

Raccomandazioni AIOM e SIAPEC-IAP per la valutazione delle mutazioni di RAS nel carcinoma del colon-retto

A cura del Gruppo di Lavoro di AIOM e SIAPEC-IAP

*AIOM: Nicola Normanno (Napoli), Carmine Pinto (Parma),
Carlo Barone (Roma), Roberto Labianca (Bergamo),
Salvatore Siena (Milano), Alberto Zaniboni (Brescia)*

*SIAPEC-IAP: Antonio Marchetti (Chieti), Gaetano De Rosa (Napoli),
Massimo Barberis (Milano), Gabriella Fontanini (Pisa),
Francesca Castiglione (Firenze), Gian Luigi Taddei (Firenze)*



Raccomandazioni AIOM e SIAPEC-IAP per la valutazione delle mutazioni di RAS nel carcinoma del colon-retto

Indicazioni cliniche

L'analisi mutazionale dei geni KRAS ed NRAS deve essere effettuata nei pazienti con carcinoma del colon-retto (CRC) 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 mutazioni degli esoni 2, 3 e 4 dei geni KRAS ed NRAS. In particolare, gli studi clinici che hanno portato alla registrazione dei farmaci anti-EGFR per i pazienti RAS wild type hanno valutato i codoni 12, 13, 59, 61, 117, 146 di KRAS ed NRAS e, quindi, tutte queste posizioni devono essere analizzate.

Il test RAS viene eseguito su richiesta dell'oncologo medico in ottemperanza a quanto previsto dall'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) per l'utilizzo nel CRC metastatico degli anticorpi monoclonali anti-EGFR (cetuximab, panitumumab). Tuttavia, in alcuni centri è stato attivato il "reflex testing", ovvero l'esecuzione del test molecolare in ogni caso di CRC sottoposto a resezione chirurgica. Il vantaggio di riportare insieme con il referto istologico lo status di RAS consiste nel risparmiare il tempo che intercorre tra la richiesta del test e la sua esecuzione. Lo svantaggio è quello di eseguire il test anche nei casi in cui non si svilupperanno metastasi o comunque non vi sia una indicazione alla terapia con farmaci anti-EGFR. L'attivazione di programmi di reflex testing dovrebbe quindi seguire una attenta valutazione del rapporto costi/benefici che può variare da centro a centro.

Il test RAS

La valutazione dello stato mutazionale di RAS nel CRC può essere effettuata con diverse tecniche molecolari, ciascuna caratterizzata da punti di forza e di debolezza. L'esecuzione dell'analisi mutazionale deve essere sempre sostenuta da specifiche esperienze di laboratorio e validata dalla stessa attività diagnostica e da programmi di controllo di qualità riconosciuti.

Le raccomandazioni per l'esecuzione del test RAS

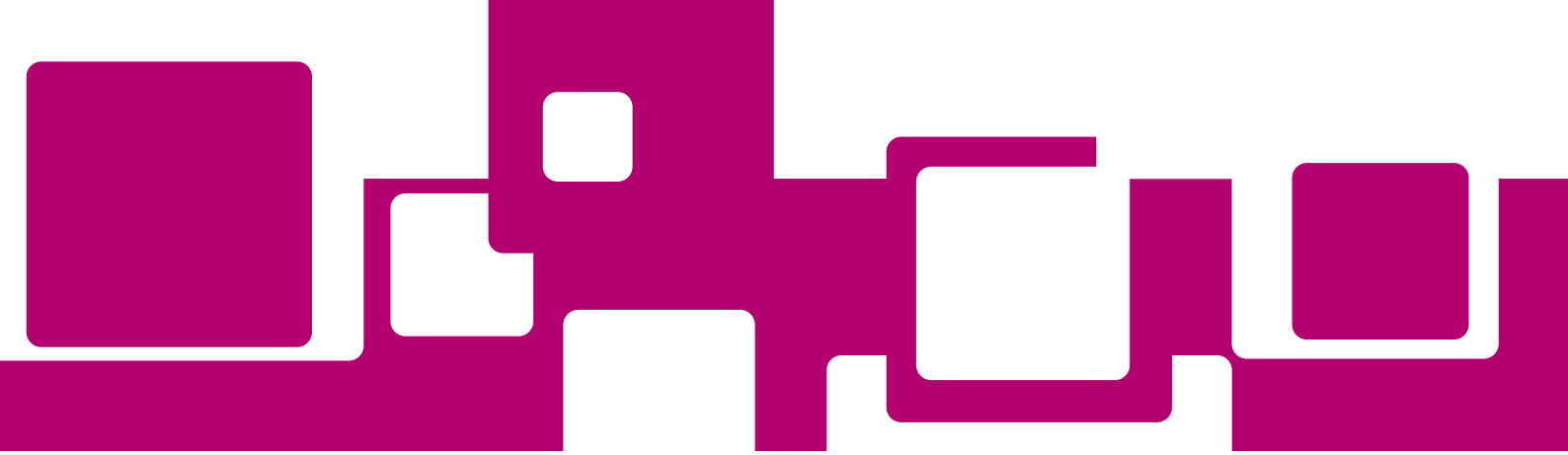
devono tenere conto della variegata realtà operativa italiana e nello stesso tempo fissare parametri condivisi in grado di fornire tutti gli elementi utili a raggiungere una soddisfacente riproducibilità diagnostica. Come in tutti i campi dell'attività diagnostica anatomo-patologica le variabili di processo sono molteplici e devono essere rigorosamente controllate. Sono pertanto di seguito presentate le variabili di processo e le tecniche molecolari più frequentemente adottate sul territorio nazionale, seguendo il work-flow dell'analisi mutazionale.

Il campione biologico da esaminare: tumore primitivo o metastasi?

Le mutazioni dei geni RAS sono in genere un evento precoce e stabile nei CRC, evidenziabile in tutta la storia naturale della malattia. Pertanto, le mutazioni di RAS sono in genere rappresentate in maniera omogenea nel contesto del tessuto tumorale. Inoltre, la maggioranza degli studi ha dimostrato un'elevata concordanza dello stato mutazionale di RAS tra tumore primitivo e metastasi epatiche. In contrasto, una discordanza del 25% è stata riportata tra tumore primitivo e metastasi linfonodali. Dati preliminari suggeriscono discordanze significative anche per le metastasi polmonari. Infine, studi recenti suggeriscono che i trattamenti con farmaci anti-EGFR possono selezionare cloni RAS mutati. In conclusione, il test RAS può essere effettuato sia sul tumore primitivo che sulla metastasi, tenendo tuttavia conto della possibile discordanza per le localizzazioni polmonari e linfonodali. La discordanza tra tumore primitivo e metastasi può essere maggiore nei pazienti con metastasi metacrone rispetto alle sincrone, soprattutto in caso di trattamento con farmaci anti-EGFR. In questi pazienti una rivalutazione dello stato di RAS potrebbe rivelare modifiche del profilo mutazionale.

Preparazione del campione di tessuto

La maggior parte dei campioni impiegati per il test RAS nel CRC è rappresentata da pezzi operatori. Tuttavia, in un limitato numero di pazienti possono es-



sere disponibili solo biopsie endoscopiche o agobiopsie (tru-cuts), in cui spesso solo una piccola parte del prelievo è idonea per la valutazione molecolare. In rari casi possono essere disponibili solo campioni citologici che possono essere impiegati quando non si ha a disposizione altro materiale e quando un sito di metastasi può essere facilmente aggredito senza creare significativo disagio al paziente.

Come premesso, in genere la maggioranza delle cellule neoplastiche sono mutate nei tumori con mutazioni di RAS. Tuttavia, 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 in quanto alleli wild type delle cellule non-trasformate determinano una diluizione degli alleli mutati. Pertanto, l'anatomo patologo deve effettuare un accurato esame microscopico del tessuto prelevato ed eventualmente provvedere a selezionare le aree tumorali mediante dissezione, al fine di arricchire di cellule neoplastiche il preparato che sarà sottoposto ad analisi.

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 impiegano procedure di analisi standard (quali il 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 biotici o citologici. Il risultato dell'esame dipende oltre che dalla quantità, anche dalla qualità del materiale biologico disponibile. Come indicazione di massima, anche se si utilizzano metodiche sensibili per l'analisi mutazionale, è preferibile non procedere all'analisi se non sono presenti almeno 100 cellule neoplastiche nel campione. È responsabilità del patologo valutare la componente tumorale nel campione e definire se essa

possa essere testata con il saggio disponibile in laboratorio. È fortemente consigliato valutare il contenuto tumorale su sezioni colorate con Ematossilina-Eosina ottenute dall'inclusione scelta, prima e dopo avere fatto eseguire le sezioni da cui estrarre il DNA. I risultati di tale attività devono essere registrati e riportati nel referto.

Infine, può accadere di dovere gestire l'analisi su lesioni precedentemente sottoposte a terapia neoadiuvante. Nel caso di regressione completa l'unica possibilità resta quella di eseguire l'analisi sulla biopsia diagnostica endoscopica. Se questa manca e nel pezzo operatorio residuano rare cellule disperse nella desmoplasia o nella flogosi, possono essere adottate metodiche ad alta sensibilità previa cattura delle cellule tumorali mediante microdissezione laser. Le sezioni istologiche significative (almeno cinque) devono essere inviate ad un centro di riferimento dotato di Laser Capture Microdissection.

Estrazione 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 ridurre 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 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.

Raccomandazioni AIOM e SIAPEC-IAP per la valutazione delle mutazioni di RAS nel carcinoma del colon-retto

Analisi mutazionale di RAS

Tutte le metodiche analitiche si fondano sulla capacità di discriminare gli alleli mutati da quelli wild-type e presentano notevoli differenze in termini di sensibilità. Tuttavia, tali differenze non determinano risultati diversi quando una accurata selezione dell'area tumorale da sottoporre ad analisi viene effettuata. Infatti, gli studi clinici che hanno determinato la approvazione dei farmaci anti-EGFR per i soli pazienti KRAS ed NRAS wild type, pur impiegando tecniche di analisi con diversi livelli di sensibilità (dal sequenziamento di Sanger al pirosequenziamento ed alla next generation sequencing), hanno riportato percentuali di mutazioni di RAS sovrapponibili. La scelta della metodica di indagine dovrebbe essere quindi effettuata in base alle caratteristiche del campione, tenendo conto della necessità di impiegare metodiche ad elevata sensibilità per i casi nei quali una dissezione non è praticabile.

Di seguito sono brevemente descritte le tecniche di analisi che attualmente sono maggiormente impiegate nei laboratori italiani.

Sequenziamento bi-direzionale secondo Sanger

Questa metodica è considerata affidabile, robusta e poco costosa. Alcune pubblicazioni hanno dimostrato che non ci sono differenze sostanziali tra il sequenziamento di Sanger e tecniche di Real Time PCR nell'identificare mutazioni di KRAS, quando il campione in esame contiene almeno il 30% di cellule tumorali. Una soglia del 50% viene tuttavia raccomandata in maniera prudenziale, dato che la sensibilità della tecnica di sequenziamento diretto può variare notevolmente da laboratorio a laboratorio (dal 10% al 25%). Per questo motivo, è di fondamentale importanza che ogni laboratorio definisca il suo limite di rilevamento (Limit of Detection, LOD) con dei reference standard di DNA. Per LOD si deve intendere la più bassa concentrazione di DNA mutato diluito in DNA wild type in cui è possibile identificare una mutazione target con il 100% di precisione nei replicati.

Dato che le mutazioni somatiche sono in genere


in eterozigosi, la minima componente neoplastica presente nella sezione dovrebbe essere quantitativamente doppia rispetto al limite di rilevazione strumentale. Per esempio un campione con il 10% di cellule tumorali dovrebbe essere testato con una metodica con limite di rilevazione di almeno il 5%. Particolare attenzione va dedicata alla formazione del personale che riveste un ruolo chiave nella valutazione dei ferogrammi proposti dal software analitico del sequenziatore. Nei casi in cui si identifichino picchi a bassa intensità possibilmente identificabili come mutazioni, è sempre prudente confermare la mutazione con altra metodica al fine di distinguere un picco vero da un eccesso di background.

Ogni laboratorio deve validare il proprio saggio di sequenziamento. Per la validazione, oltre ad individuare i limiti di sensibilità della metodica, la precisione e la accuratezza, è necessario confrontare gli esiti del test con quelli ottenuti con altra metodica (ad esempio Real Time-PCR). Il numero di test da eseguire per validare la metodica varia in funzione del numero dei casi studiati; il numero è infatti proporzionale al potere statistico nelle analisi di validazione. Il College of American Pathologists ha recentemente riportato che 40 casi siano sufficienti per la validazione di un assay non commerciale; il potere statistico generato da 40 casi corrisponde ad una sensibilità attesa del 92.5%. Per raggiungere una sensibilità attesa del 99% occorrerebbe testare 300 casi.

In conclusione, il sequenziamento diretto resta una metodica di riferimento solo in mani esperte, in un laboratorio certificato con procedure ben definite e se affiancato da metodiche ad alta sensibilità necessarie per risolvere i casi dubbi. Il suo vantaggio resta quello di potere identificare mutazioni rare non comprese in pannelli commerciali.

High resolution melting analysis (HRMA)

Questa metodica è poco usata nei laboratori italiani, sebbene presenti caratteristiche molto interessanti: è rapida, sensibile e molto economica. Non è in grado di identificare una mutazione specifica, ma rivela variazioni di sequenza mediante l'analisi dei profili di melting (dissociazione) dei prodotti di



PCR. Le mutazioni si rivelano perché modificano la forma delle curve di melting del DNA. Attraverso la combinazione di cromogeni di nuova generazione, di strumenti tecnologicamente evoluti e di software analitici sofisticati, l'HRMA rappresenta un metodo efficace di screening mutazionale a basso costo.

L'HMA è tuttavia una metodica di screening, i cui risultati positivi devono essere confermati e identificati, in genere con sequenziamento diretto. Naturalmente la differente sensibilità tra le due metodiche può portare talora a risultati discordanti; in questo caso è utile avvalersi di metodiche ad elevata sensibilità come ad esempio la Real Time -PCR basata su sonde Scorpion o il pirosequenziamento.

Tecniche di Real Time - PCR

Numerosi kit per la determinazione delle mutazioni di KRAS, basati su diverse tecnologie di Real Time PCR, sono attualmente commercializzati in Italia. Tra questi, il TheraScreen KRAS Mutation Detection Kit (DxS-Qiagen) e il COBAS KRAS Mutation Test (Roche Molecular Systems) sono diffuse metodiche commerciali con elevate livelli di sensibilità. Tuttavia, il Therascreen è attualmente in grado di identificare solo le più comuni mutazioni di KRAS nei codoni 12 e 13. Pertanto, i laboratori che intendono effettuare l'analisi di RAS nel carcinoma del colon retto e che impiegano kit di Real Time PCR quali il Therascreen per la identificazione delle mutazioni di KRAS, devono avere a disposizione altre tecnologie per potere effettuare l'esame richiesto.

Il test COBAS offre la possibilità, attraverso l'impiego di due diversi kit, di individuare le principali mutazioni di KRAS ed NRAS. In particolare, il KRAS Mutation Test rileva mutazioni nei codoni 12/13, 61 e, per cross-reazione, 59 di KRAS; il kit KRAS/NRAS (LightMix KRAS/NRAS) copre KRAS nei codoni 117 e 146, ed NRAS nei codoni 12/13, 59-61, 117/146.

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. L'intensità è direttamente proporzionale al numero delle basi introdotte dalla DNA polimerasi nel filamento di DNA di nuova sintesi.

Le metodiche di pirosequenziamento hanno una LOD, intesa come percentuale minima di allele mutato rilevabile, pari al 5-10% e consentono di sequenziare corte regioni di DNA, ovviando ai problemi legati alla frammentazione del DNA estratto da tessuto fissato in formalina.

In commercio esistono kit validati per l'uso diagnostico che permettono l'identificazione delle principali varianti mutazionali dei codoni 12, 13, 59, 61, 117 e 146 dei geni KRAS ed NRAS. Tali kit forniscono gli opportuni controlli positivi e negativi da includere in ogni singola seduta di analisi. Come per le altre metodiche, particolare attenzione deve essere posta nella selezione e nella preparazione dei campioni da sottoporre all'analisi molecolare.

Spettrometria di Massa (MALDI-TOF)

La spettrometria di massa (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - time of flight, MALDI-TOF) con tecnologia primer extension è una tecnologia multiplex hot-spot che permette la genotipizzazione del campione analizzato mediante l'amplificazione del DNA seguita da una reazione di estensione a singola base di primer adiacenti ai siti polimorfici di interesse. Per ciascun sito polimorfico si ottengono uno o più analiti di massa nota, ciascuno corrispondente al genotipo wild-type oppure mutato del campione analizzato. La sensibilità analitica del metodo può variare dal 2.5% al 10% in base alla mutazione testata.

Ad oggi sono disponibili in commercio kit validati per l'uso diagnostico basati sulla spettrometria di massa MALDI-TOF che permettono, mediante l'utilizzo di PCR multiplex, la rivelazione delle principali mutazioni dei codoni 12, 13, 59, 61, 117 e 146 nei geni KRAS ed NRAS in un'unica analisi. Uno dei principali vantaggi di questa tecnica è quello

Raccomandazioni AIOM e SIAPEC-IAP per la valutazione delle mutazioni di RAS nel carcinoma del colon-retto

di permettere l'analisi mutazionale completa del campione con una quantità di DNA limitata ed inferiore a quella richiesta dalle altre metodologie. I kit disponibili forniscono anche gli opportuni controlli positivi e negativi da includere in ogni singola seduta di analisi.

L'applicazione di questa metodologia ha consentito l'ottimizzazione dei tempi di refertazione in considerazione dell'elevata processività e del fatto che nella stessa sessione di lavoro si ottiene la genotipizzazione completa del campione.

Next Generation Sequencing

Le tecniche di next generation sequencing (NGS) si basano sull'amplificazione clonale delle singole molecole di DNA, che successivamente vengono sequenziate indipendentemente ed in maniera ripetuta. A differenza quindi di quanto accade nel sequenziamento classico nel quale l'elettroferogramma è un segnale "misto" che deriva dalla somma di sequenze mutate e non, nella NGS c'è una rappresentazione digitale delle singole sequenze il che, almeno in teoria, ne aumenta notevolmente la sensibilità. Inoltre, i sequenziatori di nuova generazione consentono di analizzare in un singolo esperimento quantità di genoma di gran lunga maggiori rispetto al sequenziamento classico.

Esistono diverse applicazioni della NGS che consentono l'analisi anche dell'intero esoma o genoma. Tuttavia, l'applicazione di NGS che trova il maggiore impiego in clinica ed in particolare nel sequenziamento di RAS, è la cosiddetta "targeted resequencing", ovvero il sequenziamento di regioni definite del genoma, tipicamente coinvolte nella patogenesi delle neoplasie in quanto sedi di oncogeni ed antioncogeni.

Sono disponibili in commercio diversi pannelli di NGS che contengono i geni RAS, ed alcuni di que-

sti sono stati anche recentemente approvati per uso diagnostico. Tecniche di NGS sono state utilizzate in alcuni studi clinici ed il loro impiego in diagnostica sta incrementando progressivamente in Europa. La sensibilità analitica della maggioranza dei pannelli disponibili in commercio varia tra il 2% ed il 5%.

Il vantaggio dell'impiego dell'NGS è sicuramente rappresentato dalla possibilità di effettuare in una singola analisi una caratterizzazione completa della neoplasia in esame. Le metodiche di NGS sono tuttavia complesse, richiedono competenze non solo di biologia molecolare ma anche di bioinformatica, ed il loro impiego dovrebbe quindi essere limitato a laboratori con elevata esperienza.

Refertazione

Il referto è parte integrante della procedura diagnostica e deve contenere le seguenti informazioni:

- L'identificazione del paziente e del medico/struttura che ha richiesto l'analisi.
- L'identificazione del campione utilizzato per l'analisi
- La descrizione macroscopica, ivi inclusa la definizione della percentuale di cellule tumorali e la eventuale dissezione eseguita, con indicazione dell'anatomo-patologo responsabile
- La metodica impiegata per l'esecuzione dell'analisi con riferimento alla sensibilità del metodo.
- Gli esoni/codoni o le specifiche mutazioni sottoposte ad analisi.
- I risultati del test, con specificazione del tipo di mutazione eventualmente rilevata ed indicazione del responsabile della esecuzione del test molecolare

In considerazione dell'impatto sulla strategia terapeutica, il tempo per la refertazione non deve superare le due settimane dalla richiesta della determinazione.

Referenze bibliografiche

Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jasssem J, Rivera F, Kocákova I, Ruff P, Błasińska-Morawiec M, Šmakal M, Canon JL, Rother M, Williams R, Rong A, Wiezorek J, Sidhu R, Patterson SD. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2013 Sep 12;369(11):1023-34.

Heinemann V, von Weikersthal LF, Decker T, Kiani A, Vehling-Kaiser U, Al-Batran SE, Heintges T, Lerchenmüller C, Kahl C, Seipelt G, Kullmann F, Stauch M, Scheithauer W, Hiescher J, Scholz M, Müller S, Link H, Niederle N, Rost A, Höffkes HG, Moehler M, Lindig RU, Modest DP, Rossius L, Kirchner T, Jung A, Stintzing S. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014 Sep;15(10):1065-75.

van Krieken JH, Jung A, Kirchner T, Carneiro F, Seruca R, Bosman FT, Quirke P, Fléjou JF, Plato Hansen T, de Hertogh G, Jares P, Langner C, Hoeffler G, Ligtenberg M, Tiniakos D, Tejpar S, Bevilacqua G, Ensari A. KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. *Virchows Arch*. 2008 Nov;453(5):417-31.

Knijn N, Mekenkamp LJ, Klomp M, Vink-Börger ME, Tol J, Teerenstra S, Meijer JW, Tebar M, Riemersma S, van Krieken JH, Punt CJ, Nagtegaal ID. KRAS mutation analysis: a comparison between primary tumours and matched liver metastases in 305 colorectal cancer patients. *Br J Cancer*. 2011 Mar 15;104(6):1020-6.

Kim MJ1, Lee HS, Kim JH, Kim YJ, Kwon JH, Lee JO, Bang SM, Park KU, Kim DW, Kang SB, Kim JS, Lee JS, Lee KW. Different metastatic pattern according to the KRAS mutational status and site-specific discordance of KRAS status in patients with colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2012 Aug 9;12:347

Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiraman M,

Liska D, Valtorta E, Schiavo R, Buscarino M, Siravegna G, Bencardino K, Cercek A, Chen CT, Veronese S, Zanon C, Sartore-Bianchi A, Gambacorta M, Gallicchio M, Vakiani E, Boscaro V, Medico E, Weiser M, Siena S, Di Nicolantonio F, Solit D, Bardelli A. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature*. 2012 Jun 28;486(7404):532-6.

Malapelle U, Carlomagno C, de Luca C, Bellevicine C, Troncione G. KRAS testing in metastatic colorectal carcinoma: challenges, controversies, breakthroughs and beyond. *J Clin Pathol*. 2014 Jan;67(1):1-9.

Normanno N, Pinto C, Castiglione F, Bardelli A, Gambacorta M, Botti G, Nappi O, Siena S, Ciardiello F, Taddei G, Marchetti A. KRAS mutations testing in colorectal carcinoma patients in Italy: from guidelines to external quality Assessment. *PLoS ONE* 2011; (6) 12, 1-6.

Tol J, Dijkstra JR, Vink-Börger ME, Nagtegaal ID, Punt CJ, Van Krieken JH, Ligtenberg MJ. High sensitivity of both sequencing and real-time PCR analysis of KRAS mutations in colorectal cancer tissue. *J Cell Mol Med*. 2010 Aug;14(8):2122-31.

Carotenuto P, Roma C, Rachiglio AM, Tatangelo F, Pinto C, Ciardiello F, Nappi O, Iaffaioli RV, Botti G, Normanno N. Detection of KRAS mutations in colorectal carcinoma patients with an integrated PCR/sequencing and real-time PCR approach. *Pharmacogenomics*. 2010 Aug;11(8):1169-79.

Mattocks CJ, Morris MA, Matthijs G, Swinnen E, Corveleyn A, Dequeker E, Müller CR, Pratt V, Wallace A; EuroGentest Validation Group. A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. *Eur J Hum Genet*. 2010 Dec;18(12):1276-88.

Ciardiello F, Normanno N, Maiello E, Martinelli E, Troiani T, Piscconti S, Giuliani F, Barone C, Carteni G, Rachiglio AM, Montesarchio V, Tonini G, Rizzi D, Cinieri S, Bordonaro R, Febbraro A, De Vita F, Orditura M, Fenizia F, Lambiase M, Rinaldi A, Tatangelo F, Botti G, Colucci G. Clinical activity of FOLFIRI plus cetuximab according to extended gene mutation status by next-generation sequencing: findings from the CAPRI-GOIM trial. *Ann Oncol*. 2014 Sep;25(9):1756-61.



Realizzato con il contributo di

