

BRIDGE THE GAP

IN PRECISION MEDICINE

4 incontri

I Evento 30 giugno 2021 - 29 settembre 2021

II Evento 7 luglio 2021 - 30 settembre 2021

III Evento 14 luglio 2021 - 14 ottobre 2021

IV Evento 21 luglio - 21 ottobre 2021

Si ringraziano tutti coloro che hanno partecipato attivamente alla realizzazione di questo progetto, in particolare:

Nadia Barraco

D.A.I. Oncologia E Sanità Pubblica, U.O.C. di Oncologia Medica, A.O.U.P. "P. Giaccone"
Ospedale Universitario, Palermo

Rossella Bruno

Dirigente Biologo Genetica Medica –Patologia Molecolare, U.O. Anatomia Patologica 3,
Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana

Chiara Cremolini

Università di Pisa e Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana

Alfonso De Stefano

S.C. Oncologia Clinica Sperimentale Addome, Istituto Nazionale dei Tumori IRCCS – Fondazione G. Pascale

Filippo Fraggetta

Direttore di Anatomia Patologica, Ospedale Cannizzaro, Catania

Domenico Galetta

Responsabile SSD Oncologia Medica per la Patologia Toracica, IRCCS Istituto Tumori Giovanni Paolo II, Bari

Umberto Malapelle

Ricercatore Anatomia Patologica, Dip.to di Sanità Pubblica, Università degli Studi di Napoli Federico II

Fabio Pagni

SC Anatomia Patologica ASST Monza, Ospedale San Gerardo, Direttore della scuola
di specializzazione Anatomia Patologica, Università Milano Bicocca

Francesco Passiglia

Dipartimento di Oncologia, Università di Torino, AOU San Luigi Gonzaga, Orbassano, Torino

Giuseppe Perrone

Professore Ordinario, UO Anatomia Patologica, Policlinico Universitario Campus Bio-Medico, Roma

Filippo Pietrantonio

Medico Oncologo, Divisione di Oncologia Medica 1, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano

Sara Pilotto

Ricercatore Universitario, U.O. Oncologia, AOUI Verona

Danilo Rocco

Responsabile GOM Aziendale Neoplasie Pleuropolmonari – Dir. Medico,
UOC di Pneumologia ad indirizzo Oncologico, A. O. R. N. dei Colli – Plesso Monaldi, Napoli

Andrea Sartore Bianchi

ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano, Professore Associato di Oncologia Medica,
Dipartimento di Oncologia ed Emato-Oncologia, Università degli Studi di Milano

Giancarlo Troncone

Capo Dipartimento di Sanità Pubblica, Università degli Studi di Napoli Federico II

Razionale

Il Carcinoma del Polmone a Cellule non Piccole (NSCLC) rappresenta la principale causa di morte per neoplasia nei Paesi industrializzati.^[1] L'approccio chirurgico, ad oggi, è considerato il trattamento terapeutico d'elezione negli stadi iniziali di malattia, tuttavia un elevato gruppo di pazienti (60-70%) viene diagnosticato in stadio metastatico (III-IV), dove tale tipologia di approccio non è più adeguato a causa delle criticità cliniche associate all'elevato carico di malattia.^[2] Negli ultimi anni l'avvento della medicina personalizzata ha rivoluzionato il paradigma terapeutico per i pazienti affetti da NSCLC in fase avanzata, fornendo ai clinici la possibilità di disporre di un nuovo approccio terapeutico basato sull'utilizzo di farmaci a bersaglio molecolare quando le cellule tumorali sono provviste di specifiche etichette molecolari.^[3, 4]

Il capostipite dei geni che assolvono il ruolo di biomarcatori predittivi di risposta al trattamento nei pazienti affetti da NSCLC è il gene codificante per il fattore di crescita epidermico (*EGFR*). Lo studio clinico IPASS ha evidenziato come le alterazioni ricadenti in specifiche regioni codificanti (esone 19 e 21) apportino un beneficio clinico per i pazienti eletti al trattamento con inibitori tirosino-chinasici (TKIs) diretti contro il dominio del recettore.^[5] Recenti sviluppi hanno inoltre verificato che le mutazioni responsive al trattamento con TKIs si estendono agli esoni 18-19-20-21.^[6] Di particolare importanza, inoltre, è la mutazione puntiforme p.T790M a carico dell'esone 20 di *EGFR*. Questa alterazione molecolare indica il principale meccanismo di resistenza delle cellule neoplastiche al trattamento con TKIs di prima o seconda generazione. La rilevazione di questa mutazione in pazienti che hanno manifestato resistenza al primo approccio farmacologico è indicativa della possibilità di beneficiare dell'utilizzo di un TKIs di terza generazione diretto contro questa specifica alterazione molecolare.^[5, 6] In aggiunta al già complesso ed eterogeneo panorama mutazionale a carico del gene *EGFR*, studi recenti hanno approvato in pratica clinica la valutazione delle traslocazioni a carico di specifiche chinasi [ALK (*Anaplastic Lymphoma Kinase*); ROS1 (*ROS Proto-Oncogene 1*); RET (*Proto-Oncogene Tyrosine-Protein Kinase Receptor Ret*)] e delle mutazioni causative dell'*exon skipping* dell'esone 14 del gene *c-MET* (*Hepatocyte Growth Factor Receptor*) per i quali è riconosciuto un beneficio clinico in relazione all'utilizzo di particolari TKIs diretti contro la proteina affetta da queste alterazioni strutturali. Di recente introduzione in pratica clinica, inoltre, sono da registrare i farmaci a bersaglio molecolare diretti contro mutazioni puntiformi dell'esone 15 del gene *BRAF* (*V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1*) e dell'esone 2 del gene *KRAS* (*Kirsten rat sarcoma*).

Per quanto riguarda il gene *KRAS*, la possibilità di trattare i pazienti portatori della specifica alterazione p.G12C mediante l'utilizzo di una particolare classe di TKIs ha rivoluzionato la concezione del gene *KRAS* nei pazienti affetti da NSCLC, eleggendo *KRAS* al ruolo di biomarcatore predittivo positivo di risposta al trattamento con farmaci a bersaglio molecolare.^[7, 8] Dinanzi al composito quadro analitico emerso nel corso degli ultimi anni per consentire il più corretto inquadramento clinico del paziente affetto da NSCLC, i laboratori di patologia molecolare hanno dovuto affrontare problematiche biologiche e tecniche. In questi

laboratori, la principale tecnologia adoperata nell'analisi mutazionale dei biomarcatori predittivi di risposta al trattamento era rappresentata dalle piattaforme di RTqCPR che, nelle sue varie accezioni, consente di identificare la singola alterazione quando rappresentata ad una frequenza allelica compresa tra 1 e 5%.^[9] Tuttavia, il campione biologico disponibile nel 50-60% dei casi per eseguire sia la diagnosi morfologica che la caratterizzazione molecolare è rappresentato da piccole biopsie o da campioni citologici che risentono di una ridotta qualità e quantità di acidi nucleici estraibili.^[10]

Nel tentativo di superare la problematica dell'esiguità del materiale a disposizione su cui eseguire i differenti test molecolari a causa dell'incremento del numero dei biomarcatori richiesti, i laboratori di patologia molecolare hanno percepito l'esigenza di passare da approcci diagnostici "single testing" ad approcci diagnostici "multitesting", come ad esempio il sequenziamento genico di nuova generazione (NGS) che in una sola seduta analitica, indipendentemente dalla piattaforma utilizzata, permette di analizzare in simultanea molti geni differenti per più pazienti.^[11] I pannelli di NGS oggi in commercio, tuttavia, sono spesso caratterizzati da una ridotta profondità di copertura delle sequenze geniche di interesse, evidenziando l'impossibilità di ottenere un risultato interpretabile nel 15-20% dei casi. Per tale motivo è avvertita l'esigenza di utilizzare piattaforme semi-/full closed che supportino l'analisi mutazionale in quei casi dove l'esame molecolare risulti gravato da problematiche tecnico-analitiche.^[12]

Obiettivo del progetto

Alla luce delle problematiche tecniche di gestione del campione di NSCLC per la caratterizzazione dei biomarcatori di risposta al trattamento, a ciascun incontro (tot=4) hanno preso parte n=10 discenti rappresentanti di differenti istituzioni nazionali attivamente coinvolti nella caratterizzazione dei biomarcatori predittivi di risposta al trattamento in pratica clinica. Le finalità di questo evento riguardano la necessità di confrontare i percorsi analitici messi in atto dalle varie istituzioni e di identificare le criticità tecniche emerse, al fine di ottimizzare il percorso diagnostico per la caratterizzazione molecolare del paziente affetto da NSCLC.

Esercitazione pratica

A ciascun partecipante sono stati consegnati n=2 *reference standard* caratterizzati dalle mutazioni clinicamente rilevanti nei pazienti affetti da NSCLC. Ogni partecipante ha implementato il *workflow* diagnostico del suo centro per la valutazione molecolare del campione artificiale. Nel dettaglio, in ciascun centro l'estrazione degli acidi nucleici, l'analisi molecolare e l'interpretazione del risultato sono state eseguite in conformità con le normali pratiche analitiche del centro stesso.

Ciascun partecipante ha completato con successo l'analisi molecolare utilizzando il proprio *workflow* diagnostico. A tale riguardo, la stragrande maggioranza dei centri (63.6%) ha utilizzato una piattaforma di NGS, negli altri casi (27.3%) è stata adoperata una piattaforma di spettrometria di massa e in un solo caso (8.1%) è stata utilizzata una RtgPCR *semi-closed* per la valutazione mutazionale dei geni *EGFR*, *ALK*, *ROS*, *RET* e le mutazioni causative dell'esone 14 del gene *c-MET*. Tutti i centri hanno correttamente identificato l'alterazione p.G719S a carico dell'esone 18 del gene *EGFR*. Nel 72.7% dei centri è stata rilevata l'alterazione p.L858R nell'esone 21 del gene *EGFR*. In tutti i centri che non hanno rilevato la p.L858R del gene *EGFR* è stato utilizzato un approccio mirato attraverso l'impiego di una piattaforma di NGS. Per quanto concerne la delezione dell'esone 19 p.Glu746_Ala750del, è stata correttamente identificata nel 45.4% dei centri; inoltre, 4/5 dei centri che hanno correttamente identificato la delezione dell'esone 19 di *EGFR* hanno valutato positivamente la presenza della mutazione di resistenza p.T790M nell'esone 20. In relazione alla mutazione p.V600E dell'esone 15 del gene *BRAF*, tutti i centri hanno correttamente individuato l'alterazione. Per quanto concerne le traslocazioni di rilevanza clinica analizzate dai centri, le traslocazioni *EML4(13)/ALK(20)*, *SLC34A2(4)/ROS1(32)* e *CCDC6(1)/RET(12)* sono state rilevate da tutti i centri indipendentemente dall'approccio tecnologico utilizzato. Inoltre, la traslocazione *SLC34A2(4)/ROS1(34)* è stata identificata nel 90.9% dei centri. Di particolare rilevanza è la valutazione mutazionale delle traslocazioni a carico del gene *RET* e delle mutazioni causative dell'*exon skipping* del gene *c-MET*. Riguardo alla traslocazione del gene *RET CCDC6(1)/RET(11)*, un unico centro è stato in grado di individuare l'alterazione mentre l'*exon skipping* del gene *c-MET* è stata rilevata nel 18.2% delle istituzioni.

Take-home message

- L'analisi delle mutazioni di *EGFR* richiede particolare attenzione nella corretta interpretazione delle alterazioni molecolari. La presenza della mutazione di resistenza p.T790M, a causa della presenza di un polimorfismo adiacente alla regione genica nella quale ricade l'alterazione molecolare, può non essere correttamente interpretata. La valutazione di questa alterazione molecolare assume rilevanza nei pazienti che sviluppano resistenza dopo una prima linea di trattamento dove l'unico campione disponibile è rappresentato da un prelievo di sangue periferico. In questo scenario l'utilizzo di tecnologie molto sensibili in grado di analizzare *in deep* questa regione genica è preordinante ai fini della corretta realizzazione dell'analisi mutazionale.
- Nel contesto dei pazienti affetti da NSCLC, dove la stragrande maggioranza dei pazienti ha a disposizione un campione paucicellulato (piccola biopsia o campione citologico) sul quale eseguire l'indagine morfologica e molecolare, l'utilizzo di tecnologie di NGS consente di ottimizzare la fase analitica attraverso l'analisi simultanea del sempre crescente numero di biomarcatori da dover testare nei pazienti affetti da NSCLC.
- L'utilizzo di *pipeline* bioinformatiche ottimizzate e standardizzate per l'interpretazione del dato molecolare è cruciale ai fini della corretta tipizzazione molecolare del campione in esame. In particolare, le tecnologie che approcciano alla valutazione dei trascritti di fusione che hanno rilevanza clinica nei pazienti affetti da NSCLC possono non interpretare correttamente l'eterogeneo *breakpoint* di fusione del gene *ROS1*.
- L'utilizzo di piattaforme di NGS consente di arricchire l'analisi mutazionale attraverso l'identificazione di alterazioni molecolari oggetto di studio in *trials* clinici in atto, al fine di elaborare il più corretto inquadramento clinico per il paziente affetto da NSCLC.

Razionale

Il carcinoma del colon retto-metastatico (mCRC) rappresenta la terza tipologia di cancro per incidenza nei soggetti di sesso maschile e la seconda nei soggetti di sesso femminile. Nel 2018, i dati della Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) riportavano 1,8 milioni di nuovi casi e 861.000 morti.^[13] Sebbene questa patologia sia caratterizzata da sintomatologia latente fin dagli stadi iniziali della malattia, è stato stimato che nel 40% dei casi i pazienti affetti da mCRC sviluppano metastasi epatiche che portano alla compromissione funzionale dell'organo.^[14] Per quanto concerne gli approcci terapeutici, la chirurgia in combinazione con la radio/chemioterapia rappresenta il trattamento convenzionale per i pazienti negli stadi iniziali della malattia.^[15] Negli stadi avanzati della malattia, l'approccio interventistico deve essere integrato con la valutazione molecolare di alcuni geni che assolvono il ruolo di biomarcatori predittivi di risposta al trattamento.^[16]

Nel dettaglio, a partire dal 2012 le linee guida dell'Associazione Americana di Oncologia Clinica (ASCO) hanno definito come obbligatoria l'analisi degli esoni 2, 3 e 4 nei geni *KRAS* (*Kirsten rat sarcoma*) e *NRAS* (*Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog*) per la corretta selezione dei pazienti eleggibili al trattamento con anticorpi monoclonali (Cetuximab e Panitumumab) diretti contro la porzione extra-citoplasmatica del recettore per il fattore di crescita epidermico (*EGFR*).^[17,18] Inoltre, le linee guida del National Comprehensive Cancer Network (NCCN) (Version 2.2018) raccomandano la valutazione dello stato mutazionale del gene *BRAF* (*v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*), avente significatività prognostica in relazione all'approccio chemioterapico.^[19] In aggiunta, il panorama mutazionale si è arricchito anche della valutazione del quadro di instabilità a carico dei microsatelliti (H-MSI), regioni mono-dinucleotidiche aventi per lo più funzione non codificante, che sono utilizzate per la diagnosi di patologie sindromiche (Sindrome di Lynch) o per identificare il gruppo di pazienti eleggibili al trattamento con inibitori del *checkpoint* immunitario (ICIs).^[20]

In relazione all'impianto metodologico utilizzato per la caratterizzazione molecolare dei biomarcatori predittivi di risposta al trattamento nei pazienti affetti da mCRC, il panorama risulta eterogeneo. Inizialmente, le piattaforme di sequenziamento genico diretto secondo *Sanger* rappresentavano il *gold standard* per l'analisi mutazionale dell'esone 2 del gene *KRAS*. Tuttavia, di pari passo al progresso scientifico in materia di biomarcatori predittivi che ha portato all'introduzione in pratica clinica delle mutazioni a carico degli esoni 2, 3 e 4 dei geni *K-N RAS*, si è resa evidente la necessità di introdurre nella diagnostica molecolare di laboratorio tecnologie in grado di far fronte all'ampliamento del numero di analisi da dover effettuare per consentire il più corretto inquadramento clinico del paziente oncologico.^[21] In aggiunta alle problematiche di tipo clinico-diagnostico, l'ottimizzazione del percorso analitico-diagnostico risultava necessaria anche alla luce di problematiche di tipo tecnico. Nel 30% dei casi dei pazienti affetti da mCRC l'unico campione disponibile è rappresentato da una piccola biopsia di tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina, caratterizzata dalla ridotta quantità di acidi nucleici estraibili da questa tipologia di campione. Viceversa, nel 70% dei casi dove il campione biologico per l'estrazione degli acidi nucleici è rappresentato

da una resezione chirurgica, la qualità è comunque inficiata dai processi di fissazione in formalina e inclusione in paraffina.^[22]

Queste limitazioni hanno incoraggiato la diffusione e l'utilizzo di metodologie analitiche più sensibili, in grado di rilevare tutte le alterazioni molecolari clinicamente rilevanti a partire da campioni caratterizzati da una ridotta qualità e/o quantità di acidi nucleici.^[23, 24] In questo ambito, un ruolo di primo piano spetta alle tecnologie di sequenziamento genico di nuova generazione (NGS) caratterizzate dalla possibilità di analizzare differenti target molecolari con un unico processo analitico. Queste tecnologie, tuttavia, richiedono un elevato *knowhow* ed elevati costi di gestione. Per far fronte a queste limitazioni sono state parallelamente introdotte in pratica clinica delle piattaforme di RTqPCR *semi-/full closed* che consentono di individuare le alterazioni molecolari ad elevata rilevanza clinica.^[25]

Queste piattaforme, d'altro canto, sono caratterizzate da una più modesta sensibilità analitica rispetto alle piattaforme di NGS e dall'impossibilità, in alcuni casi, di qualificare l'alterazione molecolare identificata. Alla luce di queste differenze tecnico-analitiche identificate nell'implementazione delle tecnologie per la caratterizzazione delle alterazioni nei geni *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* nei pazienti affetti da mCRC, questo progetto ha visto il coinvolgimento di n=11 istituzioni impegnate nell'analisi molecolare dei biomarcatori predittivi di risposta al trattamento, con la finalità di confrontare i percorsi analitici messi in atto dalle varie istituzioni e di identificare le criticità tecniche emerse.

Obiettivo del progetto

Alla luce delle problematiche tecniche di gestione del campione di mCRC per la caratterizzazione dei biomarcatori di risposta al trattamento, a ciascun incontro (tot=4) hanno preso parte n=10 discenti rappresentanti di differenti istituzioni nazionali attivamente coinvolti nella caratterizzazione dei biomarcatori predittivi di risposta al trattamento in pratica clinica. Le finalità di questo evento riguardano la necessità di confrontare i percorsi analitici messi in atto dalle varie istituzioni e di identificare le criticità tecniche emerse al fine di ottimizzare il percorso diagnostico per la caratterizzazione molecolare del paziente affetto da mCRC.

Esercitazione pratica

A ciascun partecipante sono stati consegnati n=2 *reference standard* caratterizzati dalle mutazioni clinicamente rilevanti nei pazienti affetti da mCRC. Ogni partecipante ha implementato il *workflow* diagnostico del suo centro per la valutazione molecolare del campione artificiale.

Nel dettaglio, in ciascun centro l'estrazione degli acidi nucleici, l'analisi molecolare e l'interpretazione del risultato sono state eseguite in conformità con le normali pratiche analitiche del centro stesso.

Discussione

Ciascun centro ha completato con successo l'analisi molecolare utilizzando il proprio *workflow* diagnostico. A tale riguardo, la stragrande maggioranza dei centri (63.6%) ha utilizzato una piattaforma di NGS, nel 27.3% dei casi è stata utilizzata una piattaforma di spettrometria di massa e in un solo caso (8.1%) è stata utilizzata una RTqPCR *semi-closed* per la valutazione mutazionale dei geni *KRAS*, *NRAS* e *BRAF*.

In tutti i centri è stata correttamente identificata l'alterazione p.G13D a carico dell'esone 2 del gene *KRAS*, mentre nel 90.9% dei centri è stata rilevata l'alterazione p.G12D nell'esone 2 del gene *KRAS*. Nel dettaglio, il centro che non ha rilevato la presenza della mutazione p.G12D ha utilizzato un approccio in RTqPCR.

Per quanto concerne il gene *NRAS*, l'alterazione molecolare p.Q61K a carico dell'esone 3 è stata correttamente identificata nel 90.9% dei centri; anche in questo caso il centro che non ha rilevato l'alterazione basava il proprio *workflow* sull'utilizzo di una piattaforma di RTqPCR.

In aggiunta, l'alterazione molecolare p.Q61L dell'esone 3 del gene *NRAS* è stata rilevata in un unico centro che ha utilizzato una piattaforma di NGS per la valutazione mutazionale. In merito alla valutazione dell'assetto mutazionale del gene *BRAF*, tutti i centri sono stati in grado di identificare la mutazione p.V600E a carico dell'esone 15, mentre in un caso è stata anche valutata la presenza dell'alterazione p.R347* nell'esone 11 del gene.

Take-home message

- I centri coinvolti sono stati in grado di identificare le alterazioni clinicamente rilevanti nei geni che assolvono il ruolo di biomarcatori predittivi nei casi di mCRC (*BRAF*, *KRAS*, *NRAS*) indipendentemente dall'approccio tecnologico utilizzato (NGS, RTqPCR)
- Le tecnologie a sonde possono generare dei risultati falsi negativi a causa dell'elevata omologia a carico di alcune sequenze geniche. Dalla discussione è emerso, infatti, che l'alterazione p.G12D a carico dell'esone 2 del gene *KRAS* non è stata correttamente rilevata attraverso l'utilizzo di un approccio tecnologico basato sull'impiego di sonde, mentre è stata correttamente individuata la mutazione p.G13D a carico dell'esone 2 del gene *KRAS* attraverso questo tipo di approccio tecnologico.
- L'interpretazione dei risultati rappresenta un momento cruciale nel *workflow* analitico votato all'identificazione delle alterazioni molecolari che hanno riscontro in pratica clinica. L'identificazione di alterazioni caratterizzate da frequenze mutazionali borderline in relazione al *limit of detection* (LoD) di ciascuna tecnologia richiede l'ottimizzazione di percorsi analitici standardizzati attraverso l'ausilio di *tools* mirati per la ricerca delle alterazioni clinicamente rilevanti a partire da campioni della routine diagnostica che guidino l'utente all'interpretazione del dato molecolare.
- L'utilizzo di piattaforme di NGS consente di arricchire l'analisi mutazionale attraverso l'identificazione di alterazioni molecolari oggetto di studio in *trials* clinici in atto, al fine di elaborare il più corretto inquadramento clinico per il paziente affetto da mCRC.

Referenze

1. F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J. Clin.* 68 (2018) 394–424.
2. J. Ferlay, M. Colombet, I. Soerjomataram, et al., Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018, *Eur. J. Cancer* 103 (2018) 356–387.
3. European Society for Medical Oncology, *Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up, 2020* (Accessed 4 February 2021), <https://www.esmo.org/content/download/347819/6934778/1/ESMO-CPG-mNSCLC-15SEPT2020.pdf>.
4. S.R. Yang, A.M. Schultheis, H. Yu, D. Mandelker, M. Ladanyi, R. Büttner, Precision medicine in non-small cell lung cancer: Current applications and future directions, *Semin. Cancer Biol.* (2020), <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.07.009>, 27 Jul [Epub ahead of print].
5. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, Sunpaweravong P, Han B, Margono B, Ichinose Y, Nishiwaki Y, Ohe Y, Yang JJ, Chewaskulyong B, Jiang H, Duffield EL, Watkins CL, Armour AA, Fukuoka M. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med.* 2009;361:947-57.
6. L.R. Yates, J. Seoane, C. Le Tourneau, et al., The European Society for Medical Oncology (ESMO) precision medicine glossary, *Ann. Oncol.* 29 (1)(2018) 30–35.
7. E. Smolle, K. Leithner, H. Olschewski, Oncogene addiction and tumor mutational burden in non-small-cell lung cancer: clinical significance and limitations, *Thorac. Cancer* 11(2)(2020) 205–215.
8. F. Skoulidis, J.V. Heymach, Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy, *Nat. Rev. Cancer* 19 (9)(2019) 495–509.
9. Malapelle U, Pilotto S, Passiglia F, Pepe F, Pisapia P, Righi L, Listi A, Bironzo P, Belluomini L, Tabbò F, Reale ML, Russo G, De Luca C, Novello S, Troncone G. Dealing with NSCLC EGFR mutation testing and treatment: A comprehensive review with an Italian real-world perspective. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2021;160:103300
10. Vigliar E, Malapelle U, Bellevicine C, de Luca C, Troncone G. Outsourcing cytological samples to a referral laboratory for EGFR testing in non-small cell lung cancer: does theory meet practice? *Cytopathology.* 2015;26:312-7
11. De Luca C, Rappa AG, Gragnano G, Malapelle U, Troncone G, Barberis M. Idylla assay and next generation sequencing: an integrated EGFR mutational testing algorithm. *J Clin Pathol.* 2018;71:745-750.
12. De Luca C, Conticelli F, Leone A, Gragnano G, Salatiello M, Galasso P, Pisapia P, Grillo LR, Iaccarino A, Vigliar E, Bellevicine C, Malapelle U, Troncone G. Is the Idylla EGFR Mutation Assay feasible on archival stained cytological smears? A pilot study. *J Clin Pathol.* 2019;72:609-614.
13. GLOBOCAN database, <https://gco.iarc.fr>
14. Yang YC, Wang D, Jin L, Yao HW, Zhang JH, Wang J, Zhao XM, Shen CY, Chen W, Wang XL, Shi R, Chen SY, Zhang ZT. Circulating tumor DNA detectable in early- and late-stage colorectal cancer patients. *Biosci Rep.* 2018 31;38.
15. Benson AB 3rd, Venook AP, Al-Hawary MM, Cederquist L, Chen YJ, Ciombor KK, Cohen S, Cooper HS, Deming D, Engstrom PF, Garrido-Laguna I, Grem JL, Grothey A, Hochster HS, Hoffe S, Hunt S, Kamel A, Kirilcuk N, Krishnamurthi S, Messersmith WA, Meyerhardt J, Miller ED, Mulcahy MF, Murphy JD, Nurkin S, Saltz L, Sharma S, Shibata D, Skibber JM, Sofocleous CT, Stoffel EM, Stotsky-Himelfarb E, WillettCG, Wuthrick E, Gregory KM, Freedman-Cass DA. NCCN Guidelines Insights: Colon Cancer, Version 2.2018. *J Natl Compr Canc Netw.* 2018;16: 359–369.
16. Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, de Braud F, Schuch G, Zobel A, Celik I, Schlichting M, Koralewski P. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. *Ann Oncol.* 2011;22: 1535-46.
17. Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, D'Haens G, Pintér T, Lim R, Bodoky G, Roh JK, Folprecht G, Ruff P, Stroh C, Tejpar S, Schlichting M, Nippgen J, Rougier P. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2009;360: 1408-17.
18. Soric MJ, Wiese MD, Rowland A, Kichenadasse G, McKinnon RA, Karapetis CS. Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Ann Oncol.* 2015;26: 13-21.
19. Kalemkerian GP, Narula N, Kennedy EB, Biermann WA, Donington J, Leigh NB, Lew M, Pantelas J, Ramalingam SS, Reck M, Saqi A, Simoff M, Singh N, Sundaram B. Molecular Testing Guideline for the Selection of Patients With Lung Cancer for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: American Society of Clinical Oncology Endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol.* 2018;36: 911-919.
20. Nojadeh JN, Behrouz Sharif S, Sakhinia E. Microsatellite instability in colorectal cancer. *EXCLI J.* 2018;17:159-168.
21. Seufferlein T, Simões C, Kude F, Ettrich TJ. Molecular Approaches to Metastatic Colorectal Cancer: Better Diagnosis - Better Treatment? *Visc Med.* 2019;35: 259-264.
22. Malapelle U, Pisapia P, Sgariglia R, Vigliar E, Biglietto M, Carlomagno C, Giuffrè G, Bellevicine C, Troncone G. Less frequently mutated genes in colorectal cancer: evidences from next-generation sequencing of 653 routine cases. *J ClinPathol.* 2016;69: 767-71.
23. Maxwell P, Hynes SO, Fuchs M, Craig S, McGready C, McLean F, McQuaid S, James J, Salto-Tellez M. Practical guide for the comparison of two next-generation sequencing systems for solid tumour analysis in a universal healthcare system. *J Clin Pathol.* 2018 [Epub ahead of print].
24. Karnes HE, Duncavage EJ, Bernadt CT. Targeted next-generation sequencing using fine-needle aspirates from adenocarcinomas of the lung. *Cancer Cytopathol.* 2014;122: 104-13.
25. De Luca C, Vigliar E, d'Anna M, Pisapia P, Bellevicine C, Malapelle U, Troncone G. KRAS detection on archival cytological smears by the novel fully automated polymerase chain reaction-based Idylla mutation test. *CytoJournal.* 2017;14:5.

Progetto realizzato grazie
al sostegno non condizionante di



Medica
EDITORIA E DIFFUSIONE SCIENTIFICA

Provider ECM ID 2157
SEGRETERIA SCIENTIFICA E ORGANIZZATIVA
Medica - Editoria e Diffusione Scientifica Srl Con Unico Socio
Corso Buenos Aires, 431 20124 Milano
PIVA/CF 12399510152
T +39 02 76281337 M info@medicacom.it
F +39 02 83601995 W www.medicacom.it