



**SARDEGNA  
RICERCHE**

**Sardegna FESR 2014/2020 - ASSE PRIORITARIO I**

**“RICERCA SCIENTIFICA, SVILUPPO TECNOLOGICO E INNOVAZIONE”**

**Azione 1.1.4 Sostegno alle attività collaborative di R&S per lo sviluppo di nuove tecnologie sostenibili, di nuovi prodotti e servizi**

**PROGETTO CLUSTER TOP DOWN  
“NIASMIC - Not Invasive Analysis of Somatic  
Mutations In Cancer”  
RAPPORTO TECNICO  
ANALISI HTA (Fase iniziale)**



**SARDEGNA  
RICERCHE**

## Indice

<b>Glossario</b>	<b>2</b>
<b>Sommario</b>	<b>3</b>
Introduzione	3
Metodi	3
Risultati	3
Conclusioni	4
<b>Introduzione generale</b>	<b>5</b>
Razionale scientifico	5
<b>Progetto NIASMIC</b>	<b>7</b>
Fini del progetto	7
Stato dell'arte	8
Sviluppo del progetto	9
Analisi dei costi	10
Costi attuali per la diagnosi di malattie genetiche con le tecnologie in uso	10
Stima dei costi	13
Conclusioni	15
Bibliografia	17



**SARDEGNA  
RICERCHE**

## Glossario

<b>bp</b>	base pair
<b>ccfDNA</b>	circulating cell free DNA
<b>ctDNA</b>	circulating tumor DNA
<b>Mb</b>	Megabase
<b>NGS</b>	Next Generation Sequencing
<b>NIASMIC</b>	Non-Invasive Analysis of Somatic Mutation in Cancer
<b>SSN</b>	Servizio Sanitario Nazionale
<b>WES</b>	Whole exome sequencing
<b>WGS</b>	Whole genome sequencing
<b>XLID</b>	X-linked intellectual disability



**SARDEGNA  
RICERCHE**

## Sommario

### Introduzione

I tumori solidi e le patologie oncoematologiche di tipo linfoproliferativo, sono una delle principali cause di morbidità e mortalità in tutto il mondo, primariamente a causa del fallimento della precoce individuazione della malattia in fase iniziale e alla inadeguatezza delle terapie, con un conseguente impatto sulla efficacia del trattamento. Il progetto NIASMIC – Non Invasive Analysis of Somatic Mutations in Cancer – nasce con l'intento di abbinare la tecnologia di sequenziamento NGS ad un trend sempre più diffuso e rappresentato dalla sostituzione della biopsia solida con quella liquida a scopi diagnostici, con i vantaggi che quest'ultima comporta. Più nel dettaglio, la biopsia liquida rappresenta una fonte di diversi analiti e biomarcatori che possono essere utilizzati in campo diagnostico. In questo contesto, il progetto NIASMIC prevede il sequenziamento di DNA circolante tumorale (ctDNA) a partire dalla frazione plasmatica.

L'obiettivo è di valutare con i principi dell'Health Technology Assessment (HTA) i vantaggi e i limiti delle tecnologie NGS studiate nel corso progetto NIASMIC rispetto al gold standard per il sequenziamento in diagnostica in ambito sanitario pubblico analizzando la qualità diagnostica, le caratteristiche tecniche, la sicurezza, il rapporto costo-efficacia e l'appropriatezza, considerando le ricadute cliniche, etiche e tecniche.

### Metodi

I dati sono stati raccolti principalmente tramite ricerca bibliografica (PubMed), indagini di mercato, dati del Sistema Sanitario Nazionale e analisi dei costi.

### Risultati

Le metodiche di sequenziamento NGS, seppure all'avanguardia, non risultano diffuse in Italia nel campo diagnostico. La metodologia Sanger ed altri metodi di indagine genetica sono ancora i più utilizzati, nonostante siano più costosi (considerando la quantità di dati prodotti) e meno efficienti se paragonata alle metodologie NGS. L'utilizzo del ctDNA a scopi diagnostici rientra in un trend osservato nella comunità finanziaria il cui potenziale di mercato del settore è stato valutato dagli operatori di settore di considerevole interesse.



**SARDEGNA  
RICERCHE**

## Conclusioni

L'implementazione del progetto NIASMIC nella pratica diagnostica, con l'utilizzo della tecnologia NGS per il sequenziamento di ctDNA da biopsia liquida, risulta cost-effective, time-saving per il SSN e per il paziente, migliorerebbe il percorso clinico e diagnostico del paziente con un'analisi più completa e, in un secondo momento, faciliterebbe anche il follow-up del paziente con relativo monitoraggio dell'efficacia terapeutica. Vanno comunque evidenziate alcune considerazioni etiche, comuni alle pratiche di sequenziamento NGS.



**SARDEGNA  
RICERCHE**

## Introduzione generale

Il seguente HTA è focalizzato sull'applicazione della tecnologia di Next Generation Sequencing (NGS) su DNA tumorale libero circolante (circulating tumor DNA – ctDNA) estratto da biopsia liquida di pazienti oncologici e confrontato con la pratica diagnostica in uso nelle strutture sanitarie nazionali, basata su molteplici metodologie applicate all'analisi molecolare di DNA estratto da biopsia solida.

Gli aspetti presi in considerazione sono il contesto scientifico e lo stato dell'arte, la validità analitica, l'utilità clinica e i vantaggi apportati dallo sviluppo del progetto, i costi e l'impatto etico-sociale.

La valutazione dei benefici, degli svantaggi della tecnologia NGS e le eventuali raccomandazioni sono state eseguite in un'ottica di comparazione con le tecniche di indagine genetica attualmente in uso nei laboratori ospedalieri. A tal fine si è proceduto con l'analisi dei diversi aspetti che riguardano la tecnologia NGS, quali il contesto di utilizzo, la descrizione della tecnologia, i criteri regolatori, l'efficacia e la sicurezza, nonché gli aspetti economici, organizzativi ed etici.

## Razionale scientifico

L'applicazione della tecnologia NGS rispetto alle tecniche convenzionali permette di migliorare le analisi genetiche grazie alla elevata processività e alla esauriente capacità di risoluzione. In un'unica analisi si ottiene il profilo genetico completo del paziente e della sua neoplasia, sia in termini qualitativi che quantitativi, contrariamente alle diverse metodiche necessarie per la rilevazione delle possibili alterazioni genetiche che stanno alla base della patologia o del suo decorso.

Con le tecniche convenzionali, per esempio, la ricerca di mutazioni puntiformi, come la sostituzione di un nucleotide o la delezione-inserzione di pochi nucleotidi, viene svolta mediante sequenziamento Sanger su singoli frammenti di circa 400bp (paia di basi). La ricerca di una delezione-inserzione di una regione genica richiede l'applicazione della metodica MLPA se vengono coinvolti gli esoni, o di tecniche di citogenetica molecolare, quali la FISH e la array-CGH per anomalie cromosomiche più importanti. L'amplificazione genica, che si riscontra a carico di alcuni importanti oncogeni nei tessuti tumorali, viene indagata oggi con tecniche semiquantitative come la real-time PCR, la FISH o la array-CGH. Inoltre, il disegno dei saggi genetici e l'interpretazione dei rispettivi risultati richiedono conoscenze approfondite del contesto genetico e patologico in esame, sono soggetti a errori e sono molto laboriosi perché poco automatizzabili.

Il NGS permette di superare i limiti tecnici delle metodiche convenzionali anche grazie alla completa automatizzazione delle analisi mediante pipeline bioinformatiche in grado di rispondere contemporaneamente ai diversi quesiti molecolari, qualitativi e quantitativi, con maggiore sensibilità, precisione e affidabilità. Grazie alla nascita del NGS nell'ultimo decennio le banche dati



## **SARDEGNA RICERCHE**

internazionali si sono arricchite di dati genetici con un andamento esponenziale, mettendo a disposizione della comunità scientifica un potente mezzo per l'interpretazione clinico-diagnostica delle varianti genetiche. L'applicazione di queste tecnologie a livello del sistema sanitario nazionale e regionale porterebbe alla generazione di una banca dati genetica specifica per la popolazione italiana o regionale, potenziando notevolmente la capacità di interpretazione dei dati.

Parallelamente agli sviluppi tecnologici, anche gli sviluppi scientifici in oncologia hanno modificato le modalità di fare diagnosi e trattamento. Nello specifico, un esempio di tale cambiamento è rappresentato dall'utilizzo della biopsia liquida. Infatti, è possibile identificare in campioni di sangue provenienti da pazienti oncologici una varietà di analiti differenti e potenzialmente utilizzabili come fonte di marcatori tumorali: cellule tumorali circolanti (CTCs), cellule progenitrici, cellule endoteliali mature, piastrine "istruite" sul tumore, DNA libero circolante (circulating cell free DNA – ccfDNA), come il ctDNA, o anche RNA libero circolante (ccfRNA), vescicole extracellulari, esosomi e oncosomi<sup>1,2</sup>. Ognuno di questi marcatori può essere utilizzato per aumentare la nostra conoscenza sulle basi molecolari della malattia, sul carico o sull'eterogeneità tumorale, e può fornire un nuovo e potente mezzo per migliorare la diagnosi, direzionare la terapia e monitorare la patologia. Tuttavia, per poter sfruttare al meglio questi marcatori è necessario sviluppare procedure di analisi robuste, standardizzate e riproducibili per l'applicazione sulle biopsie liquide. La presenza del ctDNA, derivante da cellule apoptotiche o in necrosi, in pazienti oncologici rappresenta una fonte di DNA che consente di superare i limiti della biopsia solida: è ottenuta in maniera non invasiva da un semplice prelievo, eventualmente ripetibile nel tempo per seguire l'evoluzione del tumore, e include non solo il profilo genetico della lesione primaria ma anche delle eventuali metastasi nel caso di tumore solido.

In questo contesto, il progetto NIASMIC (Non-Invasive Analysis of Somatic Mutation in Cancer) si propone di studiare e rilevare mutazioni a livello del ctDNA, valido marcatore tumorale in quanto la sua quantità in circolo incrementa esponenzialmente con l'aumentare del carico tumorale: costituisce infatti circa 1% del ccfDNA negli stadi iniziali della patologia e aumenta fino a 40% negli stadi tardivi<sup>3</sup>. Inoltre, il rilevamento di ctDNA può essere utilizzato come un marcatore di forme recidive negli stadi iniziali<sup>4-7</sup>, può essere utilizzato per monitorare il successo di un trattamento<sup>8</sup> e può avere un impatto sulla decisione terapeutica, come per esempio nel caso delle mutazioni EGFR9, dove in pazienti affetti da adenocarcinoma polmonare si va alla ricerca della mutazione T790M nel gene EGFR ricorrendo all'analisi del ctDNA. È così possibile predire la risposta alla terapia nei pazienti affetti, anche vari mesi prima della evidenza clinica di progressione della malattia stessa.

Tuttavia, la quantità di ctDNA nel plasma rimane bassa e dato che la frequenza allelica può anche rappresentare lo 0.01%, nel caso ad esempio di piccoli subcloni tumorali, sono necessarie analisi molto sensibili per la sua detezione. Per ovviare a questo problema il progetto NIASMIC si pone in questo contesto all'avanguardia, utilizzando le tecnologie di sequenziamento NGS per la



**SARDEGNA  
RICERCHE**

rilevazione di mutazioni su ctDNA Il progetto prevede l'utilizzo delle tecnologie genomiche e biotecnologie per sviluppare un metodo di prevenzione, diagnosi e cura personalizzata dei pazienti affetti da neoplasie integrando le analisi bioinformatiche e i processi di laboratorio.

## Progetto NIASMIC

Il progetto NIASMIC si propone di sviluppare un protocollo di analisi del profilo genetico del ctDNA estratto da biopsia liquida di pazienti oncologici mediante l'applicazione del NGS su un pannello di geni. Il pannello, studiato in collaborazione con i reparti di oncologia degli ospedali coinvolti nel progetto, sarà comprensivo delle regioni genomiche di interesse clinico per un ampio spettro di neoplasie.

La combinazione della biopsia liquida con la tecnologia NGS offre la possibilità di ottenere un quadro genetico completo del paziente e della neoplasia in corso, per una diagnosi precoce e dettagliata, utili sia per l'inquadramento clinico-prognostico che terapeutico. Infatti, la presenza di particolari mutazioni in geni specifici può portare ad una patologia più aggressiva o a cloni resistenti alle terapie, fattori che, se conosciuti, permettono una scelta terapeutica personalizzata con ricadute sia sulla qualità della vita del paziente che della spesa sanitaria. La realizzazione di un "kit" a partire dalla tecnologia studiata (biopsia liquida), sarà d'interesse anche per le aziende del settore biotech che potranno sviluppare prodotti innovativi per lo screening, la diagnosi e il follow-up in oncologia, un settore in forte espansione secondo recenti analisi del mercato delle biotecnologie per la salute.

## Fini del progetto

Il progetto NIASMIC integra le più avanzate tecnologie e competenze del centro di ricerca, le conoscenze cliniche dei partner ospedalieri, le conoscenze tecnico scientifiche e del mercato da parte delle aziende e si avvale della presenza sul territorio regionale di una delle più grandi piattaforme di sequenziamento NGS in Italia, connessa con il centro di calcolo ad alte prestazioni del CRS4. Nello specifico, il progetto NIASMIC risponde alle esigenze degli investitori nel settore life science, orientate (come emerso anche dall'analisi dello stato dell'arte) verso la ricerca di informazioni sullo stato di salute di un paziente attraverso un prelievo del sangue. Vi è una maggiore attenzione verso la diagnostica e lo screening da parte delle aziende del settore biomedico, principalmente perché sono cambiate tre fondamentali condizioni al contorno:

- **Volontà dei pazienti di conoscere il proprio stato di salute.** Mentre il concetto di screening e prevenzione era un tempo visto come un servizio pubblico obbligatorio verso cui porsi in modo passivo, oggi sono sempre di più i test pagati out-of-pocket (i.e. non rimborsati) che il paziente sceglie deliberatamente di fare, basti pensare all'Harmony Test





**SARDEGNA  
RICERCHE**

per la trisomia del cromosoma 21 sviluppato da Ariosa (acquistata da Roche), sempre più diffuso tra le donne in gravidanza.

- **Minore costo delle analisi genetiche.** Estrarre informazione rilevante da tessuti biologici è sempre più economico, rapido e meno invasivo. L'effetto dei progressi tecnologici (della NGS in primis) ha un impatto diretto sulla specificità dei test disponibili, ovvero sulla capacità di minimizzare il numero di falsi positivi, direttamente correlati ai costi di diagnosi ulteriore e follow-up. Una migliore tecnologia porta dunque ad una riduzione del costo di individuazione di un paziente malato.
- **Maggiore utilità dell'informazione genetica.** La continua evoluzione della medicina personalizzata, ovvero delle terapie con elementi di specificità rispetto al paziente in esame, ha aumentato notevolmente l'impatto dell'informazione diagnostica sulla terapia.

Alla luce di un nuovo scenario in cui il paziente è attivo nella scelta del proprio percorso di screening, in cui analisi un tempo impensabili sono alla portata del sistema sanitario e del sistema assicurativo o addirittura del privato ed i risultati di tali analisi possono fare la differenza sulle probabilità di riuscita del trattamento, è evidente che il peso dello screening e della diagnosi sia completamente diverso rispetto a prima. Un esempio di questo cambio di prospettiva è la rilevanza che sta assumendo agli occhi della comunità finanziaria il settore della biopsia liquida, ventaglio di procedure non invasive alternative alla biopsia chirurgica con cui è possibile effettuare analisi biologiche tramite un semplice prelievo del sangue.

## Stato dell'arte

Nella pratica diagnostica clinica è molto comune, se non esclusivo, l'utilizzo della tecnologia di sequenziamento secondo il metodo Sanger come evidente anche dalle prestazioni erogate dal nostro Servizio Sanitario Nazionale (SSN). Tuttavia, in linea di principio, il concetto teorico che sta dietro alle tecnologie di sequenziamento Sanger e NGS è simile. In entrambi i metodi, infatti, i nucleotidi fluorescenti sono aggiunti dalla DNA-polimerasi uno per volta su di un template di DNA. Ogni nucleotide che viene incorporato, viene poi identificato grazie alla sua fluorescenza. La differenza più critica tra i due metodi sta però nel volume di materiale sequenziato. Mentre con il metodo Sanger è possibile sequenziare un solo frammento di DNA per volta, mediante l'utilizzo di sequenziatori a capillare, la NGS è un tipo di sequenziamento parallelo, che permette cioè di sequenziare milioni di sequenze contemporaneamente e, di conseguenza, migliaia di geni per volta. La sensibilità della tecnologia NGS permette di identificare varianti genetiche poco rappresentate, come nel caso dell'analisi di un tessuto tumorale ricco di stroma o nel caso della presenza di una metastasi recidivante. Oltre a questi vantaggi, con il NGS è possibile ottenere una



**SARDEGNA  
RICERCHE**

quantità enorme di dati in tempi molto più brevi, coprendo anche l'intero genoma e permettendo un aumento della resa grazie anche alla possibilità di sequenziare più campioni simultaneamente (multiplex).

Questi vantaggi hanno fatto sì che l'utilizzo delle tecniche di NGS trovasse applicazioni nel campo della ricerca ma anche nei laboratori di diagnostica. Le tecniche di NGS, infatti, oltre ad essere diffuse ed utilizzate nella diagnostica fuori dal nostro territorio nazionale, stanno iniziando a diffondersi anche in Italia. In Lombardia, ad esempio, il servizio NGS è offerto e previsto nel nomenclatore tariffario con il codice 29.29.7. Il NGS, inoltre, ha già un grande valore anche per l'analisi dei ctDNA e delle biopsie liquide in generale, includendo dunque anche il sequenziamento di mRNA e miRNA<sup>10-12</sup>. A conferma di ciò, lo scorso anno un test su biopsia liquida della Foundation Medicine (il FoundationACT® assay), basato sull'analisi di un pannello contenente più di 70 geni e marcatori genomici sia per l'instabilità dei microsatelliti sia per il carico tumorale mutazionale nel sangue, è stato nominato dalla FDA come breakthrough device [13]. Il FoundationACT® test è basato su tecnologia NGS per l'identificazione di sostituzioni, inserzioni, delezioni, alterazioni del numero di copie (copy-number alterations), riarrangiamenti genici, ma anche di signature genomiche per l'instabilità dei microsatelliti e per il carico mutazionale tumorale nel sangue, utilizzando il DNA libero circolante isolato dal plasma derivato da sangue intero. Il FoundationACT® test fornisce, dunque, un metodo per rispondere ad un serio unmet medical need rappresentato dal profiling genomico completo di tumori in pazienti che non possono essere sottoposti a biopsie solide. Se dovesse essere approvato, incorporerebbe diversi companion diagnostics e marcatori informativi ai fini delle terapie personalizzate in un unico test da biopsia liquida. In più, le biopsie liquide sono una opzione sempre più importante per prendere decisioni in vista di trattamenti personalizzati per pazienti con tumore in stadi avanzati. C'è infatti una forte necessità di soluzioni non invasive per questi pazienti.

A supportare la necessità e l'importanza di sviluppare test da biopsie liquide, il Cobas EGFR Mutation Test v2 (cobas, Roche Diagnostic US, Indianapolis, IN, USA) è stato infatti approvato dalla FDA e ha raggiunto la milestone per l'utilizzo come companion diagnostic (CDx) per il trattamento del Non-Small-Cell Lung Carcinoma insieme con Erlotinib [14]. Questo test, che tuttavia si avvale di un sistema basato su PCR e non su NGS, riesce a identificare 42 mutazioni sugli esoni 18, 19, 20 e 21 del recettore per il fattore di crescita epidermico a partire da ctDNA plasmatico.

## **Sviluppo del progetto**

Il progetto NIASMIC prevede, a seguito della sottomissione e approvazione del protocollo di studio da parte del Comitato Etico, la raccolta di informazioni cliniche e materiale biologico del paziente. Il DNA costituzionale, il DNA da biopsia solida e il ctDNA da biopsia liquida saranno sequenziati per l'identificazione di varianti, germinali e somatiche, che verranno confrontate con le banche dati per



**SARDEGNA  
RICERCHE**

la valutazione del loro impatto sulla patologia. Il confronto biopsia solida – biopsia liquida indicherà i limiti e le potenzialità dell'analisi del ctDNA, anche in correlazione all'origine della neoplasia e alla sua stadiazione. Parallelamente ad una ottimizzazione della tecnologia per applicazioni nella diagnosi e il follow-up in un successivo rapporto HTA presenterà una analisi dei costi della tecnologia in funzione della continua evoluzione nel settore,

La tecnologia proposta potrà essere tramutata successivamente in un kit diagnostico o in un servizio per iniziative commerciali da parte di aziende del settore Biotech per il collocamento in un segmento di mercato in rapida crescita. Il potenziale di mercato del settore, valutato dalla J.P. Morgan Healthcare Conference nel 2016 è considerevole ed è stimato ad oltre 20 miliardi di dollari tenuto conto dell'impatto che potrebbe avere sulla personalizzazione terapeutica, il monitoraggio dei suoi effetti, la valutazione dei rischi in fase di prognosi e lo screening. Appare quindi evidente l'impatto economico-sanitario che gli esiti di questo progetto potranno avere per le aziende regionali coinvolte, per i pazienti e per la comunità estesa della ricerca scientifica e degli operatori sanitari.

## **Analisi dei costi**

### **Costi attuali per la diagnosi di malattie genetiche con le tecnologie in uso**

Per effettuare l'analisi dei costi ci siamo riferiti ai nomenclatori tariffari vigenti e aggiornati per le varie regioni italiane, prendendo ad esempio le tariffe per effettuare l'analisi di segmenti di DNA mediante sequenziamento Sanger, attualmente il metodo più diffuso nonostante sia un metodo superato, o mediante tecnologia NGS, laddove disponibile.

In Italia, la spesa media per effettuare l'analisi di segmenti di DNA mediante sequenziamento Sanger di un blocco con una lunghezza di circa 400bp equivale a 161,56€ con una deviazione standard di  $\pm 14,73$ €, con un valore minimo di 137,60€ e massimo di 196,74€ (Tabella 1). Essendo questo il prezzo per singolo frammento genico di circa 400bp, per avere una stima del costo che avrà l'analisi finale, bisogna considerare il prezzo derivante dall'analisi di più frammenti (esoni). In Toscana, ad esempio, effettuare la diagnosi molecolare per la Sindrome di Alport, ovvero sequenziare con metodo Sanger il singolo gene COL4A5, composto da 30 esoni, o il gene COL4A3 o COL4A4, composti anch'essi da 30 esoni, ha un costo per singolo gene di 4680€, equivalente a una spesa di 14040€ nel caso in cui si rendesse necessario sequenziare tutti i geni. La Regione ha recentemente messo a disposizione una soluzione per evitare di ricorrere all'analisi con metodo Sanger dei tre geni, consistente appunto nell'analisi NGS ad altissima ampiezza mediante utilizzo di un pannello di ampliconi clonali dei geni COL4A5, COL4A4, COL4A3, FN1. Questa opzione ha il costo di 4680€.



## SARDEGNA RICERCHE

Attualmente, in Italia solo la regione la Regione Lombardia ha introdotto nel suo nomenclatore tariffario la tecnologia NGS ad un costo di 2072,74€ (cod. 29.29.7 con rimborso alla struttura sanitaria di circa 2000€).

Tabella 1. Nomenclatore tariffario regionale

<b>Abruzzo</b>	€ 155,97	<b>Molise</b>	€ 155,97
<b>Basilicata</b>	€ 155,97	<b>Piemonte</b>	€ 156,00
<b>Calabria</b>	€ 172,00	<b>Puglia</b>	€ 155,97
<b>Campania</b>	€ 155,97	<b>Sardegna</b>	€ 155,97
<b>Emilia-Romagna</b>	€ 191,50	<b>Sicilia</b>	€ 155,97
<b>Friuli</b>	€ 137,60	<b>Toscana</b>	€ 156,00
<b>Lazio</b>	€ 155,97	<b>Trentino</b>	€ 156,00
<b>Liguria</b>	€ 155,97	<b>Umbria</b>	€ 171,60
<b>Lombardia</b>	€ 196,74	<b>Valle D'Aosta</b>	€ 171,60
<b>Marche</b>	€ 180,80	<b>Veneto</b>	€ 137,60
<b>Media</b>	€ 161,56		
<b>SD</b>	€ 14,73		
<b>Min</b>	€ 137,60		
<b>Max</b>	€ 196,74		

Cercando informazioni riguardanti la diagnostica con NGS in altri Stati, abbiamo trovato uno studio del 2018 in cui sono stati raccolti dati da 15 laboratori francesi di genetica che eseguono analisi



## SARDEGNA RICERCHE

cliniche con tecnologia NGS su DNA germinale e somatico utilizzando pannelli di geni comprendenti da 5 a 50 geni target [15]. Le osservazioni sono state raccolte nel periodo compreso tra Marzo 2014 e Novembre 2015. La stima include i costi sperimentali di arricchimento e di sequenziamento, i costi di analisi bioinformatiche, i costi per la validazione tecnica e per la validazione biologica, costi del personale e costi aggiuntivi, quali controlli di qualità, R&D e di manutenzione/fornitura del laboratorio. I costi per NGS per pannello di geni targeted erano in media 607€ ( $\pm 207$ ) per l'analisi genetica somatica e di 550€ per l'analisi oncogenetica germinale.

In un altro studio condotto negli USA, è emerso che il costo delle analisi WES varia da 1319,12€ fino a 2981,44€, dove i costi più bassi sono stati rilevati nei laboratori che effettuavano analisi di esomi a scopo clinico o medico, mentre quelli più alti sono associati all'analisi di esoma completo [16]. Tuttavia, è stato anche osservato che per ridurre drasticamente i costi delle metodiche di sequenziamento NGS sia necessario adoperare dei pannelli di geni target invece di utilizzare metodi WGS (Tabella 2).

Tabella 2. Stima dei costi NGS in USA, adattato da [16]

	<b>WES</b>	<b>Pannello di 5-50 geni tumorali</b>	<b>Pannello di &gt;50 geni tumorali</b>	<b>Pannello per XLID</b>	<b>Pannello per perdita uditiva</b>
<i>Costi preanalitici/analitici</i>	952,61€	270,67€	673,16€	523,76€	788,57€
<i>Costi per le apparecchiature</i>	100,62€	15,64€	110,72€	22,84€	96,08€
<i>Costi del lavoro</i>	36,90€	27,41€	51,84€	29,87€	11,717€
<i>Costi per la bioinformatica/analisi dei dati/reporting</i>	729,98€	111,78€	614,28€	140,60€	290,88€
<i>Costi di validazione e costi aggiuntivi</i>	324,57€	182,08€	261,88€	87,00€	246,35€
<i>Costo totale finale per campione</i>	2142,80€	607,42€	1711,90€	803,22€	1431,56€



**SARDEGNA  
RICERCHE**

## Stima dei costi

Per effettuare la stima dei costi relativa al progetto NIASMIC, abbiamo considerato la diagnosi e il follow-up come due fasi differenti del progetto. Nella prima fase, ovvero al momento della diagnosi, sarà necessario effettuare il sequencing del DNA genomico (gDNA), del DNA somatico (sDNA) e, infine, del ctDNA. Nella seconda fase (follow-up) sarà necessario effettuare solamente l'analisi del ctDNA (Tabella 3). Per singolo paziente sono quindi previsti quattro sequenziamenti, utilizzando dei frammenti di 150bp + 150bp: sequencing del gDNA con un coverage di 100x, del sDNA con un coverage di 500x e due sequencing del ctDNA a 10000x. Le quattro reazioni di sequencing prevedono inoltre l'utilizzo di sonde disegnate su un pannello di 500 geni target per effettuare la cattura delle sequenze di interesse, ovvero sequenze codificanti principalmente per geni coinvolti nella carcinogenesi, nei processi di metastatizzazione e geni che possono determinare la risposta alla terapia (geni farmacogenomica). Tale pannello ha una grandezza di circa 2Mb.

Con queste premesse, il sequenziamento del ctDNA, del gDNA e del sDNA richiede, rispettivamente, 67M, 1M e 3M di clusters. Stimando il costo di una flowcell per sequencing con relativi reagenti a 17400€ circa e dato che una flowcell contiene 8 lane da 370M di clusters, sequenziare ctDNA, gDNA e sDNA ha un costo finale per campione di 391€, 4€ e 20€. Al costo del sequenziamento vanno però aggiunti i costi dei reagenti, rappresentati maggiormente dalla library preparation e dall'estrazione del DNA (Tabella 4), del personale, equivalente a 50€/h, e un ammortamento, che comprende i costi della strumentazione e dell'eventuale ripetizione di campioni a bassa qualità. Più nel dettaglio, per quanto riguarda il costo del personale, sono necessarie all'incirca tre giornate lavorative da 8 ore in laboratorio per il processamento di un batch di 12 campioni (3 pazienti) più due giornate lavorative per le analisi bioinformatiche. Per un totale di 2000€, ovvero 667€ per paziente.

Riassumendo, i costi stimati per paziente equivalgono a circa 2008€, comprensivi di diagnosi e follow-up.



**SARDEGNA  
RICERCHE**

Tabella 3 Stima dei costi per paziente con applicazione del progetto NIASMIC

Fase 1 - Diagnosi	Coverage (x)	Cluster (*10 <sup>6</sup> ) 500 geni	Campioni per lane	Costo per campione	Costo dei reagenti	Costo del personale	Ammortamento	Totale per paziente
ctDNA	10000	67	5,55	391				2008
gDNA	100	1	555	4	364,5	500	37,5	
sDNA	500	3	111	20				
Fase 2 - follow up	Coverage (x)	Cluster (*10 <sup>6</sup> ) 500 geni	Campioni / lane	Costo/campione	Reagenti	Personale	Ammortamento	
ctDNA	10000	67	5,55	391	121,5	167	12,5	

Tabella 4 Costo dei reagenti

Reagenti	Costi
DNA extraction	38
Library prep	52
Library	40
UMI	10
Blockers + Wash	10
Tot	112



**SARDEGNA  
RICERCHE**

## 19 Conclusioni

Un importante risultato del presente HTA è dato dalla quantificazione dei costi reali per sequenziamento in diagnostica in Italia. Oggigiorno ci si avvale ancora della tecnologia Sanger per il sequenziamento di blocchi di circa 400bp per volta, ad un costo che per il sequenziamento di un singolo gene che nella maggior parte dei casi supera notevolmente il costo del WES o WGS, con evidenti differenze in termini di risultati e rapidità. Nonostante quello economico sia un aspetto molto importante da tenere in considerazione, è importante menzionare le altre ricadute che l'implementazione delle tecnologie NGS apporterebbe nella pratica clinica.

Il progetto NIASMIC, infatti, si inserisce in un contesto in cui l'utilizzo della biopsia liquida per l'analisi genetica sul DNA sta lentamente sostituendo la biopsia solida. Attualmente, quest'ultima viene effettuata principalmente sui tessuti prelevati dal tumore stesso tramite intervento chirurgico e presenta pertanto alcune limitazioni: in primo luogo, potrebbe essere problematico attuare la biopsia nella sede della neoplasia. Vanno anche considerate le condizioni cliniche del paziente e anche l'esiguità del prelievo bioptico con le relative difficoltà diagnostiche. Inoltre, poiché metodica invasiva presenta diversi rischi e non può essere svolta routinariamente o per un monitoraggio nel tempo. Un altro limite è dovuto al fatto che la biopsia contiene le informazioni di una regione limitata del tumore, e quindi non rappresenta l'eterogeneità clonale che caratterizza tali patologie e che spiega le differenze fenotipiche osservate e le diverse risposte alla terapia.

Lo sviluppo del progetto NIASMIC comporta un'analisi delle ricadute in termini etici. Dopo aver definito il pannello di geni da controllare, a test ultimato, il risultato potrebbe essere positivo e indicare, pertanto, la presenza di una o più mutazioni. In questo caso, il test ha rilevato una o più mutazioni a livello di uno (o più) gene responsabile della predisposizione ereditaria allo sviluppo di uno specifico tumore, cioè presentano una copia del gene mutata. Tuttavia, un risultato positivo non significa che il paziente ai cui è stata riscontrata una mutazione svilupperanno necessariamente il tumore, ma solamente che quel paziente ha una predisposizione a sviluppare il tumore, cioè possiede un rischio maggiore rispetto ad una persona che non presenta la specifica mutazione. Infatti, non tutte le persone che sono portatrici di mutazione sviluppano la patologia neoplastica; sebbene queste mutazioni aumentano notevolmente il rischio di insorgenza del tumore, questo non si sviluppa finché la copia normale del gene corrispondente non viene soggetta a mutazione nel corso della vita.





## **SARDEGNA RICERCHE**

Poiché ciascuna persona eredita due copie dello stesso gene, deve incorrere un evento mutazionale in ciascuna copia per sopprimere la funzione di quel gene; l'acquisizione di una nuova mutazione può quindi provocare direttamente l'insorgenza del tumore. L'identificazione di una mutazione predisponente permette di stabilire un protocollo di controlli clinici ravvicinati e di valutare l'opportunità di interventi preventivi. Permette inoltre di estendere l'esame ad altri familiari a rischio che desiderino eseguirlo. In questi ultimi l'analisi ha valore di test predittivo, perché consente di distinguere, all'interno di queste famiglie, i soggetti portatori della mutazione dai non portatori, identificando con precisione gli individui che presentano un elevato rischio di tumore e coloro il cui rischio è paragonabile a quello della popolazione generale. In questo modo, i primi potranno essere avviati in maniera mirata a specifici programmi di sorveglianza, al fine di una diagnosi precoce, o di profilassi, mentre i secondi potranno essere indirizzati ai controlli previsti per la popolazione generale. Le mutazioni riscontrabili tramite il test possono rientrare nelle seguenti categorie prognostiche: con significato patologico noto; con significato benigno in quanto sono riscontrabili in individui normali e sono prive di significato patologico; con significato incerto in quanto non ancora note o caratterizzate dalla comunità medico-scientifica. In questo caso possono essere necessari ulteriori indagini per chiarire il significato della variante.

Un risultato negativo, con assenza di mutazioni, indica che il test non ha rilevato la presenza di mutazioni nei geni esaminati. Tuttavia, è importante sottolineare che un risultato negativo non significa che il paziente ha rischio zero di sviluppare un tumore; queste persone possiedono lo stesso rischio di tumore riportato per la popolazione generale, ciò perché la maggior parte di questo genere di tumori si estrinseca in forma sporadica.

Un'altra problematica etica sorgerebbe dalla possibile rilevazione di mutazioni nel ccfDNA in geni non compresi nel pannello definito a priori. Effettuando WES e WGS, soprattutto nelle fasi iniziali del progetto e durante l'implementazione del pannello genico da utilizzare, esiste il rischio di imbattersi in incidental findings, mutazioni che non sono correlate con l'indicazione iniziale per cui era stato effettuato il test ma che possono avere un valore medico per il paziente.

Oltre quanto visto finora, ci sono anche delle osservazioni tecniche da tenere in considerazione. ai vantaggi in termini di riduzioni dei costi per il SSN e per il paziente, centralizzazione e velocizzazione dei test, l'utilizzo di tecnologie NGS permette anche un abbattimento del rischio di errore clinico. Anzi, la superiorità in termini di accuratezza del NGS rispetto al sequenziamento con metodo Sanger è stata dimostrata nel 2016 tramite uno studio condotto da ricercatori del National Human Genome Research Institute [17]. I due metodi sono stati confrontati e da un'analisi di 5660 varianti genetiche identificate con il NGS, il metodo Sanger non è riuscito a confermarne 19 ad una prima analisi e 2 ad un secondo ciclo di analisi, con una percentuale di conferma pari al 99,965%. In questo contesto, l'analisi con metodo Sanger o anche una validazione con questo metodo, si sarebbe rivelata non necessaria o anche controproducente, dato che 17 delle 19 varianti sarebbero state escluse per errore.



**SARDEGNA  
RICERCHE**

## Bibliografia

1. Neumann, M. H., Bender, S., Krahn, T. & Schlange, T. ctDNA and CTCs in Liquid Biopsy – Current Status and Where We Need to Progress. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 16, 190–95 (2018).
2. In 't Veld, S. & Wurdinger, T. Tumor-educated platelets. *Blood* 133, 2359–64 (2019).
3. Bettegowda, C. et al. Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. *Sci. Transl. Med.* 6, 224ra24 LP-224ra24 (2014).
4. Garcia-Murillas, I. et al. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci. Transl. Med.* 7, 302ra133 LP-302ra133 (2015).
5. Tie, J. et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci. Transl. Med.* 8, 346ra92 LP-346ra92 (2016).
6. Schmiegel, W., Scott, R. J., Dooley, S., Lewis, W. & Meldrum, C. J. Blood-based detection of RAS mutations to guide anti-EGFR therapy in colorectal cancer patients: concordance of results from circulating tumor DNA and tissue-based RAS testing. *Mol. Oncol.* 11, 208–219 (2017).
7. Siravegna, G. & Bardelli, A. Genotyping cell-free tumor DNA in the blood to detect residual disease and drug resistance. *Genome Biol.* 15, 449 (2014).
8. Murtaza, M. et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature* 497, 108 (2013).
9. Ulz, P., Heitzer, E., Geigl, J. B. & Speicher, M. R. Patient monitoring through liquid biopsies using circulating tumor DNA. *Int. J. Cancer* 141, 887–896 (2017).
10. Fernandez-Cuesta, L. et al. Identification of Circulating Tumor DNA for the Early Detection of Small-cell Lung Cancer. *EBioMedicine* 10, 117–123 (2016).
11. Perakis, S., Auer, M., Belic, J. & Heitzer, E. Chapter Three - Advances in Circulating Tumor DNA Analysis. in *Advances in Clinical Chemistry* (ed. Makowski, G. S. B. T.-A. in C. C.) 80, 73–153 (Elsevier, 2017).
12. Ulz, P. et al. Inferring expressed genes by whole-genome sequencing of plasma DNA. *Nat. Genet.* 48, 1273 (2016).
13. Foundation Medicine's New Liquid Biopsy Assay Granted Breakthrough Device Designation by U.S. Food and Drug Administration. Foundation Medicine, Inc (2018). Available at: <http://investors.foundationmedicine.com/news-releases/news-release-details/foundation-medicines-new-liquid-biopsy-assay-granted>.
14. Roche expands indication for cobas® EGFR Mutation Test v2 as a companion diagnostic with TAGRISSO®. PR Newswire (2018). Available at:



**SARDEGNA  
RICERCHE**

- <https://www.prnewswire.com/news-releases/roche-expands-indication-for-cobas-egfr-mutatio-on-test-v2-as-a-companion-diagnostic-with-tagrisso-300632648.html>.
15. Marino, P. et al. Cost of cancer diagnosis using next-generation sequencing targeted gene panels in routine practice: a nationwide French study. *Eur. J. Hum. Genet.* 26, 314–323 (2018).
  16. Sabatini, L. M. et al. Genomic Sequencing Procedure Microcosting Analysis and Health Economic Cost-Impact Analysis: A Report of the Association for Molecular Pathology. *J. Mol. Diagnostics* 18, 319–328 (2016).
  17. Beck, T. F., Mullikin, J. C. & Biesecker, L. G. Systematic Evaluation of Sanger Validation of Next-Generation Sequencing Variants. *Clin. Chem.* 62, 647 LP – 654 (2016).