Ministero della Salute

Agenzia Nazionale per i Servizi Sanitari Regionali

HTA Report

Next Generation Sequencing (NGS)

RIHTA
Rete Italiana Health Technology Assessment

age.na.s. AGENZIA NAZIONALE PER I SERVIZI SANITARI REGIONALI

Marzo 2017

Questo report deve essere citato come: Jefferson T, Cerbo M, Chiarolla E, Di Maria E, Favarato M, Gillespie F, Lo Scalzo A, Pinotti G, Turchetti D, Perrini MR - Agenas - HTA Report - "Next Generation Sequencing (NGS)" Roma, marzo 2017.

Contributi

Autori

Jefferson T[1], Cerbo M[1], Chiarolla E[1], Di Maria E[2], Favarato M[3], Gillespie F[1], Lo Scalzo A[1], Pinotti G[4], Turchetti D[5], Perrini MR[1]

[1]Agenzia nazionale per i servizi sanitari regionali - Agenas -Via Piemonte, 60 - 00187 Roma

[2] Dipartimento di Scienze della Salute, Università di Genova; SSD Genetica Medica, EO Ospedali Galliera, Genova

[3] Dipartimento di Patologia Clinica, UOC Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e microbiologia, UOS Diagnostica Molecolare, AULSS3 Serenissima, Venezia.

[4] SC Oncologia Medica – ASST Sette Laghi - VARESE

[5]Unità Operativa di Genetica Medica – Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna Policlinico S.Orsola-Malpighi

Autore di riferimento

Jefferson T, jefferson@agenas.it

Esperti e Revisori Esterni

Arbustini Eloisa – Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo Pavia, Centro Malattie Gentiche

Ringraziamenti

Patrizia Brigoni (documentalista), Fabio Bernardini (documentalista), Antonella Cavallo (editing finale, coordinamento tecnico-amministrativo), Mario Del Giacco (supporto amministrativo), European Diagnostic Manufacturers Association – EDMA (background iniziale).

Dichiarazione del conflitto di interessi

Gli autori dichiarano di non ricevere benefici o danni dalla pubblicazione del presente report. Nessuno degli autori ha o ha posseduto azioni, prestato consulenza o avuto rapporti personali con alcuno dei produttori dei dispositivi valutati in questo documento.

Di Maria Emilio dichiara che negli ultimi 3 anni ha collaborato con la Rete Ligure HTA e che il Dipartimento di Scienze della Salute, Università di Genova, presso il quale lavora, ha ricevuto fondi o altri finanziamenti da industrie farmaceutiche.

Pinotti Graziella dichiara che negli ultimi 3 anni ha collaborato con Amgen, Roche, Merck-Serono e Astazeneca. Nell'ultimo triennio ha partecipato a congressi organizzati da Ecm Sidera, Lilly, Doc Congress e Eisai e che l'Azienda Ospedaliera Sette Laghi (Varese), presso la quale lavora, ha ricevuto fondi o altri finanziamenti da industrie farmaceutiche anche per la ricerca.

Arbustini Eloisa dichiara che negli ultimi 3 anni ha collaborato con Consorzio NISTAS e ha ricevuto rimborsi per partecipazione a congressi da Shire, Genzyme – Sanofy e Menarini. Nell'ultimo triennio ha ricevuto farmaci/attrezzature/sostegno amministrativo da Menarini e che la fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, presso il quale lavora, ha ricevuto fondi o altri finanziamenti da industrie farmaceutiche.

Finanziamento

Agenas e Ministero della Salute

Sommario

Abstract 5

Introduzione 7

1. Obiettivi, quesito di politica sanitaria e quesiti di ricerca 7

2. Descrizione della tecnologia 10

3. Analisi dell'uso corrente della tecnologia 18

4. Analisi della performance 21

4.1 Validità analitica 21

4.2 Validità clinica 22

4.3 Utilità clinica 23

4.4 I Next Generation clinical trial designs 23

5. Analisi economica 26

5.1 Analisi dell'evidenze 26

5.2 Analisi di contesto 29

6. Impatto organizzativo 38

7. Implicazioni etiche 46

8. Conclusioni e Discussione 53

9. Raccomandazioni 56

Bibliografia 57

Glossario 59

Allegato 1. Strategia di ricerca 60

Allegato 2. Questionario 62

Abstract

Introduction: The purpose of this work is the production of a document that describes the current status of the art of next generation sequencing – NGS – and provides data and information useful for planning future governance of NGS in oncology (in somatic and constitutional analysis). The document does not address research applications and so-called direct-to-consumer tests offered directly to the public.

Methods: The document describes the technology and its current uses, its analytical and clinical validity, clinical utility, the regional laboratory networks, costs, ethical-social impact and information needs. The assessment and recommendations are made comparing NGS with the single automated sequencing according to the Sanger method using available data, including a survey of 4 Italian regions.

Results: Differences in technology between laboratories in the application of quality metrics and procedures can lead to substantial changes in the type and quality of information given to the patient and the clinician leading to different clinical decisions. Targeted tests, which analyze genes or mutations with a documented impact on risk, prognosis or therapeutic response, must be differentiated from those that comprise genes or genomic regions with uncertain clinical significance. We found a few examples ("Umbrella trials" and "Basket Trials") defined as "Next-generation clinical trials" trying to integrate the molecular heterogeneity factor of tumors into adaptive study designs. There was insufficient evidence to provide a timely analysis on the cost-effectiveness of NGS, although an estimate of the average annual fixed cost is from around 80,000 Euros per staffed platform. Manufacturers offer different solutions for NGS platforms according to different applications and to the length of the portion of the genome to be analyzed. The regional network organizational aspects are mainly related to laboratory specialist activity and staff training. There was a peak of platform acquisitions in 2015-2016. There is a need to communicate to the patient clear and comprehensive information emerging from NGS and related therapeutic possibilities allowing an informed decision about what you want or not know.

Conclusions: Standardization should be a requirement in all laboratory using NGS. Networking could facilitate the management and analysis of data, and an alignment across the platforms. We suggest the central governance of NGS best practices with rules for the conduct of the test, accreditation of laboratories, exchanging and storing data for reimbursement of marker companion and marker non companion tests, incentives for participation in clinical trials and stakeholders consortia for the financing and development of national and European networks for the validation and evaluation of the technology. The rapid potential improvement of a cancer patient by means

of a more selective approach to therapy should be supported by clinical trials that incorporate the problem of low prevalence phenotypes in various types of cancer that could benefit. Correct and punctual information should be provided to all users.

Introduzione

Negli ultimi anni le acquisizioni scientifiche nel campo della genetica hanno visto l'introduzione sul mercato e lo sviluppo rapido di nuovi sistemi per il sequenziamento del genoma denominati sequenziatori Next Generation Sequencing (NGS). Gli NGS hanno permesso di leggere le sequenze di DNA in parallelo riducendo sia i costi che i tempi di attesa per il sequenziamento di singoli geni, pannelli di geni, esoma ed intero genoma. In futuro è possibile che costi e tempi potranno essere ancora più contenuti rispetto al sequenziamento di singoli geni o all'identificazione di varianti patogenetiche.

Oggi appare certo che questi progressi porteranno insieme ad una conoscenza più approfondita dell'origine ed evoluzione delle malattie ad un cambiamento radicale della medicina e faciliteranno indagini più approfondite e efficienti. In questo scenario e a fronte del proliferare di ogni sorta di offerta di sequenziamento e di test vi è bisogno assoluto di una prospettiva strategica per il governo e lo sviluppo delle tecnologie di sequenziamento genico che permetta una erogazione equa, efficiente ed etica delle corrispondenti prestazioni.

Già in fase di stesura del protocollo di questo rapporto da un primo esame di documenti di policy è emersa la difficoltà da parte dei decisori nel definire un set di dati ed un metodo di valutazione adeguato della metodica detta NGS. Uno dei problemi più di sovente citati è la mancanza di un paradigma valutativo adeguato della tecnologia sostenuto da dati affidabili.

Le informazioni prodotte dall'uso del test sono potenzialmente di gran numero, complessità e delicatezza, richiedendo procedure dedicate di trattamento e conservazione dei dati, inclusi appositi database informatici, che vanno stabilite e adottate con politiche chiare che salvaguardino gli interessi di tutti gli utenti.

Questo documento è stato concepito con questo obiettivo a seguito di una richiesta specifica di alcune regioni. Considerando le infinite applicazioni delle tecnologie di sequenziamento genico si è ritenuto di limitare la valutazione alle applicazioni in campo oncologico, senza con questo ridurre l'importanza presente o futura di altri campi applicativi.

1. Obiettivi, quesito di politica sanitaria e quesiti di ricerca

Lo scopo di questo lavoro è la produzione di un documento utile per il governo della tecnologia NGS, a livello nazionale e regionale, in ambito oncologico (analisi somatiche e costituzionali) con esclusione delle applicazioni a scopo di ricerca e dei cosiddetti *direct to consumer tests*, ovvero test offerti liberamente al cittadino.

Quesito di politica sanitaria

Il Servizio Sanitario Nazionale come deve governare l'introduzione della tecnica di sequenziamento genico nota come Next Generation Sequencing (NGS)?

Quesiti di ricerca

Quali sono le caratteristiche di performance del test, cioè:

- *Quale è la validità analitica del NGS?*
- La validità analitica indica la capacità del test di rilevare la presenza o assenza di una variante genica.
- *Quale è la validità clinica del NGS?*
- La validità clinica indica la capacità del test di determinare la relazione fra la variante genetica analizzata e la presenza o assenza del rischio della patologia in questione.
- *Quale è la utilità clinica del NGS?*
- L'utilità clinica indica la capacità del test di fornire informazioni utili alla diagnosi, trattamento, gestione e prevenzione di una patologia in maniera che il paziente ne tragga beneficio.
- *Quali sono le migliori indicazioni per l'accesso all'analisi di pannelli multigene, al sequenziamento dell'esoma o dell'intero genoma?*
- Con la tecnologia denominata NGS è possibile analizzare simultaneamente sequenze multiple di DNA, che possono variare da batterie (panels) di svariati geni fino all' intero genoma umano, ma non è chiaro quali benefici, oltre a quali svantaggi, la mole di informazioni che si ricavano, soprattutto dagli approcci Whole Exome Sequencing e Whole Genome Sequencing (WGS), possa portare.
- *Quali sono le migliori indicazioni per incentivare la raccolta di prove di validità e utilità di buona qualità ed utili al governo della tecnologia?*
- *Quali sono le migliori indicazioni per la gestione delle informazioni prodotte dall'uso della tecnologia?*
- *Quali implicazioni etico-sociali possono derivare dalla diffusione del NGS, dato il drastico incremento di informazioni inaspettate e/o di significato incerto che essa può generare, in confronto ai test tradizionali, e quali proposte di gestione si possono formulare?*
- *Quale impatto economico ed organizzativo può derivare dall'introduzione ed utilizzo della tecnologia nei contesti di riferimento?*

Metodi

Per rispondere ai quesiti il Gruppo di Lavoro (GdL) ha ricercato documenti di sintesi (Revisioni Sistematiche, lavori di HTA e di politica di gestione), ivi compresi i riferimenti normativi e una registrazione di un convegno di alto livello presso la US Food and Drugs Administration (FDA). Il GdL ha focalizzato l'attenzione sull'applicazione del NGS a persone affette da patologie neoplastiche con sequenziamento applicato all'analisi delle mutazioni costituzionali e all'analisi delle mutazioni somatiche per uso diagnostico/predittivo nella pratica clinica (tecnologia e sue applicazioni). Gli aspetti presi in considerazione sono la validità analitica, la validità clinica, l'utilità clinica, le caratteristiche organizzative dei laboratori, i costi, l'impatto etico-sociale e le necessità informative. La valutazione dei benefici, degli svantaggi dell' NGS e le eventuali raccomandazioni sono state eseguite in un'ottica di comparazione con il sequenziamento automatizzato singolo secondo il metodo Sanger.

A tal fine si è proceduto con l'analisi delle diverse dimensioni che riguardano la tecnologia, quali il contesto di utilizzo, la descrizione della tecnologia, gli aspetti regolatori, l'efficacia e la sicurezza, nonché gli aspetti economici, organizzativi ed etici. In particolare, l'analisi ha approfondito i seguenti aspetti:

- Individuazione della tipologia e delle caratteristiche dei laboratori di analisi adibiti all'utilizzo della tecnologia NGS e descrizione di un modello organizzativo/gestionale;
- Individuazione dei laboratori di analisi che dispongono della tecnologia NGS nelle Regioni Emilia-Romagna, Liguria, Lombardia e Veneto;
- Individuazione dei produttori/distributori;
- Individuazione dei *companion diagnostics (test diagnostico utilizzato a supporto di un farmaco terapeutico per determinarne l'applicabilità ad uno specifico paziente)*;
- Descrizioni ed eventuali differenze tra le piattaforme;
- Descrizione degli aspetti regolatori (marcatura CE degli IVD e approvazione European Medicines Agency EMA o US Food and Drug Administration FDA);
- Caratteristiche di performance della tecnologia;
- Performance dei test;
- Accuratezza analitica (sensibilità, specificità), validità clinica e utilità clinica (outcome);
- Analisi dei costi e valutazioni economiche;
- Rischio di errore clinico;
- Analisi delle ricadute in termini etici;
- Gestione delle informazioni.

E' stata condotta una ricerca sistematica delle pubblicazioni rilevanti, in lingua inglese, attraverso la consultazione di database elettronici (PubMed, EMBASE, Cochrane Library, Econlit, NHSEED e NHSHTA), dall'anno 2010 fino a Maggio 2016. Sono stati consultati inoltre altri database per la ricerca di rapporti HTA, rassegne sistematiche o documenti metodologici.

La strategia di ricerca è riportata in Allegato 1.

2. Descrizione della tecnologia

Lo spettro delle variazioni del DNA del genoma umano comprende piccoli cambiamenti di basi (sostituzioni), inserzioni e delezioni di una o poche basi o delezioni di esoni o interi geni e riarrangiamenti genomici, come ad esempio inversioni o traslocazioni. Tradizionalmente il sequenziamento con il metodo Sanger viene impiegato per l'analisi e ricerca di sostituzioni nucleotidiche, piccole inserzioni e delezioni. Per le restanti anomalie, solitamente, vengono impiegate determinazioni dedicate, come ad esempio la amplificazione genica ciclotermica (PCR), la ibridazione in situ fluorescente (FISH) o la ibridazione genomica comparativa su micro-array (comparative genomic hybridisation - CGH) per rilevare microdelezioni o microduplicazioni. Tutte queste informazioni possono essere ottenute, in linea di principio, mediante sequenziamento NGS, evitando così di impiegare una moltitudine di determinazioni dedicate. Permangono comunque alcune limitazioni anche per NGS, in particolare nell'analisi di regioni genomiche particolarmente ricche del di-nucleotide guanina citosina o in architetture genomiche con ripetizioni da espansione dove rimane importante il ruolo del sequenziamento classico, almeno fino a quando la tecnologia non permetterà di risolverle [Cottrell C.E. et al. 2014].

Confronto del sequenziamento Sanger con NGS

Nel sequenziamento secondo Sanger il DNA genomico reso a singolo filamento viene amplificato mediante PCR, l'impiego di nucleotidi modificati (ddNTP), e marcati con quattro diverse molecole fluorescenti, nella reazione di amplificazione consente di interrompere la reazione di sintesi in posizioni specifiche (noto come metodo della terminazione della catena). I frammenti cosi ottenuti evidenziati dalla specifica molecola fluorescente vengono analizzati mediante elettroforesi capillare ad alta risoluzione. I frammenti marcati, di dimensioni discrete, che attraversano una particolare cella deputata alla cattura del segnale fluorescente, specifico per ogni singola base, vanno a comporre la sequenza nucleotidica in esame [Mardis E.R. 2013].

Nel sequenziamento con NGS, il DNA che deve essere sequenziato viene impiegato per costruire "una libreria" di frammenti ciascuno dei quali, nella sua parte terminale, viene covalentemente legato a delle sequenze di "DNA sintetico" denominate adapter, ad opera di una DNA ligasi. Questi

adapter sono sequenze universali e specifiche per ogni piattaforma analitica. La libreria di DNA, cosi realizzata, può essere amplificata (ad opera della polimerasi) direttamente nello strumento di sequenza su superfici opportunamente preparate che sono in grado di legare gli adapter. Questi piccoli frammenti fungono da stampo per la sintesi di numerosi frammenti complementari (detti reads). Ogni piccolo frammento del DNA originario viene cioè copiato numerose volte in un numero variabile di reads. A seconda del livello di precisione desiderato è possibile calibrare il sistema per ottenere un certo livello di copertura (coverage), ossia un certo numero di reads piuttosto che un altro (ad esempio, 30 reads per frammento – che si definirebbero in gergo 'coverage 30x' - sono già sufficienti per la diagnostica di routine delle malattie mendeliane, mentre la diagnostica delle mutazioni somatiche tipiche dei tumori può richiedere coverage fino a 1000x). Un computer raccoglie poi tutte le sequenze delle reads ottenute e le allinea con le sequenze di riferimento (reference sequence) annotate nei database. In questo modo le sequenze delle reads possono essere ricomposte come in un puzzle fino ad ottenere la sequenza del gene o del genoma dell'individuo analizzato. [Cassandra 2013, Sims D 2014]
Ad oggi sono presenti sul mercato diverse piattaforme, che possono essere utilizzate per diversi tipi di applicazioni in base all'ampiezza della porzione di genoma analizzata [Goodwin 2016].

1. Sequenziamento dell'intero genoma (Whole-Genome Sequencing – WGS);
2. Sequenziamento dell'intero esoma Whole-Exome Sequencing – WES);
3. Sequenziamento mirato di pannelli di geni (Targeted NGS testing o Panel NGS testing)

Per molti anni il sequenziamento del DNA è stato fatto principalmente impiegando la metodologia proposta da Sanger sin dagli anni '50, , tale approccio generalmente analizza DNA a singolo filamento. A differenza dell'NGS il sequenziamento non può essere eseguito in multiplo e perciò, nel caso sia necessario sequenziare regioni genomiche molto ampie o un numero elevato di geni, comporta tempi e costi decisamente maggiori e, nel caso di WES o WGS, non sostenibili in ambito diagnostico.
Sul mercato sono disponibili diverse piattaforme NGS che pur impiegando differenti tecnologie di analisi hanno in comune il seguente workflow:

1. Frammentazione del DNA. Il DNA che viene estratto dal campione biologico (tessuto/cellule) subisce un processo di frammentazione, l'obiettivo è quello di generare dei frammenti casuali con estremità che si possano sovrapporre della lunghezza variabile compresa tra 150 e 600 bp, questo dipende sia dalla piattaforma sia dal tipo di applicazione analitica che si intende impiegare. Sono disponibili tre metodi per la frammentazione della catena degli acidi nucleici: fisico, enzimatico e chimico [Head 2014].

2. Legame degli adattatori. I frammenti di DNA sono convertiti in libreria attraverso il legame chimico con specifiche sequenze sintetiche (adapter complementari a sequenze oligonucleotidiche presenti sulla piattaforma NGS) [Head 2014].

3. Immobilizzazione. Questa avviene mediante le sequenze adapter, preventivamente ibridate alla parte terminale del frammento di DNA, su una superficie solida ad esempio su matrice di vetro di una cella a flusso che rappresenta il supporto fisico della reazione di sequenza.

4. Amplificazione clonale. La maggior parte delle piattaforme richiedono un'amplificazione del materiale di partenza per aumentare il segnale di rilevamento. Ciò può essere ottenuto attraverso l'impiego di varie metodiche di PCR (emulsione o in soluzione) con la produzione di cluster di migliaia di molecole identiche.

5. Sequenziamento. Costituisce la fase finale dell'intero processo e permette la composizione ordinata della sequenza. Ogni sistema utilizza un suo processo di sequenziamento. Durante le fasi cicliche del processo, quando vengono aggiunti i nucleotidi fluorescenti, viene immediatamente catturato il segnale luminoso. I segnali luminosi corrispondono a chiamate di base (cioè al nucleotide specifico ACGT), da cui si ricava la sequenza nucleotidica o 'reads'. La lunghezza dei reads è di circa 200 bp per i test NGS in oncologia, più corti rispetto ai reads utilizzati con il metodo Sanger, che possono variare da 800 a 1000 bp.

6. Analisi dei dati. L'analisi dei dati ottenuti dal sequenziamento, rappresenta un complesso "montaggio di dati" che avviene con l'ausilio di algoritmi bioinformatici ben strutturati e con l'impiego di software particolari. Nelle applicazioni configurate secondo normativa CE-IVD l'interpretazione e l'elaborazione dei risultati avviene in modo automatico, con restituzione solo del risultato ottenuto ed in genere senza ulteriori analisi da parte dell'operatore.

L'analisi per sequenza del DNA avviene mediante l'impiego di vari reagenti chimici che possono essere reperiti sul mercato sotto forma di kit. Nell'ambito della diagnostica molecolare, il mercato fornisce kit confezionati secondo la normativa CE-IVD e che prevedono specifici controllo di qualità. In alternativa esistono reagenti singoli che ogni laboratorio può combinare autonomamente, in base alla propria esperienza (*home made*) e che per essere impiegati a scopo diagnostico devono subire un processo di validazione. Altre forme di reagenti, disponibili in kit ma non marcati CE-IVD trovano applicazione solamente in ambito di ricerca (RUO). In questo report ci riferiamo esclusivamente alle metodiche e kit marcati CE IVD per l'uso commerciale tralasciando i test utilizzati nel campo della ricerca [Rehm HL 2013].

Le piattaforme più utilizzate nelle regioni oggetto della survey sono prodotte da: Illumina Inc, Roche, Thermo-Fisher.

Illumina

Nelle piattaforme Illumina la preparazione della libreria per il sequenziamento parte dalla denaturazione della doppia elica di DNA e l'aggiunta di sequenze adapter alle estremità, ottenendo un filamento stampo da porre nel processo di sequenziamento.

La superficie fisica dove avvengono tutte le reazioni è rappresentata da una particolare micro cella a flusso (flow-cell) composta da otto canali indipendenti, sulle cui superfici sono immobilizzati due diversi oligonucleotidi. I frammenti vengono introdotti sulla micro cella, dove avviene una ibridazione tra le sequenze adapter e le sequenze complementari legate alla microcella. Il legame si forma in entrambe le estremità dei frammenti, che vengono così immobilizzati sulla superficie della cella a flusso, assumendo una forma "a ponte". All'immobilizzazione segue il processo di amplificazione, la DNA polimerasi sintetizza il filamento complementare, la copia così ottenuta viene denaturata e i due filamenti rimangono legati alla cella a una sola estremità. L'operazione viene ripetuta in modo ciclico, i due frammenti si ripiegano fino ad ibridare la loro estremità rimasta libera con l'oligonucleotide complementare fissato alla cella a flusso formando nuovamente una architettura a ponte consentendo la sintesi di un nuovo filamento complementare. Le varie fasi si ripetono fino a formare un cluster di migliaia di frammenti identici, legati a una estremità al substrato e raccolti in uno spazio molto limitato, tale processo viene definito bridge PCR.

I cluster amplificati sono composti sia da filamenti copia del filamento originale, sia da filamenti complementari inversi, questi ultimi vengono rimossi, ottenendo un cluster di circa 1000 copie identiche della stessa sequenza. I frammenti che compongono ogni cluster, attraverso l'impiego di un piccolo oligonucleotide (primer) vengono sequenziati. Ogni ciclo di sequenziamento coinvolge la DNA polimerasi e i quatto dNTP che sono coniugati con molecole fluorescenti e un terminatore reversibile. Il terminatore è una molecola che blocca il gruppo ossidrile impedendo l'ulteriore sintesi, in modo da garantire l'incorporazione di una unica base. Questa limitazione è fondamentale poiché in ogni ciclo sono forniti tutti i dNTP e quindi la sintesi potrebbe riguardare più basi in contemporanea; il terminatore permette invece di arrestare la sintesi dopo ogni singola incorporazione in modo reversibile. Dopo ogni incorporazione, una luce laser eccita il fluoroforo coniugato al dNTP determinando una emissione luminosa che ne permette l'identificazione. Quindi il terminatore viene rimosso, continuando il sequenziamento alla base successiva [Mardis ER, 2013, Mc Court C., 2013]. Nella tabella 1 vengono riportate le caratteristiche principali degli strumenti NGS di Illumina.

Tabella 1 – Principali caratteristiche nelle piattaforme NGS commercializzate da Illumina

Piattaforma	Strumento	Unità	Reads/unit	Lunghezza Read (bp)	Tipo* Read	Tipo di mutazione
Illumina	NovaSeq 6000 S4	Run	10,000,000,000	300	SR & PE	substitution
Illumina	NovaSeq 6000 S3	Run	6,600,000,000	300	SR & PE	substitution
Illumina	NovaSeq 5000/6000 S2	Run	3,300,000,000	300	SR & PE	substitution
Illumina	NovaSeq 5000/6000 S1	Run	1,600,000,000	300	SR & PE	substitution
Illumina	NextSeq 500 High-Output	Run	400,000,000	300	SR & PE	substitution
Illumina	HiSeq X	Lane	375,000,000	300	PE	substitution
Illumina	HiSeq 3000/4000	Lane	312,500,000	300	SR & PE	substitution
Illumina	NextSeq 500 Mid-Output	Run	130,000,000	300	PE	substitution
Illumina	HiSeq High-Output v4	Lane	250,000,000	250	SR & PE	substitution
Illumina	HiSeq High-Output v3	Lane	186,048,000	250	SR & PE	substitution
Illumina	HiSeq Rapid run v4	Lane	150,000,000	500	SR & PE	substitution
Illumina	HiSeq Rapid Run	Lane	150,696,000	300	SR & PE	substitution
Illumina	HiScanSQ	Lane	93,024,000	200	SR & PE	substitution
Illumina	GAIIx	Lane	42,075,000	300	SR & PE	substitution
Illumina	MiSeq v3	Lane	25,000,000	600	SR & PE	substitution
Illumina	MiniSeq High-Output	Lane	25,000,000	300	SR & PE	substitution
Illumina	MiSeq v2	Lane	16,000,000	250	SR & PE	substitution
Illumina	MiniSeq Mid-Output	Lane	8,000,000	300	SR & PE	substitution
Illumina	MiSeq v2 Micro	Lane	4,000,000	300	SR & PE	substitution
Illumina	MiSeq v2 Nano	Lane	1,000,000	500	SR & PE	substitution

*SR: Single read; PE: Paired End

Le informazioni riportate sono state tratte da: https://www.illumina.com/systems/nextseq-sequencer/performance-specifications.html (accesso 04/01/2017) e Rizzo JM. 2012; Frey KG 2014.

Roche

La piattaforma attualmente commercializzata da Roche è denominata 454 e comprende due differenti sequenziatori: GS FLX e GS Junior. Secondo quanto dichiarato dal produttore è previsto un *phase out* della tecnologia entro la fine del 2016, e verrà sostituita da sequenziatori a più alto potenziale definiti sequenziatori di terza generazione SMRT sequencer – PacBio collaboration.

Nell'ambito dei sequenziatori 454 sono ora disponibili strumenti che si caratterizzano per la lunghezza delle sequenze (fino a 700-1000 bp – 454 FLX+) e per la velocità di sequenziamento (10-23 ore) [http://www.roche.it/home/roche-in-italia/diagnostics/prodotti/next-generation-seq.html].

Il sistema 454, a differenza degli altri delle altre piattaforme NGS che utilizzano dideossinucleotidi per interrompere la catena di amplificazione, è basato sul pirosequenziamento, una tecnica basata sulla rivelazione del pirofosfato rilasciato durante la fase di incorporazione dei nucleotidi [Liu 2012].

Ai frammenti di DNA, denaturati per renderli a singolo filamento, sono uniti due adapter, specifici per la piattaforma analitica, alle estremità (libreria). La fase di amplificazione utilizza delle piccole sfere (28 μm) la cui superficie è ricoperta da oligonucleotidi complementari ad uno degli adapter dei frammenti. Frammenti e sfere vengono posti in contatto permettendo la formazione di un legame forte tra di loro. L'insieme sfere e filamenti assieme agli enzimi di amplificazione genica sono poste nella fase acquosa di una emulsione acqua-olio per favorire il processo di amplificazione clonale mediante PCR. Si tratta di un processo ciclico in cui la DNA polimerasi sintetizza il filamento complementare, viene quindi denaturata la doppia elica e vengono sintetizzati due nuovi filamenti complementari; il processo continua fino ad ottenere decine di milioni di copie del frammento per ogni sfera. Conclusa l'amplificazione, le sfere ricoperte dai nuovi filamenti sono poste su un supporto per il sequenziamento apposito, formato da circa 1,5 milioni di micro pozzetti che consentono la deposizione di una sola sfera per posizione. A queste vengono aggiunte da numerose sfere di dimensione più piccola legate a solforilasi, luciferasi, apirasi e luciferina, enzimi e substrati necessari per il processo di sequenziamento. Il sequenziamento con queste piattaforme avviene con un processo chiamato pirosequenziamento che prevede il completamento ripetitivo del filamento e la simultanea lettura del segnale emesso dai nucleotidi marcati incorporati. E' un processo ciclico, in cui un singolo dNTP viene aggiunto di volta in volta alla reazione. Se il deossinucleotide è complementare al filamento stampo, la sua incorporazione determina il rilascio di pirofosfato inorganico (Ppi) che ad opera della solforilasi è convertito in ATP. L'ATP ottenuto consente la conversione della luciferina ad ossi luciferina ad opera della luciferasi

con produzione di un segnale luminoso che viene rilevato dalla camera CCD. L'incorporazione dei nucleotidi nel filamento genera una quantità di luce che è proporzionale al numero di basi incorporate in un'unica aggiunta di nucleotidi. L'enzima apirasi degrada il dNTP che non è stato incorporato. Quando la degradazione è terminata si aggiunge un secondo dNTP per far progredire la reazione di polimerizzazione. Vengono aggiunti ciclicamente tutti e quatto i nucleotidi fino alla deduzione completa della sequenza in esame [Mardis ER 2013]. Nella tabella 2 vengono riportate le caratteristiche principali degli strumenti NGS di Roche.

Tabella 2 – Principali caratteristiche nelle piattaforme NGS commercializzate da Roche

Piattaforma	Strumento	Unità	Reads/unit	Lunghezza Read (bp)	Tipo Read	Tipo di mutazione
Roche 454	GS FLX+ / FLX	1 PTP	700,000	700	SR	indel
Roche 454	GS FLX+ / FLX	1/2 PTP	350,000	700	SR	indel
Roche 454	GS FLX+ / FLX	1/4 PTP	125,000	700	SR	indel
Roche 454	GS FLX+ / FLX	1/8 PTP	50,000	700	SR	indel
Roche 454	GS FLX+ / FLX	1/16 PTP	20,000	700	SR	indel
Roche 454	GS FLX+ / FLX	1 PTP	70,000	400	SR	indel

Le informazioni riportate sono state tratte da: Rizzo JM. 2012 e Frey KG 2014.

Thermo-Fisher

I sequenziatori sono prodotti dalla divisione Ion Torrent e si suddividono in due linee: una costituita dalle piattaforme Ion S5 e Ion S5 XL, l'altra dalla piattaforma Ion PGM. Le piattaforme utilizzano un sistema di sequenziamento con semiconduttori.

Dopo la denaturazione della doppia elica del DNA e l'ibridazione con le sequenze adapter, i frammenti vengono ibridati a particolari sfere di piccole dimensioni (0.75 mm) la cui superficie è ricoperta ad oligonucleotidi complementari a una delle molecole adapter creando una notevole densità di sfere sequenziabili per corsa.

In particolare Ion Torrent sfrutta la tecnologia dei semiconduttori, coniugandola con un meccanismo di sequenziamento basato su processi biochimici già noti. Infatti, nei sistemi biologici, quando un singolo nucleotide è incorporato dall'enzima DNA polimerasi nella catena nascente di DNA a doppia elica, viene rilasciato uno ione idrogeno come sottoprodotto. La tecnologia dell'Ion Torrent è incentrata sull'impiego di un sofisticato array ad alta densità con micropozzetti all'interno dei quali questo processo di sintesi (e conseguente rilascio di ioni idrogeno) viene ripetuto ciclicamente. Ogni micropozzetto del chip racchiude una molecola di template nonché un sensore in grado di registrare anche minime variazioni del pH ambientale: quando uno ione idrogeno è rilasciato, il pH subirà una modificazione, rilevata dal pH-metro presente nel pozzetto. Di conseguenza l'informazione viene convertita da chimica a digitale. Il sistema consente l'aggiunta al chip di un nucleotide noto alla volta: se il nucleotide aggiunto al sistema non viene incorporato nella molecola di DNA neosintetizzata, in quanto non complementare al template contenuto nel

micropozzetto, non verrà prodotta nessuna modifica del pH e di conseguenza nessuna modifica del voltaggio. Un ciclo del processo dura pochi secondi poiché non richiede una rilevazione ottica, come accade invece negli altri sistemi di NGS [Mardis ER, 2013, Mc Court C., 2013]. Nella tabella 3 vengono riportate le caratteristiche principali degli strumenti NGS di Thermo-Fisher.

Tabella 3 – Principali caratteristiche nelle piattaforme NGS commercializzate da Thermo-Fisher**.**

Piattaforma	Strumento	Unità	Reads/unit	Lunghezza Read (bp)	Tipo Read *	Tipo di mutazione*
Ion	Proton I	Chip	60,000,000	200	SR	indel
Ion	PGM 318	Chip	4,000,000	400	SR	indel
Ion	PGM 316	Chip	2,000,000	400	SR	indel
Ion	PGM 314	Chip	400,000	400	SR	indel

*SR: Single read

Le informazioni riportate sono state tratte da: http://www.thermofisher.com/it/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/ion-torrent-next-generation-sequencing-workflow/, Rizzo JM. 2012 e Frey KG 2014)

3. Analisi dell'uso corrente della tecnologia

Individuazione dei laboratori di analisi che dispongono della tecnologia NGS nelle Regioni Emilia-Romagna, Liguria, Lombardia e Veneto

Metodi

Al fine di verificare l'uso corrente della tecnologia e il contesto di utilizzo è stata condotta una rilevazione presso le Regioni che hanno segnalato e prioritarizzato la tecnologia in esame: Emilia Romagna, Liguria, Lombardia e Veneto.

Ai referenti regionali è stato inviato un questionario (Allegato 2) con il quale sono state richieste, per gli anni 2014 e 2015 e relativamente all'uso corrente della tecnologia, le seguenti informazioni: Azienda Sanitaria, Città e Provincia, bacino di utenza dell'Azienda Sanitaria, Unità operativa in cui è presente l'NGS, tipologie di laboratorio presenti; sono state inoltre richieste informazioni circa il numero di NGS, fabbricante, modello, anno di installazione. Per quanto riguarda le informazioni relative all'attività è stato richiesto l'elenco dei test effettuati con NGS, il numero delle prestazioni erogate distinto dal totale delle prestazioni oncologiche ed il numero di test oncologici refertati.

Risultati

Le informazioni raccolte si riferiscono a quattro regioni (Emilia Romagna, Liguria, Lombardia e Veneto) la cui popolazione rappresenta il 35%[1] di quella italiana.

Dalla survey risulta che la tecnologia è in uso in 32 strutture di cui 24 sono pubbliche e 8 private accreditate. Riguardo alla distribuzione per tipologia di struttura si è riscontrata la maggior concentrazione presso le Aziende Ospedaliere (11) e presso gli IRCCS (11); infatti, in queste strutture sono presenti 42 sequenziatori su un totale di 54. Nella tabella 4 si riporta il numero di strutture appartenenti alla stessa tipologia ed il relativo numero di sequenziatori NGS.

Tabella 4- Numero di strutture e sequenziatori NGS per tipologia di struttura

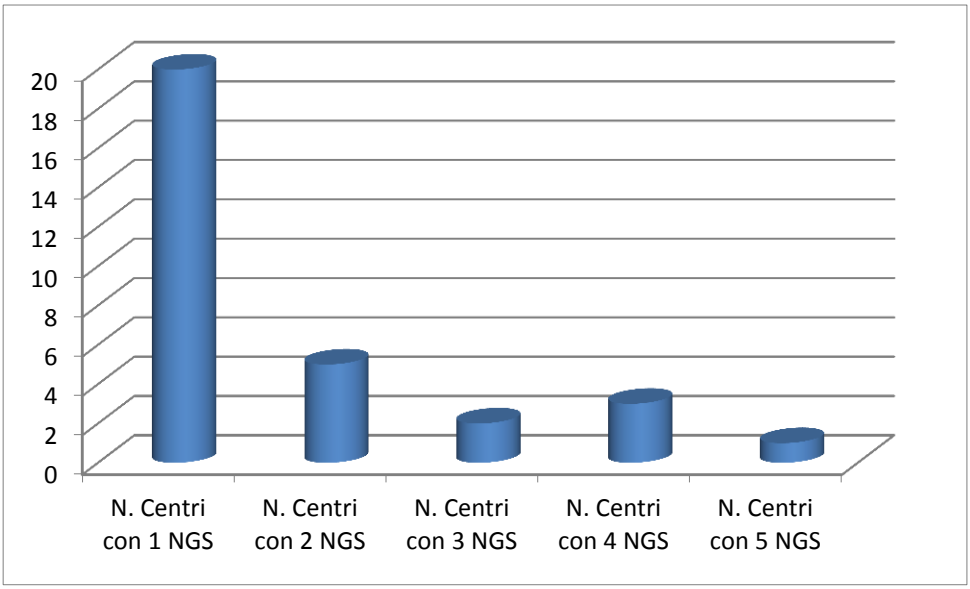
Tipologia struttura	Numero strutture	Numero sequenziatori NGS
Azienda ospedaliera	11	18
IRCCS	11	24
Casa di cura	3	3
Laboratorio territoriale	2	2
Azienda Sanitaria	2	2
Casa di cura IRCCS	2	4
Ente Ospedaliero	1	1
Totale	**32**	**54**

[1] Fonte ISTAT 2016, statistiche regionali, popolazione http://www.istat.it/it/archivio/regioni (accesso 19.01.2017)

E' importante specificare che alcune strutture codificate come AO attualmente sono Presidi Ospedalieri delle Aziende sanitarie, in seguito a recenti leggi regionali di riordino del Sistema Sanitario Regionale.

Nelle 32 strutture rispondenti è stato rilevato che alcuni centri dispongono di più piattaforme NGS, come riportato in Figura 1.

Figura. 1 – Numero di piattaforme NGS presenti nei Centri rilevati



I laboratori rilevati che ospitano gli NGS sono quelli di microbiologia, biologia molecolare, anatomia patologica e genetica medica.

Nelle quattro Regioni, oggetto della rilevazione, sulla base delle informazioni fornite si stima un numero medio di sequenziatori NGS pari a 2,4 per milione di abitanti (min 0,8; max 3,5).

L'introduzione dei sequenziatori è piuttosto recente ed il maggior numero delle piattaforme è stato acquisito negli anni 2014-2015, come si evince dal grafico (Figura 2), con una brusca diminuzione nel 2016 le cui ragioni sono da rimandare eventualmente ad un successivo livello di approfondimento.

Figura 2 – Numero di piattaforme NGS per anno di acquisizione

Per quanto riguarda l'attività svolta nelle strutture, l'analisi si è concentrata solo sull'anno 2015, poiché la Regione con il più alto numero di piattaforme (pari al 65% del numero di NGS rilevati) ha fornito dati di attività solo per questo anno. L'analisi ha evidenziato che, su un totale di 54 piattaforme NGS censite, il dato di attività è stato fornito, per tutte le tipologie di prestazioni, solo per 37 piattaforme (circa il 68% del numero di NGS rilevati) mentre nell'ambito oncologico l'attività è stata rilevata solo per 18 piattaforme NGS (circa il 33% del numero di NGS rilevati). Infine, l'attività oncologica, conclusa con un referto, ha riguardato 12 piattaforme NGS (circa il 22% del numero di NGS rilevati). Questi referti verosimilmente rappresentano l'uso diagnostico per test.
Nella tabella 5 si riporta il quadro di sintesi dell'attività rilevata.

Tabella 5 – Numero di piattaforme NGS e relativi volumi di attività

Attività rilevata (2015)	N. piattaforme NGS	Media prestazioni	Mediana prestazioni	Min	Max
Tutte le prestazioni	37	419	200	10	2107
Prestazioni in campo oncologico	18	228	113	10	1937
Prestazioni oncologiche concluse con referto	12	284	119	5	1937

Le prestazioni oncologiche (4.098) rappresentano il 26,45% del totale delle prestazioni (15.496), mentre le prestazioni oncologiche refertate (3.408) rappresentano l'83,16% di quelle oncologiche. Questo risultato mette in evidenza che buona parte delle prestazioni erogate nel campo oncologico potrebbero aver avuto un utilizzo clinico.

4. Analisi della performance

4.1 Validità analitica

La validità analitica indica la capacità del test di rilevare in modo preciso e affidabile, la presenza o assenza di una o più varianti geniche. Per definire lo stato dell'arte nella valutazione della validità analitica sono stati sintetizzati i punti più importanti emersi dall'incontro di consultazione pubblica organizzato da FDA (Public Workshop - Next Generation Sequencing-Based Oncology Panels, February 25, 2016 https://www.fda.gov/MedicalDevices/NewsEvents/WorkshopsConferences/ucm480046.htm), e dai documenti Green Park Model Collaborative "Initial Medical Policy and Model Coverage Guidelines for Clinical Next Generation Sequencing in Oncology" [Green Park Collaborative 2015] e dal documento della Società Italiana di Genetica Umana - SIGU [Ferlini 2016]. Un ulteriore approfondimento delle differenti componenti della validità analitica (preparazione del campione, preparazione della run, analisi) non è stata trattata.

Una definizione unica della validità analitica dell'approccio è pressoché impossibile, se si considera l'esistenza di diverse piattaforme per l'analisi NGS che comportano estrema variabilità delle procedure che costituiscono l'intero flusso produttivo che porta al risultato finale (preparazione del campione, analisi, preparazione delle library, applicazioni bioinformatiche e interpretazione). Le differenze, in tecnologia tra i laboratori, nell'applicazione di metriche di qualità e nelle procedure, possono portare a variazioni sostanziali nel tipo e qualità delle informazioni date al paziente e al clinico, che possono condurre a decisioni cliniche diverse.

Le fonti di variabilità possono essere ricondotte sostanzialmente a tre livelli:

1) Differenze delle piattaforme e delle relative procedure:

   Le varie piattaforme NGS presentano livelli di errore intrinseco variabile che portano a cambiamenti di sensibilità significativi.

   Ciò riguarda le caratteristiche di registrazione di un device e del suo corredo per la sequenziazione genica in parallelo. Tutti i documenti consultati esprimono una sostanziale incertezza sulle variabili necessarie per effettuare ed interpretare in maniera valida un panel di geni in oncologia per tipo di tessuto (**registrazione**).

2) Differenze tra diversi tipi di analisi

   La validità analitica è facilmente determinabile per un test finalizzato a un pannello di mutazioni ben conosciute e controllabili con un metodo gold standard, mentre è difficilmente definibile per un'indagine ad ampio spettro come il Whole Genome Sequencing.

   L'incertezza riguarda anche le eventuali varianti geniche riscontrate nella esecuzione del

panel, e il caso di sequenze geniche identificate che non siano state validate precedentemente in un trial clinico.

3) Variabilità pre-analitica introdotta dal tipo di prelievo: l'estrazione del DNA, da vari tipi di tessuti preservati chimicamente o meno, può tradursi in una resa estrattiva (quantità) non ottimale, oppure l'integrità del DNA estratto può essere non sufficiente a garantire un buon risultato di sequenza. Inoltre, potendo partire da vari tipi di materiale biologico (tessuto fresco, aspirati, tessuti FFPE – formalin-fixed paraffin-embedded) per l'analisi NGS potrebbero generarsi risultati diversi non tanto per errori bioinformatici o del flusso di lavoro ma perché sono state eseguite o meno delle procedure di arricchimento del materiale di partenza. Inoltre, in caso di analisi somatiche nei tumori, è da considerare il sito di campionamento, poiché la neoplasia di per sé rappresenta una trasformazione/entità biologica ad elevata eterogeneità genetica.

Le linee guida preparate da EuroGentest e European Society of Human Genetics [Matthijs G et al, 2016] raccomandano requisiti e procedure per la valutazione e la validazione delle applicazioni diagnostiche del NGS; tuttavia sono focalizzate sull'utilizzo della tecnologia per la diagnosi di malattie genetiche ereditarie (su DNA germinale) e non trattano specificamente i test somatici in oncologia.

4.2 Validità clinica

La validità clinica indica la capacità del test di evidenziare varianti per cui vi è una chiara correlazione con il rischio di cancro (test costituzionali – di predisposizione) o con la prognosi o la risposta a specifici trattamenti oncologici (test somatici – prognostici o predittivi).

Indipendentemente dalle caratteristiche dei test, i dati clinici non sono aggregabili (e quindi utilizzabili) senza informazioni precise sui test eseguiti.

Anche in questo caso, infatti, occorre differenziare fra i test targeted, che analizzano geni o mutazioni con un documentato impatto su rischio, prognosi o risposta terapeutica, e quelli che ricomprendono geni o regioni genomiche con significato clinico incerto. In quest'ultimo caso, aumenta la probabilità (comunque presente anche in test targeted) di riscontrare **varianti genetiche che suggeriscono un'utilità clinica** (varianti con prove preliminari di utilità clinica cosiddette emergenti nel documento della Green Par [Green Park Collaborative 2015]) e **varianti di significato incerto il cui significato clinico è sconosciuto** (generalmente definite "variants of unknown significance – VUS"). Il significato delle varianti, la loro generalizzabilità ad altri tumori simili, e la possibilità di utilizzare modelli in silico per la validazione delle varianti sono oggetto di discussione. Questo aspetto potrebbe essere anche considerato nell'ambito della validità analitica. In particolare l'annotazione che può essere fatta con diversi strumenti bioinformatici e con

differenti risorse genomiche (come i transcript set ENSEMBLE o REFSEQ) e l'interpretazione delle varianti stesse rappresenta un passaggio delicato per la sua variabilità intrinseca, che va attentamente documentato per la scelta degli strumenti utilizzati e delle ragioni che hanno portato a quella scelta [Van den Bulcke 2016].

4.3 Utilità clinica

L'utilità clinica indica la capacità del test di fornire informazioni utili alla diagnosi, trattamento, gestione e prevenzione di una patologia in maniera che il paziente ne tragga beneficio.

I test possono essere **"companion diagnostics"** in quanto identificano biomarcatori per i quali esistono degli agenti antitumorali specifici o sono in grado di identificare pazienti ad aumentato rischio di effetti collaterali o servono per monitorare il trattamento e **"non-companion diagnostics"** che identificano geni con utilità prognostica o predittiva di risposta ma che non sono al momento essenziali nella selezione dei pazienti e nelle scelte terapeutiche. La US FDA esprime incertezza sugli standard di registrazione di questi test.

Per definire lo stato dell'arte nella **valutazione della utilità clinica** in oncologia dell'abbinamento fra sequenziamento genico, diagnosi, prognosi e terapia di forme tumorali sono state effettuate ricerche supplementari per identificare i disegni di studio correnti, proposti o in corso di definizione (Allegato 1 - strategia di ricerca).

Dall'esame di titoli e abstract dei 9374 possibili articoli ne sono stati identificati 26 come possibili e 7 sono stati utilizzati come fonte di informazione sullo stato attuale dei disegni di studi clinici.

Gli schemi già sviluppati e attualmente in uso per la valutazione strutturata di validità clinica e utilità clinica si trovano in una rassegna sistematica completata dopo la ricerca riportata nel presente report [Pitini E. et al, submitted.]

4.4 I Next Generation clinical trial designs

Dai risultati della ricerca appare chiara la necessità di adottare dei disegni di trial che riflettano una realtà dinamica, come di fatto si verifica in campo oncologico e che si possano applicare a sottotipi di neoplasie, che con le potenzialità del NGS, avranno frequenza sempre più bassa. A questo proposito si trovano già in letteratura alcuni esempi definiti come "Next-generation clinical trials" [Catenacci 2015]. Questi tentano di integrare il fattore di eterogeneità molecolare dei tumori nel disegno dello studio. La Tabella 6 sintetizza i disegni di trial clinico utilizzati.

Tabella 6 - Next generation trial designs

Seriale	Riferimento	Disegno di studio	Caratteristiche	Note (esempi)
•	Disegno ad Ombrello (Umbrella trial) Progettato per testare l'impatto di diversi farmaci su diverse mutazioni in un unico tipo di tumore, sulla base di una valutazione molecolare centralizzata. Questo tipo di disegno permette la validazione di una strategia basata su una miscela di biomarker e farmaci			
1.	(1, 2)	Retrospettivo-prospettico	Disegno tradizionale senza analisi di biomarker con abbinamenti retrospettivi alla fine del trial	
2.	(1)	Esplorativo	I partecipanti sono randomizzati nei diversi bracci, senza alcun riferimento iniziale per l'accoppiamento biomarker-farmaco. Successivamente (dopo analisi ad interim) vengono identificate le associazioni biomarker-farmaco e lo studio prosegue con un disegno di accoppiamento adattivo con l'ampliamento della popolazione Si prosegue con gli studio di Fase IIb o fase III. Il braccio inefficace viene interrotto.	Braccio placebo non deve essere presente. Si possono testare molte associazioni biomarker-farmaco (BATTLE trial)
3.	(1)	Esplorativo	I partecipanti sono assegnati ai bracci con stratificazione biomarker-driven prima della randomizzazione. Sono possibili appaiamenti con il placebo.	(I-SPY trial)
4.	(1)	Espansivo	Segue alla fase esplorativa del disegno al seriale 2.	
5.	(1)	Espansivo	Continua dal disegno al Seriale 3. A seconda della molteplicità dei biomarker identificati c'è la possibilità di inserire trattamenti prioritari	Istologico-dipendente (FOCUS-4 trial)
Disegno a Paniere (Basket Trial) Testa l'effetto di uno o più farmaci in diverse tipologie di tumore con stessa alterazione molecolare (positività per uno o più biomarkers) I Biomarkers sono di solito misurati a livello locale Questo disegno permette a pazienti affetti da diverse tipologie di tumore ma con identiche mutazioni genetiche di essere arruolati nelle coorti in uno studio (nel "Paniere") . I ricercatori possono analizzare separatamente le risposte dei pazienti in quanto ciascun tipo di tumore può essere messo in una coorte, e valutare l'impatto del farmaco su tutti i pazienti come un solo gruppo. Se un gruppo denota una buona risposta, questo può essere ampliato ad altri pazienti per valutare subito se altri pazienti possono beneficiare della nuova terapia. Se un altro gruppo non evidenzia alcuna efficacia, questo può essere chiuso e l'arruolamento può continuare nella sola altra coorte.				
6.	(1, 2)	Espansivo	Test molecolari durante lo screening e randomizzazione sulla base del profilo del biomarker, segue fase arricchita nei bracci con accoppiamenti efficaci.	Istologico-agnostico (NCI-MATCH e Signature trials)

7.	(1)	Espansivo	Disegno rivolto all' eterogeneità tumorale intra-paziente e al trattamento dopo progressione con biopsie multiple. Algoritmo di trattamento personalizzato rispetto ai controlli storici - concetto pilota con varianti per diverse linee di terapia con o senza fasi di crossover.	Istologico-dipendente (PANGEA trial)

Alcuni aspetti da tenere in considerazione nel leggere la tabella 7 sono la necessità di grandi denominatori per i disegni di studio cosiddetti esplorativi. In generale i disegni esplorativi e espansivi sono molto costosi e difficilmente possono essere sostenuti da un'unica fonte di finanziamento [Peplow 2016]. Nei vari lavori citati la descrizione accurata dell'arruolamento e le fasi della randomizzazione spesso non sono chiare. Ciò è dovuto possibilmente alla loro relativa novità ed alla comprensibile mancanza di esperienza degli operatori. Un compromesso fra le due grandi famiglie di studi (ombrello e paniere potrebbe essere rappresentato dal cambiamento ed adattamento dello stesso studio in varie fasi con disegni variabili a partire da quello retrospettivo-prospettico per identificare accoppiamenti da testare. Indipendentemente dal disegno di studio scelto, la maggior parte degli studi richiede numerose biopsie per sequenziamenti multipli lungo il periodo di studio per testare la eterogeneità di genomi tumorali fra i soggetti e fra siti multipli all'interno dello stesso tumore. L'ultimo e forse più grosso problema di disegni di studio ispirati al probabilismo fisheriano (che richiede molti partecipanti) è dato dai numeri esigui di partecipanti per braccio selezionati sulla base di sequenze geniche simili. Ciò è anche dovuto al basso tasso (<5%) di mutazioni puntiformi di varianti, come testimoniato dall'esito negativo del trial di Lopez-Chavez et al.[Lopez-Chavez 2015]. La selezione finale di numeri esigui di partecipanti è dovuta alla logica della tipizzazione con NGS: (sito tumorale – morfologia - cambiamento morfologico – sequenziamento - sequenziamento individuale - sub sequenziamento individuale).

Conclusioni

L'opportunità di un potenziale rapido miglioramento dei pazienti oncologici mediante un approccio più selettivo alla terapia deve essere sostenuta da trial clinici che incorporano la problematica dei fenotipi a bassa prevalenza in vari tipi di tumore che potrebbero beneficiare, con una modifica di indicazione di un trattamento già approvato per altri tipi di neoplasie [Jamieson 2015].

Il documento del Green Park propone delle possibili soluzioni per ovviare alla difficoltà di arruolare grandi numeri di pazienti. Ci sono incentivi ai medici che arruolano pazienti in trials con disegni appropriati ed approvati, incentivi ai laboratori che lavorano in rete e mettono a disposizione i dati, e partecipazioni di stakeholder in iniziative consorziali per arruolare il maggior numero di pazienti. Quest'ultima proposta è necessaria dato il probabile costo altissimo dei trial descritti o proposti in

questo documento. Tali costi sono dovuti alla imponente logistica di arruolamento e selezione dei pazienti, alle ripetute fasi di selezione sulla base di sequenziamenti, cambiamenti ed adeguamenti del disegno dello studio oltre al costo delle terapie.

5. Analisi economica

5.1 Analisi delle evidenze

Per rispondere al quesito di ricerca sopra indicato in merito al potenziale impatto economico che la tecnologia NGS può generare nei sistemi di riferimento, il Gruppo di Lavoro ha avviato due linee di attività: la prima, focalizzata sulla ricerca dell'evidenza clinica e traslazionale disponibile, la seconda, focalizzata sull'analisi del contesto di riferimento [vedi par. 5.2].

Con riferimento alla prima linea di attività è stata condotta una ricerca della letteratura scientifica cercando documenti di sintesi (revisioni sistematiche, lavori di HTA) dal 2011 al 2016, in lingua inglese, sui database Ebsco, Pubmed e The Cochrane Library, e Google per gli articoli su piattaforme Open Access, riguardanti gli aspetti economici collegati all'utilizzo della tecnologia Next Generation Sequencing (NGS) [ultimo accesso giugno 2016].

Il focus della ricerca è stato l'applicazione della metodica NGS a pazienti affetti da patologie neoplastiche con sequenziamento applicato all'analisi delle mutazioni costitutive e all'analisi delle mutazioni somatiche per uso diagnostico/predittivo nella pratica clinica.

Dall'analisi della letteratura sono risultati 22 studi potenzialmente includibili. A tali studi sono stati applicati i criteri di inclusione e, dopo la fase di lettura del "titolo" ed "abstract", sono risultati potenzialmente includibili 5 studi. Di questi 5 studi uno è stato eliminato, poichè non considerava la tecnologia oggetto di indagine del report [Westwood, 2014], con un numero totale di studi inclusi pari a quattro.

Il primo studio di Assasi N. et al [2012] ha condotto una revisione sistematica dei metodi e del reporting utilizzati nelle valutazioni economiche, all'interno di HTA report, riguardanti tecnologie di analisi genetica con l'obiettivo di fornire raccomandazioni per il miglioramento della qualità degli studi. Sono state quindi incluse tutte le valutazioni economiche contenute in HTA report, o pubblicate in riviste peer-reviewed, considerate parte dell'assessment insieme alla dimensione clinica. Per la valutazione della qualità degli studi gli autori hanno utilizzato lo strumento QHES, basato su 16 criteri di valutazione.

La revisione di Assasi N. ha individuato 361 citazioni risultanti dalla ricerca e, dopo la fase di screening per titolo ed abstract e di applicazione dei criteri di inclusione, solo 15 valutazioni economiche sono state incluse nella revisione, di cui 12 contenute in HTA report e 3 pubblicate in articoli di giornale.

Poiché non tutte le valutazioni economiche incluse nella revisione avevano ad oggetto come condizioni cliniche le neoplasie, sono stati identificati gli studi di nostro interesse dalla tabella di estrazione degli studi inclusi riportata nello studio [Tab.1]. Sono stati così identificati 4 studi potenzialmente includibili [Agency for Healthcare Research and Quality (2007); Medical Advisory Secretariat (2010); Medical Advisory Secretariat (2010b); Medical Advisory Secretariat (2010c)] e, dalla lettera del full text, è emerso che nessuno degli studi aveva valutato la tecnologia NGS e, per tale ragione, non sono stati inclusi nella nostra valutazione.
Il secondo studio incluso è un Rapid Response Report [2014] del CADTH. Scopo dello studio era indagare la costo-efficacia legata all'utilizzo della tecnologia NGS e le linee guida basate sull'evidenza per l'utilizzo della tecnologia nella pratica clinica.
La ricerca della letteratura è stata condotta dal CADTH da gennaio 2009 fino a gennaio 2014, in lingua Inglese, sui database Medline, PubMed, The Cochrane Library, CRD databases, Canadian, Agenzie di Health Technology oltre a ricerche condotte su internet (grey literature) e sono stati ricercati health technology assessment report, revisioni sistematiche, meta-analisi, linee guida e studi economici. I criteri di inclusione avevano come oggetto: popolazione affetta da cardiomiopatia o da cancro non ereditario sequenziata con tecnologia NGS (qualsiasi piattaforma) confrontata con altre procedure di sequenziamento o con nessun comparatore; disegni di studio includibili erano linee guida e/o raccomandazioni e studi di costo-efficacia. Dopo lo screening per titolo ed abstract e, successivamente, per full text la revisione ha incluso 5 studi, di cui tre riguardanti la costo-efficacia (un report di health technology assessment e due revisioni sistematiche) e due riguardanti le linee guida basate sulle evidenze.
Con riferimento alla costo-efficacia, il report di health technology assessment è stato condotto in UK e ha comparato l'uso del NGS con il metodo Sanger, la prima revisione è stata condotta in Germania e si è focalizzata principalmente sui costi associati al sequenziamento del genoma, non escludendo eventuali approcci con NGS, mentre la seconda revisione ha analizzato gli studi economici condotti sul cancro al seno ereditario in Inghilterra e Galles, revisione già emersa dalla nostra ricerca [vedi Sullivan W. et al 2012].

La tecnologia NGS era stata comparata con i metodi standard, ovvero il metodo di sequenziamento secondo Sanger e tecniche di analisi genetica come MLPA (MLPA- Multiple Ligation Probe Amplification).

In merito alle linee guida, selezionate ed incluse, una aveva ad oggetto linee guida procedurali in merito all'utilizzo della tecnologia NGS per la diagnosi dei disordini genetici, pubblicata in USA nel 2013, mentre la seconda, prodotta nel Regno Unito nel 2012, trattava di una sintesi delle iniziative dei partecipanti al meeting sulla buona pratica del NGS.

Considerando il solo punto di vista economico, gli autori hanno concluso, sulla base degli studi inclusi, che esiste una rilevante mancanza di RCT in merito alla costo-efficacia relativa all'utilizzo della tecnologia NGS e che i costi associati all'utilizzo NGS variano a seconda della metodologia utilizzata, dei geni investigati e del laboratorio che ha condotto l'analisi, inoltre, sono necessarie della conferme Sanger per validare i risultati in diagnostica. Inoltre è emerso che nel sequenziamento dell'intero genoma, il sequenziamento con metodo Sanger aveva un costo di circa 1.5 milioni di dollari americani. Il confronto tra sequenziamento Sanger e NGS non è definibile in quanto con NGS il costo può variare sensibilmente tra i laboratori e sembra che l'analisi delle varianti possa far aumentare i costi rispetto ai metodi riferimento. Da ciò gli autori hanno desunto che è molto difficile determinare il costo-efficacia della tecnologia NGS per la natura multiforme dell'interpretazione dei risultati e che non c'erano sufficienti evidenze per fornire analisi informate sul costo-efficacia del NGS.

Il terzo articolo incluso nella nostra valutazione è di Sullivan W. et al [2012], studio già presente nel Rapid Response Report precedentemente descritto. Scopo dello studio è stato identificare, sintetizzare e valutare criticamente le valutazioni economiche, attualmente disponibili, sui test genetici per la predisposizione al cancro del seno di tipo ereditario al fine di comprendere il livello attuale di evidenza economica a supporto delle linee guida inglesi. Uno scopo secondario è stato quello di valutare l'estensione correntemente utilizzata nei laboratori inglesi per testare le mutazioni BRCA 1/2, al fine di capire se tale tecnica è realmente inglobata nella pratica standard. Sono stati utilizzati due metodi: una survey, basata su interviste telefoniche, e la ricerca della letteratura scientifica. Dall'analisi della letteratura per gli autori non è stato possibile individuare, in quanto non riportata, la metodica utilizzata nell'effettuazione del test mentre con riferimento al risultato della survey è emerso che su un totale di 14 laboratori investigati, 9 utilizzavano il metodo Sanger, 1 laboratorio utilizzava l'elettroforesi capillare sensibile con conferma del sequenziamento Sanger, 2 utilizzavano il metodo NGS, anche se ancora solo diffuso nel settore della ricerca, e 2 laboratori utilizzavano il service per effettuare il test; è così risultato che il metodo prevalentemente utilizzato è il metodo Sanger ma il risultato dell'utilizzo di 2 laboratori su 14 della metodica NGS, anche se ancora solo diffusa nell'ambito della ricerca, ha spinto gli autori a concludere che l'analisi di costo-efficacia è stata limitata dalla mancanza di dati robusti pubblicati rendendo necessarie evidenze economiche riguardanti l'utilizzo di questa nuova tecnologia.

Ultimo studio incluso è il report del Green Park Collaborative [2015] in cui l'unico riferimento alla parte economica si trova nel capitolo sulla "Struttura politica del modello di copertura" in cui gli autori affermano che il "costo di analisi con NGS non eccede il costo individuale di sequenziamento dei geni targati attraverso altri metodi."

Si può così concludere che al momento l'impatto economico che potrebbe derivare dalla potenziale introduzione della tecnologia NGS all'interno dei sistemi sanitari regionali e, quindi, il suo utilizzo in sostituzione o parallelo alla metodica standard Sanger non può, sulla base delle evidenze ad oggi disponibili, ancora essere valutato poiché le variabili che intervengono nella definizione delle voci di costo, di ogni singola procedura, sono eterogenee e molteplici rendendo così necessaria la produzione di nuova evidenza.
Si sottolinea come nessun referto diagnostico che includa una mutazione o VUS può oggi essere rilasciato senza conferma Sanger e nessun test BRCA negativo in NGS può essere considerato concluso senza Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MPLA).

5.2 Analisi di contesto

Metodi

La seconda linea di attività, condotta dal gruppo di lavoro, si è basata sull'analisi di un questionario, costruito ad hoc, (vedi Allegato 2), finalizzato alla rilevazione di specifiche informazioni in determinati contesti regionali, selezionati sulla base dell'interesse manifestato dalle Regioni alla valutazione nelle fasi di segnalazione e prioritarizzazione delle tecnologie potenzialmente valutabili. Le Regioni coinvolte sono state Emilia-Romagna, Liguria, Lombardia e Veneto.

Il questionario ha indagato la parte relativa all"Uso corrente della tecnologia" (vedi paragrafo3) e agli "Aspetti economici". Il principale obiettivo dell'analisi economica è stato quello stimare il costo medio annuo per sequenziatore/piattaforma.
Il periodo di riferimento oggetto di indagine è relativo al biennio, 2014 e 2015, e alle Regioni è stato chiesto di fornire le informazioni dettagliate a livello locale (azienda sanitaria).
In particolare, è stato chiesto di indicare, per ogni struttura in cui è presente la tecnologia NGS, le seguenti voci di costi fissi e variabili:

- modalità di acquisizione della/e tecnologie (acquisto, noleggio, service) e rispettivo valore economico;
- costo di manutenzione;
- costo della struttura informatica;
- costo dei consumabili;
- costo controllo di qualità interno (CQI) per seduta e costo di partecipazione a programmi VEQ;
- costo del personale dedicato.

L'analisi è stata condotta analizzando ogni singolo ambito di indagine a livello aggregato; nel caso di dati non forniti o incompleti il dato non è stato considerato per l'analisi.

Risultati

Il questionario è stato inviato alle Regioni, tramite posta elettronica, nel Luglio 2016; l'ultimo questionario compilato è pervenuto nel Dicembre 2016. Il tasso di risposta a livello regionale, e a livello di dettaglio, ovvero azienda, è stato pari al 100%.

Rispetto all'orizzonte temporale richiesto nell'indagine (anni 2014 e 2015), è da specificare che in alcuni casi sono stati riportati dati relativi a tecnologie acquisite precedentemente (2010), ma in uso per gli anni di riferimento. Le strutture che hanno risposto sono state 32, distribuite nelle 4 Regioni oggetto di indagine, e sono state principalmente Aziende sanitarie territoriali e laboratori territoriali, Aziende Ospedaliere, Aziende Ospedaliere Universitarie, IRCCS e Case di cura, pubbliche e private accreditate.

La tecnologia NGS è risultata acquisita, negli anni dal 2010 al 2016, soprattutto nel 2014 e nel 2015, anno quest'ultimo in cui si è raggiunto il valore più alto di presenza di tecnologie nelle strutture sanitarie (31%), come riportato nel precedente capitolo 3, Analisi dell'uso corrente della tecnologia. (Tabella 7).

Tabella 7 - Numero tecnologie NGS presenti nelle strutture sanitarie rispondenti

Numero di tecnologie NGS presenti nelle strutture rispondenti							
2010	**2011**	**2012**	**2013**	**2014**	**2015**	**2016**	**Totale**
1	**3**	**7**	**9**	**16**	**17**	**1**	**54**

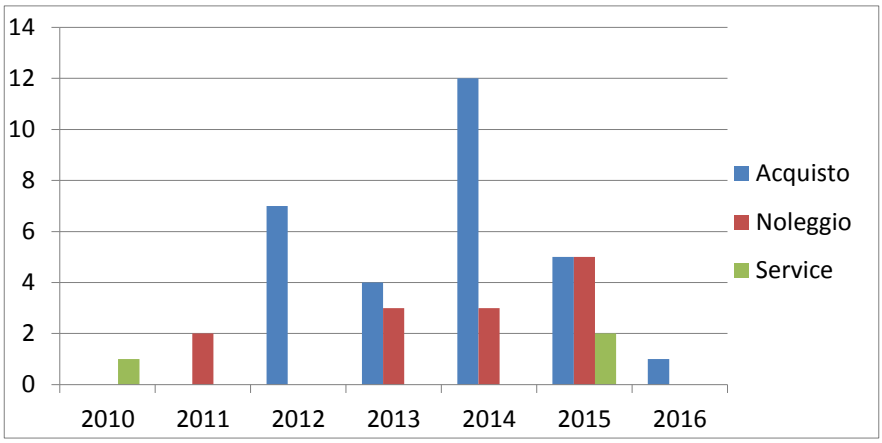
Modalità di acquisizione

Dall'analisi dei dati rilevati è emerso che la modalità di acquisizione maggiormente utilizzata, nel corso degli anni, è stata l'"Acquisto" (incluse le donazioni) nel 64% circa dei casi, il "Noleggio" nel 29% e, solo in pochissimi casi, il "Service" con il 7%, con un'attività prevalente soprattutto negli anni 2014 e 2015 (Tabella 8 e Grafico 1). Tali percentuali si riferiscono ad un numero di 45 sequenziatori, differente rispetto al totale censito nelle strutture rispondenti. Tale differenza deriva dal fatto che sono stati considerati solamente i dati forniti in maniera completa e coerente

Tabella 8 - Modalità di acquisizione tecnologia NGS negli anni 2010-2016

	Modalità di acquisizione NGS							
	2010	**2011**	**2012**	**2013**	**2014**	**2015**	**2016**	**Totale**
Acquisto	0	0	7	4	12	5	1	**29**
Noleggio	0	2	0	3	3	5	0	**13**
Service	1	0	0	0	0	2	0	**3**
Totale	1	2	7	7	15	12	1	**45**

Grafico 1 - Modalità di acquisizione tecnologia NGS negli anni 2010-2016



In merito al valore economico relativo alle diverse modalità di acquisizione delle tecnologie all'interno delle aziende sanitarie, ai fini del calcolo del costo medio di acquisizione è stata calcolata la media dei valori economici, per modalità di acquisizione (acquisto, noleggio o service) e per anno. L'analisi ha considerato solamente le informazioni risultate complete e coerenti escludendo i dati ritenuti incompleti, uguali a zero o non riportati. (Tabella 9).

Con riferimento all'Acquisto il risultato ha evidenziato come il costo medio di acquisto aumenta nel periodo 2014-2015, periodo in cui si registra un maggior numero di acquisizioni di sequenziatori all'interno delle strutture sanitarie, soprattutto in quelle a carattere scientifico e di ricerca, pubbliche e private accreditate; per il Noleggio si registra lo stesso andamento rilevato per l'Acquisto. In merito al Service i dati forniti, incompleti o con un grado di aggregazione dei costi non valutabile, e la modalità di erogazione (caratterizzata dall'esternalizzazione completa dell'attività) hanno determinato l'esclusione di tale modalità dall'analisi.

Per quanto riguarda i costi di Manutenzione, è stato calcolato il costo medio di manutenzione distinguendolo solo per modalità di acquisizione e non per anni, a causa di un numero elevato di dati mancanti. In particolare, per i sequenziatori in acquisto il costo medio annuo di manutenzione, per singolo sequenziatore, è risultato pari a €9.600; per il noleggio, il costo medio di manutenzione è risultato pari €9.910, calcolo basato su un numero di dati esiguo ed eterogeneo.

Tabella 9 - Costo medio unitario (€) relativo alle diverse modalità di acquisizione negli anni 2010-2016.

	Valore Economico modalità di acquisizione						
	2010	**2011**	**2012**	**2013**	**2014**	**2015**	**2016**
Acquisto	0	0	121.944	99.127	126.065	145.009	101.500
Noleggio	-	21.840	0	28.081	29.508	38.670	0

Con riferimento al costo della struttura informatica, i dati rilevati sono risultati esageratamente disomogenei. In particolare, i dati relativi ai sequenziatori in acquisto non sempre hanno riportato, quando trasmessi, il periodo temporale di riferimento risultando così non interpretabili e quindi non confrontabili. Si evidenzia una variabilità eccessiva e non coerente, con valori economici che vanno da €610 a €121.560 e, per tale ragione, il costo medio di struttura informatica non è stato calcolato. Lo stesso problema si è presentato nel caso del noleggio.

Consumabili

Ulteriore aspetto valutato ha riguardato l'utilizzo dei consumabili. In particolare, è stato richiesto alle Regioni, e quindi alle aziende sanitarie, di indicare la quantità di materiali di consumo, in termini di reagenti e test oncologici, e il loro relativo valore economico.

L'elevata eterogeneità e non completezza dei dati forniti, trasmessi o per singola unità o per valore economico complessivo non rapportato al volume di attività, non ha permesso di calcolare in maniera univoca il costo per test, o meglio un costo a referto, ma è stato possibile solamente indicare un valore economico minimo e massimo, con valori che oscillano tra €40 e €300 a campione.

Personale

In merito al personale è stato chiesto alle Regioni di indicare il numero di personale dedicato alle procedure con NGS, dettagliando per tipologia di professionista coinvolto, percentuale di tempo dedicato e relativo valore economico.

L'analisi è stata condotta su un campione di tre Regioni su quattro partecipanti, poiché per una Regione non è stato possibile estrarre i dati in quanto eterogenei e rapportati ad unità di misura differenti, e ha identificato i professionisti comuni a tutte le aziende, rilevando la percentuale di tempo dedicato e il valore economico relativo alla retribuzione media annua.

Le professionalità su cui è stato possibile effettuare un'analisi sono state: il Biologo, il Medico e il Tecnico di laboratorio. Nelle Tabelle 10 (A,B,C) è riportata la distribuzione di tempo dedicato, in percentuale, di ogni professionista, suddivisa per range percentuali, e il relativo valore economico medio di retribuzione annuo. Anche per tale analisi, come per le precedenti, sono state analizzate solo le voci che risultavano complete e coerenti.

Per il *Biologo* su un totale di 22 professionisti coinvolti, in diverse strutture sanitarie, la percentuale di tempo dedicato varia dal 5% al 100%, con un valore economico medio annuo che varia da €2.100 a €73.469. Rispetto al totale dei professionisti coinvolti l'analisi per distribuzione di frequenza è stata fatta su 9 professionisti.

Tabella 10 A - Numero di Biologi coinvolti nelle procedure NGS e relativo valore economico

	Quantità	1% - 25%	26% - 50%	51% - 75%	76% - 100%
Frequenza	9	2	4	0	3
Valore Economico annuo (€)		6.050	41.739	0	67.420

Per il *Medico* i professionisti dedicati sono risultati pari a 5, in diverse strutture sanitarie, e la percentuale di tempo dedicato è risultata variare dal 10% al 60% con un valore economico medio annuo che varia da €5.100 a €61.300.

Tabella 10 B - Numero di Medici coinvolti nelle procedure NGS e relativo valore economico

	Quantità	1% a 25%	26% - 50%	51% - 75%	76% - 100%
Frequenza	5	2	2	1	0
Valore Economico annuo (€)		5.100	44.674	61.300	0

Per la figura del *Tecnico di laboratorio* i professionisti sono risultati pari a 10 con una percentuale di tempo dedicato che varia dal 10% a 50% e un valore economico medio annuo rispettivamente di €13.700 e €15.000. L'analisi per frequenza è stata condotta su 6 unità.

Tabella 10C - Numero di Tecnici di laboratorio coinvolti nelle procedure NGS e relativo valore economico

	Quantità	1% a 25%	26% - 50%	51% - 75%	76% - 100%
Frequenza	6	1	5	0	0
Valore Economico annuo (€)		15.000	16.357	0	0

Valutazione di qualità interna ed esterna

Poiché la valutazione interna ed esterna di qualità è un requisito fondamentale necessario per i laboratori analisi è stato chiesto alle Regioni di indicare i costi che gravitano intorno a tale tipo di attività. E' stato chiesto di indicare per la Valutazione interna il costo per seduta mentre per la valutazione esterna (VEQ) il costo di partecipazione ai programmi (annuo). Anche in questo caso, il numero di dati trasmessi è stato limitato con alcuni casi in cui è stato indicato un valore economico pari a zero, poiché fornito in maniera gratuita, in altri casi in cui è stato riportato solo il valore quantitativo delle attività effettuate senza il relativo valore economico, in altri casi ancora è stato specificato che il costo e il numero delle valutazioni è strettamente correlato al numero di test eseguiti. Per tale ragione non è stato possibile individuare un costo medio di riferimento. Tale attività deve comunque essere considerata come una variabile importante e non trascurabile, da tenere in considerazione nel calcolo finale del costo medio annuo di utilizzo della tecnologia NGS.

In conclusione, nonostante l'elevata eterogeneità e non completezza dei dati raccolti, al fine di fornire un'informazione, seppur indicativa, della valorizzazione monetaria collegata all'utilizzo della

tecnologia, è stato stimato un costo medio annuo distinto a seconda della modalità di acquisizione (acquisto, noleggio), per gli anni dal 2011 al 2015, anni in cui si registra il numero prevalente di acquisizioni. Per la definizione di tale costo non è stata considerata la modalità di acquisizione mediante service.
La stima del costo medio annuo per tecnologia è stata calcolata sommando il costo medio per: acquisizione, manutenzione, personale, consumabili e valutazione interna ed esterna di qualità.
Per la modalità di "Acquisto" il costo medio di acquisizione è stato suddiviso per un numero di anni pari a 5, quale ammortamento ipotizzato, vista la natura evolutiva della tecnologia; il risultato è stato sommato alle altre variabili di costo precedentemente analizzate e, laddove non è stato possibile identificare una stima media di costo, sono stati considerati i valori minimi e massimi. In particolare, per la voce di costo relativa al "Personale coinvolto" (vedi Tabella 10 A,B,C), è stato considerato come valore minimo il valore corrispondente al 50% di tempo dedicato e come valore massimo il valore corrispondente al tempo dedicato tra il 51% e il 100% delle professionalità coinvolte, assumendo che il personale sia coinvolto contemporaneamente con la stessa percentuale di tempo dedicato.

Pertanto, la stima del costo medio annuo per tecnologia è risultata pari €68.908, considerando i costi variabili minimi, e pari a €88.858 considerando i costi variabili massimi; a questi costi devono essere aggiunti i costi variabili relativi ai consumabili, per i quali si passa da un costo minimo per test campione pari a €40 ad un massimo pari a € 300, rapportato alla quantità di test eseguiti e il costo della valutazione interna ed esterna di qualità, a seconda delle sedute effettuate, della tipologia di test eseguiti e al tipo di programmi a cui si aderisce (Tabella 11).

Anche per il Noleggio la stima del costo medio annuo per tecnologia è stata calcolata sommando il costo medio di acquisizione (canone annuale) ai costi fissi e variabili. Per quanto riguarda il personale è stata adottata la metodologia prima descritta per la modalità Acquisto. In merito alla voce Manutenzione è stata rilevata un'elevata eterogeneità dei valori economici trasmessi riconducibile, probabilmente, all'inclusione dei costi di manutenzione nel canone annuale. Per tale ragione è stato calcolato sia il costo medio della tecnologia comprensivo di manutenzione che privo di quest'ultimo. Inoltre alcuni contratti di noleggio includevano nel canone annuale anche il costo per consumabili.

La stima del costo medio annuo per la tecnologia NGS acquisita in modalità noleggio è risultata come di seguito:
- Stima costo medio di noleggio con costi di manutenzione separati dal contratto: valore minimo pari a €79.074 e valore massimo pari a €98.724.

- Stima costo medio di noleggio con costi di manutenzione inclusi nel contratto: valore minimo pari a €69.164 e valore massimo pari a €88.814.

A questo valore stimato vanno aggiunti i costi variabili legati ai consumabili, quando non inclusi nel contratto di noleggio, moltiplicati per la quantità utilizzata e i costi della valutazione interna ed esterna di qualità, come indicato nella modalità Acquisto (Tabelle 12 A e Tabella 12 B).

Tabella 11 - Stima costo medio annuo per tecnologia (acquisto)

ACQUISTO						
Costo medio di acquisizione annuo	Manutenzione	Personale 50% (min)	Personale 51% - 100% (max)	Consumabili	Valutazione esterna ed interna di qualità	Stima Costo medio annuo per tecnologia (€)
25.051	9.600	34.257	0	n.r.	n.r.	68.908
25.051	9.600	0	53.907	n.r.	n.r.	88.858

Tabella 12 A - Stima costo medio annuo per tecnologia (noleggio) con costi di manutenzione

NOLEGGIO						
Costo medio di acquisizione annuo	Manutenzione	Personale 50% (min)	Personale 51% - 100% (max)	Consumabili	Valutazione esterna ed interna di qualità	Stima Costo medio annuo per tecnologia (€)
34.907	9.910	34.257	0	n.r.	n.r.	79.074
34.907	9.910	0	53.907	n.r.	n.r.	98.724

Tabella 12 B - Stima costo medio annuo per tecnologia (noleggio) senza costi di manutenzione

NOLEGGIO						
Costo medio di acquisizione annuo	Manutenzione	Personale 50% (min)	Personale 51% - 100% (max)	Consumabili	Valutazione esterna ed interna di qualità	Stima Costo medio annuo per tecnologia (€)
34.907	0	34.257	0	n.r.	n.r.	69.164
34.907	0	0	53.907	n.r.	n.r.	88.814

Con riferimento al valore di rimborso regionale solo una Regione ha identificato uno specifico codice per tale prestazione, denominata "Analisi di sequenze geniche mediante Next Generation Sequencing (NGS) e tecniche assimilabili", e identificando una tariffa pari a € 2.072 circa a prestazione, specificando il numero di blocchi.

Al momento della stesura del presente documento non è ancora pubblicato il decreto di aggiornamento dei LEA e delle tariffe delle prestazioni specialistiche.

Il Decreto 9 dicembre 2015, avente ad oggetto "Condizioni di erogabilità e indicazioni di appropriatezza prescrittiva delle prestazioni di assistenza ambulatoriale erogabili nell'ambito del

Servizio sanitario nazionale" (GU n. 15 del 20.01.2016), aveva già disposto una riorganizzazione della diagnostica di laboratorio pertinente la genetica medica per indicazioni cliniche (vedi allegato 2, colonna A). Nell'allegato 1 del decreto sono citate le tecnologie di indagine genetica, e in particolare l'analisi di segmenti di DNA mediante sequenziamento (91.30.3, che corrisponde al sequenziamento Sanger), con l'indicazione che in caso di utilizzo per analisi di farmacogenetica se ne raccomanda l'uso solo su indicazioni EMA/AIFA. L'allegato 2 riporta le patologie e le condizioni oncoematologiche per le quali l'indagine genetica e/o citogenetica è indicata per confermare la diagnosi e/o definire la prognosi, a seguito di indagini (biochimiche, ematologiche, morfologiche) e su prescrizione specialistica. L'analisi NGS non viene specificamente normata.

Conclusioni

Al fine di valutare l'impatto economico derivante dall'introduzione o utilizzo della tecnologia NGS, in determinati contesti regionali, è stata condotta una survey nelle aziende sanitarie delle quattro Regioni oggetto di indagine, con l'obiettivo di determinare un costo medio annuo della tecnologia NGS in ambito oncologico. L'indagine ha evidenziato una presenza più diffusa della tecnologia nelle aziende ospedaliere e negli istituti a carattere scientifico e di ricerca, un utilizzo in diversi campi di applicazione e una evidente variabilità dei costi. Tale variabilità, insieme ad una eccessiva eterogeneità dei dati raccolti, ha costretto ad un'analisi caratterizzata da alcuni limiti che hanno richiesto la formulazione di ipotesi per alcune voci di costo. In particolare, per quanto riguarda il personale, al fine di rendere i costi confrontabili, ci si è riferiti alle figure professionali più ricorrenti nelle realtà analizzate ipotizzando un impiego delle risorse univoco (in termini di professioni coinvolte e tempo dedicato); in merito ai consumabili, l'eccessiva eterogeneità dei dati non ha consentito una stima di costo medio; con riferimento alle modalità di acquisizione, è stata esclusa dall'analisi la modalità in service, poiché riguardava una esternalizzazione totale dell'attività.

E' importante specificare, con riferimento a quest'ultimo aspetto, che circa il 50% delle prestazioni oncologiche, erogate nel 2015, erano oggetto di esternalizzazione dell'attività (service), come risulta dall'analisi relativa all'uso corrente della tecnologia (vedi par. 3); l'esclusione della modalità di acquisizione in service ha determinato una decurtazione delle prestazioni oncologiche (che rappresentavano il 26% circa del totale delle prestazioni) rendendo la percentuale di quest'ultime particolarmente esigua. Alla luce di ciò è stato così determinato il costo medio annuo relativo alla tecnologia per tutti i campi di applicazione e non solo per quello oncologico.

I limiti sopra elencati trovano conferma da quanto emerso dalla letteratura analizzata da cui è risultato che le variabili che intervengono nella definizione delle voci di costo, di ogni singola procedura, sono eterogenee e molteplici rendendo così necessaria la produzione di nuova evidenza [par. 5.1].

Alla luce dei limiti esposti l'analisi ha evidenziato una situazione pressoché sovrapponibile nelle situazioni descritte, ovvero in caso di acquisizione mediante acquisto o mediante noleggio, rilevando un costo medio annuo pressoché simile con costi variabili che giocano un ruolo determinante nel calcolo finale del costo medio annuo.

6. Impatto organizzativo

Al fine di analizzare l'impatto organizzativo relativo all'uso della tecnologia NGS all'interno dei sistemi sanitari regionali sono stati sintetizzati i punti salienti delle principali norme che regolano l'organizzazione dei laboratori di analisi, a livello nazionale e regionale, e gli atti, laddove esistenti, che regolamentano le branche specialistiche di riferimento per inquadrare lo schema normativo che disciplina tali attività e, successivamente, identificare i modelli organizzativi adottati nelle diverse realtà regionali.

Normativa nazionale relativa ai laboratori di analisi

Partendo dal livello nazionale i primi riferimenti normativi in tema di organizzazione della rete di diagnostica di laboratorio si hanno con la L. 27 dicembre 2006, n. 296, lettera o), comma 796, art.1 (Legge finanziaria 2007). Tale legge impone, per tutte le Regioni, la predisposizione di un Piano di riorganizzazione della rete delle strutture pubbliche e private accreditate, eroganti prestazioni specialistiche e di diagnostica di laboratorio, al fine dell'adeguamento degli standard organizzativi e di personale coerenti con i processi di incremento dell'efficienza resi possibili dalla disponibilità di sistemi analitici ad alta automazione ed informatizzazione. Tale atto normativo impone sostanzialmente un processo di riorganizzazione della rete laboratoristica regionale, pubblica e privata, per la razionalizzazione e l'efficientamento delle risorse garantendo la qualità delle prestazioni erogate.

Nel 2009, facendo seguito a quanto stabilito dalla L. 296/2006, viene redatto un documento di indirizzo, a cura delle più rappresentative Società Scientifiche della diagnostica di laboratorio e con il coordinamento di Agenas, denominato "Linee di indirizzo per la riorganizzazione dei Servizi di medicina di laboratorio nel Servizio Sanitario Nazionale", con lo scopo di proporre soluzioni in grado di garantire la qualità dei servizi di diagnostica, evitando processi di riorganizzazione fondati solo su considerazioni di carattere economico e senza tenere in considerazione le indicazioni tecnico-professionali.

Gli obiettivi delle Linee di Indirizzo erano: orientare le iniziative regionali nella definizione del percorso di riorganizzazione delle attività di laboratorio, garantendo la perfetta sinergia tra pubblico e privato, nell'ottica di un servizio effettivamente centrato sul paziente e sui reali bisogni di salute; definire i requisiti essenziali, le tipologie di servizi erogati, gli indicatori di qualità ed efficienza, in rapporto anche alle aree specialistico-disciplinari, ed i criteri di funzionamento delle reti di laboratorio a livello sia locale che regionale e, per quanto attiene le strutture di riferimento, interregionale e/o nazionale; predisporre criteri qualitativi, di efficienza e di efficacia, per il monitoraggio a livello centrale dei "Piani regionali di riorganizzazione".

Successivamente è l'Accordo Stato-Regioni del 23 marzo 2011, avente ad oggetto i "Criteri per la riorganizzazione delle reti di offerta di diagnostica di laboratorio", a fornire un supporto alle Regioni indicando i criteri che devono essere seguiti per la predisposizione ed implementazione dei Piani di riorganizzazione delle reti laboratoristiche a livello regionale. L'Accordo, tenendo conto di quanto definito dalle Linee di indirizzo e al fine di garantire la qualità e l'appropriatezza delle prestazioni erogate incrementando l'efficienza delle strutture e l'uso ottimale delle risorse pubbliche, approva i criteri per la riorganizzazione delle reti di offerta di diagnostica di laboratorio, nel rispetto dell'autonomia delle singole Regioni che hanno già dato avvio ad un processo di riorganizzazione, applicando i criteri a seconda delle specifiche realtà regionali.
I criteri sostanzialmente puntano alla creazione di un sistema di governance basato sulla creazione di reti fra strutture, pubbliche e private, in grado di rispondere in maniera coerente ai bisogni clinici dei cittadini, in regime di ricovero ed ambulatoriale, garantendo la qualità delle prestazioni.

Focalizzando l'attenzione sulle branche specialistiche che costituiscono le potenziali aree di applicazione della tecnologia NGS, oggetto della nostra indagine, sono state analizzate le regolamentazioni nazionali emanate sulla Genetica Medica, l'Anatomia Patologia e la Citogenetica.

In particolare, con riferimento alla Genetica Medica la disciplina è contemplata nel DM 29/1/1992, avente ad oggetto l' "Elenco delle alte specialità e fissazione dei requisiti necessari alle strutture sanitarie per l'esercizio delle attività di alta specialità", ma sono l'Accordo Stato-Regioni del 15/7/2004, recante "Linee Guida per le attività di genetica medica", ed il successivo Accordo del 26/11/2009, di "Attuazione delle linee guida per le attività di genetica medica", a costituire i principali atti disciplinanti tali attività. In particolare, tali accordi stabiliscono e definiscono la tipologia di prestazione sotto il profilo clinico e nelle diverse correlazioni di diagnostica di laboratorio di specialità.

Le Linee guida del 2004 hanno avuto l'obiettivo di individuare appropriate modalità operative nel rispetto dell'Accordo Stato-Regioni dell'8 Agosto 2001 e l'Allegato A), considerato parte integrante del documento, assolve ad una funzione di razionalizzazione dell'attività di genetica medica nell'ambito del Servizio Sanitario Nazionale, ferma restando l'autonomia delle singole Regioni che invece attiene ai modelli organizzativi più consoni alle realtà territoriali. L'Accordo definisce le malattie genetiche ed i test genetici con le relative applicazioni e fornisce definizioni in merito alle strutture di genetica medica, ovvero le strutture dedicate a tale tipologia di attività, indicandone caratteristiche e ruoli, distinguendo tra strutture cliniche e laboratori di genetica medica. Dal punto di vista organizzativo l'Accordo contiene sia i "Criteri per l'organizzazione delle strutture di genetica medica", ovvero indica i parametri organizzativi, quali il bacino di utenza regionale per il quale

riporta i parametri minimi europei pari a 2.500.000–3.000.000 abitanti, la natura specialistica delle attività, il coordinamento regionale delle strutture dedicate a tale tipologia di analisi, sia i "Criteri per lo svolgimento delle attività sanitarie di genetica medica da parte delle strutture pubbliche e private", indicando l'integrazione della rete delle strutture di genetica medica, sulla base della programmazione regionale, con altre reti di livello regionale, il personale che deve operare all'interno delle strutture dedicate, specificando che il personale sanitario laureato che opera in tali strutture deve essere specialista in genetica medica o possedere i requisiti equipollenti secondo la normativa vigente. L'Accordo, inoltre, fa riferimento all'attività di "Consulenza Genetica" intesa come un complesso processo di comunicazione, con diverse tipologie che ne condizionano l'organizzazione e le modalità di esecuzione che può richiedere la partecipazione di più figure professionali a seconda delle competenze. Obiettivo della consulenza genetica è quello di aiutare la persona ed i suoi familiari a comprendere le informazioni mediche (diagnosi, decorso della malattia e interventi preventivi, terapeutici e assistenziali), a comprendere la componente genetica e il rischio di trasmissione, le opzioni disponibili nell'affrontare il rischio della malattia, ed affrontare le scelte più appropriate e a realizzare il miglior adattamento alla malattia.

Successivamente con il DM 8 maggio 2007 viene istituita la "Commissione per la Genetica nel SSN" con lo scopo principale di dare attuazione alle linee guida approvate con l'Accordo del 15 luglio 2004; tale Commissione aveva inoltre la finalità di fissare i criteri per la certificazione e l'accreditamento istituzionale delle Strutture di Genetica Medica, procedere alla definizione delle attività di Genetica Medica fornendo idonee indicazioni sull'utilizzo di test genetici e determinando le forme di collegamento con la rete delle malattie rare, procedere alla definizione di indicatori e alla valutazione del "commissioning" nonché alla più globale valutazione economica delle attività di Genetica Medica, procedere a fissare le regole sulla pubblicizzazione e sulla promozione di test genetici e sulla consulenza genetica, nonché procedere alla divulgazione di raccomandazioni basate sull'evidenza scientifica in tema di Genetica Medica.
All'interno del documento redatto dalla suddetta Commissione è specificato che tra gli elementi caratterizzanti assume importanza l'organizzazione territoriale; nello specifico è indicato che, al fine di acquisire e mantenere sufficiente esperienza e competenza e di migliorare l'uso delle risorse, è necessario eseguire un adeguato numero di esami. È così suggerito che il bacino di utenza delle Strutture di Genetica Clinica non sia inferiore a 1.000.000 abitanti, quello dei Laboratori di Citogenetica tra 500.000 e 1.000.000, quello dei Laboratori di citogenetica molecolare non inferiore ai 3.000.000 abitanti, quello dei Laboratori di Immunogenetica non inferiore a 1.000.000 abitanti. Per le patologie il cui bacino di utenza deve essere interregionale e nazionale è auspicabile che la programmazione regionale sia coerente con quella nazionale.

Secondo la Commissione assumono anche particolare importanza i Criteri per la certificazione e l'accreditamento delle strutture di Genetica Medica, tanto che partendo dalla necessità di sviluppare la cultura della qualità e della valutazione è stato finanziato dall'Unione europea un Network di eccellenza (EuroGenetest) per strutturare, armonizzare e migliorare la qualità delle prestazioni di genetica medica. Tale network pone molta attenzione agli aspetti organizzativi legati all'erogazione dei test genetici promuovendo la certificazione delle strutture eroganti.

In Italia già nel 1998, le Linee Guida sui test genetici del Consiglio Nazionale per la Biosicurezza e le Biotecnologie, avevano regolamentato i requisiti richiesti ai laboratori che intendono eseguire test genetici; in particolare, nella definizione dei laboratori era indicato che i Laboratori di Genetica sono finalizzati a svolgere indagini specifiche (citogenetica, genetica molecolare, biochimica, ecc.) per l'identificazione delle malattie su base genetica e possono essere integrati in organizzazione di tipo dipartimentale. E' indicato che tali laboratori abbiano un bacino di utenza regionale o sovra regionale. Sono laboratori specialistici riconosciuti a livello legislativo nazionale (prima dal D.P.C.M. del 10/2/1984 e poi dal D.P.R. del 14/1/1997) e presenti in tutto il territorio nazionale. Nei requisiti del laboratorio che esegue i test genetici è specificato che i laboratori che eseguono i test genetici devono essere assoggettati ad un programma di accreditamento specifico.

L'Accordo del 2009, di attuazione delle Linee Guida del 2004, anche sulla base di quanto stabilito dal DM 8 maggio 2007, rimarcando l'importanza dei test genetici quale strumento diagnostico conviene su una serie di punti che mirano a monitorare tale attività, a valutare gli effetti, attraverso indicatori predefiniti, che la stessa può generare e ad avviare una programmazione delle attività di genetica su una distribuzione territoriale ottimale definita, in modo tale che la casistica si possa concentrare presso strutture e operatori che garantiscono un volume di attività associato ad un costante aggiornamento delle conoscenze e delle tecnologie. Lo stesso prevede, inoltre, procedure di accreditamento per le strutture che erogano prestazioni di genetica medica e l'integrazione della genetica medica con le reti di assistenza attive nel territorio regionale ed interregionale, ponendo un'attenzione particolare alle malattie rare, all'area materno-infantile e alle patologie oncologiche.

Nel 2010 il Comitato Nazionale per la Bioetica ha redatto un documento avente ad oggetto i "Test genetici di Suscettibilità e Medicina Personalizzata" che focalizza l'attenzione sull'utilizzo dei test genetici, sugli aspetti dell'impiego clinico degli stessi e relative norme di buona pratica clinica, la loro commercializzazione e gli aspetti etico-giuridici e bioetici.
È inoltre specificato che sono individuati alcuni standard, ulteriori rispetto a quelli definiti dalla normativa vigente, cui il laboratorio che esegue test genetici deve aderire al fine di garantire

accuratezza nell'esecuzione dei test in base alle metodologie ed ai reagenti attualmente a disposizione. In particolare, il laboratorio deve operare sulla base di standard di qualità che rappresentano requisiti minimi richiesti per l'autorizzazione ad operare. E' previsto che i laboratori devono essere inoltre accreditati secondo la UNI EN ISO 15189:2013 avente ad oggetto "Laboratori medici – Requisiti riguardanti la qualità e competenza" transitando dalla norma UNI EN ISO 15189:2007.

Infine, le "Linee di indirizzo sulla genomica in sanità pubblica" (recepite con Intesa Stato-Regioni del 13 marzo 2013) a partire dalla prescrizione del Piano nazionale della Prevenzione 2010-12 (PNP) hanno lo scopo di fornire indirizzi generali che consentano il governo di questa tematica, fortemente innovativa e strategica per il futuro del SSN, in modo sistematico e organico in un'ottica di public health genomics, non solo limitata alla prevenzione ma anche valorizzando il coinvolgimento degli altri settori del sistema sanitario interessati.

Con riferimento alla Citogenetica [SIGU 2007] la disciplina è accorpata alla Genetica Medica e il DM 70 del 02.04.2015 "Regolamento recante definizione degli standard qualitativi, strutturali, tecnologici e quantitativi relativi all'assistenza ospedaliera" al punto 7 fa riferimento agli "Standard specifici per l'alta specialità" e conferma gli standard previsti dal DM del 1992 in attesa di formulazione e definizione di indirizzi di aggiornamento.
Con riferimento all'Anatomia Patologica le Linee Guida del Ministero della Salute del maggio 2015 forniscono indicazioni in merito alla tracciabilità, raccolta, trasporto, conservazione e archiviazione di cellule e tessuti per indagini diagnostiche, ma non si esprimono in termini organizzativi.

Normativa regionale relativa ai laboratori di analisi

A livello regionale si è proceduto, come per la parte relativa alla normativa nazionale, a sintetizzare gli atti normativi più importanti emanati, in materia di diagnostica di laboratorio, dalle Regioni partecipanti all'indagine (Emilia-Romagna, Liguria, Lombardia, Veneto) utilizzando anche la survey condotta a livello regionale. Come precedentemente indicato, la riorganizzazione della rete di diagnostica di laboratorio è stata disciplinata a livello nazionale con la Legge 296 del 27.12.2006; alcune Regioni hanno recepito tale norma e dato avvio ad un processo riorganizzativo, altre, invece, hanno proseguito quanto già cominciato sulla scorta di quanto stabilito dalla Legge del 2006 e nel tempo hanno, considerate le norme che si sono susseguite in merito, migliorato la propria riorganizzazione rispettando i parametri dettati dal legislatore.
Di seguito è riportata una sintesi delle principali norme regionali riguardanti la riorganizzazione della rete di diagnostica di laboratorio e, nello specifico, sulle branche specialistiche di riferimento della tecnologia NGS con l'obiettivo di illustrare quelle che possono essere le caratteristiche

organizzative di ciascuna Regione; sono state così raccolte e sintetizzate le informazioni derivanti sia dagli atti normativi indicati nel questionario che da altri riferimenti normativi ricercati da varie fonti.

Regione Emilia-Romagna

La Regione Emilia-Romagna ha avviato e messo in atto, con DGR 2175/2007, quanto richiesto dalla Legge 27 dicembre 2006, n. 296. Nel corso degli anni la Regione ha individuato i modelli organizzativi della rete hub & spoke approvando le linee organizzative ed operative per la definizione degli assetti di attività di livello regionale; ha provveduto ad approvare linee guida per diverse aree di attività e, in particolare, per le funzioni di "diagnostica di laboratorio ad elevata complessità" e di "genetica medica" che sono state configurate quali attività aventi rilevanza regionale e, quindi, inserite a tutti gli effetti nell'elenco delle funzioni afferenti al modello "hub and spoke". Con riferimento alle attività ad alta complessità ha definito una specifica rete per i Servizi clinici di Genetica medica, per i laboratori di Citogenetica, di Genetica molecolare e di Genetica oncologica, recepita con una apposita delibera regionale. Con riferimento alla Genetica medica la Regione ha disciplinato "La rete di Genetica Medica in Emilia-Romagna"; in particolare, la rete è costituita dai Servizi di genetica clinica e dai laboratori di genetica, in relazione tra loro secondo il modello organizzativo utilizzato in tutto nel servizio sanitario regionale per le alte specialità, ovvero il modello Hub & Spoke, e secondo il modello operativo caratterizzato da lavoro in équipe di cui fanno parte i genetisti medici, genetisti biologi, infermieri, tecnici di laboratorio, psicologi e psichiatri oltre al personale amministrativo e di supporto. Il modello in rete ideato cerca di assicurare l'adozione di percorsi di diagnosi e di assistenza di qualità, appropriati e aderenti ai principi della medicina basata sull'evidenza e alle linee guida scientifiche, la corretta informazione a pazienti e familiari in ogni momento del percorso di consulenza genetica (pre e post test), l'equità nelle condizioni di accesso e di fruizione dei servizi. È specificato che le strutture che fanno parte della rete devono essere accreditate.

Le attività di genetica medica vengono coordinate da un Nucleo regionale di coordinamento che ne definisce i piani di attività, coordina e monitora i servizi erogati; il Nucleo effettua una valutazione annuale delle attività svolte all'interno della Rete, diffonde i risultati alla Regione, alle aziende sanitarie e alle Associazioni di utenti con l'obiettivo del miglioramento continuo dei servizi e delle prestazioni offerte. La Rete è impegnata nelle attività di "Ricerca teorica", indirizzata all'applicazione delle nuove conoscenze alla pratica clinica, di "Formazione" al personale e di "Attività epidemiologica" al fine di individuare le strategie migliori per la prevenzione dei rischi genetici tra la popolazione. Risulta in vigore la DGR 220/2011 relativa alla rete Hub& Spoke per il rischio eredo-familiare carcinoma mammella- ovaio, così come il relativo percorso diagnostico, la

cui ultima versione è dell'ottobre 2016 e che comprende anche l'indicazione dei laboratori che eseguono il test BRCA1/2, tutti attualmente mediante NGS.

La DGR 1299/2014 ha aggiornato il nomenclatore delle prestazioni di assistenza specialistica ambulatoriale relativamente ai nuovi inserimenti dei test di genetica medica eseguiti nella regione Emilia-Romagna ed alla revisione delle tariffe di cui alla DGR 1980/2012. Con riferimento ad eventuali atti normativi relativi all'introduzione della tecnologia NGS nel sistema regionale nessun atto programmatorio è stato ad oggi emanato.

Regione Liguria

La regione Liguria, con riferimento alla riorganizzazione della medicina di laboratorio, ha recepito l'Accordo Stato-Regioni del 2011 con delibera n.617 del 2012 avente ad oggetto i processi di razionalizzazione nell'ambito della rete regionale dei laboratori pubblici. Precedenti delibere nel 2007 avevano regolamentato la riorganizzazione della rete delle strutture pubbliche sulla base di un Piano di fattibilità ma l'obiettivo della Regione è stato nel tempo quello di integrare fortemente la rete pubblica con la rete delle strutture di diagnostica di laboratorio private accreditate. Sono stati così emanati atti normativi volti a regolamentare il processo di razionalizzazione e riorganizzazione della rete di diagnostica di laboratorio privata accreditata con la finalità dell'integrazione con il pubblico al fine di fornire un servizio flessibile e di alta qualità al cittadino. Con delibera 1112/2014 la Regione ha redatto il Piano triennale per la riorganizzazione e razionalizzazione della rete delle strutture private accreditate di diagnostica di laboratorio, approvato con successiva Determina e monitorato nello stato di avanzamento con Determinazione del Commissario Straordinario n. 42/2016.

Con riferimento agli atti normativi relativi all'introduzione della tecnologia NGS nel sistema regionale, nessun atto programmatorio è stato ad oggi adottato; la Regione ha dichiarato che è in previsione un documento della Rete Ligure HTA, sul modello di quello già realizzato per altre apparecchiature, che verrà realizzato quando sarà disponibile il report HTA di Agenas.

Regione Lombardia

La regione Lombardia con Delibera di Giunta Regionale n. VIII/4239 del 28.2.2007 ha dato attuazione a quanto disposto dal comma 796, dell'art. 1 della L. 27 dicembre 2006 n. 296 in merito al processo di riorganizzazione della medicina di laboratorio e, successivamente, ha regolamentato le azioni volte al consolidamento delle strutture eroganti prestazioni di diagnostica di laboratorio. Il consolidamento ha avuto come principale obiettivo la garanzia dei tempi di risposta delle analisi urgenti e la regolamentazione di quelle non urgenti e possibilmente trasportabili. È stata creata quindi una rete distinta per specializzazione che tenesse conto degli obiettivi di programmazione. In quest'ottica di consolidamento le aziende sono state invitate a mettere in atto progetti destinati

a tal fine e quindi a garantire qualità e una risposta rapida riducendo così il ricorso all'istituto del service. Successivamente sono state emanate norme relative al consolidamento di determinate branche tra cui la Genetica Medica, l'Anatomia Patologica e l'Immunoematologia e, nel 2015, è stato approvato un progetto di riordino dei laboratori pubblici per la città di Milano per le branche di Biochimica, Microbiologia ed Ematologia secondo il modello di rete Hub & Spoke. Con riferimento ad eventuali atti programmatori relativi all'introduzione della tecnologia NGS nel contesto regionale nessun atto specifico è stato emanato anche se la Regione ha regolamentato l'utilizzo della tecnologia NGS nella delibera di aggiornamento del nomenclatore tariffario (DGR 17/10/2014, n. 10/2512).

Regione Veneto

Con riferimento alla riorganizzazione della rete laboratoristica, la Regione Veneto con DGR n. 4052 dell'11 dicembre 2007 ha recepito l'indirizzo contenuto nella Legge 296/2006. In particolare, sono stati definiti i modelli organizzativi in rete per i laboratori privati accreditati, distinguendoli in Modello A), che prevede la concentrazione della fase analitica presso uno dei laboratori partecipanti alla rete (laboratorio di service) il quale potrà dislocare gli spazi in una sede distinta, e Modello B), che prevede la concentrazione della fase analitica presso una struttura dedicata (laboratorio service) con propria direzione responsabile, distinta da ciascun laboratorio partecipante alla rete. Tale struttura non può essere aperta al pubblico. Nel 2013, con DGR n. 1131, viene recepita l'Intesa per la revisione della normativa dell'accreditamento adottata in sede di Conferenza Stato Regioni il 20.12.2012 e, nel 2014 con DGR 524, sono state approvate le linee guida sull' accreditamento per lo sviluppo della Medicina di Laboratorio, che tengono conto della significativa evoluzione di tale specialità e della relativa necessità di monitoraggio continuo prevedendo, peraltro, la costituzione di un Tavolo di Monitoraggio con il compito di coordinare, sulla base dei criteri generali descritti dalle citate linee guida, la elaborazione dei nuovi requisiti di accreditamento per la Medicina di Laboratorio e di identificare le modalità più opportune per assicurare il monitoraggio continuo della qualità. Con riferimento alle branche specialistiche la Regione in merito all'Anatomia Patologica ha voluto istituire ed attivare (D.G.R. n. 249 del 03 marzo 2015), in forma sperimentale, un dipartimento strutturale interaziendale di Anatomia patologica tra diverse aziende sanitarie della Regione.

Con riferimento alla Genetica medica nel 2014 la Regione con DGR n. 984 ha definito le regole ed i criteri per l'erogazione delle prestazioni di genetica medica, in applicazione della DGR 846 del 4 giugno 2013, con la quale la Giunta Regionale aveva recepito l'Intesa adottata ai sensi dell'art. 8, comma 6, della Legge 5 giugno 2003 n. 131, tra il Governo, le Regioni e le provincie Autonome di Trento e di Bolzano sul documento recante "Linee di indirizzo sulla genomica in sanità pubblica".

Con riferimento ad eventuali atti normativi che disciplinano l'utilizzo della tecnologia NGS la Regione Veneto non ha indicato nessuna norma emanata, anche se questa Regione ha previsto l'utilizzo della tecnologia NGS nel Catalogo Veneto del Prescrivibile (CVP) (Circolare Regionale 26.09.2014, Circolare Regionale 30.03.2015, Circolare Regionale 28.07.2015).

In sintesi, gli aspetti organizzativi dell'utilizzo della tecnologia in esame sono prevalentemente connessi ad aspetti di tipo strutturale e di qualificazione del personale dedicato all'esecuzione dei test, non diversi da quelli considerati in generale per i laboratori afferenti alle reti per la diagnostica di laboratorio, e in particolare per i laboratori di genetica medica. L'impatto organizzativo è quindi dipendente dal ruolo affidato ai laboratori che utilizzano la tecnologia rispetto agli altri, anche della medesima specialità, nell'ambito della rete regionale.

7. Implicazioni etiche

L'analisi relativa alle implicazioni etiche dell'utilizzo dell'NGS in ambito clinico-oncologico intende evidenziare quali informazioni si generino tramite l'utilizzo di tale tecnologia, quali siano le informazioni che è importante dare al paziente evidenziando danni/benefici potenziali, limiti e potenzialità e quali modalità/procedure permettono di comunicare al meglio ed informare esaustivamente il soggetto che si sottopone al test.

Metodo

E' stata condotta una ricerca della letteratura rilevante su NGS ed implicazioni etiche del suo utilizzo. Per reperire il materiale si sono consultati database di letteratura medico scientifica, ricerca manuale e consultazione di motori di ricerca generali, con l'obiettivo di individuare letteratura secondaria e/o di sintesi (revisioni sistematiche) sul tema.

Risultati

Sono stati ricercati prioritariamente studi di sintesi recenti e rilevanti per il tema in analisi. Di seguito si riporta una sintesi dei principali contenuti esaminati nella selezione di articoli individuata (vedi bibliografia).

Tipi di informazioni generate dal sequenziamento

In generale il sequenziamento fornisce una mole di informazioni/dati genetici molto ampia e relativa allo stato di salute attuale e futuro non solo del paziente, ma anche dei suoi familiari e della sua progenie. Il sequenziamento di nuova generazione permette l'esame di porzioni di

genoma ancora più ampie rispetto alle tecniche di sequenziamento meno recenti. Ciò porta ad un ulteriore aumento di informazioni che fa emergere problematiche etiche ancora più pressanti riguardo al consenso, alla riservatezza dei dati e alle modalità e contenuti della comunicazione pre test al paziente e suoi familiari. La Società Italiana di Genetica Umana indica, infatti, tre categorie principali di varianti di sequenza, osservate con analisi NGS (SIGU, 2016).

Varianti causative. Sono quelle varianti alle quali è possibile attribuire con certezza un ruolo patogenetico.
Varianti responsabili di fenotipi non collegati al quesito clinico. La definizione più usata per designare questa classe di varianti è "risultati incidentali" (Incidental Findings; IF). Ogni individuo è infatti portatore di un numero di varianti genetiche associabili a potenziali conseguenze cliniche.
Varianti di sequenza con effetti funzionali e clinici non definiti (varianti di significato incerto; VUS).

I risultati incidentali e quelli di significato sconosciuto sono le tipologie informative che sollevano la maggior parte delle questioni etiche da considerare, potendo generare difficoltà nella gestione clinica del paziente e nella strutturazione della consulenza genetica.

Il contenuto della comunicazione al paziente: le informazioni da fornire

Rispetto al contenuto della comunicazione, Ayuso e colleghi hanno condotto una revisione sistematica delle letteratura e di materiale pubblicato da società scientifiche, con l'obiettivo di capire quale sia l'insieme di informazioni da fornire ai pazienti ai fini del consenso informato, e quali siano gli aspetti più importanti del processo di comunicazione delle caratteristiche del sequenziamento (Ayuso, 2013).
La ricerca di letteratura effettuata dagli autori su Pubmed, Embase, Medline and Cochrane Library ha permesso il reperimento di 554 record sull'argomento pubblicati tra il 2006 e 2012 e la selezione, in base a criteri espliciti, di 14 di essi per la revisione. Per i documenti pubblicati da società scientifiche/istituzioni salute sono stati individuati 7 report pubblicati tra 2007 e il 2012. Nel complesso la maggior parte del materiale è stata pubblicata tra 2011 e il 2012. Gli autori hanno, inoltre, analizzato diversi tipi Moduli per il Consenso Informato, utilizzati con i pazienti che si sottopongono a sequenziamento in ambito clinico. A partire da tali moduli hanno elaborato una prima lista di elementi informativi essenziali e comuni a tutti i form. Il materiale ottenuto dalla revisione della letteratura è stato poi comparato con questa lista iniziale per validarla ed eventualmente ampliarla.
Gli autori hanno, infine, proposto una lista di Elementi del processo informativo e di informazioni che dovrebbero essere fornite nella comunicazione con il soggetto, sottolineando l'importanza, in particolare, della Consulenza pre-test e dei risultati incidentali (vedi Tabella 1).

Tabella 13 - Elementi del processo informativo e informazioni per il consenso informato in caso di WGS in ambito clinico

1	**Counseling Pre-test (Consulenza pre-test)** Condotto sempre da esperti nel campo e con accordo sul disvelamento o meno dei dati ottenuto;
2	**Obiettivo/scopo/motivazione** Definizione o delimitazione dello scopo del test**;**
3	**Descrizione** Informazioni su caratteristiche, limiti e implicazioni della procedura; Le descrizioni saranno diverse a seconda dell'obiettivo del test (es. malati di cancro, test su portatori, soggetti presintomatici etc.); Assicurarsi che le implicazioni cliniche siano pienamente comprese;
4	**Benefici** Aumentata conoscenza sui rischi di contrarre malattie e su eventuali predisposizioni. Possibilità di avere raccomandazioni su stili di vita adatti alla prevenzione e/o terapie farmacologiche personalizzate etc.
5	**Rischi** Rischi medici Dati di significato sconosciuto Individuazione di geni che predispongono a malattie con o senza cura; Rischi psico-sociali Implicazioni relative a decisioni riproduttive; Implicazioni su terze parti (i familiari): discriminazioni, stigmatizzazione, uso improprio delle informazioni (da parte del datore di lavoro, di compagnie assicurative etc.)
6	**Volontarietà**
7	**Possibilità/libertà di rifiuto in ogni momento**
8	**Descrizione dei metodi diagnostici alternativi**
9	**Privacy e confidenzialità** Rispetto della privacy Risultati del test confidenziali Informare se i risultati del test verranno o meno inventariati su database/ supporto informatico; Chi avrà accesso ai dati e in quali casi Informare o meno i familiari
10	**Conservazione e futuro uso dei risultati del test** Conservazione per usi futuri Ricerca (in questo caso è necessario uno specifico Consenso Informato) Distruzione, contatto successivo dei pazienti o reinterpretazione dei risultati
11	**Gestione delle risultati incidentali che potrebbero emergere dall'analisi** Fornire i risultati incidentali in una modalità appropriata al contesto clinico (a seconda del tipo di malattia, che si tratti di adulti o bambini etc.) Necessità di esplicitare gli standard per ciò che può essere riferito Diritto a non sapere
12	**Consenso Informato specifico**

Sintesi da Ayuso C. et al. 2013

La consulenza pre-test e la gestione dei risultati incidentali assume una rilevanza estrema, sottolineano gli autori, nel caso dell'uso clinico del WGS data la quantità di informazioni che genera. I pazienti ne traggono un beneficio per la rapidità di diagnosi di malattie genetiche o per terapie farmacologiche mirate in campo oncologico, ma devono essere anche avvisati del fatto che tra le varianti genetiche che saranno osservate vi saranno anche varianti responsabili di fenotipi non collegati al quesito clinico. Tra esse potrebbero esserci informazioni di significato incerto o

informazioni non desiderate che coinvolgono anche familiari e parenti e che si ha il diritto di non conoscere.
Come affrontare l'emergere di questo tipo di informazioni è però anche una questione molto dibattuta e, come sottolinea Davey, 2014, in letteratura, vi sono posizioni diverse rispetto agli approcci che il clinico può avere. Sostanzialmente essi variano a seconda della maggiore o minore propensione ad avere una approccio informativo e comunicativo paternalistico e di maggiore o minore rispetto dell'autonomia decisionale del paziente.
Berg et al. (2011) propongono un approccio basato su una "classificazione delle informazioni" che permetta di dividere in gruppi le vaste ed eterogenee informazioni incidentali che possono emergere dal sequenziamento, così da aiutare medico/struttura erogatrice e paziente a discutere ogni singola categoria di risultati possibili e conoscere i vari diversi risultati, se lo desiderano, sempre con consulenza genetica adeguata. Alcuni recenti studi hanno infatti evidenziato che in questo campo una procedura di consenso informato adeguata potrebbe richiedere anche 5/6 ore di colloqui *face to face* con il consulente, articolati in diverse sedute (Berg et al, 2011, Ormond et al. 2010). La partizione proposta, sottolinea l'autore, rispetta l'autonomia del paziente e non vuole configurarsi come un approccio particolarmente paternalistico. Berg ma anche altri autori (Clarke A. et al 2014) consigliano poi che siano stabiliti momenti di consenso con esperti, per decidere cosa rientra nell'uno e/o nell'altro Gruppo e rivedere nel tempo le assegnazioni, dato che la comprensione della maggior parte dei dati provenienti dal sequenziamento è inadeguata oggi, ma destinata a migliorare nel tempo (per es. se venissero in futuro individuati farmaci o altre strategie che possano mitigare il rischio di sviluppare l'Alzheimer in coloro che hanno un APOE4, questo implicherebbe un passaggio ad un gruppo diverso- vedi più avanti).

Gli autori classificano, dunque, le informazioni genetiche a seconda del rischio e della utilità clinica. Le informazioni incidentali sono divisi in tre gruppi ed il secondo si articola in tre sottogruppi con una complessità della comunicazione e delicatezza della informazione da fornire al paziente che è decrescente. I tre gruppi principali sono:

1) Varianti che hanno una utilità clinica diretta. Esistono, cioè, linee guida e studi scientifici su come gestire la malattia e (es. malattia di Marfan o neurofibromatosi di tipo1 o quelle che danno un rischio alto di malattie prevenibili - sindrome di Lynch, BRCA1/2);

2) Varianti con utilità clinica, ma che non hanno implicazioni cliniche basate su evidenze. Berg suddivide questo gruppo in tre sotto categorie, poiché questo tipo di informazioni varia molto a seconda anche del grado di stress che possono generare nel paziente se interessato ad esserne informato. Il primo sottogruppo ha il rischio più basso di creare ansia (es. SNP: polimorfismo di

singolo nucleotide comune nella popolazione). Secondo Berg questo tipo di varianti potrebbe essere incorporato in un medical record elettronico che permetta l'attivarsi del medico, quando e se l'informazione diverrà rilevante. Il secondo sottogruppo può creare stress ma di medio livello (e.g. risultati che si associano con una certa probabilità di malattia) per esempio l'APOE4, che nonostante la sua chiara associazione coll'Alzheimer, non ha un significato clinico per la mancanza di interventi preventivi atti a ridurre il rischio di sviluppo della malattia. Un terzo sotto gruppo è quello delle informazioni ad altissimo rischio di creare non solo stress al paziente, ma di avere un effetto negativo se comunicati senza la consulenza necessaria (per es. le malattie di Huntignton e Creutzfeld - Jacob).

3) L'ultima categoria è quella dei dati di significato sconosciuto dal punto di vista clinico, che magari possono avere senso per la ricerca in futuro, ma rispetto ai quali paziente-medico possono soprassedere.
Ayuso et al 2014 hanno modificato questa classificazione, proponendone una articolata su 6 livelli diversi di informazioni genetiche secondo l'effetto presente o futuro della variante, la possibilità di azioni cliniche, etc. Si veda Tabella 14 per la ricategorizzazione proposta.

Tabella 14 - Categorizzazione delle informazioni genetiche che è possibile ottenere con l'WGS.

Gruppo 1	**Informazioni genetiche utili alla diagnosi della malattia per cui è stato fatto il test**
Gruppo 2	**Ogni informazione genetica che potrebbe avere un beneficio immediato per il paziente collegato alla malattia o condizione clinica.**
	A) Malattie per le quali è disponibile un trattamento (per es. malattie cardiovascolari che predispongono l'individuo a morte improvvisa)
	B) Malattie per le quali NON è disponibile un trattamento (per es. Charcot- Marie-Tooth type 1A)
Gruppo 3	**Mutazioni genetiche collegate ad un alto rischio di sviluppare in futuro malattie Medeliane ()**
	A) Informazioni sui rischi di malattie prevenibili e per le quali vi sia un trattamento (per es. sindrome di Lynch o BRCA1/2)
	B) Informazioni sui rischi di malattie NON prevenibili e per le quali NON vi sia un trattamento (per es. Malattia di Huntington)
Gruppo 4	**Informazioni sullo status delle mutazioni del portatore per un X-linked o un disordine autosomal recessive che impatti sulle decisioni relative alla riproduzione (es. fibrosi cistica, malattia di Tay-Sachs).**
Gruppo 5	**Informazioni sul rischio variabile di malattie future (es. tratti genetici che potrebbero rivelarsi in una predisposizione verso malattie complesse es. Alzheimer o APSE4. La maggior parte delle varianti farmacogenetiche (es. B-Bloccanti, etc.Beta1 recettori androgenetici)**
Gruppo 6	**Informazioni di significato sconosciuto;**

Sintesi da Ayuso C. et al. 2014

Secondo Ayuso qualsiasi informazione incidentale che abbia un'utilità clinica collegata alla pratica corrente (Gruppo 1) e le informazioni che evidenzino malattie per cui è disponibile un trattamento

(anche preventivo - vedi nota a piè di pag. 2) e interessino il paziente o la sua progenie/parenti (Gruppi 2A e 3A e Gruppo 4) dovrebbero essere sempre comunicate [2]. D'altra parte la possibile comunicazione di altri tipi di informazioni (Gruppi 2B e 3B e Gruppo 5 e Gruppo 6) dovrebbe essere discussa e concordata con il paziente durante il processo che porta al consenso informato (se minori, posporre informazioni fino a maggiore età).

Una volta concordato cosa si vuole sapere, secondo Ayuso è anche necessario decidere prima, con il paziente, cosa si farà delle informazioni che non vuole conoscere. Un prima opzione è la loro distruzione, oppure una forma di conservazione ed, eventualmente, concordare un futuro contatto da parte del medico e nuova discussione alla luce di eventuali nuove scoperte ed evidenze di trattamento e/o capacità di lettura. Infine sarebbe auspicabile, una volta chiarito il ruolo dell'NGS, l'avvio di una discussione pubblica (che attivi un processo educativo dei cittadini) relativa a questi temi e che permetta di aumentare le conoscenze della società su queste tematiche.

Linee guida, raccomandazioni e documenti istituzionali

La European Society of Human Genetics ha elaborato 11 Raccomandazioni per la gestione del WGS and WES in ambito clinico. Relativamente all'informazione al paziente le Raccomandazione 5,10 e 11 evidenziano alcuni punti essenziali (Carla G van El, 2013): 5. Devono essere sviluppate linee guida per il consenso informato. La richiesta dei pazienti per il diritto a non sapere, supera la responsabilità professionale quando la sua salute o quella dei suoi familiari sono a rischio. I gruppi di pazienti potrebbero fornire input importanti su come gestire questa situazione; 10. Educazione del personale sanitario a vari livelli per informare in modo appropriato; 11. Esperti genetisti dovrebbero informare e stimolare l'attenzione dei cittadini in generale sui pro e contro e migliorare "l'alfabetizzazione" dell'uomo comune rispetto a queste tematiche, attivando un dibattito pubblico.

[2]Townsend e colleghi (2014) hanno invece criticato Ayuso in quanto esprimerebbe una posizione basata su una visione del Medico come unico "gatekeeper" delle informazioni e ispirata ad un modello di rapporto medico-paziente di tipo paternalistico e ritenuto ormai da superare. Secondo Townsend ciò si evince chiaramente quando Ayuso afferma che, nel caso di informazioni del Gruppi 2A e 3A e Gruppo 4 il medico deve sempre comunicare tali risultati, essendo disponibile un trattamento. Secondo Townsend il medico impedirebbe al paziente di esercitare la propria libertà di scelta e autonomia individuale a "non sapere" e l'applicazione di un modello in cui è il paziente il "gatekeeper" unico della propria informazione genetica.

Rispondendo alle critiche di Townsend, Ayuso et al. (2014) sottolineano il loro accordo rispetto al principio di autonomia del paziente, ma evidenziano che il medico dovrebbe informare per iscritto il paziente che i risultati sono disponibili in file e consultabili in ogni momento nel suo studio, semmai il paziente cambiasse idea e volesse accedere anche alle altre informazioni. Inoltre Ayuso evidenzia che quando si utilizza questa tecnologia in un sistema pubblico, dato che si sono spesi soldi pubblici che sono comunque limitati, le decisioni diagnostiche individuali hanno spesso conseguenze "pubbliche" che vanno attentamente considerate e ricordate Per ciò raccomandano, per questo contesto, di mettere a conoscenza i pazienti (dopo esplicazione attenta di rischi benefici e tipi di informazione etc) di tutti gli "actionable findings" che Ayuso intende come informazioni che evidenziano malattie per le quali ci sia una terapia/cura ma anche quelle per le quali si hanno azioni preventive.

L'American College of Medical Genetics and Genomics ha pubblicato una "policy statement" sul tema che enfatizza l'importanza di comunicare con il paziente ed ha formato un gruppo di lavoro sugli "Incidental Finding" in per dare raccomandazioni sulla gestione degli IF nel WES e WGS.
In Italia ricordiamo infine che l'Accordo Stato-Regioni del 15/7/2004, recante "Linee Guida per le attività di genetica medica", individuava già più di 10 anni fa l'importanza della "Consulenza Genetica" nelle prestazioni di genetica medica, definendola come una comunicazione complessa e professionale che aiuti il soggetto che si sottopone al test a capire le implicazioni, i benefici e i rischi delle informazioni generate. Tale concetto è stato poi confermato nel successivo Accordo per "Attuazione delle linee guida per le attività di genetica medica" del novembre 2009 in cui le Regoni si sono impegnate, tra l'altro, a promuovere ed adottare "percorsi diagnostico-assistenziali aderenti a Linee Guida scientificamente validate (con particolare riferimento alle "Linee guida per le attività di genetica medica" 2004) che prevedano un'adeguata consulenza genetica pre e post test ed una comprensiva ed esaustiva informazione ai pazienti e ai familiari".
L'accordo del 2009 sottolinea poi come Ministero, l'ISS e Regioni/Province autonome con il supporto delle Società Scientifiche ed in particolare della Società Italiana Genetica Umana (SIGU), si debbano impegnare a: informare correttamente il pubblico attraverso siti istituzionali e altri canali su uso ed efficacia dei test genetici, diffondere informazioni corrette e aggiornate relative al trattamento dati di natura genetica ed individuare siti web istituzionali con corretta informazione e informazioni su strutture accreditate.

Conclusioni

Dagli studi analizzati emergono alcuni punti fondamentali relativi alla modalità di gestione delle informazioni che possono essere generate dall'NGS e delle implicazioni etico sociali che l'uso di tale tecnologia può avere. Un primo punto è la necessità e importanza di distinguere in modo chiaro le categorie di informazioni che possono emergere dall'NGS, aggiornando tali categorie nel tempo. Il secondo è la necessità di una prioritaria chiara ed esaustiva comunicazione al paziente delle varie tipologie di informazioni, dei loro limiti, delle eventuali relative possibilità terapeutiche permettendo così una scelta relativa a cosa si voglia o meno sapere che sia autonoma e informata.

8. Conclusioni e Discussione

Già in fase di protocollo da un primo esame di documenti di policy è emersa la difficoltà nel definire un set di dati ed un metodo di valutazione adeguato della metodica detta NGS. Uno dei problemi più di sovente citati è la mancanza di un paradigma valutativo adeguato sostenuto da dati affidabili.

La valutazione della validità analitica del NGS trova limiti nella variabilità delle piattaforme utilizzate, e mentre è facilmente determinabile per un test finalizzato a un pannello di mutazioni ben conosciute e controllabili con un metodo gold standard, è difficilmente definibile per un'indagine ad ampio spettro come il Whole Genome Sequencing. L'incertezza riguarda anche le eventuali varianti geniche riscontrate nella esecuzione del panel, e il caso di sequenze geniche identificate che non siano state validate precedentemente in un trial clinico. Occorre inoltre, differenziare fra i test targeted, che analizzano geni o mutazioni con un documentato impatto su rischio, prognosi o risposta terapeutica, e quelli che ricomprendono geni o regioni genomiche con significato clinico incerto. In quest'ultimo caso, aumenta la probabilità (comunque presente anche in test targeted) di riscontrare varianti genetiche con prove preliminari di utilità clinica (cosiddette emergenti) e varianti di significato incerto il cui significato clinico è sconosciuto (VUS). Il significato delle varianti, la loro generalizzabilità ad altri tumori simili, e la possibilità di utilizzare anche modelli in silico per la validazione delle varianti sono oggetto di discussione, riguarda anche gli strumenti bioinformatici di annotazione genica (come i transcript set ENSEMBLE o REFSEQ) e l'interpretazione delle varianti stesse.

Sotto il profillo dell'utilità clinica, i test possono essere "companion diagnostics" in quanto identificano biomarcatori per i quali esistono degli agenti antitumorali specifici o sono in grado di identificare pazienti ad aumentato rischio di effetti collaterali o servono per monitorare il trattamento e "non-companion diagnostics" che identificano geni con utilità prognostica o predittiva di risposta ma che non sono al momento essenziali nella selezione dei pazienti e nelle scelte terapeutiche. La US FDA esprime incertezza sugli standard di registrazione di questi test.

Dai risultati della ricerca appare chiara la necessità di adottare dei disegni di trial che riflettano una realtà dinamica, come di fatto si verifica in campo oncologico e che si possano applicare a sottotipi di neoplasie, che con le potenzialità del NGS, avranno frequenza sempre più bassa. A questo proposito si trovano già in letteratura alcuni esempi definiti come "Next-generation clinical trials" [Catenacci 2015]. Questi tentano di integrare il fattore di eterogeneità molecolare dei tumori nel disegno dello studio.

Si può così concludere che al momento l'impatto economico che potrebbe derivare dalla potenziale introduzione della tecnologia NGS all'interno dei sistemi sanitari regionali e, quindi, il suo utilizzo in sostituzione o parallelo contemporaneo alla metodica standard Sanger non può, sulla base delle

evidenze ad oggi disponibili, ancora essere valutato poiché le variabili che intervengono nella definizione delle voci di costo, di ogni singola procedura, sono eterogenee e molteplici rendendo così necessaria la produzione di nuova evidenza.

L'indagine di contesto ha evidenziato una presenza più diffusa della tecnologia nelle aziende ospedaliere e negli istituti a carattere scientifico e di ricerca, un utilizzo in diversi campi di applicazione e una evidente variabilità dei costi. Tale variabilità, insieme ad una eccessiva eterogeneità dei dati raccolti, ha costretto ad un'analisi caratterizzata da alcuni limiti che hanno richiesto la formulazione di ipotesi per alcune voci di costo. In particolare, per quanto riguarda il personale, al fine di rendere i costi confrontabili, ci si è riferiti alle figure professionali più ricorrenti nelle realtà analizzate ipotizzando un impiego delle risorse univoco (in termini di professioni coinvolte e tempo dedicato); in merito ai consumabili, l'eccessiva eterogeneità dei dati non ha consentito una stima di costo medio; con riferimento alle modalità di acquisizione, è stata esclusa dall'analisi la modalità in service, poiché riguardava una esternalizzazione totale dell'attività.
Dagli studi analizzati emergono alcuni punti fondamentali relativi alla modalità di gestione delle informazioni che possono emergere dall'NGS e delle implicazioni etico sociali che l'uso di tale tecnologia può avere. Un primo punto è la necessità e importanza di distinguere in modo chiaro le categorie di informazioni che possono emergere dall'NGS, aggiornando tali categorie nel tempo. Il secondo è la necessità di una prioritaria chiara ed esaustiva comunicazione al paziente delle varie tipologie di informazioni, dei loro limiti, delle eventuali relative possibilità terapeutiche permettendo così una scelta relativa a cosa si voglia o meno sapere che sia autonoma e informata.

Successivamente alla data di ricerca di questo report (Maggio 2016), la FDA ha tenuto a settembre 2016* (vedi di seguito) un webinar in cui si discute degli aspetti regolatori dei test NGS usati per la diagnosi di individui con sospetta malattia ereditaria; due webinar** (vedi di seguito) tenuti a luglio 2016 in cui vengono discussi sia gli aspetti tecnici (standard analitici e database genetico) e regolatori inerenti l'uso del NGS nelle malattie ereditarie e sia le implicazioni per i pazienti e providers. I webinar di cui sopra discutono le linee guida draft pubblicate a luglio 2016 : "Use of Standards in the Food and Drug Administration's Regulatory Oversight of Next Generation Sequencing-Based In Vitro Diagnostics Used for Diagnosing Germline Diseases"- e "Use of Public Human Genetic Variant Databases to Support Clinical Validity for Next Generation Sequencing-Based In Vitro Diagnostics. " ***(vedi di soeguito).

*Public Workshop - Adapting Regulatory Oversight of Next Generation Sequencing-Based Tests - September 23, 2016
http://www.fda.gov/MedicalDevices/NewsEvents/WorkshopsConferences/ucm514720.htm

Webinar - Next Generation Sequencing (NGS) Draft Guidances: Technical and Regulatory Aspects
**http://www.fda.gov/MedicalDevices/NewsEvents/WorkshopsConferences/ucm511436.htm?source=govdelivery&utm_medium=email&utm_source=govdelivery
Webinar - Next Generation Sequencing (NGS) Draft Guidances: Implications for Patients and Providers - July 27, 2016
**http://www.fda.gov/MedicalDevices/NewsEvents/WorkshopsConferences/ucm511437.htm?source=govdelivery&utm_medium=email&utm_source=govdelivery
"Use of Standards in the Food and Drug Administration's Regulatory Oversight of Next Generation Sequencing-Based In Vitro Diagnostics Used for Diagnosing Germline Diseases"- July 8, 2016
https://www.federalregister.gov/documents/2016/07/08/2016-16201/use-of-standards-in-the-food-and-drug-administrations-regulatory-oversight-of-next-generation
*** "Use of Public Human Genetic Variant Databases to Support Clinical Validity for Next Generation Sequencing-Based In Vitro Diagnostics. "- July 8, 2016
https://www.federalregister.gov/documents/2016/07/08/2016-16200/use-of-public-human-genetic-variant-databases-to-support-clinical-validity-for-next-generation

Inoltre, sempre dopo la data di ricerca di questo report, nel Quaderno di Monitor "MARCATORI CIRCOLANTI IN ONCOLOGIA GUIDA ALL'USO CLINICO APPROPRIATO Sintesi comparativa delle raccomandazioni nelle linee guida di pratica clinica" di settembre 2016 (Massimo Gion, Chiara Trevisiol, Giulia Rainato, Aline S.C. Fabricio) sono fornite delle tabelle sinottiche delle evidenze disponibili per tipo di tumore per approfondire argomenti relativi ai marcatori o per prendere decisioni strutturate.

9. Raccomandazioni

Per quanto riguarda la gestione della tecnologia, la standardizzazione dovrebbe essere un obbligo sotto tutti gli aspetti, particolarmente per i laboratori che usano NGS. Interessante sarebbe proporre che i laboratori che usano NGS in campo oncologico lavorino obbligatoriamente in rete, con una specifica regolamentazione riguardante la riservatezza dei dati. Questo potrebbe rendere più facile sia la gestione che l'analisi dei dati, e potrebbe garantire una maggiore sicurezza relativa all'allineamento strumentale tra piattaforme diverse:

- definizione di buone pratiche di uso NGS
- regole per la conduzione dei test
- regole per l'accreditamento di laboratori
- regole per lo scambio e conservazione dati (previo consenso informato)
- proposte per la incentivazione di partecipanti a trials clinici e altre sperimentazioni
- regole per la conduzione di studi di segregazione familiare
- regole per il rimborso d' uso dei marker companion
- regole per il rimborso d' uso dei marker non companion
- proposte di consorzi di stakeholders per il finanziamento e sviluppo di reti nazionali ed europee di validazione e valutazione della tecnologia in oncologia.

Considerate la complessità e l'implementazione continua dell'impiego di questa tecnologia in ambito clinico e traslazionale, si suggerisce l'aggiornamento in continuo di questo documento per un minimo di tre anni.

Bibliografia

Angus J. Clarke Managing the ethical challenges of next generation sequencing in genomic medicine British Medical Bulletin, 2014, 111:17–30

Assasi N, Schwarts L, Tarride JE, Goeree R, and Xie F. Economic Evaluations Conducted for Assessment of Genetic Testing Technologies: A Systematic Review. Genetic Testing and Molecular Biomarkers. Vol. 16, Number 11, 2012.

Ayuso, C., Millan, J.M., Mancheno, M. & Dal-Re, R. (2013) Informed consent for whole-genome sequencing studies in the clinical setting. Proposed recommendations on essential content and process. European Journal of Human Genetics: EJHG, 21, 1054.

Ayuso, C., Millan, J.M., Mancheno, M. & Dal-Re, R. (2014) Reply to Townsend et al. European Journal of Human Genetics: EJHG, 22, 7.

Berg, J.S., Khoury, M.J. & Evans, J.P. (2011) Deploying whole genome sequencing in clinical practice and public health: meeting the challenge one bin at a time. Genetics in Medicine, 13, 499.

Carla G van El et al. Whole-genome sequencing in health care. Recommendations of the European Society of Human Genetics in European Journal of Human Genetics (2013) 21, 580–584; doi:10.1038/ejhg.2013.46

Cassandra R, GuarrapRicognizione del Software Disponibile per Analisi primaria di Dati NGS. ICAR CNR. RT-ICAR-NA-2013-5. Novembre 2013.

Catenacci DV. Expansion Platform type II: testing a treatment strategy. The Lancet Oncology 2015; 36:1276-

Catenacci DV. Next-generation clinical trials: Novel strategies to address the challenge of tumor molecular heterogeneity. Mol Oncol. 2015;9(5):967-96.

Cottrell C.E. et al., Validation of next-generation sequencing assay for clinical molecular oncology. J Mol Diagn, 16:89-105, 2014.

Davey S., Next generation sequencing: considering the ethics, International Journal of Immunogenetics, 2014, 41, 457–462.

Frey KG, Herrera-galeano JE, et al., Comparison of three next-generation sequencing platforms for metagenomic sequencing and identification of pathogens in blood. BMC Genomics 15:1-14, 2014.

Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. Nature Reviews Genetics. Volume 17 June 2016 333-351.

Green Park Collaborative, A partnership for innovation and effectiveness. Initial Medical Policy and Model Coverage Guidelines for Clinical Next Generation Sequencing in Oncology. August 17, 2015.

Head SR, Komori HK, LaMere SA et al. Library construction for next-generation sequencing: Overviews and challenges. Practical Guide. BioTechniques 56:61-77. February 2014.

Jamieson NB, Chang DK, Biankin AV. Cancer Genetics and Implications for Clinical Management. Surg Clin North Am. 2015;95(5):919-34.

Le Tourneau C, Delord J-P, Gonçalves A, et al. Molecularly targeted therapy based on tumour molecular profi ling versus conventional therapy for advanced cancer (SHIVA): a multicentre, open-label, proof-of-concept, randomised, controlled phase 2 trial. Lancet Oncol 2015; 16: 1324–34.

Liu L, Li Y, Li S. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. Hindawi Publishing Corporation. Journal of Biomedicine and Biotechnology. Volume 2012.

Mardis E.R. Next-Generation sequencing platforms. Ann rev Anal Chem 6:287-303, 2013

McCourt C.M., McArt D.G et al., Validation of next generation squencing technologies in comparison of current diagnostic gold standard for BRAF, EGFR and Kras mutational analysis. POLS ONE 8:1-10, 2013.

Next Generation DNA sequencing: A Review of the Cost Effectiveness and Guidelines. Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health. 06 February 2014.

Ormond KE, Wheeler MT, Hudgins L, et al. Challenges in the clinical application of whole-genome sequencing. Lancet 2010;375:1749 –1751

Rehm H.L., Bale S.J, et al., ACGM clinical laboratory standards for next-generation sequencing. Genetic in medicine 15:733-747, 2013.

Rizzo J.M. and Buck M.J. Key principles and clinical application of "Next-generation" DNA Sequencing. Cancer Prev Res, 22:887-900, 2012.

Sims D. Sudbery I et al., sequencing depth and coverage: key consideration in genomic analyses. Nature reviews, 15:121-132, 2014.

Sullivan W., Evans D.G., Newman W.G., Ramsden S.C., Scheffer H., and Payne K. Developing National Guidance on Genetic Testing for Breast Cancer Predisposition: The Role of Economic Evidence? Genetic Testing and Molecular Biomarkers, Vol. 16, Number 6, 2012.

Townsed Rousseaus F et al, Autonomy and the patient's right not to know in clinical whole-genomic sequencing European Journal of Human Genetics: EJHG, 22, 6-11.

Voelkerding K.V, Dames S. and Durtschi D.J. Next generation sequencing for clinical diagnostic-principles and application to targeted resequencing for hypertrophic cardiomyopathy. J Mol Diag. 12:539-551, 2010.

Glossario

Mutazioni germinali vengono trasmesse alla progenie attraverso i gameti e sono presenti in tutte le cellule dell'individuo.

Mutazioni somatiche insorgono in una singola cellula dell'organismo e vengono trasmesse alla sua progenie a costituire un clone cellulare. Non possono essere trasmesse ai discendenti in quanto coinvolgono cellule che non danno origine a cellule della prole; sono coinvolte nella cancerogenesi e nell'invecchiamento.

DNA l'acido nucleico che contiene le informazioni genetiche necessari alla sintesi di RNA. È un polimero i cui monomeri sono i nucleotidi (A, G, C e T), l'ordine in cui i monomeri sono disposti in sequenza costituisce l'informazione genica. È strutturato in forma di coppia di filamenti complementari fra loro, detta doppia elica. Negli eucarioti, il DNA si trova all'interno del nucleo cellulare, in strutture dette cromosomi.

Sequencing library le librerie possono essere di DNA o di RNA, a seconda che si desideri svolgere analisi di genomica o trascrittomica. il DNA o l'RNA di un individuo viene rotto in numerosissimi piccoli frammenti (ad esempio attraverso l'uso di ultrasuoni) per costituire la cosiddetta libreria di sequenziamento (sequencing library). Questi piccoli frammenti fungono da stampo per la sintesi di numerosi frammenti complementari (dette reads).**Targeted NGS testing** sequenziamento mirato di pannelli di geni**Reads** piccoli frammenti di DNA che fungono da stampo per la sintesi di numerosi frammenti complementari. Il numero di basi che la compongono rappresenta la sua lunghezza (misurata in nt o bp).

Utilità clinica indica la capacità del test di fornire informazioni utili alla diagnosi, trattamento, gestione e prevenzione di una patologia in maniera che il paziente ne tragga beneficio.

Validità analitica indica la capacità del test di predire la presenza o assenza di un gene o di un cambiamento genetico

Validità clinica indica la capacità del test di determinare la relazione fra la variante genetica analizzata e la presenza o assenza del rischio della patologia in questione

Whole-Genome Sequencing (WGS) sequenziamento dell'intero genoma umano

Whole-Exome Sequencing (WES) sequenziamento dell'intero esoma umano

Allegato 1. Strategia di ricerca

Strategia per l'identificazione di studi sulla valutazione dell'utilità clinica.

Per definire lo stato dell'arte nella valutazione della utilità clinica in oncologia dell'abbinamento fra sequenziamento genico, diagnosi, prognosi e terapia di forme tumorali sono state effettuate ricerche supplementari per identificare i disegni di studio correnti, proposti o in corso di definizione. Le banche dati interrogate dalle quali sono stati reperiti gli articoli sono quelle inserite nella piattaforma del circuito biomedico Bibliosan ossia, catalogo risorse elettroniche AtoZ della Ebsco, Pubmed, Cochrane e infine attraverso lo scambio interbibliotecario nella piattaforma del Network Inter-Library Document Exchange (NILDE) e l'Archivio Collettivo Nazionale dei Periodici (ACNP). Per alcuni articoli sono state consultate banche dati Open Access, messe a disposizioni da enti governativi internazionali, editori e autori.
Riviste reperite da:
Cancer Genetics management;
Clinical Pharmacology and Therapeutics;
Cancer Biology & Therapy;
Contemporary Clinical Trial;
Nature Biotechnology;
Human Pathology;
Biomedicine & Pharmacotherapy;
Cancer Informatics;
Tumor biology;
Jama Oncology;
Health Technology Assessment;
Genetic Testing and Molecular Biomarkers;
Institute National d'Excellence en Santè et en Services Sociaux – Quebec;
KCE report 240 – Federal Healthcare Knowledge Centre;
National Institute for Health Research – NHS;
Canadian Agency for Drug and technologies in health – CADTH;

In particolare per la ricerca nella Cochrane Library sono state usate le seguente sequenze di ricerca per interrogazioni multiple:
Prima interrogazione:
"molecular heterogeneity" OR "Next-generation clinical trials" OR Inter-patient heterogeneity OR Intra-patient heterogeneity OR Expansion Platform Designs;
Utilizzando i seguenti filtri: Online Publication Date from Jan 2014 to May 2016, in Cochrane Reviews (Reviews only), Other Reviews, Trials, Methods Studies and Technology Assessments (Word variations have been searched) – records 47 su 9393 risultati. (25 maggio 2016).

Seconda interrogazione:
"next generation" OR biomarker OR "trial design" AND molecular in Title, Abstract, Keywords
AND heterogeneity OR diversity OR inter-patient OR intra-patient in Title, Abstract, Keywords

OR expansion OR exploratory OR platform AND "companion diagnostic" in Title, Abstract, Keywords
OR "personalized treatment" AND algorithm* in Title, Abstract, Keywords.
OR NCTN OR "national clinical trial network" OR NCI OR "national cancer institute" in Title, Abstract, Keywords.
Utilizzando i seguenti filtri: Online Publication Date from Jan 2014 to May 2016, in Cochrane Reviews (Reviews only), Other Reviews, Trials, Methods Studies and Technology Assessments (Word variations have been searched) **- records 26 su 9374 risultati.**
(in data 25 maggio 2016).

Per la ricerca in PubMed è stata utilizzata la seguente ricerca **con interrogazioni multiple:**

Prima interrogazione
Search (((((((((((("next generation"[Title/Abstract]) AND biomarker[Title/Abstract]) AND "trial design"[Title/Abstract]) AND molecular[Title/Abstract]) AND (((heterogeneity[Title/Abstract] OR diversity)[Title/Abstract]))) OR (((inter-patient[Title/Abstract] OR intra-patient)[Title/Abstract]))) OR (((expansion[Title/Abstract] OR exploratory)[Title/Abstract]))) AND platform[Title/Abstract]) AND "companion diagnostic"[Title/Abstract]) AND "personalized treatment"[Title/Abstract]) AND algorithm*[Title/Abstract]) AND NCTN[Title/Abstract]) OR "national clinical trial network"[Title/Abstract]) AND NCI[Title/Abstract]) OR "national cancer institute"[Title/Abstract]

Utilizzando i seguenti filtri: Clinical Trial; Review; Meta-Analysis; Systematic Reviews; Publication date from 2014/01/01 to 2016/05/12; Humans; English - records 224, (in data 16-05-2016)

Seconda interrogazione:
((("Molecular heterogeneity"[Text Word]) OR "Inter-patient heterogeneity"[Text Word]) OR "Intra-patient heterogeneity"[Text Word]) OR "Next-generation clinical trials"[Text Word]) OR "Expansion Platform Designs"[Text Word] AND ((Clinical Trial[ptyp] OR Review[ptyp] OR Meta-Analysis[ptyp] OR systematic[sb]) AND ("2014/01/01"[PDat]:"2016/05/15"[PDat]) AND Humans[Mesh] AND English[lang]) - records 60. (in data 24-05-2016)

I filtri utilizzati sono: Clinical Trial; Review; Meta-Analysis; Systematic Reviews; Publication date from 2014/01/01 to 2016/05/12; Humans; English

Allegato 2. Questionario

Agenzia Nazionale per i Servizi Sanitari Regionali

VIII ACCORDO HTA Agenas - Ministero della Salute

Rapid HTA Report – Next Generation Sequencing (NGS)

Questionario

ASPETTI ORGANIZZATIVI

USO CORRENTE DELLA TECNOLOGIA

ASPETTI ECONOMICI

Area introduttiva – DATI IDENTIFICATIVI

REGIONE _____

Nome e Cognome del compilatore _____

Ufficio di appartenenza _____

Posizione ricoperta _____

Contatto telefonico _____

Indirizzo e-mail _____

1. ASPETTI ORGANIZZATIVI

(da compilare a cura della Regione)

1.1 Si chiede di indicare l'ultimo riferimento normativo disponibile in merito all'organizzazione della rete laboratoristica, con particolare riferimento all'organizzazione regionale degli esami di genetica (allegare il/i documenti).

_____

_____

_____

1.2 Si chiede di indicare l'eventuale atto programmatorio in merito all'introduzione della tecnologia NGS nel contesto regionale (allegare il/i documenti).

_____

2. USO CORRENTE DELLA TECNOLOGIA

(da compilare a cura dell'azienda sanitaria)

Tabella 1: Dati identificativi della/e Azienda/e sanitaria/e in cui è presente la tecnologia NGS *(nel caso di Presidi Ospedalieri indicare il nome di questi ultimi)*

Nome Azienda sanitaria[1]	Città e Provincia[2]	Bacino utenza dell'azienda sanitaria[3]	Unità Operativa (Laboratorio) in cui è presente NGS[4]		Tipologie di laboratorio presenti (di base, specializzato, specialistico)[5]		Sequenziatori NGS (numero, marca e modello, anno di acquisizione)		Test effettuati con NGS[6]		Numero totale prestazioni NGS erogate (n.)[7]		Numero totale prestazioni oncologiche erogate con NGS (n.)[8]		Numero di test oncologici NGS refertati		Personale addetto a NGS (% tempo dedicato)[9]	
			Anno 2014	Anno 2015	Anno 2014	Anno 2015	Anno 2014	Anno 2015	Anno 2014	Anno 2015	Anno 2014	Anno 2015	Anno 2014	Anno 2015	Anno 2014	Anno 2015	Anno 2014	Anno 2015
Asl XXXXXX																		

Glossario compilazione Tabella 1

1. Nome Azienda sanitaria: indicare il nome dell'Azienda Sanitaria indicandone la tipologia: AO; IRCCS; AOU/Policlinico Universitario; Azienda sanitaria Pubblica; Azienda sanitaria privata accreditata; altro.
2. Città e Provincia: indicare la Città e la Provincia di riferimento dell'Azienda sanitaria.
3. Bacino utenza dell'azienda sanitaria: indicare il bacino di utenza dell'Azienda sanitaria.
4. Unità Operativa (Laboratorio) in cui è presente NGS*:* indicare l'unità operativa/specializzazione in cui è presente la tecnologia, ad es. genetica, genetica molecolare, laboratorio analisi chimico cliniche, anatomia patologica, medicina trasfusionale, ecc.
5. Tipologie di laboratorio presenti (di base, specializzato, specialistico): indicare secondo la definizione del DM/97 la tipologia di laboratorio in cui è presente NGS.
6. Test effettuati con NGS: elencare tutti i test eseguiti con NGS, raggruppati per specialità (es. oncologia, genetica umana, microbiologia).
7. Numero totale prestazioni NGS erogate: riportare il numero totale di esami eseguiti indipendentemente dalla specialità.
8. Numero totale prestazioni oncologiche erogate con NGS: riportare il numero totale dei test oncologici, inclusi i non refertati.
9. Personale addetto a NGS (% tempo dedicato): riportare, in percentuale, il tempo medio settimanale speso dal personale nell'utilizzo dell'NGS.

2.1. Indicare se l'azienda ha adottato un protocollo per l'utilizzo dei test genetici in oncologia ____

_____

_____

_____

3. ASPETTI ECONOMICI

(da compilare a cura dell'azienda sanitaria)

3.1. Con riferimento all'utilizzo della tecnologia NGS si chiede di compilare, per ogni Azienda Sanitaria in cui è presente la tecnologia NGS, la tabella sottostante *(Tabella 2). I dati dovranno far riferimento all'ultimo anno disponibile, che dovrà essere indicato.*

Tabella 2. Valori economici

Azienda:

Anno*:*

Voce di costo	Quantità		Valore economico (€)		Note
	Anno 2014	Anno 2015	Anno 2014	Anno 2015	
Modalità di acquisizione della tecnologia:					
- acquisto *(indicare il costo IVA esclusa)*					
- noleggio/leasing/service *(indicare il canone annuale)*					
Costo di manutenzione della tecnologia NGS					
Costo della struttura informatica					
Costo consumabili					
- reagenti					
- test oncologici					
Costo CQI per seduta *(Indicare nella Quantità il numero di controlli eseguiti per seduta)*					
Costo di partecipazione a programmi VEQ *(specifici per test NGS)* *(indicare Quantità e Frequenza)*					
Personale *(indicare nella colonna "Quantità" il n° di unità dedicata e la % di tempo dedicato)*					
- personale dedicato	*n°; %*				
- Biologo *(indicare la specializzazione)*					
- Medico *(indicare la specializzazione)*					
- Tecnico di laboratorio					
- Bioinformatico					
- Altro (specificare)					

4. Ulteriore Documentazione

4.1. Si prega di indicare/allegare qualsiasi documentazione regionale disponibile inerente eventuali valutazioni sulla tecnologia NGS.