

# A Translation of NGS report into clinical **action** (#AtTraction)

**19**  
settembre  
2022



**ATTI DELL'EVENTO**

SI RINGRAZIANO TUTTI COLORO CHE HANNO PARTECIPATO  
ATTIVAMENTE ALLA REALIZZAZIONE DI QUESTO PROGETTO,  
IN PARTICOLARE:

***Simonetta Buglioni***

Molecular Diagnostic Laboratory - Pathology Unit, Advanced Diagnostics and Technological Innovation Department, Regina Elena National Cancer Institute, Roma

***Umberto Malapelle***

Ricercatore Anatomia Patologica, Dip.to di Sanità Pubblica, Università degli Studi di Napoli Federico II

***Marcello Tiseo***

Professore Associato di Oncologia, Direttore Scuola di Specializzazione in Oncologia Medica, Università di Parma, SS di U.O. "Gestione attività ambulatoriali oncologiche complesse", Coordinatore PDTA di Oncologia Toracica, U.O. Oncologia Medica, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma

***Antonio Marchetti***

Professore Ordinario di Anatomia Patologica, Università di Chieti

***Antonio Russo***

Professore Ordinario di Oncologia Medica, Dip.to di Discipline Chirurgiche, Oncologiche e Stomatologiche, Università degli Studi di Palermo

***Giancarlo Troncione***

Capo Dipartimento di Sanità Pubblica, Università degli Studi di Napoli Federico II

***Laura Cortesi***

Responsabile Struttura Semplice di Genetica Oncologica, Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico Modena

***Filippo Fraggetta***

Anatomia Patologica, Ospedale Gravina di Caltagirone, ASP Catania

**A Translation of NGS  
report into clinical action  
(#AtTraction)**



In relazione al grande sviluppo della patologia oncologica e molecolare a cui si è assistito negli ultimi anni, i professionisti e le organizzazioni sanitarie hanno dovuto affrontare tante sfide per cercare di assicurare un'adeguata risposta ai bisogni che si sono venuti a creare.

Lo studio di un elevato numero di geni considerati biomarcatori molecolari di risposta al trattamento è risultato fondamentale al fine di definire una strategia terapeutica quanto più personalizzata possibile per pazienti affetti da specifiche neoplasie solide.

Per permettere la più corretta stratificazione clinica del paziente oncologico, le società internazionali IASCL/AMP/CAP hanno elaborando un pannello di "must test genes" che devono essere testati, ponendo chiarezza a riguardo.

Tra le neoplasie in cui lo studio di biomarcatori predittivi di risposta terapeutica risulta avere un'importanza fondamentale, ritroviamo sicuramente il carcinoma del polmone non a piccole cellule (NSCLC) e il carcinoma sieroso di alto grado dell'ovaio (HGOC).

Il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) è stato il primo biomarcatore ad essere approvato nella stratificazione del paziente affetto da NSCLC: infatti le mutazioni che ricadono nel dominio tirosino-chinasico di questo recettore permettono ai pazienti di essere trattati con piccole molecole mimetiche dell'ATP. Numerosi studi hanno dimostrato che quest'ultime conferiscono un beneficio clinico in termini di PFS mediana rispetto alla chemioterapia convenzionale.

L'efficacia e i numerosi vantaggi che la medicina personalizzata comporta al paziente ha portato al susseguirsi negli ultimi dieci anni di numerosissimi studi clinici, che hanno consentito l'introduzione di numerosi altri biomarcatori predittivi quali *BRAF*, se è presente la mutazione puntiforme p.V600E dell'esone 15, le traslocazioni a carico dei geni *ALK*, *ROS1* ed *NTRK*, targettabili con farmaci approvati e rimborsati in Italia, le traslocazioni di *RET*, le mutazioni causative dello *skipping* dell'esone 14 del gene *MET* e la mutazione puntiforme p.G12C di *KRAS*, targettabili invece con farmaci non approvati in Italia ma disponibili (CNN/EAP), e per ultimo il gene *HER2*, per le cui mutazioni è stato creato un farmaco al momento disponibile solo nei trail clinici.

Individuare il sottotipo istologico corrispondente al tumore solido in analisi risulta essere fondamentale al fine di individuare i *must genes* da analizzare. Il carcinoma del polmone non a piccole cellule è sicuramente l'istotipo polmonare per cui, sia in ambito di ricerca sia in pratica

clinica, si indaga il più alto numero di geni. Infatti circa il 40% dei NSCLC non-squamosi ha un target druggable. Tali farmaci target hanno numerosi vantaggi rispetto alle terapie tradizionali: hanno una risposta tumorale maggiore, più rapida, più profonda con durata della risposta e PFS in genere prolungate, inoltre hanno un buon profilo di tollerabilità e possibile impiego anche in pazienti anziani, spesso impossibilitati ad eseguire trattamenti standard.

In casi selezionati, ad esempio in soggetti giovani non fumatori o se i campioni che vengono testati sono piccole biopsie, che potrebbero essere non completamente rappresentative del tumore in analisi, può essere importante testare anche pazienti con NSCLC squamoso, per valutare se è possibile selezionare il paziente ai trattamenti target.

Le alterazioni con chiaro significato patogenetico a carico dei geni *BRCA1* e *BRCA2* fanno parte del pannello dei must test genes elaborato dalle società scientifiche, nei pazienti affetti da carcinoma sieroso di alto grado dell'ovaio. Le mutazioni definite "patogeniche" nelle proteine BRCA 1 e 2 consentono, in pazienti affetti da OC, il trattamento con inibitori di PARP (PARPi), enzima coinvolto nei meccanismi di riparo del DNA. Tali biomarcatori rappresentano il primo esempio di oncopressore che assume la funzione di selettore positivo ai fini dell'inquadramento clinico del paziente affetto da OC. Nel tumore dell'ovaio avanzato la percentuale delle mutazioni di tipo germinale-somatico, ad oggi detectabili, raggiunge il 50% dei campioni analizzati. Le mutazioni di tali geni possono essere dovute a numerosi fenomeni. Se la mutazione si verifica in seguito ad un deficit di ricombinazione omologa (HRD) si avrà una dis-regolazione nella via delle risorse umane che porta all'instabilità genomica e all'incapacità da parte della cellula di riparare efficacemente il DNA danneggiato. Le cellule HRD positive possono essere più suscettibili agli effetti di agenti dannosi per il DNA come agenti platino o inibitori PARP. Le mutazione tumorali dei geni oncosoppressori *BRCA1* o *BRCA2* possono essere sia di tipo germinale (gBRCAmut), che di tipo somatico (sBRCAmut).

Il trattamento con i PARP inibitori in prima linea è considerato al momento il migliore: infatti in pazienti con *BRCA* mutato è raccomandato il trattamento con Olaparib, in pazienti HRD+ invece la combinazione di due farmaci Olaparib+Bevacizumab sembra essere la più efficace. Questi farmaci, favorendo il riparo del DNA, migliorano la sopravvivenza e aumentano la qualità della vita dei pazienti, inducendo una prognosi statisticamente migliore, soprattutto in presenza di mutazioni di *BRCA* germinali.

Alla complessità del panorama mutazionale appena descritto si associa la difficoltà tecnico-analitica nell'eseguire il test molecolare: spesso il materiale biologico destinato all'analisi è scarso, in quanto l'esame è richiesto esclusivamente negli stadi IIB-IV di malattia, soprattutto nel NSCLC, o di bassa qualità, a causa di over fissazione dei campioni istologici, come spesso può accadere per l'HGOC. Nel tentativo di superare la problematica dell'esiguità del materiale di ottima qualità a disposizione su cui eseguire i differenti test molecolari, i laboratori di patologia molecolare hanno percepito l'esigenza di trasferire l'attività diagnostica su approcci analitici "multi testing", come ad esempio il sequenziamento genico di nuova generazione (NGS). L'utilizzo di piattaforme di sequenziamento genico di nuova generazione rappresenta il supporto tecnico più adeguato ai fini della caratterizzazione molecolare sia dei geni *BRCA1/2* per l'HGOC, sia dei biomarcatori associati allo NSCLC.

Fino allo scorso anno, per il sequenziamento genico di nuova generazione, nel laboratorio di patologia molecolare predittiva dell'Università degli studi di Napoli Federico II è stato utilizzato un pannello custom, il (SiRe®): questo è in grado di analizzare 568 hotspot mutazionali in sei geni (*EGFR, KRAS, NRAS, BRAF, cKIT e PDGFRA*).

Con l'introduzione di nuovi marcatori predittivi terapeutici, tale pannello è risultato essere troppo restrittivo: allo scopo di utilizzare un pannello che ad oggi risultasse quanto più completo possibile è stato selezionato l'Oncomine Precision Assay della ThermoFisher .

Per il carcinoma sieroso di alto grado dell'ovaio si è passati, in circa 24 mesi, dalla necessità di caratterizzare un singolo gene per fini terapeutici, all'esigenza di una visualizzazione panoramica molecolare complessissima. Il fatto che nella riparazione del DNA mediante HR vi siano tanti attori è di per sé una complicanza notevole dal punto di vista diagnostico ma, recentemente, è stato dimostrato rappresentare un'importante opportunità dal punto di vista terapeutico. La possibilità di trovare il corretto approccio diagnostico per l'identificazione dello status HRD attraverso differenti metodiche è un tema assai dibattuto dalla comunità scientifica, in particolare da quella interessata al carcinoma ovarico. Lo status del sistema di riparazione del DNA mediante HRR – deficitario o, al contrario, funzionante (deficient o proficient) – ha un riflesso terapeutico, in quanto influisce sulla sensibilità delle cellule tumorali agli inibitori di PARP.

Al fine di ottenere l'analisi dell'HRD, occorre un pannello molto ampio che valuti tutte le mutazioni presenti in un dato campione e, tramite un algoritmo, calcoli uno score.

Esistono numerosi pannelli in grado di analizzare l'HRD di cui sicuramente il Myriad MyChoice CDx è quello più completo e utilizzato.

Nella panoramica dei biomarcatori molecolari sempre più numerosi da ricercare, ha acquisito un valore fondamentale l'utilizzo della biopsia liquida. L'impiego di questo biofluido, soprattutto nell'ambito del NSCLC, risulta avere un'importanza fondamentale, soprattutto nei casi in cui non sia disponibile il materiale cito/istologico del paziente o questo fosse risultato inadeguato all'indagine molecolare. Inoltre la biopsia liquida acquisisce ancora più valore quando utilizzato per la gestione clinica e terapeutica del paziente nel tempo: può infatti essere d'aiuto per andare a tracciare la percentuale di allele mutato associato al tumore e seguire di questo andamento nel tempo, senza dover effettuare un nuovo prelievo di tessuto e, talvolta, portando anche un'anticipazione ai risultati delle indagini strumentali.

In ultima analisi, visto l'elevato numero di test molecolari da effettuare, la problematica della scarsa quantità e qualità di materiale, la necessità crescente di individuare biomarcatori in un timing strettissimo e la potenziale utilità della biopsia liquida nella ricerca di biomarcatori, le piattaforme di NGS rappresentano l'approccio più adeguato, non solo in ambito di ricerca ma anche in pratica clinica.

## OBIETTIVI DEL PROGETTO

Garantire una profilazione genomica completa che comporti una definizione terapeutica sempre più precisa e personalizzata per ciascun paziente conduce inevitabilmente all'aumento della complessità dei referti da elaborare. Al fine di garantire una comprensione completa dei referti a qualunque specialista debba interpretarli, risulta fondamentale condividere un codice univoco, concordato tramite discussioni multidisciplinari che coinvolgano tutti gli specialisti che si occupano della gestione di un paziente oncologico.

Questo progetto si pone l'obiettivo di migliorare la comunicazione tra le varie figure professionali (dall'oncologo, al patologo, fino al biotecnologo) coinvolte nel management dei dati ottenuti a seguito di un'analisi in NGS associata ad ogni singolo paziente. La comprensibilità dei referti rappresenta la chiave di connessione tra laboratorio e clinica.

## DISCUSSIONE

Per attribuire una vera valenza clinico-terapeutica ai risultati ricavati da un test in Next Generation Sequencing, risulta di fondamentale importanza l'interpretazione e la classificazione delle varianti riscontrate. Infatti l'interpretazione molecolare dei risultati è una procedura complessa che richiede personale qualificato, esperienza e competenza: un report generato dal software potrebbe non essere adeguato. Ovviamente non tutte le varianti che vengono rilevate hanno la stessa valenza clinica: ciascuna alterazione va valutata in base, non solo alla tipologia di tumore che stiamo analizzando, ma anche in base alle varie caratteristiche di sensibilità e resistenza ad un dato trattamento.

Tra le mutazioni che possono essere rilevate, in seguito ad una analisi in NGS, numerosissime possono non avere rilevanza clinica perché non associate a terapie target approvate o associate a controindicazione per terapie target. Quindi non solo è importante mettere in rilievo l'assenza o la presenza di una alterazione clinicamente rilevante, ma è anche fondamentale specificare sempre che non è stata rilevata la presenza di mutazioni negli altri geni analizzati, al fine di evidenziare lo stato wild-type di quei geni presenti nel pannello che, se alterati, potrebbero avere rilevanza clinico-terapeutica nella neoplasia in questione. Inoltre, in calce ai risultati dei test richiesti, soprattutto per le alterazioni dei geni *BRCA1* e *2*, dovrebbero essere riportate le varianti patogenetiche o probabilmente potogenetiche nel tumore in esame e le

varianti d'incerto significato (VUS) rilevate dal pannello diagnostico utilizzato.

Esistono numerosi pannelli genici per lo studio delle varie mutazioni target e ciascuno di essi può contenere un numero diverso di marcatori molecolari, inoltre esistono differenti chimiche che possono essere utilizzate per ottenere il sequenziamento genico di nuova generazione e ciascuna tipologia differente presenta criteri qualitativi e caratteristiche differenti.

Gli approcci di refertazione possono variare: si può scegliere se comunicare all'interno dei report unicamente lo stato mutazionale dei geni per i quali viene richiesto il test mutazionale e lo stato mutato o wild-type dei geni inclusi nel pannello in NGS, oppure si può optare per una tipologia di refertazione complessa che comprenda all'interno del report anche informazioni di tipo bioinformatiche, opzioni di filtraggio o soluzioni commerciali.

Il ruolo del patologo comprende un percorso lungo e complesso che va dal management e la gestione del materiale e arriva in anatomia patologica fino alla diagnosi. Il referto che verrà fuori da questo complesso processo dovrà comprendere non solo dati relativi alla morfologia della lesione analizzata, ma dovrà fornire a chi leggerà il referto dati relativi alla predittività, alla terapia e alla prognosi del paziente. Ecco che occorre una "quarta rivoluzione": l'integrazione del dato. A tal proposito la Società Italiana di Anatomia Patologica e Citologia Diagnostica (SIAPEC)- Gruppo Italiano PMMP ha realizzato un documento di raccomandazioni per l'implementazione dell'oncologia di precisione in Italia che si propone di fornire indicazioni che aiutino a creare una rete di laboratori in grado di effettuare test in NGS su biopsie tissutali e liquide nell'ambito delle reti oncologiche regionali.

Per omologare l'indagine in NGS nei vari centri è necessario organizzare un controllo qualità di tutti i laboratori che operano in questo settore in modo da essere sicuri che svolgano nel migliore dei modi test in NGS. Infatti occorre utilizzare le tecnologie in NGS in maniera mirata ai tumori selezionati in base al numero e al tipo di alterazione genomica e alla tipologia di farmaco approvato. Altro punto fondamentale è creare un sistema di rimborsabilità appropriato ai costi del test in NGS, creare un molecular tumor boards a livello nazionale per garantire le prescrizioni appropriate dei test in NGS e garantire la loro corretta interpretazione per scopi clinici. La Società Italiana di Patologi, SIAPEC, a tale scopo, sta definendo un metodo di refertazione per il test NGS che comprenda ogni informazione utile. Il report dovrà contenere almeno la lista di geni inclusi nel pannello usato e dovrà riportare il coverage di analisi, ossia il numero medio di volte in cui una base viene analizzata, il limite di sensibilità del pannello che viene utilizzato, la valutazione dell'adeguatezza del campione in analisi, la frequenza allelica della variante se riscontrata. L'alterazione inoltre dovrà avere una nomenclatura di univoca interpretazione (ciò sarà possibile tramite l'utilizzo della Humane Genome Variation Society nomenclature).

**A Translation of NGS report  
into clinical action (#AtTraction)**



Inoltre l'interpretazione biologica, patologica e clinica della variante identificata è anche possibile mediante l'ausilio di specifici database (quali OncoKb, ClinVar ecc) e mediante le indicazioni fornite dalla European Society for Medical Oncology (ESMO) Scale for Clinical Actionability. Dovrebbe essere fatta particolare attenzione nell'interpretazione di varianti dal significato incerto, la cui valenza clinica andrebbe rivalutata nel tempo in maniera continua.

Nella *real practice* non è però così semplice creare un report strutturato e completo, in quanto non sempre viene fornito al clinico un quadro completo del paziente. La comunicazione tra le varie figure professionali che operano all'ottenimento di un trattamento ottimale per il paziente renderanno possibile l'*interoperability* del dato stesso.

Altro punto fondamentale da tenere in considerazione nella realizzazione di un test che dovrà portare alla stesura di un referto quanto più completo possibile sarà la velocità con cui quest'ultimo sarà fruibile. Infatti un *timing* di esecuzione e di refertazione ottimale renderanno l'ottenimento del referto effettivamente utilizzabile.

Al fine di fornire un risultato più preciso possibile è necessario che il medico richiedente fornisca una richiesta precisa dei test da eseguire, inoltre è di fondamentale importanza che nel report sia inserita la tipologia di test eseguita sia che sia somatico sia che sia germinale, e la tipologia di tecnologia e/o pannello utilizzato. Infatti per il clinico essere a conoscenza del numero di geni detectabili con uno specifico pannello avrà importanza nella gestione e nell'outcome del paziente.

La SIAPEC sta svolgendo un ruolo fondamentale nella standardizzazione e validazione dei referti molecolari. Infatti tra i vari obiettivi prefissati la Società avrà il ruolo di validare i set di dati sul cancro raccolti della International Collaboration on Cancer Reporting (ICCR).

Altro aim fondamentale della SIAPEC sarà l'integrazione a livello nazionale del Fascicolo Sanitario Elettronico (FSE): un insieme di dati e documenti digitali di tipo sanitario e sociosanitario generati da eventi clinici, riguardanti il paziente, riferiti a prestazioni erogate dal Servizio Sanitario Nazionale (SSN) e da strutture sanitarie private.

L'implementazione di un vocabolario armonizzato aiuterebbe i medici a dare priorità alle anomalie genomiche del cancro durante l'interpretazione dei report genomici e faciliterebbe la comunicazione tra il mondo accademico, l'industria farmaceutica, gli operatori sanitari e i pazienti. La standardizzazione dei referti, la collaborazione tra le varie figure professionali che collaborano alla stesura del referto, la consapevolezza che ciascun professionista mediante le proprie specifiche skills potrà essere di arricchimento per la gestione clinica di ciascun paziente e il lavoro congiunto tra le varie società scientifiche, permetterà la realizzazione di una rete culturale fondamentale che condurrà all'ottimo utilizzo di tutti i dati ottenuti per un singolo paziente e per tutta la comunità.

## TAKE HOME MESSAGE

- La gestione e la raccolta del materiale, l'analisi genetica e l'interpretazione dei risultati può richiedere dei tempi lunghi di refertazione, questi hanno impatto negativo sulla sopravvivenza.
- In base a ciascun pannello o tecnologia di sequenziamento genico utilizzata varia il range di riferimento e i parametri metrici a cui attenersi.
- È stata evidenziata una grande varietà di referti NGS, con alta variabilità nell'annotazione dei vari campi essenziali e in particolare delle mutazioni riportate.
- L'anatomia patologica moderna vede l'anatomo patologo come figura dinamica che si confronta con i colleghi clinici e biologi e che tramite il confronto anche con i pazienti da qualcosa che va oltre una diagnosi.
- Il referto che riporta i dati rilevati a seguito di una indagine in NGS andrebbe costruito secondo una struttura sinottica, consentendo in questo modo di riportare un'elevata quantità di dati in modo sintetico e immediatamente fruibile a qualsiasi specialista ne abbia bisogno.
- L'obiettivo è garantire che i set di dati prodotti per le diverse tipologie di tumore abbiano uno stile e un contenuto coerenti e contengano tutti i parametri necessari per guidare la gestione e la prognosi dei singoli pazienti.

## REFERENCES

1. Goossens N, Nakagawa S, Sun X, Hoshida Y. Cancer biomarker discovery and validation. *Transl Cancer Res.* 2015 Jun;4:256-26
2. Jordan et al. Prospective Comprehensive Molecular Characterization of Lung Adenocarcinomas for Efficient Patient Matching to Approved and Emerging Therapies. *Cancer Discovery* 2017
3. William P. McGuire, M.D., William J. Hoskins, M.D., Mark F. Brady, B.S., Paul R. Kucera, M.D. et al. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *N Engl J Med* 1996
4. Robert A. Burger, M.D., Mark F. Brady, Ph.D., Michael A. Bookman, M.D., Gini F. Fleming, M.D., et al., Incorporation of Bevacizumab in the Primary Treatment of Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2011
5. A Phase 3 Trial of Bevacizumab in Ovarian Cancer. Timothy J. Perren, M.D., Ann Marie Swart, M.D., Jacobus Pfisterer, M.D., Jonathan A. Ledermann, M.D., et al., *N Engl J Med* 2011
6. Robert L. Coleman et al. Progression-free survival by investigator versus blinded independent central review in newly diagnosed patients with high-grade serous ovarian cancer: Analysis of the VELIA/GOG-3005 trial. *Gynecol Oncol* 2021
7. Malapelle U, Mayo de-Las-Casas C, Rocco D, Garzon M, Pisapia P, Jordana-Ariza N, Russo M, Sgariglia R, De Luca C, Pepe F, Martinez-Bueno A, Morales-Espinosa D, González-Cao M, Karachaliou N, Viteri Ramirez S, Bellevicine C, Molina-Vila MA, Rosell R, Tronccone G. Development of a gene panel for next-generation sequencing of clinically relevant mutations in cell-free DNA from cancer patients. *Br J Cancer.* 2017;116:802-810



Progetto realizzato con il contributo  
non condizionante di

**AstraZeneca** 

**Medica**  
EDITORIA E DIFFUSIONE SCIENTIFICA

Provider ECM ID 2157  
SEGRETERIA SCIENTIFICA E ORGANIZZATIVA  
Corso Buenos Aires, 43 | 20124 Milano  
T +39 02 76281337 | M info@medicacom.it  
F +39 02 93661995 | W www.medicacom.it