



የጥናት ሪፖርት

**Risultati della Survey
sulle Caratteristiche
e le Attività dei Centri
Afferenti
alla Rete Nazionale
per il Sequenziamento di
Nuova Generazione (NGS)
SIAPEC-PMMP**

Gennaio 2021

PROMOTORI



SIAPEC - IAP

*Società Italiana di Anatomia Patologica e Citologia Diagnostica
Divisione Italiana della International Academy of Pathology*

**Patologia
Molecolare**



SIAPEC - IAP

**Medicina
Predittiva**



*Gruppo Italiano di Patologia Molecolare e Medicina Predittiva
(PMMP) - SIAPeC IAP*

INDICE

01.	GRUPPO DI LAVORO.....	PAG. 4
01.1	AFFILIAZIONI.....	PAG. 4
02.	INTRODUZIONE.....	PAG. 5
03.	MATERIALI E METODI.....	PAG. 6
04.	RISULTATI.....	PAG. 7
05.	DISCUSSIONE.....	PAG. 14
06.	REFERENZE BIBLIOGRAFICHE.....	PAG. 17

01. Gruppo di Lavoro

Antonio Marchetti¹, Mattia Barbareschi², Massimo Barberis³, Simonetta Buglioni⁴, Fiamma Buttitta¹, Matteo Fassan⁵, Gabriella Fontanini⁶, Caterina Marchiò⁷, Mauro Papotti⁸, Giancarlo Pruneri⁹, Aldo Scarpa¹⁰, Giorgio Stanta¹¹, Giovanni Tallini¹², Giancarlo Troncone¹³, Silvio Veronese¹⁴, Mauro Truini¹⁵, Anna Sapino.⁷⁻¹⁵

01.1 Affiliazioni:

- ¹ *Laboratorio di Diagnostica Molecolare Oncologica, Center for Advanced Studies and Technology (CAST), Università di Chieti- Pescara*
- ² *Unità di Anatomia Patologica, Dipartimento dei Servizi Clinici - Ospedale santa Chiara, Trento*
- ³ *Divisione di Anatomia Patologica, IEO - European Institute of Oncology, IRCCS, Milano*
- ⁴ *UOC Anatomia, Istologia Patologica e Citodiagnostica, Istituto Nazionale Tumori Regina Elena IRCCS, Roma*
- ⁵ *Dipartimento di Medicina (DIMED), Università di Padova. Istituto Oncologico Veneto, IOV-IRCCS, Padova*
- ⁶ *Dipartimento di Patologia Chirurgica, Medica, Molecolare e dell'Area Critica, Università di Pisa*
- ⁷ *Divisione di Anatomia Patologica, Istituto dei Tumori di Candiolo FPO-IRCCS, Candiolo, Torino*
- ⁸ *Unità di Anatomia Patologica, Dipartimento di Oncologia, Università di Torino e Azienda Ospedaliero-Universitaria "Città della Salute e della Scienza, Torino*
- ⁹ *Unità di Anatomia Patologica e Medicina di Laboratorio, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano*
- ¹⁰ *Sezione di Anatomia Patologica, Dipartimento di Diagnostica e Sanità Pubblica e Centro di Ricerca ARC-Net, Università di Verona, Verona*
- ¹¹ *DSM-Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Trieste, Trieste*
- ¹² *Dipartimento di Medicina Specialistica Diagnostica e Sperimentale (DIMES), Università di Bologna. Laboratorio di Patologia Molecolare-Dipartimento Interaziendale di Anatomia Patologica, Bologna*
- ¹³ *Divisione di Anatomia Patologica Dipartimento di salute Pubblica, Università Federico II di Napoli, Napoli*
- ¹⁴ *Patologia Molecolare, SC Anatomia, Istologia Patologica e Citogenetica, Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano,*
- ¹⁵ *Anna Sapino e Mauro Truini, rispettivamente Presidente e Past-President della Società Italiana di Anatomia Patologica e Citologia Diagnostica - IAP. Antonio Marchetti, Coordinatore del Gruppo di Studio SIAPEC-PMMP.*

02. INTRODUZIONE

L'oncologia di precisione con farmaci a bersaglio molecolare implica un accurato inquadramento clinico del paziente ed una approfondita analisi morfologica, immunofenotipica e molecolare della patologia neoplastica attraverso una serie di processi che richiedono il coinvolgimento di varie professionalità in attività di equipe (1,2).

Il patologo è sempre più coinvolto nella caratterizzazione molecolare del tumore. Le attuali necessità diagnostiche in vari ambiti oncologici richiedono analisi a largo spettro, che includano informazioni sull'assetto mutazionale, i meccanismi di riparazione del DNA e la risposta immunitaria (3-6). Queste tipologie di analisi non possono essere più affrontate con approcci classici che risultano ormai improponibili per motivazioni inerenti i costi dei singoli reagenti, i tempi di esecuzione dei test e la scarsità di materiale biologico disponibile.

Il sequenziamento di nuova generazione (Next Generation Sequencing, NGS) anche definito come Sequenziamento Massivo Parallelo (Massive Parallel Sequencing, MPS) si sta diffondendo nei centri diagnostici e sta progressivamente sostituendo le metodiche classiche di analisi molecolare meno processive (7-11).

L'attivazione di centri operanti in ambito diagnostico con la tecnologia NGS ha richiesto negli anni adattamenti non semplici alla nuova tecnologia, con investimenti cospicui e acquisizione di nuove professionalità.

La Società Italiana di Anatomia Patologica e Citologia Diagnostica tramite il Gruppo di Studio di Patologia Molecolare e Medicina Predittiva (PMMP) da anni sta seguendo l'evoluzione delle attività di diagnostica molecolare nei centri di Anatomia Patologica operanti sul territorio Nazionale. Con il progressivo incremento dei centri che hanno nel tempo adottato la tecnologia NGS in diagnostica, è stata attivata *una rete* di studio sul sequenziamento massivo parallelo in Italia, riconosciuta come **Rete Nazionale NGS SIAPEC** dal Direttivo della Società Scientifica SIAPeC in data 5 luglio 2017.

Da allora sono state implementate, all'interno della rete, attività che hanno previsto un allineamento dei laboratori tramite attività di analisi concordanza diagnostica e monitoraggio dei centri afferenti alla Rete Nazionale NGS SIAPEC tramite questionari dedicati immediatamente precedenti gli incontri annuali del Gruppo PMMP.

In relazione alle crescenti necessità di analisi genomiche allargate sul territorio nazionale, e più specificamente nel contesto delle reti oncologiche regionali, il comitato scientifico del Gruppo PMMP ha deciso di attivare una survey nazionale per valutare nel dettaglio le attività connesse alla diagnostica genomica in ambito oncologico all'interno della Rete Nazionale NGS SIAPEC-PMMP.

03. MATERIALI E METODI

Il Gruppo di Studio SIAPEC-PMMP ha attivato una survey coinvolgendo 30 centri afferenti alla Rete Nazionale NGS SIAPEC. La survey è stata condotta tramite un questionario organizzato per valutare una serie di parametri caratterizzanti il Centro e le attività in esso svolte.

Di seguito sono riportati i principali punti affrontati nel questionario:

- Denominazione del Centro, Affiliazione, Direttore, Responsabile.
- Personale afferente al centro (Medici, Biologi/Biotecnologi, Tecnici di Laboratorio)
- Strumentazioni presenti nel centro (piattaforme per il sequenziamento massivo parallelo, piattaforme per l'allestimento di librerie genomiche)
- Pannelli genici utilizzati (denominazione del pannello, numero dei geni, acidi nucleici richiesti)
- Quantificazione delle Attività svolte (Ricerca-Diagnostica) nel corso dell'ultimo anno. Indicazione delle principali patologie neoplastiche sottoposte ad esame.
- Esistenza di un Modello di refertazione
- Rapporto del Laboratorio con gruppi multidisciplinari per la selezione dei trattamenti nei pazienti sottoposti ad analisi genomica (Molecular Tumor Board)
- Professionalità coinvolte nel molecular tumor board
- Eventuale Ratifica regionale del Molecular Tumor Board di riferimento per il laboratorio.

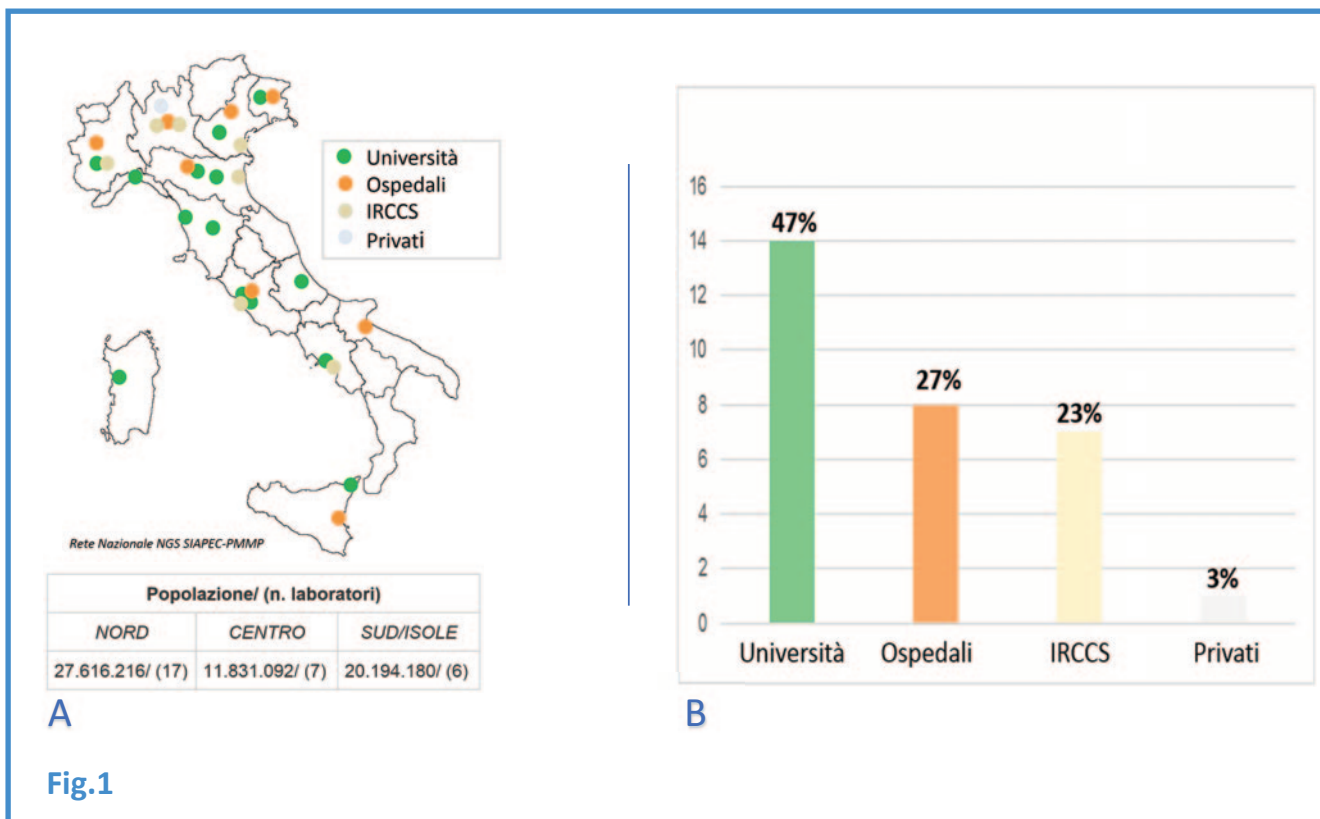
Il questionario inviato ai centri partecipanti alla survey è disponibile come file allegato.

Il questionario è stato sottoposto ai 30 centri nel periodo luglio-dicembre 2020. Sono stati inizialmente concessi due mesi di tempo (Luglio-Agosto 2020) per rispondere ai quesiti formulati. Hanno risposto alla survey nei tempi previsti 21 centri. I risultati ottenuti sono stati tabulati, anonimizzati e sottoposti ad analisi. I dati preliminari ottenuti sui 21 centri sono stati presentati in forma cumulativa alla riunione nazionale del gruppo PMMP, tenutasi per via telematica l'8 settembre 2020. Ulteriori dati sono stati forniti dai restanti centri nel periodo ottobre-dicembre 2020. I dati definitivi della survey, sono stati tabulati su foglio di lavoro excel e sottoposti ad analisi statistica di frequenza, T Test e tabelle di contingenza.

Un valore di $P < 0.05$ è stato considerato come significativo. L'analisi è stata effettuata mediante software IBM® SPSS® Statistics. I dati finali sono stati presentati al comitato scientifico del gruppo PMMP, riunitasi in seduta plenaria il 18 gennaio 2021.

04. RISULTATI

Hanno partecipato alla survey nazionale, all'interno del gruppo di lavoro SIAPEC-PMMP, 30 centri distribuiti sul territorio come riportato in Fig.1 (A), tutti i centri hanno risposto a tutte le domande presenti nel questionario.



Diciassette centri sono situati al nord del paese, 7 centri al centro, 6 centri al sud (includente le isole maggiori). Sulla base della distribuzione geografica della popolazione italiana (dati ISTAT, 31 dicembre 2019) la distribuzione dei laboratori è risultata maggiore nel centro-nord rispetto al sud-isole. Mediamente, il rapporto laboratorio diagnostico/popolazione è risultato di 1/1.6 milioni di abitanti al nord, 1/1.7 milioni al centro e 1/3.4 milioni al sud/isole.

Riguardo alla tipologia dei centri, 14 laboratori sono ubicati in sedi Aziendali-Universitarie, 8 in grandi Ospedali e 7 in Istituti di Ricovero e Cura a carattere Scientifico (IRCCS), un centro privato ha partecipato alla survey. La Fig.1 (B) riporta la tipologia dei Centri con un grafico che ne illustra la distribuzione percentuale.

Ventiquattro (80%) dei centri del Network NGS SIAPEC-PMMP sono laboratori specializzati in tecnologie molecolari all'interno di centri di Anatomia Patologica, negli altri casi si tratta di laboratori di Patologia Clinica, Oncologia molecolare, Diagnostica Molecolare, strettamente connessi a centri di Anatomia Patologica. Il personale dedicato all'attività diagnostica nei centri è stato suddiviso in 3 categorie: Medici, Biologi, Tecnici di Laboratorio.

Come riportato in **Tabella 1**, nella quale i centri sono stati anonimizzati, mediamente circa 3 unità di ciascuna categoria sono presenti in ciascun centro con un minimo di 3 unità ed un massimo di 24 unità. Il 30% dei centri (9 su 30) ha meno di 5 unità di personale dedicato, mentre 12 centri (40%) presentano 10 o più unità. Il 40% dei centri ha riferito di avere unità di personale con competenze bioinformatiche.

Centro	Medici	Biologi	tecnici	TOTALE
1	2	2	3	7
2	2	6	2	10
3	2	2	3	7
4	0	4	4	8
5	7	1	9	17
6	0	5	2	7
7	10	8	16	34
8	3	1	2	6
9	2	1	2	5
10	1	2	1	4
11	1	3	1	5
12	0	1	4	5
13	1	1	4	6
14	1	2	1	4
15	2	2	0	4
16	2	4	1	7
17	0	4	1	5
18	3	4	5	12
19	1	2	3	6
20	4	3	3	10
21	2	3	3	8
22	1	1	1	3
23	0	8	2	10
24	14	4	3	21
25	2	2	1	5
26	5	8	4	17
27	8	12	4	24
28	1	2	3	6
29	2	3	5	10
30	0	2	8	10
	media 2,7	media 3,4	media 3,4	MEDIA TOTALE 9,4

Unità di Personale
 <5
 tra 6 e 9
 ≥10

Tabella 1

L'indagine compiuta sul numero e la tipologia di sequenziatori NGS presenti nei vari centri ha rivelato la presenza di 1 piattaforma di sequenziamento nel 33% dei laboratori, di due piattaforme nel 30% e di 3 o più piattaforme nel 37% dei centri. All'interno della rete sono presenti 31 piattaforme Illumina, 28 piattaforme Ion-Torrent e 4 piattaforme Qiagen.

In **Tabella 2** sono riportati i dati della survey relativi al numero e tipologia di piattaforme di sequenziamento presenti nei diversi centri.

Il turnover delle piattaforme è risultato elevato, in quanto la maggioranza dei centri ha riportato upgrade tecnologici nel corso degli anni. Ai fini dell'implementazione dei test NGS nella pratica clinica, risulta importante la diffusione di sistemi automatizzati per la preparazione di librerie genomiche che permettono di ridurre considerevolmente l'impegno degli operatori nella fase pre-analitica di allestimento dei test e gli errori umani. In Tab. 2 sono riportate anche le strumentazioni adottate nei centri per l'automatizzazione dei processi. Alcune di esse sono parte integrante o complementare di piattaforme commerciali per il sequenziamento NGS (es. Ion Chef per piattaforma Ion Torrent), in altri casi si tratta di sistemi meccatronici adattabili a diverse piattaforme di sequenziamento (Agilent, Hamilton Robotics; Masmec).

Centri	Piattaforme		Preparatore librerie genomiche	DIAGNOSI NGS 2019	Tabella 2
	Numero	Tipologia			
1	3	MS/NS/GR	Magnis	715	
2	1	S5	N. 2 Ion Chef System	1200	
3	2	MS/NS	Microlab starlet	400	
4	1	S5	Ion Chef System	0	
5	3	S5/PGM/HS	Ion Chef System	35	
6	3	MS/NS/S5	Ion Chef System - QIAgility	60	
7	2	S5/MS	Ion Chef System	198	
8	1	PGM	Ion Chef System	530	
9	3	MS/PGM/S5	NO	60	
10	1	GR	Qiacube	150	
11	2	GR	NO	360	
12	2	MS/S5	Ion Chef System - NGS Star	150	
13	3	MS/NS/NoS	NO	205	
14	1	PGM	NO	0	
15	2	S5/PGM	Ion Chef System	300	
16	3	MS/MS/NS	NGS Star	587	
17	1	PGM	NO	29	
18	2	S5/NS	Ion Chef System	1500	
19	2	MS/PGM	NO	26	
20	2	S5/MS	NO	40	
21	1	S5	Ion Chef System	1359	
22	3	S5/MS/NS	Ion Chef System	4	
23	3	S5/MS/NS	Ion Chef System - NGS Star	50	
24	1	MS	NO	0	
25	1	S5	Ion Chef System	0	
26	4	PGM/S5/S5/GN	N2. Ion Chef System	1600	
27	2	MS/NS	NO	20	
28	2	MS/NS	NO	25	
29	3	PGM/PGM/S5	Ion Chef System - Magnis	875	
30	3	MS/MS/MS	Omnia - Microlab starlet	803	

Abbreviazioni:
 MS, MiSeq (Illumina);
 NS, NextSeq (Illumina);
 GR, GeneReader (Qiagen);
 S5, S5 system (ThermoFisher);
 PGM, Personal Genomic
 Machine (ThermoFisher);
 HS, HighSeq (Illumina);
 NoS, NovaSeq (Illumina).

Sono stati raccolti tutti i dati relativi ai pannelli genetici utilizzati nei vari centri per la diagnostica NGS, in ordine di frequenza di utilizzo, dando 6 canali (slot) per l'inserimento nel questionario (dal pannello del gruppo 1, o di prima scelta, al pannello del gruppo 6).

In **Tabella 3** sono riportati i dati relativi ai pannelli indicati dai vari centri per il gruppo 1. Si tratta di pannelli genici con un numero di geni analizzabili da 2 a 80 ed una media pari a 27 geni per pannello; sono riportati in tabella anche gli acidi nucleici richiesti per l'espletamento del test.

Centri	Denominazione pannello: gruppo1	Numero di geni in esame	Acido nucleico richiesto
1	AIO ALL IN ONE	22	DNA
2	Oncomine™ Solid Tumour DNA	22	DNA
3	Myriapod NGS-LT 56G Onco Panel	56	DNA
4	Hotspot Cancer panel v2	50	DNA
5	Oncomine Focus Assay	80	DNA/RNA
6	Archer FusionPlex Sarcoma Kit (Archer Dx)	26	DNA/RNA
7	ONCOMINE BRCA ASSAY	2	DNA
8	OST DNA	22	DNA
9	BRCA1/2 DEVYSER	2	DNA
10	Qiaact BRCA UMI Panel	5	DNA
11	QIAact DNA AIT UMI panel	30	DNA
12	ONCOMINE UNIVERSAL DX	56	DNA/RNA
13	COLON-LUNG BENKIT panel	5	DNA
14	SiRe	6	DNA
15	AllRas	4	DNA
16	BRCA1/2 somatico mini-HRS (up-grade 2020 a Devyser BRCA)	2	DNA
17	Myriapod NGS-LT BRCA1-2 panel (HB: 2018/04)	3	DNA
18	Custom	26	DNA
19	Oncomine Focus Assay	80	DNA/RNA
20	Myriapod NGS-LT 56G Onco Panel	56	DNA
21	PAN-SOMATIC LAB-DEVELOPED 2.0	26	DNA
22	BRCA1/2 DEVYSER	2	DNA
23	Oncomine Focus Assay	52	DNA/RNA
24	Myriapod NGS-LT 56G Onco Panel	56	DNA/RNA
25	CUSTOM	25	DNA
26	SirE	7	DNA
27	MYRIADPOD NGS SOLID TUMOR	16	DNA
28	Myriapod NGS-LT 56G Onco Panel	56	DNA
29	Oncomine BRCA	2	DNA
30	HEREDITARY CANCER SOLUTION™	26	DNA

Tabella 3

Il numero dei pannelli adottati nei diversi centri varia da 1 a 6, con 30 centri che hanno riportato un pannello nel gruppo 1, 22 centri che hanno utilizzato anche un secondo pannello, 17 centri che hanno utilizzati 3 pannelli, 9 che ne hanno utilizzati 4, 4 che ne hanno utilizzati 5 e 3 che ne hanno utilizzati 6. Il numero dei geni nei pannelli riportati nei diversi gruppi variava da 2 a 5.

Come si evince dalla **Tabella 4**, il numero medio dei geni valutabili con i diversi pannelli aumentava progressivamente dai pannelli di 1° scelta ai pannelli di 6° scelta. Si desume dai dati che i pannelli di 4°, 5° e 6° scelta, con una media di geni analizzabili >100, erano utilizzati solo da un limitato numero di centri che disponevano di tecnologia ed esperienza adeguata. Per ciascun pannello utilizzato è stato riportato il software commerciale dedicato e, in presenza di competenze bioinformatiche nel centro, è stato indicato anche l'utilizzo di ulteriore software per l'analisi dei risultati. I dati analitici possono essere disponibili su richiesta al Direttivo SIAPEC.

Tabella 4	pannello: gruppo 1	pannello: gruppo 2	pannello: gruppo 3	pannello: gruppo 4	pannello: gruppo 5	pannello: gruppo 6
Numero centri	30	22	17	9	4	3
Numero medio di geni	27	29	31	117	143	202
Numero minimo di geni	2	1	2	9	7	17
Numero massimo di geni	80	161	170	395	524	524

I centri hanno fornito dati numerici sui test eseguiti nell'anno 2019 per attività di ricerca o diagnostica. Sono stati complessivamente effettuati 17667 test NGS (media di 654 test per centro), di cui 6.386 eseguiti nell'ambito di attività di ricerca (media di 237 test per centro), e 11.281 per attività diagnostica (media di 418 test per centro).

Il numero dei test effettuati nei diversi centri è risultato eterogeneo, con 13 centri a maggiore produttività (da 500 a 2500 test/anno) 6 centri a media produttività (da 200 a 500 test/anno) e 11 centri che possono essere definiti a bassa attività o in implementazione (< 200/test/anno).

I dati analitici sono riportati in [Tabella 5](#).

E' emersa una associazione statisticamente significativa tra la produttività diagnostica e la disponibilità presso il centro di piattaforme per l'automatizzazione dei processi preparativi: i centri che dispongono di strumenti per la processazione automatizzata delle librerie genomiche presentavano una media di produttività diagnostica annuale di 502 casi rispetto ad una media di 78 casi nei centri privi di automatizzazione (P=0.026) (Tabella 2, confrontare la terza e quarta colonna).

Centri	Numero test eseguiti: anno 2019	2019 - Ricerca	2019 - Diagnostica
1	920	205	715
2	1700	500	1200
3	600	200	400
4	In implementazione	In implementazione	In implementazione
5	60	25	35
6	145	85	60
7	486	288	198
8	620	90	530
9	100	40	60
10	150	0	150
11	460	100	360
12	250	100	150
13	405	200	205
14	In implementazione	In implementazione	In implementazione
15	780	480	300
16	587	0	587
17	519	490	29
18	1650	150	1500
19	26	0	26
20	90	50	40
21	1359	0	1359
22	342	338	4
23	600	550	50
24	In implementazione	In implementazione	In implementazione
25	120	120	0
26	2000	400	1600
27	220	200	20
28	175	150	25
29	2500	1625	875
30	803	0	803
Totale	17667 (Media: 654)	6386 (Media: 237)	11281 (Media : 418)

Tabella 5

Ai centri è stato chiesto di indicare le patologie oncologiche indagate mediante diagnostica NGS. I risultati della survey indicano che prevalentemente i test NGS erano utilizzati per la diagnostica dei tumori del polmone, dell'ovaio e del colon (con più di 15 centri coinvolti), del melanoma e dei tumori della mammella (oltre 10 centri coinvolti) e a seguire altre patologie oncologiche come mostrato in Fig. 2.

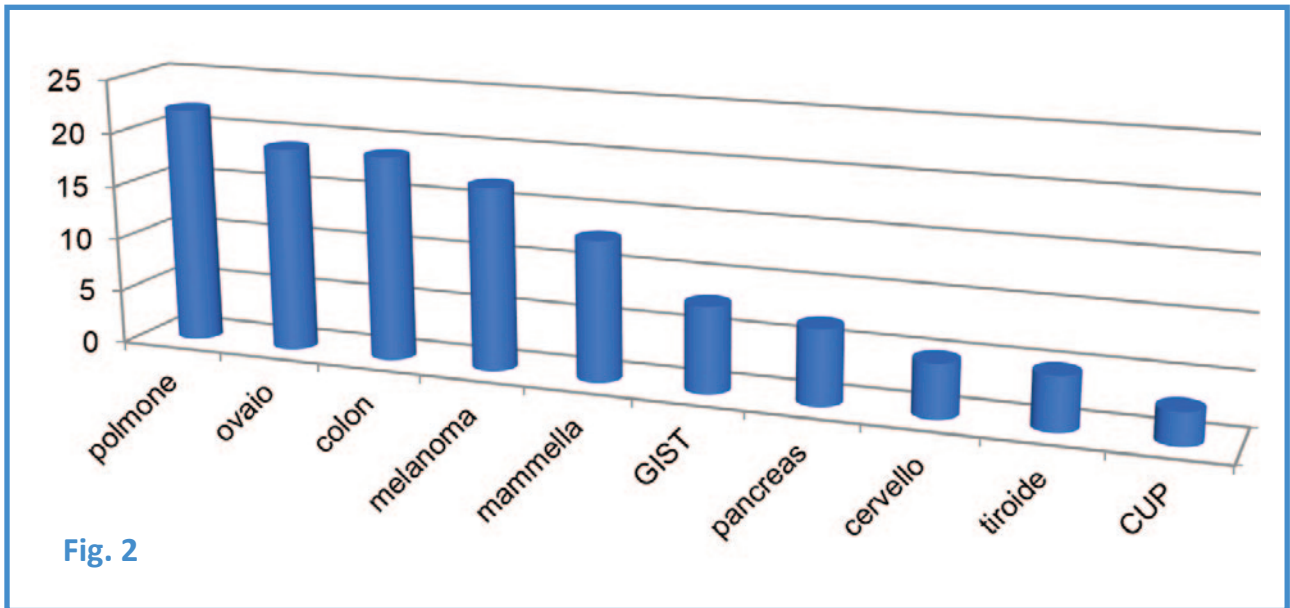


Fig. 2

Il 40% dei centri ha applicato test NGS diagnostici a più di 6 diversi tipi tumorali, il 27% dei centri si è limitato all'applicazione della tecnologia a 3-5 tipi tumorali, mentre il 33% dei centri ha svolto attività NGS focalizzata alla diagnosi di specifiche forme neoplastiche (<5 tipi tumorali) (Fig. 3).

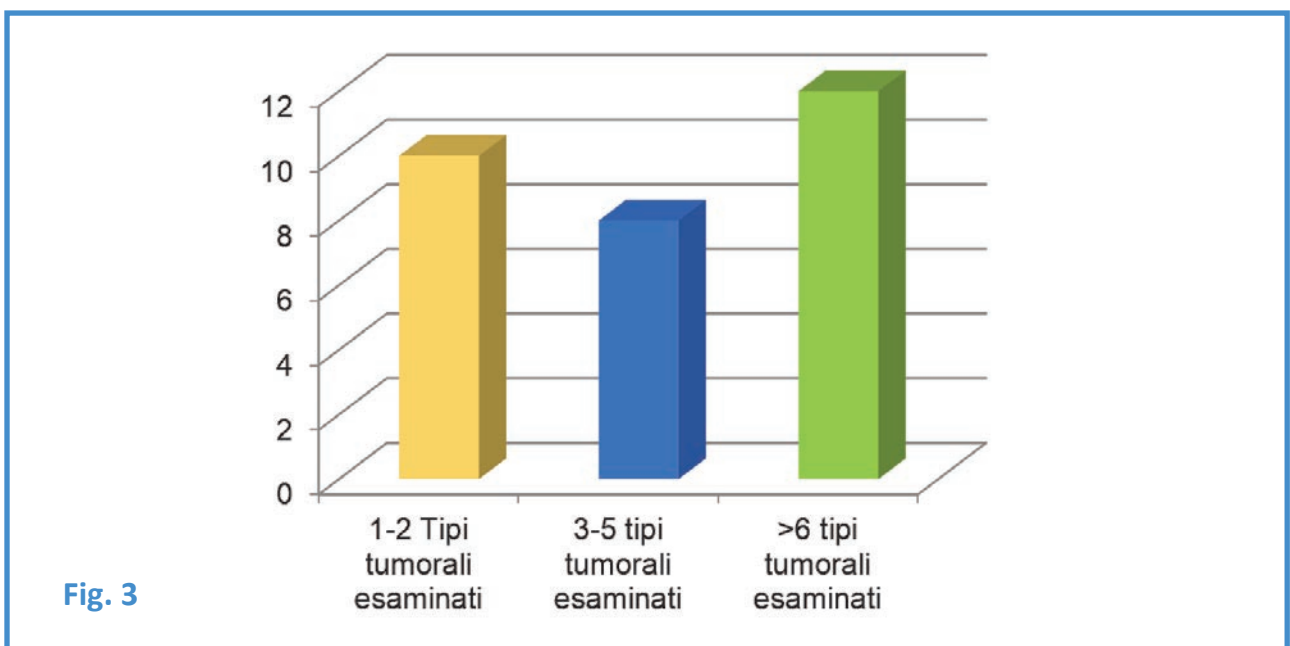


Fig. 3

La survey prevedeva anche di raccogliere informazioni circa la disponibilità nel centro di un modello di refertazione e di esprimersi sulla utilità di un modello standard unificato da adottare a livello nazionale. Ventitré centri (77%) dei 30 centri hanno risposto di avere un modello definito per la refertazione. Il 97% dei centri ha riportato che aderirebbe volentieri all'adozione di un modello standardizzato societario condiviso.

E' stato inoltre richiesto ai centri diagnostici partecipanti alla survey se fossero in rapporto con un gruppo multidisciplinare dedicato o "Molecular Tumor Board" (MTB) per la selezione dei pazienti da destinare a trattamenti a bersaglio molecolare.

Diciannove (63%) dei centri hanno indicato l'esistenza di un gruppo multidisciplinare di riferimento con cui condividere le decisioni diagnostiche in funzione dei trattamenti oncologici. Le professionalità coinvolte nei diversi centri sono molteplici. Le figure professionali più frequentemente riportate sono rappresentate dal patologo (100%), dall'oncologo (100%), dal biologo molecolare (79%) dal genetista (63%), dal farmacologo/sta (37%) e dal bioinformatico (32%) come riportato in [Tabella 6](#)

Centri	Figure professionali coinvolte nel "core team" del Molecular Tumor Board					
1	Oncologo	Patologo	biologo molecolare			
2	Oncologo	Patologo	biologo molecolare	Genetista	Farmacologo	Bioinformatico
3	Oncologo	Patologo	biologo molecolare			
4	Oncologo	Patologo	biologo molecolare			
5	Oncologo	Patologo	biologo molecolare	Genetista		
6	Oncologo	Patologo		Genetista		
7	Oncologo	Patologo	biologo molecolare			
8	Oncologo	Patologo		Genetista		
9	Oncologo	Patologo	biologo molecolare	Genetista		
10	Oncologo	Patologo	biologo molecolare			Bioinformatico
11	Oncologo	Patologo	biologo molecolare	Genetista		Bioinformatico
12	Oncologo	Patologo	biologo molecolare	Genetista		
13	Oncologo	Patologo	biologo molecolare	Genetista	Farmacologo	
14	Oncologo	Patologo			Farmacologo	
15	Oncologo	Patologo	biologo molecolare			
16	Oncologo	Patologo	biologo molecolare	Genetista	Farmacologo	Bioinformatico
17	Oncologo	Patologo		Genetista	Farmacologo	
18	Oncologo	Patologo	biologo molecolare	Genetista	Farmacologo	Bioinformatico
19	Oncologo	Patologo	biologo molecolare	Genetista	Farmacologo	Bioinformatico

Tabella 6

A queste figure di base se ne affiancano altre coinvolte nella diagnostica strumentale o nei trattamenti oncologici, che riportiamo in ordine di frequenza: chirurgo, radiologo, ematologo, radioterapista, pneumologo, endocrinologo, dermatologo, urologo, metodologo, psico-oncologo. Per 9 (47%) dei 19 centri che hanno dichiarato di operare in armonia con un MTB, quest'ultimo è stato ratificato da una delibera regionale. Le regioni che si sono attivate in tal senso risultano essere: Campania, Lazio, Liguria, Lombardia, Sicilia, Sardegna, Toscana e Veneto – otto regioni su cui sono distribuiti in tutto nove strutture (due nel Veneto). In alcuni casi i centri hanno risposto di non avere ben chiara la differenza fra Molecular Tumor Board e Gruppo Oncologico Multidisciplinare.

05. DISCUSSIONE

I risultati della survey nazionale sui centri che eseguono test genomici in ambito oncologico mediante sequenziamento massivo parallelo hanno fornito un quadro della situazione attuale abbastanza eterogeneo e potenzialmente in via di rapida evoluzione. Nel complesso, i dati ottenuti si prestano ad una serie di interessanti riflessioni sul repentino sviluppo di questo nuovo approccio, sulle sue principali applicazioni in ambito diagnostico per una fine caratterizzazione delle patologie oncologiche in funzione di trattamenti mirati e sui progressivi adattamenti indotti dalla nuova tecnologia a più livelli che richiederanno, a breve, interventi regolatori per l'ottimizzazione dei processi.

Una prima considerazione sulla base dei dati emersi, deve essere rivolta alla tipologia e al numero dei centri della rete sul territorio nazionale, alla loro distribuzione geografica ed alle caratteristiche tecnologiche dei laboratori. I centri partecipanti alla survey nell'80% dei casi erano strutture interne a Unità Operative di Anatomia Patologica, negli altri casi i laboratori erano comunque in stretta connessione funzionale con centri di Anatomia Patologica. Dei trenta centri che hanno aderito alla rete di studio NGS SIAPEC, più della metà (57%) è situata nel nord del paese e l'80% nel centro-nord. Ciò riflette la maggiore densità di popolazione in queste aree geografiche rispetto al sud-isole. Tuttavia, rapportando il numero dei laboratori alla distribuzione demografica, nel centro-nord la densità risulta pressoché omogenea (un laboratorio per 1.6-1.7 milioni di abitanti), mentre al sud-isole gli oltre 20 milioni di abitanti sono serviti da soli 6 laboratori (1 per 3.4 milioni di abitanti). Di fatto nel sud-isole abbiamo, rapportati alla popolazione, circa la metà dei laboratori presenti nel centro-nord. La distribuzione dei laboratori al centro-nord è in linea con quanto più volte riportato in documenti programmatici relativi ad una ideale distribuzione dei centri di diagnostica genomica sul territorio (17,18). La concentrazione dei laboratori al sud, invece, rappresenta un dato che esprime criticità da colmare in tempi brevi, particolarmente in alcune aree geografiche.

Da un punto di vista strumentale tutti i centri, al momento della survey, presentavano una o più strumentazioni di sequenziamento massivo parallelo, sostanzialmente riconducibili alla due tecnologie disponibili più diffuse sul mercato internazionale, commercializzate da Termofisher ed Illumina, con un limitato numero di centri che hanno adottato la piattaforma Qiagen, al momento in dismissione. I 2/3 dei laboratori dispongono di due o più piattaforme e la maggior parte dei centri ha riportato upgrade tecnologici dei principali strumenti nel corso di pochi anni. Questo implica un impegno economico notevole degli enti per sostenere questa nuova tecnologia, anche limitatamente al versante strumentale. Otto (80%) dei 10 centri dotatisi di una sola piattaforma hanno optato per la tecnologia Ion-Torrent, mentre le strumentazioni multiple nei vari centri sono prevalentemente Illumina: ciò può dipendere da problematiche relative alle caratteristiche tecniche dei prodotti, ai costi degli stessi, alle politiche commerciali. La survey ha fornito dati anche riguardo ai sistemi meccatronici per l'automatizzazione dei processi preparativi, in particolare per quanto concerne l'allestimento delle librerie genomiche per il sequenziamento massivo parallelo. Nell'insieme, il panorama strumentale osservato è molto eterogeneo e può essere meglio interpretato solo valutando complessivamente i dati relativi alla strumentazione e all'attività diagnostica implementata nei centri (Tabella 2). I laboratori che dispongono di piattaforme per l'automatizzazione dei processi hanno avuto una produttività diagnostica media significativamente maggiore rispetto ai centri privi di piattaforme automatizzate.

Il dato sta ad indicare l'importanza delle piattaforme per l'automatizzazione della fase preanalitica che, nel caso del sequenziamento massivo parallelo, è particolarmente lunga, complessa, con fasi ripetitive che possono indurre gli operatori ad errori, e pertanto poco adattabile all'attività clinica routinaria in assenza di processi automatizzati.

Una ulteriore considerazione riguarda le attività di sequenziamento svolte all'interno dei centri della Rete Nazionale NGS SIAPEC.

Come tutte le nuove tecnologie, il sequenziamento di nuova generazione è stato inizialmente introdotto in molti laboratori a scopo di ricerca. Con gli avanzamenti tecnologici, sia strumentali che nell'ambito delle chimiche utilizzate nei processi preparativi, la tecnologia si è resa nel tempo più affidabile spostandosi progressivamente anche in campo diagnostico, fornendo nuove e importanti possibilità applicative. Al momento della survey il 68% dell'attività NGS nei centri è stata destinata alla diagnostica in ambito oncologico e ben 15 (50%) dei centri svolge più attività diagnostica che di ricerca. Ciò indica che nel giro di pochi anni il sequenziamento massivo parallelo ha assunto un ruolo importante come strumento diagnostico sul territorio nazionale.

Sulla base dei numeri forniti relativamente all'attività diagnostica annuale svolta, 13 laboratori hanno riportato una numerosità di campioni effettuati compatibile con la processività che dovrebbe avere un centro di riferimento per massimizzare le risorse in economie di scala (12). Altri laboratori sono al momento a bassa intensità di flusso, altri infine sono stati appena attivati e i processi diagnostici sono in fase di implementazione. La società provvederà ad effettuare ulteriori survey a cadenza annuale per monitorare lo stato di attività dei centri e favorirne l'ulteriore sviluppo.

Nell'insieme i dati forniti in ambito diagnostico indicano che la tecnologia NGS è stata utilizzata per la caratterizzazione genomica in differenti patologie neoplastiche e che quindi l'impatto della tecnologia è ad ampio spettro. Le tipologie di tumore più frequentemente indagate riflettono quanto indicato recentemente da raccomandazioni della Società Europea di Oncologia Medica. Tuttavia, circa un terzo dei centri ha limitato l'utilizzo della tecnologia a poche patologie oncologiche, con maggiore frequenza per polmone, ovaio, colon, melanoma, sia per la maggiore complessità dei geni da esaminare (es. BRCA e geni correlati nel tumore ovarico) sia per la necessità di esaminare contemporaneamente numerosi marcatori entrati nella pratica clinica con limitate quantità di materiale biologico a disposizione per l'analisi (es. tumore polmonare, melanoma).

Il personale attualmente presente nei centri diagnostici a maggiore processività risulta mediamente adeguato alla numerosità dei test effettuati e ben rappresentato in termini di categorie professionali fra medici, biologi, biotecnologi, e tecnici di laboratorio. Personale con competenze specifiche di bioinformatica è presente solo nel 40% dei centri e la presenza non è correlata alla numerosità delle casistiche esaminate. Evidentemente, il ruolo del bioinformatico è assunto da altro personale con competenze biologiche più generali, favorito dal progressivo sviluppo di software interpretativi dedicati.

Di particolare interesse è risultato il quesito sulla implementazione dei Molecular Tumor Board. Questi gruppi multidisciplinari sono considerati necessari per una adeguata e condivisa attività di selezione dei pazienti da destinare a trattamenti oncologici personalizzati dopo la caratterizzazione genomica mediante NGS (13-19). Circa due terzi dei centri hanno riferito di rapportarsi a gruppi di lavoro multidisciplinari, riferiti come Molecular Tumor Board, dedicati alla attività di selezione dei pazienti dopo il test NGS, ma solo per il 30% dei centri era presente un Molecular Tumor Board ratificato con delibera regionale.

In generale, le figure professionali più frequentemente coinvolte nella costituzione del Molecular Tumor Board sono risultate essere l'oncologo, l'anatomo patologo, il biologo molecolare, il genetista, il farmacologo/sta, il bioinformatico.

A questo "core team" centrale, che evidentemente rappresenta l'asse portante dei Molecular Tumor Board, si associano meno frequentemente altre figure professionali, coinvolte nel percorso clinico, per specificità di patologia oncologica nei diversi centri (ematologo, pneumologo, endocrinologo, dermatologo, urologo) o per consulenza. Dai risultati della survey emerge anche la necessità di meglio definire i rapporti tra i gruppi oncologici multidisciplinari (GOM) e i MTB, indicandone precisamente i limiti, le funzioni specifiche e l'interattività.

I risultati della survey sono relativi ad un network di studio e monitoraggio SIAPEC-PMMP che comprende la stragrande maggioranza dei centri coinvolti nella diagnostica NGS in ambito oncologico attivi a livello nazionale. Altri centri, non operanti all'interno di strutture di Anatomia Patologica o associati ad esse, sono esclusi da questa analisi che pertanto può definirsi rappresentativa della situazione nazionale ma non esaustiva. Riteniamo, tuttavia, che solo pochi centri attivi su grandi numeri possano essere stati ignorati dallo studio.

I dati ottenuti da questa survey indicano che un'attività diagnostica mediante sequenziamento massivo parallelo sul territorio nazionale è presente ma eterogenea, sia per la distribuzione geografica e le caratteristiche dei laboratori di riferimento che per l'attività implementata. I centri diagnostici risultano ancora non del tutto strutturati in reti regionali definite, non sempre collegati ai percorsi diagnostico-terapeutici e ai molecular tumor board e tantomeno ad una rete nazionale funzionale istituzionalizzata.

Una caratterizzazione genomica ad ampio spettro in ambito oncologico, basata sul sequenziamento massivo parallelo, risulta economicamente non sostenibile in assenza di una economia di scala che preveda una centralizzazione delle attività, dei processi produttivi adeguati ed un'automatizzazione dei percorsi. L'implementazione di un network laboratoristico funzionale che favorisca la logistica sul territorio e la confluenza di materiale biologico in centri di riferimento per le analisi molecolari è fortemente auspicabile. Ciò, unitamente alla gestione dei dati da parte dei molecular tumor board, in stretto rapporto con gruppi oncologici multidisciplinari in percorsi diagnostico-terapeutici ben definiti, all'interno delle reti oncologiche regionali, potrà assicurare un consistente incremento della qualità, un abbattimento dei costi per i test ed elevati livelli di appropriatezza diagnostico-terapeutica.

06 REFERENZE BIBLIOGRAFICHE

- 1) Garraway LA Genomics-driven oncology: Framework for an emerging paradigm. *J. Clin. Oncol.* 2013; 31:1806–1814.
- 2) Özdoğan M, Papadopoulou E, Tsoulos N, et al. *BMC Med Genomics.* 2021; 14: 105.
- 3) Giardina T, Robinson C, Grieco-Iacopetta F et al. Implementation of next generation sequencing technology for somatic mutation detection in routine laboratory practice. *Pathology.* 2018; 50:389-401.
- 4) Luchini C, Bibeau F, Ligtenberg MJL, et al. 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; 30: 1232-1243.
- 5) Alborelli I, Leonards K, Rothschild SI, et al. Tumor mutational burden assessed by targeted NGS predicts clinical benefit from immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer. *J Pathol.* 2020; 250: 19-29.
- 6) Rizvi H, Sanchez-Vega F, La K, et al. Molecular Determinants of Response to Anti-Programmed Cell Death (PD)-1 and AntiProgrammed Death-Ligand 1 (PD-L1) Blockade in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Profiled With Targeted Next-Generation Sequencing. *J Clin Oncol.* 2018; 36: 633-641.
- 7) Morganti S, Tarantino P, Ferraro E, et al. Next Generation Sequencing (NGS): A Revolutionary Technology in Pharmacogenomics and Personalized Medicine in Cancer. *Adv Exp Med Biol* 2019; 1168: 9-30
- 8) Tan O, Shrestha R, Cunich M, et al. Application of next-generation sequencing to improve cancer management: A review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness. *Clin Genet.* 2018; 93: 533-544
- 9) Deans ZC, Costa JL, Cree I, et al. Integration of next-generation sequencing in clinical diagnostic molecular pathology laboratories for analysis of solid tumours; an expert opinion on behalf of IQN Path ASBL. *Virchows Arch.* 2017; 47:5-20.
- 10) Mosele F, Remon J, Mateo J, et al. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol.* 2020; ([Epub ahead of print]
- 11) van Krieken JH, Normanno N, Blackhall F, et al. Guideline on the requirements of external quality assessment programs in molecular pathology. *Virchows Arch.* 2013; 462: 27-37
- 12) Martini N, Marchetti P, Marchetti A, et al. Dall'Istologia al Target. il futuro della Precision Medicine. *I Quaderni di Medicina.* Il Sole 24 ore, 2017.
- 13) VanderWalde A, Grothey A, Vaena D, et al. Establishment of a Molecular Tumor Board (MTB) and Uptake of Recommendations in a Community Setting. *Pers Med.* 2020; 10: 252.
- 14) Harada S, Arend R, Dai Q, Levesque JA, et al. Implementation and utilization of the molecular tumor board to guide precision medicine. *Oncotarget.* 2017 ; 8:5 7845-57854.
- 15) Walko C, Kiel PJ, Kolesar J. Am et al. Precision medicine in oncology: New practice models and roles for oncology pharmacists. *J Health Syst Pharm.* 2016; 73: 1935-1942.
- 16) Tafe LJ, Gorlov IP, de Abreu FB, et al. Implementation of a Molecular Tumor Board: The Impact on Treatment Decisions for 35 Patients Evaluated at Dartmouth-Hitchcock Medical Center. *Oncologist.* 2015 Sep;20(9):1011-8. doi: 10.1634/theoncologist.2015-0097.
- 17) Patton EE, Mueller KL, Adams DJ, et al. Melanoma models for the next generation of therapies. *Cancer Cell.* 2021: S15356108(21)00055-6.
- 18) Raccomandazioni AIOM 2020 - Tumor Board Molecolare. 19 Novembre 2020
- 19) Test Molecolari e Terapie Target in Oncologia. Atti del Workshop ISS-FICOG, 4 e 17 Novembre 2020