

Titolo del Progetto

PROSECUZIONE DEL PROGETTO “ATTIVAZIONE LABORATORIO DI BIOLOGIA DIAGNOSTICA MOLECOLARE” AL FINE DI CONSOLIDARE IN STRUTTURE AZIENDALI QUANTO AVVIATO.

Durata: fino ad esaurimento dei fondi (verosimilmente entro il 31/12/2019)

Responsabile del Progetto : Direttore del Dipartimento di Patologia Clinica dott. Pierluigi Berti

Costo finanziato con i fondi richiesti : Euro 93.373,63

Area tematica di ricerca :

Nuova ricerca traslazionale e/applicata: terapie mirate mediante nuovi test molecolari predittivi.

Lo scopo della ricerca traslazionale oncologica è quello di costituire un ponte che consenta un rapido trasferimento delle nuove informazioni e delle scoperte dal laboratorio di ricerca a quello più specificatamente diagnostico sino alla terapia e alla gestione clinica del paziente, producendo terapie innovative che risolvano le problematiche cliniche più urgenti. La Medicina Molecolare e Traslazionale costituisce al momento l'approccio emergente in campo internazionale, come dimostrato dal sempre maggior numero di riviste, convegni, attività didattiche e di aggiornamento professionale che si occupano di questo tema, e dal sorgere di sempre nuovi centri di ricerca traslazionale soprattutto in campo oncologico. La ricerca traslazionale ha come obiettivo la trasformazione delle scoperte scientifiche che arrivano dal laboratorio di ricerca in applicazioni cliniche per ridurre l'incidenza e la mortalità per cancro. Questo ramo della ricerca scientifica viene ben rappresentato dalla frase “dal bancone del laboratorio al letto del paziente” (in inglese, “from bench to bedside”). La ricerca in “Oncologia Traslazionale” riunisce quindi le competenze necessarie a promuovere la progettazione e l'esecuzione di progetti multidisciplinari con particolare riferimento alle malattie oncologiche per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici anche personalizzati alla malattia.

Per traslare tali conoscenze nell'ambito della diagnostica molecolare oncologica è fondamentale operare creando sinergie tra professionisti che operino in team sviluppando professionalità sempre più formate e in grado di utilizzare tecnologie innovative per rispondere prontamente alle specifiche esigenze degli oncologi clinici.

Obiettivo del progetto:

L'obiettivo del progetto consiste nel ricondurre in ambito aziendale l'attività di Biologia Molecolare dedicata all'esecuzione di test di oncologia molecolare predittiva in capo a personale aziendale con specifiche competenze di Biologia molecolare che opera funzionalmente in Team con l'Anatomopatologo e l'Oncologo.

Approccio progettuale :

Il progetto prevede di transitare quanto finora attuato con il progetto “attivazione laboratorio di biologia diagnostica molecolare” interamente finanziato dalla Fondazione VDA-RC realizzando nell'Azienda USL della Valle d'Aosta una attività Dipartimentale di Biologia Molecolare oncologica in cui sono strettamente coinvolte diverse professionalità (Unità multidisciplinare) già presenti nell'Azienda USL (Medici, biologi molecolari, tecnici, amministrativi), al fine di creare una organizzazione sinergica fra i vari soggetti clinici e laboratoristi, sia dal punto di vista dell'ottimizzazione delle risorse sia dal punto di vista della finanziabilità delle attività. Il Team coordinato dal Direttore del Dipartimento di Patologia Clinica Dott. Pierluigi Berti, è costituito dai referenti delle principali attività rappresentate, un Oncologo, un Biologo Molecolare e un Anatomopatologo che collaboreranno per



individuare la migliore strategia organizzativa e tecnico-scientifica, in accordo con le linee guida AIOM e SIAPEC prevedendo momenti di incontro e di valutazione dei casi clinici.

La richiesta dell'esame molecolare deve riportare in maniera completa le informazioni cliniche pertinenti, il referto patologico e, soprattutto nel caso di biopsie successive, l'indicazione di precedenti trattamenti chemioterapici.

La refertazione del test rappresenta un aspetto di grande rilevanza e dovrà essere eseguita di concerto tra l'Anatomopatologo, il Biologo Molecolare e condivisa con l'Oncologo.

La refertazione è parte integrante della procedura diagnostica, risultato di un processo multifasico che converte il risultato di un'analisi strumentale in un'informazione di utilità clinica, nonché necessaria per un'adeguata impostazione terapeutica. Il referto, quindi, compilato su un modello prestabilito, dovrà essere firmato dall'Anatomopatologo e dall'esecutore del test molecolare. In considerazione dell'impatto sulla strategia terapeutica, il tempo per la refertazione non deve superare le due settimane dalla richiesta della determinazione, come previsto dalle linee guida AIOM e SIAPEC..

Organizzazione:

Strutture AUSL VdA coinvolte:

S.C. Oncologia:

Direttore: Dott.ssa Marina Schena

S.C. Anatomia Patologica

Direttore: Dott.ssa Roberta Patetta

S.C. Analisi Cliniche:

Direttore: Dott. Massimo Di Benedetto

Ruolo della S.C. Oncologia:

- Indirizzare l'attività diagnostica promuovendo l'inserimento degli opportuni test molecolari predittivi alla luce delle più recenti indicazioni del mondo scientifico per i quali esistano evidenze del ruolo determinante nell'approccio terapeutico.
- Promuovere collegamenti tra le diverse strutture laboratoristiche della Rete Oncologica Piemonte Valle d'Aosta per un approccio diagnostico omogeneo e che garantisca l'appropriatezza dei percorsi diagnostici.
- Promuovere l'integrazione dei PDTA e la razionalizzazione delle risorse

Ruolo della S.C. Anatomia Patologica:

- Attività di preparazione del materiale ai fini dell'esame molecolare.
- Selezione del blocco di tessuto più idoneo per numero e qualità delle cellule tumorali, valutazione della percentuale di cellule neoplastiche nel campione ed eventuale dissezione del tessuto.
- Descrizione del campione e confronto con il Biologo molecolare che eseguirà l'analisi.

Ruolo della S.C. Analici Cliniche - Settore Biologia Molecolare

- Garantire l'esecuzione dei test indicati nel progetto secondo gli standard di qualità indicati nelle linee guida AIOM e SIAPEC.
- Garantire la qualità dei test partecipando a controlli di qualità per tutti i test eseguiti
- Implementare, di concerto con l'Anatomopatologo e l'Oncologo, modelli di refertazione in diagnostica molecolare per analisi mutazionale.
- Promuovere formazione continua per l'acquisizione delle più innovative tecnologie utilizzate per l'esecuzione dei test molecolari predittivi.

L'attività di Biologia Molecolare, almeno in una fase iniziale, dovrà poter contare su personale dedicato. Questo aspetto diviene fondamentale nella fase di formazione e di avviamento dell'attività.

Ambizione:

Il progetto dovrà permettere di superare lo stato dell'arte esistente, ovvero ricondurre tale attività in capo a professionalità aziendali che operano da anni nell'ambito della Biologia molecolare, in ambienti idonei e strutturati per l'esecuzione di tale attività e soprattutto consentire una appropriata confidenza con l'esame non raggiungibile da un unico operatore che esegua un numero esiguo di test/anno. Prevedere continua formazione su tecnologie più innovative attualmente non ancora introdotte per consentire una crescita continua di professionalità che già possiedono le competenze in tale ambito ma che possano essere costantemente in linea con la rapida evoluzione delle tecnologie molecolari. Migliorare il sistema di assicurazione della qualità con l'introduzione di controlli di qualità per tutti i test eseguiti, aderendo a programmi di qualità idonei che prevedano invii plurimi all'anno per un monitoraggio adeguato e conforme alle linee guida.

Potenziale innovativo della proposta:

Creazione di uno staff di professionisti, miglioramento dell'expertise del team, ottimizzazione di risorse umane ed economiche in aderenza alle raccomandazioni, elaborate da esperti nell'ambito del gruppo Patologia Molecolare e Medicina Predittiva (PMMP), che si propongono di favorire un armonico sviluppo sul territorio delle attività diagnostico-molecolari .

Sinossi del Progetto

Il progetto prevede nella fase iniziale l'esecuzione dei seguenti test molecolari predittivi
Mutazioni del gene EGFR Mutazioni del panel "all RAS" (geni NRAS, KRAS, BRAF)
nell'adenocarcinoma del colon retto.

Analisi UGT1A1 per metabolismo dell'irinotecano (UGT1A1) e analisi DPYD per il metabolismo del 5-Fluorouracile

Sarà previsto un aggiornamento tecnologico rispetto alla tecnologia utilizzata in precedenza (vedi Piano di lavoro progettuale) e la disponibilità di un metodo di conferma qualora l'esito del primo test non risulti conclusivo. L'attività di Biologia Molecolare sarà svolta presso la S.C Analisi Cliniche nel Settore di Biologia Molecolare.

L'esecuzione di tali test prevede:

1. **una fase preanalitica** che deve essere concepita sin dall'inizio in funzione delle attività diagnostiche sia morfologiche e immunoistochimiche che molecolari ricorrendo per queste ultime, se necessario, a percorsi dedicati;
2. **una fase analitica** che deve prevedere l'utilizzo delle più innovative ed adeguate tecnologie per la diagnostica degli specifici marcatori;
3. **i controlli di qualità**, sia esterni, condotti da enti riconosciuti a livello nazionale e/o internazionale, sia interni al laboratorio con lo scopo di mantenere nel tempo i livelli di qualità riconosciuti dai controlli esterni;
4. **la stesura di un referto diagnostico** secondo criteri di refertazione internazionali e modelli di refertazione concepiti per armonizzare il processo e fornire risultati più facilmente interpretabili ed applicabili nella pratica clinica.

Piano di lavoro per l'esecuzione dei test di oncologia molecolare predittiva presso l'Azienda USL

Tempi di realizzazione:

- non superiore a 1 mese dal trasferimento della strumentazione dalla S.C. Anatomia Patologica e dalla acquisizione della nuova strumentazione.

Test eseguibili:

Gene	Target da indagare
KRAS	esoni 2 (codoni 12, 13), 3 (codoni 59, 61), 4 (codoni 117 e 146)
NRAS	esoni 2 (codoni 12, 13), 3 (codoni 59, 61), 4 (codoni 117 e 146)
BRAF	V600E, V600K, V600D, V600R
HRAS	esoni 2 (codoni 12, 13), 3 (codone 61)
EGFR	esoni 18, 19, 20, 21

L'attività verrà realizzata mediante l'uso di Kit e strumentazione della ditta Diatech con la richiesta di un aggiornamento tecnologico sulla strumentazione attualmente collocata presso la S.C. Anatomia Patologica.

Diatech Pharmacogenetics s.r.l. propone un sistema analitico completo validato per uso "In Vitro Diagnostics" (IVD) composto da due piattaforme indipendenti:

- **Sistema EasyPGx:** analisi dei principali geni coinvolti nella risposta ai farmaci antitumorali che consente un'importante riduzione del tempo operatore e del TAT (complessivamente entro le 3 ore a partire dal tessuto FFPE)
- **Sistema Real Time Sequencing System:** sistema già in uso presso il laboratorio di Anatomia Patologica che fornisce informazioni relative alla sequenza in tempo reale.
- La soluzione proposta comprende tutti i reagenti necessari al funzionamento del sistema, i materiali di calibrazione e controllo, il materiale consumabile, kit di estrazione manuale del DNA da tessuti FFPE ed un sistema per estrazione di DNA da sangue periferico per biopsia liquida.
- La soluzione proposta è marcata CE IVD.

Descrizione Sistema:

- **Sistema principale, Linea EasyPGx**

- Protocollo interamente CE-IVD dall'estrazione del DNA fino alla reazione di rilevamento delle mutazioni
- Protocollo veloce e ridotta manualità: dal tessuto al risultato finale in meno di 3 ore con soli 10 minuti di "hands-on-time"
- I reagenti di estrazione sono contenuti all'interno del kit. Essi comprendono buffer, enzima e reagente per deparaffinare. Il processo è molto rapido, permettendo l'esecuzione dell'estrazione in una reazione one-step in circa 1 ora con soli 5 minuti di "hands-on-time"
- Reagenti in formato "Ready-to-use": le miscele di amplificazione contenenti primers, sonde e master mix sono in formato "dry" prealiquotate in strip da 8 pozzetti
- Protocollo "Easy-to-use": non c'è necessità di scongelare, congelare o pipettare in ghiaccio e i pochi step di pipettamento riducono il rischio di errori o contaminazioni

- Presenza di controllo interno: ogni oligo-mix permette la co-amplificazione del gene target e di un gene di controllo endogeno mediante duplex qPCR, permettendo di monitorare eventuali errori legati alla mancata dispensazione del campione o alla presenza di inibitori
 - Elevata sensibilità: limite di rilevamento fino a 0.5-1% di allele mutato rilevabile
 - Sensibilità analitica: 1-200 ng/rxn
 - Flessibilità: stesso profilo termico per lo studio dei 4 geni somatici: NRAS, EGFR, KRAS e BRAF. Possibilità di eseguire nella stessa run applicazioni miste
 - Vengono forniti inoltre strumenti e reagenti per la conservazione del sangue, e l'estrazione del cfDNA dal plasma.
 - Software di analisi incluso nel protocollo CE-IVD il quale permette di facilitare e velocizzare l'interpretazione del dato grezzo fino al risultato
- **Sistema di backup, Linea Response:**

- Sistema per uso In Vitro Diagnostico con tecnologia end point PCR con rilevamento tramite intercalante e pirosequenziamento, comprensivo di sistema informatico per la gestione dei dati clinici in ambiente comune con la S.C. di Oncologia, per analisi di farmacogenetica avanzata.
- Workflow CE-IVD in combinazione con il sistema strumentale proposto dall'amplificazione del DNA fino alla reazione di rilevamento e identificazione delle mutazioni tramite sequenziamento;
- Sequenziatore che sfrutta il principio del pirosequenziamento con piastra da 96 pozzetti per consentire l'analisi di più campioni e/o geni contemporaneamente; il sistema effettua il sequenziamento in tempo reale e al tempo stesso genotipizza e determinare la frequenza allelica al termine della corsa.
- Presenza all'interno del sistema di uno strumento Real Time PCR per la valutazione del prodotto di PCR tramite analisi End Point prima di procedere all'analisi mutazionale, evitando la necessità di eseguire la valutazione qualitativa tramite gel d'agarosio,
- Reagenti accessori necessari alla procedura totalmente validati CE-IVD
- Software di analisi interpretativo dei dati forniti dal pirosequenziamento in grado di analizzare in automatico tutti i risultati provenienti dai kit somatici.

Con il sistema proposto è possibile eseguire i test richiesti con un workflow completamente CE-IVD e – tramite analisi End-Point prevista nel manuale d'uso del kit – di comprendere se la PCR è avvenuta correttamente o meno e di valutare i motivi di un eventuale fallimento senza spreco di materiale biologico e/o di reagenti di sequenziamento.

L'analisi della reazione di pirosequenziamento avviene in maniera quantitativa e chiara attraverso apposito software con limiti di accettazione ben definiti in metodica.

L'azienda Diatech Pharmacogenetics è inoltre produttrice e/o distributrice di vari sistemi diagnostici in grado di soddisfare esigenze future del laboratorio di biologia molecolare, tra i quali:

- NGS (Next Generation Sequencing), con applicazioni validate CE-IVD anche per Fibrosi Cistica, BRCA1-2
- Nanostring, piattaforma utilizzata in vari IRCCS oncologici per analisi dei trascritti di fusione, rischio di ricorrenza del tumore alla mammella, scelta della terapia immuno-oncologica.

Risultati attesi

- Esecuzione dei test indicati secondo i criteri definiti
- Contenimento dei costi finora sostenuti per test in convenzione esterna, in quanto eseguiti contestualmente al progetto.
- Sviluppo di reti collaborative fra le Strutture Aziendali USL e qualificate strutture operanti in ambito sanitario e di ricerca.
- Valorizzazione delle strutture aziendali USL valdostane nella Rete Oncologica Piemonte Valle d'Aosta così da promuovere mobilità verso tali strutture di uno o più test.
- Saranno previsti incontri bimestrali col team per la valutazione dei casi e miglioramento continuo delle performance. Il risultato sarà espresso dalle relazioni prodotte che attesteranno il grado di collaborazione positiva del gruppo e la capacità di creare reti collaborative con centri che eseguono la stessa tipologia di analisi in particolare all'interno della Rete Oncologica Piemonte Valle d'Aosta.
- Istituzione di un Gruppo Interdisciplinare e Cura (GIC) di Patologia Molecolare trasversale alle tre strutture interessate, modificando e integrando l'elenco dei GIC di cui all'allegato 2 della Deliberazione del Direttore Generale n.694 del 22.06.2015 e successive modificazioni, oppure integrando la partecipazione del settore di Biologia Molecolare nei GIC di pertinenza.

Costo complessivo del Progetto articolato per voci di spesa

VOCI DI SPESA	COSTO COMPLESSIVO PRESUNTO <u>1° Annuo</u>	IVA 22%	
Apparecchiature canone annuale	€ 14.400,00	€ 3.168,00	
Kit per esecuzione test - costo annuale	€ 27.189,00	€ 5.981,58	
Materiale di consumo destinato al progetto	€ 3.176,00	€ 698,72	
Kit e materiali di consumo per cfDNA	€ 1.680,00	€ 369,60	
Controlli di qualità ESP Lung External Quality Assessment Scheme	€ 550,00	€ 121,00	
Altri controlli qualità	<i>Da definire</i>		
Formazione del personale	€ 3.000,00	€ 660,00	
Altro (specificare)			TOTALE CON IVA
TOTALE	€ 49.995,00	€ 10.998,90	€ 60.993,90
			Residuo € 32.379,73

Il Responsabile del Progetto
 Firma 