



Raccomandazioni AIOM e SIAPEC-IAP per l'analisi mutazionale del gene EGFR nel carcinoma polmonare

Aggiornamento Marzo 2014

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

*AIOM: Nicola Normanno (Napoli), Andrea Ardizzoni (Parma),
Lucio Crinò (Perugia), Cesare Gridelli (Avellino),
Giorgio Scagliotti (Torino), Carmine Pinto (Bologna)*

*SIAPEC-IAP: Antonio Marchetti (Chieti), Massimo Barberis (Milano),
Claudio Clemente (Milano), Eugenio Maiorano (Bari),
Mauro Papotti (Torino), Giulio Rossi (Modena),
Gianluigi Taddei (Firenze), Gaetano De Rosa (Napoli)*



Raccomandazioni AIOM e SIAPEC-IAP per l'analisi mutazionale del gene EGFR nel carcinoma polmonare

Indicazioni cliniche

La determinazione dello stato mutazionale di EGFR si rende necessaria per la scelta della migliore strategia terapeutica in pazienti selezionati con carcinoma polmonare non a piccole cellule (Non-small Cell Lung Cancer/NSCLC) in stadio IIIB e IV. Nell'ambito del NSCLC, sono gli adenocarcinomi puri o le neoplasie con una componente di adenocarcinoma mista a carcinoma squamoso (adeno-squamoso) od a carcinoma a grandi cellule a presentare una maggiore incidenza di mutazioni. L'immunoistochimica è importante per identificare l'adenocarcinoma poco differenziato. Tuttavia, nella pratica diagnostica il suo uso va bilanciato con la necessità di preservare il tessuto per le indagini molecolari. Il test molecolare va comunque eseguito nel caso l'anatomopatologo non sia in grado di tipizzare il NSCLC definito come non altrimenti specificato (NAS).

I pazienti non fumatori o deboli fumatori con diagnosi di carcinoma squamoso, soprattutto se effettuata su campioni non rappresentativi di tutta la neoplasia quali piccole biopsie o materiale citologico, dovrebbero essere sottoposti al test EGFR, perché sui campioni non operatori non è possibile escludere la presenza di una componente di adenocarcinoma.

La determinazione delle mutazioni di EGFR può essere eseguita su pezzo operatorio oppure su prelievo biotico o citologico indifferentemente sul tumore primitivo o sulla metastasi. Nel caso si disponga sia di lesioni primitive che metastatiche, il test deve essere eseguito sul campione migliore in termini quantitativi e qualitativi. A parità di condizioni sarà selezionato il campione più recente.

Nei pazienti non fumatori, deboli fumatori (< 15 pacchetti/anno o ≤ 5 sigarette al giorno) ed ex-fumatori (da ≥ 15 anni), per i quali non è disponibile un adeguato materiale, può essere indicato un ulteriore prelievo biotico per permettere la successiva determinazione molecolare quando clinicamente indicato.

Il materiale biologico per l'analisi molecolare

Un campione di tessuto è disponibile in circa il 50% dei pazienti con NSCLC ed è ottenuto al momento della diagnosi (biopsia bronchiale, frustolo da core biopsy transtoracica o biopsia pleurica toracoscopica) o nel corso di intervento chirurgico (campione chirurgico).

Il tessuto, fissato in formalina ed incluso in blocco di paraffina, è indispensabile per la diagnosi istologica ed è conservato negli archivi delle Anatomie Patologiche. Purtroppo, in una elevata percentuale di pazienti non è disponibile un campione istologico. In molti di questi casi si dispone di materiale citologico, ottenuto mediante agoaspirazione, lavaggio bronchiale e broncoalveolare, "brushing" bronchiale o toracentesi. La presenza al momento del prelievo di un citologo dedicato per la valutazione immediata dell'adeguatezza e per la gestione del materiale prelevato è di grande utilità. Prelievi citologici possono essere processati diversamente a seconda dei centri: striscio su vetrino, citoinclusione, preparazioni in fase liquida con allestimenti di preparati in monostrato. In rari casi non vi è disponibilità di materiale biologico. L'esame mutazionale di EGFR può essere condotto, con alta probabilità di successo, su tessuti fissati ed inclusi e prelievi citologici con componente neoplastica sufficientemente rappresentata (come discusso in seguito).

L'analisi di campioni con basso contenuto di cellule neoplastiche può produrre falsi negativi, legati ai limiti di sensibilità delle metodiche impiegate, e falsi positivi, per la maggiore probabilità di artefatti. L'assenza di tessuti disponibili per alcuni pazienti, ha indotto ad esplorare la possibilità di effettuare esami molecolari su siero o plasma. Tuttavia, al momento, questi approcci diagnostici sono da considerarsi solo di interesse speculativo per l'assenza di validazione dei dati in ampie casistiche di pazienti.

Infine, sono oggi disponibili alcuni anticorpi mutazione-specifici che riconoscono tumori portatori di mutazione L858R nell'esone 21 e la delezione E746_A750del nell'esone 19. La specificità riportata in caso di tumori positivi è quasi del 100%, ma la sensibilità è solo del 60-70%. Allo stato attuale non esistono studi prospettici che ne supportino l'uso nella pratica clinica; peraltro tale metodica non è nemmeno raccomandata nelle linee guida del College of American Pathologists (CAP).

Quantità di tessuto/cellule neoplastiche per l'analisi molecolare

Le comuni metodiche per la determinazione di mutazioni somatiche su tessuto prevedono la purificazione



e la quantificazione del DNA prima dell'amplificazione mediante PCR. Ciò è possibile solo se si dispone di una sufficiente quantità di tessuto neoplastico, in pratica corrispondente a circa cinque sezioni di 5-10 micron di una biopsia bronchiale di medie dimensioni. In presenza di una bassa quantità di cellule neoplastiche, possono essere utilizzati protocolli alternativi che possono anche non prevedere la purificazione/quantificazione del DNA. È difficile indicare qual è il minimo quantitativo di cellule per l'analisi molecolare in tali casi, anche perché ciò che conta è l'amplificabilità del DNA del campione che può dipendere oltre che dalla quantità, anche dalla qualità del materiale biologico e da una serie di altri parametri, tra cui il tempo di permanenza del campione nel fissativo. Alcuni studi hanno utilizzato il limite minimo di 100 cellule tumorali per l'esecuzione della analisi mutazionale dell'EGFR.

Preparazione del campione di tessuto

Il campione di tessuto da sottoporre ad analisi molecolare risulta frequentemente eterogeneo: accanto ad aree vitali di carcinoma polmonare possono essere presenti zone di necrosi, aree ricche di infiltrato flogistico e tessuto normale adiacente. La possibilità di individuare mutazioni geniche è condizionata dalla percentuale di cellule neoplastiche nel campione. Il tessuto va valutato attentamente al microscopio per definirne il contenuto di cellule neoplastiche, parametro che condiziona la scelta della metodica di analisi. Se si utilizzano procedure di analisi mutazionale, di sensibilità standard quali il sequenziamento diretto, si suggerisce la presenza di almeno il 50% di cellule neoplastiche. Tale soglia può anche essere inferiore se si dispone di sequenziatori di ultima generazione ed il protocollo di sequenziamento è stato ottimizzato. Tuttavia, in presenza di una percentuale di cellule tumorali inferiore al 30% è indispensabile impiegare metodiche a più elevata sensibilità. Pertanto per soddisfare tali soglie di cellularità, prima dell'estrazione del DNA, l'anatomopatologo deve valutare le caratteristiche del tessuto in esame ai fini di una eventuale macrodissezione manuale e, nel caso questa si rendesse necessaria, selezionare le aree del campione più ricche di cellule tumorali. La macrodissezione viene eseguita su sezioni di tessuto paraffinato dello spes-

sore di 5-10 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 a temperatura ambiente. La macrodissezione viene effettuata mediante la lama di un bisturi o un ago da siringa, dopo aver identificato e marcato le aree tumorali da dissezionare tramite sovrapposizione della corrispondente sezione in ematossilina-eosina. 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 (sotto la guida di un anatomopatologo) 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 la qualità non ottimale del DNA ottenuto.

Preparazione del campione citologico

Il materiale d'archivio è di solito rappresentato da preparati citologici strisciati, colorati e montati con vetrino coprioggetto o da materiale citologico incluso in blocchi di paraffina (citoincluso). A tale riguardo, si incoraggia la diffusione della tecnica di citoinclusione per l'allestimento dei preparati in quanto questa favorisce notevolmente l'esecuzione di analisi molecolari. Nel caso del materiale strisciato su vetrino, è necessaria la rimozione del coprioggetto in xilolo, seguita da lavaggi delle cellule in etanolo. Le aree del vetrino contenenti il maggior numero di cellule neoplastiche vengono quindi demarcate e le cellule presenti in tali aree rimosse dal vetrino mediante una lama di un bisturi o un ago da siringa, e poste in un tubo Eppendorf. Se il campione contiene isolati gruppi microscopici di cellule tumorali, la migliore soluzione è la dissezione laser, purtroppo non disponibile in tutti i centri. Per il materiale citoincluso si effettua un congruo numero di sezioni di 5-10 micron che vengono raccolte in un tubo Eppendorf. Le sezioni vengono sparaffinate (vedi sopra), lavate in alcool e disidratate prima di proseguire con le procedure di analisi. Anche

Raccomandazioni AIOM e SIAPEC-IAP per l'analisi mutazionale del gene EGFR nel carcinoma polmonare

in questo caso, se necessario, possono essere effettuate dissezioni manuali o laser.

Metodi di estrazione e quantificazione del DNA

La qualità e la quantità del DNA estratto dai campioni biologici è di notevole importanza per le successive analisi molecolari. Un DNA di scadente qualità può ostacolare l'amplificazione mediante PCR e inficiare il risultato dell'analisi generando risultati falsi negativi o falsi positivi. Il metodo di estrazione deve essere molto affidabile e deve generare quanto più DNA possibile dal campione in esame.

Per l'estrazione e la purificazione del DNA da tessuto paraffinato sono oggi disponibili vari kit commerciali, in genere basati sul principio della cromatografia, che hanno il vantaggio di accorciare notevolmente i tempi tecnici rispetto alla metodica classica basata sull'estrazione in fenolo-cloroformio e la purificazione mediante precipitazione in alcool. Sono anche disponibili kit per estrazione di DNA da micro campioni quali piccole biopsie o materiale citologico.

Il vantaggio principale nell'utilizzo di tali kit è che essi sono corredati di protocolli di semplice esecuzione e consentono una standardizzazione delle procedure. Una volta estratto, il DNA viene risospeso in un tampone adeguato. La quantificazione del DNA è una pratica utile perché permette di ottimizzare il processo di amplificazione e di conoscere quanti esami sono possibili a partire dal DNA estratto. Tuttavia la procedura non è indispensabile e può essere evitata nel caso in cui la quantità di DNA disponibile sia molto limitata. Per la quantificazione del DNA estratto da tessuti in paraffina, una PCR quantitativa è molto più accurata della spettrofotometria, in quanto permette di valutare direttamente l'amplificabilità del DNA estratto. Per valutare la qualità e la quantità del DNA, disponendo di materiale sufficiente, possono anche essere utili valutazioni fluorometriche.

Protocolli alternativi in carenza di materiale

Qualora le cellule neoplastiche nel materiale biotico o citologico siano ritenute insufficienti per la purificazione del DNA è possibile procedere con metodiche alternative che prevedono la sospensione e lisi delle

cellule tumorali in tamponi contenenti proteasi (56°C). Dopo inattivazione enzimatica tramite calore (10 min a 95°C), il campione viene direttamente sottoposto ad amplificazione mediante PCR.

Analisi mutazionale del gene EGFR

La dimostrazione della presenza di mutazioni attivanti il dominio tirosino-chinasico del gene EGFR è presupposto indispensabile per l'impiego di farmaci anti-EGFR nella I linea di trattamento del NSCLC. Poiché mutazioni attivanti sono state descritte negli esoni 18-21, questi 4 esoni dovrebbero essere sottoposti ad analisi mutazionale. Considerata la scarsità del materiale biologico disponibile in alcuni casi, la priorità va data alla determinazione delle mutazioni degli esoni 19 e 21 che risultano le più frequenti; in caso di negatività e di disponibilità di DNA, anche gli esoni 18 e 20 devono essere analizzati. Infine, nei casi in cui l'indagine produca risultati non conclusivi, è necessario ripetere l'esame, preferibilmente impiegando due diverse metodiche.

Metodiche per lo studio delle mutazioni

Varie tecniche sono disponibili per l'analisi delle mutazioni del gene EGFR. Queste possono essere distinte in metodiche di screening che possono evidenziare tutte le mutazioni, incluse nuove mutazioni, e metodiche a bersaglio mutazionale che permettono la diagnosi di specifiche mutazioni già note. Tra le più diffuse metodiche di screening ricordiamo nell'ordine: a) il sequenziamento diretto del prodotto della PCR secondo il metodo di Sanger; b) il pirosequenziamento; c) metodiche basate sulla denaturazione "melting" del DNA, come l'HRMA (high resolution melting analysis). Il sequenziamento diretto ed il pirosequenziamento permettono di effettuare diagnosi del tipo specifico di mutazione, mentre l'HRMA fornisce solo il dato di assenza o presenza di mutazione che dovrà essere poi eventualmente caratterizzata. Essendo questa ultima metodica rapida e sensibile, essa può risultare utile per selezionare i casi da sequenziare, riducendo notevolmente la mole di lavoro. La caratterizzazione della mutazione risulta comunque indispensabile, sia perché mutazioni diverse possono avere differente si-

gnificato biologico, sia perché sono state descritte in letteratura false positività con la metodica HRMA. Tra le metodiche a bersaglio molecolare le più diffuse risultano essere la Scorpion-ARMS, la PNA/LNA clamp, la Snapshot PCR e la mutant-Enriched PCR. Diversi kit commerciali basati su queste metodiche sono disponibili in commercio e molti di essi sono approvati per l'impiego in diagnostica clinica (CE-IVD). Sebbene questa approvazione non sia al momento obbligatoria per l'esecuzione di test di diagnostica molecolare, è innegabile che i kit commerciali presentano il vantaggio di essere metodiche standardizzate e di fornire in molti casi adeguati controlli positivi e negativi di reazione. Inoltre, in genere queste metodiche sono più rapide e sensibili del sequenziamento diretto. Esse presentano, tuttavia, lo svantaggio di evidenziare solo le mutazioni previste a priori.

La scelta della metodica da impiegare per le analisi mutazionali dipende da una serie di parametri. Sebbene il sequenziamento diretto del prodotto di PCR col metodo di Sanger sia stato per molti anni la metodica più utilizzata per l'analisi mutazionale, in Italia si è osservato un progressivo incremento dei laboratori che impiegano pirosequenziamento o Real Time PCR. A tale proposito, va ricordato che i risultati del programma di controllo di qualità di EGFR organizzato da AIOM e SIAPEC e recentemente pubblicato, hanno evidenziato un maggior tasso di errori, in particolare nell'analisi delle piccole biopsie, per i laboratori che impiegano sequenziamento di Sanger rispetto ai centri che utilizzano pirosequenziamento o Real Time PCR. È vero anche che molti centri che utilizzano il sequenziamento secondo Sanger hanno superato brillantemente il controllo di qualità. Questi dati sottolineano ancora una volta la difficoltà nella standardizzazione di questo metodo e la conseguente variabilità di risultati che si può osservare da centro a centro.

Raccomandazioni per il protocollo di PCR-sequenziamento secondo Sanger

PCR

- 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.).

- Per ogni determinazione devono essere previsti almeno un controllo positivo di amplificazione (ad esempio campione di DNA genomico precedentemente validato) ed un controllo negativo (miscela di reazione priva di template).
- Per ogni campione da analizzare è opportuno produrre due amplificati, in modo da effettuare la sequenza di due distinti prodotti di PCR.
- 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 EGFR sia conosciuto. La sensibilità della metodica dovrebbe essere tale da individuare mutazioni quando le copie di DNA mutato rappresentano il 20% circa del totale.

Sequenziamento

- I prodotti di due distinte PCR devono 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 all'analisi delle sequenze, lettura dell'elettrogramma e confronto con la sequenza wild type.
- I software per l'analisi di sequenza devono essere impostati con livelli soglia più bassi di quelli utilizzati per l'analisi dei polimorfismi nel DNA della linea germinale.
- 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.

Raccomandazioni AIOM e SIAPEC-IAP per l'analisi mutazionale del gene EGFR nel carcinoma polmonare

- Nel caso venga evidenziata una nuova mutazione (mai riportata precedentemente) o una mutazione rara (riportata 1-2 volte nei database internazionali) questa deve essere verificata in due ulteriori amplificati PCR.
- Ad intervalli di 25-30 sequenze, deve essere sequenziato un DNA di controllo per verificare l'assenza di contaminazioni e la qualità della procedura.
- 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 EGFR sia conosciuto. La sensibilità della metodica dovrebbe essere tale da individuare mutazioni quando le copie di DNA mutato rappresentano il 20% circa del totale.

Raccomandazioni per altre metodiche d'analisi

Analisi mediante REAL-TIME PCR

Diverse metodiche basate sull'impiego della Real Time PCR possono essere utilizzate per la individuazione delle mutazioni dell'EGFR. È disponibile in commercio un kit basato sulla tecnologia ARMS/Scorpion in grado di individuare 29 diverse mutazioni dell'EGFR tra cui quelle più frequentemente descritte in letteratura nei pazienti con NSCLC (therascreen EGFR RGQ PCR Kit). La sensibilità teorica della metodica è tale da individuare mutazioni quando le copie di DNA mutato rappresentano circa l'1% del DNA totale, con differenze tra le varie mutazioni identificate. Tuttavia, è da sottolineare che la metodica individua una mutazione se nel campione sono presenti almeno 5-10 copie di DNA mutato. Pertanto, l'analisi effettuata su di un numero esiguo di cellule potrebbe comunque risultare in un falso negativo.

Esistono numerosi altri kit commerciali per la individuazione di mutazioni di EGFR (cobas EGFR Mutation Test; PNAclamp™ EGFR Mutation Detection Kit; PNA EGFR Mutation Detection Kit; Dx™ EGFR 29 Mutations Detection Kit), basati su metodiche di Real Time PCR e con sensibilità teorica variabile tra lo 0.1% ed il 5% a secondo della tecnologia impiegata.

Infine, è possibile sviluppare metodiche alternative di Real Time PCR basate su discriminazione allelica per la

individuazione di mutazioni dell'EGFR. Queste dovrebbero essere in grado di individuare le principali mutazioni dell'EGFR riportate in letteratura negli esoni 18-21.

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 i kit commerciali, provvisti di una serie di controlli interni, 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 ottenuto da linee cellulari il cui stato mutazionale di EGFR sia conosciuto. La sensibilità delle metodiche basate sulla tecnologia ARMS dovrebbe raggiungere l'1%; per i saggi basati sulla discriminazione allelica è stata riportata una sensibilità di circa il 10%.

Analisi mediante 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 (riportata tra il 5 ed il 10%) e la possibilità di sequenziare frammenti piuttosto corti di DNA, superando in tal modo eventuali problematiche legate alla frammentazione del DNA.



Sono disponibili in commercio anche kit per uso clinico per la determinazione dello stato mutazionale dell'EGFR mediante tecniche di pirosequenziamento. 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.

Metodologie multimarker

Recenti sviluppi tecnologici hanno aperto la possibilità all'analisi contemporanea di numerosi markers molecolari. Alcune tecnologie come la real-time su piattaforme microfluidiche o la spettrometria di massa (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – time of flight, MALDI-TOF) possono permettere di analizzare contemporaneamente fino a centinaia di diverse mutazioni in numerosi geni. Inoltre, grandi progressi sono stati compiuti nell'ambito del sequenziamento di nuova generazione che nel tempo potrebbe imporsi come metodo ideale per la diagnostica multigenica.

Al momento, tuttavia, sono ancora necessari studi di validazione e controlli di qualità prima dell'inserimento di queste nuove possibilità di indagine diagnostica nella pratica clinica. Inoltre, l'utilizzo di tali approcci apre una serie di problematiche riguardanti la gestione dei dati e relative, in particolare, alla interpretazione del significato di mutazioni rare, alla possibilità di identificazione di mutazioni germline e, aspetto da non sottovalutare, all'estensione della caratterizzazio-

ne molecolare oltre i parametri normalmente richiesti dalla pratica clinica. Appare evidente che questi approcci, fino alla risoluzione delle suddette problematiche, dovrebbero essere limitati a protocolli di ricerca clinica piuttosto che alla diagnostica di routine.

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 con riferimento alla sensibilità del metodo.
- Gli esoni sottoposti ad analisi.
- Le mutazioni indagate nel caso delle metodiche a bersaglio molecolare.
- I risultati del test, con specificazione del tipo di mutazione eventualmente rilevata.
- La interpretazione del dato ed una valutazione complessiva dell'analisi con le eventuali problematiche legate al caso.

Il referto deve essere compilato su un modello prestabilito e firmato dall'anatomopatologo e dall'esecutore 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

Ciardiello F, Tortora G: EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 358: 1160-74, 2008

Thunnissen E, Kerr K, Herth F, et al. The Challenge of NSCLC Diagnosis and Predictive Analysis on Small Samples. Practical approach of an International Working Group. *Lung Cancer* 2012 Apr;76(1):1-18

Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, et al: Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol* 8: 823-59, 2013

Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al: Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med* 362: 2380-88, 2010

Marchetti A, Martella C, Felicioni L, et al: EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. *J Clin Oncol* 23: 857-65, 2005

Marchetti A, Normanno N: Recommendations for mutational analysis of EGFR in lung carcinoma. *Pathologica* 102: 119-26, 2010

Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al.: Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 361: 947-57, 2009

Normanno N, Pinto C, Taddei G, et al: Results of the First Italian External Quality Assurance Scheme for somatic EGFR mutation testing in non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 8: 773-8, 2013

Normanno N, De Luca A, Bianco C, et al: Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 366: 2-16, 2006

Rosell R, Carcereny E, Gervais R, et al: Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutations-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC) a multicenter open-label randomized trial. *Lancet Oncol* 13: 239-46, 2012

Sequist LV, Yang JC, Yamamoto N, et al: Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J Clin Oncol* 31: 3327-34, 2013

Sharma SV, Bell DW, Settleman J, et al: Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 7: 169-81, 2007

Questo materiale è stato realizzato grazie al grant incondizionato di

