



FONDAZIONE onlus
EDOed ELVO TEMPIA
per la lotta contro i tumori

Il Laboratorio Biomolecolare

Maria Scatolini, PhD

Direttore Laboratorio Oncologia Molecolare

Fondazione Edo ed Elvo Tempia, Biella

Corso Marcatori oncologici circolanti e tissutali.

Ruolo, limiti e prospettive

Torino, 17/02/2025



Potenziali conflitti d'interesse da dichiarare

Tipo di affiliazione o supporto finanziario	Sponsor
Advisory board, speaker honorarium, travel grant	Astra Zeneca, MSD, Glaxo-Smith-Kline, Menarini
Speaker honorarium	Incyte, Pierre Fabre,
Scientific collaboration, speaker honorarium, travel grant	Roche
Speaker honorarium, scientific collaboration	Bayer
KOL, scientific collaboration, speaker honorarium	Diaceutics

Tematiche affrontate

- I requisiti di un laboratorio certificato (vs. Accreditato)
- Il percorso del campione biologico ed i problemi tecnici
- L'interpretazione dei dati e la refertazione

I requisiti di un Laboratorio certificato

Certificato ISO 9001

Accreditato ISO 15189

Accreditamento o Certificazione?



- **Accreditamento** significa che un ente autorevole (es. ACCREDIA) riconosce formalmente che un'organizzazione (o un singolo) è competente nell'eseguire uno specifico servizio come descritto nello scopo dell'accREDITAMENTO. Es. accREDITAMENTO ISO 15189:2024 applica criteri e procedure specificatamente predisposte per determinare la competenza tecnica di un laboratorio.
- **Certificazione** significa che una terza parte indipendente ha confermato “per iscritto” che un prodotto, procedura o servizio soddisfa i requisiti prescritti. Es. certificazione ISO 9001:2015 di un'azienda dichiara la conformità ai requisiti della norma (non è collegata ad una competenza tecnica) e riguarda principalmente la gestione generale, i processi e la manipolazione dei dati.
- La **differenza** risiede nel fatto che con l'accREDITAMENTO il riconoscimento formale di competenza si basa su una comprovata conoscenza tecnica e pertanto richiede la consultazione di un esperto tecnico per lo scopo dell'accREDITAMENTO, mentre la certificazione riguarda principalmente l'assicurare la conformità ad una data norma.

ISO 15189 normativa di riferimento dei Laboratori Medici

- Definizione di Laboratorio Medico:
 - Un **Laboratorio medico** *esegue esami su materiali derivati dall'organismo umano con il proposito di fornire informazioni in merito a **diagnosi**, **prevenzione** e **trattamento** delle malattie, o la valutazione dello stato di salute degli esseri umani, e che possa fornire un **servizio di consulenza** che copra tutti gli aspetti delle indagini di Laboratorio, inclusa **l'interpretazione dei risultati** e suggerimenti su ulteriori indagini appropriate.*

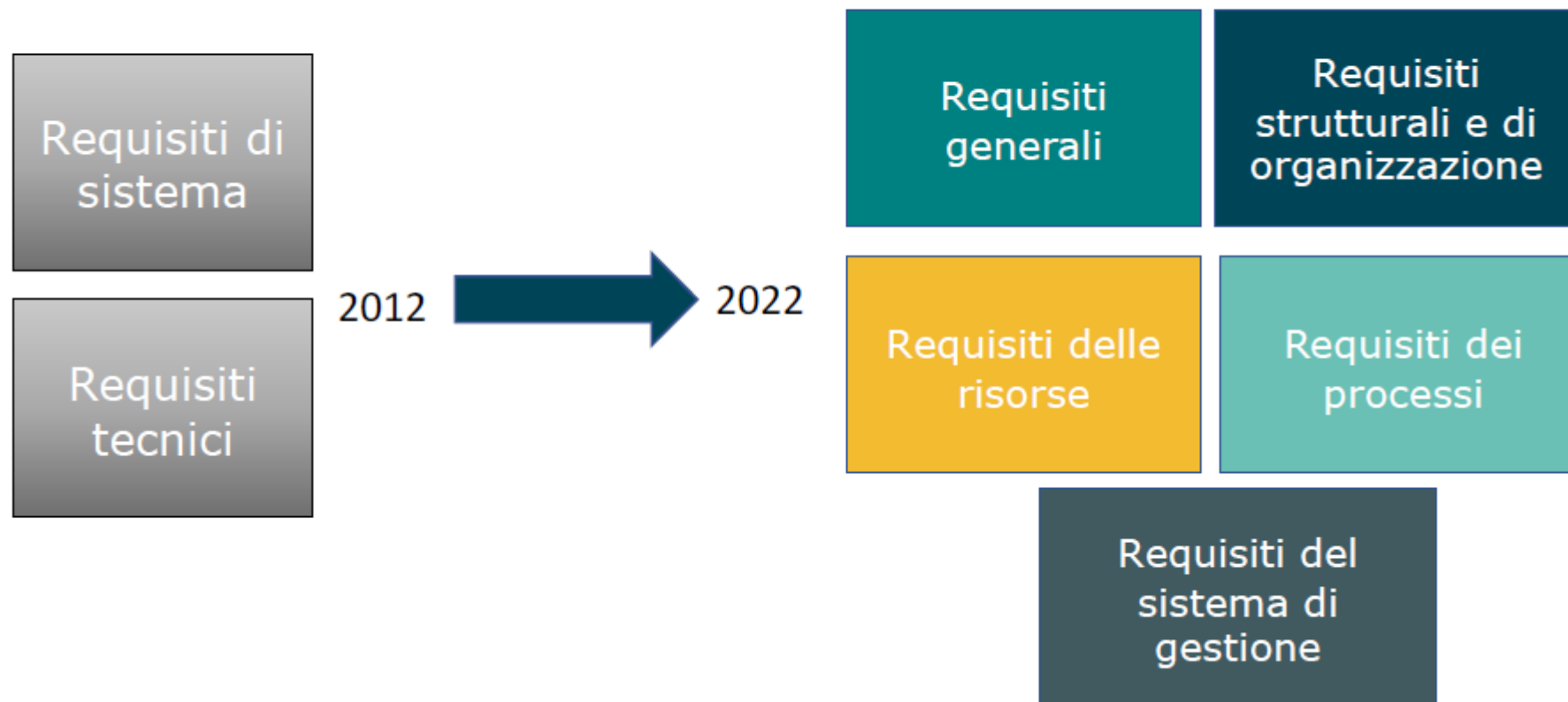


EN ISO 15189:2022 (IV Edizione)



- in data **16 febbraio 2024** la norma EN ISO 15189:2022 è stata pubblicata in Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea. Ciò significa che la EN ISO 15189:2022 è ora una norma armonizzata ai sensi del Reg. (CE) N. 765/2008.
- Pubblicata Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana 15/04/2024 (ISO 15189:2024)
- EN ISO 15189:2012 ritirata dalla Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea a decorrere dal **20 Agosto 2025**

Struttura della nuova ISO 15189

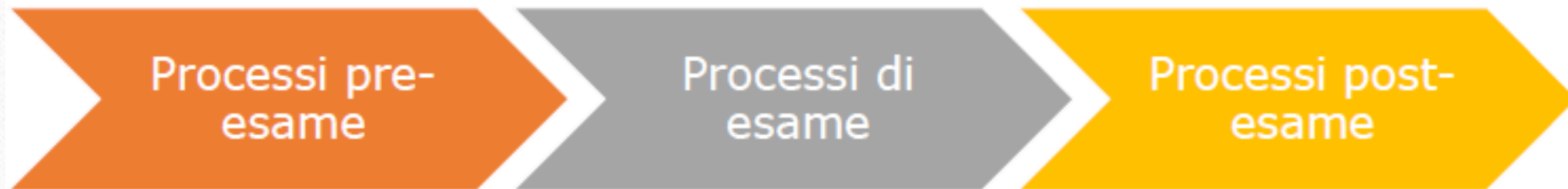


La nuova norma ISO 15189:2024

- Maggior parte dei requisiti sostanzialmente invariati (nuovi requisiti imparzialità e riservatezza)
- Maggior focalizzazione sulla gestione del rischio (valutato per processi) **ISO 22367:2020 Rischio clinico**
- Presa in carico dei point-of –care testing (POCT) **ISO 22870:2016 annullata**
- Riorganizzata la struttura del documento
- La norma è meno prescrittiva, maggior libertà lasciata ai Laboratori sul decidere «come» gestirsi al fine di raggiungere i requisiti previsti.

Cosa si può accreditare in conformità alla ISO 15189

- Gli esami oggetto di accreditamento sono identificati da:
 - **Disciplina** (es. Genetica Medica)
 - **Natura del campione** (es. sangue)
 - **Determinazione/Tipo di esame** (es. mutazioni BRCA1/2)
 - **Principio del metodo/tecnica** (es. NGS)
 - **Procedura d'esame** (es. IO 10 PRO 09)
 - **Tipo di procedura** (A, B)
- **Prelievi:** attività allocata o meno nel sito di esecuzione degli esami (ad esempio il prelievo ematico, il tampone faringeo, ecc.)
 - **Point Of Care Testing (POCT):** analisi mediche eseguite al di fuori delle strutture del laboratorio (presso reparti di cura, ambulatori, servizi territoriali) e che possono richiedere strumentazione collocata in prossimità del paziente per l'esecuzione immediata dell'esame.



Non è possibile accreditare la sola fase di raccolta, prelievo e trasporto del campione: si accredita l'esame e, se il laboratorio lo richiede e se solo l'attività è eseguita sotto la responsabilità del laboratorio, si estende l'accreditamento anche all'attività pre-esame dell'esame rientrante nel campo di accreditamento.

→ Chi fa solo attività di raccolta, prelievo e trasporto del campione non rientra nella definizione di laboratorio. ←

ISO 15189:2024: il paziente al centro...

La parola PAZIENTI compare per 77
volte nel testo della norma

La parola RISCHI/O compare per 83
volte nel testo della norma

Fondamentale focus
sul rischio di tipo CLINICO ISO 22367:2020

La gestione del rischio secondo ISO 15189:2024

- La gestione del rischio è centrale nell'etica della progettazione dei processi di gestione della qualità dei laboratori
- I Laboratori devono considerare il rischio per i pazienti in tutti i processi (es. momento dell'accettazione, trattamento dei campioni, attività di refertazione, etc..)
- L'obiettivo è stimolare una valutazione più ampia delle aree in cui è possibile apportare miglioramenti.

La salute, la sicurezza e i diritti dei pazienti devono essere le considerazioni primarie



Approccio alla gestione del rischio



risk-based thinking!

PRO Gestione del Rischio

- La presente procedura definisce le modalità applicate, relativamente al processo di gestione dei rischi di prodotto e di gestione dei rischi dei processi aziendali.
- L'obiettivo di tale processo è di assicurare che la gestione dei processi comprenda la minimizzazione del rischio e la capacità strategica di cogliere le opportunità.
- Tale processo ha in input i processi strategici e in output l'approvazione del rapporto di gestione dei rischi con cui è attestata l'accettabilità dei rischi e del rapporto rischi/opportunità strategiche.
- ISO 22367:2020 Rischio Clinico per il Laboratori Medici

Un esempio pratico: Procedure necessarie

- 1) Gestione dei documenti e dei dati
- 2) Gestione dei reclami
- 3) Gestione NC
- 4) Riesame della Direzione
- 5) Audit
- 6) Gestione del rischio
- 7) Gestione degli strumenti
- 8) Gestione del personale
- 9) Gestione del processo analitico
- 10) Gestione delle nuove prove d'esame
- 11) Gestione dei fornitori
- 12) Gestione del campo flessibile
- 13) Gestione delle modifiche
- 14) Gestione dell'utente



Struttura interna di una procedura (es.):

- Lo scopo
- Il campo di applicazione
- I riferimenti di legge
- Le responsabilità
- Le modalità operative
- Le modalità di archiviazione
- Allegati (eventuali)

PRO Gestione del processo analitico

La presente procedura ha lo scopo di definire le attività per la gestione del servizio di analisi e refertazione.

- 61 IO (Istruzioni operative) che fanno riferimento a questa procedura.
- 80 MOD (Moduli) che sono stati redatti per il corretto svolgimento delle IO della PRO Gestione del processo analitico.

- Le regole previste per una adeguata redazione e gestione di Istruzioni Operative e Moduli sono dettagliate in apposita procedura *PRO Gestione dei documenti e dei dati*
- Determinati requisiti sono stabiliti dalla norma, altri sono regole interne che ciascun laboratorio può darsi calate nella propria realtà.

Cosa sono le IO e i MOD?

Nel caso specifico della PRO **Gestione del processo analitico**

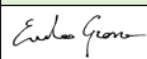
- Le istruzioni operative sono il protocollo dettagliato di ciascuna fase di «manipolazione» del campione biologico,
 - *Es. Istruzioni per l'accettazione del campione*
 - *Es. Istruzioni per il taglio al microtomo*
 - *Es. istruzioni per l'estrazione del DNA.*
- Devono contenere il riferimento specifico ad **ambienti, strumenti, reagenti, processo di esecuzione**, etc..
- I Moduli servono a registrare i dati relativi all'esperimento, all'operatore che ha eseguito il test, allo strumento utilizzato, identificano il campione, al lotto dei reagenti, data, firma operatore. Sono fondamentali per garantire la tracciabilità.

Esempio di Istruzione Operativa (estratto pag 1-3/18)

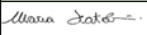
IO 59 PRO 09

NGS DNA Panel

Preparato da

Funzione	Nome	Data	Firma
Biologo	Dott. Enrico Grosso	25/01/2021	

Approvato da

Funzione	Nome	Data	Firma
Direttore del Laboratorio	Dott.ssa Maria Scatolini	25/01/2021	

2	20/05/2021	Nuova versione del KIT, aggiunta strumento PGX-05	Biologo	DL
1	19/04/2021	Mod. creazione Sample sheet	Biologo	DL
0	25/01/2021	Emissione	Biologo	DL
Rev.	Data di entrata in vigore	Descrizione	Preparato da	Approvato da

IO 59 PRO 09

NGS DNA Panel

Kit CE-IVD UTILIZZATO: MYRIAPOD NGS CANCER PANEL DNA (cod. NG033 - HB: 2020/12)

AVVERTENZE IMPORTANTI PRIMA DELL'USO

Evitare di sottoporre reagenti e controlli a più di cinque scongelamenti

Proteggere tutte le **DNA QUANTIFICATION STRIPS** contenenti sonde dalla luce per evitare la degradazione dei fluorofori.

I reagenti contenuti nel kit sono pronti all'uso, ad eccezione di **NAOH 2N SOLUTION** e **NGS DNA POS CTRL** che devono essere diluiti all'utilizzo secondo quanto riportato nel protocollo

Per ogni step eseguito includere in ogni seduta il controllo negativo e il controllo positivo previsto dalla procedura

SELEZIONE DEL MATERIALE BIOLOGICO

1. Campione da tessuto fresco o congelato o FFPE
2. Biopsia liquida
3. In caso di analisi mutazionale somatica, il materiale idoneo è rappresentato da tessuto prelevato dal tumore stesso. La percentuale di cellule tumorali nel tessuto da sottoporre all'esame deve essere $\geq 50\%$.
4. Macrodissezzare il materiale di partenza seguendo il protocollo "IO 01 PRO 09 – Macrodissezione del tessuto FFPE" ed estrarre il DNA seguendo il protocollo "IO 03 PRO 09 - Estrazione DNA GeneRead kit"

QUANTIFICAZIONE DEL DNA INPUT

Un'accurata quantificazione del DNA input è di fondamentale importanza per la riuscita della libreria.

DNA ESTRATTO DA TESSUTO FFPE

Quantificare il DNA utilizzando lo spettrofotometro SPF-01 (IO 07 PRO 09) oppure il fluorimetro QBT-01 (IO 42 PRO 09). Dal momento che la lettura dell'assorbanza non può distinguere tra DNA frammentato e non, la concentrazione del template può essere sovrastimata. Pertanto, è necessaria la valutazione della quantità e del grado di frammentazione del DNA presente nel campione FFPE mediante real-time qPCR utilizzando i reagenti **DNA QUANTIFICATION STRIPS** inclusi nel box 1/2 del kit.

ALLESTIMENTO DELLA REAZIONE DI AMPLIFICAZIONE

OPERAZIONI PRELIMINARI:

1. Accendere lo strumento EasyPGX® qPCR instrument 96 (PGX-01/PGX-05) almeno 20-30 minuti prima dell'avvio della reazione per permettere il riscaldamento della lampada,
2. Riequilibrare almeno 30 minuti prima dell'uso:
 - Campioni (Freezer FRZ-01)
 - **WATER** (Frigorifero FRG-01)
 - **NGS DNA POS CTRL** (Frigorifero FRG-01/Freezer FRZ-01)
 - **DNA QUANTIFICATION STRIP** (BIANCO - Frigorifero FRG-01)
3. Compilare le schede "MOD 71 PRO 09 - utilizzo kit PGX_Easy" corrispondenti al saggio in allestimento.

POSTAZIONE DI LAVORO: CAP-03

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

STRUMENTI UTILIZZATI:

- vortex VOR-04
- centrifuga minispin CEN-03

ESECUZIONE:

1. Risospendere con 250 μ l di **WATER** un'aliquota di **NGS DNA POS CTRL**, dopo averlo spinnato.
2. Per ogni campione, preparare una soluzione di 25 ng di DNA in 25 μ l finali.

Procedere come segue:

1. Utilizzando il modello "MOD 16 PRO 09 – NGS DNA Panel" eseguire i calcoli di diluizione,
2. Mescolare i campioni sul vortex e quindi centrifugarli brevemente,
3. Identificare le provette (0,5 ml) riportando il codice identificativo, aggiungere la **WATER** in ogni provetta, quindi il DNA,
4. Mescolare i campioni sul vortex e quindi centrifugarli brevemente e lasciare i campioni sotto la cabina DNA fino al loro utilizzo.

Esempio di Modulo (estratto 1 /2)

MOD 16 PRO 09

NGS DNA Panel

Quantificazione del DNA input

Data _____

DNA quantification strip (1h25')		
n° strip		
A	NGS DNA Pos Ctrl	A2
B	NTC	B2
C	C1	C2
D	D1	D2

Aliquotare 1ng/ul 25 µl di DNA in ogni pozzetto.
Protocollo termico: NG033_DNAquant

ID	Conc. SPF	Dil. Factor	DNA	H2O	RATIO	Conc. amplificabile	DNA (20ng)	H2O (to 50 µl)
C1								
D2								
A2								
B2								
C2								
D2								

RATIO	Q.tà in PCR1
>0.5	10ng
0.5-0.3	25ng
<0.3	50ng

Kit utilizzato	
Strumento	PGX-01
Operatore DNA	

Note:

PRO Gestione degli Strumenti

- E' necessario avere una lista degli strumenti, riportante la loro codifica, localizzazione, utilizzo, contatti assistenza, etc..
- Per gli strumenti utilizzati in esami accreditati è necessario avere un contratto di assistenza/manutenzione e l'elenco strumenti deve riportare il tipo di manutenzione prevista (es.preventiva esterna o fatta dal personale interno), la cadenza e le date di verifica.
- Nel caso di frigoriferi/frezeer la temperatura deve essere monitorata da apposite sonde a garanzia della corretta conservazione di campioni e reagenti.
- Le sonde devono essere tarate da un Laboratorio LAT, ovvero accreditato da Accredia secondo ISO 17025, oppure tarate «in-house» utilizzando un termometro primario (certificato LAT)
- Le micropipette impiegate per l'esecuzione di esami accreditati devono essere tarate (es. annualmente) da un Laboratorio LAT
- Le cappe devono essere sottoposte ad adeguata revisione.

1	MOD 01 PRO 07	LISTA STRUMENTI							
2	Aggiornato al			11/04/2023					
3	Codice Strumento	Descrizione	Modello	Nome del Produttore e/o Fornitore	Livello di Criticità	Macrogruppo	Stanza	Frequenza manutenzione	Tipo manutenzione
87	QBT-01	Fluorimetro	Qubit® 3.0 Fluorometer	Thermo Scientific	BASSA	NGS	C - NGS	/	/
88	SEQ-01	Next Generation Sequencer	Illumina MiSeq	Illumina / Diatech Pharmacogenetics	ALTA	NGS	C- NGS	1/anno	Esterna
89	SEQ-02	Next Generation Sequencer	Illumina NexSeq 550 Dx	Illumina	ALTA	NGS	B - Post PCR	1/anno	Interna/Esterna
90	SEQ-03	Next Generation Sequencer	Illumina iSeq	Illumina	BASSA	NGS	B - Post PCR	/	/
91	SPF-01	Spettrofotometro	DS-11 Spectrophotometer	DeNovix	MEDIA	Estrazione	A - Pre PCR	/	Interna
92	TCY-01	Thermal Cycler	Mastercycler personal	Eppendorf	MEDIA	Retrotrascrizione - MLPA	A - Pre PCR	quadriennale	Esterna
93	TCY-03	Thermal Cycler	Mastercycler	Eppendorf	MEDIA	Sanger - Analisi di frammenti	C - NGS	quadriennale	Esterna
	TCY-05	Dual-port	9600	Eppendorf	MEDIA	Sanger - Analisi di	B - Post PCR	quadriennale	Esterna

PRO Gestione del Personale

- E' necessario che ciascun operatore possa dedicare del tempo alla propria formazione/aggiornamento (es. acquisizione crediti ECM).
- La norma prevede che il Direttore Laboratorio sia disponibile ad offrire consulenza pre e post test.
- Fondamentale quindi la competenza del personale del Laboratorio non solo nello svolgimento del test, ma nella sua interpretazione clinica!

MOD 05a PRO 08

Scheda di Valutazione del Personale:
Valutazione Tecnica di Addestramento

Ruolo: Settore di Laboratorio:	Nominativo:	
ATTIVITÀ E COMPETENZE	Punteggio	Data Valutazione
Attività di laboratorio (gestione dei campioni in fase di accettazione e stoccaggio, gestione dei reagenti, gestione della strumentazione, gestione delle aree di lavoro) intesa dalla fase pre-analitica fino alla fase post-analitica.		
Sequenziamento di nuova generazione (NGS): -gestione del campione (taglio al microtomo ed estrazione di DNA/RNA) -preparazione delle libraries -caricamento dello strumento e manutenzione ordinaria		
Analisi di Frammenti ad alta risoluzione: -gestione del campione (taglio al microtomo ed estrazione di DNA/RNA) -preparazione della PCR -caricamento dello strumento e manutenzione ordinaria		
Sequenziamento Sanger: -gestione del campione (taglio al microtomo ed estrazione di DNA/RNA) -preparazione della reazione di PCR -preparazione delle sequenze -caricamento dello strumento e manutenzione ordinaria		
Real-time PCR: -gestione del campione (taglio al microtomo ed estrazione di DNA/RNA, estrazione da sangue) -preparazione della reazione di real time -caricamento dello strumento e manutenzione ordinaria		
Capacità di operare sotto pressione, di gestire imprevisti e carichi di lavoro inattesi		
Capacità di collaborare con i colleghi per il buon funzionamento del settore contribuendo a creare un clima positivo		
Autonomia		
Esito	☐ Positivo	☐ Negativo
Commenti		

Giudizio Verifica: 4 = Ottimo 3 = Buono 2 = Sufficiente 1 = Necessaria attività Formativa	Firma DL	
	Data Valutazione Finale	

CONDIVISIONE CON L'OPERATORE

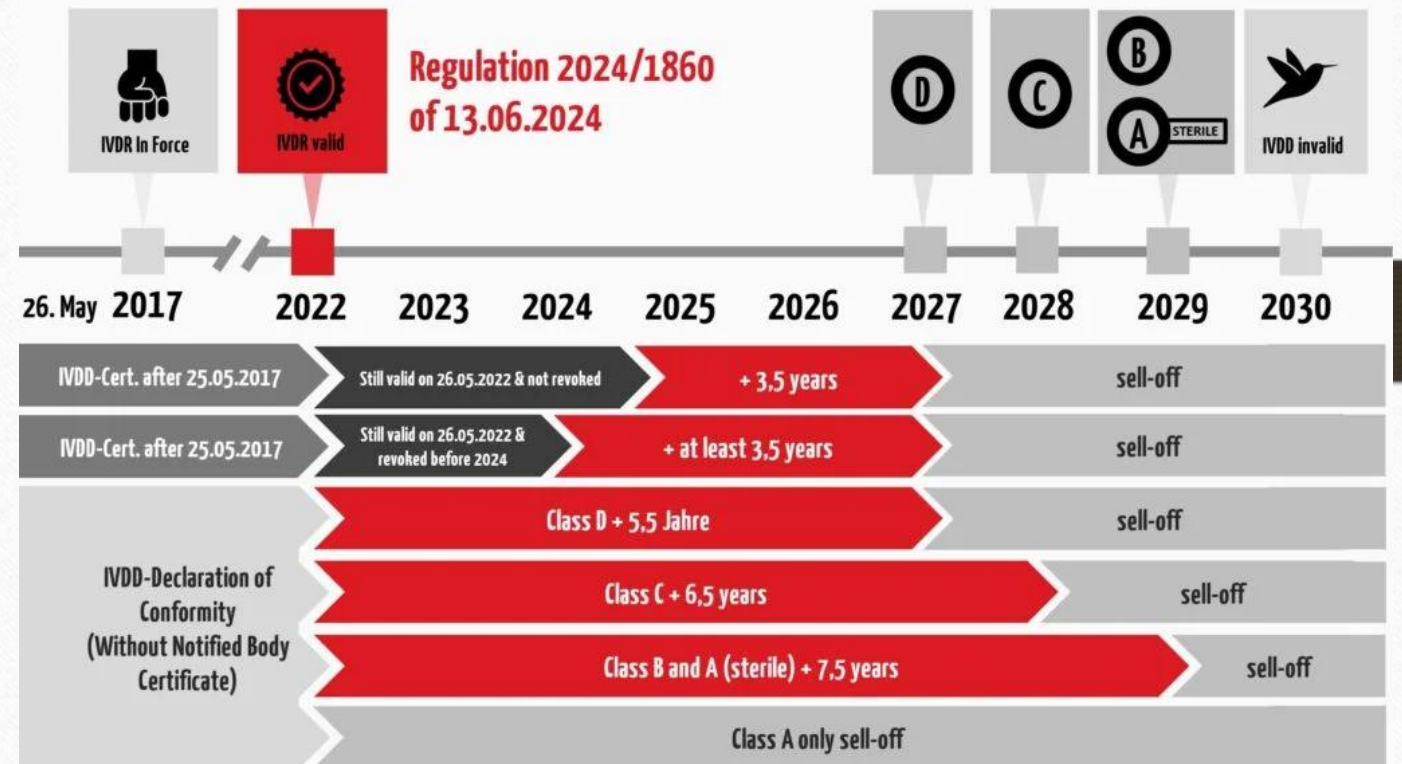
Data		
Esito	☐ Accettata	☐ Non accettata
Commenti		
Firma Operatore		
Firma Responsabile/Direttore		

Gestione delle nuove prove di esame

- L'introduzione di nuove prove di esame deve prevedere una fase di pianificazione
- La stesura di Istruzioni operative in versione «bozza» antecedenti alla approvazione da parte del DL.
- Per l'introduzione di ogni nuova prova di esame, se basata sull'utilizzo di kit commerciali certificati per la diagnostica (attuale IVD, futuro IVDR), non è necessario effettuare una validazione del metodo.
- Necessaria invece SEMPRE la verifica del metodo.
- Per richiedere l'accreditamento di un nuovo esame è necessario avere della VEQ (se disponibili) oppure utilizzare dei metodi alternativi (es. verifiche interlaboratorio).

ISO 15189 e IVDR

- L'introduzione di del nuovo regolamento europeo relativo all'utilizzo di *in vitro* diagnostic device (IVDR) rappresenterà una sfida per i laboratori di diagnostica
- Quando entrerà in vigore, solo i laboratori ISO 15189 potranno continuare ad utilizzare metodi LDT (Laboratory Developed Test) o metodi RUO (Research use only), previa validazione in-house.
- Tutti i laboratori di diagnostica che non si accrediteranno ISO15189 potranno usare solo metodi IVDR correndo il rischio di non poter offrire test allineati con lo stato delle conoscenze (es. nuovi marcatori).



Accreditamento ISO15189: Take Home Messages

- Accredia: ente unico italiano di accreditamento
- La normativa di riferimento per i Laboratori Medici è la UNI EN ISO 15189:2024
- Il percorso di accreditamento è un processo molto impegnativo che richiede l'attiva partecipazione di tutto il personale (Alta Direzione, Direzione Lab, Biologi, Tecnici,etc..)
- Iniziare con un percorso di certificazione ISO 9001:2015 potrebbe essere di ausilio per il Laboratorio per familiarizzare con le procedure di SGQ.
- L'accreditamento, a differenza della certificazione, garantisce la competenza del personale, caratteristica fondamentale per assicurare al paziente un servizio di elevata qualità.

«La qualità è un diritto del paziente»

Il percorso del campione biologico

I problemi tecnici

Laboratorio di Oncologia Molecolare- Fondazione Edo ed Elvo Tempia

- Nato nel **2011** è situato all'interno dell' Ospedale degli Infermi di **Biella**
- Ha la finalità di offrire un servizio di diagnostica molecolare (marcatori predittivi e prognostici) in convenzione con la sanità pubblica:



ASL di Biella

ASL di Alessandria

ASL di CN1

ASL di CN2

ASL di Asti

ASL di Vercelli

AUSL
di Aosta

ASL TO4
Ivrea

ASO Croce e Carle
di Cuneo

Ospedale
Mauriziano Torino

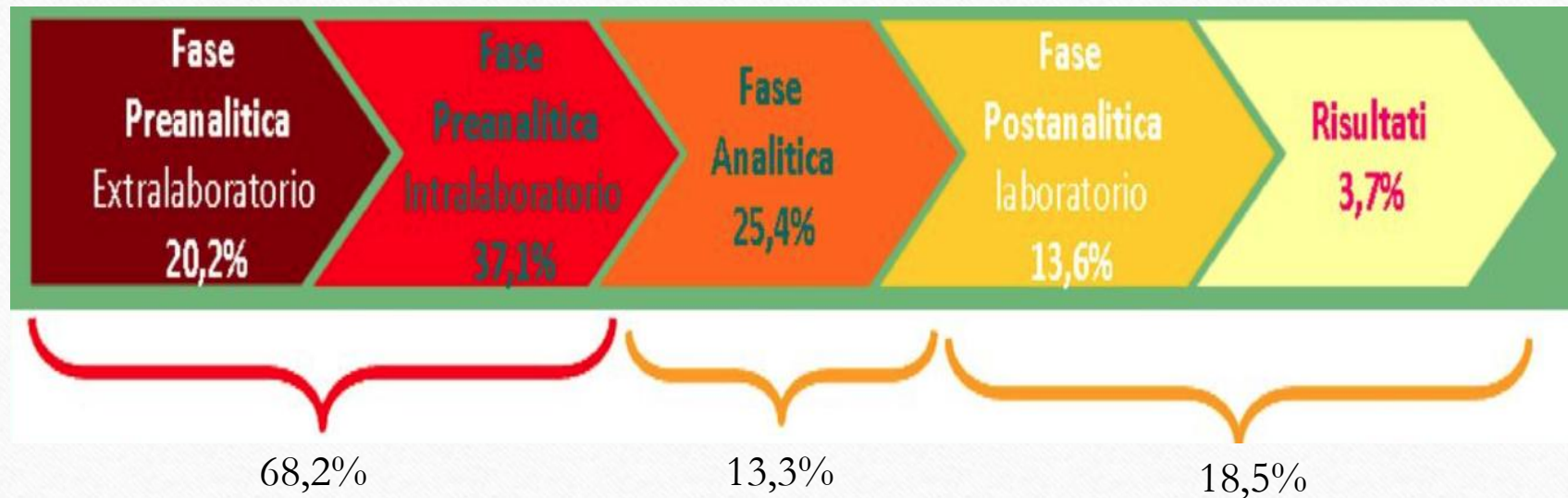
- Laboratorio Medico,
accreditato **ISO15189:2024**
(ACCREDIA) nella disciplina
Genetica Medica



FONDAZIONE onlus
EDOedELVO TEMPIA
per la lotta contro i tumori



Processo Diagnostico: quanto è importante la fase pre-analitica?



Quasi il 70% degli errori diagnostici sono commessi nella fase pre-analitica!



**MEDICAL
LABORATORY**

Normative ISO Pre-analitica (DNA, RNA)



ICS > 11 > 11.100 > 11.100.10

ISO 20166-1:2018

Molecular in vitro diagnostic examinations — Specifications for pre-examination processes for formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue — Part 1: Isolated RNA



ICS > 11 > 11.100 > 11.100.10

ISO 20166-3:2018

Molecular in vitro diagnostic examinations — Specifications for pre-examination processes for formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue — Part 3: Isolated DNA

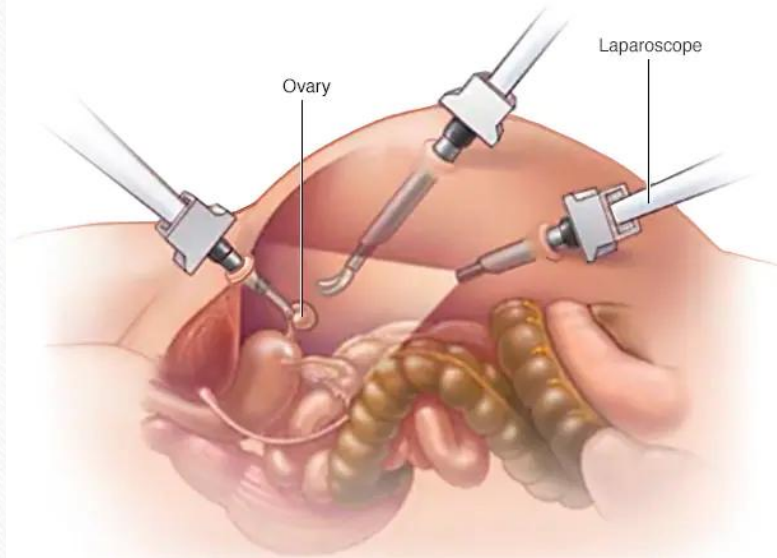
Oncologo/clinico richiedente



**Appropriatezza
prescrittiva del test!**

- L'oncologo è il «regista» che ha il compito di selezionare i pazienti che necessitano di una caratterizzazione molecolare a scopo predittivo di risposta alle terapie (es. target, immunoterapia)
- Valutazione in base alla patologia, l'istologia e la stadiazione (es. carcinoma ovarico, sieroso di alto grado, metastatico, indicazione test HRD)
- Sulla base delle informazioni cliniche (es. performance status, precedenti linee terapeutiche) definisce quali **target molecolari** è necessario valutare per le successive opzioni terapeutiche.

Chirurgo/Radiologo interventista



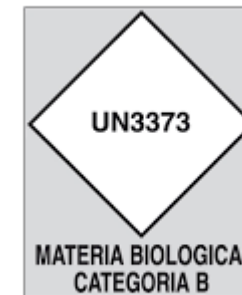
© MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH. ALL RIGHTS RESERVED.

- Sebbene sia evidente che ad una corretta gestione clinica delle pazienti competano tutti i players...
- ... Non è altrettanto noto che anche per la buona riuscita di un test molecolare è fondamentale la collaborazione di tutti, a partire dalla **sala operatoria!**
- Fondamentale è il controllo del tempo di «ischemia fredda», ovvero quello che inizia dalla rimozione chirurgica del pezzo e finisce nel momento in cui inizia il processo di fissazione in formalina.

- Diverse tipologie di prelievo (pezzo operatorio, biopsia)
- Differenti percorsi (sala operatoria, prelievo ambulatoriale)
- Necessità di inviare il campione presso altro centro?

Prelievo e trasporto del materiale biologico: quali variabili possono incidere?

- Tempo di ischemia fredda: dovrebbe essere il più breve possibile
 - < 1 hr per DNA
 - < 30 min per RNA
- Trasportato in anatomia nel minor tempo possibile
- Temperatura di trasporto controllata a 2-8 °C



Anatomo- patologo



- Il patologo ha il ruolo fondamentale di identificare il campione più rappresentativo della lesione da sottoporre al test molecolare (**primitivo? mts?**)
- Deve essere garante della corretta manipolazione del materiale biologico (**fase pre-analitica**)
- Fattore necessario per una corretta valutazione del dato molecolare è la **percentuale di cellule tumorali** presenti nel campione (<30% campione inadeguato per NGS)
- La presenza di **aree necrotiche** può inficiare la buona riuscita del test molecolare!
- Per il nostro centro analisi richiediamo l'invio di:
 - blocchetto e H&E con l'area contrassegnata dal patologo e la % di cellule tumorali
 - In alternativa al blocchetto possono essere inviate sezioni in bianco (con H&E riquadrata).

Fase Pre-analitica in Anatomia Patologica

Quali accorgimenti sono necessari?



Importanza della formazione dei patologi
e tecnici di anatomia- patologica

- Formalina neutra tamponata 10%, Ph 6,8- 7,2
- Dissezione del tessuto necessaria se spessore superiore a 4-5 mm.
- Decalcificazione con EDTA
- Evitare l'over fissazione in formalina del campione (12-48H)
- Paraffina standard a bassa temperatura di melting (50-56 °C)
- Conservazione dei blocchetti a RT (evitare ambienti soggetti a surriscaldamento)

Analisi molecolari eseguite su RNA estratto da campioni FFPE

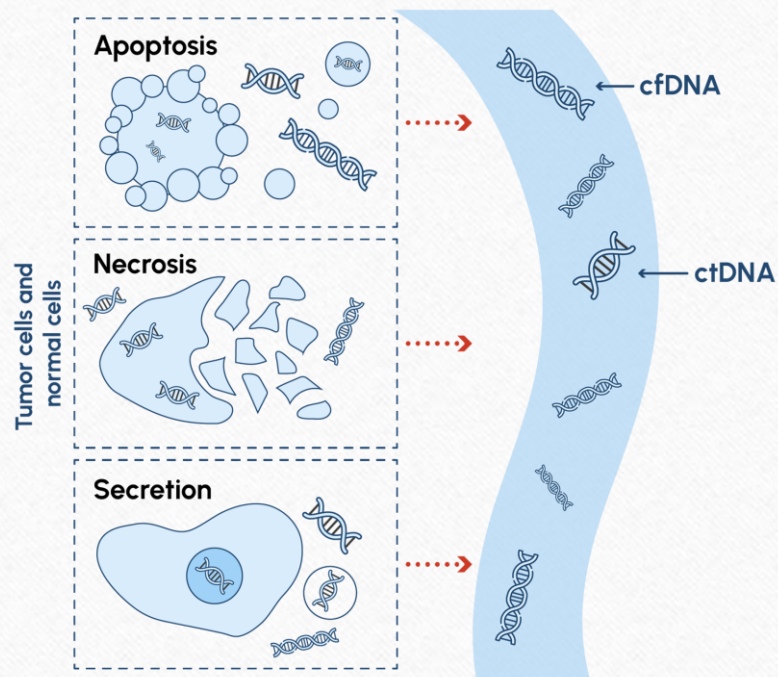
- La qualità dell'RNA isolato da campioni FFPE può variare ampiamente tra campioni diversi o fra reperi diversi dallo stesso istologico (es. aree necrotiche).
- L'RNA subisce una sostanziale modificazione chimica durante la fissazione in formalina: gli acidi nucleici sono cross-linkati alle proteine e i trascritti dell'RNA sono degradati in frammenti più piccoli.
- Le differenze nei metodi di fissazione in formalina e l'età dei campioni di tessuto d'archivio rappresentano un'ulteriore variabile alla qualità dell'RNA.
- Criticità aggiuntive per analisi su RNA in campioni NSCLC:
 - Bassa cellularità (<100cells)
 - Bassa percentuale di cellule tumorali (< 20%)



PERCORSO AD OSTACOLI....

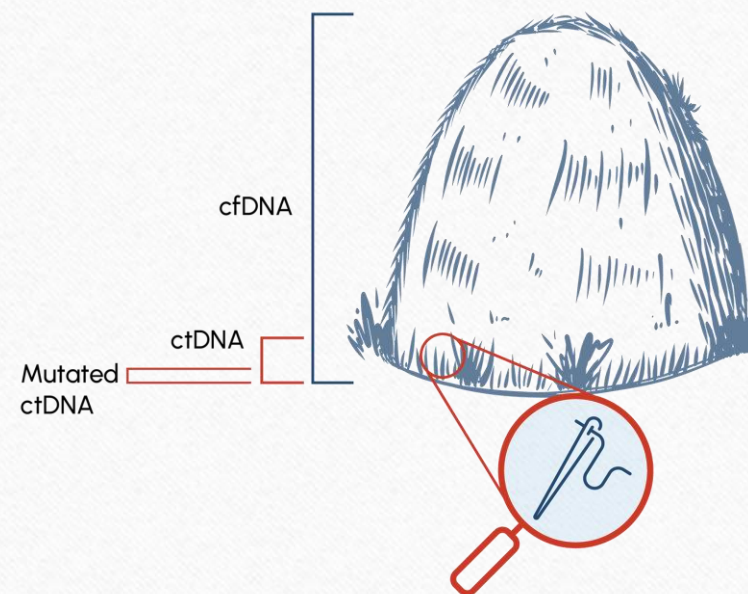
Biopsia liquida: utilizzo del cell-free DNA (cfDNA) come matrice per l'identificazione di mutazioni in specifici geni

Sources of cell-free DNA



Solo una piccola frazione del cfDNA deriva dal tumore, rappresenta il circulating tumor DNA (ctDNA)¹⁻³

Schematic model showing detecting ctDNA/mutated ctDNA from blood is like finding the needle in the haystack³



Solo una piccola frazione del ctDNA è portatrice di una specifica mutazione tumorale (es. *ESR1* mutations)³

Aspetti logistici



- Al fine di ottimizzare i **tempi di refertazione (TAT)** deve intercorrere il minor tempo possibile fra la richiesta del test da parte del clinico e la preparazione del materiale da parte del patologo
- In caso di centro esterno è necessario coordinare le fasi logistiche (es. per il ritiro del materiale biologico, una volta che il materiale è stato preparato.)
- **Se necessario prevedere un trasporto a temperatura controllata** (soprattutto in estate).

Percorso del campione: take home messages

DOVE POSSIAMO MIGLIORARE?

- Nessun kit diagnostico potrai mai farci ottenere dei dati affidabili SE il materiale di partenza è INADEGUATO (qualità e/o quantità).
- Non si può correre il rischio di refertare un campione INADEGUATO come WILD-TYPE (non informativo)
- Collaborazione e condivisione dei protocolli con **l'intera filiera** del processo analitico (da prelievo a refertazione).
- Maggior applicazione degli **standard internazionali** di qualità (ISO) nei Laboratori Medici e nelle Anatomie Patologiche
- Utilizzare kit IVD (next IVDR) che prevedano step di verifica della qualità del DNA/RNA a monte e dell'intero processo a valle.
- **Evidenziare la presenza di campioni inadeguati dovuti alla pre-analitica per poter migliorare insieme!**



L'interpretazione dei dati e la refertazione

REVIEW

Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group

F. Mosele¹, J. Remon², J. Mateo³, C. B. Westphalen⁴, F. Barlesi¹, M. P. Lolkema⁵, N. Normanno⁶, A. Scarpa⁷, M. Robson⁸, F. Meric-Bernstam⁹, N. Wagie¹⁰, A. Stenzinger¹¹, J. Bonastre^{12,13}, A. Bayle^{1,12,13}, S. Michiels^{12,13}, I. Bièche¹⁴, E. Rouleau¹⁵, S. Jezdic¹⁶, J-Y. Douillard¹⁶, J. S. Reis-Filho¹⁷, R. Dienstmann¹⁸ & F. André^{1,19,20*}

Background: Advancements in the field of precision medicine have prompted the European Society for Medical Oncology (ESMO) Precision Medicine Working Group to update the recommendations for the use of tumour next-generation sequencing (NGS) for patients with advanced cancers in routine practice.

Methods: The group discussed the clinical impact of tumour NGS in guiding treatment decision using the ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets (ESCAT) considering cost-effectiveness and accessibility.

Results: As for 2020 recommendations, ESMO recommends running tumour NGS in advanced non-squamous non-small-cell lung cancer, prostate cancer, colorectal cancer, cholangiocarcinoma, and ovarian cancer. Moreover, it is recommended to carry out tumour NGS in clinical research centres and under specific circumstances discussed with patients. In this updated report, the consensus within the group has led to an expansion of the recommendations to encompass patients with advanced breast cancer and rare tumours such as gastrointestinal stromal tumours, sarcoma, thyroid cancer, and cancer of unknown primary. Finally, ESMO recommends carrying out tumour NGS to detect tumour-agnostic alterations in patients with metastatic cancers where access to matched therapies is available.

Conclusion: Tumour NGS is increasingly expanding its scope and application within oncology with the aim of enhancing the efficacy of precision medicine for patients with cancer.

Key words: next-generation sequencing (NGS), advanced cancer, precision medicine, ESCAT

Raccomandazioni ESMO

- **2020:** NSCLC, prostata, colon-retto, colangiocarcinoma e carcinoma ovarico
- **2024:** aggiunti tumore alla mammella, GIST, tiroide, CUP, sarcomi.

Biologo Molecolare



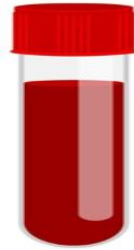
- Il rapido sviluppo delle tecnologie di sequenziamento ha reso sempre più complessa l'analisi e l'interpretazione dei dati molecolari (NGS)

Raccomandazioni ESMO sull'HRD test:

- laboratori accreditati
 - ISO15189
- con esperienza pregressa tecnica nel settore
 - Pannelli NGS su tessuto tumorale
- con esperienza pregressa interpretativa
 - BRCA1/2

Differenti matrici, differenti risultati (e competenze)

- I test molecolari possono essere di tipo diverso:
 - **Test germinale:** mutazioni ereditarie (oltre che predittive risposta farmaco)
 - **Test somatico** su tessuto o da biopsia liquida
- Sono richieste competenze diverse per la valutazione di varianti ereditarie vs varianti predittive risposta farmaco
- **Le competenze dello staff sono fondamentali!**



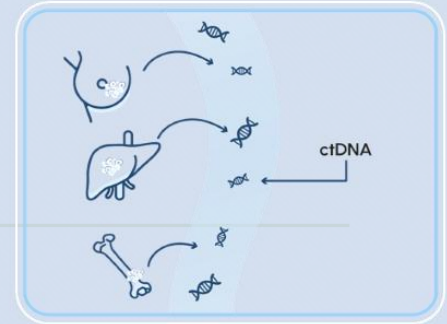
Test germinale
(sangue in EDTA)

BRCA1
BRCA2



Test somatico
(tessuto fissato)

AKT1
PIK3CA
PTEN

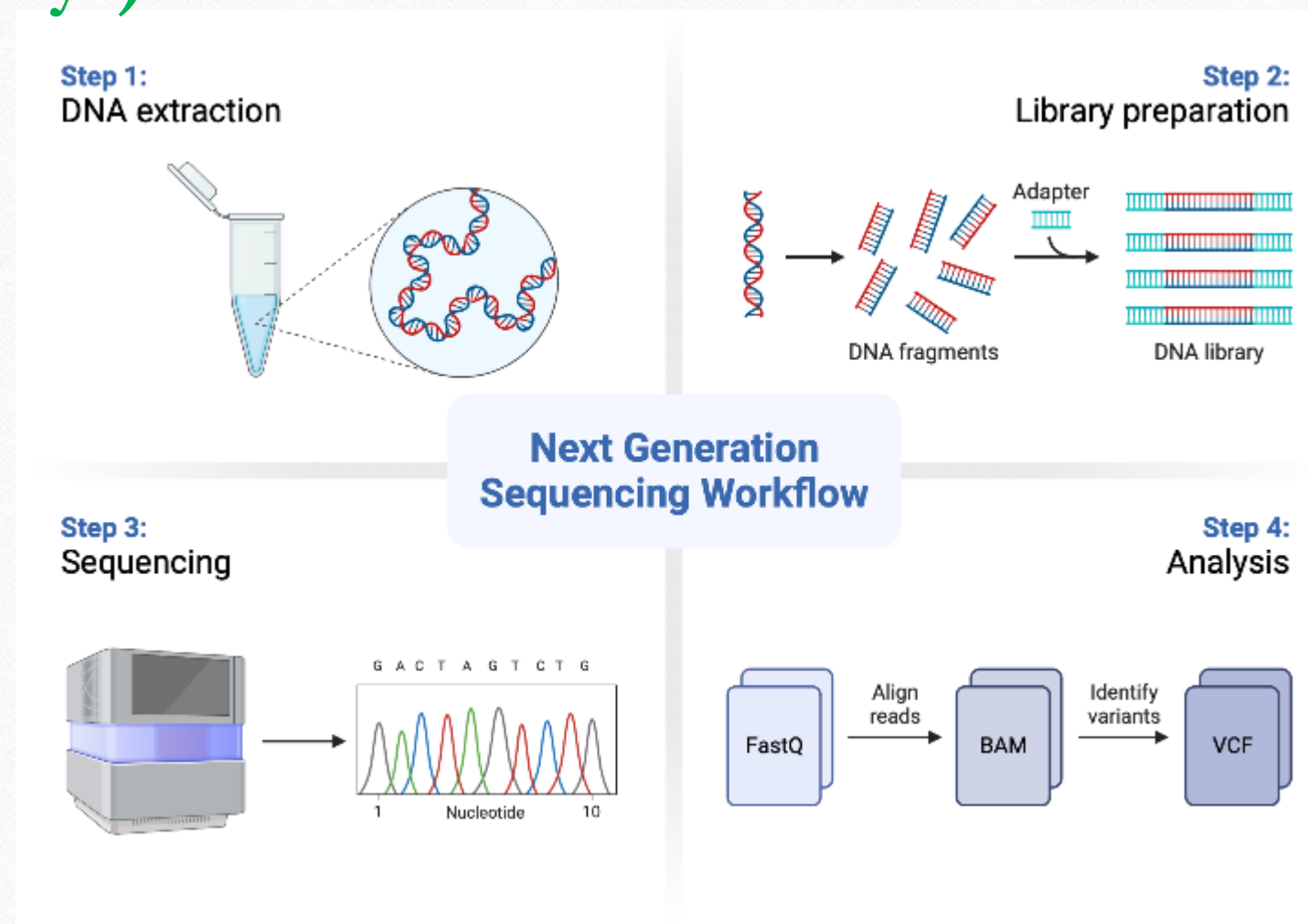


Biopsia liquida
(tubo streck,
cfDNA)

ESR1
AKT1
PIK3CA
PTEN *

NGS Work-flow (5 days)

- Accettazione del campione (sangue, FFPE, biopsia liquida)
- Estrazione DNA/RNA (1gg)
- Preparazione delle librerie (1gg)
- Caricamento dello strumento e sequenziamento (20-30h)
- Analisi bioinformatiche (5h)
- Interpretazione e refertazione del caso



REVIEW

How to read a next-generation sequencing report—what oncologists need to know

S. Schmid^{1,2*}, W. Jochum³, B. Padberg³, I. Demmer³, K. D. Mertz⁴, M. Joerger¹, C. Britschgi⁵, M. S. Matter⁶, S. I. Rothschild⁷ & A. Omlin¹

¹Division of Medical Oncology and Hematology, Cantonal Hospital St. Gallen, St. Gallen; ²Inselspital Berne, University of Berne, Bern; ³Institute of Pathology, Cantonal Hospital St. Gallen, St. Gallen; ⁴Institute of Pathology, Cantonal Hospital Baselland, Liestal; ⁵Department of Medical Oncology and Hematology, University Hospital Zürich, Zürich; ⁶Institute of Pathology, University Hospital of Basel, University of Basel, Basel; ⁷Department of Medical Oncology and Comprehensive Cancer Center, University Hospital Basel, Basel, Switzerland



Available online 29 September 2022

Next-generation sequencing (NGS) of tumor cell-derived DNA/RNA to screen for targetable genomic alterations is now widely available and has become part of routine practice in oncology. NGS testing strategies depend on cancer type, disease stage and the impact of results on treatment selection. The European Society for Medical Oncology (ESMO) has recently published recommendations for the use of NGS in patients with advanced cancer. We complement the ESMO recommendations with a practical review of how oncologists should read and interpret NGS reports. A concise and straightforward NGS report contains details of the tumor sample, the technology used and highlights not only the most important and potentially actionable results, but also other pathogenic alterations detected. Variants of unknown significance should also be listed. Interpretation of NGS reports should be a joint effort between molecular pathologists, tumor biologists and clinicians. Rather than relying and acting on the information provided by the NGS report, oncologists need to obtain a basic level of understanding to read and interpret NGS results. Comprehensive annotated databases are available for clinicians to review the information detailed in the NGS report. Molecular tumor boards do not only stimulate debate and exchange, but may also help to interpret challenging reports and to ensure continuing medical education.

Key words: next-generation sequencing (NGS), NGS-report, molecular targets, tumor genomic profiling, ESMO scale of clinical actionability for molecular targets (ESCAT), minimal requirement

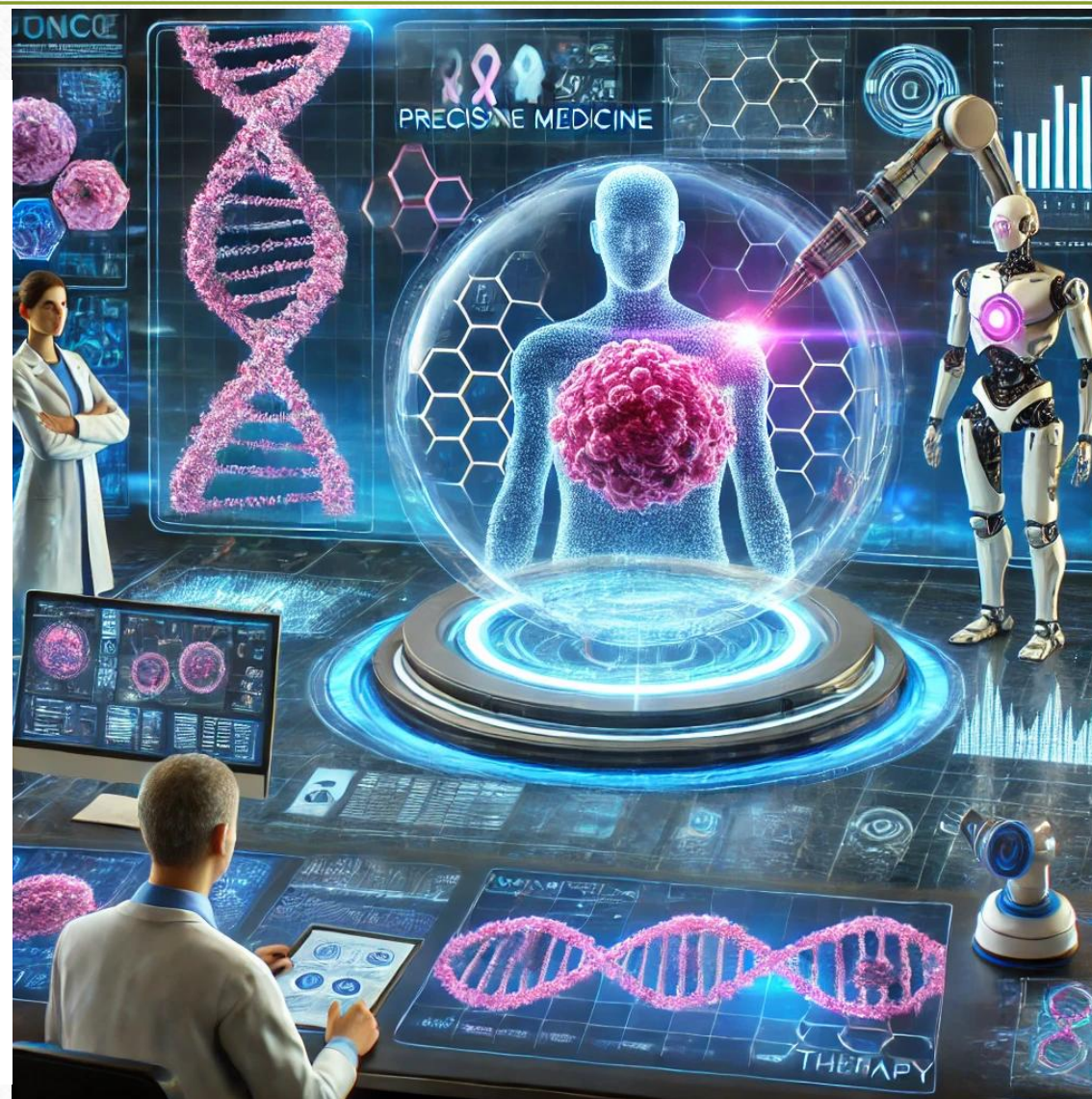


Table 3. The NGS report: minimal content requirements

Laboratory/patient/sample identifier	• Patient's name, date of birth, sex • ID number • Date specimen collected • Date specimen received • Date results reported • Ordering physician • Laboratory name
Specimen used for NGS testing	• Specimen type (FFPE, frozen tissue, liquid biopsy) • In case of tumor tissue: ◦ Tissue information with diagnosis ◦ Tumor cell content
Results	• Results with test name • Range • Use standard gene nomenclature • For variants also VAF (variant allele frequency)
Methodology/procedure	• Target description • Specimen-enrichment method • Limit of detection • Additional assay limitations
Procedure	• Type of procedure (e.g. NGS) • Defined target (e.g. name of target tested such as gene, locus, or genetic defect; use HUGO-approved gene nomenclature, HGVS nomenclature) • Analytic interpretative comment • Clinical interpretative comment • Pathologist/designee signature • LDT reporting language • ASR language

Comments

- Significance of the result in general or in relation to this patient
- Correlate with prior test results
- Recommend additional measures (further testing, genetic counseling)
- Condition of specimen that may limit adequacy of testing
- Pertinent assay performance characteristics or interfering substances
- Cite peer-reviewed medical literature or reliable web sites on the assay and its clinical utility
- Document intradepartmental consultation
- Document to whom preliminary results, verbal results, or critical values were reported and when
- Incorporate information specifically requested on requisition
- Answer specific questions posed by the requesting clinician
- Reason specimen rejected or not processed to completion
- If the report is an amended or addendum report, describe the changes or updates
- Describe discrepancies between preliminary and final reports
- Name of testing laboratory, if transmitting or summarizing a referral laboratory's results

ESCAT

ESMO Scale for Clinical Actionability of Molecular Targets



ESMO GOOD SCIENCE
BETTER MEDICINE
BEST PRACTICE

- Non tutte le varianti patogenetiche sono «actionable»
- Necessità di utilizzare una classificazione che sia immediatamente fruibile dall'oncologo

Table 1. European Society for Medical Oncology (ESMO) clinical actionability of molecular targets

Tier I	Alteration-drug match is associated with improved outcome in clinical trials
Tier II	Alteration-drug match is associated with antitumor activity, but magnitude of benefit is unknown
Tier III	Alteration-drug match is suspected to improve outcome based on clinical trial data in other tumor types(s) or with similar molecular alteration
Tier IV	Preclinical evidence of actionability
Tier V	Alteration-drug match is associated with objective response, but without clinically meaningful benefit
Tier X	Lack of evidence for actionability

ClinVar

Clinically relevant variation

CTGATGGTATGGGGCCAAGAGATAT
AGGTACGGCTGTCATCACTTAGAC
AGGGCTGGGATAAAAGTCAGGGCA
CATGGTGCATCTGACTCCTGAGGA
CAGGTTGGTATCAAGGTTACAAGA
GCACTGACTCTCTGCTATTGGT

OncKB

MSK's Precision Oncology Knowledge Base

An FDA-Recognized Human Genetic Variant Database*

688

Genes

5729

Alterations

133

Cancer Types

111

Drugs



Table 4. Databases with genomic data and where to check for relevance of alterations

Database	Comments
Cancer Genome Atlas (TCGA)	Large database including cancer-associated genomic alterations of >20 000 cancer patients
International Cancer Genome Consortium (ICGC)	Global initiative to build a large database of genomic alterations in the most common tumor types
OncoKB	Memorial Sloan Kettering Cancer Centre precision oncology database including link to FDA levels of evidence
MyCancerGenome	Large database including cancer-associated genomic alterations of almost 100 000 tumor samples
CIViC	Clinical interpretation of variants in cancer, open access open source, community driven
COSMIC	Large catalogue of somatic cancer mutations including data from >37 000 genomes
ClinVar	Freely accessible, public archive of reports of the relationships among human variations and phenotypes, with supporting evidence
Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)	Comprehensive, authoritative compendium of human genes and genetic phenotypes
VarSome	Variant knowledge community, data aggregator and variant data discovery tool
Breast Cancer Information Core (BIC) Database	Large <i>BRCA1</i> and <i>BRCA2</i> gene mutation database
ARUP <i>BRCA1</i> and <i>BRCA2</i> mutation databases	Provides information on <i>BRCA1</i> and <i>BRCA2</i> gene mutations and their impact on risk of developing breast cancer, ovarian cancer and certain other cancers. Two types of databases are provided. One is a list of mutations curated from critical review of literature and family studies. The other provides <i>in silico</i> prediction of risk to help understand variants of unknown significance

Guideline > Genet Med. 2015 May;17(5):405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30. Epub 2015 Mar 5.

Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology

Sue Richards ¹, Nazneen Aziz ², Sherri Bale ³, David Bick ⁴, Soma Das ⁵, Julie Gastier-Foster ⁶, Wayne W Grody ⁷, Madhuri Hegde ⁸, Elaine Lyon ⁹, Elaine Spector ¹⁰, Karl Voelkerding ⁹, Heidi L Rehm ¹¹; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee



Genetics in Medicine (2022) 24, 986–998



Genetics
in
Medicine

www.journals.elsevier.com/genetics-in-medicine

SPECIAL ARTICLE

Standards for the classification of pathogenicity of somatic variants in cancer (oncogenicity): Joint recommendations of Clinical Genome Resource (ClinGen), Cancer Genomics Consortium (CGC), and Variant Interpretation for Cancer Consortium (VICC)



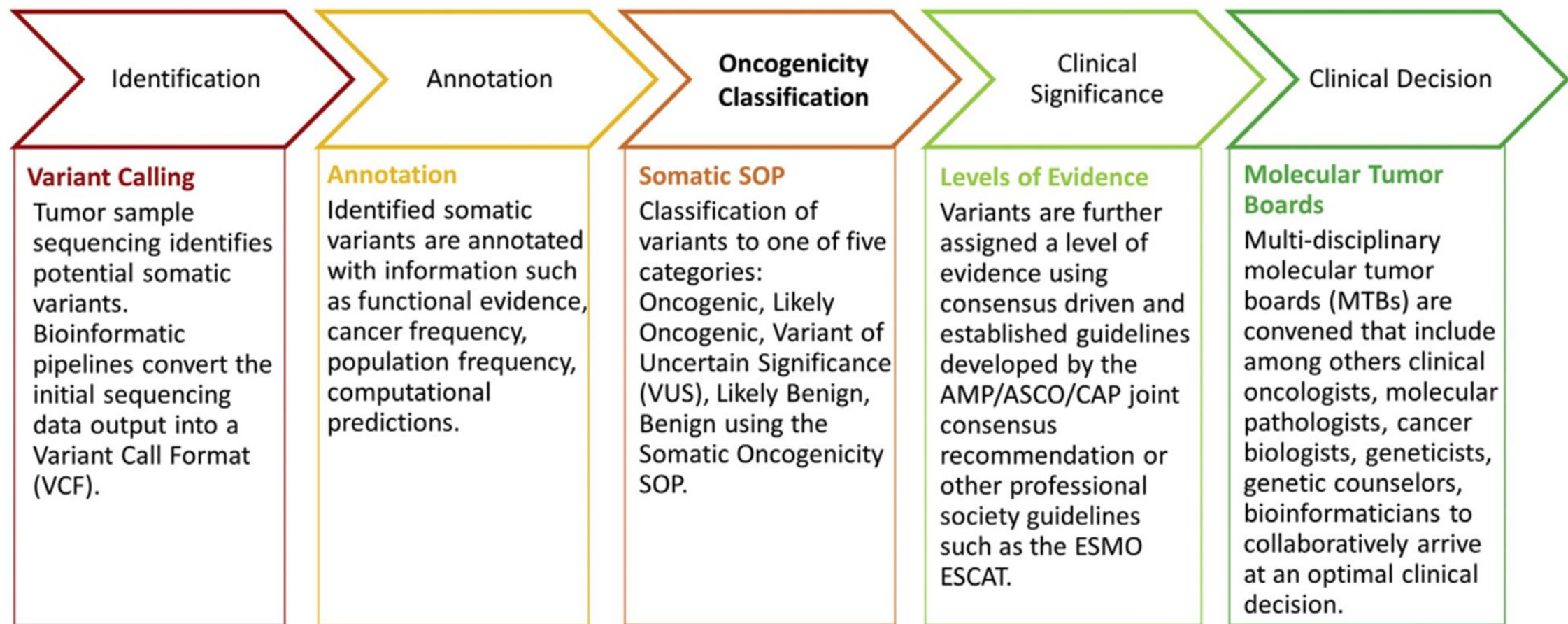
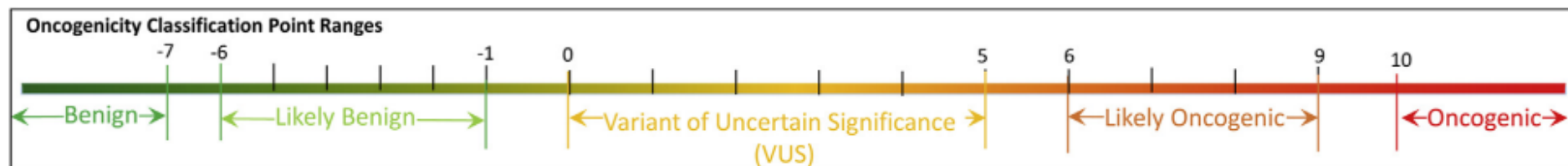


Figure 2 Stepwise process of somatic variant classification and interpretation. AMP, Association of Molecular Pathology; ASCO, American Society of Clinical Oncology; CAP, College of American Pathologists; ESCAT, European Society for Medical Oncology Scale of Clinical Actionability of molecular Targets; ESMO, European Society for Medical Oncology; SOP, standard operating procedure.



	Benign			Oncogenic			
Evidence Strength	Very Strong	Strong	Supporting	Supporting	Moderate	Strong	Very Strong
POINTS	-8	-4	-1	+1	+2	+4	+8
Population Data	MAF is >5%	MAF is >1%		Absent in population databases			
Functional Data		Well-established functional studies show no oncogenic effects				Well-established functional studies supportive of an oncogenic effect	
Predictive Data			Silent mutation (no predicted impact on splicing)		Missense change at an amino acid residue where a different missense change determined to be oncogenic has been documented	Same amino acid change as a previously established oncogenic mutation	Null variant in tumor suppressor
Cancer Hotspots				Cancer hotspots with low frequency of recurrence	Cancer hotspot with moderate frequency of recurrence	Cancer hotspot with high frequency of recurrence	
Computational Evidence			All utilized lines of computational evidence suggest no impact of a variant	All utilized lines of computational evidence support oncogenicity			

Figure 1 Somatic standard operating procedure evidence framework overview (all criteria are not listed). MAF, minor allele frequency.



SPECIAL ARTICLE

Germline-focused analysis of tumour-detected variants in 49,264 cancer patients: ESMO Precision Medicine Working Group recommendations

Z. Kuzbari^{1†}, C. Bandlamudi^{2†}, C. Loveday³, A. Garrett⁴, M. Mehine⁵, A. George^{1,3}, H. Hanson^{1,4}, K. Snape⁴, A. Kulkarni⁵, S. Allen¹, S. Jezdic⁶, R. Ferrandino⁶, C. B. Westphalen⁷, E. Castro⁸, J. Rodon⁹, J. Mateo^{10,11}, G. J. Burghel¹², M. F. Berger², D. Mandelker^{2†} & C. Turnbull^{1,3*}

¹Division of Genetics and Epidemiology, The Institute of Cancer Research, London, UK; ²Department of Pathology and Laboratory Medicine, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, USA; ³The Royal Marsden NHS Foundation Trust, London; ⁴South West Thames Regional Genetics Service, St George's University Hospitals NHS Foundation Trust, London; ⁵South East Thames Regional Genetics Service, Guy's and St Thomas' NHS Foundation Trust, London, UK; ⁶Scientific and Medical Division, European Society for Medical Oncology, Lugano, Switzerland; ⁷Department of Medicine III and Comprehensive Cancer Center (CCC Munich LMU) University Hospital, LMU Munich, Munich, Germany; ⁸Genitourinary Cancers Translational Research Group, Institute of Biomedical Research in Málaga (IBIMA), Málaga, Spain; ⁹Investigational Cancer Therapeutics, Division of Cancer Medicine, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, USA; ¹⁰Vall d'Hebron Institute of Oncology (VHIO), Barcelona; ¹¹Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain; ¹²North West Genomic Laboratory Hub, Manchester University NHS Foundation Trust, Manchester, UK



Available online 16 December 2022

Background: The European Society for Medical Oncology Precision Medicine Working Group (ESMO PMWG) was reconvened to update its 2018/19 recommendations on follow-up of putative germline variants detected on tumour-only sequencing, which were based on an analysis of 17 152 cancers.

Methods: We analysed an expanded dataset including 49 264 paired tumour-normal samples. We applied filters to tumour-detected variants based on variant allele frequency, predicted pathogenicity and population variant frequency. For 58 cancer-susceptibility genes, we then examined the proportion of filtered tumour-detected variants of true germline origin [germline conversion rate (GCR)]. We conducted subanalyses based on the age of cancer diagnosis, specific tumour types and 'on-tumour' status (established tumour-gene association).

Results: Analysis of 45 472 nonhypermutated solid malignancy tumour samples yielded 21 351 filtered tumour-detected variants of which 3515 were of true germline origin. 3.1% of true germline pathogenic variants were absent from the filtered tumour-detected variants. For genes such as *BRCA1*, *BRCA2* and *PALB2*, the GCR in filtered tumour-detected variants was >80%; conversely for *TP53*, *APC* and *STK11* this GCR was <2%.

Conclusion: Strategic germline-focused analysis can prioritise a subset of tumour-detected variants for which germline follow-up will produce the highest yield of most actionable true germline variants. We present updated recommendations around germline follow-up of tumour-only sequencing including (i) revision to 5% for the minimum per-gene GCR, (ii) inclusion of actionable intermediate penetrance genes *ATM* and *CHEK2*, (iii) definition of a set of seven 'most actionable' cancer-susceptibility genes (*BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* and *RET*) in which germline follow-up is recommended regardless of tumour type.

Key words: tumour-only sequencing, germline, cancer-susceptibility genes, variants, germline conversion rate

Interpretazione e refertazione: take home messages

- Il rapido sviluppo della **tecnologia NGS** ed il suo sempre più ampio utilizzo in clinica, impone la necessità di un adeguato expertise nello staff del laboratorio per la corretta interpretazione delle varianti geniche
- La figura del **biologo molecolare** e del **biologo genetista** stanno assumendo sempre maggior rilevanza in questo settore
- La costante introduzione di nuovi marcatori di interesse clinico e **nuovi farmaci** richiede un costante aggiornamento al fine di saper massimizzare il valore del risultato dei test NGS in un'ottica di **medicina personalizzata**.



FONDAZIONE onlus
EDO ed ELVO TEMPIA
per la lotta contro i tumori

Maria Scatolini, PhD

Direttore Laboratorio Oncologia Molecolare

Fondazione Edo ed Elvo Tempia- Biella

maria.scatolini@fondazionetempia.org

LOM
Laboratorio
Oncologia Molecolare



*Grazie per
l'attenzione!*

Sp Adobe Spark