



Determinazione dell'instabilità microsatellitare nella gestione del paziente affetto da carcinoma del colon-retto

Gruppo di Studio sui tumori del colon-retto

Coordinatori: Paolo Massucco, Patrizia Racca, Lucia Turri

Comitato estensore:

Laura Fanchini, Luisa Ferrari, Anna Ferrero, Alex Luca Gerbino, Cristina Granetto, Sara Lattuada con il contributo di Guido Casalis Cavalchini, Paola Cassoni, Paola Francia di Celle, Tiziana Venesio

Componenti del Gruppo di Lavoro che hanno approvato il documento:

Adamo Vincenzo, Arcadipane Francesca, Balbo Mussetto Annalisa, Bellomo Paola, Bellora Paolo, Bima Carlo, Borraccino Chiara, Cauda Simona, Clara Renzo, Cravero Francesca, Cucchi Mariella, Fanchini Laura, Ferrari Luisa, Ferrero Anna, Forti Laura Giovanna, Garino Mauro, Gatti Matteo, Genco Chiara, Gerbino Alex Luca, Ghidoni Palmira, Giuffrida Carmela, Grammatico Vittoria, Granetto Cristina, Lattuada Sara, Leone Francesco, Leutner Monica, Lo Tesoriere Roberto, Marino Donatella, Mellano Alfredo, Mistrangelo Massimiliano, Monsellato Igor, Moro Francesco, Negru Maria Emanuela, Nicolosi Filadelfio Massimiliano, Oliva Cristiano, Olivero Francesca, Panier Suffat Luca, Paris Myriam Katja, Perinotti Roberto, Piva Cristina, Priora Fabio, Ribero Dario, Rimonda Roberto, Salmè Giulio, Santarelli Mauro, Sapone Nicoletta, Saracco Roberto, Sarli Franco, Serventi Alberto, Solej Mario, Spandre Mauro, Spinelli Andrea, Todisco Liana, Traverso Elena Silvia, Zago Marcello.

Quesito relativo al documento di consenso

E' necessario implementare l'anamnesi familiare del paziente affetto da carcinoma del colon-retto (CCR)?

La determinazione routinaria dell'instabilità micro satellitare (MSI) può essere utile per selezionare persone e famiglie a maggior rischio di forme ereditarie di CCR?

La determinazione di MSI può essere utile per predire il rischio di recidiva di malattia e/o la sua sensibilità a chemioterapici o altri tipi di trattamento?

Quale metodica utilizzare nella determinazione di MSI?

Quali pazienti sottoporre a determinazione di MSI?

Premessa

Il 5-6% circa dei pazienti affetti da CCR derivano la propria patologia da una predisposizione ereditaria (SPE-CCR) associata a mutazioni genetiche in geni noti¹ La forma più frequente di SPE-CCR è la Sindrome di Lynch (SL), un tempo nota come HNPCC (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer), una condizione ereditaria autosomica dominante, dovuta ad una mutazione germinale di un gene codificante per una delle proteine del "mismatch repair" (MMR), complesso multienzimatico preposto alla riparazione degli errori di replicazione del DNA; il MMR deficitario (dMMR) causa l'insorgenza di un alto tasso di mutazioni disperse lungo il genoma umano, in particolare a carico dei microsatelliti, corte sequenze nucleotidiche (mono-, di- e tetra-nucleotidiche) intra o extra geniche, la cui alterazione è rilevabile come "instabilità" (microsatellite instability o MSI).

Quando la MSI riguarda microsatelliti localizzati nella regione non codificante di alcuni geni che regolano la proliferazione cellulare, determina un aumentato rischio di CCR, in età più giovane rispetto alla popolazione generale, ed una maggior incidenza di tumori dell'endometrio, ovaio, stomaco e intestino tenue, pancreas e vie biliari, urotelio, prostata, SNC e cute¹. dMMR/MSI non è però una condizione specifica della SL poiché, sebbene si ritrovi nel 95% dei tumori ad essa associati, risulta essere presente anche nel 12-15% dei CCR sporadici (mentre SL è correlata solo al 3% dei CCR sporadici).

L'importanza di identificare le forme ereditarie di CCR, ed in particolare la SL, consiste non solo nel riconoscere il singolo paziente, ma anche nel coinvolgere i suoi familiari in programmi di screening dedicati, volti alla diagnosi precoce delle varie forme tumorali; programmi di screening e di chirurgia profilattica (es isteroannessiectomia) hanno infatti dimostrato di poter ridurre del 70% la mortalità specifica².

Nel corso degli anni sono state proposte linee guida indicanti criteri clinici di selezione dei pazienti da avviare a consulenza genetica (Criteri di Amsterdam I e II, più recentemente i Criteri di Bethesda), ma per vari motivi la loro applicazione nella pratica clinica quotidiana è risultata difficile: una precisa ed approfondita indagine anamnestica richiede tempo ed attenzione e, se da una parte il medico si può trovare in difficoltà per il sovraccarico di lavoro routinario, spesso coesistono scarsa esperienza ed interesse, poiché le SPE-CCR sono ritenute rare e non impattanti sulle scelte terapeutiche correnti; d'altro canto, sovente, anche il paziente presenta difficoltà a ricostruire la propria storia clinica personale e/o familiare.

Ne deriva che sensibilità e specificità delle valutazioni con criteri clinici sono basse: anche in casistiche di oncologi sensibilizzati al problema, solo circa il 30% dei pazienti considerati a rischio vengono effettivamente inviati in consulenza genetica e, per contro, nel 60% dei casi inviati a consulto non sussistono i corretti criteri di invio³.

A seguito di tali difficoltà, la maggioranza delle famiglie portatrici di SL restano ancora misconosciute. Ne consegue la necessità di disporre di metodiche più rapide ed affidabili per identificare i soggetti portatori di dMMR/MSI da avviare a consulenza genetica.

La necessità di identificare i pazienti operati o affetti da CCR dMMR/MSI sta peraltro divenendo importante anche per alcune evidenze cliniche che hanno o avranno un risvolto pratico terapeutico nel prossimo futuro.

Nei pazienti operati per CCR stadio II (pT3-4N0M0) l'indicazione a chemioterapia adiuvante è ancora controversa e soggetta ad una valutazione rischio/beneficio per ogni singolo paziente, sulla base di fattori prognostici noti.

Valutazioni retrospettive condotte in studi di fase III di chemioterapia adiuvante ed una meta-analisi hanno evidenziato che la presenza di dMMR/MSI correla significativamente con un minor rischio di recidiva ed una miglior prognosi, soprattutto per i pazienti in stadio II⁴.

Al contrario la mutazione di BRAFV600E identifica pazienti con peggior prognosi, specie se associata a stabilità microsatellitare (pMMR/MSS)⁵.

Dati preclinici hanno inoltre ipotizzato che CCR dMMR/MSI risultino resistenti a chemioterapia contenente solo fluorouracile (5FU); conferme in tal senso vengono anche da dati retrospettivi ottenuti da trial di chemioterapia adiuvante, dove pazienti operati per CCR dMMR/MSI in stadio II-III sembrano trarre un minor vantaggio dalla terapia con 5FU rispetto a pazienti pMMR/MSS^{6,7}.

Al contrario, i pochi dati clinici retrospettivi disponibili sembrano dimostrare che l'efficacia dell'oxaliplatino nei CCR stadio III sia indipendente dallo status di MSI/MMR⁸.

Considerando la miglior prognosi e la relativa chemioresistenza al 5FU dei CCR dMMR/MSI, ne deriva che pazienti operati in stadio II, in assenza di altri fattori prognostici negativi, non dovrebbero essere sottoposti a chemioterapia adiuvante per la probabile inefficacia del trattamento, a fronte della potenziale tossicità; in questi pazienti, in presenza di altri fattori di rischio, sarebbe probabilmente auspicabile considerare l'associazione di fluorofolati ed oxaliplatino.

La determinazione alla diagnosi di dMMR/MSI permetterebbe pertanto di selezionare facilmente questi pazienti.

Nei CCR in stadio metastatico la caratterizzazione molecolare della malattia sta divenendo fondamentale per l'impostazione del programma terapeutico, specie per quanto riguarda la determinazione dello stato mutazionale dei geni RAS e BRAF.

Nel prossimo futuro anche lo status di MMR/MSI potrebbe avere un ruolo predittivo terapeutico: alcuni studi hanno dimostrato l'attività e l'efficacia di farmaci inibitori di PD-1/PD-L1 in pazienti affetti da CCR metastatico dMMR/MSI pesantemente pretrattati⁹.

A seguito dei risultati osservati la FDA ha approvato l'utilizzo di pembrolizumab¹⁰ e nivolumab¹¹ per il trattamento di tumori con alta instabilità (MSI-H) e la NCCN ha modificato le proprie linee guida, per cui tutti i pazienti affetti da CCR metastatico dovrebbero essere sottoposti a determinazione di dMMR/MSI in modo da valutare una terapia con inibitori di PD1/PD-L1, al fallimento delle terapie standard, se riscontrata MSI-H.

Allo stato attuale in Italia ed Europa i farmaci antiPD1/PD-L1 non hanno ancora ottenuto l'indicazione al trattamento del CCR avanzato MSI-H. In ambito sperimentale clinico, trials di fase III sono in corso per valutare l'associazione di farmaci antiPD1/PD-L1 alla chemioterapia standard; qualora i risultati confermassero l'efficacia di tali trattamenti, già in I linea, il problema etico circa l'indisponibilità dei farmaci antiPD1/PD-L1 diverrebbe importante.

Negli ultimi anni la ricerca di laboratorio ha reso disponibili due test di pre-screening interpretabili, da eseguire alla diagnosi su tessuto tumorale per identificare lo status di MMR/MSI: la dimostrazione immunoistochimica (IHC) di mancata espressione delle proteine codificate dai geni del MMR (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) o la ricerca di MSI tramite l'amplificazione genica di sequenze ripetute selezionate mono- e/o di- nucleotidiche sparse in regioni codificanti e non codificanti del genoma, sono entrambi esami conducibili su tessuto fresco o paraffinato.

Sono in corso di validazione metodiche di più semplice esecuzione e interpretazione volte a stabilire lo stato MSI in base alle curve di denaturazione di sonde per marcatori quasi monomorfici (tecnologia Real Time PCR).

Quale test preferire non è chiaro, probabilmente dipende dallo scopo dell'esame e quindi da chi lo richiede (genetista vs clinico). MSI-PCR e MMR-IHC sono comunque esami complementari, altamente concordanti, sensibili (>95%) e specifici (>90%). IHC è il test generalmente più impiegato, poiché è meno costoso ed eseguibile presso qualsiasi servizio di Anatomia Patologica, non richiedendo un laboratorio di

biologia molecolare¹².

Nel percorso di screening per SL il test molecolare viene preferibilmente condotto in parallelo su tessuto normale e tessuto neoplastico con conseguente aumento dell'impegno di laboratorio e dei costi.

Peraltro, una recente analisi retrospettiva, condotta su casistiche di pazienti non-responder all'immunoterapia, ha permesso di evidenziare circa il 10% di errate attribuzioni dello status di dMMR/MSI; la conclusione degli autori dello studio, raccolta anche dall'ESMO, è stata di consigliare la valutazione con entrambe le metodiche prima di avviare il paziente all'immunoterapia¹³.

In sintesi, allo stato attuale delle conoscenze, la determinazione alla diagnosi dello status di MMR/MSI permetterebbe:

- Una più facile identificazione dei pazienti e delle famiglie Lynch-related

- La selezione di pazienti dMMR/MSI-H operati in stadio II, da non sottoporre a chemioterapia adiuvante (con solo 5FU)

- La selezione di pazienti dMMR/MSI-H in stadio IV, candidabili ad immunoterapia.

Sulla base di queste evidenze, alcune società scientifiche (ESMO, NICE, ASCO) consigliano l'adozione dello screening "universale", condotto su tutti i nuovi casi di CCR, indipendentemente dall'età e dalla storia familiare (secondo la flow chart allegata), poiché ritenuta essere la strategia più sensibile ed economicamente conveniente¹⁴. In Italia, i servizi sanitari regionali di Lombardia e Veneto hanno deciso l'adozione di tale programma, utilizzando prevalentemente l'IHC quale test di prima battuta.

Come visibile nella flow chart, dopo test IHC, in casi con perdita di MLH1 e PMS2, il successivo riscontro di mutazione di BRAF V600E e/o dell'ipermetilazione del promoter di MLH1 permettono di identificare casi di CCR MSI sporadici, che non necessitano di ulteriori test genetici; al contrario la perdita di MSH2 e MSH6 segnalano casi meritevoli di immediata valutazione genetica.

Nel caso del test MSI-PCR il riscontro di MSS esclude ragionevolmente la SL, mentre non è ancora chiaro il significato biologico e clinico della bassa instabilità (MSI-L).

Al fine di ridurre i costi derivanti dallo screening universale, in considerazione del fatto per cui la maggior percentuale di casi di CCR-SL correlati si presentano in giovane età, alcuni autori hanno avanzato la proposta di escludere dall'analisi di MMR/MSI i pazienti anziani (> 70-75 anni)^{15,16}.

Questa possibilità viene però criticata da chi ricorda che casi di CCR-SL correlati si presentano anche in età avanzata, tipica di questa patologia: escludendo questi pazienti, il numero di casi persi, percentualmente ridotto, sarebbe però significativo in termini assoluti.

Considerando poi che i casi di CCR sporadici MSI aumentano con l'avanzare dell'età, l'analisi per fini terapeutici risulterebbe particolarmente utile per discernere i pazienti anziani operati per CCR-dMMR/MSI in stadio II, a cui potrebbe essere evitata la chemioterapia adiuvante.

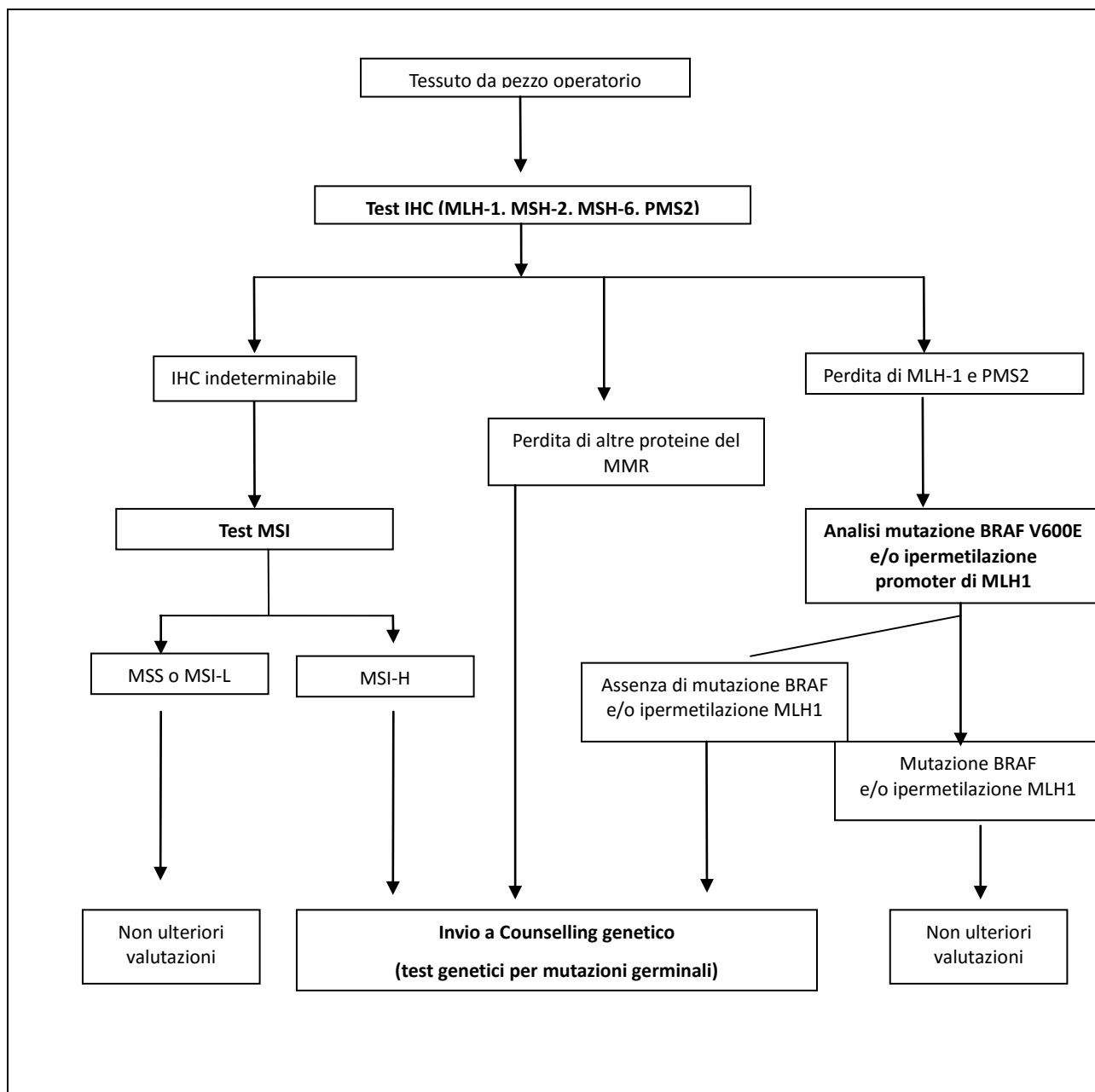


Fig. 1 : flow-chart screening universale MMR/MSI

Statement su adesione a Linee Guida Nazionali e/o Internazionali sul tema

- [www.aiom.it/LG AIOM](http://www.aiom.it/LG_AIOM), Tumori del colon (2018)
- www.bsg.org.uk/resource/NICE guidance on molecular testing strategies for Lynch syndrome in people with colorectal cancer (2017)
- Hereditary gastrointestinal cancers: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up; Ann Oncol (2019)
- [www.nccn.org/Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal](http://www.nccn.org/Genetic/Familial-High-Risk-Assessment:Colorectal) (2017)
- Stoffel et al: Hereditary colorectal cancer syndromes: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline endorsement of the familial-risk of colorectal cancer: European Society for Medical Oncology Clinical Practice Guidelines; J Clin Oncol (2015)
- Guidelines on Genetic Evaluation and Management of Lynch Syndrome: A Consensus Statement by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer; Am J Gastroenterol (2014)

- Molecular Biomarkers for the Evaluation of Colorectal Cancer: Guideline From the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and the American Society of Clinical Oncology; J Clin Oncol (2016)
- ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach; Ann Oncol (2019)

Motivazioni e Statement di consenso del Gruppo di Studio

1) Implementare l'anamnesi familiare alla presa in carico del paziente.

Nonostante la bassa sensibilità e specificità dimostrata è comunque auspicabile che nel corso della presa in carico del paziente da parte del clinico e dell'infermiere CAS/GIC venga raccolta un'anamnesi familiare il più completa possibile, utilizzando per riferimento le indicazioni di Amsterdam/Bethesda modificate (vedi tabella).

2) Estendere l'analisi dello status di MMR/MSI alla diagnosi di nuovi casi di CCR.

L'utilizzo di metodiche relativamente semplici di pre-screening permetterebbe la più agevole identificazione di pazienti con nuova diagnosi di CCR MSI correlata o meno a SL. L'identificazione precoce di casi dMMR/MSI avrebbe la duplice utilità di implementare lo screening delle famiglie interessate e di selezionare i pazienti la cui indicazione a chemioterapia adiuvante è dubbia (nei pazienti operati per malattia stadio II) o che potrebbero giovare d'immunoterapia di salvataggio (qualora disponibile, nei pazienti con malattia avanzata non responsiva a chemioterapia standard).

In assenza di studi di comparazione tra MSI-PCR e MMR-IHC, entrambi i test risultano altamente specifici e sensibili. La scelta di quale metodica utilizzare è generalmente determinata dalla disponibilità ed esperienza del singolo centro.

L'impiego "universale" di MSI-PCR o MMR-IHC, consigliato da alcune linee-guida e già effettuato in modo routinario in Lombardia e Veneto, sebbene auspicabile, è stato recentemente ridimensionato dai risultati di valutazioni retrospettive che hanno evidenziato come oltre i 70-75 anni i casi di CCR MSI-Lynch related siano pochissimi, tali da non giustificare la spesa^{15,16}.

Ai fini pratici, l'adozione di un programma di screening "universale" necessita delle seguenti valutazioni:

Fattibilità pratica e sostenibilità: In Piemonte, ove si registrano circa 4000 casi/anno di CCR¹⁷, l'utilizzo di un programma "universale" determinerebbe altrettanti esami, ma permetterebbe l'identificazione di circa 120 soggetti portatori di MSI correlato a LS (3% dei casi) e di circa 480 pazienti (12%) affetti da CCR sporadico MSI. Nella nostra Regione alcuni laboratori di Anatomia Patologica e di Patologia Molecolare eseguono già in maniera più o meno routinaria i test MSI-PCR /MMR-IHC. Il problema della fattibilità pratica e della sostenibilità economica di tale progetto è stato oggetto di una riunione del Gruppo di Patologia Molecolare della Rete Oncologica che ha dato una parziale disponibilità all'estensione di tali analisi, anche alla luce del progressivo calo dei costi dei test (Allegato 1). Adottando come riferimento il recente studio pubblicato su Ann. Int. Medicine¹⁶ che analizzava circa 3891 pazienti, la restrizione dei test ai soggetti d'età inferiore a 75 anni permetteva di risparmiare il 27% degli esami, con conseguente riduzione dei costi e del carico di lavoro a fronte di un ridotto numero di casi "persi" (5%).

Qualità: le metodiche impiegate e l'analisi dei dati dovranno sottostare a programmi di controllo di qualità certificati e di audit, tali da assicurare l'accuratezza dei risultati.

Omogeneità delle informazioni fornite: i referti prodotti dovranno permettere un'uniformità d'interpretazione. Relativamente alla qualità ed alla omogeneità dei test il Gruppo di Patologia Molecolare della Rete Oncologica sta rivedendo i criteri di refertazione delle analisi molecolari per renderli di immediata comprensione per la pratica clinica ed ha previsto l'esecuzione di riunioni informative per i patologi e biologi che necessitino di un percorso d'apprendimento specifico.

Raccomandazione del Gruppo di Studio

Nell'ambito del gruppo di studio si è dibattuto circa la fattibilità di uno screening "universale" alla diagnosi, in termini di costi e carico di lavoro per il personale dei laboratori di Anatomia Patologica e

Patologia Molecolare.

Il gruppo di lavoro è convenuto di sollecitare una **maggior attenzione nella raccolta anamnestica da parte del medico e dell'infermiere CAS/GIC, tramite l'utilizzo sistematico dei criteri minimi di Amsterdam/Bethesda semplificati** secondo quanto previsto dall'ASCO Expert Statement¹⁸. A tal fine si è redatta una scheda anamnestica "sintetica", uguale per tutti i GIC (Allegato 2) che permetta una rapida raccolta dei principali dati anamnestici d'interesse; tale scheda andrebbe somministrata al paziente il prima possibile lungo il percorso diagnostico-terapeutico da parte di un medico o di un infermiere CAS/GIC; qualora emerga un sospetto di potenziale familiarità, meritevole di consulenza genetica, occorrerà inviare la scheda alla SC di Genetica Medica Universitaria, anche in caso di negatività dei test MSI/dMMR. Qualora invece l'analisi su tessuto identifichi instabilità dei microsatelliti e pertanto il paziente abbia indicazione alla consulenza genetica, in fase di prenotazione della stessa occorrerà compilare e fornire il questionario "standard" reperibile sulla pagina https://www.cittadellasalute.to.it/images/stories/strutture/molinette/genetica_u/2019/moduli/modu_sc_011.pdf,

I membri del gruppo sono comunque concordi nel ritenere che l'utilizzo dei criteri di Amsterdam/Bethesda, sebbene utile per indirizzare la valutazione preliminare del patologo e del genetista, non permetterebbe comunque di selezionare tutti i casi LS correlati, e soprattutto non avrebbe utilità per i casi di CCR sporadico MSI.

Dal dibattito è emerso che in alcune strutture la determinazione di MMR-IHC è già routinariamente eseguita alla diagnosi di malattia o alla recidiva metastatica, perché richiesto da trial clinici di ricerca o perché previsto nella pratica clinica locale.

Recependo le istanze del Gruppo di Patologia Molecolare e considerando i recenti dati pubblicati, il gruppo di lavoro ritiene comunque giustificato porre un limite di età nella casistica da analizzare.

In considerazione di quanto detto, i componenti del gruppo di lavoro sono convenuti d'avanzare la proposta di **adottare anche in Piemonte un programma di screening "universale" per la determinazione di MMR/MSI alla diagnosi in tutti i nuovi casi di CCR; in una fase iniziale il test verrà però limitato ai soli pazienti d'età inferiore a 70 anni**, al fine di saggiare il carico di lavoro e rodare il sistema. L'eventuale estensione del test ai pazienti tra i 70 e 75 anni verrà rivalutata in una seconda fase.

Per i pazienti over-70 anni, il test MSI-PCR/MMR-IHC potrà essere eseguito **solo qualora dalla scheda anamnestica emerga il forte sospetto di predisposizione familiare** (precedenti anamnestici personali o familiari) o **se il patologo ritenga che le caratteristiche isto-patologiche della malattia possano essere indicative di un fenotipo MSI**. In casi selezionati inoltre, qualora l'oncologo ritenga il proprio paziente particolarmente fit per un'eventuale immunoterapia, i test MSI-PCR/MMR-IHC potranno essere richiesti **solo dopo discussione del caso in ambito GIC e, se possibile, dopo opportuna valutazione onco-geriatrica**.

La scelta del test MMR-IHC o MSI-PCR rimane libera a seconda dell'esperienza e disponibilità di ogni singolo centro. Test per BRAF e metilazione del promotore di MLH-1 di routine saranno richiesti in tutti i casi di perdita di MSH-1 e PMS2. **Qualora il paziente in esame sia candidato all'immunoterapia occorrerà eseguire entrambe i test (IHC+PCR) per ridurre il rischio di falsi positivi**.

Il gruppo di lavoro ricorda che i test indicati dovranno ovviamente essere eseguiti da personale formato secondo i criteri di standardizzazione delle metodiche proposti dal Gruppo di Patologia Molecolare della Rete Oncologica. I servizi dovranno inoltre sottostare a controlli di qualità certificati e di audit (Allegato 1).

Il gruppo di lavoro ritiene infine essere auspicabile l'istituzione di un data-base regionale per la raccolta dei casi MSI (familiari + sporadici) per eventuali studi prospettici futuri.

Revised Bethesda Guidelines (2004)
CCR diagnosticato in individuo di età < 50 anni
Presenza di neoplasie sincrone o metacrone del colon o in altre sedi tipiche della SL (endometrio, ovaio, stomaco e intestino tenue, pancreas e vie biliari, urotelio, SNC e ghiandole sebacee)
CCR con caratteristiche patologiche tipiche dei CCR- dMMR/MSI in individuo di età < 60 anni (G3,

mucinoso/a cell. con castone, cospicua infiltrazione linfocitaria/reazione tipo Chron)

Almeno un altro caso di CCR o neoplasie correlate a SL in parenti di primo grado con uno dei tumori diagnosticato < 50 anni

Almeno altri due casi di CCR o neoplasie correlate a SL in parenti di primo/secondo grado

Criteria minimi di familiarità oncologica da richiedere in visita (sec ASCO Expertice Statement)

- a. Richiedere se esistano casi di tumori solo fra:
 - Parenti di primo grado (genitori, fratelli, sorelle, figli)
 - Parenti di secondo grado (nonni, zii, cugini, nipoti)
- b. Specificare se i casi di parenti con tumore appartengano ai rami paterno o materno
- c. Specificare per i parenti con tumore il tipo di cancro e l'età d'insorgenza

Non è necessario individuare tutti i casi possibili, ma solo quelli che possano indurre il sospetto di SPE-CCR. L'approfondimento sarà compito del genetista.

Bibliografia essenziale

1. Stoffel E et al: Hereditary colorectal cancer syndromes: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline endorsement of the familial-risk of colorectal cancer: European Society for Medical Oncology Clinical Practice Guidelines; JCO 2015
2. Sinicrope FA: Lynch syndrome associated colorectal cancer; NEJM 2018, 379(8): 764-773
3. Wood ME et al: Quality of cancer family history and referral for genetic counseling and testing among oncology practices: a pilot test of quality measures as part of American Society of Clinical Oncology Quality Oncology Practice Initiative; JCO 2014, 32: 824-829
4. Popat S et al: Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. JCO 2005;23: 609-18
5. Sinicrope FA, et al: Molecular markers identify subtypes of stage III colon cancer associated with patient outcomes. Gastroenterology; 2015;148:88-99.
6. Sargent DJ et al: Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. JCO 2010;28:3219-26.
7. Kawakami H et al: MSI testing and its role in the management of colorectal cancer; Curr Treat Options Oncol 2015, 16(7): 30
8. Gavin PG et al. Mutation profiling and microsatellite instability in stage II and III colon cancer: an assessment of their prognostic and oxaliplatin predictive value. Clin Canc Res 2012;18:6531-41.
9. Le DT et al: Mismatch-repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. Science 2017; 357: 409-413
10. Le DT et al: KEYNOTE-164: Phase II study of pembrolizumab for patients with previously treated, microsatellite instability-high advanced colorectal carcinoma. JCO 2016; 34(4): suppl.tps 787

11. Overman M et al: Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair deficient or microsatellite instability high colorectal cancer (Checkmate 142): an open-label multicentre, phase 2 study: *Lancet Oncol* 2017; 18(9): 1182-1191
12. Win AK et al: Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer): Clinical manifestations and diagnosis. Literature review current through: Mar 2019
13. Cohen R et al: Association of Primary Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors in Metastatic Colorectal Cancer With Misdiagnosis of Microsatellite Instability or Mismatch Repair Deficiency Status. *JAMA Oncol.* 2019; 5(4):551-5.
14. NICE: Molecular testing for Lynch syndrome in people with colorectal cancer - Final scope. February 2016
15. Stoffel et al: Hereditary colorectal cancer syndromes: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline endorsement of the familial-risk of colorectal cancer: European Society for Medical Oncology Clinical Practice Guidelines. *JCO* 2015; 33(2): 209–217
16. Dan Li et al: Comparison of universal versus age-restricted screening of colorectal tumors for Lynch Syndrome using mismatch repair immunohistochemistry: a color study. *Ann Int Med* 2019; 171(1): 19-26
17. Leenen et al: Cost-effectiveness of routine screening for Lynch syndrome in colorectal cancer patients up to 70 years of age. *Genetics in Medicine* 2016; 18: 966–973
18. L'impatto dei tumori in Piemonte. Registro Tumori Piemonte – www.cpo.it
19. Lu KH et al: American Society of Clinical Oncology Expert Statement: collection and use of a cancer family history for oncology providers. *JCO* 2014; 32: 833-40.

Allegato 1. Raccomandazioni del Gruppo di Studio di Patologia Molecolare della Rete Oncologica Piemonte e Valle d'Aosta per la Determinazione dell' Instabilità Microsatellitare nel Carcinoma del Colon Retto

Paola Francia di Celle, Tiziana Venesio, Antonella Maffè, Maria Scatolini, Claudia Veggiani, Susanna Cappia, Sara Orecchia, Doriana Giustetto, Patrizia Falcone.

Il Gruppo di Studio di Patologia Molecolare della Rete Oncologica ha discusso la fattibilità ad eseguire nei laboratori della Regione il test di determinazione dell' Instabilità Microsatellitare (MSI) come screening diagnostico del Carcinoma del Colon Retto (CCR) per meglio selezionare famiglie suscettibili geneticamente (forme ereditarie di CCR) e a scopo prognostico/predittivo per determinare il rischio di recidiva e la risposta a chemioterapia o altri regimi terapeutici. La necessità è stata segnalata e supportata dal Gruppo di Studio CCR coordinato dalla Dott.ssa Patrizia Racca e dal Dr. Massucco.

Ad oggi sono disponibili due approcci metodologici: uno basato su Immunoistochimica (IHC) che identifica il difetto di espressione delle 4 principali proteine del Mismatch Repair (MMR), un secondo basato sulla valutazione di pannelli di sequenze ripetute validate (Pentaplex) del DNA che identifica variazioni di pattern di amplificazione genica (a seguito del difetto del MMR). La letteratura e l'esperienza internazionale indicano che i metodi di analisi delle proteine e del DNA sono complementari e dimostrano una buona concordanza (ca. 90%).

Ad oggi i due test vengono impiegati per identificare le forme ereditarie di CCR (Sindrome di Lynch) e in Piemonte sono condotti routinariamente nei Centri Città della Salute e della Scienza, IRCCs Candiolo, Osp. Cuneo e AOU Novara (in collaborazione con la Fondazione Edo/ElvioTempia).

Nel corso del 2018 in Piemonte sono stati analizzati all'incirca 536 casi; si stima che uno screening alla diagnosi di tutti i CCR porterebbe ad un aumento dell'attività di circa 8 volte (ca 4000 casi attesi).

Nel corso dell'ultimo anno sono stati introdotti test molecolari semplificati, validati in Real Time PCR. Essi permettono di valutare i marcatori microsatellitari, sono di semplice esecuzione e interpretazione e consentono di ottimizzare materiale, tempi e costi e in ultimo di estendere il test molecolare ad un numero maggiore di pazienti; molti Centri si stanno attivando per una loro rapida introduzione.

Il Gruppo di Studio di Patologia Molecolare supporta l'estensione dell'indagine MMR/MSI dalla sola forma ereditaria di CCR allo screening di tutti i CCR alla diagnosi e, vista la buona concordanza esistente tra i metodi IHC e molecolari, con libertà di scelta della metodica più confacente alla organizzazione dei singoli Centri senza necessità di eseguire entrambi i test.

Qualora si preferisca il solo approccio molecolare, si raccomanda il completamento con il test IHC ogni volta che possano esserci dubbi interpretativi (< 40% dei marcatori microsatellitari positivi) o per i pazienti MSI positivi la cui anamnesi familiare suggerisca una chiara forma ereditaria. Questo algoritmo ridurrebbe le analisi di IHC al 15% circa dei casi.

Il Gruppo raccomanda che i laboratori coinvolti nell'attività MMR/MSI standardizzino le analisi e la refertazione (IHC e Molecolare) a livello Regionale. Raccomanda anche la partecipazione a Programmi di Verifica di Qualità Esterni o in alternativa organizzerà uno schema regionale come già fatto in passato per altre analisi molecolari.

Sul Nomenclatore Nazionale della GU 18/03/17 Serie Generale Suppl n°15, esiste il codice 91.60.7 Instabilità Microsatellitare (ancora senza tariffa, come per tutte le prestazioni) i cui criteri di appropriatezza nell'Allegato E, Anatomia Patologica riportano il CCR (pazienti stadio II clinicamente selezionati e stadio III >75 aa di età). In attesa di una tariffa univoca nazionale sarà compito del Gruppo condividere la strategia di tariffazione da applicare.

09/09/2019

Allegato 2: Modulo per la valutazione dell'anamnesi personale e familiare
da somministrare ai soggetti con analisi su tessuto tumorale negativa

Cognome	Nome
Data di nascita/...../.....	Luogo di nascita
Email	Telefono

Storia clinica personale

1) Ha avuto diagnosi di tumore? Segnare le diagnosi dei seguenti tipi di tumore: colon/retto, endometrio, stomaco, ovaio, alte vie urinarie, tratto epato-biliare, intestino tenue, sistema nervoso centrale, neoplasie benigne e maligne delle ghiandole sebacee

	Età		Età
	Età		Età
	Età		Età

2) Ha avuto diagnosi di polipi del colon? Segnare numero, sede, tipo istologico e grado di displasia:

	Età		Età
	Età		Età
	Età		Età
	Età		Età

Storia clinica familiare

1) Qualcuno della sua famiglia ha avuto diagnosi di tumore? Segnare le diagnosi dei seguenti tipi di tumore: colon/retto, endometrio, stomaco, ovaio, alte vie urinarie, tratto epato-biliare, intestino tenue, sistema nervoso centrale, neoplasie benigne e maligne delle ghiandole sebacee

Rapporto di parentela con chi compila il modulo	Tumore	Età

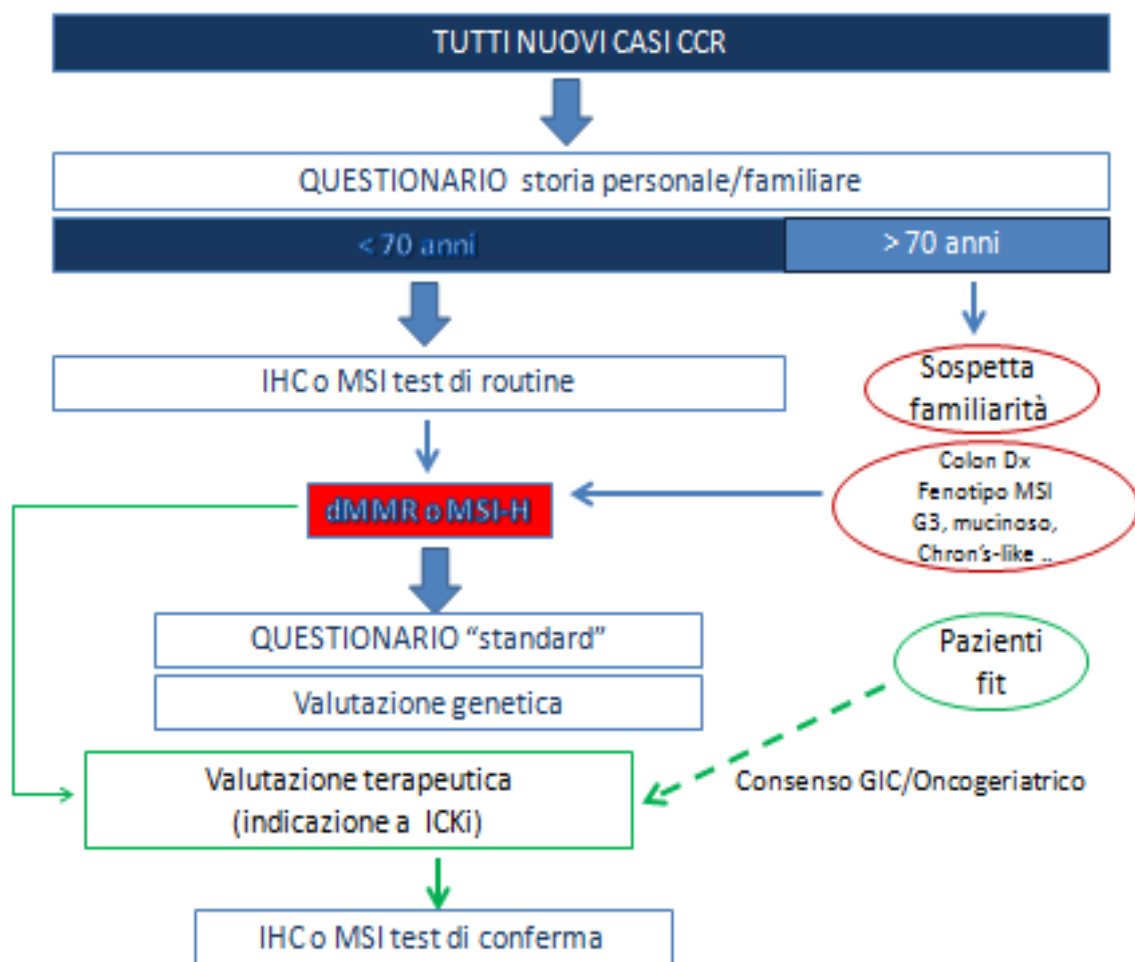
Il paziente o qualcuno dei suoi familiari è mai stato sottoposto ad analisi genetica? Se sì, allegare il referto.

NOTE:

Autorizzo il trattamento dei miei dati personali e familiari, ai sensi dei D.lgs. 196 del 30 giugno 2003 e 101 del 10 agosto 2018, e dichiaro di aver fornito le informazioni / documentazione dei miei familiari con il loro consenso.

Data/...../..... Firma

In caso di storia personale o familiare sospetta per patologia ereditaria, il presente modulo dovrà essere inviato alla SC Genetica Medica U - AOU Città della Salute e della Scienza, Via Santena 19, 10126 Torino – Tel 0116334479 – Fax 0116335181 insieme alla documentazione istologica dei tumori e dei polipi riferiti e al referto dell'analisi su tessuto tumorale già eseguita.



Flow chart generale del programma