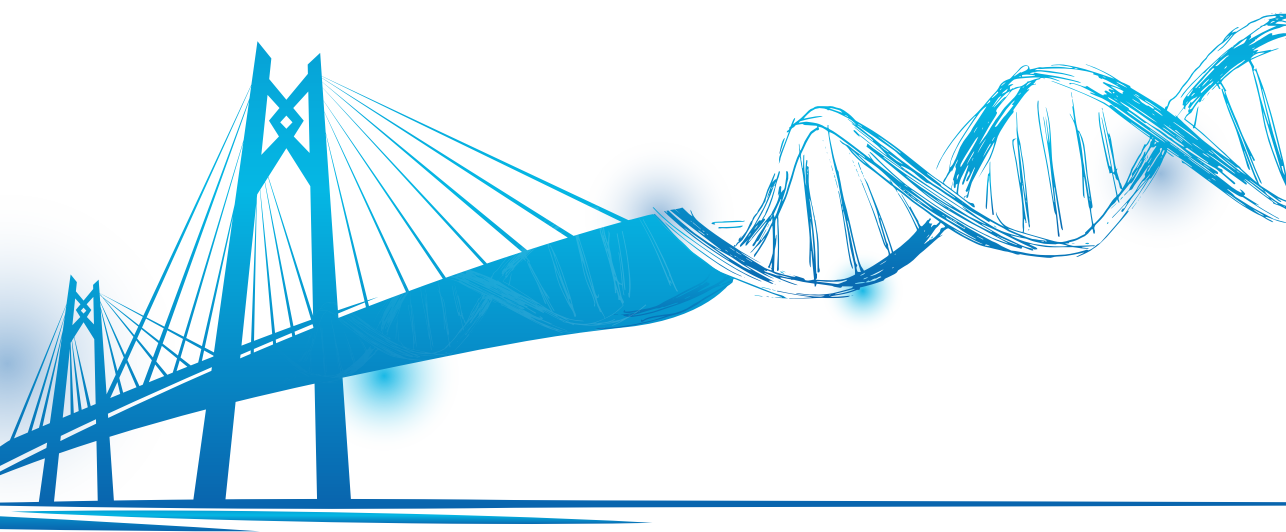


ATTI DEL CONVEGNO

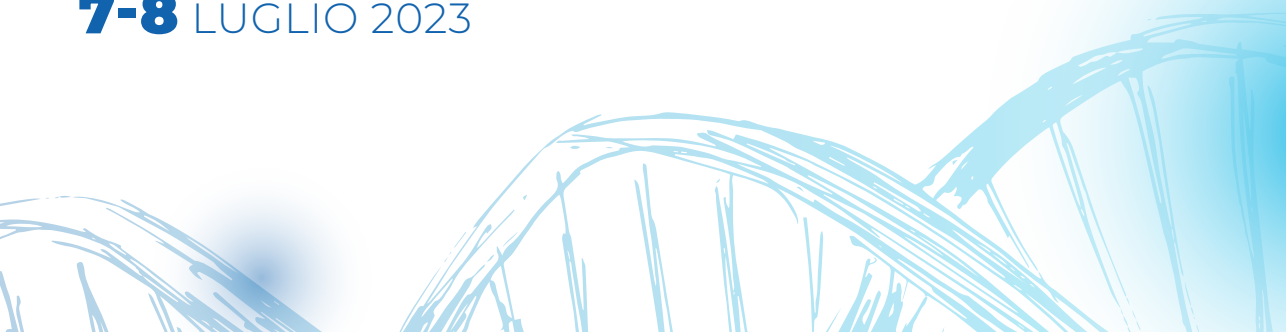
BRIDGE THE GAP

IN PRECISION MEDICINE



ROMA

7-8 LUGLIO 2023



Razionale Scientifico

L'avvento della medicina personalizzata ha rivoluzionato, negli ultimi anni, l'approccio terapeutico degli oncologi clinici nella gestione dei pazienti affetti da neoplasie solide in stadio avanzato. Infatti, per questi pazienti, è notevolmente ampliato il quadro dei geni ai quali è riconosciuto il ruolo di biomarcatori di risposta al trattamento da analizzare nel tentativo di definire la strategia terapeutica più adeguata. Di conseguenza, anche il ruolo dei patologi negli ultimi anni ha subito una forte evoluzione; infatti: la strettissima connessione dell'anatomia patologica ai test di patologia molecolare predittiva ha comportato una forte trasformazione dei laboratori, ancora oggi in atto.

In particolare, la necessità di distinguere gli istotipi tumorali in maniera precisa è diventata un'esigenza sempre più importante con l'evoluzione dei trattamenti personalizzati per i pazienti, che possono variare a seconda della differente tipologia di tumore e dell'assetto mutazionale dei geni a bersaglio molecolare posseduto.

Tra i tumori solidi in cui il ruolo dei biomarcatori di risposta al trattamento è sempre più trainante ritroviamo il *tumore del colon metastatico* e il *tumore del polmone non a piccole cellule (NSCLC)*.

Il tumore del colon è una malattia molto eterogenea e il valore biologico delle alterazioni molecolari si traduce in maniera differenziale sulla base di differenti aspetti clinici. I trattamenti nella malattia avanzata sono scelti dall'oncologo in base a due aspetti fondamentali: sulla base delle possibilità del paziente di essere trattato con terapie più intensive, definite *doppiette o triplete*, o con *monoterapia*, e sulla base dei *molecular drivers*. Ad oggi, da "Linee Guida AIOM", i target da valutare in prima linea, al fine di definire un trattamento personalizzato per il paziente con tumore del colon, sono le mutazioni dei geni RAS, BRAF, che hanno un ruolo predittivo negativo, e l'*instabilità dei microsatelliti (MSI)* e la fusione di *HER2*. Gran parte dei pazienti, che alle indagini cliniche risulta essere compliant alle terapie più intensive, viene valutata per trattamento con doppietta o tripla di farmaci. Infatti, il paziente con *adenocarcinoma del colon* in aggiunta alla chemioterapia tradizionale (*fluorouracile o capecitabina*) riceve in combinazione un farmaco anti-EGFR, se è *wild type* per le mutazioni che ricadono nei geni RAS e BRAF, oppure riceve un trattamento classico più l'anticorpo monoclonale *bevacizumab* se i geni RAS o BRAF risultano mutati. La biopsia liquida in questo contesto sta acquisendo un valore sempre crescente: infatti dallo "studio PARADIGM", il primo studio prospettico a testare la superiorità di due *anticorpi molecolari*, *panitumumab* rispetto a *bevacizumab*, in combinazione con la chemioterapia standard, si è evinto che in una percentuale di pazienti risultati *WT* per RAS, BRAF o all'*instabilità dei microsatelliti (MSI)* all'indagine molecolare su tessuto, questi sono risultati invece mutati all'analisi del ct-DNA. Tale popolazione risulterà resistente e non avrà beneficio

da *paninutumab*. Quindi è necessaria una iper-selezione per i pazienti per beneficiare al massimo dei trattamenti.

L'*instabilità dei microsatelliti (MSI)* è un fattore predittivo positivo di risposta al trattamento con gli inibitori del *check point* immunitario. A seguito dello studio clinico "KN.177", il *pembrolizumab*, è stato eletto come terapia di prima scelta, in prima linea, nei tumori con instabilità MSI (in termini di *PFS*, *OS* e tossicità ha dato risultati ottimali rispetto alla chemioterapia tradizionale).

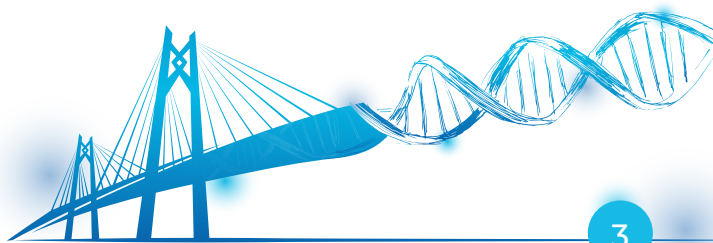
La mutazione di *BRAF* p.V600E, ad oggi risulta avere un importante ruolo prognostico: se è presente il tumore risulta più aggressivo, spesso associato a metastasi peritoneali e spesso segregante prevalentemente nel colon destro. Sono stati sviluppati inibitori mirati contro questa mutazione, in particolare il farmaco *encorafenib*. Tale mutazione è spesso associata all'instabilità dei microsatelliti. Inoltre, circa il 30% dei pazienti sviluppa mutazioni secondarie in seguito alla selezione molecolare causate dai molteplici trattamenti ricevuti. In questo contesto la biopsia liquida ha un ruolo fondamentale nella rivalutazione dell'assetto molecolare dei geni *RAS/BRAF*, al fine di valutare un nuovo trattamento per il paziente in seguito a progressione.

Infine, circa il 3% dei pazienti presenta la fusione di *HER2*, (da valutare con immunoistochimica). In questi casi il farmaco target utilizzato è il *Trastuzumab deruxtecan*, immunoconiugato composto da un anticorpo monoclonale anti-*HER2* legato ad un inibitore della topoisomerasi.

Tra le mutazioni frequentemente riscontrate ritroviamo: la mutazione puntiforme del gene *KRAS* p.G12C, presente nel 3% dei tumori del colon-retto, la metilazione del promotore del gene *MGMT* e i riarrangiamenti del gene *NTRK* (0,5% nel colon retto). Le alterazioni a carico di *NTRK* sono associate ai primi farmaci agnostici approvati in Italia: *entrectinib* e *larotrectinib*.

Nel tumore del polmone la situazione è ancora più complessa, per tale motivo le società internazionali IASCL/AMP/CAP hanno posto chiarezza a riguardo elaborando un pannello di "*must test genes*" che devono essere testati ai fini della più corretta stratificazione clinica del paziente oncologico affetto da NSCLC. I biomarcatori selezionati comprendono: le alterazioni di *EGFR*, la mutazione puntiforme p.V600E di *BRAF*, le traslocazioni a carico dei geni *ALK*, *ROS1*, *RET*, *NTRK* e le mutazioni causative dello *skipping* dell'esone 14 del gene *MET*. A questi si aggiunge la valutazione dell'espressione della proteina PD-L1. Circa il 50% dei pazienti affetto da NSCLC oggi può usufruire di una terapia a bersaglio molecolare, che consente loro non solo un aumento dell'aspettativa di vita, comportando una migliore risposta al trattamento, ma migliorandone anche la qualità.

Ad oggi, -da linee guida ESMO- le terapie target approvate in prima linea riguardano



le alterazioni del gene *EGFR*, i riarrangiamenti dei geni *ALK* e *ROS1* e le mutazioni puntiformi del gene *BRAF*. I farmaci target approvati in seconda linea, invece, hanno come bersaglio: i riarrangiamenti del gene *NTRK* l'exon *skipping* dell'esone 14 del gene *MET*, le fusioni a carico del gene *RET*, la mutazione puntiforme del gene *KRAS* p.G12C e le inserzioni dell'esone 20 del gene *EGFR*. Le stesse linee guida ci dicono che, nonostante i farmaci possano essere somministrati in prima o in seconda linea, la profilazione molecolare, da effettuare tramite piattaforme di sequenziamento di nuova generazione (NGS), è da praticare al momento della diagnosi in maniera simultanea per tutti i biomarcatori, in quanto, sin dall'inizio, deve essere pianificato il percorso terapeutico del paziente. Ad oggi, le mutazioni a carico del gene *EGFR*, in passato suddivise a seconda dell'esone di appartenenza della mutazione, si valutano invece in base alla valenza clinica della mutazione. Tali alterazioni possono, quindi, essere suddivise in quattro gruppi: le alterazioni "comuni" di *EGFR* (delezione dell'esone 19 e la mutazione puntiforme dell'esone 21), le mutazioni di *EGFR* p.T790like, le inserzioni dell'esone 20 di *EGFR* e le mutazioni P-loop α C – helix. Tale suddivisione ridistribuisce le mutazioni in base alla possibilità di risposta che è stata valutata a seguito della somministrazione dei farmaci inibitori della tirosin chinasi (TKI). Infatti, sulla base della mutazione posseduta, il paziente riceverà uno specifico trattamento: se è presente la mutazione p.L858R o la delezione dell'esone 19 a carico di *EGFR*, in prima linea, riceverà *osimertinib*, se invece l'alterazione posseduta appartiene al gruppo delle mutazioni meno comuni dell'esone 18 e 21 di *EGFR* potrà ricevere *afatinib* o *osimertinib*, se il paziente presenta un'inserzione dell'esone 20 del gene *EGFR*, sarà candidato a chemioterapia a base di *platino*, in prima linea di trattamento, con anticorpo bi-specifico in seconda linea, *amivantamab*. Infine, se l'alterazione appartiene alle mutazioni non comuni del gene *EGFR* è molto importante definire bene quale alterazione è presente, in quanto il farmaco varierà a seconda della specifica mutazione. Nei casi in cui (circa 2-3%) è presente la fusione del gene *RET*, viene somministrato il *sempcratinib*, che ha ottenuto ad oggi risposte al trattamento eccellenti (al 60% fino a tre anni).

La mutazione p.G12C del gene *KRAS*, presente nel 12% circa dei casi di adenocarcinoma del polmone, viene trattata con *sotorasib*, l'inibitore covalente di tale mutazione.

A tutte queste alterazioni di valore predittivo di risposta al trattamento, si aggiungono un elevato numero di co-mutazioni: quali l'alterazione dei geni *STK11/KEAP1* e dei geni *TP53/RB1* (spesso associata al driver molecolare, *EGFR*). Queste mutazioni hanno sicuramente un fattore prognostico negativo che influisce in maniera importante sull'outcome del paziente, ma non hanno influenza, al momento, sulla scelta del trattamento.

A seguito della somministrazione di farmaci target sempre più numerosi, il panorama delle mutazioni di resistenza acquisite dai pazienti è sempre più vario. Effettuare un nuovo test molecolare al paziente, a seguito di non risposta ai farmaci, è la soluzione migliore per programmare una nuova linea di trattamento: la re-biotizzazione del

tumore, a discapito della biopsia liquida, è considerato ancora ad oggi il gold standard per re-testare il paziente a seguito di una progressione.

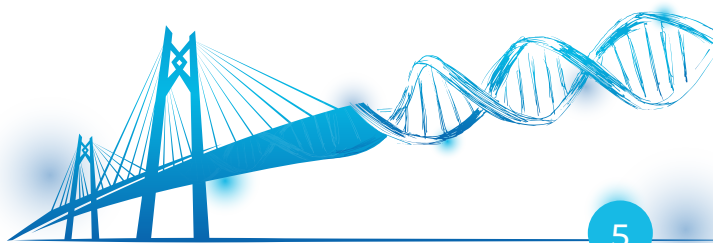
Nel tumore polmonare, la medicina di precisione sta assumendo una forte importanza anche in stadio precoce di malattia, infatti i test possono già essere richiesti anche nel setting di terapia neo-adiuvante e adiuvante. Ad oggi sono stati approvati, in Italia, due farmaci nel trattamento adiuvante: gli inibitori di terza generazione *osimertinib*, nel tumore EGFR MT, e l'immunoterapia con *atezolizumab*, nel caso in cui l'espressione di PD-L1 sia >50%, con *EGFR* e *ALK* WT.

La strettissima connessione tra l'esecuzione di una diagnosi isto o citologica, che definisce la natura del campione rappresentativo del tumore, e l'ottenimento dell'assetto molecolare, fondamentale per definire il trattamento personalizzato da somministrare al paziente, rende fortemente necessaria la presenza del laboratorio di patologia molecolare in anatomia patologica. Infatti, il referto ideale, da fornire all'oncologo clinico, dovrebbe comprendere l'integrazione del dato di biologia molecolare con quello morfologico.

Le società scientifiche stanno elaborando dei modelli di referto, che a breve dovranno essere utilizzati in tutta Europa, dove in prima pagina sono riportati i *Livelli essenziali di assistenza (LEA)* del paese di appartenenza, ossia le prestazioni e i servizi che il Servizio sanitario nazionale (SSN) è tenuto a fornire. I dati che devono essere sempre presenti all'interno di un referto devono descrivere in maniera chiara le informazioni relative al paziente, il materiale su cui viene effettuata l'indagine molecolare e il risultato, sia morfologico che molecolare. Inoltre, è di buona prassi associare ad ogni referto una discussione multidisciplinare ogni qualvolta sia presente un caso con una mutazione particolare o dubbia, o si voglia includere nel referto la presenza di mutazioni non riportate nella richiesta dell'oncologo clinico. Per stabilire la refertabilità di una mutazione riscontrata, a seguito di un test di biologia molecolare, è fondamentale valutare la richiesta dell'oncologo, la tipologia di tumore in analisi, la storia clinica del paziente e il dato di cellularità neoplastica, derivante dal campione in esame. Infatti, la validità di una mutazione dipende fortemente dalla percentuale di allele mutato riscontrato, in relazione alla percentuale di cellularità neoplastica identificata.

Questo, insieme ad altri fattori tecnici, permetterà di evitare refertazioni di mutazioni al di sotto della validità clinica o di mutazioni clonali non driver.

Quindi l'integrazione dei dati clinici e analitici relativi ad un caso clinico, per una ottimale gestione del paziente, risulta fondamentale. A tale scopo, l'anatomia patologica sta subendo una importante trasformazione definita "*Integrative Dimension of Pathology*" (ESDIP). L'aim fondamentale di questa nuova dimensione dell'anatomia



patologica è riuscire ad integrare tutti i dati relativi ad un paziente, quali informazioni cliniche, informazioni di imaging (*TAC-PET-ECO*), informazioni di biologia molecolare, informazioni morfologiche e renderle tutte visualizzabili e accessibili, a tutti gli specialisti, in ogni momento. Tutto questo è possibile mediante l'utilizzo della "*computational pathology*", disciplina che tramite l'ausilio di sistemi computazionali unisce *raw data* (imaging, dati di laboratorio ecc.) e genera dati, in modo da arrivare ad implementare gli algoritmi diagnostici, prognostici e predittivi. Tutto questo è possibile se si è in grado di fornire una vera e costante tracciabilità di tutti gli step che compongono l'algoritmo, a partire dall'arrivo del campione in laboratorio, con la successiva digitalizzazione delle *slide* derivanti da esso, fino al momento della refertazione. Ogni fase, inoltre, necessita di check point che permettano di controllare il processo ed effettuare integrazione di dati cito-istologici. Per ottenere ciò, la *digital pathology* si avvale dell'*intelligenza artificiale* (AI) che grazie ad una serie di tecniche computazionali, statistiche e matematiche, rende i sistemi informatici in grado di eseguire attività che normalmente richiedono intelligenza umana. Tra i sistemi utilizzati ritroviamo il *Machine learning* (ML), algoritmi e modelli statistici che traggono dati dai sistemi senza programmazione, il *Deep learning* (DL), ML con reti neurali per imparare dai *big data*, il *Convolutional neural networks*, DL utilizzato per attività di riconoscimento di immagini e video, il *training set*, sottoinsieme di dati utilizzato per addestrare un modello all'apprendimento automatico.

Gli algoritmi utilizzati si basano su: *accuratezza*, ossia la misura del rendimento complessivo di un modello, *precisione*, quanto sono accurate le previsioni positive di un modello, *recall*, misura di quanto bene il modello è in grado di identificare un dato. Una volta creato un algoritmo, questo sarà in grado di riconosce tutto ciò che è simile e di associarlo. L'algoritmo ideale da utilizzare in un laboratorio di patologia molecolare presente in anatomia patologica è in grado di integrare le informazioni che derivano dalla *Machine learning* con l'*Explainable AI*, ossia l'individuazione dell'area dove è presente la cellula di nostro interesse, l'*Interpretable AI*, ossia la predizione dell'assetto molecolare, e la *Transparent AI*, ossia quali elementi morfologici all'interno di una sezione predicano un fattore molecolare.

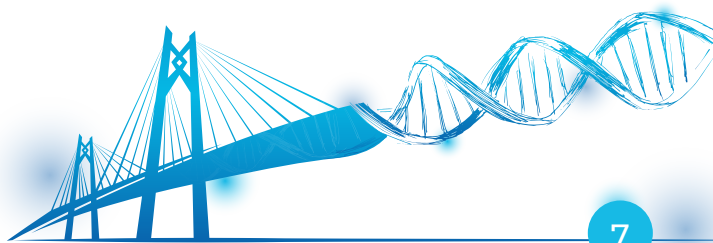
Obiettivo del progetto

Il continuo incremento dei biomarcatori predittivi di risposta terapeutica da dover testare per la migliore profilazione possibile del paziente affetto da adenocarcinoma del polmone non a piccole cellule (NSCLC) e da tumore del colon metastatico, comporta un'implementazione necessaria, soprattutto nei grandi e medi laboratori, di tecnologie di sequenziamento di nuova generazione. Inoltre, le difficoltà preanalitiche ed analitiche relative all'esecuzione dei test molecolari, sui campioni della pratica clinica, impattano

enormemente sulla corretta esecuzione di tali test. Questi aspetti, insieme alla necessità di dover creare una digitalizzazione dei dati relativi al paziente, a partire dalla formazione di archivi digitali dove i campioni possono essere recuperati con facilità, fino all'ottenimento di una diagnosi completa di ogni dato clinico relativo al paziente, facilmente accessibile da ogni specialista, hanno posto le premesse per lo sviluppo del progetto "Bridge the gap". L'obiettivo del progetto è identificare, assieme ai partecipanti, che rappresentano il complesso quadro dei laboratori accreditati per l'esecuzione dei test molecolari su territorio nazionale, i *pitfalls* analitici, al fine di ottimizzare il percorso diagnostico per la caratterizzazione molecolare del paziente affetto da tumori solidi in stadio avanzato, in particolare da *NSCLC* e *tumore del colon metastatico*.

Esercitazione pratica

Ciascun partecipante ha preso parte all'esercitazione pratica, svoltasi presso l'Hotel NH Collection a Roma, volta alla valutazione degli aspetti tecnici legati al Sequenziamento Genico di Nuova Generazione: a partire della preparazione del campione in fase preanalitica, alla processazione del campione biologico e all'esame molecolare in fase analitica, fino ad arrivare alla visualizzazione dei risultati ottenuti con la successiva elaborazione di un report chiaro e completo, da fornire all'oncologo clinico, in fase post-analitica. Nel dettaglio, sono stati discussi i principali percorsi diagnostici di allestimento del preparato cito-istologico, con le relative problematiche relative all'archiviazione del materiale da storing e alla digitalizzazione delle *slides* derivanti dal materiale da analizzare. Successivamente, è stata valutato in dettaglio il work flow analitico relativo all'impiego di tecnologie di NGS, con particolare rilevanza alla fase interpretativa del dato di sequenza, realizzata attraverso software di analisi di primo e di secondo livello. Inoltre, è stata approfondita in maniera dettagliata l'interpretazione e la valutazione clinica delle varianti che possono essere riscontrate, con l'esempio del tumore al polmone con focus sui geni *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *ALK*, *ROS*, *MET*, *RET*, *NTRK*, e del tumore del colon, con focus sui geni *KRAS*, *BRAF*, *HER2*, *NTRK* e sull'instabilità dei microsatelliti. In seguito, si è discusso delle caratteristiche principali che devono essere presenti all'interno di un referto, il quale deve risultare comprensivo del dato clinico, morfologico e molecolare relativo al paziente, affetto da una particolare neoplasia solida. Tale report dovrà facilitare la discussione multidisciplinare, in particolare tra il patologo molecolare e l'oncologo clinico. Infine, è stata analizzata, tramite workshop, l'"*Integrative Pathology*", la nuova frontiera dell'anatomia patologica, capace di digitalizzare i dati relativi ai pazienti e predire, tramite l'ausilio dell'intelligenza artificiale, diagnosi e dati molecolari, rilevandoli



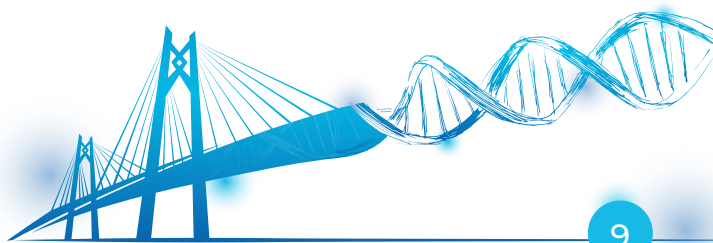
da campioni digitalizzati a confronto. La partecipazione dei discenti, ottimale in ogni fase delle giornate, è stata particolarmente incrementata dalla presentazione di casi clinici, riportati come spunto di riflessione per problematiche della pratica clinica. Grazie ad essa, è stato possibile analizzare le peculiarità analitiche di ogni centro partecipante, al fine di evidenziare le criticità che riducono l'efficienza analitica e di ritrovare le migliori soluzioni per la gestione della pratica clinica di ciascun laboratorio.

Discussione

- I primi problemi connessi all'impatto della biologia molecolare nei laboratori, hanno sicuramente riguardato la fase pre-analitica dei test. L'immunoistochimica classica, da sempre utilizzata nei laboratori di anatomia patologica, con l'arrivo dell'NGS ha sicuramente trovato un'integrazione fondamentale, ma i laboratori non sempre sono pronti ad utilizzarla.
- Le tecnologie di sequenziamento di nuova generazione devono essere necessariamente utilizzate nei laboratori di patologia molecolare predittiva, l'ausilio di tecnologie a single gene test, come la Real Time PCR, contribuirebbe a garantire un accesso limitato ai pazienti a terapie target. Il Sistema Sanitario Nazionale ha quindi il compito di garantire ad ogni paziente l'analisi completa dei biomarcatori stabiliti nei LEA, tramite tecnologie di NGS, evitandone l'accesso unicamente a coloro i quali possono accedervi privatamente, quindi pagando il test.
- La cellularità neoplastica presente in ogni campione in analisi è un fattore di ampia variabilità inter-osservatore. Questo ha un impatto importantissimo sulle seguenti indagini di biologia molecolare, ad esempio, nel riconoscimento tra mutazione somatica driver e sub-clonale. Tale errata valutazione potrebbe comportare la refertazione di una mutazione non espressa in maniera trainante nelle cellule tumorali, comportando una mancata risposta al trattamento che verrà somministrato al paziente.
- In passato era diffusa la previsione di centralizzare a qualsiasi costo dei test in NGS nei centri più grandi: ad oggi sappiamo che centralizzare ogni attività non è sostenibile; quindi, bisogna organizzare una strutturazione a livelli differenziali in tutto il territorio nazionale, in modo da garantire ad ogni paziente i test compresi nei LEA. Tale processo può avvenire tramite il supporto dei centri grandi ai centri minori, garantendo a quest'ultimo un sostegno per l'accesso dei pazienti ai *Comprehensive Genomic Profiling*.
- I campioni con i quali abbiamo a che fare nella pratica clinica sono ben lontani da quelli standardizzati, che vengono presi in considerazione per i controlli di qualità e

che di conseguenza danno risultati ottimali. Il campione perfetto dovrebbe presentare alta cellularità tumorale, una mutazione genica driver e nessuna mutazione clonale. Ovviamente questo non avviene in gran parte dei casi. Fondamentale nella refertazione, che avviene a seguito di una indagine molecolare, è valutare la richiesta dello specialista e riportare tra i risultati esattamente il reference range genico riportato nell'istestazione del report.

- Le mutazioni acquisiscono un differente valore a seconda del tumore nel quale vengono riscontrate: nel tumore del polmone, ad esempio, ha estremamente valore la presenza di una mutazione a carico dell'esone 2 del gene *KRAS* p.G12C, bersaglio per un trattamento target. La presenza di una mutazione del gene *KRAS*, differente della p.G12C o questa stessa mutazione non refertata correttamente, riportata ad esempio come p.G12X, può portare una gran confusione per l'oncologo.
- Una problematica ancora estremamente discussa nei laboratori riguarda la modalità di analisi, DNA-based o RNA-based, dell'*exon skipping* dell'esone 14 del gene *MET*. Tale alterazione si genera dall'acquisizione di una mutazione puntiforme a cavallo tra l'introne 13 e l'esone 14 di *MET*, che può generare l'andata via dello *splicing* dell'mRNA dell'esone 14. Nei database sono annoverate 274 varianti che generano tale *skipping*, ma le mutazioni che ricadono in quella regione che sono più di 500, questo vuole dire che non tutte queste causano lo *skipping*. Quindi, valutare tale alterazione su DNA non ha molto valore, in quanto non renderebbe possibile la predizione dell'impatto della mutazione sulla proteina. Al contrario, l'analisi dell'RNA permette di valutare effettivamente se è presente o no lo *skipping di MET*, oltre a verificare la presenza della mutazione.
- La struttura di un referto, che dovrà essere chiaro e completo, deve presentare, oltre ai campi relativi ai dati personali e identificativi del paziente, tutti i dati tecnici relativi al materiale biologico in esame. Quindi la tipologia di materiale utilizzato, la sede di provenienza del prelievo e le informazioni cliniche e patologiche relative al campione (ad esempio se il prelievo è stato effettuato prima o dopo trattamento, l'adeguatezza del preparato, la percentuale di cellule neoplastiche presenti nel campione).
- Il passaggio alla *digital pathology*, con la relativa scansione digitalizzata delle *slides* relative ai campioni in analisi, deve mantenere le stesse caratteristiche di qualità della anatomia patologica classica. Quindi affinché possa essere realizzata, tramite intelligenza artificiale, un'ottimale previsione di diagnosi, tramite connessione dei dati clinici e di analisi delle cellule tumorali presenti sul campione digitalizzato, devono essere rispettati tutti i criteri di qualità in fase pre-analitica tra i quali: assenza di contaminazione al taglio, spessore della fetta bianca e colorazione richiesta ottimali.

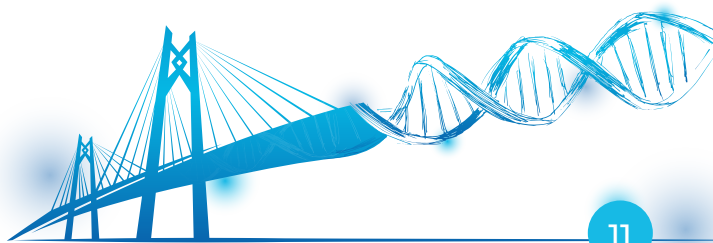


- La *digital pathology* può necessitare della supervisione di uno specialista per la creazione dell'algoritmo d'analisi, ossia il patologo può fornire le informazioni che occorrono all'intelligenza artificiale per distinguere, ad esempio, una cellula normale da una tumorale, o si può eseguire un'analisi non supervisionata, ossia si fornisce al software un numero elevato, ad esempio, di cancro del colon retto e di tessuti di colon normali, e lo strumento da sé impara a distinguerli. La scelta dell'algoritmo nella diagnosi crea un problema importante nella firma di un referto da parte di un patologo, quando non c'è la supervisione. Quindi è necessario rendere il processo riproducibile e fattibile tramite l'ausilio di standard di riferimento da cui l'algoritmo deve imparare: al momento sono disponibili surrogate solide, regolamentate e approvate in pratica clinica dalla U.S. Food and Drug Administration e dalla comunità europea EMA, che possono essere utilizzate.
- La digitalizzazione è fondamentale in fase pre-analitica, analitica e post-analitica: a volte i campioni conservati in archivio devono essere recuperati per le indagini molecolari, dopo anni che sono stati stoccati. Ad oggi gli archivi sono mal conservati, spesso delocalizzati ed esternalizzati dall'ospedale di riferimento. Tutto questo incide tantissimo sull'analisi del campione, allungando il tempo di analisi (*TAT*) in maniera non tollerabile e procurando un enorme ritardo, molto superiore ai 10 giorni lavorativi, delle risposte per la biologia molecolare.
- Per il nuovo *WHO*, relativo alla standardizzazione dei referti in anatomia patologica, il *grading*, che descrive l'aspetto e il comportamento delle cellule neoplastiche, quindi anche l'aggressività di un tumore, va inserito sempre all'interno del referto. L'intelligenza artificiale può aiutarci in questo contesto: è in grado di riconoscere il cancro con i vari sotto-pattern di crescita, ciò facilita la creazione di un *grading automatizzato*, inoltre è in grado di rilevare la presenza di micrometastasi.
- L'applicazione principale nell'ambito dell'adenocarcinoma del polmone, dell'intelligenza artificiale, permette di valutare il *PDL-1 SCORE*. Tale valutazione è soggetta ad un'alta variabilità inter-osservatore: cercare di migliorare la variabilità unendo l'occhio del patologo all'intelligenza artificiale può essere un importante passo avanti. Inoltre, tale applicazione può risultare di grande ausilio anche nella diagnosi di altri tumori, quali il cancro della mammella.

Take home message

- Dal 2004 al 2019 sono stati fatti dei passi da gigante nell'evoluzione della medicina personalizzata e, ad oggi, si sta riducendo sempre più la testina dei tumori non oncogene addicted. Infatti numerosi studi clinici stanno valutando dei numerosi geni che potrebbero diventare in futuro dei nuovi marcatori molecolari target da testare.

- I lavori educazionali, che permettono il confronto tra i vari centri e tra tutte le figure che fanno parte di un laboratorio, sono fondamentali, al fine di raggiungere un'ottimale performance in ogni fase di gestione di un work flow diagnostico (fase preanalitica, analitica e post-analitica).
- L'utilizzo di pipeline bioinformatiche ottimizzate e standardizzate per l'interpretazione del dato molecolare è fondamentale per la corretta interpretazione del dato. L'integrazione di algoritmi analitici di primo e di secondo livello consente una più adeguata gestione del risultato molecolare, in particolar modo nei casi dove la qualità dell'analisi molecolare è pregiudicata a causa delle caratteristiche del campione biologico.
- La regia per l'analisi dei test deve abitare in anatomia patologica, che detiene il materiale e sa come gestirlo al meglio.
- Adattare internamente i protocolli standard, presenti sui manuali relativi ai kit utilizzati per una determinata analisi, è fondamentale. Il materiale va protetto per tutto per l'uso che ne deve essere fatto: a tale scopo l'anatomopatologo deve organizzare al meglio il campione in fase preanalitica per lasciare tutto il materiale, già spesso poco di partenza, utilizzabile per la biologia molecolare.
- L'evoluzione della anatomia patologica è sicuramente proiettata alla patologia digitale, questo renderà la patologia molecolare più sicura già a partire dalla fase preanalitica.
- È necessaria una collaborazione tra le varie figure professionali che prendono parte al processo diagnostico relativo ad un paziente, solo in questo modo si potrà ottenere una medicina personalizzata per uno specifico caso clinico. Inoltre, è necessario che centri più grandi, *HUB*, vadano in soccorso a centri più piccoli, *spoke*, soprattutto per la profilazione genomica completa dei pazienti, a seguito dei test minimi, garantiti dai LEA, da eseguire per ogni paziente.
- L'*"Integrative pathology"* permette di raccogliere tutta la mole di dati riferiti ad un paziente (TAC, PET, risonanza, raw data, indagini molecolari, dati istologici), combinandoli tra loro. Questo garantisce l'ottimale gestione multidisciplinare di ciascun paziente, dalla clinica alla molecolare, facilitando, a ciascuno specialista, la diagnosi e l'elaborazione del protocollo di cura personalizzato per ogni paziente.
- Il vantaggio vero della *"digital pathology"* è garantire la completa profilazione morfologica e molecolare relativa ad un paziente, mediante l'ausilio dell'intelligenza artificiale, sotto la guida di uno specialista.



Referenze

1. Kerr KM, Bibeau F, Thunnissen E, Botling J, Ryška A, Wolf J, Öhrling K, Burdon P, Malapelle U, Büttner R. The evolving landscape of biomarker testing for non-small cell lung cancer in Europe. *Lung Cancer*. 2021;154:161-175
2. Malapelle U, Mayo de-Las-Casas C, Rocco D, Garzon M, Pisapia P, Jordana-Ariza N, Russo M, Sgariglia R, De Luca C, Pepe F, Martinez-Bueno A, Morales-Espinosa D, González-Cao M, Karachaliou N, Viteri Ramirez S, Bellevicine C, Molina-Vila MA, Rosell R, Troncone G. Development of a gene panel for next-generation sequencing of clinically relevant mutations in cell-free DNA from cancer patients. *Br J Cancer*. 2017;116:802-810
3. Malapelle U, Pepe F, Pisapia P, Sgariglia R, Nacchio M, De Luca C, Lacalamita R, Tommasi S, Pinto R, Palomba G, Palmieri G, Vacirca D, Barberis M, Bottillo I, Grammatico P, Grillo LR, Costa V, Smeraglio R, Bruzzese D, Troncone G. Harmonization of Next-Generation Sequencing Procedure in Italian Laboratories: A Multi-Institutional Evaluation of the SiRe® Panel. *Front Oncol*. 2020;10:236
4. Alessandro Caputo, Vincenzo L'Imperio, Francesco Merolla, Ilaria Girolami, Eleonora Leoni, Vincenzo Della Mea, Fabio Pagni, Filippo Fraggetta. The slow-paced digital evolution of pathology: lights and shadows from a multifaceted board. *Pathologica*, 2023; 115(3):127-136

Progetto realizzato grazie al
contributo non condizionante di

AMGEN®

Medica
EDITORIA E DIFFUSIONE SCIENTIFICA