



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**

2023

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. 8
05.	DISCUSSIONE.....	PAG. 18
06.	REFERENZE BIBLIOGRAFICHE.....	PAG. 23

01. Gruppo di Lavoro

Antonio Marchetti¹, Mattia Barbareschi², Massimo Barberis³, Simonetta Buglioni⁴, Fiamma Buttitta⁵, Matteo Fassan⁶, Gabriella Fontanini⁷, Umberto Malapelle⁸, Caterina Marchiò⁹, Fabio Pagni¹⁰, Mauro Papotti¹¹, Giancarlo Pruneri¹², Rebecca Rossetti⁵, Aldo Scarpa¹³, Giorgio Stanta¹⁴, Giovanni Tallini¹⁵, Giancarlo Troncone⁸, Silvio Veronese¹⁶, Anna Sapino⁹, Filippo Fraggetta¹⁷

01.1 Affiliazioni:

¹ *Coordinatore del Gruppo di Studio SIAPEC-PMMP. 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 Scienze Mediche, Orali e Biotecnologiche, Università di Chieti- Pescara*

⁶ *Dipartimento di Medicina (DIMED), Università di Padova. Istituto Oncologico Veneto, IOV-IRCCS, Padova*

⁷ *Dipartimento di Patologia Chirurgica, Medica, Molecolare e dell'Area Critica, Università di Pisa*

⁸ *Divisione di Anatomia Patologica Dipartimento di salute Pubblica, Università Federico II di Napoli, Napoli*

⁹ *Divisione di Anatomia Patologica, Istituto dei Tumori di Candiolo FPO-IRCCS, Candiolo, Torino*

¹⁰ *Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Unità di Anatomia Patologica, Fondazione IRCCS San Gerardo dei Tintori, Università di Milano-Bicocca, Monza.*

¹¹ *Unità di Anatomia Patologica, Dipartimento di Oncologia, Università di Torino e Azienda Ospedaliero-Universitaria "Città della Salute e della Scienza, Torino*

¹² *Unità di Anatomia Patologica e Medicina di Laboratorio, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano*

¹³ *Sezione di Anatomia Patologica, Dipartimento di Diagnostica e Sanità Pubblica e Centro di Ricerca ARC-Net, Università di Verona, Verona*

¹⁴ *DSM-Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Trieste, Trieste*

¹⁵ *Dipartimento di Medicina Specialistica Diagnostica e Sperimentale (DIMES), Università di Bologna. Laboratorio di Patologia Molecolare-Dipartimento Interaziendale di Anatomia Patologica, Bologna*

¹⁶ *Patologia Molecolare, SC Anatomia, Istologia Patologica e Citogenetica, Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano,*

¹⁷ *Presidente della Società Italiana di Anatomia Patologica e Citologia Diagnostica - IAP. Unità di Anatomia Patologica, Azienda Ospedaliera Gravina, Caltagirone.*

02. INTRODUZIONE

L'inquadramento diagnostico del paziente oncologico, nell'ambito dei percorsi dell'"oncologia di precisione", richiede una valutazione clinica accurata del paziente e un'analisi approfondita della patologia tumorale a livello morfologico, immunofenotipico e molecolare. Questo processo coinvolge diverse figure professionali che lavorano in team (1,2).

Il patologo ha un ruolo sempre più importante nella caratterizzazione molecolare dei tumori. Le moderne esigenze diagnostiche in diversi settori oncologici necessitano di analisi ad ampio spettro che includono informazioni sulle mutazioni geniche, i meccanismi di riparazione del DNA e la risposta immunitaria (3-6). Le metodologie diagnostiche tradizionali per indagare questi parametri non sono più ottimali a causa dei costi dei singoli test, dei tempi di esecuzione e della disponibilità limitata di campioni biologici.

Il sequenziamento di nuova generazione (Next Generation Sequencing, NGS), noto anche come sequenziamento massivo parallelo (Massive Parallel Sequencing, MPS), sta diventando sempre più comune nei centri diagnostici per la sua alta processività di analisi e sta gradualmente sostituendo le metodologie tradizionali (7-11).

L'introduzione dell'NGS nei centri diagnostici ha richiesto adattamenti complessi, investimenti significativi e l'acquisizione di nuove competenze professionali.

La Società Italiana di Anatomia Patologica e Citologia Diagnostica, attraverso il Gruppo di Studio di Patologia Molecolare e Medicina Predittiva (PMMP), segue da anni l'evoluzione delle attività diagnostica molecolare nei centri di Anatomia Patologica in Italia. Con l'aumento dei centri che utilizzano il sequenziamento di nuova generazione (NGS) per le diagnosi, è stata creata una rete di studi sul sequenziamento massivo parallelo in Italia, riconosciuta come "Rete Nazionale NGS SIAPEC" dalla Società Scientifica SIAPeC il 5 luglio 2017.

Da allora, all'interno della rete, sono state implementate attività che hanno incluso l'allineamento dei laboratori attraverso l'analisi dei casi diagnostici concordanti e il monitoraggio dei centri che fanno parte della Rete Nazionale NGS SIAPEC tramite questionari specifici, compilati prima degli incontri annuali del Gruppo PMMP.

Per venire incontro alle crescenti necessità di analisi genomiche su tutto il territorio nazionale, in particolare all'interno delle reti oncologiche regionali, il comitato scientifico del Gruppo PMMP ha deciso di avviare quest'ulteriore indagine nazionale per valutare in dettaglio le attività legate alla diagnostica genomica nell'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 33 centri afferenti alla Rete Nazionale NGS SIAPEC. La survey è stata condotta tramite un questionario strutturato per esaminare una serie di parametri che caratterizzano il Centro e le attività in esso svolte.

Di seguito sono riportati i punti più importanti affrontati nel questionario:

- Denominazione del Centro, Affiliazione, Direttore, Responsabile.
- Personale afferente al centro (Medici, Biologi/Biotecnologi, Tecnici di Laboratorio)
- Metratura del centro destinata allo svolgimento di analisi molecolari
- Strumentazioni presenti nel centro (piattaforme disponibili per l'estrazione automatizzata degli acidi nucleici e per la loro valutazione quantitativa/qualitativa, 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.
- Materiale biologico utilizzato per le analisi mutazionali distinto in tessuti, preparati citologici e sangue/liquidi biologici (biopsia liquida)
- 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.

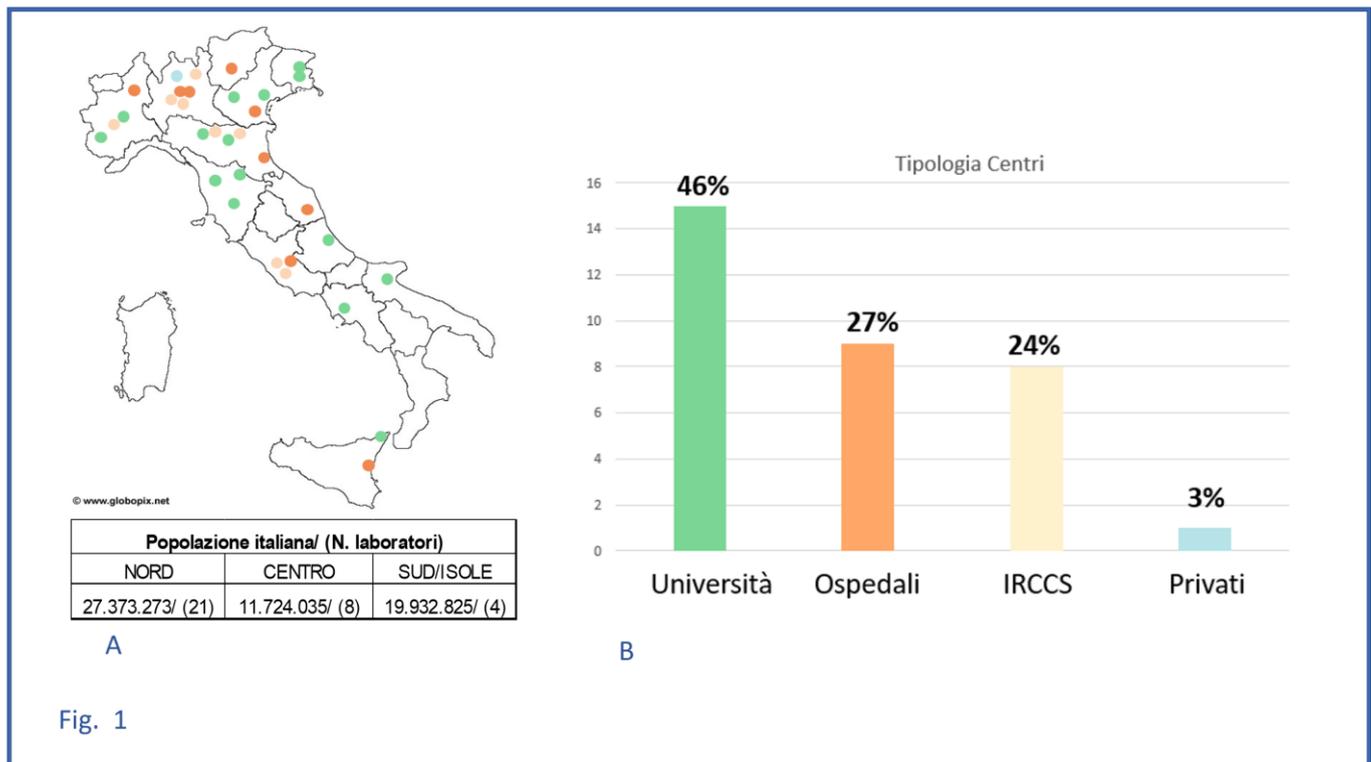
Il questionario inviato ai centri partecipanti alla survey è disponibile come file allegato.

Il questionario è stato sottoposto ai 33 centri nel periodo luglio 2022-gennaio 2023. I risultati ottenuti sono stati tabulati, anonimizzati e sottoposti ad analisi. I dati preliminari ottenuti sono stati presentati

in forma cumulativa alla riunione nazionale del gruppo PMMP, tenutasi a Firenze nei giorni 22-24 maggio 2023. I dati definitivi della survey, sono stati tabulati 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.

04. RISULTATI

I risultati ottenuti dalla survey nazionale derivano da 33 centri, appartenenti al gruppo di lavoro SIAPEC-PMMP, che hanno risposto a tutte le domande presenti nel questionario. Le informazioni ottenute dall'indagine sono state riportate in forma anonima. La distribuzione dei centri sul territorio nazionale è riportata nella Fig.1 (A).



Ventuno centri sono situati al nord del paese, otto centri al centro, quattro centri al sud (includente le isole maggiori). Considerando la distribuzione geografica della popolazione italiana (dati ISTAT, 31 dicembre 2021) la distribuzione dei laboratori è risultata maggiore nel centro e al nord rispetto al sud/isole. È stato calcolato il rapporto laboratorio diagnostico/popolazione, che mediamente è risultato di 1/1.3 milioni di abitanti al nord, 1/1.5 milioni al centro e 1/5 milioni al sud/isole.

Nella Fig.1 (B) è riportata la tipologia dei Centri che hanno preso parte alla survey e la rispettiva distribuzione percentuale. Di questi, 15 laboratori sono ubicati in sedi Aziendali Universitarie, 9 in grandi Ospedali, 8 in Istituti di Ricovero e Cura a carattere Scientifico (IRCCS) e un centro privato.

Per i diversi laboratori sono stati ottenuti dati sull'area destinata ad indagini molecolari, che è risultata in media di dimensioni pari a 153 mq. Quattordici i centri hanno dichiarato di essere dotati di un'area compresa tra 100 e 200 mq., dodici centri dispongono di un'area inferiore ai 100 mq, mentre sette centri hanno adibito un'area dedicata ad analisi molecolari superiore a 200 mq.

La **Tabella 1** riporta le informazioni relative al personale afferente ai centri, suddiviso in tre categorie: Medici, Biologi, Tecnici di Laboratorio. Il 22% dei centri (7 su 33) ha meno di 5 unità di personale dedicato, il 48% dei centri (16 su 33) presenta tra 6 e 9 unità, mentre il 30% dei centri (10 su 33) ha riferito di avere più di 10 unità di personale, con un centro che riporta un massimo di 45 unità. Mediamente i centri presentano un numero totale di 9 unità di personale dedicato all'attività diagnostica.

MEDICI	BIOLOGI/BIOTECNOLOGI	PERSONALE TECNICO	TOTALE
2	2	2	6
1	3	3	7
1	5	5	11
0	7	1	8
1	2	1	4
0	3	3	6
1	3	3	7
2	4	3	9
4	4	3	11
1	1	2	4
1	4	1	6
0	3	4	7
1	1	5	7
1	1	2	4
0	4	2	6
2	8	2	12
2	3	3	8
2	4	2	8
2	2	1	5
2	1	3	6
4	8	2	14
0	5	4	9
16	1	28	45
2	4	4	10
4	4	3	11
2	1	2	5
4	8	4	16
0	3	3	6
9	7	2	18
1	3	1	5
0	3	6	9
6	5	7	18
2	2	0	4
MEDIA 2	MEDIA 4	MEDIA 4	MEDIA TOTALE 9

≤ 5
Tra 6 e 9
≥ 10

Tabella 1

Dall'indagine compiuta sono emersi il numero e il tipo di sequenziatori in uso nei vari centri, come riportato nella [Tabella 2](#). Di questi il 25% ha dichiarato la presenza di una sola piattaforma adibita al sequenziamento, il 18% ha in uso due piattaforme e il 36% tre piattaforme, mentre sono presenti 4 o 5 piattaforme nel 9 % dei laboratori, solo un laboratorio ha riportato di utilizzare più di 5 piattaforme (3%). Sulla base dei dati raccolti all'interno della rete si riscontra la presenza di 32 piattaforme IonTorrent e 58 piattaforme Illumina.

Piattaforme		Preparatore librerie genomiche	DIAGNOSI NGS
Numero	Tipologia		
1	S5	NESSUNA	60
2	S5/MS	NESSUNA	50
2	MS/NS	NESSUNA	0
5	MS/MS/NS/NoS/S5	2 Starlet Hamilton; 1 Chef Thermo Fisher	2100
1	IS	NESSUNA	80
3	MS/NS/NoS	NESSUNA	280
1	IS	NESSUNA	0
2	MS/S5	1 Ion Chef (Thermo Fisher)	2070
5	MS/MS/MS/NS/S5	1 Ion Chef (Thermo Fisher)	1071
3	MS/MS/NS	NESSUNA	2100
4	S5/GX/GX/MS	1 Ion Chef, 2 GENEXUS (Thermo Fisher)	171
3	MS/MS/S5	1 Ion Chef Thermo Fisher	1529
4	MS/MS/NS/NoS	NESSUNA	722
1	GX	1 Genexus Thermo Fisher	1002
3	MS/MS/NS	NESSUNA	255
3	MS/NS/GX	1 Ion Chef Thermo Fisher, 1 Qiagility Qiagen	881
1	MS	NESSUNA	623
4	MS/MS/NS/NS	1 NGS Star (HAMILTON Robotics)	573
2	IS/PGM	NESSUNA	0
3	MS/S5/PGM	2 Ion Chef (Thermo Fisher)	260
3	S5/S5/GX	2 Ion Chef; 1 Genexus (Thermo Fisher)	1778
1	S5	1 Ion Chef	136
1	S5	1 Thermo Fisher; 1 Magnis Agilent	2000
3	S5/S5/NS	2 Ion Chef ; 1 Hamilton star	2000
2	MS/NS	1 Magnis Agilent	
7	NS/MS/MS/MS/S5/PGM/S5	1 NGS Star Hamilton; 1 Ion Chef	418
5	PGM/S5/S5/S5/S5	3 Ion Chef System	1341
1	MS	NESSUNA	0
3	GX/S5/IS	2 Ion Chef + 1 Genexus (Thermofisher)	1589
2	MS/NS	NESSUNA	427
3	MS/MS/NS	1 Starlet M Hamilton; 1 Omnia Masmec	1761
3	MS/MS/S5	NESSUNA	0
3	NS/NS/NoS	NESSUNA	261

Tabella 2

Abbreviazioni
 MS, MiSeq (Illumina)
 NS, NextSeq (Illumina)
 IS, ISeq (Illumina)
 NoS, NovaSeq (Illumina)
 GX, Genexus (Thermo Fisher)
 S5, S5 system (Thermo Fisher)
 PGM, Personal Genomic Machine (Thermo Fisher)

L'incremento di test NGS nella pratica clinica e la complessità procedurale di preparazione delle librerie genomiche da sottoporre al sequenziamento pongono la necessità di ricorrere all'uso di piattaforme automatizzate, al fine di ridurre considerevolmente l'impegno degli operatori nella fase preanalitica di allestimento dei test e gli errori umani.

Nella [Tabella 2](#) sono riportate 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 mecatronici adattabili a diverse piattaforme di sequenziamento (Agilent, Hamilton Robotics, Masmec). È da sottolineare che dei

33 centri che hanno partecipato alla survey, 28 applicano la tecnologia NGS alla pratica clinica (Tabella 2). Tuttavia, di questi ultimi solo 18 (64 %) dispongono di sistemi automatizzati per la preparazione di librerie genomiche.

Sono stati raccolti tutti i dati relativi ai pannelli genetici per la diagnostica NGS utilizzati nei vari centri, in ordine di frequenza di utilizzo. Il numero dei pannelli adottati nei diversi centri varia da 1 a 6 (dal pannello del gruppo 1, o di prima scelta, al pannello del gruppo 6).

Nella Tabella 3 è stato riportato il pannello maggiormente utilizzato dai singoli centri (gruppo 1). Per ciascuno è indicato il numero di geni analizzabili e gli acidi nucleici richiesti per l'espletamento del test. A fronte delle recenti evidenze scientifiche, la necessità di analizzare un ampio numero di geni è evidente, in media si riscontra un valore pari a 60 geni per pannello, con un minimo di 2 ed un massimo di 500.

Dalle risposte ottenute emerge che 32 centri su 33 hanno riportato un pannello nel gruppo 1, 28 centri utilizzano anche un secondo pannello, 21 centri utilizzano 3 pannelli, 14 ne utilizzano 4, 12 ne utilizzano 5 e 10 ne utilizzano fino a 6.

Denominazione pannello : gruppo 1	Numero di geni in esame	Acido nucleico richiesto
FUSION PLEX SARCOMA PANEL	64	RNA
pannello NGS: Myriapod NGS Cancer Panel, Myriapod lung cancer, Myriapod Colon Cancer	27	DNA/RNA
NGS DNA Diatech	16	DNA
Focus oncomine	52	DNA/RNA
Myriapod NGS Dry	17	DNA
Myriapod NGS Cancer panel DNA	16	DNA
Myriapod NGS cancer panel DNA	17	DNA
Oncomine Focus Assay	52	DNA/RNA
Myriapod NGS Cancer panel DNA (Diotech Pharmacogenetics)	17	DNA
Myriapod NGS-IL Onco-panel	56	DNA
Oncomine Precision Assay	56	DNA/RNA
Oncomine DX Target Test DNA e RNA (ThermoFisher)	52	DNA/RNA
"Genomic DNA FFPE ONE-STEP" (Diotech Labline);	16	DNA
Oncomine Precision Assay	50	DNA/RNA
Myriapod NGS Cancer Panel DNA (CE-IVD, DiotechPharmacogenetics)	16	DNA
Myriapod NGS Cancer panel DNA (Diotech)	16	DNA
Myriapod®NGS Cancer Panel DNA kit, Diotech Pharmacogenetics]	17	DNA
Tumor Mutation Burden Panel	496	DNA
Myriapod NGS Cancer panel DNA	16	DNA
Focus assay 59 geni	59	DNA/RNA
SiRe Genedin	12	DNA/RNA
Oncomine Focus Assay	52	DNA/RNA
BRCA Oncomine research SE	2	DNA
Oncomine custom	26	DNA
SureSelect Cancer All-In-One solid tumor assay	98	DNA
oQIAGEN-QIAseq Targeted DNA Custom Panel- Gliomi	29	DNA
hot spot cancer panel v2	50	DNA
Myriapod NGS Cancer panel DNA	17	DNA
Oncomine Precision Assay (ThermoFisher)	50	DNA/RNA
Trusight oncology 500	500	DNA
Hereditary Cancer Solution (HCS) Sophia Genetics	26	DNA
Nessuno	0	DNA/RNA
Dewyser BRCA-CE-IVD	2	DNA

Tabella 3

I dati ottenuti sui pannelli genici dei gruppi 1-6 sono presentati cumulativamente nella [Tabella 4](#). Sono stati considerati il numero medio di geni valutati, il numero massimo e minimo dei geni per ciascun gruppo. Come si evince dalla Tabella, il numero medio dei geni valutabili con i diversi pannelli aumenta progressivamente dai pannelli di prima scelta ai pannelli di sesta scelta. Dai dati ottenuti si ricava che 14 centri (gruppo 4) utilizzano pannelli con un numero medio di 192 geni e 10 centri (gruppo 6) con un numero medio di 289 geni. Questi grandi pannelli sono sostanzialmente finalizzati a studi allargati in caso di esaurimento di opzioni terapeutiche ed i risultati ottenuti devono essere sottoposti ad un Molecular Tumor Board.

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.

Tabella 4

	pannello: gruppo 1	pannello : gruppo 2	pannello : gruppo 3	pannello: gruppo 4	pannello : gruppo 5	pannello: gruppo 6
Numero centri	32	28	21	14	12	10
Numero medio di geni	60	70	87	192	38	289
Numero minimo di geni	2	2	2	2	2	10
Numero massimo di geni	500	409	523	523	74	>500

È stato richiesto ai centri il numero di test NGS eseguiti in ambito di ricerca e diagnostica per l'anno 2021. Le informazioni ottenute sono riassunte nella [Tabella 5](#). Il totale dei test eseguiti all'interno della rete NGS è pari a 38.838 (con una media di 1177 test per centro), quasi il doppio rispetto a quello della precedente indagine eseguita nel 2019. Nello specifico si riscontra un totale di 11.870 test (media di 360 test per centro) in ambito di ricerca e 26.968 test (media di 817 test per centro) in ambito di diagnostica. La maggior parte dei centri effettua una maggiore attività in ambito diagnostico, mentre solo tre centri utilizzano la metodica NGS più a scopo di ricerca che di diagnostica. Dal confronto con i dati ottenuti nelle precedenti survey SIAPeC-PMMP, risulta evidente un progressivo incremento dell'utilizzo di metodiche di

sequenziamento NGS nel corso degli anni su tutto il territorio nazionale, in particolare nell'ambito dell'attività diagnostica.

Il numero dei test effettuati nei diversi centri è risultato eterogeneo, con 13 centri a maggiore produttività (più di 1000 test/anno), 7 centri a media produttività (da 500 a 1000 test/anno) e 13 centri che possono essere definiti a medio-bassa attività (<500 test/anno); di questi ultimi, 4 centri, inclusi comunque nella survey, hanno di fatto iniziato l'attività di sequenziamento NGS dopo il 2021. Se si confrontano la terza e quarta colonna della [Tabella 2](#), risulta evidente l'associazione tra la produttività diagnostica e la disponibilità di piattaforme per l'automatizzazione dei processi. In particolare, i centri che dispongono di strumenti per la processazione automatizzata delle librerie genomiche presentano una media di produttività diagnostica annuale di 1610 casi rispetto ad una media di 528 casi nei centri privi di automatizzazione (P=0.029).

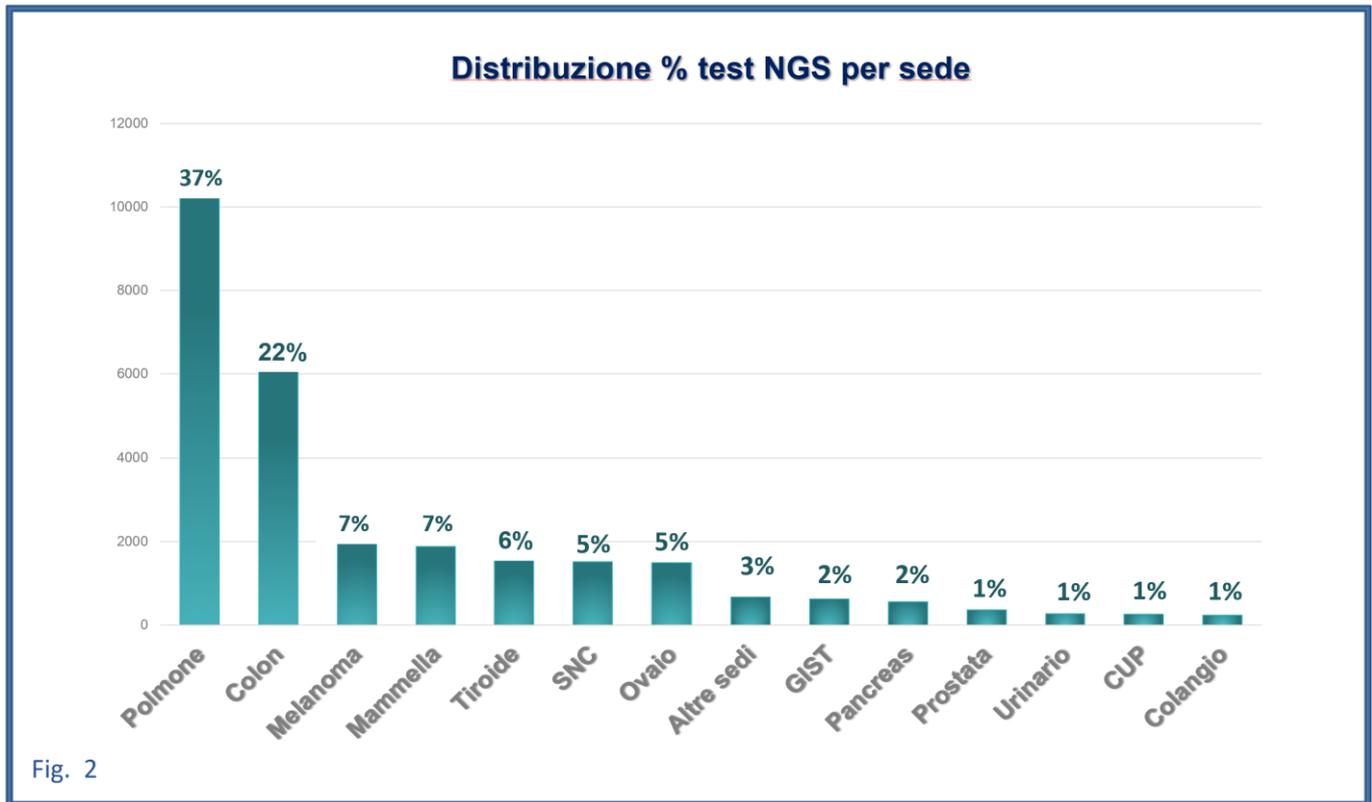
Inoltre, è stato chiesto mediante questionario il numero di richieste esterne ed interne per test NGS. Come si evince dalla [Tabella 5](#) sono maggiori le richieste interne ai centri, piuttosto che esterne. Tuttavia, vi sono alcuni centri (18%; 6 sui 33 totali) che lavorano principalmente su richieste esterne.

Totale test eseguiti 2021	2021: Ricerca	2021: Diagnostica	2021: Richieste INTERNE (N. totale test NGS)	2021: Richieste ESTERNE (N. totale test NGS)
85	25	60	52	8
230	180	50	15	0
429	429	0	0	0
3157	1057	2100	1600	1538
80	0	80	80	0
630	350	280	260	20
0	0	0	0	0
2570	500	2070	1863	207
1193	122	1071	971	100
2250	150	2100	1600	500
271	100	171	171	0
1779	250	1529	1213	316
1322	600	722	650	72
1152	150	1002	600	400
405	150	255	66	189
961	80	881	656	225
698	75	623	75	25
668	95	573	0	573
16	16	0	0	0
310	50	260	200	60
3778	2000	1778	450	1328
136	0	136	128	8
2700	700	2000	850	101
3000	1000	2000	1000	1000
2300	870	1430	309	1121
658	240	418	400	18
1401	60	1341	1330	11
0	0	0	94	0
1889	300	1589	626	963
487	60	427	400	27
3522	1761	1761	622	1139
0	0	0	0	0
761	500	261	248	13
38838	11870	26968	16529	9962

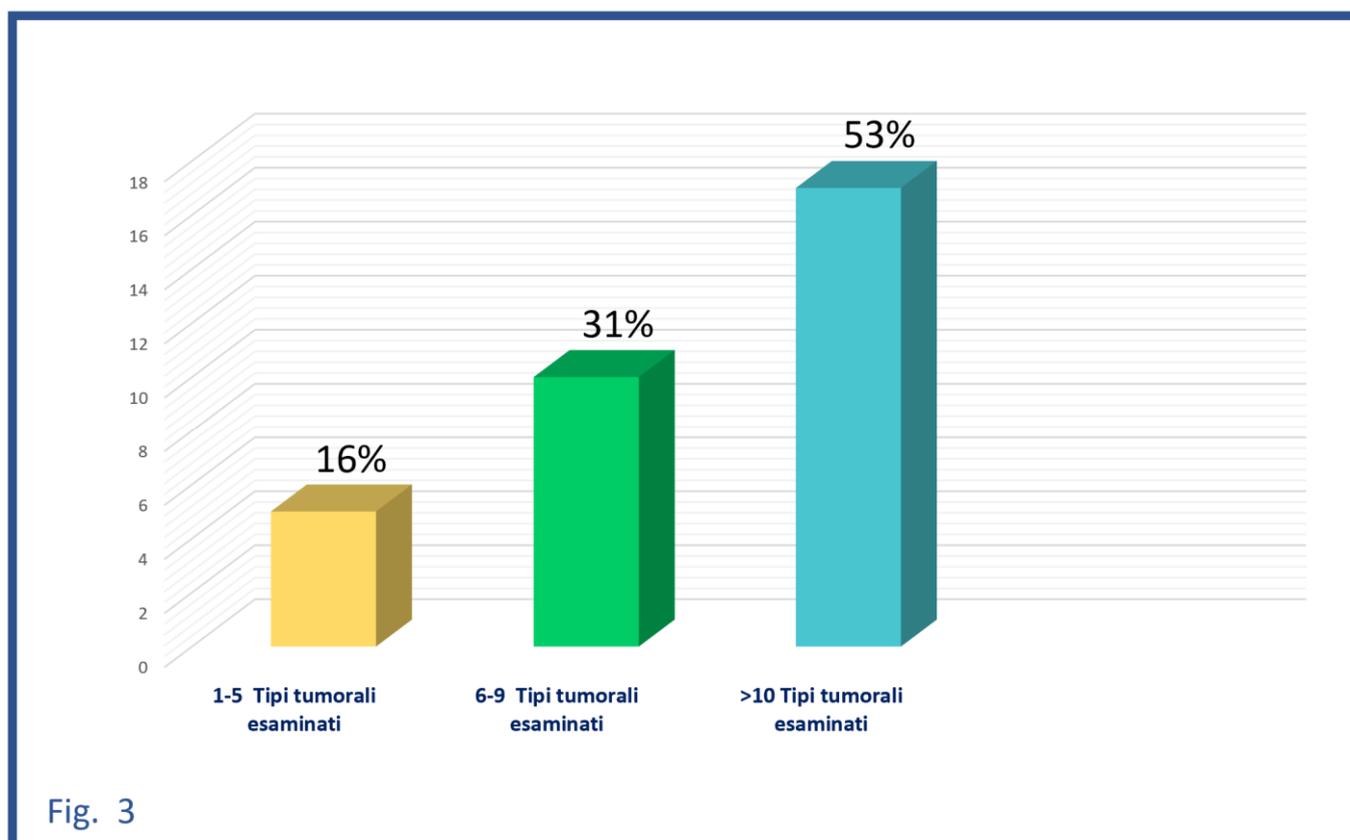
Tabella 5

Sono state indagate dalla survey le patologie oncologiche oggetto di test diagnostici mediante NGS. Dalle informazioni ottenute emerge che i test NGS continuano ad essere utilizzati principalmente per la

diagnostica dei tumori del polmone (con quasi 31 centri coinvolti), a seguire il colon-retto, il melanoma e i tumori della mammella (con più di 21 centri coinvolti). In Fig. 2. è riportata la distribuzione percentuale dei test NGS per tutte le patologie oncologiche segnalate dai centri partecipanti alla survey.



A fronte dei nuovi biomarcatori entrati nella pratica clinica e delle recenti approvazioni da parte del FDA di nuovi farmaci a bersaglio molecolare, nuove tipologie tumorali sono entrate nella pratica diagnostica di routine. Patologie come il colangiocarcinoma e la prostata meritano di particolare menzione. Allo stato attuale, i pazienti affetti da colangiocarcinoma possono essere indirizzati verso trattamenti a bersaglio molecolare in presenza di alterazioni molecolari targettabili (*FGFR2*, *IDH1*, *NTRK*, *BRAF*). Inoltre, è stato esteso lo studio delle mutazioni di *BRCA1-2* e dei geni della ricombinazione omologa al tumore prostatico metastatico resistente alla castrazione, per il quale tale valutazione molecolare rappresenta uno step fondamentale nella decisione del trattamento farmacologico. Questi aspetti rappresentano importanti punti di riflessione se si considera l'evoluzione costante che caratterizza il panorama molecolare oncologico.



Come si evince dalla Fig. 3 la maggior parte dei centri (53%) applica test NGS diagnostici a 10 o più diversi tipi tumorali, il 31% dei centri si limita all'applicazione della tecnologia a 6-9 tipi tumorali, mentre il 16% dei centri svolge attività NGS focalizzata alla diagnosi di specifiche forme neoplastiche (1-5 tipi tumorali).

Nel questionario è stato indagato anche il materiale biologico utilizzato per analisi le mutazionali, distinto in tessuti, preparati citologici e sangue/liquidi biologici (biopsia liquida). I dati ottenuti sono stati organizzati in un grafico a torta che ne riporta le distribuzioni percentuali (Fig. 4). L'esame diagnostico eseguito su tessuto resta il "gold standard" per la caratterizzazione molecolare del tumore nei laboratori partecipanti alla survey (73% dei test effettuati), seguito dal materiale citologico (18%), e dall'esame su liquidi biologici (*biopsia liquida*) nel 9% della casistica totale. L'uso della biopsia liquida negli ultimi anni sta sempre più diffondendosi, soprattutto nell'ambito del tumore polmonare non a piccole cellule (NSCLC), a diagnosi e a progressione da EGFR-TKIs, ma anche in altri tipi tumorali (colon-retto, melanoma, mammella, ovaio e prostata).

La maggior parte dei centri predilige la valutazione molecolare su tessuto, mentre un centro lavora più su preparati citologici che tissutali. Due centri si dedicano alla biopsia liquida in percentuale quasi equiparabile all'utilizzo di tessuto. Dalle risposte ottenute dal questionario emerge che i centri applicano la biopsia liquida soprattutto per lo studio del tumore polmonare NSCLC, mediante pannello genico dedicato.

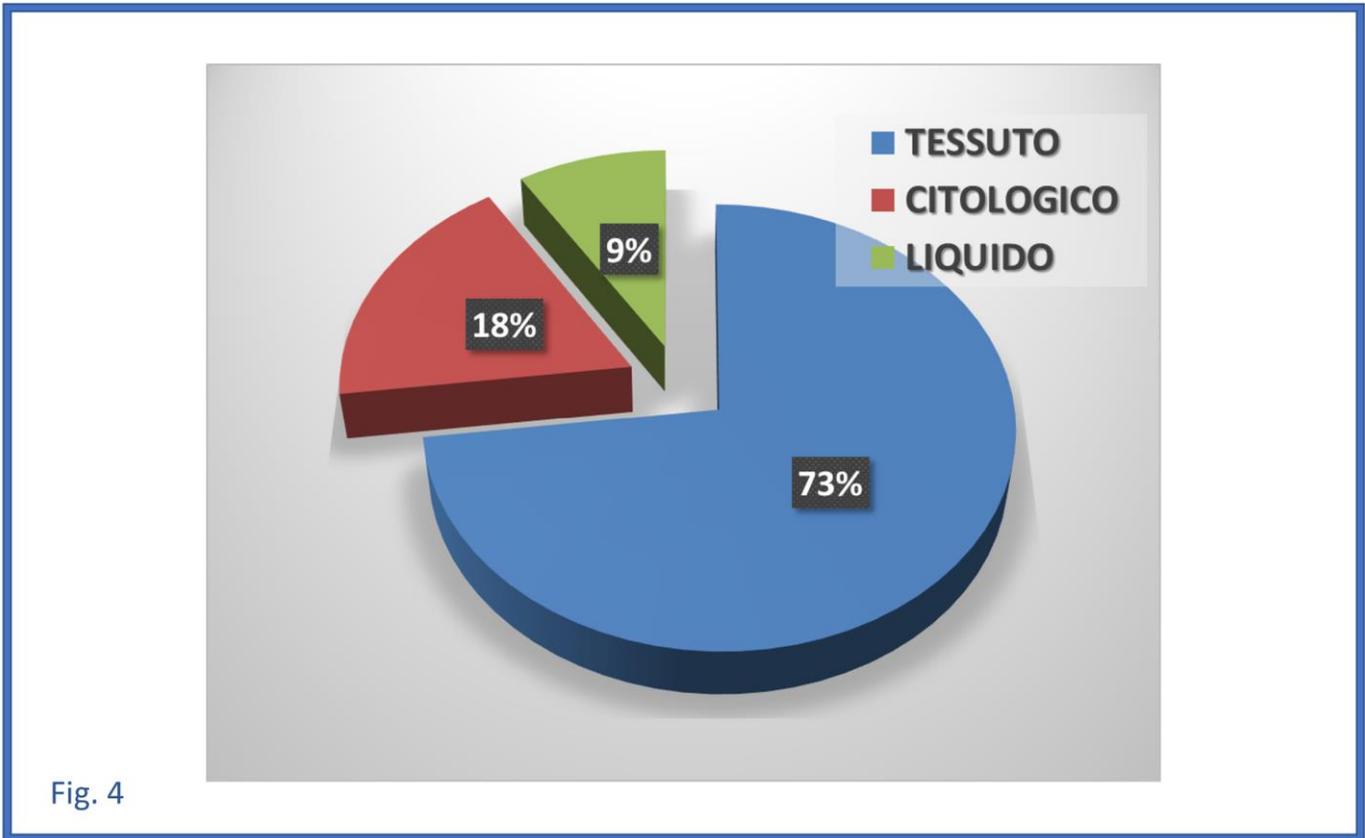


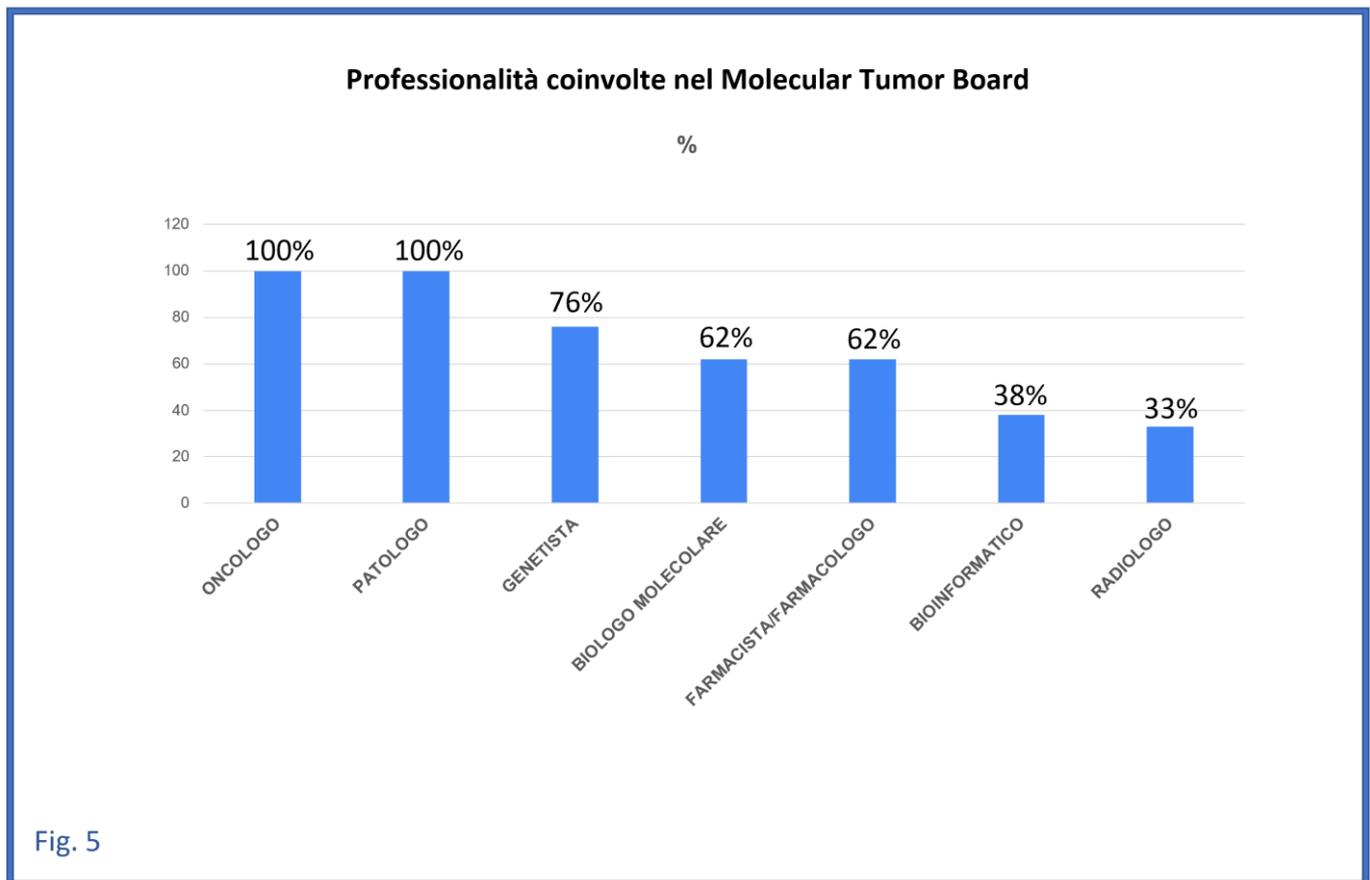
Fig. 4

Le informazioni raccolte relative all'utilizzo di un modello di refertazione unificato hanno messo in luce che trentadue centri si sono uniformati nell'utilizzo di un modello standardizzato, un centro non riporta di utilizzare un modello di refertazione. Tutte i centri sono concordi nell'adottare le raccomandazioni societarie per la refertazione dei dati genomici, pubblicate sul sito SIAPeC.

Infine, uno dei quesiti della survey ha riguardato l'eventuale rapporto del laboratorio con un "Molecular Tumor Board" (MTB), gruppo multidisciplinare di fondamentale importanza nel nuovo modello di oncologia di precisione. Analizzando le risposte ottenute, si evince che ventuno centri diagnostici (63%) cooperano con un MTB di riferimento presente nella loro sede di appartenenza, mentre dodici centri (37%) non riportano contatti con un MTB. La costituzione dell'MTB è avvenuta con delibera regionale per dieci dei ventuno centri che hanno dichiarato di collaborare già con un gruppo multidisciplinare. Piemonte, Veneto, Emilia-Romagna, Toscana, Sicilia, Lazio, Campania, Lombardia, Puglia e Friuli-Venezia Giulia sono

le regioni che si sono mosse in tal senso. Undici dei ventuno centri hanno dichiarato che la nascita del MTB è avvenuta per iniziativa spontanea. Tre centri sono in attesa della costituzione dell' MTB che avverrà mediante delibera regionale in via di approvazione.

Nella Fig. 5 sono riportate le professionalità coinvolte nel MTB. Il patologo e l'oncologo rappresentano le figure maggiormente presenti (rispettivamente 100% e 100%), a seguire il genetista (76%), il biologo molecolare (62%), e il farmacista/ farmacologo (62%). Rispetto ai risultati ottenuti nella precedente survey, le figure del bioinformatico (38%) e del radiologo (33%) sono in aumento.



Dalla survey sono emerse ulteriori figure professionali che affiancano queste maggiormente rappresentate, in ordine di frequenza: l'ematologo, il chirurgo, il bioeticista, il biostatistico, il data manager, l'infermiere di ricerca, lo pneumologo, l'urologo, il ginecologo, l'igienista, lo psichiatra e il metodologo.

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 eterogeneo e potenzialmente in via di rapida evoluzione. Nel complesso, i dati ottenuti si prestano ad una serie di interessanti riflessioni sul rapido 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 saranno necessariamente oggetto di 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. Dei 33 centri partecipanti alla survey, il 46% è ubicato in sedi Aziendali Universitarie, il 27% in Unità Operative Ospedaliere, il 24% in Istituti di Ricovero e Cura a carattere Scientifico (IRCCS). Nell'80% dei casi si tratta di strutture interne a Unità Operative di Anatomia Patologica, negli altri casi i laboratori sono comunque in stretta connessione funzionale con centri di Anatomia Patologica.

Per quanto concerne la distribuzione geografica dei laboratori che hanno partecipato alla survey SIAPEC-PMMP, ventuno (64%) sono situati al nord del paese, otto (24%) al centro, quattro (12%) al sud, includente le isole maggiori. È stato calcolato il rapporto tra numero di centri laboratoristici e popolazione, che mediamente è risultato di 1/1.3 milioni di abitanti al nord, 1/1.5 milioni al centro e 1/5 milioni al sud/isole. 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 bassa concentrazione dei laboratori al sud sembra da ascrivere alla presenza di alcuni laboratori che effettuano diagnosi molecolari su tessuto e cellule, al di fuori dell'Anatomia Patologica e quindi non partecipanti alla survey, come emerso da indagini collaterali condotte dal gruppo di studio.

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. 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.

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.

Sono stati raccolti tutti i dati relativi ai pannelli genetici per la diagnostica NGS utilizzati nei vari centri, in ordine di frequenza di utilizzo. Il numero dei pannelli adottati varia da 1 a 6 (dal pannello del gruppo 1, o di prima scelta, al pannello del gruppo 6).

Seguendo le nuove evidenze scientifiche, si fa strada la necessità di analizzare un numero sempre più ampio di geni per svolgere un'indagine approfondita del decorso della patologia tumorale: a tal proposito è emerso che progredendo dai pannelli di prima scelta (gruppo 1) a quelli del gruppo 6, si assiste ad un notevole aumento dei geni presenti, finalizzati ad analisi allargate, in caso di esaurimento di opzioni terapeutiche convenzionali.

Un aspetto di particolare importanza, è quello che 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 è risultata più affidabile e si è spostata progressivamente anche in campo diagnostico, fornendo nuove e importanti possibilità applicative.

Al momento della survey il 69% dell'attività NGS nei centri è stata destinata alla diagnostica in ambito oncologico e ben 30 (91%) 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 minore 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 sono in linea con quelle indicate recentemente da raccomandazioni della Società Europea di Oncologia Medica. I dati analitici sono stati discussi nella precedente sessione sui risultati presentati. Ci preme qui sottolineare come nuove patologie tumorali siano entrate nella rosa di quelle indagate nella pratica clinica, quali il colangiocarcinoma e il tumore della prostata metastatico resistente alla castrazione. Ciò riflette la continua evoluzione dei trattamenti a bersaglio molecolare e conseguentemente dei test diagnostici per la valutazione dei driver oncologici.

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 in circa il 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 riportato 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 47% dei centri era presente un Molecular Tumor Board ratificato da 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 genetista, il biologo molecolare, il farmacologo/farmacista, il bioinformatico, il radiologo.

A questo "core team", 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 del sondaggio riguardano un network di studio e monitoraggio SIAPEC-PMMP, che include la maggior parte dei centri coinvolti nella diagnostica NGS in ambito oncologico a livello nazionale. Alcuni centri, che non operano all'interno di strutture di Anatomia Patologica o associati ad esse, potrebbero non essere stati inclusi in questa analisi. Pertanto, l'analisi può essere considerata rappresentativa della situazione nazionale, ma non esaustiva. Tuttavia, riteniamo che solo un numero limitato di centri con un grande volume di attività (principalmente situati nel sud del paese o nelle isole maggiori) potrebbero non essere stati inclusi nello studio.

I dati ottenuti da questa survey indicano che l'attività diagnostica mediante sequenziamento massivo parallelo sul territorio nazionale è ormai consolidata; risulta tuttavia ancora 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, processi produttivi adeguati ed un'automatizzazione dei percorsi. L'implementazione di un network laboratoristico 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 all'interno di percorsi diagnostico-terapeutici ben definiti, nel contesto 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) Özdođan M, Papadopoulou E, Tsoulos N, et al. *BMC Med Genomics.* 2021; 14: 105.
- 3) Giardina T, Robinson C, Grieu-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 Anti-Programmed 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