



Ministero della Salute

Consiglio Superiore di Sanità

Sessione LIII (2022-2025)

Presidente: Prof. Franco Locatelli

Sezione I

**Pianificazione di sistema ed economica, Innovazione e ricerca,
sviluppo di nuovi modelli di servizio nel SSN**

Presidente: Prof. Paolo Vineis

Segretario tecnico: Dr. Stefano Moriconi

**“Proposta di regolamentazione per
l’appropriatezza dell’utilizzo dei Test Multigenici
NGS predittivi e prognostici nella pratica clinica”**

Coordinatore: Prof. Giovanni Scambia

Co-coordinatori:

Prof. Giuseppe Curigliano

Prof.ssa Anna Sapino

Prof Nicola Normanno

INDICE

INTRODUZIONE	3
1. Le Tecnologie NGS.....	4
1.1 Le applicazioni delle tecniche NGS nella profilazione genetico-molecolare delle neoplasie solide. ...	6
1.2 Elementi da considerare nella interpretazione di un test NGS	8
1.3 Linee guida all’impiego di tecniche di NGS nella pratica clinica	8
1.4 Appropriatezza prescrittiva – popolazione target.....	11
1.4.1 Utilizzo di pannelli di NGS per CGP.....	12
1.4.1.1 Carcinoma dell’ovaio	12
1.4.1.2 Tumori di origine sconosciuta (CUP).....	13
1.4.1.3 Tumori solidi avanzati per i quali non sono disponibili alternative terapeutiche.....	14
1.4.1.4 Tumori solidi pediatrici	14
1.4.2 Utilizzo di pannelli NGS per l’identificazione di specifiche alterazioni genomiche	17
1.4.2.1 Carcinoma del polmone non a piccole cellule (NSCLC).....	18
1.4.2.2 Colangiocarcinoma	19
1.4.2.3 Carcinoma della prostata.....	20
1.4.2.4 Carcinoma della tiroide	21
1.4.2.5 Carcinoma del colonretto	22
1.4.2.6 Carcinoma dell’endometrio.....	23
1.4.2.7 Carcinoma uroteliale	24
1.4.2.8 Sarcomi.....	25
1.4.2.9 Tumore mammario.....	26
1.5 Requisiti della rete laboratoristica nazionale	28
1.6 Educazione e gestione del paziente oncologico candidato a test NGS e gestione degli Incidental Findings.....	30
1.7 Definizione di una policy per la gestione di risultati indesiderati e legati a potenziali mutazioni germinali.....	31
1.8 I Molecular Tumor Board	31
1.9 La Refertazione del test NGS e del report del MTB.....	33
2. L’utilizzo di tecnologie NGS per l’analisi della biopsia liquida.....	36
3. Conclusioni.....	38
Gruppo di lavoro “TM NGS” Sezione I Consiglio Superiore di Sanità.....	40

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni l'innovazione in ambito biomedico ha portato allo sviluppo e progressiva diffusione di "Test Multigenici Prognostici e Predittivi" (TMPP), soprattutto in ambito oncologico. Per test prognostico si intende un esame il cui risultato dà informazioni sull'evoluzione della malattia in pazienti non trattati o trattati con terapie standard. L'esito di tale test può dare un'indicazione dell'aggressività biologica del tumore che, accompagnata allo stadio della patologia (e.g., dimensioni, stadio, etc.) e ai dati clinici (e.g., stato menopausale), può fornire un quadro più completo sull'evoluzione della malattia. I test molecolari prognostici di uso clinico si basano sull'analisi di espressione di diversi geni (multigenici) del tessuto ottenuto dal tumore primario dopo escissione chirurgica oppure da prelievi biotici. Per test predittivo si intende un test genomico che fornisce informazioni sulla probabilità di risposta e beneficio clinico dall'esposizione ad un determinato agente a bersaglio molecolare (tirosin chinasi inibitore, anticorpo monoclonale o altro). Per l'esecuzione di TMPP si utilizzano tecnologie complesse.

Per i carcinomi della mammella esistono ad oggi sul mercato diverse opzioni di TMPP, questi sono inseriti tra i Livelli Essenziali di Assistenza (LEA) in Italia. I TMPP restituiscono una categoria di rischio per la paziente che può dare utili informazioni al "gruppo oncologico multidisciplinare" circa il trattamento più appropriato. In particolare, per le pazienti con carcinoma mammario questi test indirizzano la scelta tra trattamento combinato di chemioterapia e ormonoterapia verso la sola ormonoterapia in quei soggetti per i quali caratteristiche biologiche e marcatori di prognosi standard rendessero incerta la scelta tra i due trattamenti.

Il sequenziamento di nuova generazione (NGS) consente il sequenziamento di un numero elevato di nucleotidi in un breve lasso di tempo e a un costo accessibile per paziente. In questo documento, il tavolo tecnico del Consiglio Superiore di Sanità ha l'obiettivo di discutere dell'utilità clinica dell'utilizzo dell'NGS come tecnologia, e come questa tecnologia dovrebbe essere utilizzata (pannelli piccoli o grandi) nella profilazione genomica delle malattie oncologiche. Le raccomandazioni saranno formulate a tre livelli: 1) dal punto di vista della salute pubblica, 2) dal punto di vista dei centri di ricerca clinica accademica e 3) dal livello di ogni singolo paziente. Le tecnologie NGS sono estensivamente utilizzate per tipizzare biologicamente alcuni tumori (carcinomi polmonari non a piccole cellule in particolare) con l'obiettivo di sequenziare geni lunghi e complessi e/o più geni per campione di tumore, al fine di identificare alterazioni driver e/o target e di allocare i pazienti a terapie targeted. Sebbene questa tecnologia sia stata ampiamente implementata, non ci sono

raccomandazioni sul loro utilizzo nella pratica clinica quotidiana. Nel presente documento forniamo delle raccomandazioni su come e quando la l'NGS potrebbe essere utilizzato per profilare i tumori metastatici o allo stadio precoce.

1. Le Tecnologie NGS

Il termine *Next Generation Sequencing* (NGS) si riferisce in maniera generica ad una serie di tecnologie basate sul sequenziamento massivo parallelo e pertanto in grado di sequenziare regioni più o meno ampie del genoma in tempi relativamente brevi. Lo sviluppo di queste tecnologie ha rivoluzionato la ricerca clinica, grazie alla loro capacità di generare rapidamente grandi volumi di dati di sequenziamento per corsa, con una concomitante diminuzione dei costi di sequenziamento. Le tecnologie NGS consentono, inoltre, di riconoscere tutte le diverse alterazioni genetiche coinvolte nella patogenesi delle neoplasie, ovvero mutazioni puntiformi (single nucleotide variants, SNV), inserzioni/delezioni (indels), alterazioni del numero di copie dei geni (copy number alterations, CNA), riarrangiamenti genici e geni di fusione, partendo spesso da piccole quantità di acidi nucleici.

Le tecnologie di NGS vanno in particolare distinte in:

- 1) Sequenziamento di regioni definite (targeted sequencing), con pannelli che possono spaziare da poche decine a centinaia di geni;
- 2) Sequenziamento dell'esoma clinico, ovvero di un numero limitato di geni (in genere da 3000 a 6000) con potenziale ruolo nella patogenesi delle malattie umane;
- 3) Sequenziamento dell'intero esoma (Whole Exome Sequencing, WES), che prevede il sequenziamento di tutte le regioni codificanti del genoma;
- 4) Sequenziamento dell'intero genoma (Whole Genome Sequencing, WGS).

La matrice del sequenziamento NGS è rappresentata dal DNA. Tuttavia, queste tecnologie possono essere impiegate anche per analizzare RNA al fine di identificare alterazioni strutturali (geni di fusione) o dei livelli di espressione di geni codificanti per proteine coinvolte in processi patologici. Le tecniche di sequenziamento dell'RNA (RNAseq) prevedono la retrotrascrizione dell'RNA in DNA complementare (cDNA). Inoltre, la disponibilità di tecniche di targeted sequencing ad elevata sensibilità ha consentito più recentemente l'impiego di queste tecnologie anche per il sequenziamento del DNA tumorale circolante (ctDNA), che può essere isolato dai fluidi corporei dei pazienti oncologici.

Gli approcci di targeted sequencing sono quelli maggiormente utilizzati in diagnostica e ricerca clinica oncologica. I protocolli di sequenziamento variano a seconda delle tecnologie impiegate. In linea di massima, dopo l'estrazione e la frammentazione del DNA, si procede alla generazione delle librerie per il sequenziamento. L'arricchimento delle regioni target può avvenire mediante due principali strategie. Quella "hybridization-based" sfrutta sonde biotinilate complementari alle regioni di interesse, mentre l'approccio ad ampliconi prevede l'amplificazione di regioni genomiche con primers specifici. Una modifica di questo ultimo approccio è rappresentata dalla tecnologia anchored multiplex PCR (AMP), che utilizza un solo primer specifico e primers che riconoscono adattatori che vengono legati ai frammenti di DNA.

Le tecnologie ad ampliconi sono più rapide e richiedono quantità inferiori di DNA di partenza. Tuttavia, hanno alcuni limiti nella identificazione di CNA e fusioni geniche. Per quest'ultima applicazione, la tecnologia AMP ha il vantaggio di poter riconoscere eventuali riarrangiamenti genici in maniera indipendente dal partner di fusione. Le tecniche "hybrid capture" hanno il vantaggio di poter coprire regioni genomiche più ampie, ma richiedono una maggiore quantità di DNA di partenza e tempi più lunghi di analisi.

La maggior parte delle piattaforme commerciali che utilizzano il sequenziamento massivo parallelo si basano sul concetto di sequenziamento per sintesi (SBS). In pratica, questi metodi consentono l'incorporazione di nucleotidi utilizzando una varietà di enzimi e schemi di rilevamento che permettono alla piattaforma di sequenziamento corrispondente di raccogliere dati durante la sintesi enzimatica della catena di DNA. Invece, la tecnologia Ion Torrent rileva le modifiche di pH che si verificano quando un nucleotide corretto viene incorporato di fronte alla sua base complementare in una catena di DNA in crescita, con conseguente rilascio di uno ione idrogeno.

L'elaborazione bioinformatica dei dati di sequenziamento con NGS risulta di cruciale importanza. Questo processo prevede una serie di passaggi, a cominciare dalla valutazione della qualità dei dati di sequenziamento per rimuovere le sequenze di adattatori e le sequenze di bassa qualità. A questo segue l'allineamento con una sequenza genomica di riferimento e la successiva identificazione di varianti con diversi strumenti bioinformatici per ridurre il margine di errore. Infine, le varianti identificate devono essere annotate, ovvero devono essere interpretate rispetto al loro ruolo patogenetico ed eventualmente predittivo di risposta alle terapie target.

Sono disponibili diversi strumenti per l'elaborazione bioinformatica dei dati di NGS e la loro successiva interpretazione, che potenzialmente possono portare anche conclusioni e

raccomandazioni cliniche differenti. È importante quindi che la pipeline bioinformatica sia accuratamente validata e che diversi database siano consultati per la classificazione delle varianti e la loro interpretazione clinica.

1.1 Le applicazioni delle tecniche NGS nella profilazione genetico-molecolare delle neoplasie solide

La rapida evoluzione della medicina di precisione comporta la necessità di valutare nella pratica clinica un numero di biomarcatori genomici in costante aumento per l'individuazione della migliore strategia diagnostica e terapeutica. L'elevato numero e la complessità dei biomarcatori genomici da valutare richiede una attenta scelta delle tecnologie di analisi per garantire che esse vengano eseguite secondo criteri di appropriatezza, in tempi adeguati alle necessità cliniche e con le quantità spesso limitate di materiale biologico a disposizione. L'introduzione nella diagnostica molecolare di tecnologie di NGS rappresenta un importante contributo tecnologico per far fronte a queste nuove esigenze cliniche.

Le applicazioni delle tecniche di NGS nella diagnostica molecolare avanzata sono molteplici e possono essere distinte in due principali categorie:

- A) Lo studio di varianti germinali associate a rischio di sviluppo di neoplasie e, in alcuni casi, anche a sensibilità a specifici agenti farmacologici;
- B) La valutazione di mutazioni somatiche predittive di risposta o di resistenza a farmaci a bersaglio molecolare.

Queste applicazioni richiedono diversi approcci di NGS. Lo studio delle varianti germinali viene spesso eseguito con pannelli NGS con un numero limitato di geni, utilizzando come template il DNA germinale isolato da sangue periferico. La ricerca delle varianti germinali richiede un basso coverage, ovvero una bassa profondità di sequenziamento, tipicamente 50X o 100X. In casi selezionati, può trovare indicazione l'analisi dell'esoma clinico o anche approcci di WES o di WGS.

La più frequente applicazione dell'NGS in oncologia è rappresentata dalla ricerca di varianti somatiche in pazienti con neoplasie solide in fase avanzata di malattia. Esistono ormai protocolli consolidati per il sequenziamento NGS di DNA ed anche RNA isolati da tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina (FFPE). L'analisi del DNA consente di identificare SNV, indels, CNA e riarrangiamenti genici con una buona sensibilità, utilizzando un coverage di almeno 300x. Tuttavia, numerosi studi hanno dimostrato che il sequenziamento dell'RNA è in grado di identificare fusioni geniche con una maggiore accuratezza rispetto al sequenziamento del DNA. La presenza di lunghe

sequenze introniche può infatti limitare la sensibilità del sequenziamento del DNA nell'identificazione di riarrangiamenti genici. Pertanto, molti pannelli commerciali includono sia il sequenziamento del DNA che dell'RNA, per garantire una adeguata sensibilità su tutte le alterazioni geniche di rilievo clinico. Il numero dei geni coperto dai diversi pannelli commerciali e la stessa tipologia di alterazioni identificate varia notevolmente, da pochi geni a centinaia. I pannelli di dimensione inferiore hanno un minore impatto economico ma possono causare una maggiore complessità organizzativa se differenti pannelli devono essere impiegati per le varie applicazioni cliniche. I pannelli ad ampio spettro hanno costi e complessità di esercizio maggiori, ma consentono di effettuare un profilo genomico complessivo (comprehensive genomic profiling, CGP) e di valutare anche biomarcatori complessi come ad esempio il carico mutazionale del tumore (tumor mutational burden, TMB), l'instabilità dei microsatelliti (MSI) o il deficit di ricombinazione omologa (homologous recombination deficiency, HRD). La scelta del pannello da parte del laboratorio deve quindi tenere conto delle esigenze cliniche, del contesto nel quale il test viene effettuato e delle effettive opportunità terapeutiche che il risultato dell'analisi può offrire al paziente. Di converso, il clinico deve verificare che il test effettuato fornisca tutte le informazioni rilevanti per l'inquadramento clinico-diagnostico del paziente.

Una sorgente alternativa di DNA tumorale può essere rappresentata dal ctDNA, in genere isolato dal plasma ottenuto da sangue periferico ma presente anche in altri fluidi biologici. Il sequenziamento del ctDNA rappresenta la più recente applicazione dell'NGS, resa possibile dallo sviluppo di tecnologie ad elevata sensibilità dedicate a questo specifico scopo. L'elevata sensibilità tecnologica è richiesta per la possibile estrema diluizione del ctDNA nel DNA "normale" presente nel plasma e di derivazione principale dalle cellule emopoietiche. Il coverage per questa applicazione NGS è tipicamente elevato, da 5000x a 20000x o anche oltre, con conseguente aumento notevole dei costi di sequenziamento. L'elevata sensibilità richiesta dal test del ctDNA può anche determinare la creazione di artefatti di sequenziamento. Pertanto, i pannelli dedicati all'analisi del ctDNA devono essere attentamente validati. Nonostante la possibilità di utilizzo di tecnologie avanzate, esiste comunque un aspetto di relativa bassa sensibilità intrinseca di questa analisi per diverse motivazioni. Alcuni tumori rilasciano basse quantità di DNA, determinando possibili risultati falsi negativi del test. Se la quantità di DNA sequenziato è adeguata alla ricerca di varianti, questa potrebbe però non essere sufficiente per la valutazione di altre alterazioni geniche quali il CNA. Infine, le tecniche NGS su biopsia liquida si limitano al sequenziamento del ctDNA, con

possibile bassa sensibilità per le fusioni geniche. I risultati dei test NGS su ctDNA dovrebbero pertanto essere discussi nell'ambito del gruppo multidisciplinare per valutarne attentamente le implicazioni cliniche.

1.2 Elementi da considerare nella interpretazione di un test NGS

L'interpretazione del risultato di un test NGS deve prendere in considerazione una serie di variabili, che dovrebbero tutte essere indicate nel referto, ovvero:

- 1) La tecnologia utilizzata per l'estrazione degli acidi nucleici e per il sequenziamento;
- 2) Le regioni genomiche coperte dal pannello, specificando se il sequenziamento dei geni riportati è completo oppure limitato alle regioni hotspot;
- 3) Le tipologie di alterazioni che sono individuabili dal pannello, ovvero SNV, indels, CNA e fusioni, nonché il limite di sensibilità della tecnologia;
- 4) L'eventuale partecipazione a controlli di qualità esterni e la presenza di certificazione ISO, elementi di qualità del laboratorio che ha effettuato il test;
- 5) La descrizione delle alterazioni genomiche utilizzando le linee guida della Human Genome Variation Society (HGVS), riportando anche frequenza allelica e possibile clonalità della mutazione identificata;
- 6) L'interpretazione delle varianti rispetto al loro ruolo patogenetico o possibilmente patogenetico;
- 7) Le implicazioni terapeutiche, utilizzando diversi database e rifacendosi alle correnti terapie approvate;
- 8) Per le analisi su DNA germinale, la raccomandazione di rivolgersi ad una consulenza genetica in caso di alterazioni patogenetiche o probabilmente patogenetiche;
- 9) Per le analisi su DNA estratto da tessuto tumorale, la raccomandazione di riferirsi ad una consulenza genetica in caso di alterazioni patogenetiche o probabilmente patogenetiche potenzialmente riferibili alla line germinale.

1.3 Linee guida all'impiego di tecniche di NGS nella pratica clinica

Diversi documenti nazionali ed internazionali hanno affrontato la problematica dell'impiego di tecnologie di NGS per la profilazione genetico-molecolare di specifiche neoplasie. Nel 2020, la European Society of Medical Oncology (ESMO) ha pubblicato raccomandazioni per l'utilizzo

dell'NGS nella profilazione genomica delle principali neoplasie solide nella pratica clinica, limitatamente alla individuazione di fattori predittivi di risposta alle terapie target. In particolare, ESMO ha riunito un gruppo di esperti che hanno analizzato tutte le alterazioni actionable (ovvero che offrono possibilità di intervento terapeutico) dei più frequenti tumori solidi, assegnando ad ognuna di esse la classificazione ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets (ESCAT). La classificazione ESCAT prevede cinque livelli. Le alterazioni genomiche di livello I sono i biomarcatori pronti per l'impiego in pratica clinica sulla base delle evidenze scientifiche disponibili e dei farmaci approvati o in via di approvazione. Il livello di evidenza è invece inferiore per i gradi successivi ESCAT, rappresentando pertanto alterazioni genomiche per le quali sono necessarie ulteriori evidenze sperimentali.

ESMO ha quindi elaborato le proprie raccomandazioni all'impiego dell'NGS prendendo in considerazione la percentuale di pazienti che presentano alterazioni di livello I ed il numero di alterazioni di livello I per ogni tumore, oltre la loro complessità. Partendo da tali presupposti, il gruppo ESMO ha elaborato delle raccomandazioni su tre diversi livelli.

Il primo livello, riguarda l'impiego di pannelli multigenici NGS nella pratica clinica. A tale riguardo, ESMO ha raccomandato l'utilizzo di pannelli limitati alle alterazioni di tipo I nelle seguenti neoplasie:

- a) Adenocarcinoma del polmone
- b) Carcinoma del colon, se non produce costi aggiuntivi rispetto alla PCR;
- c) Carcinoma della prostata
- d) Colangiocarcinoma.

È stato inoltre raccomandato l'impiego di NGS in poche altre specifiche situazioni nella pratica clinica:

- a) Carcinoma dell'ovaio, per determinare mutazioni di BRCA1/2;
- b) Carcinomi di origine sconosciuta (Cancer of Unknown Primary, CUP), per i quali è consigliato l'utilizzo di pannelli ampi;
- c) Una serie di tumori di diversa origine istologica, per la determinazione del TMB, nei paesi dove questo biomarcatore è approvato dalle autorità regolatorie.

Queste raccomandazioni riguardano la pratica clinica e quindi tengono conto della necessità di limitare i costi del sequenziamento ai soli biomarcatori approvati nella pratica clinica. Allo stesso tempo, ESMO ha raccomandato che i centri di ricerca clinica eseguano sequenziamento con pannelli più ampi nell'ambito di programmi di screening molecolare, per aumentare l'accesso a farmaci

innovativi e ad accelerare la ricerca clinica, con particolare riguardo alle neoplasie in cui sono presenti alterazioni di livello II-IV numerose (mammella, pancreas ed epatocellulare).

Infine, ESMO riconosce che alcuni pazienti e medici potrebbero decidere di utilizzare ampi pannelli per la ricerca di mutazioni actionable in altre neoplasie. Tuttavia, questa strategia difficilmente porterà risultati utilizzabili se non collegata ad un programma di ricerca clinica e non dovrebbe comunque comportare oneri aggiuntivi per il sistema sanitario pubblico.

Le raccomandazioni ESMO hanno rappresentato il primo tentativo di dare una risposta organica ai quesiti sull'impiego delle tecnologie di NGS. Esse costituiscono pertanto un quadro di riferimento, in continuo aggiornamento sulla base dell'incremento delle conoscenze.

L'Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM) e la Società Italiana di Anatomia Patologica e Citopatologia (SIAPEC) hanno prodotto una serie di documenti sulla medicina di precisione, tra cui anche un documento sul "Tumor Board Molecolare" che ha definito alcuni criteri sulla selezione dei casi da sottoporre al MTB e quindi alla profilazione genomica. Nel 2021, l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) e la Federation of Italian Cooperative Oncology Groups (FICOG) ha coordinato un tavolo di lavoro a cui hanno partecipato anche AIOM e SIAPEC su Test Molecolari e Terapie Target In Oncologia. Il gruppo di lavoro ha concordato che le tecniche di NGS nella pratica clinica devono essere applicate in neoplasie selezionate in fase avanzata, in funzione del numero di target molecolari da rilevare, della loro complessità e della percentuale di pazienti con biomarcatori approvati dagli enti regolatori e da linee guida nazionali ed internazionali. È stato anche sottolineato che un test NGS effettuato per la identificazione di biomarcatori approvati nella pratica clinica rientra nelle normali procedure diagnostiche. In base alle attuali conoscenze, l'adenocarcinoma del polmone, il colangiocarcinoma, i carcinomi della prostata e dell'ovaio, sono stati individuati come esempi di tumori da sottoporre ad analisi NGS. È stato anche sottolineato che in queste neoplasie, l'impiego di tecnologie di NGS consente l'ottimizzazione di utilizzo del campione di tessuto e/o l'individuazione di alterazioni complesse o rare che non potrebbero essere rilevate con altre metodiche di analisi.

Il documento ISS/FICOG ha anche riconosciuto che l'elenco delle neoplasie in cui la tecnologia NGS è raccomandata, sia tuttavia soggetto a continuo aggiornamento sulla base delle nuove conoscenze. I pannelli NGS da utilizzare devono coprire tutte le alterazioni genetico-molecolari per le quali esiste una indicazione clinica e quindi SNV, indels, CNA, riarrangiamenti strutturali e fusioni, ove richiesto. Per le fusioni, il sequenziamento dell'RNA garantisce una migliore affidabilità diagnostica. Infine, il

gruppo di lavoro ha concordato che l'uso di pannelli ampi per il CGP dovrebbe essere consentito nel contesto di protocolli di ricerca clinica, mentre il WES non è ancora utilizzabile per scopi clinici nella profilazione delle neoplasie solide a scopo terapeutico.

Infine, recentemente l'American Society of Clinical Oncology (ASCO) ha pubblicato delle raccomandazioni cliniche sui test genomici somatici in pazienti con cancro metastatico o avanzato. In line generale, ASCO raccomanda l'impiego di pannelli multigenici in tutti i casi in cui esistano più biomarcatori genomici per i quali ci siano terapie approvate (forza della raccomandazione: forte) ma anche nei casi in cui ci sia un singolo biomarcatore genomico con associata terapia approvata (forza della raccomandazione: moderata). La sostanziale differenza tra le raccomandazioni ASCO ed ESMO deriva dalla approvazione da parte della Food & Drug Administration (FDA) ma non dell'European Medicine Agency (EMA, di alcuni biomarcatori agnostici, quali TMB e MSI. Se si aggiungono a questi due biomarcatori complessi anche le fusioni di NTRK, appare evidente la necessità di dover ricorrere a test multigenici in una larga frazione di pazienti oncologici. L'utilizzo di pannelli ampi favorisce anche l'individuazione di mutazioni rare, per le quali tuttavia terapie in indicazione non sono spesso disponibili. A tale riguardo, ASCO raccomanda l'arruolamento in studi clinici quando possibile, al fine di raccogliere dati sulla correlazione tra alterazioni genomiche ed efficacia di terapie target. Infine, ASCO raccomanda in maniera forte che i test siano eseguiti in laboratori certificati.

Da quanto esposto, appare evidente che le raccomandazioni internazionali vadano adattate alle realtà regionali e nazionali, tenendo conto della disponibilità di farmaci approvati e di studi clinici che offrano possibilità di accesso a nuovi farmaci.

1.4 Appropriata prescrivibile – popolazione target

L'impiego di pannelli multigenici NGS appare appropriato nella fase diagnostica iniziale in tutti i pazienti con tumore avanzato/metastatico in cui sia necessaria la valutazione di molteplici biomarcatori approvati nella pratica clinica, oppure non esistano opzioni terapeutiche standard. Tuttavia, la tipologia di analisi NGS, e quindi i pannelli da utilizzare, variano in base al quesito clinico al quale si deve rispondere. Si possono infatti distinguere almeno due diversi scenari clinici nei quali sono necessarie differenti approcci NGS:

- 1) Pazienti nei quali è necessario effettuare test di CGP con ampi pannelli genici, per identificare biomarcatori complessi o per una valutazione del profilo genomico ad ampio spettro a fini diagnostici, prognostici e/o predittivi;
- 2) Pazienti nei quali è opportuno l'impiego di pannelli di NGS per l'identificazione di specifiche alterazioni genomiche.

1.4.1 Utilizzo di pannelli di NGS per CGP

Le possibilità di applicare l'oncologia di precisione nella pratica clinica stanno progressivamente aumentando grazie alla disponibilità di un numero sempre maggiore di biomarcatori e di farmaci a bersaglio molecolare. Questo rapido progresso determinerà sempre di più il ricorso a tecniche di CGP per l'identificazione del quadro molecolare complessivo della neoplasia e per la determinazione di biomarcatori complessi. L'analisi genomica a largo spettro consente anche di individuare potenziali varianti patogenetiche germinali o comunque alterazioni associate ad una possibile sindrome genetica in oltre il 10% dei pazienti con tumori solidi, come dimostrato da recenti pubblicazioni. Questa strategia permette quindi la individuazione di soggetti a rischio di sviluppare neoplasie da sottoporre a programmi di screening, incrementando le possibilità di diagnosi precoce con impatti significativi sul numero di vite salvate e sui costi a carico del sistema sanitario. Il nostro paese deve quindi prepararsi a questa evoluzione dell'oncologia, garantendo al contempo l'appropriatezza prescrittiva e l'adeguato utilizzo delle risorse disponibili.

L'impiego di ampi pannelli multigenici per CGP appare attualmente appropriato nei casi in cui sia richiesta l'individuazione di biomarcatori complessi o per la ricerca ad ampio spettro di marcatori diagnostici, prognostici e/o predittivi in specifiche popolazioni di pazienti oncologici. In base alle attuali conoscenze, il ricorso a pannelli di CGP risulta quindi appropriato nelle situazioni cliniche di seguito descritte.

1.4.1.1 Carcinoma dell'ovaio

L'impiego degli inibitori di PARP (PARPi) è stato da lungo tempo approvato dall'EMA per il trattamento del carcinoma sieroso d'alto grado, delle tube di Falloppio o del peritoneo in donne con mutazioni somatiche o germinali in uno o entrambi i geni BRCA1 e BRCA2. Più recentemente, l'EMA ha esteso l'utilizzo dei PARPi in donne con carcinoma ovarico che abbiano un deficit di ricombinazione omologa (Homologous Repair Deficiency, HRD), in specifici setting di malattia. L'HRD è legato a mutazioni o inattivazioni dei geni BRCA 1/2 oppure di altri geni coinvolti nel

pathway dell'HR e la sua presenza è associata ad un beneficio simile a quello delle mutazioni di BRCA in pazienti che non presentano queste specifiche alterazioni genetiche.

L'approvazione dell'HRD pone diverse problematiche diagnostiche per la complessità di questo biomarcatore. Secondo le raccomandazioni ESMO, il test di riferimento per la determinazione dell'HRD nella prima linea di terapia è il Genomic Instability Score (GIS), un parametro calcolato da un test commercializzato da Myriad sulla base di tre alterazioni genomiche, la Large Scale Transition (LST), la Telomeric Allelic Imbalance (TAI) e la Loss of Heterozygosity (LOH), mentre per la seconda linea è accettabile anche il solo parametro LOH.

Diversi pannelli commerciali sono stati recentemente sviluppati per la valutazione dell'HRD. Tutte queste tecnologie sono basate sul sequenziamento di ampie regioni genomiche per la determinazione di alterazioni strutturali del genoma tipiche dell'HRD. I test per la determinazione dell'HRD sono eseguiti su campioni FFPE di tessuto tumorale e consentono anche la individuazione di eventuali mutazioni di BRCA 1 e 2. La natura germinale di queste alterazioni dovrà essere poi valutata mediante test su campione di DNA germinale.

La determinazione dell'HRD con ampi pannelli genomici appare quindi indicata alla diagnosi di carcinoma sieroso d'alto grado, delle tube di Falloppio o del peritoneo per un corretto inquadramento diagnostico e per l'appropriata pianificazione terapeutica.

L'incidenza di queste neoplasie è di circa 5180 casi/anno, che rappresentano pertanto la popolazione target per questa neoplasia.

14.1.2. Tumori di origine sconosciuta (CUP)

I tumori di origine sconosciuta (CUP) sono una rara condizione clinica che tuttavia pone importanti problematiche per quanto riguarda sia la loro diagnosi che la terapia. Una analisi di CGP può fornire importanti informazioni per la diagnosi della malattia, per l'inquadramento prognostico e per l'identificazione di eventuali marcatori predittivi di risposta alla terapia target e/o all'immunoterapia, in pazienti per i quali non esistono valide alternative terapeutiche. I pannelli di NGS da utilizzare per questa applicazione devono pertanto essere in grado di rilevare tutte le principali alterazioni genomiche driver mediante sequenziamento del DNA ed eventualmente dell'RNA, nonché biomarcatori complessi come MSI, TMB ed HRD e firme mutazionali.

Si stima che l'incidenza di casi di CUP in Italia sia di circa 2000 casi.

14.1.3. Tumori solidi avanzati per i quali non sono disponibili alternative terapeutiche

La disponibilità di nuove tecnologie di profilazione genomica e di numerosi farmaci a bersaglio molecolare potenzialmente attivi contro specifiche alterazioni genetiche, offre possibilità di trattamento anche per pazienti che hanno esaurito le linee standard di terapia e per i quali non esistono valide alternative terapeutiche. Tuttavia, gli studi di profilazione genomica prospettica che non hanno selezionato i pazienti in maniera adeguata, hanno fallito in molti casi di dimostrare l'efficacia di questa strategia.

Al fine di garantire l'appropriatezza prescrittiva, l'utilizzo di pannelli di CGP dovrà essere quindi attentamente valutata nell'ambito dei Molecular Tumor Board (MTB), ai quali deve essere demandata la possibilità di prescrizione di test di CGP in questo setting di malattia.

L'accesso ai test di CGP dovrebbe essere limitato a popolazioni di pazienti che rispettino criteri clinici stringenti. Requisiti fondamentali per l'accesso ai test CGP sono:

- a) Un'aspettativa di vita di almeno 6 mesi;
- b) Un buon Performance Status (PS 0-1);
- c) L'assenza di altre possibilità terapeutiche considerate efficaci nel trattamento della malattia;
- d) L'assenza di biomarcatori approvati in pratica clinica o, in alternativa, la resistenza clinica ai farmaci molecolari disponibili;
- e) La disponibilità di un campione biologico per la profilazione genomica.

In base a queste considerazioni, l'impiego di tecniche di CGP potrebbe essere preso in considerazione già alla diagnosi in pazienti affetti da neoplasie rare orfane di approcci terapeutici riconosciuti. Per le neoplasie solide per le quali esistano opzioni terapeutiche valide, le tecniche di CGP dovranno essere riservate ai pazienti in linee avanzate di trattamento, che abbiano esaurito le opzioni terapeutiche disponibili e possiedano i requisiti fondamentali descritti. Complessivamente, si stima che circa 11.000 pazienti/anno con queste caratteristiche potrebbero essere sottoposti a CGP.

14.1.4. Tumori solidi pediatrici

Numerosi farmaci a bersaglio molecolare sono in fase di valutazione in diversi studi clinici per l'impiego clinico in pazienti con tumori pediatrici solidi che presentino alterazioni driver. Di recente diversi consorzi internazionali (come Inform, MAPPYACTS, iTHER ecc.), nati con lo scopo di identificare alterazioni genetiche che possono servire come bersagli terapeutici, hanno dimostrato

che 30-40% dei tumori pediatrici presenta potenziali alterazioni farmacologicamente bersagliabili. Sulla base di questi studi sono stati selezionati i geni driver dei tumori solidi più comuni per i quali sono in corso studi clinici che testano l'efficacia di farmaci molecolari e che quindi sono accessibili mediante programmi di expanded access o richieste su base individuale.

In questi casi è quindi raccomandato l'utilizzo di pannelli di CGP, data la rarità delle neoplasie, la bassa frequenza di molteplici alterazioni target, la prognosi infausta e l'assenza di valide alternative terapeutiche.

Gene	Alterazione genomica	Frequenza
Neuroblastoma		
ALK	SNV, CNV	≈ 20%
Aurora A kinase	CNV	≈ 20%
CDK4/6	CNV	≈ 1-2%
MEK	SNV	≈ 1-2%
MDM2	SNV	≈ 1-2%
Medulloblastoma		
SMO: SHH pathway	SNV, CNV	≈ 30%
CDK4/6	SNV, CNV	≈ 30%
CK2: SHH pathway	SNV, CNV	≈ 30%
Low grade glioma		
BRAF/NF1/NRAS/KRAS: Ras/Raf Pathway	SNV, fusion	≈ 15%
High Grade glioma		
BRAF V600	SNV	≈ 7%
Rhabdoid Tumors		
SNF5, SMARCB1, BAF47, SMARCA	SNV, CNV	≈ 10%
Ewing Sarcoma		
CDK4 and CDK6	CNV	≈ 10%
mTOR	SNV, CNV	≈ 1%
Osteosarcoma		

MTOR	SNV, CNV	≈ 20%
Cyclin D1 - CDK4/6 - Rb pathway	SNV, CNV	≈ 20%
Neuroblastoma		
ALK	SNV, CNV	≈ 20%
Aurora A kinase	CNV	≈ 20%
CDK4/6	CNV	≈ 1-2%
MEK	SNV	≈ 1-2%
MDM2	SNV	≈ 1-2%
Medulloblastoma		
SMO: SHH pathway	SNV, CNV	≈ 30%
CDK4/6	SNV, CNV	≈ 30%
CK2: SHH pathway	SNV, CNV	≈ 30%
Low grade glioma		
BRAF/NF1/NRAS/KRAS: Ras/Raf Pathway	SNV, fusion	≈ 15%
High Grade glioma		
BRAF V600	SNV	≈ 7%
Rhabdoid Tumors		
SNF5, SMARCB1, BAF47, SMARCA	SNV, CNV	≈ 10%
Ewing Sarcoma		
CDK4 and CDK6	CNV	≈ 10%
mTOR	SNV, CNV	≈ 1%
Osteosarcoma		
MTOR	SNV, CNV	≈ 20%
Cyclin D1 - CDK4/6 - Rb pathway	SNV, CNV	≈ 20%
Neuroblastoma		
ALK	SNV, CNV	≈ 20%
Aurora A kinase	CNV	≈ 20%

CDK4/6	CNV	≈ 1-2%
MEK	SNV	≈ 1-2%
MDM2	SNV	≈ 1-2%
Medulloblastoma		
SMO: SHH pathway	SNV, CNV	≈ 30%
CDK4/6	SNV, CNV	≈ 30%
CK2: SHH pathway	SNV, CNV	≈ 30%
Low grade glioma		
BRAF/NF1/NRAS/KRAS: Ras/Raf Pathway	SNV, fusion	≈ 15%

Tabella 1: Geni driver dei tumori solidi pediatrici per i quali sono disponibili farmaci in corso di approvazione per la pratica clinica accessibili

L'incidenza dei tumori solidi più comuni per i quali è possibile una terapia a bersaglio molecolare (Dati Registro AIEOP 2008-2010, età: 10-14 anni) è stimata in:

- Tumori del sistema nervoso centrale: 255 casi per anno
- Neuroblastoma: 122 casi per anno
- Tumori dei tessuti molli e altri sarcomi extra ossei: 84 casi per anno
- Tumori maligni delle ossa: 55 casi per anno

1.4.2 Utilizzo di pannelli NGS per l'identificazione di specifiche alterazioni genomiche

Le linee guida nazionali ed internazionali hanno individuato una serie di neoplasie nelle quali è raccomandato l'utilizzo di tecniche di NGS per la profilazione genomica nella pratica clinica. L'impiego di pannelli di NGS è in generale preferito rispetto alle metodiche tradizionali in tutti i casi in cui si devono analizzare molteplici alterazioni genomiche, ai fini di ridurre i tempi di analisi e ottimizzare l'impiego del tessuto tumorale disponibile. Il sequenziamento con NGS consente anche di avere informazioni che potrebbero contribuire a migliorare gli approcci di medicina di precisione. Ad esempio, in caso di fusioni geniche l'utilizzo dell'NGS permette di identificare il partner di fusione e, quindi, di rilevare possibili differenze prognostiche e/o predittive delle differenti fusioni. Inoltre, evidenze crescenti suggeriscono un possibile ruolo di co-mutazioni nella resistenza alla terapia con farmaci a bersaglio-molecolare, sebbene questo parametro non sia ancora impiegato per decisioni terapeutiche.

Il numero delle neoplasie in cui è raccomandabile l'impiego dell'NGS per la profilazione genomica è in continuo aumento per l'incremento dei biomarcatori approvati per l'impiego clinico o per i quali è comunque possibile accedere a trattamenti attraverso diversi approcci (uso compassionevole, expanded access, etc.). Di seguito sono elencate le neoplasie per le quali, in base alle attuali evidenze, è raccomandato l'impiego di pannelli NGS multigenici.

1.4.2.1 Carcinoma del polmone non a piccole cellule (NSCLC)

Numerosi farmaci a bersaglio molecolare sono stati approvati per l'impiego clinico in pazienti con NSCLC avanzato/metastatico che presentino alterazioni driver. Le principali mutazioni driver per le quali ci sono farmaci approvati sono state prevalentemente rilevate nell'adenocarcinoma polmonare, per le quali le attuali linee guida suggeriscono la profilazione genetico-molecolare. Infatti, circa il 40% dei pazienti con adenocarcinoma polmonare possiede alterazioni driver per le quali sono disponibili farmaci già approvati per l'impiego clinico o in fase avanzata di sperimentazione ed accessibili attraverso diverse modalità. I dati della letteratura suggeriscono che anche i soggetti non fumatori che hanno ricevuto una diagnosi di carcinoma del polmone di istotipo non-adenocarcinoma mediante un prelievo citologico oppure una ago-biopsia, dovrebbero essere sottoposti a profilazione genomica, essendo stata dimostrata l'esistenza di tumori ad istologia mista con mutazioni driver.

Le alterazioni genomiche driver del carcinoma polmonare per le quali sono disponibili farmaci e che pertanto devono essere incluse in pannelli NGS per la pratica clinica sono:

Gene	Alterazione genomica	Frequenza
EGFR	SNV, indels	≈ 10%
ALK	Fusioni geniche	≈ 4%
ROS1	Fusioni geniche	≈ 1%
BRAF V600	SNV	≈ 1-2%
RET	Fusioni geniche	≈ 1-2%
NTRK	Fusioni geniche	≈ 0,2%
MET*	Riarrangiamento (METex14 skipping)	≈ 3%

KRAS*	SNV (G12C)	≈ 13%
ERBB2*	Indels, CNA	≈ 2%

* biomarcatori per i quali non sono disponibili farmaci approvati dal SSN

Tabella 2: geni driver del carcinoma polmonare per i quali sono disponibili farmaci approvati per la pratica clinica oppure accessibili mediante programmi di expanded access o richieste su base individuale

L'incidenza degli adenocarcinomi del polmone avanzati/metastatici è di circa 13.500 casi/anno, che rappresentano la popolazione target per questa neoplasia.

1.4.2.2 Colangiocarcinoma

I colangiocarcinomi (CCA) rappresentano il 10-25% delle neoplasie epatiche primarie e il 3% di tutte le neoplasie gastrointestinali. I CCA che originano nel fegato (derivanti dai dotti o dai dotti segmentali) sono classificati come colangiocarcinoma intraepatico (iCCA), mentre quelli che si verificano nelle porzioni perilari o distali delle vie biliari sono classificati come colangiocarcinoma extraepatico (eCCA). La maggior parte dei pazienti con CCA ha una malattia avanzata o metastatica alla diagnosi e le opzioni di trattamento per la malattia non resecabile sono limitate, con conseguente prognosi infausta. Tuttavia, la recente identificazione di alterazioni genomiche mirate ha ampliato le opzioni di trattamento per i pazienti con CCA.

Le linee guida nazionali ed internazionali raccomandano l'impiego di pannelli multigenici per l'individuazione nei pazienti con CCA di alterazioni genomiche driver per le quali sono disponibili farmaci approvati per la pratica clinica oppure accessibili mediante programmi di expanded access o richieste su base individuale. Sebbene le alterazioni genomiche con farmaci attualmente approvati siano più frequenti nel iCCA, l'aggressività della malattia e l'assenza di terapie efficaci oltre la prima linea di trattamento suggeriscono di sottoporre a profilazione genomica tutti i casi di CCA.

Le alterazioni driver da analizzare nel CCA sono descritte nella seguente tabella:

Gene	Alterazione genomica	Frequenza
IDH1*	SNV	≈ 20%
FGFR2	Fusioni geniche	≈ 15%
NTRK	Fusioni geniche	≈ 2%
MSI/dMMR	-	≈ 2%
BRAF V600	SNV	≈ 5%
ERBB2*	Indels	≈ 2%

	CNA	≈ 10%
--	-----	-------

* biomarcatori per i quali non sono disponibili farmaci approvati dal SSN

Tabella 3: geni driver del CCA per i quali sono disponibili farmaci approvati per la pratica clinica oppure accessibili mediante programmi di expanded access o richieste su base individuale

L'incidenza del CCA metastatico è di circa 500 casi/anno, che rappresentano la popolazione target per questa neoplasia.

1.4.2.3 Carcinoma della prostata

Il carcinoma della prostata metastatico resistente alla castrazione (mCRPC) presenta frequentemente aberrazioni nei geni di riparazione del DNA. La presenza di queste alterazioni è predittiva di un beneficio clinico in pazienti trattati con PARPi, sebbene un'analisi esplorativa per gene abbia dimostrato che la maggior parte del beneficio è ottenuta nei pazienti con mutazioni somatiche di BRCA1/2. Data la complessità delle mutazioni dei geni BRCA, è raccomandato l'utilizzo di pannelli di NGS per analizzare almeno le mutazioni di BRCA 1/2 nel tessuto tumorale di pazienti con mCRPC. Pannelli più ampi per valutare alterazioni aggiuntive, come da tabella seguente, possono essere utilizzati se non rappresentano un costo aggiuntivo per il sistema sanitario pubblico:

Gene	Alterazione genomica	Frequenza
BRCA 1/2	SNV, CNA	≈ 9%
MSI/dMMR*	-	≈ 1%
NTRK	Fusioni geniche	≈ 0,2%
ATM*	SNV, CNA	≈ 5%
PTEN*	SNV, CNA	≈ 40%
PALB2*	SNV	≈ 1%

* biomarcatori per i quali non sono disponibili farmaci approvati dal SSN

Tabella 4: geni driver del mCRPC per i quali sono disponibili farmaci approvati per la pratica clinica oppure accessibili mediante programmi di expanded access o richieste su base individuale

I nuovi casi di mCRPC sono circa 500/anno, che rappresentano la popolazione target per questa neoplasia.

1.4.2.4 Carcinoma della tiroide

I carcinomi della tiroide sono neoplasie relativamente rare che presentano peculiari caratteristiche genetico-molecolari che offrono possibilità di intervento terapeutico con farmaci a bersaglio molecolare. In particolare, i tumori midollari della tiroide (medullary thyroid cancer, MTC) presentano una elevata frequenza di SNV del gene RET. Alterazioni di questo gene sono infatti praticamente trovate a livello germinale in tutti i casi di MTC associato alle sindromi caratterizzate da multiple neoplasie endocrine (MEN2), che rappresentano circa il 25% dei MTC. Inoltre, mutazioni somatiche di RET sono state identificate in circa il 55% dei MTC sporadici. Recentemente, inibitori di RET hanno dimostrato elevata attività clinica in pazienti con MTC RET-mutato. Le raccomandazioni ESMO per il test del gene RET nel MTC suggeriscono di eseguire prima una valutazione su DNA germinale e, se questa dovesse risultare negativa, analizzare il DNA estratto da tessuto FFPE per la ricerca di varianti somatiche di RET. ESMO raccomanda l'impiego di NGS soprattutto per l'analisi del DNA estratto dal tessuto tumorale, per garantire una migliore copertura di tutte le possibili varianti di RET.

Diverse alterazioni driver sono state anche identificate nei tumori tiroidei non-MTC, ovvero i tumori tiroidei differenziati (DTC), papillari (PTC), follicolari (FTC) ed anaplastici (ATC). Riarrangiamenti del gene RET che determinano fusioni geniche sono state identificate in circa il 10% dei pazienti, nei quali gli inibitori di RET dimostrano un'importante attività clinica. Dati preliminari suggeriscono anche che pazienti con ATC e mutazioni di BRAF hanno un beneficio clinico dal trattamento con combinazioni di inibitori di BRAF e MEK. Pertanto, è indicato l'impiego di tecniche di NGS per il sequenziamento del DNA e dell'RNA isolato dal tessuto tumorale per l'analisi delle alterazioni genomiche indicate nella seguente tabella:

Gene	Alterazione genomica	Frequenza
RET	Fusioni geniche	≈ 10%
NTRK	Fusioni geniche	≈ 2%
BRAF V600*	SNV	10-50%

* biomarcatori per i quali non sono disponibili farmaci approvati dal SSN

Tabella 5: geni driver del carcinoma della tiroide non-midollare per i quali sono disponibili farmaci approvati per la pratica clinica oppure accessibili mediante programmi di expanded access o richieste su base individuale

I nuovi casi di carcinoma della tiroide midollare e non-midollare avanzato/metastatico da sottoporre ad analisi NGS con pannelli target sono circa 900/anno.

1.4.2.5 Carcinoma del colon-retto

Le linee guida nazionali ed internazionali raccomandano che tutti i pazienti con carcinoma del colon-retto metastatico siano analizzati per le mutazioni di KRAS e NRAS negli esoni 2, 3 e 4 alla diagnosi, in quanto queste alterazioni rappresentano meccanismi di resistenza agli anticorpi monoclonali anti-EGFR. È inoltre raccomandata la valutazione delle mutazioni di BRAF e della MSI, sia per il ruolo prognostico che predittivo, essendo disponibili terapie mirate per questi sottogruppi di pazienti. ESMO raccomanda anche che i pazienti con tumori RAS wild type siano analizzati anche per l'amplificazione di ERBB2, in genere valutata mediante IHC oppure FISH, sebbene non siano disponibili attualmente farmaci approvati. Infine, le fusioni di NTRK sono rare nel carcinoma del colon-retto e quindi la fattibilità del loro screening va valutata. Le fusioni geniche sono più frequenti in pazienti con MSI ed in genere mutualmente esclusive con altre mutazioni driver (KRAS, NRAS, BRAF). Lo screening delle fusioni di NTRK può essere effettuato con IHC e successivamente confermato con NGS.

Le linee guida ESMO raccomandano che i pazienti con carcinoma del colon-retto metastatico vengano analizzati per le alterazioni in tabella 4 con NGS, se questa tecnologia non determina costi aggiuntivi rispetto alle tecniche standard di analisi. Tuttavia, va anche sottolineato che l'utilizzo di tecniche di NGS rispetto agli approcci convenzionali di PCR ha il vantaggio di fornire una stima quantitativa delle mutazioni, consentendo pertanto di valutare l'impatto della frequenza di alleli RAS mutati sulla resistenza ai farmaci anti-EGFR, come suggerito dalle linee guida AIOM per il trattamento del carcinoma del colon-retto metastatico.

Gene	Alterazione genomica	Frequenza
KRAS	SNV	≈ 45%
NRAS	SNV	≈ 4%
BRAF V600	SNV	≈ 8%
MSI/dMMR	-	≈ 4%

NTRK	Fusioni geniche	≈ 0,2%
ERBB2*	CNA	≈ 2%

* biomarcatori per i quali non sono disponibili farmaci approvati dal SSN

Tabella 6: geni driver del carcinoma del colon-retto per i quali sono disponibili farmaci approvati per la pratica clinica oppure accessibili mediante programmi di expanded access o richieste su base individuale

I nuovi casi di carcinoma del colon-retto da sottoporre ad analisi NGS con pannelli target sono circa 11.000/anno.

1.4.2.6 Carcinoma dell'endometrio

Recentemente, è stata proposta una stratificazione molecolare del carcinoma dell'endometrio che ha importanti risvolti prognostici e che, quindi, risulta fondamentale per una corretta programmazione terapeutica. In particolare, sono stati individuati quattro distinti gruppi molecolari: i) ultramutato con varianti patogene nel dominio esonucleasico della DNA polimerasi epsilon (POLE); (ii) ipermutato con MSI; (iii) con alto CNA e frequenti varianti patogeniche di TP53 e (iv) con basso CNA e frequenti alterazioni del signaling di fosfoinositide 3-chinasi (PI3K) e WNT. ESMO ha proposto un algoritmo diagnostico semplice e chiaramente definito per la classificazione molecolare del carcinoma dell'endometrio di qualsiasi tipo istologico, basato sull'analisi iniziale delle varianti di POLE. Successivamente, per casi che non hanno una variante POLE patogenetica, è raccomandata in successione la valutazione della MSI, ed infine quella di TP53 con immunoistochimica. Le linee guida ESGO/ESTRO/ESP suggeriscono di integrare l'analisi IHC di TP53 con quella molecolare. Pertanto, appare appropriato nella caratterizzazione genetico molecolare del carcinoma dell'endometrio, l'impiego di pannelli di NGS che coprano almeno le mutazioni di POLE e possibilmente gli altri biomarcatori prognostici e/o predittivi.

Gene	Alterazione genomica	Frequenza
POLE	SNV	5-15%
TP53	SNV	5-15%
MSI/dMMR	-	25-30%
NTRK	Fusioni geniche	≈ 0,2%

Tabella 7: geni driver del carcinoma dell'endometrio le cui alterazioni hanno rilevanza prognostica e/o predittiva

I nuovi casi di carcinoma dell'endometrio sono circa 8400/anno.

1.4.2.7 Carcinoma uroteliale

Studi su larga scala che hanno impiegato tecniche di NGS hanno rivelato un grado elevato di eterogeneità mutazionale e un'alta frequenza di mutazioni somatiche del carcinoma uroteliale rispetto ad altri tumori solidi. Questi studi hanno anche rivelato alcune mutazioni driver che offrono possibilità di intervento terapeutico. In particolare, i tumori uroteliali presentano un'elevata frequenza di alterazioni genomiche a carico dei geni della famiglia dell'FGFR. A tale riguardo, farmaci inibitori di FGFR sono stati approvati per il trattamento di pazienti con carcinoma uroteliale avanzato o metastatico ed alterazioni a carico dei geni FGFR, quali mutazioni di FGFR3 e fusioni di FGFR2 e FGFR3.

Per l'identificazione di queste varianti è suggerito l'impiego di tecnologie di NGS se queste non comportano costi aggiuntivi per il SSN rispetto alle metodiche standard.

Gene	Alterazione genomica	Frequenza
FGFR3	SNV	≈ 15%
FGFR3	Fusioni geniche	≈ 6%
NTRK	Fusioni geniche	≈ 0,3%
MSI/dMMR*	-	≈ 3%
ERBB2*	Indels	≈ 9%
	CNA	≈ 5%

* biomarcatori per i quali non sono disponibili farmaci approvati dal SSN

Tabella 8: geni driver del carcinoma del colon-retto per i quali sono disponibili farmaci approvati per la pratica clinica oppure accessibili mediante programmi di expanded access o richieste su base individuale

I casi attesi di carcinoma uroteliale avanzato/metastatico sono circa 1500/anno.

1.4.2.8 Sarcomi

La presenza di numerose varianti istologiche, spesso a bassa prevalenza e caratterizzate da una intrinseca eterogeneità, sono alla base della complessità nella diagnosi di sarcoma. A corollario della più classica indagine morfologica e dei marcatori immunocitochimici di differenziazione, l'approccio molecolare ha acquisito notevole rilevanza. In particolare, la ricerca di alterazioni geniche patognomoniche avvantaggia la diagnosi differenziale tra forme diverse di sarcoma e tra sarcomi e altre neoplasie di diversa natura e la distinzione tra lesioni mesenchimali benigne e maligne. La metodica di sequenziamento a carico dell'RNA è, in questo contesto, in grado di identificare i trascritti di fusione derivanti dalle aberrazioni strutturali dei cromosomi istotipo-specifiche.

Oltre a questo approccio di rilevanza diagnostica, la presenza di fusioni specifiche che coinvolgono geni codificanti recettori tirosin-chinasici come *ALK*, *NTRK1/2/3* e *PDGFRB*, rappresentano importanti target di analisi molecolare in ottica prognostica e/o predittiva alla risposta di specifiche terapie a bersaglio molecolare.

La FISH (DNA) o la RT-PCR (RNA) sono le metodiche classiche per rilevare le fusioni, ma l'avvento di tecnologie di sequenziamento massivo parallelo (NGS), consentono l'analisi simultanea di un ampio insieme di bersagli. I geni che possono originare trascritti di fusione nei sarcomi (riportati con il partner specifico), il tipo di sarcoma e il significato della alterazione (diagnostico e/o predittivo) sono*:

	Gene/Gene-Partner	Significato
Ewing Sarcoma	EWSR1-ERG EWSR-FLI1 EWSR1-PATZ1 FUS-ERG	Diagnostico
Dermatofibrosarcoma Protuberans	COL1A1-PDGFB	Diagnostico
Condrosarcoma mixoide extrascheletrico	EWSR1-NR4A3 EWSR1-ERG TAF15-NR4A3	Diagnostico
Fibrosarcoma congenito	ETV6-NTRK3	Diagnostico, Predittivo
Ewing-like Sarcoma	BCOR-CCNB3 CIC-DUX4	Diagnostico
Liposarcoma mixoide	FUS-DDIT3	Diagnostico
Rabdomiosarcoma alveolare	PAX3-FOXO1	Diagnostico

Carcinoma mioepiteliale (soft tissue)	EWSR1-ATF1	Diagnostico
Sarcoma Sinoviale	SS18-SSX1	Diagnostico
Rabdomiosarcoma, spindle cell	SRF- NCOA2	Diagnostico
Tumore Fibroso Solitario	NAB2-STAT6	Diagnostico

*lista esemplificativa dei sarcomi e delle alterazioni più comuni. Altre fusioni sono riportate nell'addendum X

Tabella 9: lista dei sarcomi, delle fusioni e del loro significato in ottica di diagnostica molecolare

L'incidenza dei sarcomi è di circa 2000 casi/anno, che rappresentano la popolazione target per questa neoplasia

1.4.2.9 Tumore mammario

Le amplificazioni di ERBB2 sono predittive del beneficio clinico delle terapie con anticorpi monoclonali anti-HER2 o anticorpi coniugati anti HER2 (trastuzumab, trastuzumab e pertuzumab, trastuzuman emtansine, trastuzumab deruxtecan, che producono un miglioramento della sopravvivenza globale (OS) e della PFS. Tucatinib (un pan-HER TKI irreversibile) in combinazione a trastuzumab e capecitabina ha anche dimostrato un beneficio di OS e PFS nei pazienti con tumori HER2 amplificati. L'uso di tucatinib e neratinib sono stati associati a risposte in pazienti con mutazioni ERBB2. Gli studi di fase III hanno riportato un miglioramento significativo della PFS con gli inibitori della poli ADP ribosio polimerasi (PARPi) in pazienti con carcinoma mammario metastatico (mBC) con mutazione BRCA1/2 germinale. Attualmente si stima che il sequenziamento multigenico non può sostituire il test della linea germinale per lo stato BRCA1/2. Alpelisib, un inibitore α -selettivo della fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K), migliora la sopravvivenza libera da progressione nei pazienti con tumore mammario metastatico HR+/HER2- che presenta mutazioni dell'hotspot PIK3CA ed è approvato in questo gruppo di pazienti. Farmaci mirati ad alterazioni rare riscontrate in diversi tumori solidi, come le fusioni ad alta instabilità dei microsatelliti (MSI-H) e NTRK, hanno ottenuto approvazioni per tutti i tipi di tumore. dove gli anticorpi anti-PDL1 sono approvati. Le mutazioni ESR1 si verificano in circa il 20% dei pazienti precedentemente trattati con inibitori dell'aromatasi e sono associate alla risposta ai degradatori selettivi del recettore degli estrogeni quali l'elasestrant ed il fulvestrant. Altri bersagli promettenti nell'mBC sono le mutazioni con perdita di funzione della fosfatasi e dell'omologo della tensina (PTEN) e/o delezioni omozigoti (TNBC) e le

mutazioni AKT1E17K, che nelle analisi retrospettive ed in studi prospettici randomizzati, rispettivamente, hanno mostrato un beneficio clinico e una maggiore reattività agli inibitori dell'AKT (capivasertib).

Sebbene numerose alterazioni actionable siano state identificate nel carcinoma della mammella, le raccomandazioni ESMO non includono al momento i carcinomi della mammella tra le neoplasie in cui è suggerito l'impiego di tecniche di NGS. Le pazienti con carcinoma della mammella da sottoporre a test NGS rientrano quindi nell'ambito dei criteri indicati nel paragrafo 14.1.3: Tumori solidi avanzati per i quali non sono disponibili alternative terapeutiche.

Gene	Alteration	Prevalence	ESCAT	References
ERBB2	Amplifications	15%–20%	IA	Slamon D, et al. <i>N Engl J Med.</i> 2001 Swain S, et al. <i>N Engl J Med.</i> 2015 Verma S, et al. <i>N Engl J Med.</i> 2012 Krop I, et al. <i>Lancet Oncol.</i> 2014 Murthy R, et al. <i>N Engl J Med.</i> 2020
	Hotspot mutations	4%	IIB	Hyman D, et al. <i>Nature.</i> 2018
PIK3CA	Hotspot mutations	30%–40%	IA	André F, et al. <i>N Engl J Med.</i> 2019
BRCA1/2	Germline mutations	4%	IA	Robson M, et al. <i>N Engl J Med.</i> 2017 Litton J, et al. <i>N Engl J Med.</i> 2018
	Somatic mutations	3%	IIIA	Balasubramaniam S, et al. <i>Clin Cancer Res.</i> 2017
	MSI-H	1%	IC	Marcus L, et al. <i>Clin Cancer Res.</i> 2019
NTRK	Fusions	1%	IC	Doebbele RC, et al. <i>Lancet Oncol.</i> 2020
ESR1	Mutations (mechanism of resistance)	10%	IIA	Fribbens C, et al. <i>J Clin Oncol.</i> 2016
PTEN	Mutations	7%	IIA	Schmid P, et al. <i>J Clin Oncol.</i> 2018
AKT1 ^{E17K}	Mutations	5%	IIB	Hyman D, et al. <i>J Clin Oncol.</i> 2017
NF1	Mutations (resistance biomarker)	6%	Not applicable	Pearson A, et al. <i>Clin Cancer Res.</i> 2020
MDM2	Amplifications	~1%	IIIA	Dembla V, et al. <i>Oncotarget.</i> 2018
ERBB3	Mutations	2%	IIIB	Hyman D, et al. <i>Nature.</i> 2018

Tabella 10: Raccomandazioni ESMO

1.5 Requisiti della rete laboratoristica nazionale

Al fine di consentire l'implementazione clinica della medicina di precisione, è necessaria la creazione di reti laboratoristiche a livello regionale nell'ambito delle reti oncologiche per gestire con maggiore efficienza i costi, promuovere lo sviluppo delle competenze tecniche, investire in tecnologie diagnostiche e accelerare i tempi di risposta indipendentemente dai volumi di campioni.

Il comma 1 dall'art. 29 del DL 25 maggio 2021, n. 73, convertito nella legge 23 luglio 2021, n. 106, prevede che: "Al fine di adeguare gli standard organizzativi e di personale ai processi di incremento dell'efficienza resi possibili dal ricorso a metodiche automatizzate, le regioni e le province autonome di Trento e di Bolzano favoriscono il completamento dei processi di riorganizzazione della rete delle strutture pubbliche e private accreditate eroganti prestazioni specialistiche e di diagnostica di laboratorio, attivati mediante l'approvazione dei piani previsti dall'articolo 1, comma 796, lettera o), della legge 27 dicembre 2006, n. 296, e inseriscono tra le strutture qualificate gli istituti di ricerca con comprovata esperienza in materia di sequenziamento di nuova generazione (NGS)." Lo stesso comma individua la soglia minima di efficienza di 5.000 campioni analizzati con tecnologia NGS.

È pertanto opportuno che in ogni regione siano identificati laboratori di riferimento con adeguato bacino di utenza e quindi flusso di campioni. Idealmente, i laboratori di una efficiente rete laboratoristica a supporto della medicina di precisione dovranno:

a) essere individuati in centri oncologici di riferimento pubblici o privati ad elevato numero di pazienti;

Gli HUB NGS per raggiungere la soglia di prestazioni indicata dovranno servire diverse discipline oltre l'oncologia (microbiologia, ematologia, etc.) e coprire adeguati bacini di utenza. L'individuazione di NGS HUB in centri di riferimento con elevata casistica di pazienti oncologici favorirà il raggiungimento della soglia di efficienza, vista anche la progressiva espansione dell'utilizzo di questa tecnologia nelle patologie oncologiche.

b) possedere adeguati livelli di organizzazione, competenze professionali e dotazione tecnologica per l'esecuzione dei test NGS;

I laboratori di riferimento per i test NGS dovranno possedere strutture adeguate, con disponibilità di ambienti dedicati e locali idonei alle diverse fasi di estrazione, allestimento, sequenziamento, analisi e conservazione dei dati di sequenziamento. I laboratori dovranno avere a disposizione strumentazioni NGS di ultima generazione. Onde evitare blocchi delle attività dovute a guasti, è opportuno che ogni centro di riferimento abbia a disposizione più sequenziatori. Inoltre, sono necessarie tecnologie per la validazione ortogonale di specifiche alterazioni genomiche.

Un centro di riferimento per analisi di NGS deve possedere un'adeguata dotazione organica, con personale adeguatamente formato (patologi, biologi, bioinformatici). Visto il rapido progresso tecnologico nel settore, il personale dovrà partecipare a programmi di aggiornamento e formazione continui.

c) essere accreditati ISO o CLIA

I laboratori di riferimento devono avere procedure operative standard (SOP) definite e validate per la gestione dei campioni e dei dati e la loro tracciabilità. A tale riguardo, sarà indispensabile avere la certificazione di qualità almeno ISO9001 e auspicabilmente la ISO15189.

d) effettuare verifiche interne ed esterne di qualità dei test

I test sviluppati in-house (Laboratory Developed Techniques, LDT) e i test commerciali non a scopo diagnostico dovranno essere validati con l'utilizzo di un numero adeguato di campioni che riproducano la pratica clinica alla quale sono destinati. La validazione di questi test dovrà seguire le norme della nuova regolamentazione dei test per la diagnostica in vitro (IVD), quando questa sarà implementata.

I test IVD certificati per l'impiego nella pratica clinica devono essere comunque sottoposti ad un processo di verifica simile a quello di validazione, seppur con un numero limitato di campioni. La verifica è necessaria a dimostrare che il laboratorio è in grado di riprodurre le performance attese del test impiegato.

Tutti i laboratori che eseguono test di patologia molecolare devono inoltre sottoporsi a controlli interni di qualità, che includono verifiche periodiche della performance del test. Infine è indispensabile la partecipazione agli schemi di verifica esterna di qualità (VEQ) di enti accreditati che coprano tutti i test/tecnologie diagnostiche sui biomarcatori predittivi.

A tal fine, è necessario prevedere risorse dedicate per finanziare l'adesione a programmi di certificazione di qualità ed incentivare l'adozione da parte di un maggior numero di laboratori delle buone prassi già esistenti in Italia a garanzia della qualità.

1.6 Educazione e gestione del paziente oncologico candidato a test NGS e gestione degli Incidental Findings

È essenziale nella gestione dei risultati dei test NGS l'aspetto riguardante la modalità con la quale informare e coinvolgere il paziente/rappresentante nella decisione di utilizzare il suo materiale biologico per l'esecuzione di test biomolecolari che possono essere utilizzati a fini di ricerca e di possibili scelte terapeutiche da parte del MTB.

Tutti i dati bioinformatici e clinici devono essere gestiti in una struttura informatica dedicata, in un database codificato (ossia, i dati non saranno associati alla identità del paziente ma solo al Suo codice identificativo) a cui avranno accesso solo i soggetti autorizzati e gli addetti all'inserimento dati. L'informatica moderna, con la capacità di raccogliere e analizzare grandissime quantità di dati fornisce lo strumento tecnico, ma è necessaria la partecipazione del paziente per assecondare e favorire questo processo, mantenendo tutte le prerogative di sicurezza e di segretezza del dato raccolto. Pertanto, tutti i dati bioinformatici e clinici verranno utilizzati solo per le finalità espresse nel consenso informato. Su richiesta del paziente/rappresentante si potrà ricevere un report delle analisi evidenziate dal test di ricerca.

Le indagini biomolecolari disegnano un profilo funzionale del tumore che può essere specifico per ogni singolo paziente o che può essere comune a tumori originati in organi diversi e a diversa istologia e questo permette di applicare un trattamento personalizzato. Tali indagini richiedono spesso lo studio di molti geni contemporaneamente attraverso l'applicazione di quelli che vengono definiti pannelli multigenici. L'esito di queste indagini potrebbe delineare un più vasto profilo delle mutazioni presenti nel tumore del paziente ed accidentalmente anche riscontrare la presenza di anomalie genetiche ereditarie, non espressamente ricercate e clinicamente finora silenti. Questo significa che potrebbero venire alla luce informazioni sulla predisposizione allo sviluppo di tumori, ma anche di altre patologie. Tali informazioni potranno anche riguardare i familiari, dato che il patrimonio genetico è parzialmente condiviso tra consanguinei. In presenza di mutazioni associate a rischio tumorale, potrebbe essere consigliato al paziente ed eventualmente ai suoi familiari, di intensificare programmi di screening e/o delle misure terapeutiche preventive. Questo verrà discusso e concertato in sede di consulenza genetica, se necessaria. I risultati genetici delle ricerche condotte sul materiale biologico sono comunicati al paziente/rappresentante, previo assenso, esclusivamente nei casi in cui tali risultati rappresentino un beneficio per la salute del paziente in termini di prevenzione, diagnosi, terapia o consapevolezza di scelte riproduttive. Inoltre, il DNA non è caratteristico della singola persona ma della famiglia (nucleo biologico). Pertanto, nel rispetto della normativa del paese di provenienza, i risultati possono essere consegnati a una terza persona,

appartenente alla stessa famiglia biologica, purché la richiesta sia posta per la necessità di tutelare la propria salute e/o effettuare scelte diagnostiche, terapeutiche e/o riproduttive consapevoli (Garante per la protezione dei dati personali n. 146/2019).

Le informazioni acquisite dagli studi compiuti con il materiale biologico e i dati ad esso associati potranno:

- essere condivisi in forma anonima con altri ricercatori per finalità di ricerca medico-scientifica;
- essere utilizzati, in forma anonima e aggregata, in pubblicazioni scientifiche;
- contribuire allo sviluppo di farmaci, terapie e strumenti diagnostici.

Gli eventuali proventi economici derivati dalla messa a punto di tali prodotti non comporteranno compensi diretti per chi mette a disposizione il proprio materiale biologico.

1.7 Definizione di una policy per la gestione di risultati indesiderati e legati a potenziali mutazioni germinali.

Il large-scale tumor DNA sequencing può comportare l'identificazione di mutazioni germinali con importanti implicazioni sulla gestione del paziente e dei suoi familiari. Sebbene rari (<1%), il MTB predefinisce la possibilità e la gestione di questi risultati inattesi al paziente attraverso l'informativa del consenso informato e dà avvio alle normali procedure istituzionali per la presa in carico dei pazienti e dei suoi familiari.

Si può verificare una discordanza tra i dati molecolari ottenuti in-house e quelli eventualmente eseguiti in altra sede. Tali discordanze possono essere causate da motivi biologici (l'eterogeneità tumorale) o analitici (diverse sensibilità tra piattaforme di analisi; errori di sintesi e lettura della PCR ecc.). Tali discordanze devono essere segnalate al laboratorio e l'analisi possibilmente ripetuta.

1.8 I Molecular Tumor Board (MTB)

Obiettivo fondamentale dei MTB è quello di colmare e superare il gap di comunicazione di conoscenza fra le diverse figure professionali, legato per esempio alla differente formazione dei clinici, che spesso hanno conoscenze limitate riguardo alla interpretazione dei dati delle tecnologie di biologia molecolare, e, viceversa, dei biologi molecolari, che spesso hanno scarsa contezza delle problematiche di gestione clinica dei pazienti. La discussione collegiale dei casi permette di integrare i differenti background specialistici al fine di garantire l'approccio diagnostico e la strategia terapeutica più appropriati per i pazienti oncologici. Infatti può accadere che limitate conoscenze

dei clinici riguardo i progressi della biologia molecolare possano portare a mantenere basso il numero di pazienti sottoposti alla ricerca di specifici biomarcatori predittivi di risposta terapeutica, così come ridotte conoscenze in ambito clinico dei biologi molecolari potrebbero portare a sottostimare, e di conseguenza non refertare o non dare informazione al clinico di alterazioni poco note per le quali non esistono trattamenti farmacologici. Questo è particolarmente vero soprattutto per quanto riguarda mutazioni rare o il cui ruolo non è ancora "codificato" nella gestione dei pazienti oncologici; in questi casi il dibattito potrebbe orientare verso un trattamento piuttosto che un altro, oppure qualora disponibile, permettere l'arruolamento del paziente in clinical trial in corso, in Italia o in altre parti del mondo. Il MTB analizza tutti i potenziali target tumorali messi in evidenza dalle analisi molecolari, li confronta con banche dati online, e infine fornisce raccomandazioni precise per eventuali trattamenti, più spesso, off-label. L'indicazione ad un trattamento si basa sulla probabilità che un paziente possa rispondere ad un farmaco già presente sul mercato ed utilizzato per altre indicazioni, ovvero disponibile in sperimentazioni cliniche, soppesando il rapporto rischio/beneficio e tenendo sempre in considerazione i principi etici, deontologici e normativi. Oltre che nella scelta delle strategie terapeutiche più appropriate, il MTB è fondamentale per risolvere problemi di altra natura, legati ad esempio alla scelta del campione più appropriato da sottoporre ad analisi molecolare in relazione alle condizioni cliniche generali del paziente (campione istologico, citologico, biopsia liquida), alla metodica molecolare (multiplex o target) ed al pannello genico (ampi pannelli vs. pannelli ristretti) che andrebbero utilizzati, ed infine all'interpretazione dei risultati ottenuti, in particolare nei casi dubbi. Il MTB può quindi aiutare i diversi professionisti coinvolti nella gestione del paziente oncologico a tradurre le complesse informazioni molecolari in un dato fruibile dai clinici al fine di stabilire il trattamento più appropriato per ciascun paziente.

Il comma 1.bis dell'articolo 8 del D.L. 152 del 2021 ha previsto l'istituzione dei Molecular Tumor Board (MTB) nell'ambito delle reti oncologiche regionali e l'individuazione dei centri specialistici per l'esecuzione dei test per la profilazione genomica estesa NGS, da parte di ciascuna regione e provincia autonoma.

1.9 La Refertazione del test NGS e del report del MTB

Nel contesto del flusso decisionale il MTB deve gestire e generare dei referti aggiuntivi a quelli abitualmente incontrati nella normale pratica clinica. Identifichiamo due documenti distinti: il referto molecolare, cioè un report contenente la lista delle alterazioni molecolari annotate riscontrate in un certo campione biologico, e il referto collegiale, ossia un atto che descrive il suggerimento del MTB a partire dalle informazioni diagnostico-molecolari presentate. Vengono di seguito descritte le caratteristiche e le peculiarità di entrambi i documenti.

Referto Molecolare

La necessità di generare un documento strutturato emerge dal cambiamento di approccio della Biologia Molecolare nella pratica clinica dei tessuti, particolarmente nel contesto delle Anatomie Patologiche degli Istituti Oncologici. Lo screening routinario all'interno delle Patologie è passato da una lista di alterazioni puntiformi validate con risultati binari a una lista di lunghe porzioni codificanti o interi geni da profilare via tecniche high-throughput. Per questo, la maggioranza dei reparti con un alto livello di processività si è attrezzata con tecniche di NGS. Questa rivoluzione, di forte miglioramento nell'ottica costo-effort-beneficio, ha posto di fronte a una sfida tecnologica i reparti di Patologia, trovatisi a gestire grosse moli di dati non strutturati nella loro analisi, interpretazione e archiviazione.

La risoluzione del nodo referto molecolare è stata affrontata in maniera asimmetrica dai diversi Istituti. Spesso si è ricorsi a una refertazione minimale, riportando in un template binario (MUT/WT) i risultati dei pannelli NGS. In alcuni casi, uno sforzo collaborativo tra Patologie, Laboratori di Ricerca e Unità di Bioinformatica ha prodotto referti automatizzati, contenenti diversi livelli di dettaglio e opzioni di filtraggio. Infine, altri si sono affidati a soluzioni commerciali, fornite dalle stesse ditte produttrici dei kit di sequenziamento, come modulo aggiuntivo alle pipeline standard di analisi dati. Di recente, le reti hanno prodotto delle linee guida nel tentativo di unificare il formato della refertazione molecolare nei diversi centri (XXXXX).

La spinta commerciale di soluzioni all-in-one dal vetrino al referto molecolare in questo contesto è stata un forte driver, da un lato di innovazione tecnologica e culturale, dall'altro di grandi speranze disattese quando questi test sono direttamente gestiti dai pazienti, condannati a districarsi tra annotazioni di azionabilità non standardizzate tra Paesi e continenti.

Informazioni campione e paziente

Nella parte superiore del report andrebbero riportate le informazioni minimali di riconoscimento del paziente, la patologia, il tipo di saggio effettuato, il tipo di campione, e la cellularità dello stesso.

Dettaglio alterazioni molecolari

Le alterazioni molecolari riportate nel referto molecolare forniranno indicazioni:

- sulla presenza di alterazioni nel numero di copie (Copy Number Alterations, CNA), ossia variazioni strutturali del DNA quali il guadagno o la perdita di copie di DNA contenenti il gene di interesse.
- sulla presenza di mutazioni nella regione codificante (esoni) o non-codificante (introni) del gene. Queste mutazioni possono essere classificate come 1) sostituzioni di singoli nucleotidi, da distinguere tra mutazioni sinonime (o silenti), nonsense (se l'alterazione del nucleotide di una tripletta determina la trasformazione dell'aminoacido in un codone di stop), missenso (se l'alterazione causa la sostituzione di un amminoacido con uno differente); 2) inserzioni/delezioni (indels) di uno o più nucleotidi che alterano la sequenza del trascritto, a loro volta distinguibili in indels in-frame (se relative a inserzioni/delezioni di nucleotide multipli di 3) e con indels con frame-shift (nel caso di indels di nucleotidi non divisibili per 3).
- sulla formazione di geni di fusione, risultato di riarrangiamenti cromosomici che portano a trascritti chimerici e la deregolazione anomala dei geni, che spesso assumono il ruolo di oncogeni nel tumore.

Azionabilità varianti

L'annotazione delle azionabilità delle varianti è un punto cruciale del referto. Fino a poco tempo fa, il numero di geni e alterazioni azionabili per patologia erano in numero estremamente scarso, e l'annotazione poteva avvenire con scarsa probabilità di errore da parte di un oncologo leggendo le poche linee guida disponibili. Con l'aumento dei farmaci approvati in diverse indicazioni, il processo di ricerca dell'azionabilità ricade sul MTB. Rimane la possibilità di aiutare il processo di refertazione con sistemi di ricerca azionabilità automatizzati o creando un database curato di annotazioni e clinical trials tramite un network di esperti. Recentemente è stato proposto un meta-knowledge base in grado di unificare 6 diversi sistemi di annotazione, tra i quali OncoKB, dal consorzio per l'interpretazione delle varianti nel cancro (VICC, <https://cancervariants.org>). All'interno del referto dovrebbe essere riportata quale scala è stata impiegata per l'annotazione, e discutere anche in sede di refertazione collegiale eventuali discrepanze tra azionabilità FDA/EMA o tra diversi sistemi di annotazione. Il principio di azionabilità delle alterazioni genomiche è critico per definire la

prescrizione di un determinato farmaco al paziente portatore della alterazione molecolare. Infatti, un framework che include protocolli di validazione standardizzati e riflette i concetti di (i) validità analitica (cioè la capacità di un test di misurare accuratamente l'analisi di interesse come definito ad es. dai parametri: accuratezza, precisione, sensibilità, specificità, positività e valori predittivi negativi), (ii) validità clinica (ossia l'accuratezza con cui un test genetico identifica una particolare condizione clinica rispetto a una categoria diagnostica, prognostica o predittiva) e (iii) utilità clinica (ossia se il test ed eventuali successivi gli interventi comportano un miglioramento dell'esito della salute tra le persone con un risultato positivo del test e i rischi che si verificano a seguito dell'esecuzione del test) dovrebbero essere universalmente considerati e applicati. L'ESMO raccomanda che i rapporti genomici includano la classificazione delle alterazioni genomiche tramite le scale ESCAT o OncoKb.

Clinical Trials

La possibilità di codificare l'azionabilità delle varianti prevede, nei casi di evidenze ancora in fase preclinica e di validazione, di collegare un'alterazione a un clinical trial per la combo Patologia/Alterazione/Farmaco. Questo processo è garantito come automatizzato da alcuni pannelli commerciali, mentre alcune biotech companies propongono dei Knowledge Base per associare varianti genomiche a Clinical Trial provenienti da database curati ibridamente da bot (automatizzata) e da panel di esperti (manuale). La nostra raccomandazione è di non includere i Clinical Trials direttamente nel referto, in quanto l'associazione variante-CT soffre di obsolescenza in maniera ancora più repentina delle associazioni variante-azionabilità. I Clinical Trials dovrebbero essere gestiti e consigliati dagli oncologi partecipanti al MTB, sfruttando delle piattaforme di ricerca su database aggiornati, in grado di ricercare la coppia Patologia/Alterazione a diversi livelli di granularità (e.g. NSCLC/BRAF MUT, NSCLC/BRAF V600E). Il sistema di generazione dei referti potrebbe essere collegato a questo motore di ricerca (es www.clinicaltrials.gov) per dare una prima lista di CT disponibili per la Patologia/Alterazione, da cui andare a considerare gli effettivi parametri clinici di eleggibilità.

Informazioni per Riproducibilità del saggio

Il rischio di avere un dato non riproducibile è concreto, per questo un referto dovrebbe contenere una serie di informazioni minime per permettere la ripetizione del test e dell'analisi dei dati, quali il tipo di kit di sequenziamento usato (batch number se disponibile) e la pipeline analitica completa di

versione. Le tecniche di virtualizzazione del software (e.g. Docker) sono di grande aiuto in questo contesto, in quanto permettono di incapsulare in un'immagine virtuale tutte le precise versioni degli algoritmi utilizzati per individuare le alterazioni molecolari. Stesso discorso vale per i database di annotazione: ad esempio, nel caso delle varianti germinali diversi consorzi gestiscono le annotazioni di patogenicità (e.g. <https://brcaexchange.org/>) che vengono aggiornate costantemente grazie a nuove evidenze statistiche, rimane quindi fondamentale riportare la versione esatta dei dataset utilizzati (e.g. COSMIC, dbSNP). Infine, un'indicazione utile da evidenziare è il tipo di analisi effettuata: se Tumor-Only o Tumor-Normal, soprattutto nel contesto di pannelli ad ampio target genomico.

Altre informazioni dettagliate quali la lista completa dei geni compresi nel saggio effettuato sono un buon addendum da aggiungere, plausibilmente nella parte finale del referto, per un controllo aggiuntivo. La necessità di metterli in coda emerge dalla forte espansione del target genomico dei pannelli standard.

Infine, è auspicabile aggiungere delle informazioni che supportano la robustezza del dato dal punto di vista logistico e ingegneristico, quali i controlli di qualità e le certificazioni del laboratorio che ha generato il risultato.

2. L'utilizzo di tecnologie NGS per l'analisi della biopsia liquida

Il termine biopsia liquida è generalmente utilizzato per indicare la possibilità di analizzare biomarcatori presenti nei fluidi biologici. Tra le varie applicazioni della biopsia liquida, quella che viene attualmente impiegata nella pratica clinica è il sequenziamento del DNA tumorale circolante (ctDNA) che viene rilasciato in quantità variabili dalle cellule neoplastiche.

L'analisi del ctDNA è stata per lungo tempo effettuata impiegando tecnologie basate sulla Real Time PCR o sulla PCR in emulsione, che hanno il vantaggio di avere una notevole sensibilità ma che allo stesso tempo presentano il limite di poter analizzare poche mutazioni per analisi. Più recentemente sono diventate disponibili nuove tecnologie di NGS a sensibilità elevata ed in grado di derivare il profilo genomico del tumore a partire dai pochi nanogrammi di ctDNA che in genere vengono estratti dal plasma dei pazienti oncologici. L'esecuzione di test su ctDNA richiede una maggiore profondità di sequenziamento rispetto a quanto necessario per l'analisi del tessuto tumorale, con costi di sequenziamento che sono dal 30% al 50% superiori a parità di regioni genomiche coperte.

ESMO ha recentemente pubblicato raccomandazioni sull'impiego dei test su ctDNA nella gestione dei pazienti oncologici (Pascual Ann Oncol 2023). Queste raccomandazioni hanno evidenziato che per i pazienti con cancro avanzato, saggi per l'analisi del ctDNA validati e adeguatamente sensibili sono utili nell'identificare mutazioni actionable per indirizzare la terapia a bersaglio molecolare e possono essere utilizzati nella pratica clinica di routine, a condizione che si tenga conto dei limiti della tecnologia. Infatti, la profilazione genomica del tessuto tumorale rimane l'approccio migliore per molti malati di cancro, a causa dei limiti dei test del ctDNA nel rilevare fusioni geniche e modifiche del numero di copie dei geni. Tuttavia, l'analisi del ctDNA è raccomandata quando è clinicamente importante avere i risultati del test in tempi rapidi o quando le biopsie tissutali non sono adeguate per la caratterizzazione molecolare. L'analisi del tessuto tumorale dovrebbe comunque essere sempre prevista in seguito a un risultato non informativo del test sul ctDNA, ovvero quando nessuna variante è stata identificata. Questi casi potrebbero infatti rappresentare dei risultati falsi negativi dovuti ai bassi livelli di ctDNA.

Diversi studi hanno dimostrato che la rilevazione del ctDNA nei pazienti trattati per tumori in fase iniziale consente di identificare una malattia molecolare residua o una recidiva molecolare e che questo dato ha un elevato valore prognostico. Tuttavia, questa applicazione non può essere raccomandata nella pratica clinica di routine, poiché attualmente non ci sono prove di utilità clinica nell'indirizzare la scelta terapeutica. Ulteriori potenziali applicazioni dei saggi del ctDNA, non attualmente raccomandati per la pratica di routine, includono l'identificazione dei pazienti che non rispondono alla terapia mediante la valutazione dei livelli di ctDNA, il monitoraggio della terapia per individuare lo sviluppo di mutazioni di resistenza prima della progressione clinica e lo screening delle persone asintomatiche per la diagnosi precoce di cancro, che rappresentano tuttavia sviluppi futuri dell'analisi del ctDNA.

Per quanto riguarda i criteri di appropriatezza prescrittiva dei test NGS per la biopsia liquida in pazienti con neoplasie in fase avanzata/metastatica, essi sono identici a quelli previsti per l'analisi del tessuto tumorale, con le limitazioni sopra descritte.

3. Conclusioni

Diversi studi hanno evidenziato una scarsa diffusione delle tecnologie di NGS per la profilazione genetica-molecolare delle neoplasie in Italia (Normanno Eur J Cancer 2022). Diversi fattori hanno sicuramente contribuito a questa limitazione, inclusa la mancanza di criteri di appropriatezza per l'utilizzo di questa tecnologia. Il limitato impiego di NGS rappresenta un'importante limitazione allo sviluppo dell'oncologia di precisione in Italia e, soprattutto, alla possibilità di accesso alle terapie innovative per i pazienti oncologici. Le tecniche di NGS consentono una migliore gestione dei campioni di tessuto, spesso limitati, e premettono l'analisi di tutti i biomarcatori in indicazione, in tempi limitati e senza il rischio di dover effettuare un nuovo prelievo biotico per poter completare la profilazione genomica. La disponibilità di pannelli di NGS a sensibilità elevata per l'analisi del ctDNA consente poi di superare il limite dell'assenza di materiale per la profilazione genetica-molecolare, che spesso rappresenta un limite per la possibilità di accedere a nuove terapie.

Importanti iniziative legislative e regolatorie sicuramente contribuiranno alla diffusione delle tecnologie di NGS in Italia. L'art. 29 del decreto-legge 25 maggio 2021, n. 73, convertito, con modificazioni, dalla legge 23 luglio 2021, n. 106, "Incentivo al processo di riorganizzazione della rete dei laboratori del Servizio sanitario nazionale", a cui è seguito il decreto del 30 dicembre 2021 avente ad oggetto la "Ripartizione dell'incentivo al processo di riorganizzazione della rete dei laboratori del Servizio sanitario nazionale (22A01344)", ha dettato alcuni criteri organizzativi per l'individuazione di centri che possano effettuare prestazioni di NGS. Oltre ad aver indicato l'opportunità di coinvolgere nella rete laboratoristica anche istituti di ricerca con comprovata esperienza in tecniche di NGS, ha anche stabilito un tetto di 5.000 campioni/anno da analizzare per centro ed ha individuato un budget per il raggiungimento di questo obiettivo. Questo decreto ha richiesto alle regioni di individuare centri di riferimento per l'esecuzione di test NGS, rappresentando pertanto il primo passo verso la centralizzazione di queste complesse analisi. Inoltre, sono stati istituiti due Fondi rivolti a finanziare test NGS per specifiche applicazioni. Il primo Fondo per i test NGS, con una dotazione pari a 5 milioni di euro per gli anni 2022 e 2023, è destinato al potenziamento di test di profilazione genomica dei tumori dei quali è riconosciuta evidenza e appropriatezza, ed è stato successivamente finalizzato alla profilazione genomica dell'adenocarcinoma del polmone. A questo è seguita l'individuazione di un secondo Fondo per i test NGS per il colangiocarcinoma di 600.000 euro per il triennio 2023-2025. I rispettivi Decreti Attuativi dei due Fondi prevedono criteri relativi alle caratteristiche dei laboratori, che devono avere

almeno 2 anni di esperienza di refertazione NGS, al timing dell’esecuzione del test e alla tipologia di test utilizzati.

Il presente documento vuole contribuire alla diffusione dei test NGS nel nostro Paese, indicando criteri di appropriatezza nell’utilizzo di questa tecnologia che dovranno poi essere seguiti dall’individuazione di centri di riferimento e dall’identificazione della di tariffe differenziate per le diverse tipologie di test (pannelli per CGP versus pannelli per identificazione di specifiche alterazioni target, analisi del tessuto versus sequenziamento del ctDNA), nell’ambito di un budget dedicato all’analisi dei biomarcatori per la medicina di precisione.



Consiglio Superiore di Sanità

Sessione LIII (2022-2025)

Sezione I

Pianificazione di sistema ed economica, Innovazione e ricerca, sviluppo di nuovi modelli di servizio nel SSN

Presidente: Prof. Paolo Vineis

Segretario tecnico: Dr. Stefano Moriconi

Gruppo di lavoro

"Proposta di regolamentazione per l'appropriatezza dell'utilizzo dei Test Multigenici NGS predittivi e prognostici nella pratica clinica" (TM NGS)

Prof. Giovanni Scambia

Coordinatore Gdl - vice Presidente Sezione I

Professore Ordinario Ginecologia e Ostetricia, Direttore UOC Ginecologia Oncologica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Policlinico A. Gemelli, Roma - Direttore Scientifico IRCCS Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli Roma - *Presidente European Society for Gynaecological Endoscopy (ESGE)*

Dr. Stefano Moriconi

Segretario tecnico

Coordinatore e Direttore Struttura tecnica di Segreteria della Sezione I del Consiglio Superiore di Sanità - Dirigente medico, Ministero della salute

Prof. Giuseppe Curigliano

Co-coordinatore - Consigliere Sezione V CSS

Professore Ordinario Oncologia Medica, Dipartimento di Oncologia e Emato-oncologia, Università degli Studi di Milano. Direttore Struttura complessa, Divisione di Sviluppo di Nuovi Farmaci per Terapie Innovative. IRCCS Istituto Europeo di Oncologia (IEO)

Prof.ssa Anna Sapino

Co-coordinatore Gdl

Professore Ordinario Anatomia Patologica, Direttore Dipartimento di Scienze Mediche, Università degli Studi di Torino. Direttore Scientifico IRCCS Istituto di Candiolo, Fondazione del Piemonte per l'Oncologia (FPO), Direttore SC Anatomia Patologica IRCCS Candiolo FPO (TO). *Presidente Società Italiana di Anatomia Patologica e Citologia (SIAPEC)*

Dott. Nicola Normanno

Direttore del Dip.to di Ricerca Traslazionale dell'Istituto Nazionale Tumori IRCCS Fondazione Pascale, Napoli.

Presidente International Quality Network for Pathology (IQNPath) - Presidente Società italiana di Cancerologia (SIC)

Prof. Americo Cicchetti

Professore Ordinario di Organizzazione Aziendale, Dip.to di Scienze dell'economia e della gestione aziendale, Facoltà di Economia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma.

Direttore dell'Alta Scuola di Economia e Management dei Sistemi Sanitari (ALTEMS)

Prof. Francesco Saverio Mennini

Professore di Economia Sanitaria e Economia Politica, Facoltà di Economia, Università di Roma "Tor Vergata"

Presidente Società Italiana di Health Technology Assessment (Sihta)

Società scientifiche:

Dott. Saverio Cinieri

Presidente nazionale Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM)

Direttore U.O.C. Oncologia Medica e Breast Unit, Presidio Osp.ro "Perrino", Brindisi

E-mail: saverio.cinieri@me.com aiom.presidente@aiom.it Tel. 02.70630279

Cell. 340.8657650

Prof. Achille Iolascon

Presidente Società Italiana di Genetica Umana (SIGU)

Professore Ordinario di Genetica Medica, Dipartimento di Medicina molecolare e Biotecnologie mediche, Università degli Studi di Napoli "Federico II"

IL COORDINATORE del GDL:

Prof. Giovanni Scambia

I VICE COORDINATORI del GDL:

Prof. Giuseppe Curigliano

Prof.ssa Anna Sapino

IL SEGRETARIO DELLA SEZIONE I

Dr. Stefano Moriconi

IL PRESIDENTE DELLA SEZIONE I

Prof. Paolo Vineis