



## Il ruolo dei marcatori molecolari nello screening colo rettale

Cristina Sani (1), Leonardo Ventura (2), Marco Zappa (2), Carlo Senore (3), Luigi Bisanti (4), Grazia Grazzini (5), Germana Martinasso (3), Roberta Casa (6), Caterina Anatrone (3), Silvia De Andrea (7), Francesca Maria Carozzi (1)

(1) Laboratorio Regionale Prevenzione Oncologica, S.S. Laboratorio Regionale HPV e Biologia Molecolare ISPO Via Cosimo il Vecchio 2, Firenze

(2) Epidemiologia Clinica e Descrittiva ISPO, via delle Oblate, Pal. 28/a Florence,

(3) CPO Piemonte, AOU Città della Salute e della Scienza, Torino

(4) Servizio di Epidemiologia, ASL di Milano, C.so Italia 19, 20122 Milano

(5) Prevenzione Secondaria Screening, ISPO Via Cosimo il Vecchio 2, Firenze

(6) Laboratorio di Prevenzione, ASL di Milano Via Juvara, 22 - 20129 Milano

(7) SC Epidemiologia/SS Prevenzione Oncologica ASL di Milano C.so Italia 19, 20122 Milano

## Obiettivi

In Italia sono diffusi sul territorio nazionale, in ottemperanza alle disposizioni legislative del Ministero della Salute, programmi di screening basati sull'offerta del FIT (Fecal Immunochemical Test) biennale, che presenta un ottimo bilancio sensibilità/specificità e costo/beneficio. Il FIT è un test molto efficiente, anche se, almeno il 60% dei soggetti positivi risultano poi negativi ai successivi esami di approfondimento (colonscopia). Un test filtro, efficace, eseguito su materiale fecale, potrebbe ridurre il numero di soggetti da inviare a colonscopia con una minima perdita di lesioni importanti, limitando i costi e la perdita di adesione agli approfondimenti. Per questo, è di fondamentale importanza valutare il ruolo dei marcatori molecolari eseguiti su DNA fecale, per ridurre la proporzione di soggetti da inviare a colonscopia, dopo un FIT positivo.

# Metodi

Lo studio ha previsto l'arruolamento di 300 pazienti con FIT positivo afferenti ai programmi di screening per il cancro del colon-retto di Firenze, Torino e Milano. A questi pazienti, dopo la firma del consenso informato, veniva fornito il kit per la raccolta del campione di feci da eseguire prima della preparazione alla colonscopia. I campioni venivano riconsegnati presso le unità endoscopiche quando i pazienti si presentavano per eseguire la colonscopia, immediatamente congelati e quindi inviati al laboratorio centrale di ISPO. Il laboratorio dopo l'estrazione del DNA ha valutato un pannello di 32 marcatori molecolari (Tabella 1) scelti tra quelli più significativi riportati in letteratura, con l'obiettivo di individuare adenomi con alto rischio di progressione che rappresentano l'obiettivo target per lo screening.

Tabella 1

- Quantificazione del DNA umano in real time PCR
- Quantificazione del LONG DNA in real time PCR
- Mutazioni del gene K-ras codoni 12 e13 in pyrosequenziamento
- Mutazioni del gene p 53 esoni: 5, 6, 7 e 8 in pyrosequenziamento
- Mutazioni del gene APC esone 15 codoni : 876, 1306, 1309, 1312, 1367p1, 1378p1, 1379, 1450p1, 1465 in pyrosequenziamento
- Valutazione della instabilità genomica mediante analisi delle alterazioni dei micro satelliti Bat26, Bat25 e Bat 40 mediante analisi con AB PRISM 310 Genetic Analyzer e GeneScan software.
- Valutazione dello stato di metilazione dei geni: Vimentina, SPRF2, MGMT e HTLF in pyrosequenziamento

## Risultati

E' stata effettuata una analisi discriminante sui cinque biomarcatori che mostravano una accuratezza diagnostica di almeno il 60% (Tabella 2). E' stato individuato il cutoff ottimale della combinazione di biomarcatori che garantisce la migliore sensibilità e specificità. Attraverso il confronto dell'area sotto la curva ROC, la combinazione di biomarker mostra un aumento significativo della capacità di discriminare rispetto al risultato dei singoli biomarker riuscendo a classificare correttamente l'80% dei casi. Il cutoff scelto dal modello discriminante ha una sensibilità per cancro e adenomi di alto grado di 0.91 (95% CI = 0.84-0.96) con 86/94 casi veri positivi individuati e una specificità di 0.42 (95% CI = 0.31-0.53) con 34/81 casi veri negativi identificati. Tra gli 8 casi classificati erroneamente dal modello è stato perduto un caso di cancro.

## Risultati

Applicando questo modello all'intera popolazione screenata nella regione toscana a fronte delle 3.9 colonscopie eseguite per individuare una lesione (256 lesioni di alto grado individuate eseguendo 1000 colonscopie), utilizzando il nostro panel di marcatori molecolari come test di triage il numero di colonscopie da eseguire per individuare una lesione di alto grado scende a 2.58.

## Conclusioni

I risultati di questo studio indicano che utilizzando un panel di marcatori molecolari su campioni di DNA fecale, in una popolazione di screening FIT positivi, abbiamo una associazione significativa nell'individuare quei soggetti a maggior rischio per cancro o adenomi avanzati. Con questo approccio saremmo quindi in grado di ridurre in modo significativo il numero di colonscopie. Questi dati andranno poi confermati da studi di più ampie dimensioni.

Tabella 1 curve ROC dei 5 marcatori inseriti nel panel

Marker	ROC area	95%CI
dna	0.59	0.52 0.67
long_dna	0.66	0.58 0.74
apc1450_a	0.42	0.34 0.50
bat40_12	0.63	0.53 0.73
kras12_act	0.62	0.54 0.70