

# Cribado del cáncer colorrectal mediante la detección no invasiva de mutaciones K-ras en células exfoliadas en el material fecal. Resultados preliminares\*

J. Mora<sup>1</sup>, E. Urgell<sup>1</sup>, L. Comas<sup>1</sup>, R. Boluda<sup>1</sup>, A. Antonijuan<sup>1</sup>, M. Grau<sup>1</sup>, J.A. Espinàs<sup>2</sup>, G. Capellá<sup>2</sup>, V. Moreno<sup>2</sup>

## Resumen

**Objetivo:** Determinar la efectividad diagnóstica de la detección de mutaciones K-ras en especímenes fecales de pacientes sometidos a colonoscopia diagnóstica en un programa de cribado poblacional de cáncer colorrectal.

**Material y métodos:** Se estudiaron 149 especímenes fecales de pacientes que dieron positivo en la prueba de sangre en heces y que iban a someterse a colonoscopia. Los diagnósticos fueron: 14 micropólipos, 34 adenomas, 9 carcinomas in situ, 11 carcinomas invasivos y 81 colonoscopias no patológicas. En 122 de estos pacientes se analizaron especímenes de tejido. La detección de mutaciones en el codón 12 del gen K-ras se realizó mediante dos métodos RFLP/PCR para BstNI, uno de sensibilidad estándar y otro de alta sensibilidad.

**Resultados:** La mutación K-ras en los especímenes fecales se detectó en 6% de los adenomas y en 27% de los carcinomas invasivos. Al utilizar el método de alta sensibilidad se incrementó la detección a un 9% en adenomas y 36% en carcinomas invasivos. Las especificidades fueron del 95% y 93% para el método estándar y el de alta sensibilidad, respectivamente. La coincidencia entre los resultados obtenidos en especímenes fecales y en tejidos fue del 82% en el grupo tumoral y del 96% en el grupo no patológico para el método estándar, y del 86% en tumores y 94% en no patológicos para el método de alta sensibilidad.

**Conclusiones:** Los resultados obtenidos apoyan la utilización de la detección de mutaciones K-ras en especímenes fecales en el diagnóstico precoz de cáncer colorrectal, ya que ofrece una alternativa no invasiva para aquellos pacientes en los que la colonoscopia no sea factible o haya sido incompleta.

**Palabras Clave:** mutaciones K-ras, cáncer colorrectal, técnicas basadas en el polimorfismo de longitud del fragmento de restricción (RFLP), especímenes fecales, colonoscopia

## Summary: Screening for colorectal cancer using non-invasive detection of K-ras mutations in faecal exfoliated cells. Preliminary results.

**Purpose:** The aim of this study was to evaluate the diagnostic efficiency of K-ras mutation detection in faecal exfoliated cells, in a group of patients undergoing diagnostic colonoscopy following a screening programme.

**Material and methods:** We studied a total of 149 faecal samples of patients with positive faecal blood test undergoing colonoscopy. Final diagnosis were 14 polyps, 34 adenomas, 9 carcinomas in situ, 11 invasive carcinomas and 81 normal colonoscopies. In 122 of these patients tissue samples were also analysed. K-ras codon 12 mutations were analysed using two RFLP/PCR methods with standard and high sensitivity.

**Results:** K-ras mutations in faecal samples were detected in 6% of adenomas and in 27% of invasive carcinomas. Using the high sensitivity method the detection increased to 9% in adenomas and 36% in invasive carcinomas. Specificity were 95% and 93% for standard and high sensitivity method respectively. Agreement rate between results obtained in faecal and tissues samples was 82% in tumour group and 96% in normal group for the standard method and 86% in tumours and 94% in normals for the high sensitivity method.

**Conclusions:** The results obtained support the use of K-ras mutation detection in faecal samples in the early diagnosis of colorectal cancer because it offers a non invasive alternative to colonoscopy when this diagnostic procedure cannot be adequately performed.

**Key words:** K-ras mutations, colorectal cancer, restriction fragment length polymorphism techniques (RFLP), faecal samples, colonoscopy

## INTRODUCCIÓN

El cáncer colorrectal (CCR) es un problema sanitario de gran importancia en los países occidentales, constituyendo el

segundo cáncer más frecuente tanto en los hombres como en las mujeres (1). En la patogénesis del CCR intervienen tanto factores ambientales como genéticos, los cuales pueden interaccionar durante la progresión neoplásica. Actualmente es bien sabido que la tumorigénesis colorrectal es el resultado de la acumulación progresiva de alteraciones moleculares específicas. Aunque, con frecuencia, las alteraciones genéticas ocurren en una secuencia temporal determinada, es la acumulación de las alteraciones más que el orden de adquisición lo que determina las características biológicas de la célula tumoral. Desgraciadamente, cuando estos tumores se manifiestan clíni-

<sup>1</sup>Servei de Bioquímica Clínica. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.

<sup>2</sup>Institut Català d'Oncologia. Hospital Duran i Reynals. Hospitalet, Barcelona.

\*Este trabajo corresponde a una comunicación científica presentada y premiada en el 15th IFCC-FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine y el XXII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, celebrados en Barcelona del 1 al 5 de junio de 2003.

camente y los pacientes acuden a la consulta médica, están ya en su mayoría extendidos localmente, con lo que la posibilidad de curación quirúrgica se limita a un 30-40%. Por el contrario, si el tumor se detecta en sus estadios iniciales, cuando está localizado en el intestino, la tasa de supervivencia a los 5 años supera el 85% y esto hace que el diagnóstico precoz sea esencial. Se considera que la mayoría de carcinomas de colon se originan a partir de adenomas benignos, y se ha demostrado además que su detección precoz y posterior extirpación previene el desarrollo de la neoplasia. Existen evidencias experimentales recientes que sugieren que el proceso carcinogénico en el colon pueda iniciarse con alteraciones genéticas y morfológicas en unas pocas criptas individuales. Estas criptas seleccionadas, conocidas como focos de criptas aberrantes (FCA), son consideradas como supuestos precursores de adenomas (2,3). La alta incidencia de CCR en personas mayores de 50 años justifica la utilización de escrutinios poblacionales no invasivos tales como la prueba de sangre oculta en heces (FOBT) (1). Los individuos con una historia personal o familiar de cáncer colorrectal o bien de adenomas, así como los pacientes con patología inflamatoria crónica, presentan mayor riesgo de desarrollar un CCR y por lo tanto son candidatos a un escrutinio más intenso y/o a una mayor vigilancia. Así pues, en estos individuos se recomienda la práctica de colonoscopias periódicas por su sensibilidad en detectar tanto la presencia de pólipos como la de carcinomas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la colonoscopia es una exploración invasiva, cara y no libre de riesgos.

El cribado del cáncer colorectal mediante técnicas moleculares realizadas en especímenes fecales se caracteriza principalmente por el alto grado de coincidencia entre los resultados obtenidos en las células exfoliadas en heces y en las del propio tumor. Las células que se encuentran en la superficie de la mucosa colónica son continuamente vertidas hacia el lumen y eliminadas del tracto intestinal con las heces. La presencia de mutaciones en las células exfoliadas desde la mucosa colónica a las heces refleja fielmente las alteraciones genéticas del propio tumor (4-6). La técnica de la reacción en cadena por la polimerasa (PCR) ha hecho posible la detección de pocas copias mutadas del gen a estudiar en especímenes parcialmente purificados.

Hasta ahora las alteraciones genéticas detectadas con más frecuencia en el CCR implican a los genes de la *APC*, *p53* y *K-ras*. Existen diversos factores que hacen que la detección del gen *K-ras* mutado sea el más firme y prometedor candidato a marcador molecular aplicado al escrutinio del cáncer colorrectal.

Las mutaciones en el gen *K-ras* están presentes en un 40-50% de los adenomas colorrectales y en los carcinomas. El hecho de que su patrón mutacional quede restringido en estos tumores a los codones 12 y 13, ha facilitado enormemente el desarrollo de técnicas de detección de gran robustez y alta sensibilidad, requisitos imprescindibles para su aplicación en un contexto clínico (7-9). Es de gran interés el hecho de que hasta un 81% de los focos de criptas aberrantes, las posibles lesiones precursoras, contienen mutaciones *K-ras*, cuya relevancia biológica es actualmente desconocida.

El objetivo del presente estudio es determinar la eficiencia diagnóstica de la detección de mutaciones *K-ras* en especímenes fecales de pacientes sometidos a colonoscopia diagnóstica dentro de un programa de escrutinio poblacional de cáncer colorrectal.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Pacientes y especímenes

Se ha estudiado un total de 149 especímenes fecales de pacientes procedentes de un programa de cribado poblacional (programa de cribado de cáncer colorrectal del área de l'Hospitalet de Llobregat) que presentaban positividad a la prueba de sangre en heces y que iban a someterse a una colonoscopia diagnóstica (83 hombres y 66 mujeres; edad media: 60 años, intervalo: 50-70 años). Los diagnósticos obtenidos fueron los siguientes: en 68 pacientes se detectaron tumores colorrectales (14 micropólipos, 34 adenomas, 9 carcinomas in situ y 11 carcinomas invasivos) y en los 81 casos restantes las colonoscopias no fueron patológicas.

En 122 de estos pacientes pudieron obtenerse además, durante la colonoscopia, especímenes de tejido para analizar en paralelo.

### Extracción de DNA en especímenes fecales y tejidos

Los volúmenes recogidos de los especímenes fecales durante la colonoscopia oscilaron desde 2 mL hasta 50 mL. Este material se sometió a unos lavados previos con solución de NaCl 9 g/L y posterior centrifugación, congelando a  $-20^{\circ}\text{C}$  los sedimentos de material celular obtenidos. Para la extracción de DNA se partió de 500  $\mu\text{L}$  de material celular que se resuspendió en tampón Tris-EDTA 10:1 hasta un volumen final de 750  $\mu\text{L}$  y las células se lisaron mediante la adición de 35  $\mu\text{L}$  de duodecilo sulfato sódico (SDS) al 20% y 80  $\mu\text{L}$  de proteinasa K a una concentración de 10 mg/mL, incubando a  $37^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. La extracción del DNA se realizó mediante el método estándar del fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (utilizando 1 volumen de fenol, 1 volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 25:24:1 y 1 volumen de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1) y posterior precipitación del DNA con isopropanol. El DNA, una vez precipitado y tras dos lavados con etanol al 70%, se resuspendió en 50  $\mu\text{L}$  de agua autoclavada. Con la finalidad de eliminar interferentes de bajo peso molecular presentes en los especímenes fecales y que son inhibidores de la reacción de la PCR se procedió a purificar este DNA mediante dos pases por minicolumna comercial Wizard<sup>®</sup> DNA Clean-up System (Promega). El volumen final de DNA obtenido tras su purificación fue de 25  $\mu\text{L}$ .

Para la extracción de DNA en los especímenes de tejido se siguió el mismo procedimiento del fenol-cloroformo y precipitación con isopropanol, resuspendiendo el DNA con 50  $\mu\text{L}$  de agua autoclavada.

### Detección de Mutaciones en el codón 12 del gen *K-ras*

La detección de mutaciones en el codón 12 del gen *K-ras* se realizó mediante dos técnicas basadas en los polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP) para la enzima *Bst*NI en productos amplificados mediante la reacción en cadena por la polimerasa (PCR): a) Método estándar no enriquecido (NE-RFLP/PCR), con una detección de 1 alelo mutado en  $10^2$  alelos no mutados y b) Método enriquecido por digestión enzimática continua (CED-RFLP/PCR) que consigue detectar 1 alelo mutado en  $10^5$  alelos no mutados.

a) Para la detección de mutaciones mediante el método NE-RFLP/PCR se realizó una primera PCR utilizando los siguientes cebadores: *K-ras* 5' (5'-ACTGAATATAAAGCTTGTGGTAGTTGGACCT-3') a una concentración de 750  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , que

es el que introduce un cambio de una G por una C y permite crear una diana (CCTGG) para la enzima de restricción *Bst*NI (New England Biolabs Inc., MA, USA), y el cebador DD5P (5'-TCATGAAATGGTCAGAGAA-3') a la misma concentración y que no introduce ningún cambio. Esta diana se pierde cuando existe una mutación en el codón 12 del gen *K-ras*, obteniéndose un fragmento de 143 pares de bases (pb) cuando el alelo está mutado y de 114 pb cuando el alelo no tiene la mutación. Las condiciones de amplificación de la primera PCR fueron de 12 ciclos a 54 °C, 15 s; 72 °C, 15 s; 90 °C, 15 s. A continuación se realizó una segunda PCR utilizando los cebadores *K-ras* 5' y *K-ras* 3' (5'-TCAAAGAATGGTCCTG-GACC-3') y 45 ciclos de amplificación. El cebador *K-ras* 3' introduce otra diana para *Bst*NI que permite obtener un control interno de digestión (128 pb). La digestión final con *Bst*NI se realizó a 60 °C un mínimo de 2 horas y la separación de los fragmentos se obtuvo por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% y posterior tinción con bromuro de etidio (0,5 mg/mL). Como controles se utilizaron dos líneas celulares pancreáticas, la NP9 y la NP18 que son positivas y negativas para la mutación, respectivamente. Los reactivos y las concentraciones utilizadas en la PCR han sido descritos previamente (9).

b) El método CED-RFLP/PCR se basa en la termoestabilidad de la enzima para combinar dos etapas de PCR con una digestión enzimática que enriquece el alelo mutado desde el inicio de la primera PCR. Los cebadores son los mismos que se utilizan en el método anterior pero añadiendo a la mezcla de la 1ª PCR la enzima *Bst*NI (10 U). Con la adición de la enzima se consigue digerir de forma continua los productos amplificados no mutados, potenciándose así los productos que contienen la mutación ya que éstos no son digeridos. Las condiciones de amplificación fueron 54 °C, 15 s; 72 °C, 15 s; 90 °C, 15 s con 12 ciclos para la 1ª PCR y 35 ciclos para la 2ª PCR. Para la digestión final y la electroforesis se procedió como en el método anterior. Los reactivos utilizados también han sido descritos previamente (10).

Con la incorporación del control de digestión en ambas técnicas es posible distinguir claramente una muestra que contiene la mutación de una muestra mal digerida; para que una muestra sea positiva, la banda del alelo mutado (143 pb) tiene que ser más intensa que la banda del control de digestión (128 pb).

## RESULTADOS

En la tabla I se indican los resultados obtenidos del estudio de la detección de mutaciones *K-ras* en los 149 especímenes

fecales analizadas utilizando los dos métodos descritos. El rendimiento de la amplificación del DNA de estos especímenes fecales siguiendo el método convencional de extracción con fenol-cloroformo y posterior purificación por columna fue del 100%. Utilizando el método estándar no enriquecido (NE-RFLP/PCR) la mutación *K-ras* se detectó en 2 de los 34 (6%) adenomas estudiados y en 3 de los 11 (27%) carcinomas invasivos. Con el método enriquecido por digestión enzimática continua (CED-RFLP/PCR) se detectó la mutación *K-ras* en 1 de los 14 (7%) micropólipos, en 3 de los 34 (9%) adenomas y en 4 de los 11 (36%) carcinomas invasivos. La especificidad obtenida al analizar los especímenes fecales de los pacientes con colonoscopias no patológicas fue del 95% y de 93% según si la detección de mutaciones *K-ras* se realizaba con el método NE o CED respectivamente.

La coincidencia entre los resultados de *K-ras* obtenidos en especímenes fecales y sus correspondientes tejidos en un total de 122 pacientes y utilizando los dos métodos RFLP/PCR se expresa en la tabla II. Utilizando el método estándar la coincidencia obtenida en el grupo de tumores colorrectales fue de 36 en un total de 44 (82%) y de 38 en 44 (86%) al utilizar el método de alta sensibilidad. En el grupo de colonoscopias no patológicas la coincidencia fue de 75 en un total de 78 (96%) y de 73 en 78 (94%) según fuera el método estándar o de alta sensibilidad, respectivamente, el utilizado para la detección de estas mutaciones.

En la figura 1 se representa la sensibilidad diagnóstica en especímenes fecales y en tejidos, que la detección de mutaciones *K-ras* ofrece con los dos métodos analizados en el grupo de adenomas y carcinomas (panel A) y en el grupo de adenomas y carcinomas invasivos (panel B).

## DISCUSIÓN

Numerosos trabajos indican que la detección de mutaciones *K-ras* en especímenes fecales puede ser de utilidad en el diagnóstico precoz del cáncer colorrectal ofreciendo una alternativa diagnóstica no invasiva. En el presente estudio esta detección en especímenes fecales se realiza dentro de un programa de cribado de cáncer colorrectal en pacientes asintomáticos a los cuales, tras la detección de sangre oculta en las heces, se les propone la realización de una colonoscopia. Las principales limitaciones de la detección de mutaciones en especímenes fecales son, por una parte, la presencia de inhibidores de la reacción de PCR y, por otra, la baja proporción de

**Tabla I.** Sensibilidad diagnóstica de los dos métodos RFLP/PCR utilizados para la detección de mutaciones *K-ras* en especímenes fecales (n=149)

Diagnóstico Final	n	Análisis de Mutaciones <i>K-ras</i>			
		Método estándar (NE)		Método alta sensibilidad (CED)	
• Tumores colorrectales	68				
– Micropólipos	14	0/14	0%	1/14	7%
– Adenomas	34	2/34	6%	3/34	9%
– Carcinomas	20				
· In situ	9	0/9	0%	0/9	0%
· Invasivos	11	3/11	27%	4/11	36%
• Colonoscopias no patológicas	81	4/81*		6/81*	

\*La Especificidad fue de 95% para el método NE y de 93% para el método CED

**Tabla II.** Porcentaje de coincidencia entre los resultados de K-ras obtenidos en especímenes fecales y en tejido utilizando dos métodos RFLP/PCR (n=122)

Diagnóstico Final	n	Análisis de mutaciones K-ras en especímenes fecales			
		Método estándar (NE)		Método alta sensibilidad (CED)	
		Coincidencia con los resultados obtenidos en tejido			
		Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
• Tumores colorrectales	44				
– Micropólipos	4	0	4	0	4
– Adenomas	23	2	16	3	16
– Carcinomas	17				
· In situ	7	0	5	0	5
· Invasivos	10	3	6	4	6
		36/44 (82%)		38/44 (86%)	
• Colonoscopias no patológicas	78	0	75	0	73
		75/78 (96%)		73/78 (94%)	

células tumorales respecto de las células epiteliales de descamación presentes, lo cual requiere técnicas de alta sensibilidad. Existen diversos métodos de purificación descritos para eliminar estos interferentes presentes en especímenes fecales (11). En nuestro caso, utilizando el método comercial de purificación por columna descrito, el rendimiento de la amplificación de los especímenes fue del 100%. Al utilizar el método enriquecido por digestión enzimática continua (CED-RFLP/PCR) se detectó la mutación en un 20% del total de carcinomas (9 in situ y 11 invasivos) y en un 36% del grupo de carcinomas invasivos. Las frecuencias de mutaciones K-ras

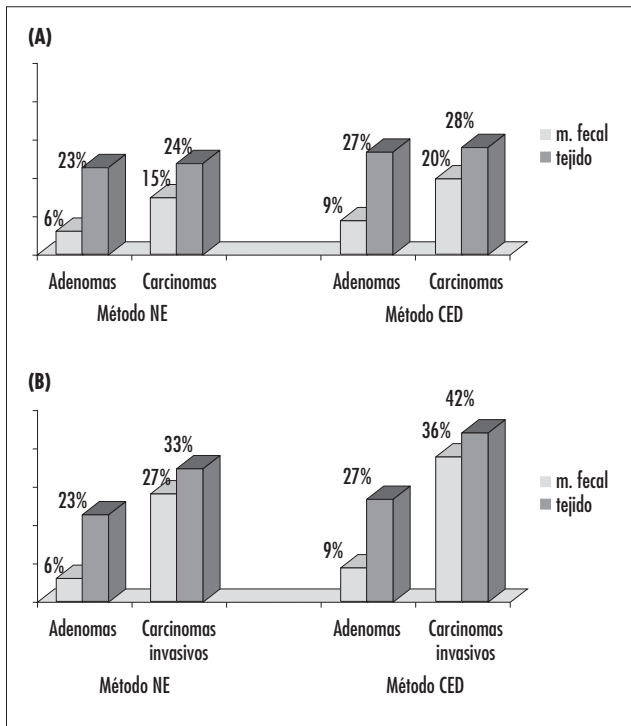
detectadas en especímenes fecales de pacientes con cáncer colorrectal publicadas en la literatura oscilan entre el 26,9% y el 56,5% (6, 12-16). Estas diferencias dependen básicamente de la sensibilidad del método utilizado para su detección y de la selección de los pacientes con cáncer colorrectal incluidos. En nuestro estudio la sensibilidad diagnóstica aumentó de un 27% a un 36% al utilizarse el método de alta sensibilidad. No obstante, esta última sensibilidad es inferior a la obtenida anteriormente por nuestro grupo (55%) utilizando el mismo método, pero en un contexto clínico diferente, no de cribado poblacional sino de pacientes con sintomatología clínica que acudían a la realización de una colonoscopia diagnóstica (6). En el grupo de adenomas, la detección también fue menor (9%) a la observada en nuestro trabajo anterior (27%), donde los adenomas analizados eran de gran tamaño y en los cuales está descrita una mayor incidencia de mutaciones K-ras (17).

La especificidad de la detección de mutaciones K-ras en heces ha sido también cuestionada ya que diversos estudios han detectado la presencia de dichas mutaciones en pacientes con colitis ulcerosa (18, 19), en focos de criptas aberrantes (2,3), y en ausencia de lesiones macroscópicas (20), aumentando esta detección al utilizar técnicas más sensibles. En el presente estudio la especificidad fue del 95% y del 93% en el grupo de 81 pacientes que presentaron colonoscopias no patológicas según que la detección de mutaciones K-ras se realizara con el método NE o CED, respectivamente. En el trabajo previo realizado por nuestro grupo la especificidad obtenida fue del 100% para ambos métodos (6).

La alta coincidencia obtenida entre los resultados en especímenes fecales y tejidos es similar a la descrita en otros trabajos (4, 5, 18), siendo superior en el grupo de carcinomas respecto al de adenomas (6) por la mayor facilidad de estas células tumorales de descamarse a la luz intestinal y poder ser detectadas en las heces.

Los resultados obtenidos apoyan la utilización de la detección de mutaciones K-ras en especímenes fecales en el diagnóstico precoz de cáncer colorrectal, ya que ofrece una alternativa no invasiva para aquellos pacientes donde la colonoscopia no sea viable o haya sido incompleta.

Para que la detección de alteraciones genéticas en especímenes de heces pueda utilizarse como una alternativa no inva-



**Figura 1.** Sensibilidad diagnóstica de los dos métodos RFLP/PCR utilizados para la detección de mutaciones K-ras en especímenes fecales y en tejido en el grupo de adenomas y carcinomas (panel A) y en el grupo de adenomas y carcinomas invasivos (panel B).

siva a la colonoscopia en todos pacientes con sospecha de cáncer colorrectal es necesario incrementar la sensibilidad diagnóstica. Con este objetivo, diferentes autores han propuesto la determinación conjunta de la presencia de mutaciones en otros genes como *p53* (12), *APC* (21) o el estudio de la inestabilidad en microsatélites (13) consiguiendo incrementar la sensibilidad hasta un 71% al utilizar un panel de 3 (*K-ras*, *p53* y *BAT 26*) (11, 13) o de 4 marcadores conjuntamente (*K-ras*, *p53*, *BAT 26* y *APC*) (22, 23).

Correspondencia:  
Josefina Mora Brugués  
Servei de Bioquímica Clínica  
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau  
Avd. Antoni M. Claret 167  
08025 Barcelona.  
e-mail: jmora@hsp.santpau.es

## BIBLIOGRAFÍA

- Levin B. Colorectal cancer screening. *Cancer* 1993; 72 (Suppl3): 1056-60.
- Losi L, Roncucci L, di Gregorio C, de Leon MP, Benhattar J. K-ras and p53 mutations in human colorectal aberrant crypt foci. *J Pathol* 1996; 178: 259-63.
- Shivapurkar N, Huang L, Ruggeri B, Swalsky PA, Bakker A, Finkelshtein S, et al. K-ras and p53 mutations in aberrant crypt foci and colonic tumors from colon cancer patients. *Cancer Letters* 1997; 115: 39-46.
- Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR, Kinzler KW, Levin B, Frost P, et al. Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science* 1992; 256: 102-5.
- Smith-Ravin J, England J, Talbot IC, Bodmer W. Detection of c-K-ras mutations in faecal samples from sporadic colorectal cancer patients. *Gut* 1995; 36: 81-6.
- Puig P, Urgell E, Capellá G, Sancho FJ, Pujol J, Boadas J, et al. A highly sensitive method for K-ras mutation detection is useful in diagnosis of gastrointestinal cancer. *Int J Cancer* 2000; 85: 73-7.
- Capellá G, Cronauer-Mitra S, Peinado MA, Perucho M. Frequency and spectrum of mutations at codons 12 and 13 of the c-K-ras gene in human tumors. *Environmental Health Perspectives* 1991; 93: 125-31.
- Kahn SM, Jiang W, Culbertson TA, Weinstein IB, Williams GM, Tomita N, et al. Rapid and sensitive nonradioactive detection of mutant K-ras genes via "enriched" PCR amplification. *Oncogene* 1991; 6: 1079-83.
- Mora J, Puig P, Boadas J, Urgell E, Montserrat E, Lerma E, et al. K-ras gene mutations in the diagnosis of fine-needle aspirates of pancreatic masses: a prospective study using two techniques of different sensitivity. *Clinical Chemistry* 1998; 44: 2243-48.
- Puig P, Urgell E, Capellá G, Villanueva A, Grau M, Sancho FJ, et al. Improved detection of K-ras codon 12 mutations in fecal exfoliated cells. *Laboratory Investigation* 1999; 79: 617-18.
- Dong SM, Traverso G, Johnson C, Geng L, Favis R, Boynton K, et al. Detecting colorectal cancer in stool with the use of multiple genetics targets. *J Natl Cancer I* 2001; 93: 858-65.
- Notarnicola M, Cavallini A, Cardone R, Pezzolla F, Demma I, Di Leo A. K-ras and p53 mutations in DNA extracted from colonic epithelial cells exfoliated in faeces of patients with colorectal cancer. *Dig Liver Dis* 2000; 32: 131-36.
- Rengucci C, Maiolo P, Saragoni L, Zoli W, Amadori D, Calistri D. Multiple detection of genetic alterations in tumors and stool. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 590-93.
- Calistri D, Rengucci C, Bocchini R, Saragoni L, Zoli W, Amadori D. Fecal multiple molecular tests to detect colorectal cancer in stool. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2003; 1: 377-83.
- Nishikawa T, Maemura K, Hirata I, Matsue R, Morikawa H, Toshina K, et al. A simple method of detecting K-ras point mutations in stool samples for colorectal cancer screening using one-step polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism analysis. *Clin Chim Acta* 2002; 318: 107-12.
- Wan J, Zhang ZQ, You WD, Sun HK, Zhang JP, Wang YH, et al. Detection of K-ras gene mutation in fecal samples from elderly large intestinal cancer patients and its diagnostic significance. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 743-6.
- Capellá G, Lluís F, Sancho F, Perucho M. Activation of the c-K-ras gene in the colon adenoma-carcinoma sequence. *Surg Forum* 1990; 41: 459-61.
- Ratto C, Flamini G, Sofo L, Nucera P, Ippoliti M, Curigliano G, et al. Detection of oncogene mutation from neoplastic colonic cells exfoliated in feces. *Dis Colon Rectum* 1996; 39: 1238-44.
- Villa E, Dugani A, Rebecchi AM, Vignoli A, Grottola A, Buttafoco P, et al. Identification of subjects at risk for colorectal carcinoma through a test based on K-ras determination in the stool. *Gastroenterology* 1996; 110: 1346-53.
- Tobi M, Luo FC, Ronai Z. Detection of K-ras mutation in colonic effluent samples from patients without evidence of colorectal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 1007-10.
- Traverso G, Shuber A, Levin B, Johnson C, Olsson L, Schoetz DJ Jr et al. Detection of APC mutations in fecal DNA from patients with colorectal tumors. *N Engl J Med* 2002; 346: 311-20.
- Ahlquist DA, Skoletsky JE, Boynton KA, Harrington JJ, Mahoney DW, Pierceall WE, et al. Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: feasibility of a multitarget assay panel. *Gastroenterology* 2000; 119: 1219-27.
- Tagore KS, Lawson MJ, Yucaitis JA, Gage R, Orr T, Shuber AP, et al. Sensitivity and specificity of a stool DNA multitarget assay panel for the detection of advanced colorectal neoplasia. *Clin Colorectal Cancer* 2003; 3: 47-53.