i centri possono anche eseguire la determinazione su singolo pozzetto, dopo una opportuna fase di apprendimento
- Ogni laboratorio dovrebbe validare la metodica di Real Time PCR in via preventiva utilizzando diluizioni di DNA mutato in DNA non-mutato da linee cellulari il cui stato mutazionale di KRAS sia conosciuto. La sensibilità delle metodiche basate sulla tecnologia ARMS dovrebbe raggiungere l'1%; per i saggi basati sulla discriminazione allelica è stata descritta una sensibilità di almeno il 10%.

Analisi mediante ibridazione molecolare su filtro (KRAS StripAssay)

Questa metodica, sulla quale sono basati alcuni Kit commerciali, prevede una amplificazione PCR arricchita per le molecole mutate, effettuata utilizzando una miscela di primers biotinilati specifici per 10 delle più comuni mutazioni del gene KRAS nei codoni 12 e 13. La determinazione della mutazione avviene mediante ibridazione molecolare invertita dei prodotti di amplificazione con sonde oligonucleotidiche, specifiche per le 10 mutazioni, immobilizzate su un filtro sotto forma di un array a bande parallele. Dopo una serie di lavaggi, le sequenze biotinilate legate specificamente al filtro vengono evidenziate tramite complessi streptoavidina-fosfatasi alcalina e substrati cromogeni. Questo tipo di determinazione risulta particolarmente sensibile, con una soglia di rilevazione pari all' 1% di sequenze mutate. Il kit è corredato di vari controlli che permettono di monitorare l'efficienza della reazione PCR e dell'ibridazione molecolare. Il metodo è stato messo a punto per l'analisi mutazionale del gene KRAS su tessuti fissati ed inclusi.

Pirosequenziamento

Il pirosequenziamento è una tecnologia di sequenziamento mediante sintesi. La tecnica consente il monitoraggio in tempo reale della sintesi di DNA mediante il rilevamento della bioluminescenza prodotta al termine di una cascata di reazioni enzimatiche innescata dall'incorporazione di un nucleotide. Le metodiche di pirosequenziamento hanno in teoria alcuni vantaggi rispetto al sequenziamento standard, tra cui la maggiore sensibilità e la possibilità di sequenziare frammenti piuttosto corti di DNA, superando in tal modo eventuali problematiche legate alla frammentazione del DNA.
Esistono in commercio kit per uso clinico per la determinazione dello stato mutazionale di KRAS mediante tecniche di pirosequenziamento. Questi kit prevedono anche la determinazione di mutazioni in codoni diversi dal 12 e 13, che non dovrebbero essere riportate nel referto avendo al momento solo scopo di ricerca. Inoltre, non sono disponibili in letteratura esperienze condotte con tale metodica in casistiche significative. Pertanto, la sensibilità e specificità della metodica dovrebbero essere determinate in ogni singolo laboratorio prima di procedere al suo impiego clinico.
Come per le metodiche sopradescritte, particolare attenzione deve essere tenuta nella preparazione dei campioni ed opportuni controlli positivi e negativi devono essere impiegati in ogni reazione.

Refertazione

La refertazione è parte integrante della procedura diagnostica e dovrebbe contenere le seguenti informazioni:
- L'identificazione del paziente e del medico/struttura che ha richiesto l'analisi.
- Il materiale utilizzato per l'analisi e la percentuale di cellule tumorali.
- La metodica impiegata per l'esecuzione dell'analisi.
- I risultati del test relativamente allo stato mutazionale dei codoni 12 e 13 di KRAS, con specificazione del tipo di mutazione nucleotidica ed aminoacidica eventualmente rilevata.

Il referto deve essere compilato su un modello prestabilito e firmato dall'anatomo patologo e/o dal responsabile della determinazione molecolare.

Referenze bibliografiche

Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, et al: Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. N Engl J Med 2009; 360: 1408-17

Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, et al: Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 2009; 27: 663-71

Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al: KRAS mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. N Engl J Med 2008; 359: 1757-65

Douillard JY, Siena S, Cassidy J, et al: Randomized, Phase III Trial of Panitumumab With Infusional Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin (FOLFOX4) Versus FOLFOX4 Alone As First-Line Treatment in Patients With Previously Untreated Metastatic Colorectal Cancer: The PRIME Study. J Clin Oncol 2010; 28: 4697-705

Peeters M, Price TJ, Cervantes A, et al: Randomized Phase III Study of Panitumumab With Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan (FOLFIRI) Compared With FOLFIRI Alone As Second-Line Treatment in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. J Clin Oncol 2010; 28: 4706-13

Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, et al: Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 2008; 26: 1626-34.

Normanno N, Tejpar S, Morgillo F, De Luca A, Van Cutsem E, Ciardiello F: Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC. Nat Rev Clin Oncol 2009; 6: 519-27

Carotenuto P, Roma C, Rachiglio AM, Tatangelo F, Pinto C, Ciardiello F, Nappi O, Iaffaioli RV, Botti G and Normanno N: Detection of KRAS mutations in colorectal carcinoma patients with an integrated PCR/sequencing and Real Time PCR approach. Pharmacogenomics 2010; 11: 1169-79

Programma per il Controllo di Qualità KRAS – promosso da AIOM e SIAPEC-IAP, 2010.
http://www.aiom.it/UrlRewriting/RewritingEngine.asp?RWdescrizione=Attivit%C3%A0+Scientifica/Documenti+AIOM/Protocolli/Centri+con+esito+positivo+al+controllo+di+qualit%C3%A0+di+KRAS&tRWid=4133&tRWpage=1&tRWType=1&tRWURL=1

Realizzato con il contributo di

AMGEN Dompé

MERCK

Merck Serono
Living science, transforming lives

Raccomandazioni per l'analisi mutazionale del gene KRAS nel carcinoma del colon-retto

Aggiornamento, 10 Novembre 2010

A cura del gruppo di lavoro AIOM - SIAPEC-IAP

Antonio Marchetti, Nicola Normanno, Carmine Pinto, GianLuigi Taddei, Alberto Bardelli, Carlo Barone, Stefano Cascinu, Fortunato Ciardiello, Angelo Paolo Dei Tos, Francesco Di Costanzo, Alfredo Falcone, Marcello Gambacorta, Giampietro Gasparini, Stefano Iacobelli, Roberto Labianca, Evaristo Maiello, Oscar Nappi, Antonio Russo, Salvatore Siena, Giuseppe Viale

AIOM

SIAPEC - IAP

Raccomandazioni per l'analisi mutazionale del gene KRAS nel carcinoma del colon-retto

Indicazioni cliniche

L'analisi mutazionale del gene KRAS deve essere effettuata nei pazienti con carcinoma del colon-retto metastatico per i quali è indicato un trattamento in I linea o in linee successive con un regime di terapia contenente un anticorpo monoclonale anti-EGFR (cetuximab, panitumumab). L'impiego dell'anticorpo monoclonale anti-EGFR non è indicato nei pazienti con gene KRAS mutato nei codoni 12 e 13. In considerazione dell'alta concordanza fra le mutazioni riscontrate nei tumori primitivi e nelle corrispondenti metastasi, la determinazione dello stato mutazionale di KRAS può essere effettuata indifferentemente su tessuto tumorale primitivo o metastatico.

Premesse del protocollo

Diverse metodiche di laboratorio possono essere impiegate per l'analisi mutazionale di KRAS in pazienti con carcinoma del colon-retto metastatico. L'amplificazione mediante PCR e la sequenza diretta dell'amplificato è l'approccio più utilizzato, come dimostrato anche dal recente controllo di qualità che ha coinvolto più di 60 centri italiani, e rappresenta al momento la metodica di riferimento e a più basso costo per la determinazione dello stato mutazionale di KRAS.
Kits commerciali con procedure standardizzate e appropriati controlli sostituiranno probabilmente nel tempo le procedure sviluppate autonomamente in laboratorio. Alcuni kit già disponibili si basano su metodiche di Real Time PCR, che presentano il vantaggio di una maggiore sensibilità e rapidità rispetto alla PCR/sequenza. Il pirosequenziamento e l'ibridazione molecolare su filtro (KRAS StripAssay) rappresentano ulteriori approcci di notevole interesse anche per la loro elevata sensibilità. Tuttavia, non sono disponibili in letteratura studi di validazione di queste ultime metodiche su ampie casistiche. Inoltre, il costo in generale delle nuove metodologie rappresenta una chiara limitazione alla loro applicazione su larga scala.
Indipendentemente dalla procedura utilizzata, la determinazione dello stato mutazionale di KRAS non può prescindere da una attenta valutazione e selezione del campione da analizzare da parte dell'anatomo-patologo. Il protocollo che segue indica alcuni principi di base che devono essere rispettati per una corretta esecuzione della analisi mutazionale di KRAS.

Il materiale biologico per l'analisi molecolare

L'analisi mutazionale del gene KRAS può essere effettuata su DNA estratto da tessuto prelevato da carcinoma infiltrante primitivo del colon-retto o metastatico. Lesioni adenomatose o carcinomatose non invasive non dovrebbero essere sottoposte ad analisi. Il materiale può rendersi disponibile sotto forma di biopsie esplorative o di tessuto neoplastico asportato con l'intervento chirurgico. Il campione da prelevare per la diagnosi molecolare deve essere effettuato in piena area neoplastica evitando, per quanto possibile, aree necrotiche e tessuto normale. Il tessuto può essere processato immediatamente, oppure dopo congelamento a -80°C o ancora dopo fissazione in formalina e inclusione in paraffina. Poiché il congelamento tessutale, sebbene auspicabile, non può essere ancora considerato una pratica diffusa, allo stato attuale, nella maggior parte dei casi, il DNA viene estratto da tessuti fissati e inclusi. L'utilizzo di tessuti paraffinati fornisce DNA di qualità decisamente inferiore a quella ottenibile da tessuti freschi o congelati ma in genere sufficiente per le analisi mutazionali.

Preparazione del campione di tessuto

All'esame istopatologico, la lesione tumorale si presenta frequentemente come un tessuto eterogeneo: accanto ad aree di carcinoma infiltrante possono essere presenti aree di necrosi, aree flogistiche, aree fibrose e tessuti normali. La possibilità di individuare mutazioni geniche può essere inficiata da una bassa percentuale di cellule neoplastiche nel campione. Pertanto, l'anatomo patologo deve effettuare un accurato esame microscopico del tessuto prelevato ed eventualmente provvedere a selezionare le aree tumorali mediante dissezioni. È difficile definire la percentuale minima di cellule neoplastiche che deve essere presente nel campione per una analisi affidabile di mutazione genica. Infatti, tale percentuale dipende dalla sensibilità della metodica utilizzata per l'esame mutazionale. Se si utilizzano procedure di analisi standard (sequenziamento diretto), si suggerisce la presenza di almeno il 50% di cellule neoplastiche. Ancor più difficile è indicare quale sia il minimo quantitativo di cellule tumorali per l'analisi molecolare nel caso di piccoli prelievi bioptici. Infatti, il risultato dell'esame può dipendere oltre che dalla quantità, anche dalla qualità del materiale biologico disponibile. In pratica, anche se si utilizzano metodiche sensibili per l'analisi mutazionale, è preferibile non procedere se non sono presenti almeno 100 cellule neoplastiche nel campione.
Le dissezioni tessutali possono essere sostanzialmente distinte in: a) macrodissezioni eseguite manualmente su fette distese su vetrino, b) microdissezioni laser.
La macrodissezione viene eseguita su sezioni di tessuto paraffinato dello spessore di 10 micron montate su vetrino portaoggetto. La raccolta delle sezioni su vetrino si effettua in acqua distillata priva di gelatina in recipienti monouso (capsula Petri, beaker) per evitare inquinamenti. Quindi le sezioni vengono fatte essiccare sul vetrino a temperatura ambiente e sottoposte a macrodissezione manuale mediante la lama di un bisturi o un ago da siringa. Il tessuto dissezionato viene raccolto in un tubo Eppendorf, sparaffinato in appropriato solvente, lavato in alcool e disidratato prima di iniziare l'estrazione del DNA.
Nel caso di piccole biopsie potrebbe rendersi necessaria la microdissezione laser. Quest'ultima metodica, per quanto utile in mani esperte, ha al momento alcune principali limitazioni: a) prevede una costosa strumentazione e personale dedicato (anatomopatologi) con esperienza nel settore specifico; b) richiede lunghi tempi di esecuzione; c) può favorire l'insorgenza di artefatti (falsi positivi e falsi negativi) per la scarsa quantità e qualità del DNA ottenuto.

L'estrazione e la conservazione del DNA

L'estrazione e la purificazione del DNA da tessuto paraffinato può essere eseguita utilizzando diverse metodiche. Tuttavia, sono disponibili vari kit commerciali, in genere basati sul principio della cromatografia, che consentono di accorciare notevolmente i tempi necessari per l'estrazione e, al contempo, favoriscono la standardizzazione delle procedure. Sono in commercio diversi tipi di kit per le varie tipologie di campioni (fissati, congelati, micro-campioni quali piccole biopsie).
Una volta estratto, il DNA viene risospeso in tampone adeguato, quindi valutato sotto il profilo qualità/quantità mediante lettura spettrofotometrica o tramite visualizzazione su gel d'agarosio. La metodica di estrazione da tessuti paraffinati deve garantire adeguate quantità di DNA per la analisi mutazionale in almeno il 95% dei campioni processati.
Se conservato opportunamente il DNA può essere usato anche a distanza di tempo (vari anni) per ulteriori indagini molecolari, previo esplicito consenso informato del paziente. La conservazione ottimale degli acidi nucleici è di estrema importanza e comporta una rigida organizzazione di "biobanking" che implica di base una strumentazione adeguata (congelatori a -80°C e contenitori di azoto liquido), dispositivi di controllo grafico della temperatura, sistemi di allarme acustico e via radio, controlli di qualità dei materiali biologici conservati.
L'estrazione rappresenta il primo passo nel percorso diagnostico molecolare alla quale, nella maggior parte dei casi, seguono metodiche di amplificazione del DNA.

Amplificazione mediante PCR dell'oncogene KRAS

Gli studi clinici che hanno portato alla registrazione dei farmaci anti-EGFR nel trattamento del carcinoma del colon retto metastatico nei soli pazienti che non hanno mutazioni di KRAS, hanno indagato esclusivamente le sette mutazioni più frequenti dei codoni 12 e 13 del suddetto gene. Recenti pubblicazioni hanno suggerito un possibile ruolo di altre mutazioni nella resistenza ai farmaci anti-EGFR. Tuttavia, questi risultati non sono stati ottenuti nel contesto di studi randomizzati e non possono essere impiegati nella pratica clinica. Pertanto, l'attività diagnostica al momento deve essere ristretta alle sole mutazioni dei codoni 12 e 13.
L'amplificazione mediante PCR dell'esone 2 del gene KRAS consente di avere sufficiente materiale per la analisi mutazionale anche partendo da esigue quantità di DNA. Il prodotto della PCR può essere utilizzato per il sequenziamento diretto del tratto amplificato o sottoposto a tecniche di vario tipo per la identificazione di mutazioni geniche.

Raccomandazioni per il protocollo PCR del gene KRAS

- Le reazioni devono essere allestite in una cappa a flusso laminare, in un ambiente diverso da quello utilizzato per l'analisi dei prodotti di amplificazione, utilizzando materiali dedicati e con le opportune precauzioni onde evitare contaminazioni (guanti, puntali con filtro, ect.).
- Per ogni determinazione devono essere previsti almeno un controllo positivo di amplificazione (campione di DNA genomico precedentemente validato) ed un controllo negativo (miscela di reazione priva di templato).
- La reazione di PCR deve essere allestita utilizzando 80-100 ng di DNA genomico, per garantire una buona resa ed evitare artefatti.
- Per ogni campione da analizzare è opportuno produrre due diversi amplificati, in modo da effettuare la sequenza di due diversi prodotti di PCR.
- La regione da amplificare deve comprendere le sequenze dei codoni 12 e 13 del gene KRAS.
- Il controllo qualitativo/quantitativo del prodotto della reazione viene effettuato mediante Elettroforesi in gel di agarosio e colorazione con Etidio Bromuro o con altro intercalante, che consente di valutare l'efficienza della PCR e la specificità del risultato.
- Ogni laboratorio dovrebbe validare la metodica di PCR/sequenziamento in via preventiva utilizzando diluizioni di DNA mutato in DNA non-mutato da linee cellulari il cui stato mutazionale di KRAS sia conosciuto. La sensibilità della metodica dovrebbe essere tale da individuare mutazioni quando le copie di DNA mutato rappresentano il 25% circa del totale.

Sequenziamento dei prodotti di PCR

Come già ricordato, il sequenziamento diretto è la tecnica al momento più diffusa per evidenziare le mutazioni del gene KRAS. Tuttavia, la sensibilità della metodica non è molto elevata, permettendo di evidenziare una mutazione solo se presente nel 10-20% delle molecole di DNA analizzate. L'utilizzo del sequenziamento diretto per l'analisi delle mutazioni del gene KRAS nei tumori colorettali consente di evidenziare mutazioni in circa il 35-40% dei pazienti.

Raccomandazioni per il protocollo di seguenziamento del gene KRAS

- La quantità del templato analizzato mediante sequenziamento deve essere dell'ordine dei 40-50 ng.
- I prodotti di due diverse PCR dovrebbero essere sequenziati in forward e reverse, in modo da ottenere un numero di 3-4 sequenze per campione.
- Il controllo qualitativo viene effettuato mediante assemblaggio delle sequenze con un software dedicato alla analisi delle sequenze, lettura dell'elettroferogramma e confronto con la sequenza wild type.
- Un campione può essere definito positivo per mutazione se questa è presente in almeno due diverse sequenze (una forward ed una reverse) ottenute da PCR indipendenti.
- Ad intervalli di 25-30 sequenze, deve essere sequenziato un DNA di controllo per verificare l'assenza di contaminazioni e la qualità della procedura.
- L'efficienza della metodica di PCR/sequenziamento deve garantire un corretto risultato almeno nel 97% dei campioni.

Analisi mediante REAL-TIME PCR

Diverse metodiche basate sull'impiego della Real Time PCR possono essere utilizzate per la individuazione delle mutazioni di KRAS. È disponibile in commercio un kit basato sulla tecnologia ARMS/Scorpion in grado di individuare le 7 più frequenti mutazioni dei codoni 12 e 13 di KRAS (TheraScreen: KRAS Mutation Kit). La sensibilità teorica della metodica è tale da individuare mutazioni quando le copie di DNA mutato rappresentano circa l'1% del DNA totale. Laboratori con esperienza di biologia molecolare possono anche sviluppare metodiche alternative di Real Time PCR basate su discriminazione allelica. Queste dovrebbero essere comunque in grado di individuare le 7 principali mutazioni del gene KRAS osservate nel carcinoma del colon retto.

Raccomandazioni generali

- Le reazioni devono essere allestite sotto cappa a flusso laminare, in un ambiente diverso da quello utilizzato per l'analisi dei prodotti di amplificazione, impiegando materiali dedicati e con le opportune precauzioni onde evitare contaminazioni (guanti, puntali con filtro, ecc.)
- Appropriati controlli positivi e negativi devono essere inclusi in ogni singola determinazione
- Le reazioni devono di norma essere eseguite in duplicato. Per il kit Therascreen, provvisto di una serie di controlli interni,