

## REPORT FINALE DEL PROGETTO "III Controllo di qualità nazionale per la valutazione delle mutazioni di RAS nel carcinoma del colon-retto"-2014

Il Comitato Scientifico AIOM e SIAPEC-IAP ha organizzato per il 2014 il Controllo di qualità nazionale per la determinazione dello stato mutazionale dei geni KRAS, NRAS e BRAF nel carcinoma del colon retto, al fine di assicurare che le analisi molecolari, ad oggi indispensabili per l'identificazione del miglior approccio terapeutico alla patologia, risultino affidabili ed accurate sull'intero territorio nazionale.

I controlli di qualità hanno riguardato gli esoni 2, 3 e 4 dei geni KRAS ed NRAS, in accordo con le nuove linee guida dell'EMA che prevedono l'utilizzo degli anticorpi monoclonali anti-EGFR, cetuximab e panitumumab, solo in pazienti con carcinoma del colon retto metastatico che non presentino mutazioni a carico dei geni KRAS ed NRAS. Inoltre, è stata introdotta anche l'analisi della mutazione V600E del gene BRAF, di frequente richiesta dagli oncologi in quanto rappresenta un importante fattore prognostico negativo.

Il progetto ha previsto una fase preliminare finalizzata all'individuazione dei campioni FFPE da inviare ai centri per lo svolgimento delle analisi. I campioni sono stati analizzati da due centri di riferimento indipendenti con metodiche differenti (pirosequenziamento, Next Generation Sequencing, sequenziamento diretto). Tra i campioni che hanno ottenuto piena concordanza nelle analisi tra i centri di riferimento, ne sono stati selezionati n.10 con adeguata percentuale di cellule tumorali ( $\geq 50\%$ ) e con una buona frequenza di alleli mutati (Tab. 1).

	KRAS	BRAF	NRAS
a1	WT	WT	WT
a2	WT	WT	WT
a3	WT	WT	WT
a4	WT	WT	WT
a5	WT	WT	WT
a6	WT	p.V600E (c.1799T>A) (27,6%)	WT
a7	p.A146T (c.436G>A) (27,6%)	WT	WT
a8	p.G12D (c.35G>A) (24,2%)	WT	WT
a9	WT	WT	p.G12D (c.35G>A) (18,1%)
a10	WT	WT	p.Q61K (c.181C>A) (74,6%)

Tab. 1 – Campioni selezionati per I round del CQ RAS 2014

La 30ma, la 60ma e l'ultima sezione ottenute dai blocchetti FFPE selezionati sono state analizzate mediante pirosequenziamento, per verificare che le mutazioni fossero rappresentate in modo omogeneo all'interno dello stesso blocchetto.

Tramite il sito internet dedicato [www.rasquality.it](http://www.rasquality.it), n.90 centri si sono registrati al programma; di questi, 88 hanno partecipato al CQ mentre 2 hanno declinato la partecipazione.

In data 4 febbraio 2014 si è quindi proceduto all'invio di una provetta tipo eppendorf con 1 sezione da 10 micron ai centri registrati ed ammessi al CQ. I campioni sono stati anonimizzati, tramite l'assegnazione automatica di un codice casuale attraverso un'applicazione del sito web. Ai centri è stato chiesto di effettuare l'analisi molecolare con la metodica da essi utilizzata di routine e di inserire i risultati on-line entro un tempo massimo di 3 settimane (deadline 24 febbraio 2014).

Il Comitato Scientifico ha quindi stabilito come necessari per il superamento del Controllo di Qualità, i seguenti parametri:

- 1) un punteggio  $\geq 18$
- 2) l'assenza di errori di genotipizzazione (falsi negativi/positivi).

In pratica, se un laboratorio realizza 18 punti senza aver commesso falsi negativi/positivi, ha superato il controllo di qualità. La presenza anche di un solo falso negativo/positivo, pur determinando un punteggio di 18 secondo la tabella seguente, viene considerato comunque insufficiente per il superamento del controllo di qualità, essendo un errore di questo tipo determinante ai fini della scelta terapeutica.

Nel dettaglio, la valutazione dei risultati è stata eseguita sulla base dei seguenti criteri di punteggio:

a) Diagnosi corretta	2 punti
b) Descrizione non corretta della mutazione	1,5 punti*
c) Diagnosi parzialmente corretta	1 punto
d) Mancata estrazione/amplificazione	0,5 punti
e) Errore diagnostico	0 punti

\*deduzione applicata una sola volta

Degli 88 centri che hanno effettivamente partecipato al CQ, 32 (36%) non hanno superato il I round (Fig. 1); di questi 23 hanno effettuato almeno un errore

diagnostico (falso negativo/positivo), mentre 9 centri non hanno sottomesso i risultati.

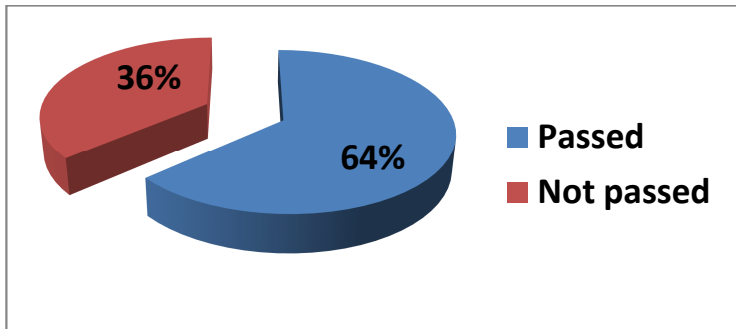


Fig. 1 – Risultati I round RAS CQ 2014

Uno dei campioni inviati ai centri per l'analisi, siglato A7 nella tabella 1, presentava la mutazione p.A146T (c.436G>A) nell'esone 4 del gene KRAS, con una percentuale di alleli mutati inizialmente stimata al 27%, mediante l'utilizzo di una metodica di NGS. Dei 79/88 centri che hanno inviato i risultati, 33/79 (42%) non sono stati in grado di identificare questa mutazione. Per questo motivo, sono state effettuate analisi retrospettive mediante NGS su sezioni ottenute a diversi punti del blocchetto. Le analisi effettuate hanno rilevato un discreto grado di eterogeneità tumorale che potrebbe aver influenzato i risultati ottenuti dai centri. Il Comitato Scientifico ha quindi ritenuto opportuno assegnare 1 punto anche ai centri che non sono stati in grado di identificare la mutazione, invitando tuttavia i singoli centri a valutare la sensibilità delle proprie metodiche nell'identificazione della mutazione p.A146T dell'esone 4 del gene KRAS.

Ai 32 centri che non hanno superato il I round del CQ, è stata offerta la possibilità di partecipare al II round, organizzato sulla falsa riga del I round. Sono stati selezionati quindi altri n.10 campioni (Tab. 2), spediti ai centri in data 14 aprile 2014.

	KRAS	BRAF	NRAS
b1	WT	WT	WT
b2	WT	WT	WT
b3	WT	WT	WT
b4	WT	WT	WT
b5	WT	WT	WT
b6	p.G12D (c.35G>A) (27,7%)	WT	WT
b7	p.A146T (c.436G>A) (62%)	WT	WT
b8	WT	WT	p.Q61R (c.182A>G) (29,5%)
b9	WT	WT	p.G12S (c.34G>A) (45,2%)
b10	WT	p.V600E (c.1799T>A) (36,9%)	WT

Tab. 2 – Campioni selezionati per II round del CQ RAS 2014

Dei 32 centri che non avevano superato il I round, 23 hanno poi superato il II round, ottenendo almeno un punteggio di 18 punti, senza commettere errori diagnostici (falsi positivi/negativi). Dei 9 centri che invece non hanno superato il II round e che quindi non superano il Controllo di Qualità, 4 non hanno sottomesso i risultati nel tempo stabilito di 3 settimane (deadline 9 maggio 2014), mentre 5 hanno commesso almeno un errore diagnostico (Fig.2).

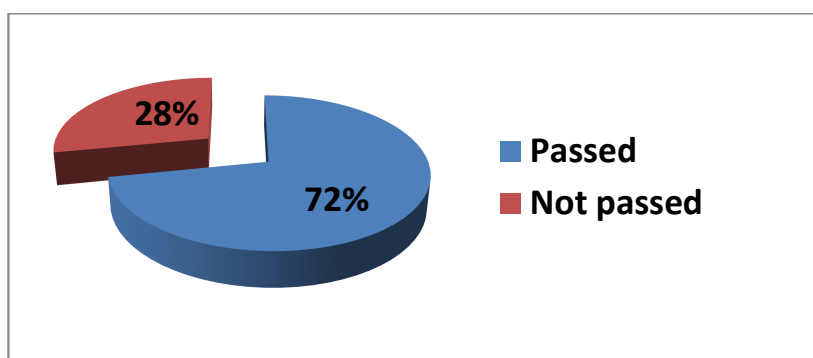


Fig. 2 – Risultati II round RAS CQ 2014

In conclusione, i centri che hanno superato il *III Controllo di qualità nazionale per la valutazione delle mutazioni di RAS nel carcinoma del colon-retto 2014* sono 79/88, di cui 56 hanno superato il I round e 23 il II round (Fig.3).

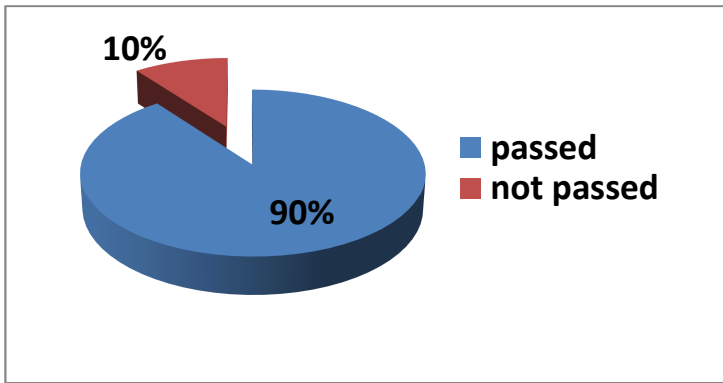


Fig. 3 – Risultati finali RAS CQ 2014