden histologischen Scheiben wurden in Formalin fixiert und postoperativ in Stufen mit 100–250 µm-Intervallen, je nach Studienprotokoll, histologisch untersucht. Jede Stufe bestand aus 3 Schnitten mit jeweils einer Hämatoxylin&Eosin (H&E)-Färbung, einer immunhisto-chemischen Färbung mit einem pan-CK-Antikörper sowie des CK19-Proteins. Diese postoperative Analytik ist sehr viel gründlicher als dies in nationalen und internationalen Empfehlungen für die Untersuchung eines SLN vorgegeben wird.

Für den OSNA-Test konnte in diesen multizentrischen Studien eine Sensitivität und Spezifität von über 95% im Vergleich zu der histologischen Befundung aufgezeigt werden. OSNA ist CE-zertifiziert und konform zu den Anforderungen der Richtlinie 98/79/eG für in-Vitro-Diagnostika und somit für den Einsatz in der Diagnostik zugelassen.

## OSNA in der Klinischen Routine

Neben der bereits beschriebenen Vermeidung von Zweitoperationen ist OSNA eine Methode, die in ihrer Anwendung in vielerlei Hinsicht Vorteile bietet:

- Das Vorliegen eines definitiven Ergebnisses intraoperativ ermöglicht den sofortigen Einsatz weiterer intraoperativer Techniken wie der IORT (Intraoperative radiotherapy) oder eine Brustrekonstruktion.
- Die sofortige Verfügbarkeit eines definitiven Ergebnisses beschleunigt die Entscheidung über weitere therapeutische Maßnahmen.
- Jüngste Studienergebnisse legen nahe, dass man Frauen, deren Brustkrebs sich in einem sehr frühen Stadium befindet und deren Lymphknotenbefall sehr gering ist (nur Mikrometastasen in max. 2 Sentinels), eine Lymphadenektomie ersparen kann. Häufig ist bei diesen Patientinnen das Risiko, dass weitere Lymphknoten befallen sind, gering. Um dennoch die optimalen therapeutischen Entscheidungen zu treffen, und diese Patientinnen sorgfältig zu selektieren, bietet eine verlässliche und standardisierte Methode wie OSNA die optimalen Voraussetzungen.

Die Auswertung vorliegender Patientenergebnisse bestätigt, dass zwischen dem OSNA Ergebnis und dem axillären Lymphknotenstatus eine Korrelation besteht.

OSNA Ergebnis	Rate befallener axillärer Lymphknoten
(+)	~ 12 %
(++)	~ 41 %

Routineanwender haben daraus bereits den Ansatz abgeleitet aus dem OSNA Ergebnis und der CK19 Kopienzahl, in Kombination mit anderen prognostischen Faktoren, ein statistisches Rechenmodell (Nomogram) zur Prädiktion des Nodalstatus zu entwickeln.

Die Vermeidung von Zweiteingriffen und postoperativen Untersuchungen ist auch wirtschaftlich von Vorteil. Prozesse werden optimiert und knapp bemessene finanzielle sowie personelle Ressourcen auf andere Bereiche verteilt. Kürzere stationäre Aufenthalte, besser ausgelastete Operationsflächen und die damit einhergehende Effizienzsteigerung sind das Ergebnis.

### **Weitere Applikationen: OSNA beim Kolonkarzinom**

Neben dem routinemäßigen Einsatz beim Mammakarzinom ist die Anwendung von OSNA auch in anderen Krebsentitäten in der Entwicklung. Basierend auf entsprechenden Studienergebnissen liegt die Zulassung für die Anwendung beim Kolonkarzinom bereits vor. In dieser Studie wurden 600 Lymphknoten von Patienten mit Kolonkarzinom einer intensiven histologischen Analyse und OSNA unterzogen, analog dem Studienprotokoll im Brustkrebsbereich. Die Konkordanz zwischen beiden Diagnostikverfahren lag bei über 95% [9]. Im Gegensatz zum Mammakarzinom kommt OSNA beim Kolonkarzinom eher für die postoperative Analytik zum Einsatz. Die Lymphadenektomie wird beim Kolonkarzinom standardmäßig durchgeführt. Daraus resultiert eine relativ große Anzahl von Lymphknoten für die histologische Untersuchung, welche in der Regel aus einem oder ggf. seriellen H&E-Schnitten besteht. Allerdings erleiden 20% der initial nodal-negativen Darmkrebspatienten, die basierend darauf keine adjuvante Therapie erhalten, innerhalb von 5 Jahren ein Rezidiv [10]. Es ist deshalb davon auszugehen, dass bei diesen Patienten Metastasen übersehen wurden [11]. Auch hier könnte die OSNA-Analyse des ganzen Lymphknotens entscheidend zu einer genaueren und standardisierten Bestimmung der Tumorlast und somit einer richtigen Zuordnung von Kolonkarzinompatienten in klinische Stadien beitragen.

## Literatur

- [1] Morton DL et al. (1992): Arch Surg 127:392–99.
- [2] Motumura K et al. (2000): Br J Surg 87:597–601.
- [3] Notomi T et al. (2000): Nucleic Acids Research 28:e63.
- [4] Tsujimoto M et al. (2007): Clin Can Res 13:4807–16.
- [5] Visser M et al. (2008): Int J Cancer 122:2562–67.
- [6] Schem C et al. (2009): Virchows Arch 454:203–10.
- [7] Tamaki Y et al. (2009): Clin Can Res 15:2879–84.
- [8] Snook KL et al. (2010): Br J Surg, accepted 10/2010.
- [9] Croner RS et al. (2010): J Transl Med 8:83–8.
- [10] Berberoglu U. (2004): Hepatogastroenterology 51:1689–93.
- [11] Bilchik AJ et al. (2002): Arch Surg 137:1377–83.

## Korrespondenzadresse

Dr. Elisabeth Breit, Monika Zänkert Sysmex Europe GmbH,  
Bornbarch 1, 22848 Norderstedt, Tel.: +49-(0)40-52726-0  
breit.elisabeth@sysmex-europe.com  
zaenkert.monika@sysmex-europe.com

## Querverweis zu ähnlichen Artikeln

[http://www.laborwelt.de/fileadmin/dateien/PDF-Ausgaben/LW2010\\_06.pdf](http://www.laborwelt.de/fileadmin/dateien/PDF-Ausgaben/LW2010_06.pdf)