



Protocollo per il controllo di qualità dello stato mutazionale del gene KRAS

Gruppo di Lavoro AIOM-SIAPEC-IAP per la Caratterizzazione bio-molecolare dei tumori del colon-retto - Determinazione dello stato mutazionale di KRAS

GianLuigi Taddei (Presidente Nazionale SIAPEC-IAP), Carmine Pinto (Coordinatore Nazionale WG AIOM Rapporti con Società scientifiche), Gerardo Botti (Napoli), Alberto Bardelli (Candiolo, Torino), Francesca Castiglione (Firenze), Marcello Gambacorta (Milano), Antonio Marchetti (Chieti), Nicola Normanno (Napoli), Salvatore Siena (Milano), Fortunato Ciardiello (Napoli), Oscar Nappi (Napoli).

Il progetto di controllo di qualità per la determinazione dello stato mutazionale di K-RAS ha la finalità di migliorare lo standard qualitativo per questa determinazione e permettere sull'intero territorio nazionale adeguate valutazioni nella selezione dei pazienti con carcinoma del colon-retto avanzato suscettibili di un trattamento con anticorpi monoclonali anti-EGFR.

L'adesione al Progetto Controllo di Qualità è volontario, riguarda i centri di anatomia patologica/biologia molecolare che effettuano questa determinazione con finalità clinica. I centri di anatomia patologica/biologia molecolare con esito positivo per controllo di qualità verranno elencati in un link previsto sui siti web di AIOM e SIAPEC-IAP. Per i centri con esito negativo è previsto un programma di formazione come di seguito riportato.

Il processo del controllo di qualità sarà gestito dal gruppo di lavoro comune AIOM-SIAPEC, coordinato da GianLuigi Taddei (Presidente Nazionale SIAPEC-IAP) e Carmine Pinto (Coordinatore Nazionale WG AIOM Rapporti con Società scientifiche) e composto da Alberto Bardelli (Candiolo, Torino), Gerardo Botti (Napoli), Francesca Castiglione (Firenze), Fortunato Ciardiello (Napoli), Marcello Gambacorta (Milano), Antonio Marchetti (Chieti), Oscar Nappi (Napoli), Nicola Normanno (Napoli), Salvatore Siena (Milano).

1. Costituzione dei centri di selezione del materiale da sottoporre ad analisi.

1.1 I centri di raccolta del materiale sono tre Anatomie Patologiche aventi come referenti Marcello Gambacorta (Milano), Antonio Marchetti (Chieti), GianLuigi Taddei (Firenze).

1.2 I tre centri, oltre al normale campionamento, raccolgono prospetticamente 10 campioni di neoplasia del colon-retto facendo attenzione ad evitare, nel campionamento, aree macroscopicamente necrotiche o che mostrino zone fibrotiche

in modo da garantire una percentuale di cellule neoplastiche superiore al 70% (80-90%).

Questi 10 casi verranno analizzati con indagini di biologia molecolare secondo il protocollo AIOM-SIAPEC-IAP per la ricerca dello stato mutazionale del gene K-RAS e serviranno come standard di riferimento per i partecipanti al controllo di qualità.

1.3 I centri di raccolta del materiale (Gambacorta, Marchetti, Taddei) invieranno i loro campioni analizzati in 5 sezioni in bianco dello spessore di 5 micron ai centri di controllo, diretti da: Alberto Bardelli (Candiolo, Torino), Antonio Marchetti (Chieti), Nicola Normanno (Napoli). Antonio Marchetti invierà i propri campioni a Marcello Gambacorta. Gli eventuali casi con discrepanze nelle determinazioni tra i differenti centri di controllo verranno esclusi e si procederà alla sostituzione con le medesime procedure.

2. Costituzione dei centri di controllo per la valutazione dello stato mutazionale del gene K RAS.

2.1 I centri previsti di controllo sono 3 con i già definiti referenti : Bardelli, Marchetti e Normanno.

2.2 Ogni centro di controllo riceve le sezioni in bianco e provvede alla ricerca dello stato mutazionale del gene K-RAS (codoni 12 e 13 esone 2) mediante PCR/sequenza (Bardelli, Marchetti) e REAL TIME PCR (Normanno).

2.3 Se i casi inviati avranno concordanza assoluta serviranno come standard di riferimento per i partecipanti al controllo di qualità.

3. Costituzione del centro raccolta e smistamento del materiale.

È previsto un unico centro di raccolta e distribuzione del materiale facente capo a Taddei.

4. Gestione dei casi concordanti.

4.1 Gestione dei casi concordanti e distribuzione materiale.

Dei casi concordanti al 100 % verranno individuati 5 casi : 2 con K-RAS WT e 3 con K-RAS mutato. Da ciascuno di questi 5 casi verranno preparate 400 sezioni in bianco

dello spessore di 5 micron. Sulla prima sezione, la 200° e la 400° verrà rivalutata, dai centri di selezione (Taddei, Marchetti, Gambacorta) lo stato mutazionale del gene K-RAS per la conferma dello stato del gene.

Nel caso in cui la 200° o la 400° sezione dessero un risultato discordante si provvederà a verifiche scalari: cioè si analizza la 350° e poi la 300°, e così in successione.

4.2 Tutte le sezioni ottenute verranno inviate a Firenze (Taddei) dove verrà creato un set da 25 vetrini, collezionati in modo casuale e provenienti dai 3 centri, contenenti casi WT e casi mutati di neoplasie del colon che verranno inviati ai centri che partecipano al controllo di qualità. I casi verranno etichettati in modo anonimo con codifica nota solo al gruppo di controllo.

4.3 Il centro che partecipa al controllo di qualità dovrà entro 30 giorni dalla data di consegna del materiale eseguire l'analisi mutazionale del gene K-Ras con la metodica in uso. Il centro dovrà inserire il dato in una scheda elettronica a cui si potrà accedere dai portali di AIOM-SIAPEC-IAP e contemporaneamente dovrà riempire la scheda allegata ed inviarla via fax al numero 055/430795.

4.4 I centri che aderiscono al controllo di qualità devono indicare la metodica utilizzata per la ricerca dello stato mutazionale del gene K-RAS come previsto nella scheda. Eventuali cambiamenti di metodica dovranno essere tempestivamente comunicati al gruppo di lavoro AIOM-SIAPEC-IAP.

5. Gestione dei risultati

5.1. I risultati delle determinazioni provenienti dai centri aderenti al progetto verranno valutati attraverso il sistema informatico, ed in questa primo test ricontrollati anche manualmente secondo le schede inviate via fax.

5.2 Il controllo di qualità verrà definitivo positivo se è stato ottenuto il 100% di concordanza nel test.

5.3 Se presente anche una sola discordanza nella valutazione, il test controllo di qualità verrà definito come negativo, e ripetuto con l'invio di nuove sezioni con le stesse modalità descritte dopo 1 mese.

5.4 Se il secondo test presenta una concordanza del 100% il risultato viene considerato positivo.

5.5 Se il secondo test presenta ancora discordanze, è previsto un programma di formazione tecnica presso centri di riferimento per la formazione distribuiti sul territorio nazionale (Candiolo-Bardelli, Milano-Gambacorta, Chieti-Marchetti, Firenze-Taddei, Napoli-Normanno, Palermo-Russo). È prevista una nuova rivalutazione del centro sottoposto a tutoraggio dopo 6 mesi.