



DXRX
The Diagnostic Network

by

Diaceutics
Better Testing, Better Treatment™

Colorectal cancer and BRAF V600E testing

FAQs



Prof. Matteo Fassan, MD, PhD



Q1: Per favore, può condividere la sua esperienza riguardo alla determinazione di BRAFV600E con immunoistochimica?

BRAFV600E è un ottimo anticorpo ed è specifico per la mutazione; se non è presente alcuna mutazione V600E, il campione non verrà identificato.

Il gruppo di Genova del Dottor Mastracci ha individuato una buona solidità nella pratica diagnostica routinaria, analizzando un gran numero di casi e lavorando molto sulla fase pre-analitica di laboratorio e sull'immunoistochimica.

Per l'immunoistochimica, il Prof. Fassan suggerisce di familiarizzare con il test prima di inserirlo nella pratica quotidiana. Il suo gruppo lo utilizza già in altri contesti come il melanoma, le lesioni pigmentate, il carcinoma papillare della tiroide.

Tuttavia, l'utilizzo del test immunoistochimico, in prima istanza, in un contesto metastatico non ha molto senso perché il clinico in questo setting necessita di informazioni relative a RAS, NRAS, BRAF e alle proteine del DNA Mismatch Repair. Per fare ciò, in NGS vengono utilizzati piccoli pannelli di geni target.

Pertanto, il Prof. Fassan sconsiglia l'immunoistochimica come primo approccio in un contesto metastatico e suggerisce di limitarne l'utilizzo solo per l'analisi delle proteine del Mismatch Repair e di analizzare BRAF contemporaneamente agli altri geni.

Q2: In che modo ritiene che la scelta della tecnica per il test BRAF possa influenzare gli esiti dei pazienti (ad esempio con la variazione del turnaround time, TAT)?

La scelta della metodica è fondamentale perché può impattare sull'outcome del paziente. Ad esempio, se abbiamo un campione che ha un sub-clone BRAF-mutato e utilizziamo un metodo con bassa sensibilità diagnostica (meno dello 0.5% dei mutati) creiamo un problema perché le terapie mirate contro BRAF sono molto utili nei tumori BRAF-mutati, ma sono dannose se si ha un piccolo clone BRAF-mutato mentre il resto del tumore non lo è. In pratica, se ho l'1% delle cellule BRAF mutate, quell'1% verrà eliminato, ma il restante 99% sopravviverà.

Pertanto, è fondamentale scegliere il metodo più appropriato in base a ciò che si vede al microscopio.

Per quanto riguarda il Turnaround Time (TAT), questo è un parametro molto importante in particolare nel setting metastatico perché è necessario che l'oncologo abbia la diagnosi molecolare per iniziare la terapia il prima possibile.

Quindi, in pazienti con adenocarcinoma del colon metastatico, la richiesta è urgente e all'interno di un laboratorio di Anatomia Patologica, è necessario sensibilizzare i patologi e tutto il personale diagnostico per gestire questi casi nel più breve tempo possibile.

Q3: Potrebbe esplorare il modo in cui ritiene che la stesura del report influenzi l'utente finale (ovvero gli oncologi)?

Questo è un punto su cui lavorare. Da una parte vi sono le raccomandazioni nazionali ed internazionali e dall'altra le richieste dell'oncologo, che vorrebbe qualcosa di più semplice per poter capire subito il tipo di alterazione evidenziata dal referto di laboratorio.

Bisogna trovare una via di compromesso tra l'esigenza del patologo di descrivere correttamente la mutazione trovata e quella dell'oncologo di avere un referto di semplice e immediata comprensione per poter scegliere la miglior terapia per il paziente.

Ad esempio, per anni nel CRC le proteine del DNA Mismatch Repair sono state refertate in modi molto diversi (positivo vs negativo, % di positività, eterogeneo, conservato vs perso...). Con il gruppo di patologi gastrointestinali e la Dott.ssa Paola Parente, abbiamo cercato di dare uno standard di refertazione basato non solo su quello che si vede al microscopio (ad esempio, positivo vs negativo), ma contenente anche una frase interpretativa che serva all'oncologo per indirizzare la terapia. A volte capita che l'oncologo legga "positivo" e che capisca di poter trattare il paziente con l'immunoterapia, mentre nel caso delle proteine del DNA Mismatch Repair è esattamente il contrario.

Quindi, dobbiamo stare molto attenti a cercare di conferire all'oncologo la risposta di caratterizzazione molecolare nel miglior modo possibile.

Q4: Come possiamo ottimizzare o standardizzare i TAT nei test BRAF per garantire un accesso tempestivo alla diagnosi per tutti i pazienti affetti da CRC in Italia?

La risposta è nell'uso del reflex test per tutti i carcinomi metastatici del colon con piccoli pannelli NGS a DNA. Le difficoltà nel loro utilizzo possono essere di tipo economico e nell'eterogeneità dei laboratori presenti sul territorio; ad esempio, vi sono laboratori in cui non c'è strumentazione di tipo NGS. Per il tempo di refertazione (TAT) bisogna considerare le tempistiche relative alla gestione della selezione del caso e della gestione del caso dal lato del laboratorio. Ad esempio, un laboratorio di patologia molecolare impiega 10 giorni lavorativi per refertare BRAF. In un contesto di un sistema Hub&Spoke bisogna diminuire il tempo di arrivo del campione al centro Hub per garantire questo TAT, e per fare questo è necessario collaborare fra noi.

Riguardo al reflex testing, si può fare in un contesto metastatico ma bisogna avere tutte le informazioni del paziente. Per questo bisogna lavorare con i clinici e i chirurghi endoscopisti, in modo tale che tutti i dati clinici necessari all'anatomo patologo accompagnino il campione. Il patologo non può cercare ogni volta che referta un caso le informazioni del paziente sui sistemi informatici, anche perché vi sono limitazioni dovute alla legge sulla privacy.

Q5: Su una richiesta di analisi BRAF fatta per escludere sindrome di Lynch conviene fare l'analisi del singolo gene o una profilazione più estesa? Ovvero in un prossimo futuro potrebbe tornare utile conoscere anche lo status di altri geni?

Dipende dai costi di laboratorio; in genere l'oncologo fa richiesta per il singolo gene. Le raccomandazioni nazionali ed internazionali indicano di fare il singolo gene, se BRAF è wild-type si passa poi alla caratterizzazione dell'ipermetilazione del promotore di MLH1.

Lo studio ItaLynch, dell'Italian Working Group Carcinoma colo-rettale, ha portato questa attività nella routine quotidiana di testing di laboratorio.

Il suggerimento finale del Prof. Fassan in questo contesto è l'uso del singolo gene.

Q6: Qual è la cellularità neoplastica del campione adeguata per una tipizzazione mediante Real Time PCR e quale per NGS?

Nell'ambito della tipizzazione NGS, qual è la frazione allelica mutata che viene riconosciuta come soglia per definire un campione positivo per mutazione BRAF?

Ciò dipende dai pannelli e dai kit diagnostici che sono utilizzati nel laboratorio. Per RT-PCR si va in un range dall'1 al 5% degli alleli mutati, mentre in NGS è il laboratorio che stabilisce la percentuale che si usa come cut-off clinico. Nei pannelli chiusi NGS la variabile significativa è il 5% della frazione allelica mutata.

In un contesto CE-IVD/CE-IVDR non si potrà più forzare questo parametro; quindi, dal 2026 bisognerà lavorare per identificare la metodica migliore per poter analizzare i campioni "problematici" (che sono comunque meno nel CRC rispetto ai casi di tumore al polmone).

Molto spesso, per avere un blocchetto di paraffina di un paziente, curato in altri ospedali, si possono aspettare anche 30-40 giorni. Per questo motivo la biopsia liquida è un test che potrebbe essere usato per dare delle indicazioni immediate sulla caratterizzazione molecolare, prima dell'arrivo in laboratorio del campione biptico. Però viene usata in casi rari.

In un setting metastatico di CRC la mutazione di BRAF nel sangue periferico si riscontra nell'85% dei pazienti. Però, per il 15% dei casi in cui BRAF è wild-type, resta l'incertezza che sia effettivamente una neoplasia BRAF wild-type o che faccia parte di quel 15% in cui dobbiamo aspettare il campione biptico per avere conferma della mutazione.