



**“NEXT GENERATION SEQUENCING” NELLA DIAGNOSTICA CLINICA
DEI LABORATORI DI PATOLOGIA MOLECOLARE.
STATO DELL’ARTE**

A cura di:

Susanna Cappia, Paola Francia di Celle, Maria Scatolini, Tiziana Venesio

Approvato dal Gruppo di Studio sulla Patologia Molecolare

Partecipanti:

Susanna Cappia, Laura Casorzo, Andrea Castelli, Massimo Di Benedetto, Patrizia Agnese Falcone, Paola Francia di Celle, Doriana Giustetto, Genny Jocollé, Antonella Maffè, Caterina Marchiò, Narciso Mariani, Sara Orecchia, Roberta Patetta, Maria Scatolini, Francesca Schillaci, Stefano Taraglio, Silvana Ungari, Claudia Veggiani, Tiziana Venesio, Ludovica Verdun di Cantogno



Il Tema della Next Generation Sequencing è stato affrontato dal Gruppo di Patologia Molecolare nell'incontro del 28 maggio cercando in prima istanza di fornire una base di conoscenza delle tecnologie oggi esistenti che rappresentano la potenzialità e il limite del loro inserimento nella routine diagnostica.

Il Dr. Enrico Berrino (Anatomia Patologica IRCCS Candiolo) ha presentato una panoramica tecnica sui sequenziatori NGS oggi disponibili (Illumina e Thermofisher) e le chimiche che impiegano (sintesi o scambio ionico). Ha poi affrontato le procedure di preparazione delle librerie genomiche sostanzialmente basate su amplificazione genica o su cattura mediante ibridazione di sonde.

Dal confronto tra strumenti e metodi e dalla definizione delle loro caratteristiche e criticità derivano le scelte che i laboratori stanno affrontando compatibilmente con le risorse e gli aspetti strutturali delle singole realtà.

La riunione è proseguita con la presentazione delle attività NGS in essere nei laboratori del Gruppo. La Dott.ssa Paola Francia di Celle (Città della Salute e della Scienza di Torino) ha relazionato circa il percorso di validazione affrontato per maturare esperienza e competenza nella scelta di sistemi diagnostici da inserire nella routine diagnostica.

Il laboratorio ha considerato sia reagenti “custom” che kit commerciali CE-IVD e utilizzato strumentazione Illumina acquisita in azienda con fondi di ricerca. L'attività al momento è ancora sostenuta da fondi esterni e superata la fase di messa a punto tecnica è principalmente rivolta all'interpretazione dei dati e alla loro formalizzazione.

La terza relazione è stata presentata dalla Dott.ssa Susanna Cappia (AOU San Luigi di Orbassano) che svolge attività NGS di routine nelle neoplasie polmonari e coloretali dopo un lungo e graduale percorso di formazione utilizzando un pannello commerciale di medie dimensioni su sequenziatore acquisito a scopo di ricerca nel 2010.

Infine la Dott.ssa Tiziana Venesio (IRCCS Candiolo) e la Dott.ssa Maria Scatolini (Fondazione Edo ed Elvo Tempia) hanno relazionato sulla loro esperienza abbinata di messa a punto e validazione di metodiche NGS per la determinazione delle mutazioni somatiche dei geni BRCA 1/2 nel carcinoma ovarico a scopo predittivo (trattamento con inibitori PARP).

Il documento che segue raccoglie le relazioni anticipate da una breve sintesi circa l'attività dei laboratori di patologia molecolare del gruppo coinvolti nell'introduzione dell'NGS nella pratica clinica.

**GRUPPO DI PATOLOGIA MOLECOLARE RETE ONCOLOGICA PIEMONTE E VALLE D'AOSTA
INTRODUZIONE DELLA "NEXT GENERATION SEQUENCING" NELLA DIAGNOSTICA CLINICA DEI LABORATORI DI PATOLOGIA
MOLECOLARE. STATO DELL'ARTE.**

Paola Francia di Celle Città della Salute e della Scienza di Torino

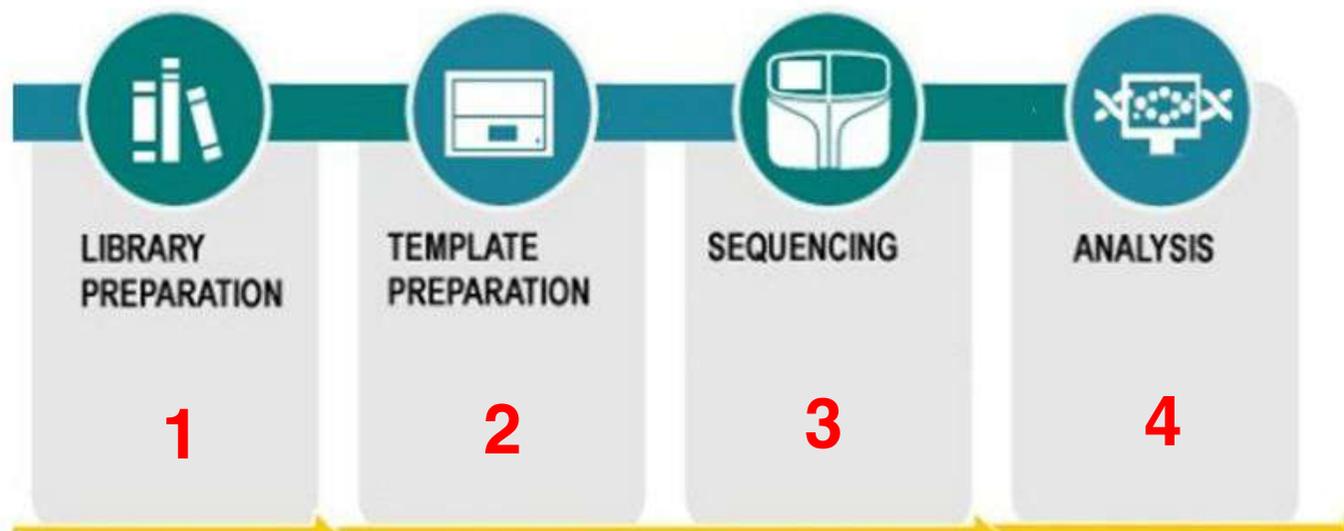
Susanna Cappia AOU San Luigi di Orbassano

Tiziana Venesio IRCCs Candiolo

Maria Scatolini Fondazione Edo e Elvo Tempia Biella

Il Gruppo di Patologia Molecolare nell' incontro del 28 maggio 2018 ha affrontato il tema della "Next Generation Sequencing" come potenziale di trasformazione dell'attività diagnostica che svolge. L'eterogenità del gruppo ha determinato la necessità di fornire a tutti i partecipanti gli elementi base della metodica tramite una panoramica tecnica allargata alle strumentazioni e alle chimiche di NGS esistenti. Ad oggi si sono cimentati nell'NGS i quattro laboratori della Regione che disponevano di equipaggiamenti acquisito con fondi esterni all'attività assistenziale (strutture accademiche e di ricerca). Nel documento che segue sono raccolte le loro esperienze e considerazioni.

Panoramica Tecnica NGS - Dr. E. Berrino IRCCS Candiolo



Il flusso di lavoro per un esperimento in NGS segue uno schema molto conservato:

- 1) preparazione della libreria di molecole che verranno sequenziate,
- 2) creazione del DNA a singolo filamento utilizzato come 'stampo' per il sequenziamento,
- 3) sequenziamento e lettura delle sequenze
- 4) analisi bioinformatica per l'allineamento e l'identificazione delle varianti rispetto ad un genoma di riferimento



Illumina



	MiSeq	NextSeq	HiSeq 2500	HiSeq X Ten
Output	15 Gb	120 GB	1000 GB	1800 GB
Number of Reads	25 Million	400 Million	4 Billion	6 Billion
Read Length	2x300 bp	2x150 bp	2x125 bp (2x250 update mid-2014)	2x150 bp
Cost	\$99K	\$250K	\$740K	\$10M

5/29/2014

IIT Indore

Source: Illumina 15

ion torrent



by *life technologies*



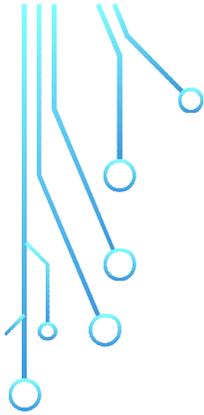
Ion PGM

- 3 types of chips
- 200 or 400 bp reads
- Up to 5.5 million reads / Ion 318 chip
- 4 – 7 h run time

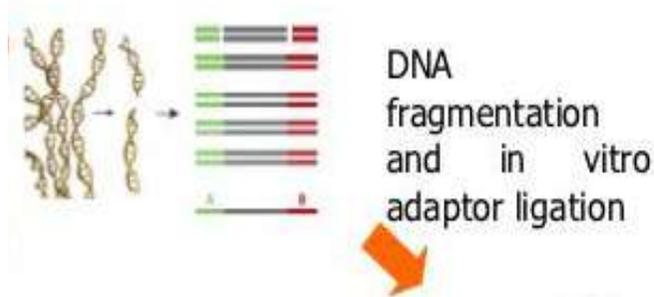
Ion S5 System			Ion S5 XL System		
Simple workflow for panels, microbes, exomes, and transcriptomes			Simple, rapid workflow for panels, microbes, exomes, and transcriptomes		
Ion 520 Chip	Ion 530 Chip	Ion 540 Chip	Ion 520 Chip	Ion 530 Chip	Ion 540 Chip
Final Reads 3–5 million	Final Reads 15–20 million	Final Reads 60–80 million	Final Reads 3–5 million	Final Reads 15–20 million	Final Reads 60–80 million

Le tecnologie di sequenziamento a disposizione sono molteplici, ma le più diffuse sono il sequenziamento con **terminatori reversibili** (Illumina) e il sequenziamento **'ion semiconductor'** (IonTorrent, life Technologies)

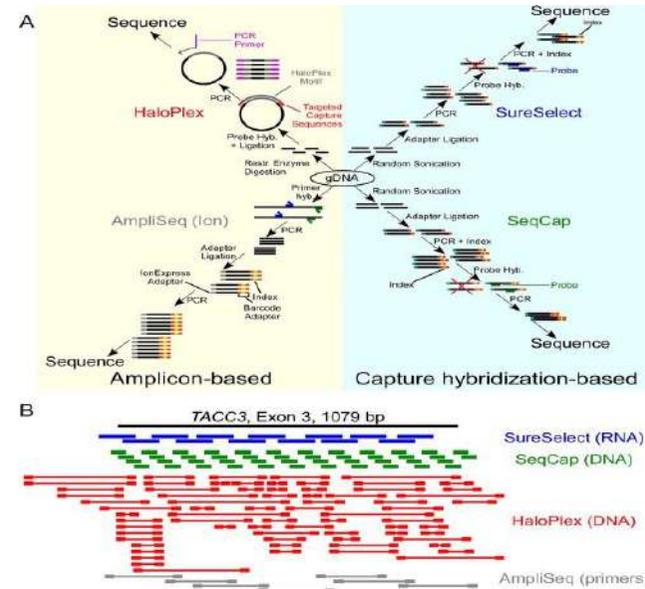
Entrambe le metodiche presentano un buon livello di flessibilità riguardo al numero di campioni analizzabili in un'unica corsa, con tempistiche abbastanza variabili per quanto riguarda l'analisi dei risultati



Una libreria NGS consiste in un set di frammenti di acidi nucleici coniugati con *sequence terminatrici* (adattatori)



La preparazione di una libreria dipende strettamente dal tipo di analisi che si vuole effettuare



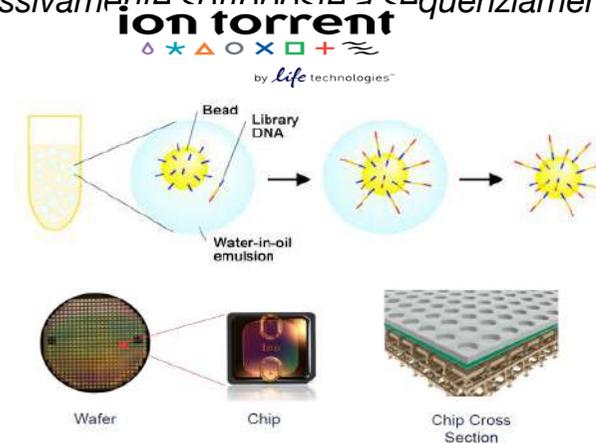
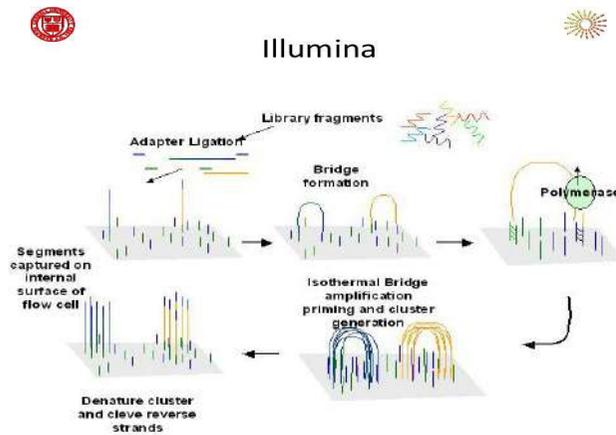
Samorodnitsky Eric et al., Hum Mutat. 2015, 36::903-14.

Per scopi diagnostici, il metodo più usato è l'NGS Target che prevede due diversi tipi di libreria:

- libreria basata su **ampliconi**: tramite PCR si amplificano un numero molto elevato di regioni genomiche che costituiranno la libreria ad ampliconi
- libreria basata su **ibridazione e cattura**: le regioni desiderate vengono «catturate» tramite ibridazione con oligonucleotidi esca e successivamente selezionate tramite purificazione



Il template NGS è costituito da molecole di DNA a singolo strand, amplificate con la PCR dai frammenti che costituiscono la libreria e successivamente sottoposte a sequenziamento

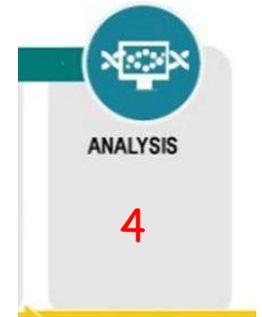
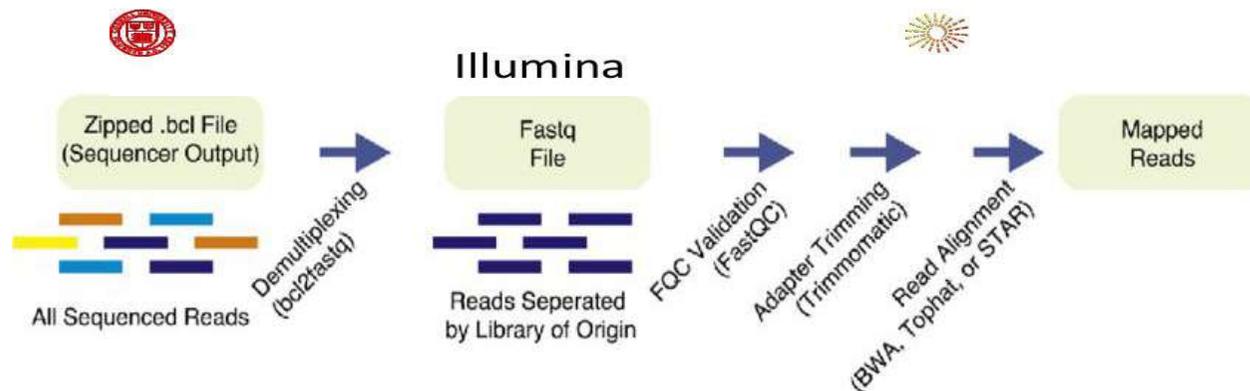


Le librerie vengono usate per generare un DNA a singolo filamento (ssDNA) che servirà come stampo per il successivo sequenziamento

Le due tecnologie più diffuse (Illumina e IonTorrent) prevedono due differenti modalità di generazione del ssDNA:

- **Illumina:** la libreria è dispensata su un supporto solido (Flow Cell) sul quale sono stati sintetizzati e ibridati primers complementari agli adattatori; tramite PCR vengono creati gruppi (clusters) di ssDNA monoclonali per il successivo sequenziamento
- **IonTorrent:** la libreria è sottoposta ad un processo di PCR ad emulsione, nella quale piccole gocce di soluzione oleosa creano un insieme di micro-reattori di PCR: ogni singola molecola di libreria entra in contatto con una biglia magnetica ricoperta di primers complementari agli adattatori e, al termine della PCR, le biglie saranno ricoperte di ssDNA monoclonali pronti per il sequenziamento

I dati ottenuti vengono allineati ad un genoma umano di riferimento (attualmente hg19)
Dopo i controlli (QC), i dati sono analizzati con strumenti bioinformatici



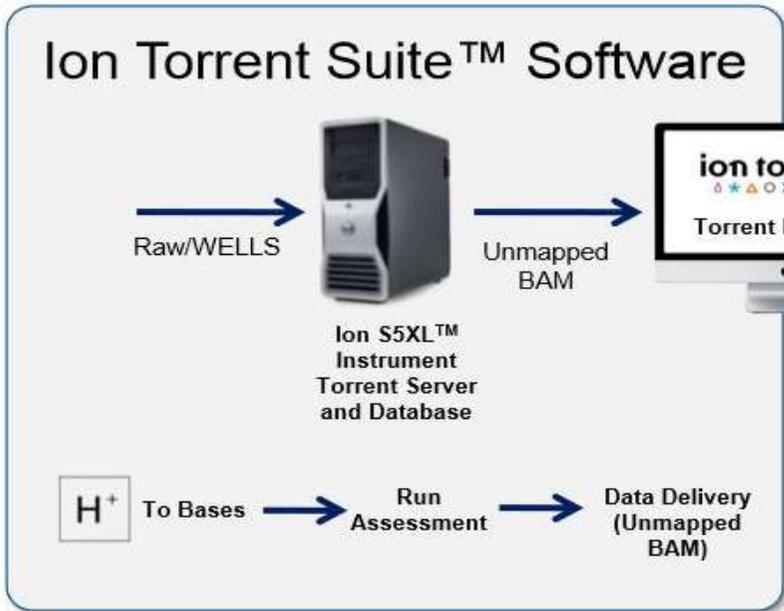
Per entrambe le metodiche, il processo di analisi dei dati generali segue un rigoroso flusso di lavoro bioinformatico.

- *Analisi primaria:* le reads prodotte vengono allineate ad un genoma di riferimento (il genoma attualmente utilizzato è il GCRh37 o hg19); in questa prima analisi, nella quale viene ricostruita la sequenza del genoma analizzato, le reads devono superare una serie di controlli di qualità per poter essere utilizzate
- *Analisi secondaria:* il file generato verrà sottoposto ad un'analisi di sequenza per definire la presenza di eventuali varianti. *La sensibilità e la specificità del sequenziamento dipenderanno da parametri di analisi scelti precedentemente in base alla letteratura ed alla natura del sequenziamento*

Questo processo richiede l'intervento di un bioinformatico esperto o di un software che lo possa sostituire

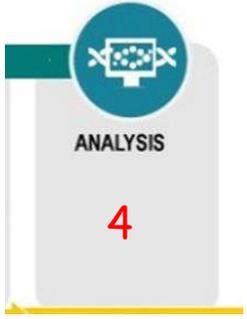


Ion S5™ Sequencer



Plugins

← Single run analysis → Multiple run analysis →



SINGLE PLATFORM STRUMENTI DIAGNOSTICI PANNELLI CE-IVD TUMORI SOLIDI

Oncomine™ Solid Tumour DNA Kit

Oncomine™ Solid Tumour Fusion Transcript Kit

DNA

Genes

EGFR, ALK, ERBB2, ERBB4, FGFR1, FGFR2, FGFR3, MET, DDR2, KRAS, PIK3CA, BRAF, AKT1, PTEN, NRAS, MAP2K1, STK11, NOTCH1, CTNNB1, SMAD4, FBXW7, TP53

RNA

Genes

ALK, RET, ROS1, NTRK1

ThermoFisher
SCIENTIFIC

ION TORRENT ONLY



ILLUMINA ONLY MySeqDX



Illumina

Extended RAS Panel

high throughput parallel sequencing for the detection of 56 specific mutations in RAS genes [*KRAS* (exons 2, 3 and 4) and *NRAS* (exons 2, 3 and 4)] in DNA extracted from

MULTIPLATFOR M

STRUMENTI DIAGNOSTICI PANNELLI CE-IVD TUMORI SOLIDI

diatech
pharmacogenetics

Myriapod® NGS 56G Onco panel

ABL1	CSF1R	FBXW7	GNAS	KIT	NPM1	SKT11
AKT1	CTNNB1	FGFR1	HNF1A	KRAS	NRAS	SMAD4
ALK	DDR2	FGFR2	HRAS	MAP2K1	PDGFRA	SMARCB1
APC	DNMT3A	FGFR3	IDH1	MET	PIK3CA	SMO
ATM	EGFR	FLT3	IDH2	MLH1	PTEN	SRC
BRAF	ERBB2	FOXL2	JAK2	MLP	PTPN11	TP53
CDH1	ERBB4	GNA11	JAK3	MSH6	RB1	TSC1
CDKN2A	EZH2	GNAQ	KDR	NOTCH	RET	VHL



COLON-LUNG NGS IVD PANEL

► Coverage: KRAS exons 2,3,4 - NRAS exons 2,3,4 - BRAF exon 11,15 - EGFR exons 18,19,20,21 - PIK3CA exons 10,21



Sentosa SQ panels

MELANOMA

Target Genes	Number of Amplicons	Number of Target Mutations	Amplicon Locations in Exon(s)
BRAF	1	37	15
NRAS	2	27	2, 3
CDKN2A	1	4	2
MAP2K1	1	4	3
FGFR3	3	9	7, 9, 14
AKT3	2	2	5, 6
KIT	4	27	2, 11, 13, 17
PIK3CA	1	15	11
GNAQ	1	1	5
GNA11	1	1	5
Total	17	127	

CRC

Target Genes	Number of Amplicons	Number of Target Mutations	Amplicon Locations in Exon(s)
NRAS	3	19	2, 3, 4
CTNNB1	1	5	2
PIK3CA	2	14	11, 22
FGFR3	3	9	7, 9, 14
KIT	3	8	11, 13, 17
EGFR	4	9	18, 19, 20, 21
BRAF	2	15	11, 15
RET	1	1	16
PTEN	3	3	5, 7
KRAS	3	22	2, 3, 4
TP53	3	7	4, 6, 7
Total	28	112	

NSCLC

Target Genes	Number of Amplicons	Number of Target Mutations	Amplicon Locations in Exon(s)
NRAS	3	19	2, 3, 4
CTNNB1	1	5	2
PIK3CA	2	14	11, 22
FGFR3	3	9	7, 9, 14
KIT	3	8	11, 13, 17
EGFR	4	10	18, 19, 20, 21
BRAF	2	15	11, 15
RET	1	1	16
PTEN	3	3	5, 7
KRAS	3	22	2, 3, 4
TP53	3	7	4, 6, 7
System Control	1	NA	NA
Total	28	113	

SC Anatomia Patologica - Laboratorio Patologia Molecolare Città della Salute e della Scienza di Torino

Il laboratorio di Patologia Molecolare dell'SC Anatomia Patologica (Direttori Prof. Mauro Papotti, Prof.ssa Paola Cassoni) della Città della Salute e della Scienza (CSS) di Torino svolge da circa 20 anni l'attività di caratterizzazione molecolare a scopo diagnostico, prognostico, predittivo delle neoplasie umane (circa 6000 passaggi nel 2018). Nata nell'area oncoematologica con personale che aveva maturato esperienza nel campo della ricerca molecolare oncologica, nel corso del tempo si è allargata ai tumori solidi cercando di coprire le necessità cliniche emergenti e sviluppando le metodiche più idonee a rispondere ai quesiti posti in essere. Tutte le metodologie condotte nel laboratorio e basate sulla PCR sono state perfezionate per evidenziare riarrangiamenti, traslocazioni cromosomiche, geni di fusione a completamento della diagnosi istopatologica (analisi qualitative) o come monitoraggio della terapia (analisi quantitative). L'avvento della medicina predittiva, ossia la necessità di individuare lesioni molecolari specifiche che rendessero il paziente eligibile o meno al trattamento del paziente con terapie mirate ha indotto il laboratorio a sviluppare metodiche di sequenziamento del DNA mirate a singoli locus genici; la risposta al quesito clinico poteva essere data tramite sequenziamento classico (Sanger) pirosequenziamento, spettrometria di massa o più semplicemente con real time PCR in grado di evidenziare specifiche mutazioni predittive di risposta con alta sensibilità. Tuttavia in un periodo piuttosto breve grazie al rapido sviluppo di farmaci a bersaglio molecolare il ventaglio di tumori per cui ci fosse indicazione clinica all'analisi mutazionale è cresciuto parallelamente al numero di geni implicati nella loro patogenesi. E' evidente che un approccio al singolo locus genico non permetteva una gestione appropriata della incalzante richiesta. L'accessibilità per laboratori di medio calibro anche clinici alle metodiche di Next Generation Sequencing (NGS) ovvero la possibilità di sequenziare simultaneamente centinaia di geni in gruppi di pazienti neoplastici ha reso evidente che lo sviluppo del nostro laboratorio dovesse andare in quella direzione.

Prima Fase

Nel corso del 2016 e del 2017, grazie a fondi esterni (forniti anche dalla Rete Oncologica Piemonte e VdA) il laboratorio di Patologia Molecolare della CSS ha iniziato a muovere i primi passi acquisendo dimestichezza con le metodiche preparative di NGS basate su entrambe le chimiche esistenti, ossia l'amplificazione delle sequenze target (Myriapod NGS – Diatech) o la loro cattura mediante ibridazione (Myeloid Tumor Solution - Sophiagenetics). In questa fase sono anche stati testati pannelli custom comprensivi di 134 geni. Non disponendo di strumentazione il sequenziamento è stato eseguito presso i laboratori dell'HUGE presso il Centro di Biotecnologie Molecolari e dell'SC Ematologia della CSS in quanto entrambi disponevano di sequenziatori e strumenti accessori acquisiti con fondi di ricerca (MySeq, NextSeq Illumina).

Per l'analisi mutazionale NGS dei Tumori solidi è stato testato il sistema Myriapod NGS – Diatech che copre 56 geni (totale 23.7 kbp) clinicamente rilevanti nelle neoplasie umane ed è stato disegnato con 263 ampliconi in grado di coprire 16.000 mutazioni descritte su Cosmic

generando una libreria compatibile con i sequenziatori Illumina. Basato sull' amplificazione del DNA il metodo consente di lavorare anche con frammenti brevi (92-184 bp) come quelli che derivano da campioni inclusi in paraffina o DNA tumorale libero circolante. Il quantitativo di DNA di partenza è 10 ng e il limite di definizione delle mutazioni è dell'1% consentendo una specificità e una copertura dei geni target (coverage) superiore al 95%. La Figura 1 raccoglie gli acronimi dei 56 geni analizzati e evidenzia in giallo i geni che vengono attualmente analizzati e refertati nella routine diagnostica con le metodiche in uso (in rosa i geni che vengono analizzati in routine ma in tumori diversi da quelli scelti per la validazione).

Figura 1 – Acronimi geni inclusi nel pannello NGS per Tumori Solidi

ABL1	CDH1	EGFR	FGFR2	GNAS	JAK3	MLH1	PDGFRA	STK11	TSC1
AKT1	CDKN2A	ERBB2	FGFR3	HMP1A	KOR	MPL	PIK3CA	SMAD4	VHL
ALK	CSF1R	ERBB4	FLT3	NRAS	RET	MSH6	PTEN	SMARCB1	
APC	CTNND1	EZH2	FDXL2	EBH1	KRAS	NOTCH1	PTPN11	SMD	
ATM	DDR2	FOXO1	GNA11	SHC	MAP2K1	NPM1	RS1	SRC	
BRAF	DNMT3	FGFR1	GNAS	JAK2	MET	NRAS	RET	TP53	

	Geni analizzati nella routine convenzionale (K, pancreas e colon retto)
	Geni aggiunti nel pannello NGS
	Geni analizzati nella routine convenzionale altri istiotipi

L'analisi dei dati viene effettuata tramite un software dedicato in una stazione che consente l'allineamento delle sequenze e la chiamata delle varianti (SNV, indel e CNV) in locale. Tutti i dati vengono collezionati ed elaborati secondo le caratteristiche della corsa e le varianti automaticamente suddivise in categorie di qualità e affidabilità delle chiamate. Oltre al coverage medio della seduta è possibile ispezionare quello delle singole regioni di interesse. I parametri della corsa sono esportabili come report globale in formato .csv oppure come rapporto per singolo campione assimilabile ad un referto primordiale (Fig 2) modificabile dall'utente che riporta le variabili della seduta (% e uniformità del coverage, numero letture analizzate e allineate con riferimento ai target specifici) le varianti determinate e campi liberi di commento. L'interpretazione delle varianti, i.e. la definizione della loro patogenicità al momento deriva principalmente dalla banca dati ClinVar-NCBI-NIH e lascia un notevole spazio successivo di interpretazione all'operatore. Come in ClinVar le varianti vengono classificate come Patogeniche,

Probabili Patogeniche, Patogenesi Dubbia, Probabili Benigne, Benigne.

Figura 2 - Report esemplificativo di NGS per Tumori Solidi



Per la validazione sono stati selezionati 50 casi di neoplasie solide già precedentemente analizzati con le metodiche in uso nel nostro laboratorio (spettrometria di massa, sequenziamento diretto, real time PCR) suddivisi in 25 adenocarcinoma del polmone (10 mutati EGFR, 2 mutati KRAS, 13 wildtype) e 25 carcinomi del colon retto metastatici (5 mutati KRAS12, 2 mutati KRAS13, 3 mutati KRAS146, 2 mutati NRAS12, 3 mutati NRAS61, 3 mutati BRAF, 17 wildtype) ; tutti i preparati sono stati sottoposti nuovamente a revisione istologica per una corretta interpretazione delle percentuali alleliche dei geni mutati. La soglia di frequenza allelica è stata stabilita al 5%. Nel gruppo erano compresi 8 casi la cui adeguatezza morfologica era al limite o al di sotto di quella stabilita (>50% e > di 100 cellule tumorali secondo linee guida AIOM-SIAPEC-IAP 2010). Tutte le mutazioni già note sono state rilevate nei 31 casi esaminati in NGS eccetto un caso di adenocarcinoma polmonare portatore di mutazione attivante all'esone 21 del gene EGFR (p.L858R). Inoltre in due casi di adenocarcinoma polmonare sono state rilevate 2 mutazioni (rispettivamente NRAS e KRAS) che il metodo di routine avrebbe dovuto riscontrare. I due campioni che hanno mostrato discrepanza tra i due metodi di analisi erano nel gruppo non adeguato morfologicamente portando alla considerazione che l'NGS permetta il raggiungimento di una sensibilità superiore assai utile in queste situazioni. Uno dei due campioni è lo stesso che è fallito in NGS per la p.L858R e si tratta di un caso il cui DNA aveva una qualità al limite dei criteri per NGS e ci riserviamo di ripetere la sua analisi. Altre mutazioni sono state evidenziate in 16 geni del pannello in 24/31 casi analizzati con particolare frequenza come atteso in TP53 (17 casi); molte mutazioni dopo accurata interpretazione in

base alla letteratura scientifica andranno confermate e saranno la base dei futuri studi che potremo intraprendere a latere della routine diagnostica. Nei restanti 34 geni inclusi nel pannello 56G non abbiamo riscontrato varianti alleliche superiori al 5% di frequenza nei casi selezionati.

Per quanto riguarda i Tumori Ematologici il sistema NGS selezionato è il Myeloid Tumor Solution . Sophia Genetics con particolare riferimento alle leucemie acute mieloidi (LAM), ai disordini mieloproliferativi cronici (MPD) e alle mielodisplasie (MDS) consiste di 30 geni le cui regioni codificanti e i siti di splicing vengono sequenziati. Il metodo è basato su cattura delle regioni target tramite sonde che consentono uniformità di coverage (uniforme al 99.3%) con una percentuale di copertura media superiore a 1000x del 98.87%. Anche in questo caso il limite di definizione delle mutazioni è dell'1%. Una peculiarità dei sistemi a cattura, non essendo legati all'ottimizzazione della PCR simultanea, è la loro flessibilità nel disegno, nell'ottimizzazione e nell'espansione dei pannelli genici. La quantità di DNA di partenza in questo caso è di 200 ng; questo aspetto non rappresenta un problema in quanto la patologia ematologica solitamente si analizza su sangue midollare con quantità e qualità di DNA sempre buone. La Figura 3 raccoglie gli acronimi dei 30 geni analizzati e evidenzia in giallo i geni che vengono attualmente analizzati e refertati nella routine diagnostica con le metodiche attualmente in uso, in questo caso esclusivamente sequenziamento diretto.

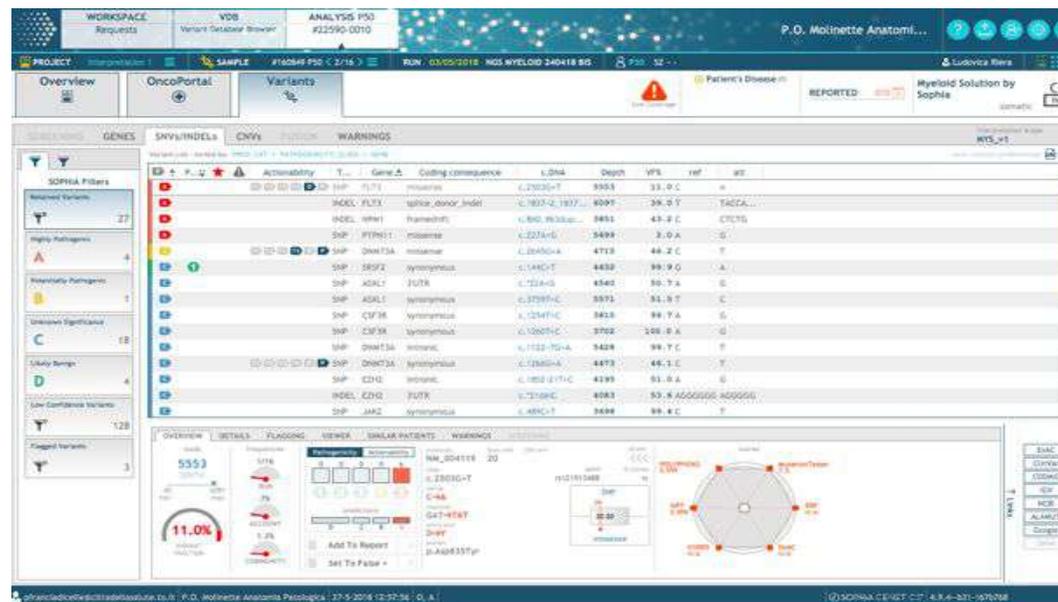
Figura 3 – Acronimi geni inclusi nel pannello NGS per Tumori Ematologici

ABL1	CEBPA	FLT3	KIT	PTPN11	TET2
ASXL1	CSF3R	HRAS	KRAS	RUNX1	TP53
BRAF	DNMT3A	IDH1	MPL	SETBP1	U2AF1
CALR	ETV6	IDH2	NPM1	SF3B1	WT1
CBL	EZH2	JAK2	NRAS	SRGF2	ZRSR2



L'analisi dei dati avviene tramite una piattaforma protetta con criptazione locale dei dati e installabile su dispositivi multipli e creazione di numero limitato di utenti [Sophia DDM]. Tutti i risultati vengono elaborati per un'interpretazione di routine diagnostica, il portale integra le informazioni disponibili in diversi database relativamente alla patogenicità delle varianti genomiche in quel preciso gruppo di patologie; l'informazione si estende alla possibilità di risposta a farmaci mirati e all'esistenza di trial clinici aperti. L'analisi converge con quella di centinaia di altre istituzioni creando un sistema fluido di interpretazione e discussione dei dati. Il software classifica le varianti in altamente patogeniche (A) potenzialmente patogeniche (B) di incerto significato © probabili benigne (D) e si interfaccia direttamente a ClinVar, ExAC, ESP, COSMIC, dbSNP, G1000. La Figura 4 mostra una pagina esemplificativa di analisi Sophia DDM in un caso di MPD.

Figura 4 portale di analisi Sophia DDM in un caso di MPD.



E' possibile scaricare i dati in formato .csv oppure generare una scheda referto per ogni singola analisi (paziente) su cui inserire note aggiuntive libere . La Figura 5 è un esempio di esportazione analisi in un caso di MDS: vengono riportati 1) il n° totale di varianti riscontrate (divise in A, B, C e D) 2) le caratteristiche del coverage 3) le varianti patogenetiche selezionate dall'utente dopo accurato studio (in questo caso segnalate se benigne o incerte) 4) le regioni a basso coverage nelle quali l'analisi può avere perso di significatività 5) il pannello completo di geni analizzati.

Figura 5 - Report esemplificativo di NGS per Neoplasie Ematologiche

Reference

Patient ID : 22 (1160554) Instrument : Illumina MiSeq Request date : 2017/01/17 10:54:00
 Analysis Type : MFLS_v1 Reagent Kit : NGS-MiSeq-DI-3007 Request created by :
 Sample ID : 22 SEQ : S19
 Pipeline ID / Revision Number / Splitting ID : ILL1XG15E_CNV_v5.0.9_GEN10N4F502 Project name : 1160555-1
 Reference genome: GRCh37/hg19 Analyzed by :
 SOPHA DGM version: 4.7.5.1-01-07-09-002 Start date : 17/1/2017 12:07:32

VARIANT REPORT

Overview :

Selected variants	4	Variant Phase	MFLS_v1 (30 genes)
Retained variants	25	Low confidence variants	ID
A - Most likely pathogenic	2	Low coverage regions	5
B - Probably pathogenic	2	Min/Avg/Max variant coverage	11/42/8008
C - Variants of unknown significance	18		
D - Most likely benign	8		

P.O. Molinette Anatomia Patologica - 17/01/2018 11:02:30

Analysis Comment

Selected variants

Index	Gene/Exon	Position	Transcript	Type	Nucleotide change	VF coverage (95%)	Calling consequence	cDNA (protein)	Filter	Pathogenicity	Ref ID
01	A20L1 / 2	chr3 : 2122259	NM_019338	SNP	T > C	100.0 % (1/104)	missense	c.244T > C / p.Lys81Pro	D	1 - Benign or of no clinical significance	RS1262894
Comment No comment											
5	MPL (4)	chr7 : 4281920	NM_001373	SNP	G > T	26.21 % (31/118)	missense	c.104G > T / p.Val35Leu	A		RS11912616
Comment No comment											
15	SETD1 / 4	chr1 : 11654730	NM_012493	SNP	T > C	56.59 % (273/482)	missense	c.118T > C / p.Val396Gln	B		RS1420706
Comment											

P.O. Molinette Anatomia Patologica - 17/01/2018 11:02:30

Variant Detail:

No comment											
20	TET2 / 3	chr4 : 106155165	NM_017629	SNP	C > G	51.1 % (630/1234)	missense	c.40C > G / p.Pro136Arg	C	3 - Uncertain	RS12489609
Comment No comment											

Low coverage table (threshold:50)

Chromosome	Gene	cDNA	Transcript	Exon	Start	End	Mean Coverage
2	DNMT3A	c540-49/06-40-936	NM_022525	7	25475057	25475091	916
9	JAK2	c.1365-25-1914	NM_004972	15	9677428	5077502	811
17	TP53	c.9938-308-933-441	NM_000546	9	7576512	7576545	816
19	CEBPA	c.736	NM_004164	1	33792525	33792525	958
19	CEBPA	c.279788	NM_004164	1	33792533	33793042	838

Interpretation project scope: MFLS_v1 (10)

CEBPA, CSF3R, FLT3, MPL, USF1, CBL, NRAS, ABL1, JAK2, HRAS, SF3B1, ZRSR2, NPM1, IDH1, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3C, DNMT3L, DNMT3O, DNMT3A2, DNMT3A3, DNMT3A3L, DNMT3A3B, DNMT3A3C, DNMT3A3D, DNMT3A3E, DNMT3A3F, DNMT3A3G, DNMT3A3H, DNMT3A3I, DNMT3A3J, DNMT3A3K, DNMT3A3L, DNMT3A3M, DNMT3A3N, DNMT3A3O, DNMT3A3P, DNMT3A3Q, DNMT3A3R, DNMT3A3S, DNMT3A3T, DNMT3A3U, DNMT3A3V, DNMT3A3W, DNMT3A3X, DNMT3A3Y, DNMT3A3Z, DNMT3A3AA, DNMT3A3AB, DNMT3A3AC, DNMT3A3AD, DNMT3A3AE, DNMT3A3AF, DNMT3A3AG, DNMT3A3AH, DNMT3A3AI, DNMT3A3AJ, DNMT3A3AK, DNMT3A3AL, DNMT3A3AM, DNMT3A3AN, DNMT3A3AO, DNMT3A3AP, DNMT3A3AQ, DNMT3A3AR, DNMT3A3AS, DNMT3A3AT, DNMT3A3AU, DNMT3A3AV, DNMT3A3AW, DNMT3A3AX, DNMT3A3AY, DNMT3A3AZ, DNMT3A3BA, DNMT3A3BB, DNMT3A3BC, DNMT3A3BD, DNMT3A3BE, DNMT3A3BF, DNMT3A3BG, DNMT3A3BH, DNMT3A3BI, DNMT3A3BJ, DNMT3A3BK, DNMT3A3BL, DNMT3A3BM, DNMT3A3BN, DNMT3A3BO, DNMT3A3BP, DNMT3A3BQ, DNMT3A3BR, DNMT3A3BS, DNMT3A3BT, DNMT3A3BU, DNMT3A3BV, DNMT3A3BW, DNMT3A3BX, DNMT3A3BY, DNMT3A3BZ, DNMT3A3CA, DNMT3A3CB, DNMT3A3CC, DNMT3A3CD, DNMT3A3CE, DNMT3A3CF, DNMT3A3CG, DNMT3A3CH, DNMT3A3CI, DNMT3A3CJ, DNMT3A3CK, DNMT3A3CL, DNMT3A3CM, DNMT3A3CN, DNMT3A3CO, DNMT3A3CP, DNMT3A3CQ, DNMT3A3CR, DNMT3A3CS, DNMT3A3CT, DNMT3A3CU, DNMT3A3CV, DNMT3A3CW, DNMT3A3CX, DNMT3A3CY, DNMT3A3CZ, DNMT3A3DA, DNMT3A3DB, DNMT3A3DC, DNMT3A3DD, DNMT3A3DE, DNMT3A3DF, DNMT3A3DG, DNMT3A3DH, DNMT3A3DI, DNMT3A3DJ, DNMT3A3DK, DNMT3A3DL, DNMT3A3DM, DNMT3A3DN, DNMT3A3DO, DNMT3A3DP, DNMT3A3DQ, DNMT3A3DR, DNMT3A3DS, DNMT3A3DT, DNMT3A3DU, DNMT3A3DV, DNMT3A3DW, DNMT3A3DX, DNMT3A3DY, DNMT3A3DZ, DNMT3A3EA, DNMT3A3EB, DNMT3A3EC, DNMT3A3ED, DNMT3A3EE, DNMT3A3EF, DNMT3A3EG, DNMT3A3EH, DNMT3A3EI, DNMT3A3EJ, DNMT3A3EK, DNMT3A3EL, DNMT3A3EM, DNMT3A3EN, DNMT3A3EO, DNMT3A3EP, DNMT3A3EQ, DNMT3A3ER, DNMT3A3ES, DNMT3A3ET, DNMT3A3EU, DNMT3A3EV, DNMT3A3EW, DNMT3A3EX, DNMT3A3EY, DNMT3A3EZ, DNMT3A3FA, DNMT3A3FB, DNMT3A3FC, DNMT3A3FD, DNMT3A3FE, DNMT3A3FF, DNMT3A3FG, DNMT3A3FH, DNMT3A3FI, DNMT3A3FJ, DNMT3A3FK, DNMT3A3FL, DNMT3A3FM, DNMT3A3FN, DNMT3A3FO, DNMT3A3FP, DNMT3A3FQ, DNMT3A3FR, DNMT3A3FS, DNMT3A3FT, DNMT3A3FU, DNMT3A3FV, DNMT3A3FW, DNMT3A3FX, DNMT3A3FY, DNMT3A3FZ, DNMT3A3GA, DNMT3A3GB, DNMT3A3GC, DNMT3A3GD, DNMT3A3GE, DNMT3A3GF, DNMT3A3GG, DNMT3A3GH, DNMT3A3GI, DNMT3A3GJ, DNMT3A3GK, DNMT3A3GL, DNMT3A3GM, DNMT3A3GN, DNMT3A3GO, DNMT3A3GP, DNMT3A3GQ, DNMT3A3GR, DNMT3A3GS, DNMT3A3GT, DNMT3A3GU, DNMT3A3GV, DNMT3A3GW, DNMT3A3GX, DNMT3A3GY, DNMT3A3GZ, DNMT3A3HA, DNMT3A3HB, DNMT3A3HC, DNMT3A3HD, DNMT3A3HE, DNMT3A3HF, DNMT3A3HG, DNMT3A3HH, DNMT3A3HI, DNMT3A3HJ, DNMT3A3HK, DNMT3A3HL, DNMT3A3HM, DNMT3A3HN, DNMT3A3HO, DNMT3A3HP, DNMT3A3HQ, DNMT3A3HR, DNMT3A3HS, DNMT3A3HT, DNMT3A3HU, DNMT3A3HV, DNMT3A3HW, DNMT3A3HX, DNMT3A3HY, DNMT3A3HZ, DNMT3A3IA, DNMT3A3IB, DNMT3A3IC, DNMT3A3ID, DNMT3A3IE, DNMT3A3IF, DNMT3A3IG, DNMT3A3IH, DNMT3A3II, DNMT3A3IJ, DNMT3A3IK, DNMT3A3IL, DNMT3A3IM, DNMT3A3IN, DNMT3A3IO, DNMT3A3IP, DNMT3A3IQ, DNMT3A3IR, DNMT3A3IS, DNMT3A3IT, DNMT3A3IU, DNMT3A3IV, DNMT3A3IW, DNMT3A3IX, DNMT3A3IY, DNMT3A3IZ, DNMT3A3JA, DNMT3A3JB, DNMT3A3JC, DNMT3A3JD, DNMT3A3JE, DNMT3A3JF, DNMT3A3JG, DNMT3A3JH, DNMT3A3JI, DNMT3A3JJ, DNMT3A3JK, DNMT3A3JL, DNMT3A3JM, DNMT3A3JN, DNMT3A3JO, DNMT3A3JP, DNMT3A3JQ, DNMT3A3JR, DNMT3A3JS, DNMT3A3JT, DNMT3A3JU, DNMT3A3JV, DNMT3A3JW, DNMT3A3JX, DNMT3A3JY, DNMT3A3JZ, DNMT3A3KA, DNMT3A3KB, DNMT3A3KC, DNMT3A3KD, DNMT3A3KE, DNMT3A3KF, DNMT3A3KG, DNMT3A3KH, DNMT3A3KI, DNMT3A3KJ, DNMT3A3KK, DNMT3A3KL, DNMT3A3KM, DNMT3A3KN, DNMT3A3KO, DNMT3A3KP, DNMT3A3KQ, DNMT3A3KR, DNMT3A3KS, DNMT3A3KT, DNMT3A3KU, DNMT3A3KV, DNMT3A3KW, DNMT3A3KX, DNMT3A3KY, DNMT3A3KZ, DNMT3A3LA, DNMT3A3LB, DNMT3A3LC, DNMT3A3LD, DNMT3A3LE, DNMT3A3LF, DNMT3A3LG, DNMT3A3LH, DNMT3A3LI, DNMT3A3LJ, DNMT3A3LK, DNMT3A3LL, DNMT3A3LM, DNMT3A3LN, DNMT3A3LO, DNMT3A3LP, DNMT3A3LQ, DNMT3A3LR, DNMT3A3LS, DNMT3A3LT, DNMT3A3LU, DNMT3A3LV, DNMT3A3LW, DNMT3A3LX, DNMT3A3LY, DNMT3A3LZ, DNMT3A3MA, DNMT3A3MB, DNMT3A3MC, DNMT3A3MD, DNMT3A3ME, DNMT3A3MF, DNMT3A3MG, DNMT3A3MH, DNMT3A3MI, DNMT3A3MJ, DNMT3A3MK, DNMT3A3ML, DNMT3A3MN, DNMT3A3MO, DNMT3A3MP, DNMT3A3MQ, DNMT3A3MR, DNMT3A3MS, DNMT3A3MT, DNMT3A3MU, DNMT3A3MV, DNMT3A3MW, DNMT3A3MX, DNMT3A3MY, DNMT3A3MZ, DNMT3A3NA, DNMT3A3NB, DNMT3A3NC, DNMT3A3ND, DNMT3A3NE, DNMT3A3NF, DNMT3A3NG, DNMT3A3NH, DNMT3A3NI, DNMT3A3NJ, DNMT3A3NK, DNMT3A3NL, DNMT3A3NM, DNMT3A3NN, DNMT3A3NO, DNMT3A3NP, DNMT3A3NQ, DNMT3A3NR, DNMT3A3NS, DNMT3A3NT, DNMT3A3NU, DNMT3A3NV, DNMT3A3NW, DNMT3A3NX, DNMT3A3NY, DNMT3A3NZ, DNMT3A3OA, DNMT3A3OB, DNMT3A3OC, DNMT3A3OD, DNMT3A3OE, DNMT3A3OF, DNMT3A3OG, DNMT3A3OH, DNMT3A3OI, DNMT3A3OJ, DNMT3A3OK, DNMT3A3OL, DNMT3A3OM, DNMT3A3ON, DNMT3A3OO, DNMT3A3OP, DNMT3A3OQ, DNMT3A3OR, DNMT3A3OS, DNMT3A3OT, DNMT3A3OU, DNMT3A3OV, DNMT3A3OW, DNMT3A3OX, DNMT3A3OY, DNMT3A3OZ, DNMT3A3PA, DNMT3A3PB, DNMT3A3PC, DNMT3A3PD, DNMT3A3PE, DNMT3A3PF, DNMT3A3PG, DNMT3A3PH, DNMT3A3PI, DNMT3A3PJ, DNMT3A3PK, DNMT3A3PL, DNMT3A3PM, DNMT3A3PN, DNMT3A3PO, DNMT3A3PP, DNMT3A3PQ, DNMT3A3PR, DNMT3A3PS, DNMT3A3PT, DNMT3A3PU, DNMT3A3PV, DNMT3A3PW, DNMT3A3PX, DNMT3A3PY, DNMT3A3PZ, DNMT3A3QA, DNMT3A3QB, DNMT3A3QC, DNMT3A3QD, DNMT3A3QE, DNMT3A3QF, DNMT3A3QG, DNMT3A3QH, DNMT3A3QI, DNMT3A3QJ, DNMT3A3QK, DNMT3A3QL, DNMT3A3QM, DNMT3A3QN, DNMT3A3QO, DNMT3A3QP, DNMT3A3QQ, DNMT3A3QR, DNMT3A3QS, DNMT3A3QT, DNMT3A3QU, DNMT3A3QV, DNMT3A3QW, DNMT3A3QX, DNMT3A3QY, DNMT3A3QZ, DNMT3A3RA, DNMT3A3RB, DNMT3A3RC, DNMT3A3RD, DNMT3A3RE, DNMT3A3RF, DNMT3A3RG, DNMT3A3RH, DNMT3A3RI, DNMT3A3RJ, DNMT3A3RK, DNMT3A3RL, DNMT3A3RM, DNMT3A3RN, DNMT3A3RO, DNMT3A3RP, DNMT3A3RQ, DNMT3A3RR, DNMT3A3RS, DNMT3A3RT, DNMT3A3RU, DNMT3A3RV, DNMT3A3RW, DNMT3A3RX, DNMT3A3RY, DNMT3A3RZ, DNMT3A3SA, DNMT3A3SB, DNMT3A3SC, DNMT3A3SD, DNMT3A3SE, DNMT3A3SF, DNMT3A3SG, DNMT3A3SH, DNMT3A3SI, DNMT3A3SJ, DNMT3A3SK, DNMT3A3SL, DNMT3A3SM, DNMT3A3SN, DNMT3A3SO, DNMT3A3SP, DNMT3A3SQ, DNMT3A3SR, DNMT3A3SS, DNMT3A3ST, DNMT3A3SU, DNMT3A3SV, DNMT3A3SW, DNMT3A3SX, DNMT3A3SY, DNMT3A3SZ, DNMT3A3TA, DNMT3A3TB, DNMT3A3TC, DNMT3A3TD, DNMT3A3TE, DNMT3A3TF, DNMT3A3TG, DNMT3A3TH, DNMT3A3TI, DNMT3A3TJ, DNMT3A3TK, DNMT3A3TL, DNMT3A3TM, DNMT3A3TN, DNMT3A3TO, DNMT3A3TP, DNMT3A3TQ, DNMT3A3TR, DNMT3A3TS, DNMT3A3TT, DNMT3A3TU, DNMT3A3TV, DNMT3A3TW, DNMT3A3TX, DNMT3A3TY, DNMT3A3TZ, DNMT3A3UA, DNMT3A3UB, DNMT3A3UC, DNMT3A3UD, DNMT3A3UE, DNMT3A3UF, DNMT3A3UG, DNMT3A3UH, DNMT3A3UI, DNMT3A3UJ, DNMT3A3UK, DNMT3A3UL, DNMT3A3UM, DNMT3A3UN, DNMT3A3UO, DNMT3A3UP, DNMT3A3UQ, DNMT3A3UR, DNMT3A3US, DNMT3A3UT, DNMT3A3UU, DNMT3A3UV, DNMT3A3UW, DNMT3A3UX, DNMT3A3UY, DNMT3A3UZ, DNMT3A3VA, DNMT3A3VB, DNMT3A3VC, DNMT3A3VD, DNMT3A3VE, DNMT3A3VF, DNMT3A3VG, DNMT3A3VH, DNMT3A3VI, DNMT3A3VJ, DNMT3A3VK, DNMT3A3VL, DNMT3A3VM, DNMT3A3VN, DNMT3A3VO, DNMT3A3VP, DNMT3A3VQ, DNMT3A3VR, DNMT3A3VS, DNMT3A3VT, DNMT3A3VU, DNMT3A3VV, DNMT3A3VW, DNMT3A3VX, DNMT3A3VY, DNMT3A3VZ, DNMT3A3WA, DNMT3A3WB, DNMT3A3WC, DNMT3A3WD, DNMT3A3WE, DNMT3A3WF, DNMT3A3WG, DNMT3A3WH, DNMT3A3WI, DNMT3A3WJ, DNMT3A3WK, DNMT3A3WL, DNMT3A3WM, DNMT3A3WN, DNMT3A3WO, DNMT3A3WP, DNMT3A3WQ, DNMT3A3WR, DNMT3A3WS, DNMT3A3WT, DNMT3A3WU, DNMT3A3WV, DNMT3A3WW, DNMT3A3WX, DNMT3A3WY, DNMT3A3WZ, DNMT3A3XA, DNMT3A3XB, DNMT3A3XC, DNMT3A3XD, DNMT3A3XE, DNMT3A3XF, DNMT3A3XG, DNMT3A3XH, DNMT3A3XI, DNMT3A3XJ, DNMT3A3XK, DNMT3A3XL, DNMT3A3XM, DNMT3A3XN, DNMT3A3XO, DNMT3A3XP, DNMT3A3XQ, DNMT3A3XR, DNMT3A3XS, DNMT3A3XT, DNMT3A3XU, DNMT3A3XV, DNMT3A3XW, DNMT3A3XX, DNMT3A3XY, DNMT3A3XZ, DNMT3A3YA, DNMT3A3YB, DNMT3A3YC, DNMT3A3YD, DNMT3A3YE, DNMT3A3YF, DNMT3A3YG, DNMT3A3YH, DNMT3A3YI, DNMT3A3YJ, DNMT3A3YK, DNMT3A3YL, DNMT3A3YM, DNMT3A3YN, DNMT3A3YO, DNMT3A3YP, DNMT3A3YQ, DNMT3A3YR, DNMT3A3YS, DNMT3A3YT, DNMT3A3YU, DNMT3A3YV, DNMT3A3YW, DNMT3A3YX, DNMT3A3YY, DNMT3A3YZ, DNMT3A3ZA, DNMT3A3ZB, DNMT3A3ZC, DNMT3A3ZD, DNMT3A3ZE, DNMT3A3ZF, DNMT3A3ZG, DNMT3A3ZH, DNMT3A3ZI, DNMT3A3ZJ, DNMT3A3ZK, DNMT3A3ZL, DNMT3A3ZM, DNMT3A3ZN, DNMT3A3ZO, DNMT3A3ZP, DNMT3A3ZQ, DNMT3A3ZR, DNMT3A3ZS, DNMT3A3ZT, DNMT3A3ZU, DNMT3A3ZV, DNMT3A3ZW, DNMT3A3ZX, DNMT3A3ZY, DNMT3A3ZZ

P.O. Molinette Anatomia Patologica - 17/01/2018 11:02:30

Per la validazione sono stati selezionati 34 casi suddivisi in 25 LAM, 34 MPD e 7 MDS. Abbiamo anche incluso un gruppo di 28 Leucemie Linfatiche Croniche (LLC) la cui analisi mutazionale ha valore predittivo per il trattamento con i nuovi farmaci inibitori della Bruton Chinasi Tiroxina (BTK). Anche in questo caso la soglia di frequenza allelica è stata stabilita al 5%. La Tabella 4 riporta i risultati di confronto tra il dato della precedente caratterizzazione molecolare e il pattern molecolare emerso in NGS nei casi esaminati. Tutte le mutazioni che già erano state

caratterizzate si confermano, in due casi è emersa una doppia mutazione dello stesso gene non visibile al sequenziamento mentre la presenza di mutazioni nuove anche nella zona dei geni già effettivi nella routine diagnostica è giustificata dal fatto che alcuni geni vengono routinariamente studiati soltanto in alcune patologie (i.e. MPL nelle MPD o KIT nelle AML). Questi nuovi riscontri andranno controvalidati con sequenziamento diretto e successivamente indagati per una rivisitazione della diagnosi. Alcune di queste mutazioni potranno molto presto essere richieste in quanto supportate da sufficiente letteratura che ne conferma l'implicazione clinica (i.e. IDH2, DNMT3A, CEBPA). Altre andranno approfondite in casistiche più ampie nel momento in cui la metodica sia a regime e saranno la base dei nostri futuri studi di ricerca traslazionale.

In conclusione questa prima fase è servita a 1) individuare l'equipaggiamento del laboratorio necessario all'esecuzione dell'NGS 2) formare specificamente il personale allo svolgimento dell'NGS individuando le criticità di procedure ancora del tutto manuali in vista del loro utilizzo a scopo assistenziale 2) validare con l'NGS i campioni già analizzati nella routine diagnostica convenzionale di neoplasie oncoematologiche (25 casi di Leucemia Acuta Mieloide, 34 casi di Mieloproliferativa Cronica, 7 casi di Mielodisplasia e 28 casi di Leucemia Linfatica Cronica) e solide (25 casi di Adenocarcinoma Polmonare e 25 Carcinomi del Colon Retto metastatici).

Seconda Fase

Il 2018 è servito a consolidare la competenza in NGS e maturare i criteri di scelta per avviare l'attività assistenziale sostenuta economicamente dall'Azienda.

1. L'NGS può sostituire e ampliare le metodiche di analisi mutazionale che svolgiamo (sequenziamento diretto, pirosequenziamento e realtime PCR)
2. Siamo orientati verso metodi basati su cattura (frammentazione del DNA genomico, preparazione della libreria, arricchimento del target mediante ibridazione, amplificazione della libreria, sequenziamento mediante sintesi) poichè con questo metodo aumenta la specificità dei geni target, è possibile analizzare più geni in contemporanea e ottenere una copertura della sequenza di interi geni (non solo mutazioni hotspot), rispetto ai sistemi NGS basati sulla amplificazione genica.
3. L'esecuzione della metodica richiede alta specializzazione nell'esecuzione di metodiche di biologia molecolare ed è auspicabile in routine acquisire strumentazione per l'automazione di almeno una parte della procedura.
4. Siamo orientati verso applicativi commerciali CE-IVD con un pannello di geni esaminati di dimensione media (30-50 geni) che consenta sedute a cadenza settimanale che smaltiscano la routine e garantiscano i TAT consueti. Esistono applicativi validati per la diagnostica clinica distribuiti da aziende leader di mercato (Illumina, Agilent, ThermoFisher, Qiagen, Sophiagenetics, Diatech Pharmacogenetics, et al). I criteri di scelta spaziano dal pannello di geni, la loro copertura, la marcatura, il software di analisi, il tipo di connessione necessario per eseguirla (Tabella 1). Per la nostra realtà è importante poter acquisire un sistema valido per entrambi i settori del laboratorio

(tumori ematologici e tumori solidi)

Tabella1

PRODUTTORE	TUMORI EMATOLOGICI		TUMORI SOLIDI		PIATTAFORMA	SOFTWARE ANALISI	CONNESSIONE
	PANNELLO	N° GENI	PANNELLO	N° GENI			
Agilent	Clear Seq AML HS	20	Clear Seq Cancer HS	47	Illumina - Ion Torrent	Sure Call	locale+web
Multiplicom (Agilent)			Tumor Hotspot MASTR Plus	26	Illumina	non specificato	non specificato
Illumina	TruSight Myeloid Sequencing Panel	54	TruSight Tumor 15 Ampliseq Focus Panel	15 52	Illumina	Base Space Sequence Hub	web
Qiagen	Human Myeloid Neoplasm Panel	141	Actionable Insight Tumor Panel	12	Qiagen	Qiagen Clinical Insight	non specificato
Sophia Genetics	Myeloid Solution	23	Solid Tumor Solution	42	Illumina	Sophia DDM + storage	web
ThermoFisher	Oncomime Myeloid Panel	50+29 fusion	Oncomine Solid Tumor DNA kit Oncomine solid Tumor Fusion Transcript kit	22 4f	Ion Torrent	Torrent Suite Software + storage	locale+web
Diatech			Myriapod 56G Oncopanel	56	Illumina - Ion Torrent	Myriapod NGS Analysis Software	locale

5. Non è ancora chiara la possibilità di poter eseguire analisi informatica a scopo assistenziale connettendosi al web o se sia necessario per motivi di privacy e gestione dati utilizzare sistemi in locale. Per questa problematica sono state interessate le Ingegnerie Cliniche della Aziende da cui arriveranno disposizioni precise in merito.
6. I complessi aspetti interpretativi sono ancora aperti. I metodi forniscono dei report con la descrizione delle varianti e la loro rilevanza clinica ma visto l'elevato numero di database di riferimento e le possibili loro discrepanze è necessario stabilire delle regole di refertazione.
7. Per questo aspetto vorremmo poter creare un gruppo multidisciplinare che stabilisca le regole di refertazione dell'NGS condividendone le responsabilità.
8. I tempi di esecuzione del test per mantenere il TAT attuale (10 giorni lavorativi) richiede l'utilizzo del sequenziatore per 4 giorni (2 per pannello neoplasie solide 2 per pannello oncoematologia) e pertanto la disponibilità attuale di sequenziatori presso la CSS non ci consente di partire formalmente.
9. Il Dipartimento di Medicina di Laboratorio della CSS ha lavorato alla stesura di una richiesta di approvvigionamento strumentazione e reagenti NGS per tutti i settori di diagnostica molecolare (Genetica Medica, Trapianto, Microbiologia e Oncologia). E' stato prodotto un documento completo che definisce le necessità dei vari settori e dopo una ricognizione del mercato esisterà in una procedura di gara che speriamo si concluda nell'arco del primo semestre 2019.
10. Restano aperte le problematiche di regolamentazione, accesso all'esame, tariffazione che sono peraltro critiche anche nella diagnostica tradizionale e che stiamo affrontando nei tavoli preposti.

Laboratorio Patologia Molecolare SCU Anatomia Patologica San Luigi Gonzaga

Dal 2009, il Laboratorio di Patologia Molecolare della SCU di Anatomia Patologica della AOU San Luigi Gonzaga, accanto alle tradizionali analisi molecolari precedentemente svolte offre un servizio diagnostico di analisi di mutazioni somatiche a fini prognostici/predittivi per neoplasie del colon-retto, polmone e melanomi. Tale attività è stata svolta fino al 2017 utilizzando tecnologie di Realtime PCR e sequenziamento diretto con pirosequenziatore e secondo Sanger.

Dal 2010 è presente nel nostro servizio la tecnologia NGS, acquisendo lo strumentazione Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) della ditta Thermo Fisher Scientific.

Dopo aver partecipato a numerosi network europei della Thermo-Fisher Scientific per la messa a punto e validazione dei pannelli diagnostici, dal 2015 è iniziata una fase di validazione interna utilizzando il kit Oncomine Solid Tumor (CE-IVD) tale kit permette il sequenziamento diretto e multigenico di regioni Hot-Spot e/o di interesse a carico di 92 ampliconi di 22 geni (*EGFR, ALK, ERBB2, ERBB4, FGFR1, FGFR2, FGFR3, MET, DDR2, KRAS, PIK3CA, BRAF, AKT1, PTEN, NRAS, MAP2K1, STK11, NOTCH1, CTNNB1, SMAD4, FBXW7, TP53*) fra i principali geni interessati dalla presenza di varianti somatiche associate a neoplasie.

Analisi Bioinformatica viene effettuata mediante l'utilizzo di software dedicato, Ion Reporter 5.6 (LifeTechnology/Thermo Fisher Scientific Waltham, USA).

Tale fase prevedeva l'utilizzo in parallelo su casi di routine consecutivi sia delle metodiche monogeniche (realtime e sequenziamento diretto) che della tecnologia NGS a fine di valutarne le performance di specificità, sensibilità, TAT e costi.

Dal novembre 2017 il pannello è utilizzato come pannello genico per tutti i pazienti che richiedono analisi mutazionali su DNA estratto da campioni istologici e citologici freschi o inclusi in paraffina che pervengono al nostro laboratorio.

La tecnologia e i dati ottenuti sono descritti in dettaglio nella relazione allegata.

Nel 2018 è iniziata ed è ancora in corso, una fase di validazione del pannello Oncomine Solid Tumor per i trascritti di fusione (CE IVD) dei geni *ALK, ROS1, RET* e *NTRK1* su una casistica clinica retrospettiva di tessuti fissati precedentemente valutata con metodiche FISH e IHC.

Laboratorio Patologia Molecolare Anatomia Patologica, FPO-IRCCs, Candiolo

Il Laboratorio di Patologia Molecolare della FPO-IRCCS di Candiolo, svolge un servizio di diagnostica molecolare a scopo prognostico e predittivo dal 2006.

Negli ultimi due anni, la FPO-IRCCs ha implementato la strumentazione NGS (MiSeq, HiSeq e un NextSeq Illumina), utilizzata prevalentemente per scopi di Ricerca, dotandosi di uno strumento IonTorrent S5, completo di IonChef system, particolarmente adatto all'analisi NGS dei campioni di tessuto fissato. Questa acquisizione permetterà di ampliare i progetti di ricerca clinica e l'introduzione dell'analisi NGS nella diagnostica molecolare.

- ! Per quanto riguarda la ricerca clinica, FPO-IRCCS partecipa al programma ministeriale del consorzio Alleanza Contro il Cancro (ACC) per la messa a punto e validazione di un pannello NGS custom, studiato e sviluppato dal gruppo in cooperazione con la ditta ThermoFisher, per l'analisi genomica di diversi tipi di tumore (polmone, mammella, melanoma e sarcomi). In questo ambito, il laboratorio di Patologia Molecolare della FPO-IRCCS ha il compito di analizzare e validare questo pannello su un set di melanomi metastatici.
- ! Il pannello, basato sugli ampliconi, è composto da due pools di 4000 coppie di primers, comprendenti regioni codificanti complete, regioni parziali fiancheggianti gli esoni e un arricchimento delle zone "hot spot" di 254 geni associati al cancro. Il suo utilizzo prevede il contemporaneo sequenziamento di una componente tumorale e normale dello stesso paziente, per permettere la corretta identificazione di varianti somatiche e/o germinali, partendo da 20 ng di DNA estratto da tessuto fissato e 10 ng di sangue periferico.
- ! Al fine di validare la bontà del pannello, il progetto sperimentale comprende l'analisi di una casistica multicentrica, retrospettiva, di 150 melanomi con DNA estratto da tessuto fissato, selezionato da un anatomo patologo e precedentemente valutato per lo status molecolare dei geni *BRAF* e *NRAS* con metodiche CE-IVD.
- ! Le analisi bioinformatiche vengono effettuate seguendo una pipeline decisa a priori dal gruppo ACC e processata sia sul cloud software Torrent Browser, sviluppato da ThermoFisher, che in locale da un bioinformatico dedicato.
- ! Attualmente sono stati analizzati 70 casi e il sequenziamento ha avuto successo per entrambi i pool di primers sia sui campioni tumorali che sui corrispondenti controlli normali, ad eccezione di un campione normale la cui concentrazione iniziale era molto bassa (<1 ng/ul)

- ! La metodica NGS è stata in grado di confermare la presenza di tutte le alterazioni patogenetiche precedentemente identificate. Inoltre, sono state trovate nuove alterazioni a livello di altri oncogeni e di alcuni oncosoppressori. In alcuni casi, la metodica in NGS ha permesso di rilevare varianti dei geni BRAF/NRAS a frequenza allelica bassa, non identificabili con diverse metodiche usate per la diagnostica routinaria, ma confermate con real-time PCR ad alta sensibilità.

Il laboratorio ha portato avanti la validazione della metodica NGS per i geni BRCA1 BRCA2 e PALB2 in collaborazione con il laboratorio di Oncologia Molecolare della Fondazione Evo ed Eldo Tempia di Biella; i risultati sono descritti in dettaglio nella presentazione successiva.

Laboratorio Oncologia Molecolare Fondazione Edo ed Elvo Tempia Biella

Dal 2011, il Laboratorio di Oncologia Molecolare della Fondazione Edo ed Elvo Tempia di Biella svolge un servizio diagnostico di oncologia molecolare per il Quadrante del Piemonte Nord-Orientale (province di Biella, Vercelli, Novara, Verbania-Cusio-Ossola). Tale attività è svolta grazie alla collaborazione con la SCU di Anatomia Patologica (diretta dal Prof. Renzo Boldorini) dell'A.O.U. "Maggiore della Carità" di Novara (Hub di Quadrante) ed in particolare con il Laboratorio di Patologia Molecolare.

Da circa 2 anni il Laboratorio di Oncologia Molecolare si è dotato della tecnologia NGS, acquisendo lo strumento Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM).

Attualmente sono stati implementati per la clinica 2 pannelli genici:

- ! Ion Torrent AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2 (Thermo Fisher Scientific)
 - o 50 oncogeni/oncosoppressori (2800 mutazioni COSMIC)
 - Adatto all'analisi dei principali tumori solidi (melanomi, carcinomi del colon-retto, carcinomi del polmone non a piccole cellule, GIST, etc..) a scopo prognostico e predittivo di risposta alle terapie.
- ! Myriapod NGS-LT BRCA 1-2 panel CE-IVD (Diatech Pharmacogenetics)
 - o geni BRCA1 BRCA2 e PALB2
 - Test genetico per la ricerca di mutazioni nei geni BRCA1 e BRCA2 marcatori predittivi di risposta alla terapia con gli inibitori di PARP

Validazione AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2

Il pannello Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2 (Thermo Fisher), che permette l'analisi contemporanea di regioni di interesse in 50 tra oncogeni e oncosoppressori per un totale di 2800 mutazioni COSMIC (Tabella 1) contiene 207 coppie di primers e consente di eseguire l'analisi partendo da 10 ng di DNA estratto da tessuto fissato.

La validazione è stata effettuata su una casistica clinica retrospettiva di 20 tessuti fissati, rappresentativi delle neoplasie maggiormente analizzate dal Laboratorio, costituita da: carcinomi del colon-retto (14/20), melanomi (3/20), GIST (2/20) e 1 caso di adenocarcinoma del polmone (NSCLC).

La casistica selezionata era stata precedentemente valutata con metodiche di Real-Time PCR utilizzando saggi di mutazione allele specifica con sensibilità compresa fra 0,5% e 5% (hot spot geni KRAS, NRAS, BRAF e EGFR) e sequenziamento Sanger diretto con sensibilità pari al 10% (geni KIT e PDGFRA). Nel 50% dei casi (10/20) erano state identificate specifiche alterazioni costituite prevalentemente da mutazioni puntiformi (SNV, 8/10 casi), mentre 2 casi presentavano rispettivamente un'inserzione e una delezione genica (Tabella 1).

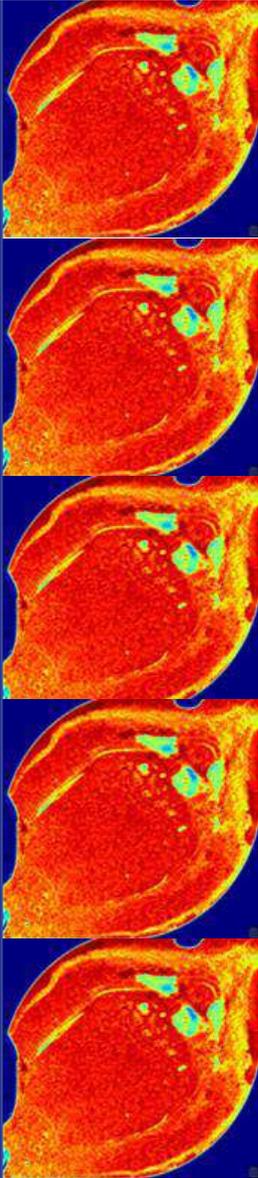
La metodica NGS è stata in grado di confermare la presenza di tutte le alterazioni patogenetiche precedentemente identificate. Inoltre, sono state identificate alterazioni aggiuntive a livello di alcuni oncogeni, al di fuori delle regioni precedentemente indagate (es. KRAS esone 10, BRAF codone 601, GNAQ, ecc...), e di alcuni oncosoppressori (es. TP53, APC, CTNNB1, ecc...). È interessante notare come i campioni risultati "wild-type" con i saggi diagnostici, siano risultati mutati su alcuni dei geni oncosoppressori valutati con la piattaforma NGS (es. APC, TP53).

Tabella 1: in alto i geni e i corrispondenti esoni precedentemente indagati per la clinica a seconda della tipologia tumorale; in basso i geni analizzati "hot spot" dal pannello.

Tumore	Geni	Esoni
Colon	KRAS/NRAS	2-3-4
	BRAF	15
Melanoma	BRAF	15
	NRAS	2-3
	CKIT	9-11-13-17
GIST	CKIT	11-13-17-18

		PDGFR α	12-18
NSCLC		EGFR	18-19-20-21
Cancer Hotspot Panel v2			
ABL 1	EGFR	GNAS	KRAS
AKT1	ERBB2	GNAQ	MET
ALK	ERBB4	HNFI1A	MLH1
APC	EZH2	HRAS	MLP
ATM	FBXW7	IDH1	NOTCH1
BRAF	FGFR1	JAK2	NPM1
CDH1	FGFR2	JAK3	NRAS
CDKN2A	FGFR3	IDH2	PDGFRA
CSF1R	FLT3	KDR	PIK3CA
CTNNB1	GNA11	KIT	PTEN

La validazione della metodica NGS per i geni BRCA1 BRCA2 e PALB2 eseguita in collaborazione con il laboratorio dell'IRCCS di Candiolo è descritta in dettaglio come presentazione successiva.



***INNOVAZIONE TECNOLOGICA DEL LABORATORIO di
PATOLOGIA MOLECOLARE: NEXT GENERATION
SEQUENCING***

***PRESENTAZIONE DELLE PRIME ESPERIENZE
SUL CAMPO***

***NGS NELLE NEOPLASIE SOLIDE
ESPERIENZA della SCDU di ANATOMIA
PATOLOGICA della
AOU San Luigi di Orbassano***

Dottssa Susanna Cappia



La piattaforma NGS presente nella SCDU di Anatomia Patologica della AOU San Luigi di Orbassano è il Ion Personal Genome Machine(PGM) della ditta Thermo Fischer Scientific.



ion torrent
△ * △ ○ × □ + ≈



Ion PGM™ Instruments

NGS PGM San Luigi

UTILIZZO IN ATTIVITA' DI RICERCA

2010

2012

2013

2014

2015

2017

2018

STRUMENTAZIONE

NETWORK COLON-LUNG

NETWORK FUSION

NETWORK ONCOMINE

DNA LUNG COLON

VALIDAZIONE IN LOCO

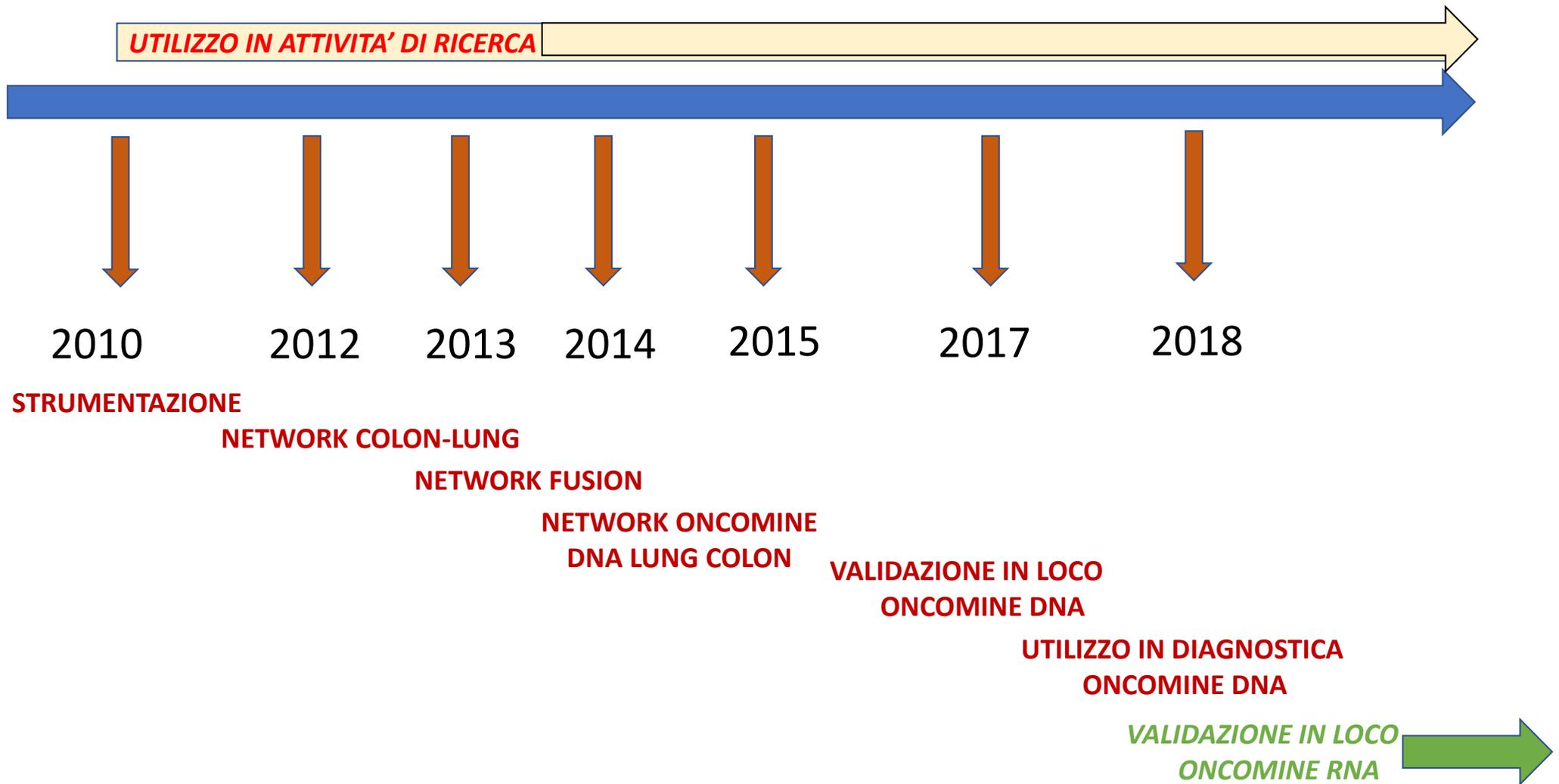
ONCOMINE DNA

UTILIZZO IN DIAGNOSTICA

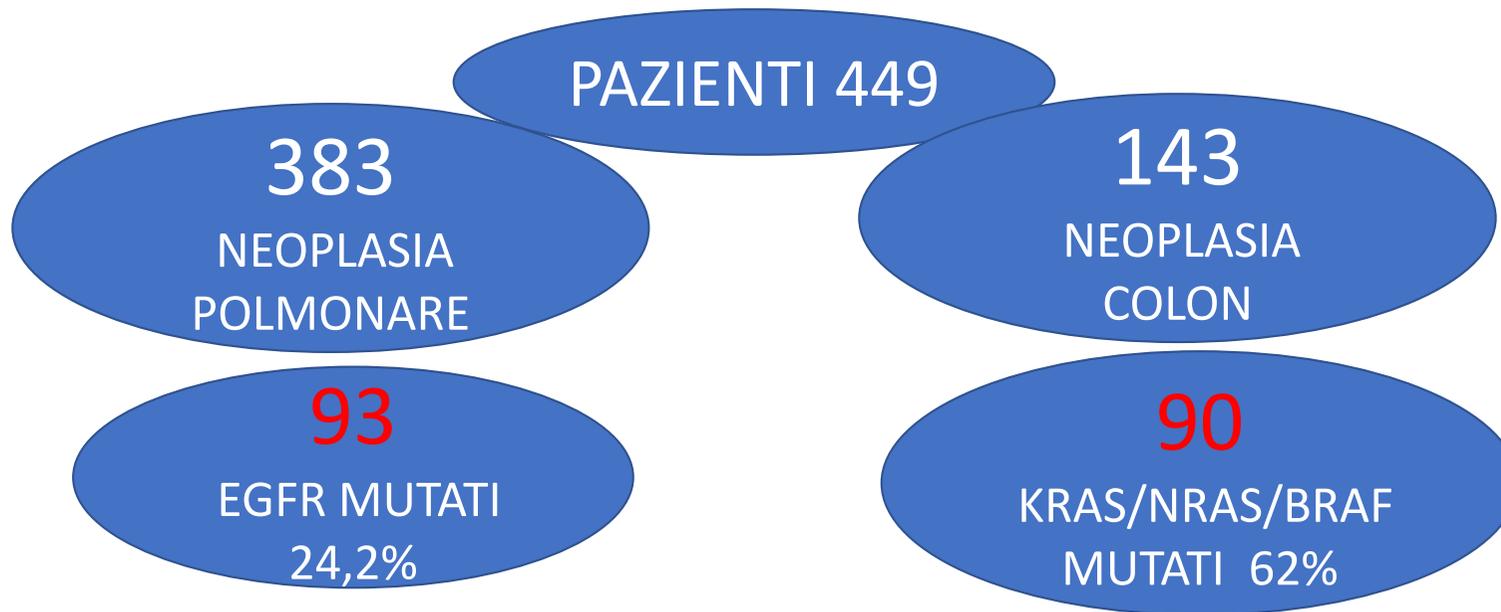
ONCOMINE DNA

VALIDAZIONE IN LOCO

ONCOMINE RNA



ONCOMINE SOLID TUMOR DNA
TEST DAL 17 NOVEMBRE 2017 AL 31 DICEMBRE 2018



EX 18		3
EX19	COMMON	33
EX19	NON COMMON	19
EX21	L858R	22
EX21	L861Q	1
EX20	15(T790M =12)	

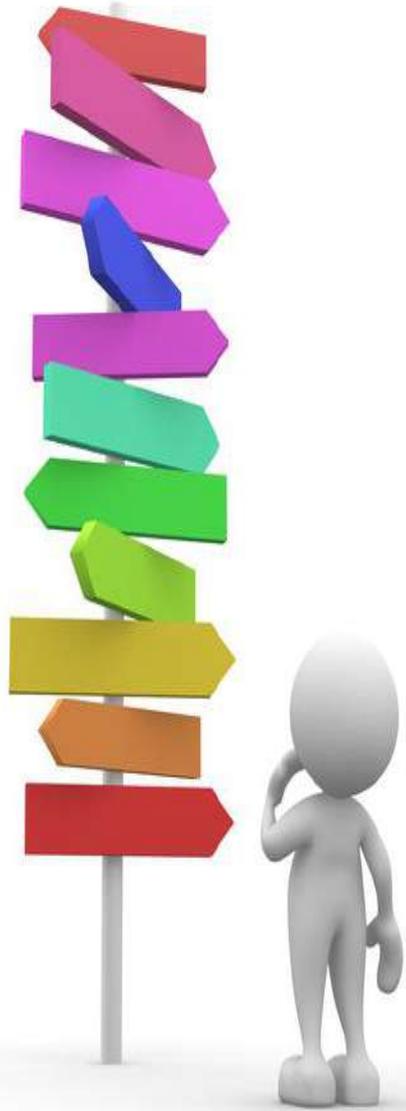
KRAS	esone 2	66
	esone 3	5
	esone 4	5
NRAS	esone 2	3
BRAF	(RAS WT)	11

NGS NELLE NEOPLASIE SOLIDE

Perché abbiamo scelto questa piattaforma?

- CHIMICA UTILIZZATA
- PROCESSIVITA' DEL SISTEMA
- PANNELLI

***SCELTA DETTATA DAL
PROPRIO OBIETTIVO***



ANALISI DETTAGLIATA DELLA SCELTA

- 1** FLESSIVITA' DEL SISTEMA
NUMERO DI TEST PER KIT
PER SEDUTA
- 2** ALGORITMO DI LAVORO COMPATIBILE CON LE RISORSE A DISPOSIZIONE
- 3** TAT DEL PROCESSO
- 4** PANNELLI IDONEI ALLE PROPRIE ESIGENZE
TIPO E NUMERO DI GENI
COPERTURA DELLE REGIONI
VELOCITA' DI INSERIMENTO NUOVI TEST
- 5** SOFTWARE DI ANALISI
- 6** COSTO DEL PROCESSO



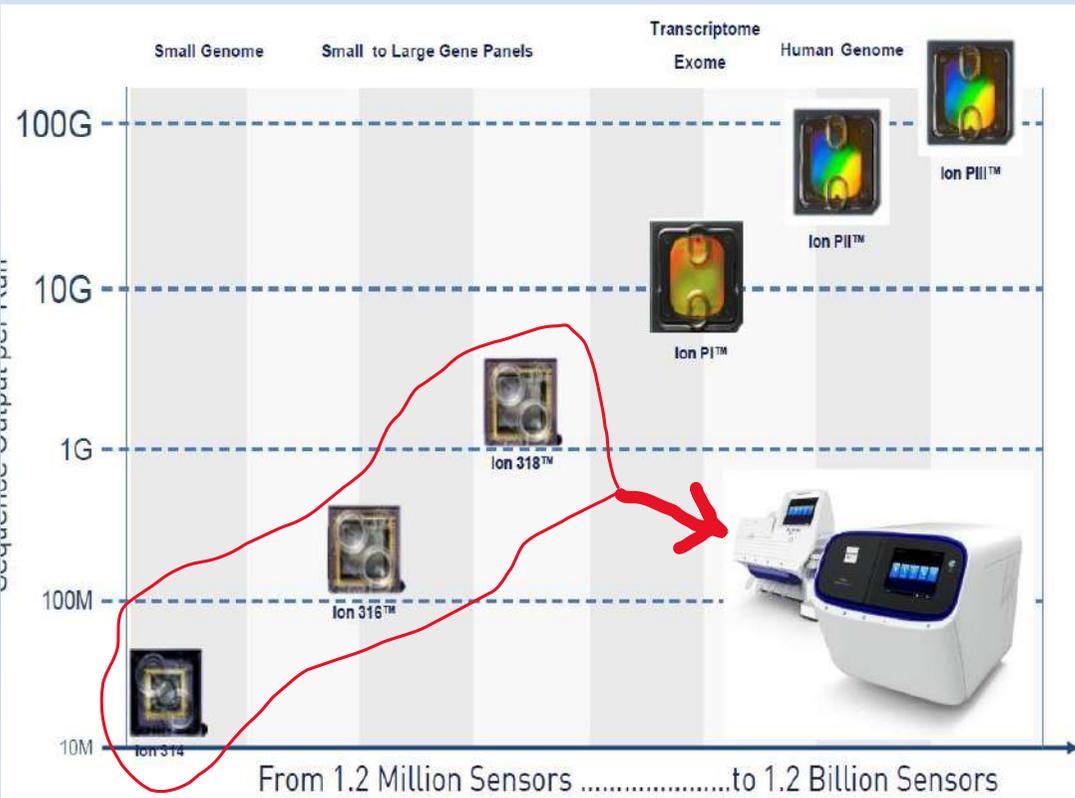
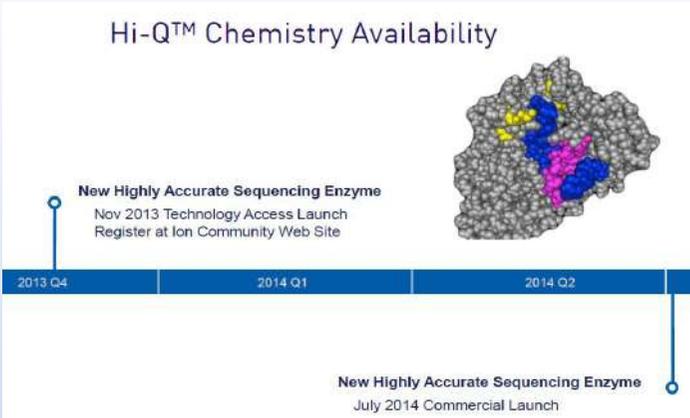


FLESSIVITA' DEL SISTEMA

DNA

RNA

possibilità di processare contemporaneamente analisi mutazionali e analisi di prodotti di fusione



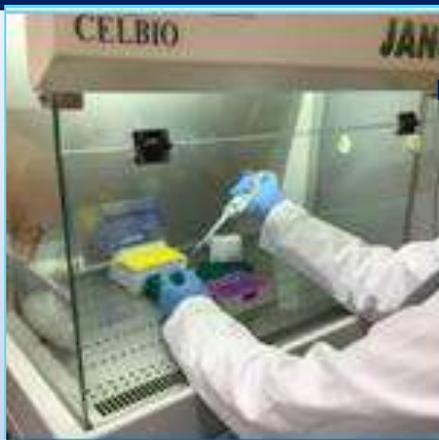
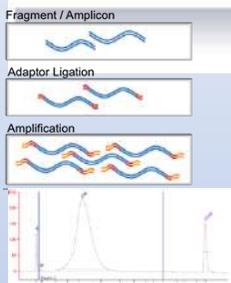
possibilità di processare un numero differente di campioni per RUN



2

IonTorrent WORKFLOW (come avviene in realtà il lavoro)

Construct DNA Library



Construction of library with multiplex amplification of regions of interest



Amplification of target regions simultaneously



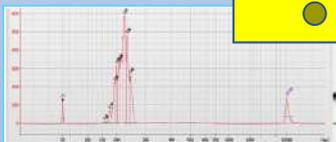
Adaptor ligation and barcode the samples



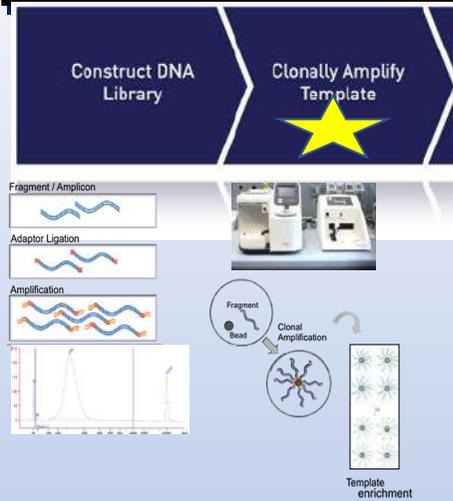
Library purification



Library Quantification and normalization



IonTorrent WORKFLOW



Template enrichment with Streptavidin-biotin system



Preparation of reaction mix with template and loading it on the amplification station

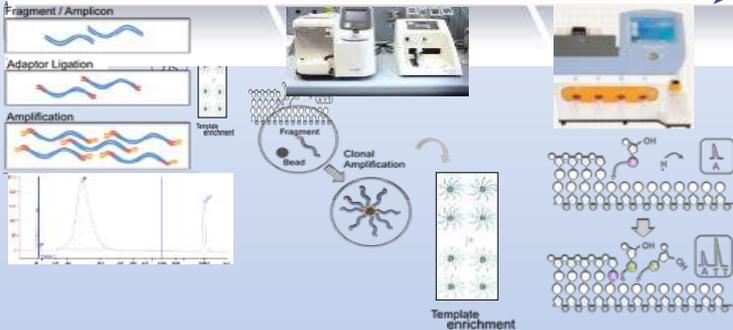


Preparation and setting of OneTouch Instrument for the reaction



Emulsion PCR for clonally amplification of template

IonTorrent WORKFLOW

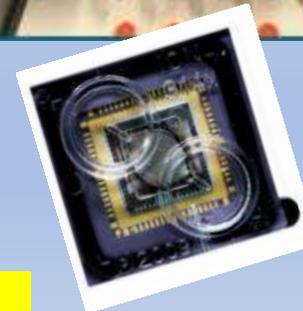


SEQUENCE

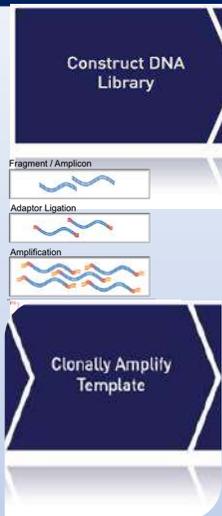


Calibration and loading of CHIP for template sequencing

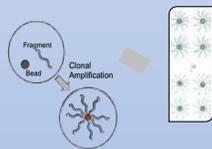
Initialization and setting of PGM machine (pH adjustment and nucleotide loading)



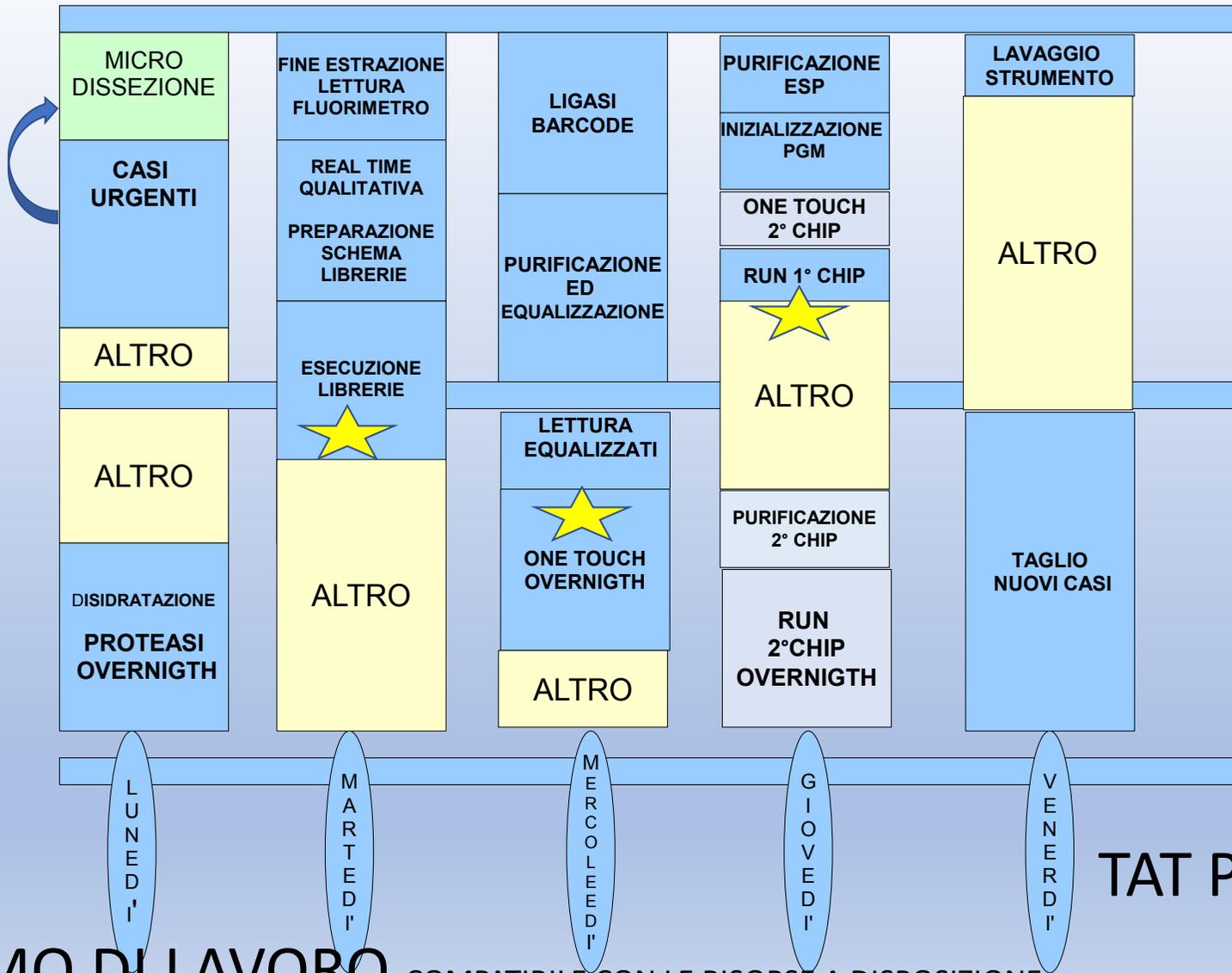
IonTorrent WORKFLOW



Ion Chef™ System



Initialization and setting of PGM machine (pH adjustment and nucleotide loading)

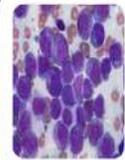


TAT PROCESSO

ALGORITMO DI LAVORO COMPATIBILE CON LE RISORSE A DISPOSIZIONE

4

PANNELLI IDONEI ALLE PROPRIE ESIGENZE



Cancer Hotspot Panel v2

50 genes
>2,800 COSMIC Mutations
207 Amplicons
10 ng DNA input



BRCA 1&2 Panel

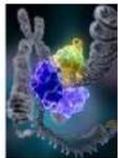
2 genes
167 amplicons

available
now



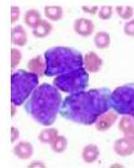
Colon and Lung Cancer Panel

22 genes
90 amplicons



Comprehensive Cancer Panel

409 Genes
16,000 Amplicons
40 ng DNA input



AML Research Panel

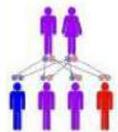
Coding regions of known
mutations
21 genes

coming
soon



CFTR Research Panel

All exons, intron-exon
boundaries, and UTRs
1 gene



Inherited Disease Panel

700 Diseases
328 Genes
10,000 Amplicons
30 ng DNA input



Cardio Research Panel

All exons and UTRs
62 genes



TP53 Research Panel

All exons and UTRs
1 gene

OncoPrint™ Solid Tumour DNA Kit

The OncoPrint™ Solid Tumour DNA Kit consists of a single pool of primers and associated reagents to perform multiplex PCR for preparation of amplicon libraries for NGS, providing sensitive and comprehensive sample amplification. Sufficient reagents are supplied for 96 tests, together with bar codes to facilitate the combination of up to 16 samples in a single NGS run.

Application	DNA somatic mutation detection (substitutions, insertions, deletions and inversions)
Sample type	Extracted human DNA samples (including those from FFPE tissue)
Input DNA required	10 ng or more
Genes	EGFR, ALK, ERBB2, ERBB4, FGFR1, FGFR2, FGFR3, MET, DDR2, KRAS, PIK3CA, BRAF, AKT1, PTEN, NRAS, MAP2K1, STK11, NOTCH1, CTNNB1, SMAD4, FBXW7, TP53
Mutations	>1,800 cancer related mutations as supported by COSMIC database*
Kit content	Amplification oligonucleotides, library preparation reagents, x16 barcodes, DNA Equalizer
Kit size	96 tests (split into 6 packs of 16 tests per pack)
Multiplexing	Possible to run up to 16 samples in a single run, as supported by sample "bar coding"

MET (EX 14) KIT PDGRa

OncoPrint™ Solid Tumour Fusion Transcript Kit

The OncoPrint™ Solid Tumour Fusion Transcript Kit consists of a single pool of primers and associated reagents to perform multiplex PCR for preparation of amplicon libraries for NGS, enabling sensitive and comprehensive sample amplification. Sufficient reagents are supplied for 96 tests, together with bar codes to facilitate the combination of up to 16 samples in a single NGS run. The kit includes Optimized positive controls designed to distinguish an assay failure from a true negative sample

Application	RNA fusion transcript detection
Sample type	Extracted human RNA samples (including those from FFPE tissue)
Input RNA required	10 ng or more of total RNA
Genes	ALK, RET, ROS1, NTRK1
Mutations	>60 specific designs for cancer relevant fusions* + "Imbalance" assay for non-targeted ALK fusions
Kit content	Amplification oligonucleotides, library preparation reagents, x16 barcodes
Kit size	96 tests (6 packs of 16 tests per pack)
Multiplexing	Possible to run up to 16 samples in a single run, as supported by sample "bar coding"

5

SOFTWARE DI ANALISI

- Direct integration with the sequencer
 - Automated analysis from data generation to annotated variants
 - Bioinformatics expertise not required

ION PGM™ SEQUENCER



ION PROTON™ SEQUENCER

ION REPORTER™ SOFTWARE



YOUR LAB

SEQUENCE

REPORT

Ion Reporter™ Software – Workflows

Preconfigured analysis workflows for your most common experimental designs.



Single Sample Analysis

- What's different from a reference genome?



Paired Analysis

- How do the variants differ between these two samples?



Somatic Paired Analysis

- What variants exist in a tumor but not the germline sample?

A>G

Explore your SNPs, InDels, and **CNVs**

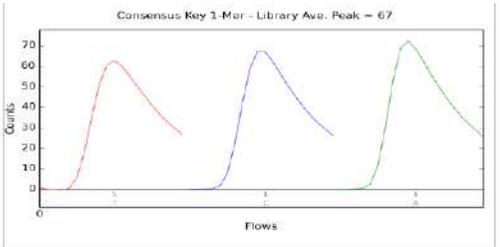
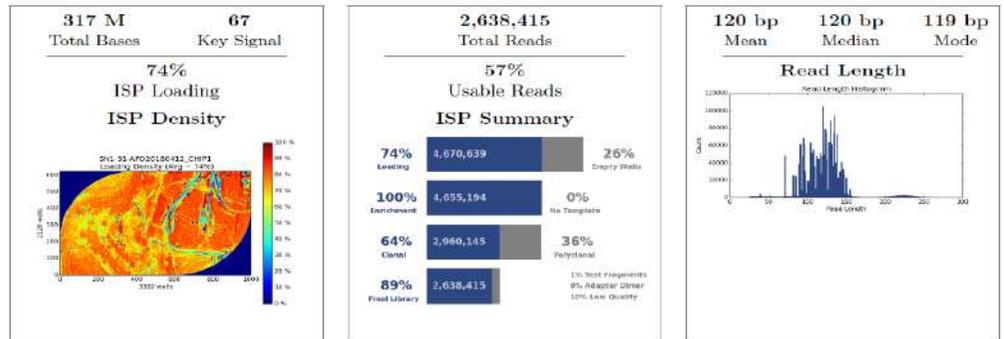


Every variant is richly annotated

- dbSNP
- COSMIC
- OMIM
- SIFT / Polyphen
- Gene Ontology
- Pfam
- Custom Annotations
- and more....



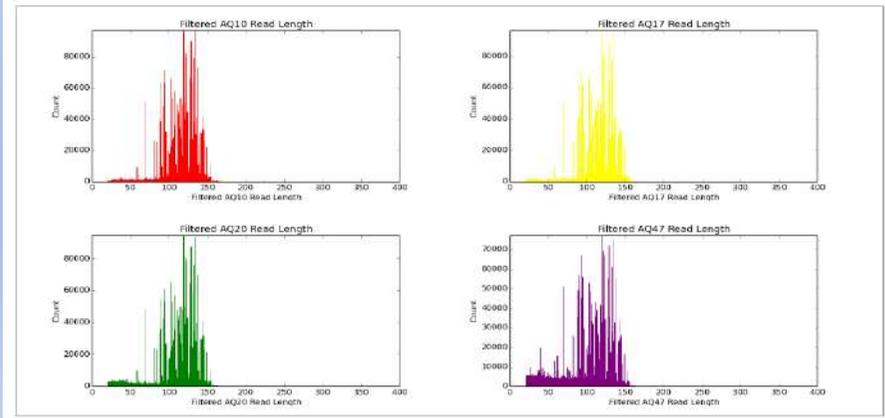
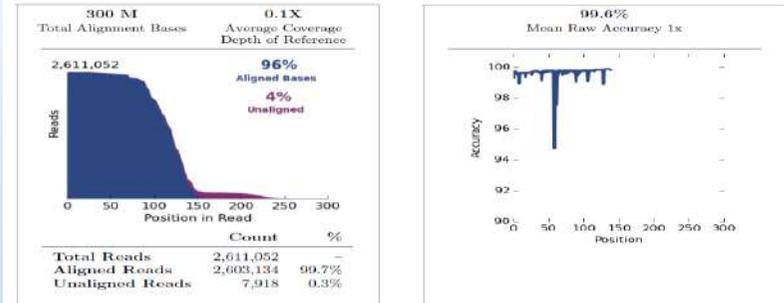
Run Summary



Category	Count	Percentage
Addressable Wells	6,337,389	
With ISPs	4,670,639	73.7%
Live	4,655,194	99.7%
Test Fragment	44,319	0.10%
Library	4,610,875	99.0%
Library ISPs	4,610,875	
Filtered: Polyclonal	1,695,049	36.8%
Filtered: Low Quality	273,027	05.9%
Filtered: Adapter Dimer	4,384	00.1%
Final Library ISPs	2,638,415	57.2%

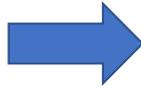
Barcode Name	Sample	Bases	≥ Q20	Reads	Mean Read Length	Read Length Histogram
No barcode	none	3,551,846	3,388,924	27,300	130 bp	
IonDx-9	E-APD20180412 CHIP1	38,400,177	37,269,886	329,367	116 bp	
IonDx-10	F-APD20180412 CHIP1	34,808,902	33,860,711	303,498	114 bp	
IonDx-11	G-APD20180412 CHIP1	31,737,171	30,775,735	241,482	131 bp	
IonDx-12	H-APD20180412 CHIP1	39,638,775	38,407,148	330,853	119 bp	

Alignment Summary (aligned to Homo Sapiens)



Run - R_2018_05_17_10_52_59_user_SN1-37-APD20180517_CHIP1

Barcode	IonDx-1	Mapped Reads	<input type="button" value="BAM"/> <input type="button" value="BAI"/>
Sample Name	Z-APD20180517_CHIP1	TVC-Processed Reads	<input type="button" value="BAM"/> <input type="button" value="BAI"/>
Reference Genome	HS19	Variant Calls	<input type="button" value="VCF.GZ"/> <input type="button" value="VCF.GZ.TBI"/> <input type="button" value="XLS"/> <input type="button" value="COV"/>
Library Type	AmpliSeq	Variants + Non-Variant Coverage	<input type="button" value="gVCF.GZ"/> <input type="button" value="gVCF.GZ.TBI"/>
Read trimming	Enabled	View Variant Calls in IGV	<input type="button" value="IGV"/>
Targeted Regions	Oncomine_Solid_Tumour_DNA_BED_MAN0013542_RevA <input type="button" value="BED"/>	Deprecated Features	<input type="button" value="Classic"/>
Hotspot Regions	ColonLungV2_20140523_hotspot <input type="button" value="BED"/>	Documentation	Torrent Variant Caller Documentation
Effective Regions	Oncomine_Solid_Tumour_DNA_BED_MAN0013542_RevA_effective <input type="button" value="BED"/>		
Parameter Settings	Custom custom, TS version: 5.6 <input type="button" value="Parameters File"/>		
Variant Caller Version	tvc 5.6-13 (ddee259)		



<input type="checkbox"/>	Position	Ref	Variant	Allele Call	Frequency	Quality	Region Name
<input type="checkbox"/>	chr1:162741794	C	T	Heterozygous	46.9 %	7890.3	ON_DDR2_5
<input type="checkbox"/>	chr3:41266118	G	A	Heterozygous	0.8 %	16.3	CHP2_CTNNB1_1
<input type="checkbox"/>	chr4:1807894	G	A	Homozygous	99.6 %	24495.0	CHP2_FGFR3_3
<input type="checkbox"/>	chr7:55228053	A	T	Heterozygous	53.6 %	9754.0	ON_EGFR_2A
<input type="checkbox"/>	chr7:55249063	G	A	Heterozygous	57.0 %	12118.7	CCP_EGFR_6
<input type="checkbox"/>	chr7:55259532	G	A	Heterozygous	0.7 %	9.6	CHP2_EGFR_8
<input type="checkbox"/>	chr9:139399409	CAC	-	Heterozygous	1.3 %	34.0	CHP2_NOTCH1_1
<input type="checkbox"/>	chr12:25398284	C	A	Heterozygous	7.7 %	1463.3	CHP2_KRAS_1
<input type="checkbox"/>	chr17:7577036	G	-	Heterozygous	0.8 %	6.5	CHP2_TP53_7
<input type="checkbox"/>	chr17:7577037	G	-	Heterozygous	0.8 %	6.5	CHP2_TP53_7
<input type="checkbox"/>	chr17:7577040	G	-	Heterozygous	0.8 %	6.5	CHP2_TP53_7
<input type="checkbox"/>	chr17:7577065	C	T	Heterozygous	1.2 %	29.1	CHP2_TP53_7
<input type="checkbox"/>	chr17:7578477	G	A	Heterozygous	0.7 %	13.1	CHP2_TP53_4
<input type="checkbox"/>	chr17:7579382	G	A	Heterozygous	0.6 %	6.3	CHP2_TP53_2
<input type="checkbox"/>	chr17:7579472	G	C	Heterozygous	99.3 %	26283.0	CHP2_TP53_2
<input type="checkbox"/>	chr18:48604668	G	A	Heterozygous	0.7 %	10.0	CHP2_SMAD4_0

Run Report for Auto_user_SN1-31-APD20180412_CHIP1_313

coverageAnalysis

Library type: AmpliSeq DNA
Target regions: Oncomine_Solid_Tumour_DNA_BED_MAN0013542_RevA

Barcode Name	Sample	Mapped Reads	On Target	Mean Depth	Uniformity
IonDx-9	E-APD20180412_CHIP1	328,342	98.39%	3,349	100.00%
IonDx-10	F-APD20180412_CHIP1	303,023	98.09%	2,969	100.00%
IonDx-11	G-APD20180412_CHIP1	241,184	98.95%	2,563	100.00%
IonDx-12	H-APD20180412_CHIP1	329,459	98.26%	3,368	100.00%
IonDx-13	I-APD20180412_CHIP1	325,414	98.24%	3,314	100.00%
IonDx-14	L-APD20180412_CHIP1	390,534	98.50%	3,868	100.00%
IonDx-15	M-APD20180412_CHIP1	374,889	98.30%	3,810	100.00%
IonDx-16	N-APD20180412_CHIP1	310,289	97.81%	3,215	100.00%

Coverage Analysis Report

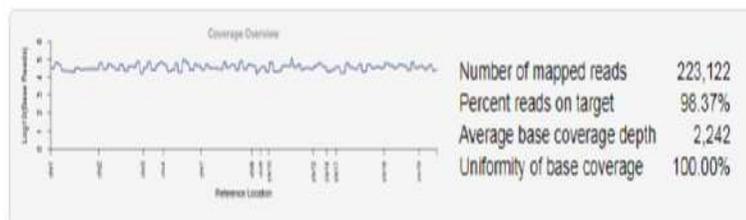
Sample Name: Z-APD20180517 CHIP1

IonDx-1_R_2018_05_17_10_52_59_user_SN1-37-APD20180517_CHIP1_Auto_user_SN1-37-APD20180517_CHIP1_319

Library type: AmpliSeq DNA

Reference: Hs19 (DNA)

Target regions: OncoPrint_Solid_Tumour_DNA_BED_MAN0013542_RevA



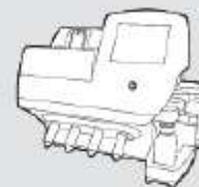
Amplicon Read Coverage		Target Base Coverage	
Number of amplicons	92	Bases in target regions	10,235
Percent assigned amplicon reads	98.37%	Percent base reads on target	89.63%
Average reads per amplicon	2,366	Average base coverage depth	2,242
Uniformity of amplicon coverage	100.00%	Uniformity of base coverage	100.00%
Amplicons with at least 1 read	100.00%	Target base coverage at 1x	100.00%
Amplicons with at least 20 reads	100.00%	Target base coverage at 20x	100.00%
Amplicons with at least 100 reads	100.00%	Target base coverage at 100x	100.00%
Amplicons with at least 500 reads	100.00%	Target base coverage at 500x	100.00%
Amplicons with no strand bias	100.00%	Target bases with no strand bias	99.56%
Amplicons reading end-to-end	98.91%	Percent end-to-end reads	97.23%
Amplicon base composition bias	0.000		

	contig_id	region_id	gc_count	overlaps	fwd_e2e	rev_e2e	total_reac	fwd_reads	rev_reads	cov20x	cov100x	cov500x
1	chr1	Hotspot_1.17678	53	1138	553	542	1138	574	564	115	115	115
2	chr1	ON_DDR2_3	65	1189	605	567	1189	616	573	110	110	110
3	chr1	ON_DDR2_2	72	1219	560	628	1219	571	648	126	126	126
4	chr1	CHP2_NRAS_1	41	1294	754	499	1294	780	514	85	85	85
5	chr1	ON_DDR2_1	70	1354	796	513	1354	825	529	132	132	132
6	chr1	ON_DDR2_7	52	1400	836	504	1400	862	538	129	129	129
7	chr1	CHP2_NRAS_2	35	1432	729	643	1432	771	661	80	80	80
8	chr1	ON_DDR2_8	49	1658	965	615	1658	1015	643	116	116	116
9	chr1	ON_DDR2_4	65	1776	808	901	1776	852	924	131	131	131
10	chr1	ON_DDR2_6	58	2136	991	981	2136	1104	1032	129	129	129
11	chr1	ON_DDR2_5	82	2741	1241	1385	2741	1306	1435	135	135	135
12	chr10	CHP2_FGFR2_3	57	849	336	480	849	345	504	114	114	114
13	chr10	CHP2_PTEN_2	29	850	359	413	850	388	462	116	116	116
14	chr10	CHP2_FGFR2_1	66	1262	496	718	1262	526	736	106	106	106
15	chr10	CHP2_FGFR2_2	66	1280	632	613	1280	652	628	127	127	127
16	chr10	CHP2_PTEN_4	43	1468	749	621	1468	792	676	128	128	128
17	chr10	CHP2_FGFR2_4	38	1689	956	691	1689	986	703	93	93	93
18	chr10	CHP2_PTEN_8	34	1855	953	771	1823	1012	811	116	116	116
19	chr10	CHP2_PTEN_5	35	2406	1290	969	2405	1357	1048	117	117	117
20	chr10	CHP2_PTEN_6	49	2490	1190	1194	2490	1237	1253	114	114	114
21	chr10	CHP2_PTEN_1	42	2868	1181	1606	2868	1215	1653	93	93	93
22	chr10	CHP2_PTEN_7	19	3806	1733	1923	3794	1774	2020	52	52	52
23	chr12	CHP2_KRAS_1	48	1347	635	618	1347	688	659	118	118	118
24	chr12	CHP2_KRAS_3	40	1556	649	786	1556	717	839	109	109	109
25	chr12	CHP2_KRAS_2	48	2247	1112	1038	2247	1158	1089	104	104	104
26	chr14	CHP2_AKT1_1	84	1561	736	765	1561	768	793	138	138	138
27	chr15	ON_MAP2K1_1	65	1178	626	502	1178	660	518	116	116	116
28	chr17	CHP2_TP53_7	80	1339	567	708	1339	603	736	136	136	136
29	chr17	CHP2_TP53_2	92	1563	673	847	1563	691	872	135	135	135
30	chr17	CHP2_ERBB2_3	75	1960	827	1068	1960	844	1116	129	129	129
31	chr17	CHP2_ERBB2_1	69	2054	928	1066	2054	961	1093	128	128	128
32	chr17	CHP2_TP53_5	60	2176	1061	1057	2176	1090	1086	118	118	118
33	chr17	CHP2_TP53_3	43	2190	893	1197	2187	926	1261	85	85	85
34	chr17	CHP2_ERBB2_2	66	2398	1126	1235	2398	1145	1253	108	108	108
35	chr17	CHP2_TP53_4	88	2415	1213	1060	2415	1320	1095	131	131	131
36	chr17	CHP2_TP53_8	70	2469	1332	1061	2469	1371	1098	112	112	112
37	chr17	CHP2_TP53_1	63	3118	1753	1285	3118	1802	1316	107	107	107
38	chr17	CHP2_TP53_6	56	3367	1583	1676	3367	1647	1720	104	104	104
39	chr18	CHP2_SMAD4_4	61	987	494	471	987	502	485	120	120	120
40	chr18	CHP2_SMAD4_7	49	1167	496	636	1167	521	646	127	127	127
41	chr18	CHP2_SMAD4_9	56	1259	713	509	1259	740	519	116	116	116
42	chr18	CHP2_SMAD4_6	52	1456	729	679	1456	748	708	117	117	117
43	chr18	CHP2_SMAD4_3	56	1590	921	601	1590	962	628	112	112	112
44	chr18	CHP2_SMAD4_5	42	1685	741	874	1685	761	924	110	110	110
45	chr18	CHP2_SMAD4_1	42	1993	1061	835	1993	1129	864	114	114	114

Analysis Details

Run Name	R_2018_04_12_10_09_18_user_SN1-31-APD20180412_CHIP1
Run Date	April 12, 2018, 10:09 a.m.
Run Flows	400
Projects	
Sample	F-APD20180412_CHIP1, G-APD20180412_CHIP1, H-APD20180412_CHIP1, I-APD20180412_CHIP1, N-APD20180412_CHIP1, L-APD20180412_CHIP1, E-APD20180412_CHIP1, M-APD20180412_CHIP1
Reference	
Instrument	sn12e011802
Operation Mode	Customer mode
Flow Order	TACGTACGTCTGAGCATCGATCGATGTACAGC
Library Key	TCAG
TF Key	ATCG
Chip Barcode	AA0611357
Chip Check	Passed
Chip Type	316v2
Chip Data	single
Chip Lot Number	Missing
Chip Wafer	Missing
Barcode Set	OncomineBARCODE
Analysis Name	Auto_user_SN1-31-APD20180412_CHIP1_313
Analysis Date	April 12, 2018, 4:58 a.m.
Analysis Flows	400
runID	3E9PC
BeadFind Args	justBeadFind -args-json /opt/ion/config/args_316v2_beadfind.json
Analysis Args	Analysis -args-json /opt/ion/config/args_316v2_analysis.json -gopt /opt/ion/config/gopt_316v2_Hi-Q.param.json
Pre-BaseCaller	BaseCaller -barcode-filter 0.01 -barcode-filter-minreads 20
Calibration Args	Calibration
BaseCaller Args	BaseCaller -barcode-filter 0.01 -barcode-filter-minreads 20 -phred-table-file /opt/ion/config/phredTable.316v2.B5.h5
Alignment Args	tmap mapall ... stage1 map4
IonStats Args	ionstats alignment
Analysis Parameters	default

RUN SEQUENCE



Ion PGM™ Sequencer

ANALYZE DATA



Torrent Suite™ Software +
Ion Reporter™ Software

Analysis Results

Download Visualize Selected Variants Send to Report Role Switch To Generate Report

Analysis Name: L-APD20180412.CHIP1_v1_af38bc25-0bca-4cdf...

Summary Functional Population Ontologies Pharmacogenomics Somatic QC

Locus	Type	Location	Genes	% Frequency	Amino Acid Change	Coding	ClinVar
chr2:212812097	SNV	ERBB4 : intronic NM_005235.:	ERBB4	28.38	p.?	c.421+58A>G	
chr7:55228053	SNV	EGFR : intronic NM_005228.:	EGFR	86.65	p.?	c.1498+22A>T	
chr7:55242467	INDEL	EGFR : exononic NM_005228.:	EGFR	79.03	p.Leu747_Thr751del	c.2240_2254delTAAGAGAAGCAACAT	drug response
chr17:7578534	INDEL	TP53 : exononic NM_000546.1	TP53	32.23	p.Lys132delinsAsnArg	c.395_396insCAG	
chr17:7579472		TP53 :					

To learn more about reviewing your results, visit the [help guide](#).

Filter Options

Variants

- Filtered In Variants (5)
- Hidden Variants (0)
- Filtered Out Variants (748)

Samples

- Proband: L-APD20180412.CHIP1_v1
 - Gender: Unknown
 - Sample Type: DNA

Chromosome

All

Analysis Results

Download Visualize Selected Variants Send to Report Role Switch To Generate Report

Analysis Name: L-APD20180412.CHIP1_v1_af38bc25-0bca-4cdf...

Summary Functional Population Ontologies Pharmacogenomics Somatic QC

ClinVar	Coverage	dbSNP	UCSC Common SNPs	Allele Coverage	Exon	VariantID
	3280	rs839541	YES	T=2349, C=931		
	4995	rs1558544	YES	A=667, T=4328		
drug response	16011	rs121913229 ...(44)		AATTAAGAGAAGCAAC=3357, A=12654	19	COSM23671;COSM6254;COSM12369
	3732	rs786203589 ...(2)		C=2529, CCTG=1203	5	COSM44405
Benign ... (3)	1062	rs1042522 ...(2)	YES	G=320, C=732	4	COSM45995

To learn more about reviewing your results, visit the [help guide](#).

Filter Options

Variants

- Filtered In Variants (5)
- Hidden Variants (0)
- Filtered Out Variants (748)

Samples

- Proband: L-APD20180412.CHIP1_v1
 - Gender: Unknown
 - Sample Type: DNA

Chromosome

All

Filter Chains

HotSpot_CL (5,2)

Total Variants: 753 Total Genes: 25

100 items per page

1 - 5 of 5 items

Analysis Results

Analysis Name: LAP02018064_CHP1_v1_25x300-3ad-449

Summary Functional Population Ontologies Pharmacogenomics Somatic QC

Classification	Locus	Type	Location	Genes	% Frequency	Amino Acid Change	Coding	Clinc
Unclassified	chr1:152741794	SNV	CG22: intronic: NM_006182.1	DDR2	65.82	p.?	c.1505-20C>T	Benign
Unclassified	chr2:212812097	SNV	ERBB4: intronic: NM_005238.1	ERBB4	99.85	p.?	c.421+58A>G	
Unclassified	chr7:5522885	SNV	EGFR: intronic: NM_005228.1	EGFR	83.19	p.?	c.1488+22A>T	
Unclassified	chr12:25296265	SNV	KRAS: exonic: NM_033360.1	KRAS	28.55	p.Gly12Ser	c.34C>A	Pathog
Unclassified	chr17:7077038	SNV	TP53: intronic: NM_004588.1	TP53	35.45	p.Arg248Gln	c.743G>A	Unclear
Unclassified	chr17:7573472	SNV	TP53: intronic: NM_004588.1	TP53	69.09	p.Pro72Arg	c.218C>G	Benign

Filter Options

Variants: Filtered In Variants (4), Hidden Variants (0), Filtered Out Variants (138)

Samples: Proband: LAP02018064_CHP1_v1, Gender: Unknown, Sample Type: DNA

Chromosome: chr12

Filter Chains: HivSpot_CL (2, 2)

Total Variants: 744, Total Genes: 29, Variant Type in MINV: SNV, LONGREAD, INDEL, Variants: 11, Genes: 10

chr12:25,296,265

45 bp

25,882,270 bp, 25,888,280 bp, 25,894,290 bp, 25,898,300 bp

RefSeq Genes: KRAS (chr12:25357723-25403865), Exon number: 2, Amino acid coding number: 12, chr12:25398208-25398329, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ncbi/term-NCM_033360

Sequence: G G C A C T C T G C C T A C G C C A C C A A

RefSeq Genes: A A T G G V B B G A C A A G T I

Analysis Results

Analysis Name: VAP020180504_CHP1_v1_1e677728-5ad8-48E

Summary Functional Population Ontologies Pharmacogenomics Somatic QC

Classification	Locus	Type	Location	Genes	% Frequency	Amino Acid Change	Coding	Clinc
Unclassified	chr2:212812097	SNV	ERBB4: intronic: NM_005238.1	ERBB4	73.41	p.?	c.421+58A>G	
Unclassified	chr7:5522885	SNV	EGFR: intronic: NM_005228.1	EGFR	100.00	p.?	c.1488+22A>T	
Unclassified	chr7:5524248E	INDEL	EGFR: exonic: NM_005228.1	EGFR	67.58	p.Glu746_Ala750del	c.2216_2230delGAATTAAAC	Pathog

Filter Options

Variants: Filtered In Variants (0), Hidden Variants (0), Filtered Out Variants (137)

Samples: Proband: VAP020180504_CHP1_v1, Gender: Unknown, Sample Type: DNA

Chromosome: chr7

chr7:55,242,480

119 bp

55,242,480 bp, 55,242,490 bp, 55,242,500 bp, 55,242,510 bp

RefSeq Genes: EGFR (chr7:55242480-55242537), Exon number: 18, Amino acid coding number: 746, chr7:55242480-55242537, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ncbi/term-NCM_005228

Sequence: A T C A A G G A A T T A A G A G A A G C A A C A C T C C G A A

RefSeq Genes: K E L R E A T S P I E L I D

Analysis Name: P-APD20100322CHIP1_v1_4b567506-4934-4fc1...

Summary Functional Population Ontologies Pharmacogenomics Somatic QC

Search Go Preferences

Locus	Type	Location	Genes	% Frequency	Amino Acid Change	Coding	Clr
chr2:212812097	SNV	ERBB4 : intronic	ERBB4 NM_005236 :	52.30	p.?	c.421+58A>G	
chr7:55228053	SNV	EGFR : intronic	EGFR NM_005228 :	99.00	p.?	c.1498+22A>T	
chr7:55242466	INDEL	EGFR : exonic	EGFR NM_005228 :	19.08	p.Glu746_Pro753del insValSer	c.2237_2267delAAATTAAGAGAAGCAACATCTCinsTCT	drug
chr7:55242467	INDEL	EGFR : exonic	EGFR NM_005228 :	20.79	p.Glu746_Pro753del insValSer	c.2237_2267delAAATTAAGAGAAGCAACATCTCinsTCT	

Gene

EGFR

- Gene view
- Overview
- External links
- Drug resistance
- Tissue distribution
- Genome browser
- Mutation distribution
- Variants
- References

Reset page

Filters

Show advanced filters

Range Show input fields
740 - 753 (391)

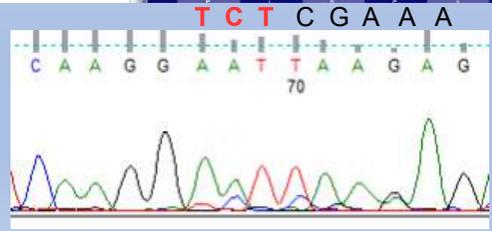
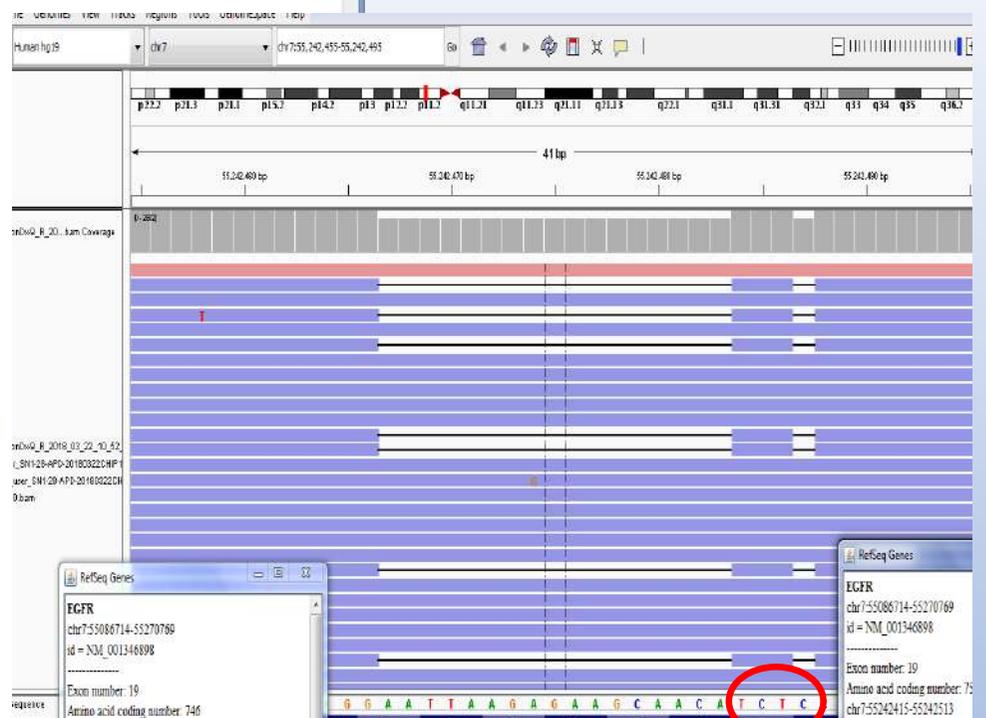
Variants

Mutations Fusions CNV & Expression Methylation

This tab displays a table of mutations for the selected gene. You can see more information in our help pages.

Show 10 entries Export: CSV TSV

Position (AA)	Mutation (CDS)	Mutation (Amino Acid)	Mutation ID (COSM)	Count
746	c.2237_2253>TC	p.E746_T751>V	COSM133193	3
746	c.2237_2253>TTCCCT	p.E746_T751>VP	COSM52935	3
746	c.2237_2253>TTGCT	p.E746_T751>VA	COSM12416	7
746	c.2237_2254del18	p.E746_S752>A	COSM12367	6
746	c.2237_2255>T	p.E746_S752>Y	COSM12384	62
746	c.2237_2256>TC	p.E746_S752>V	COSM18426	2
746	c.2237_2256>TG	p.E746_S752>V	COSM674057	1
746	c.2237_2256>TT	p.E746_S752>V	COSM133194	5
746	c.2237_2257>TCT	p.E746_P753>VS	COSM18427	3



Analysis Results

Download Visualize Selected Variants

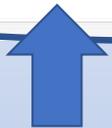
Analysis Name: L-APD20180412 CHIP1_v1_af38bc25-0bca-4cdf...

Analysis Name: L-APD20180412 CHIP1_v1_af38bc25-0bca-4cdf...

Summary Functional Population Ontologies Pharmacogenomics Somatic QC

Search Go Preferences Summary Functional Population Ontologies Pharmacogenomics Somatic QC

Locus	Type	Location	Genes	% Frequency	Amino Acid Change	Coding	ClinVar	ClinVar	Coverage	dbSNP	UCSC Common SNPs	Allele Coverage
chr2:212812097	SNV	ERBB4 : intronic : NM_005235.1	ERBB4	28.38	p.?	c.421+58A>G			3280	rs839541	YES	T=2349, C=931
chr7:55228053	SNV	EGFR : intronic : NM_005228.1	EGFR	86.65	p.?	c.1498+22A>T			4995	rs1558544	YES	A=667, T=4328
chr7:55242467	INDEL	EGFR : exonic : NM_005228.1	EGFR	79.03	p.Leu747_Thr751del	c.2240_2254delTAAGAGAAGCAACAT	drug response	drug response	16011	rs121913229 ... (44)		AATTAAGAGAAGCAAC=3357, A=12654



Analysis Results

Download Visualize Selected Variants

Analysis Name: F1-APD20180404CHIP1_v1_c879_2018-04-12-1...

Summary Functional Population Ontologies Pharmacogenomics Somatic QC

Search Go Preferences

n	Locus	Genotype	Type	Genes	Location	Length	Info	% Frequency
1	chr7:55242467	AATTAAGAGAAGCAACATC/AATC	INDEL	EGFR	EGFR : exonic : NM_005228.1	15	HS	4.83



20 items per page

1 - 1 of 1 items



COSTO del PROCESSO

COSTI TEORICI

COSTO MEDIO PER KIT

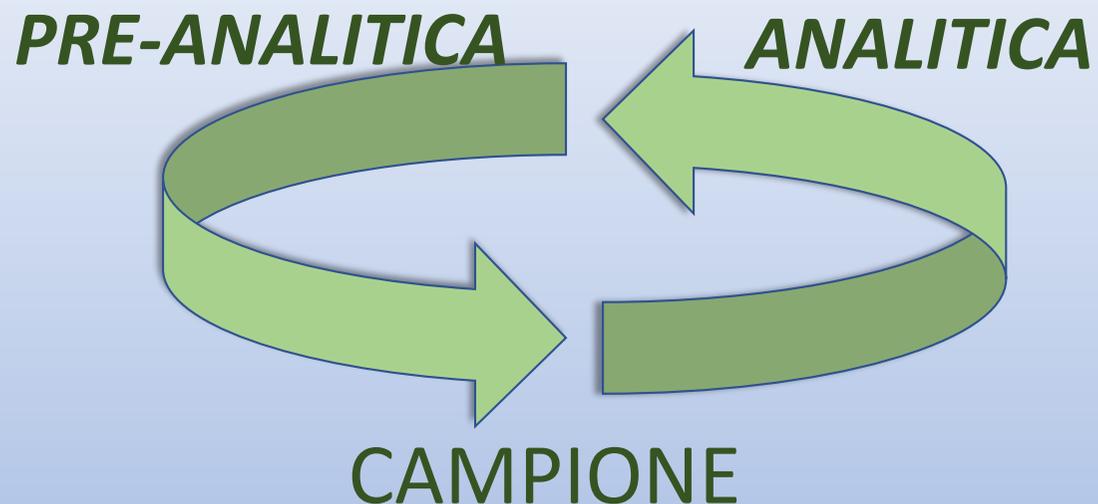
Oncomine DNA	96 test
KIT One Touch	4 sedute
KIT Sequenza	4 sedute
CHIP	314 – 316 - 318

COSTI REALI in base al numero di test per seduta

Nel 2018 si è posizionato sotto 200 euro a paziente per 22 geni



Anche utilizzando tecnologie NGS è fondamentale ricordare che la qualità del risultato analitico dipende da come sono gestite le fasi pre-test



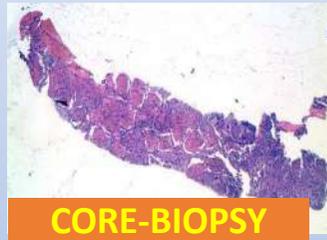
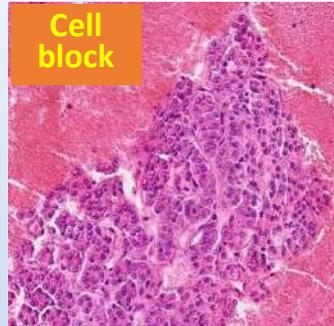
GESTIONE DEL PRELIEVO

GESTIONE TECNICA DEL MATERIALE
FISSAZIONE PROCESSAZIONE TAGGLIO

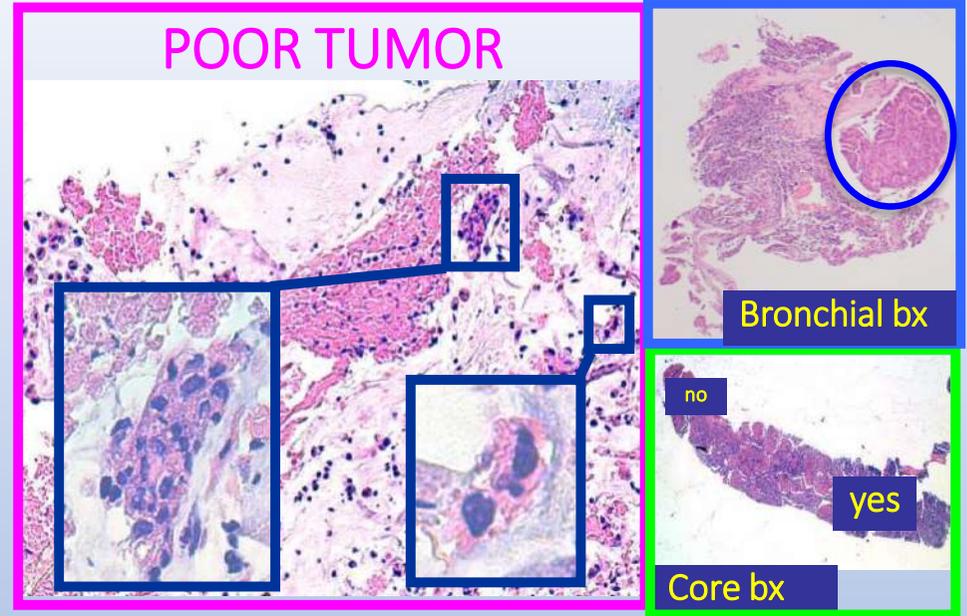
GESTIONE COMPONENTE
NEOPLASTICA



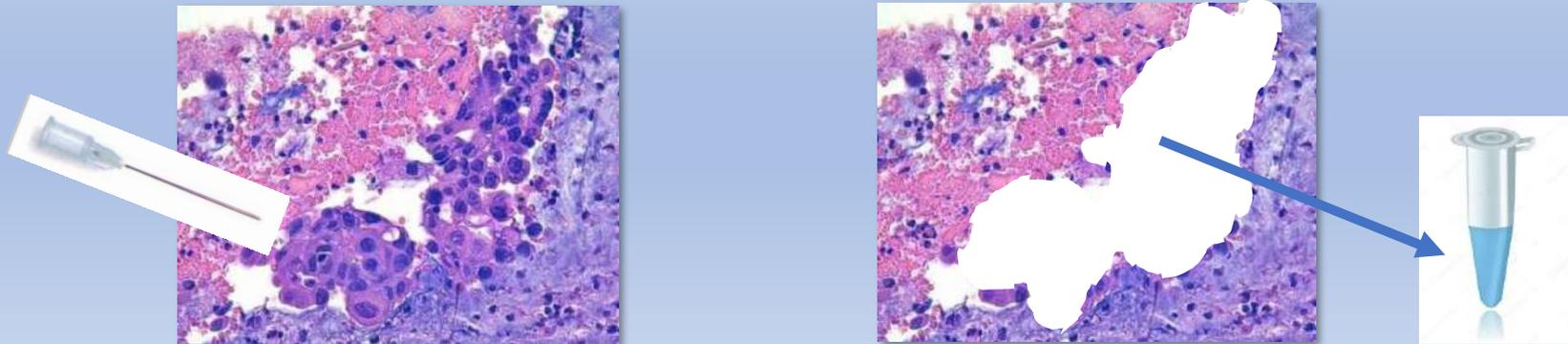
ROSE: pathologist On Site during sampling



accurate tumor content assessment



sample enrichment for molecular analyses



ANALISI NGS SOMATICA DI BRCA1/2

Esperienza pilota e validazione in tumori ovarici

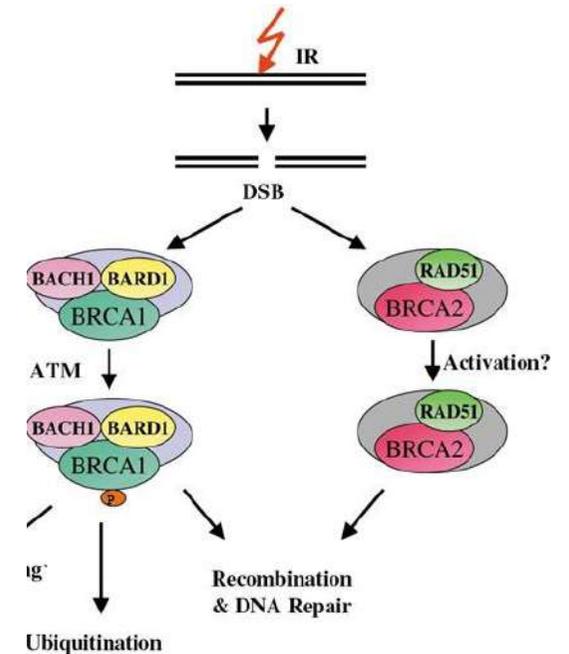
- *Patologia Molecolare, Anatomia Patologica, FPO-IRCCs, Candiolo*
- *Laboratorio di Oncologia Molecolare della Fondazione Edo ed Elvo Tempia, Biella*

BRCA1 e BRCA2, sono due geni oncosoppressori, codificanti per proteine coinvolte nella riparazione e nella ricombinazione del DNA (*DSB-Ricombinazione Omologa*)

Mutazioni in questi due geni possono portare all'assenza o all'alterazione della normale struttura delle proteine codificate e inibire il processo di riparazione del DNA con maggiori probabilità di sviluppare ulteriori alterazioni genetiche

Le mutazioni di *BRCA1* e *BRCA2*, nella maggior parte dei casi, sono ereditarie. La trasmissione è **autosomica dominante** oppure insorgono **de novo**. La loro presenza si associa ad un aumentato rischio di sviluppare tumore alla mammella e/o dell'ovaio.

Alterazioni germinali di BRCA1 e BRCA2 sono presenti nel 5-10% di tutti i tumori al seno e nel 20% di tutti i tumori dell'ovaio

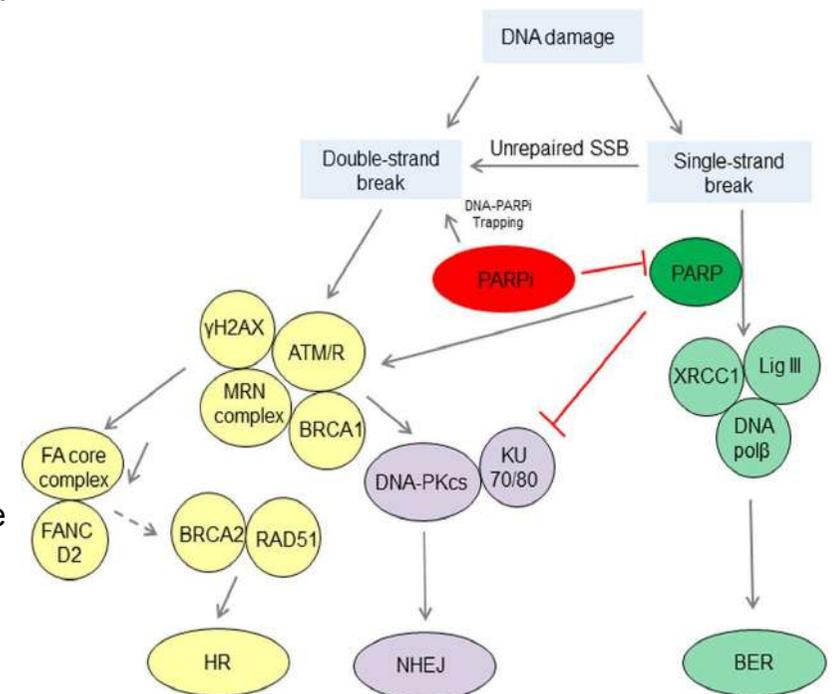


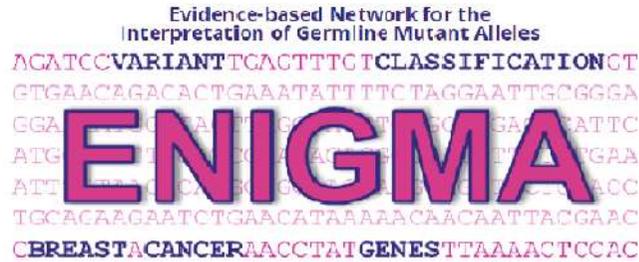
Le mutazioni dei geni *BRCA1* e *BRCA2*, germinali o solo somatiche, come descritto in un piccolo sottogruppo di tumori ovarici, sono un marcatore predittivo di sensibilità al trattamento con inibitori dell'enzima ***Poli(ADPribosio) Polimerasi (PARP)*** coinvolto nei meccanismi cellulari di riparazione del danno a carico del DNA, nelle pazienti affette da carcinoma dell'ovaio in fase avanzata

Gli inibitori di PARP nel carcinoma dell'ovaio agiscono attraverso un meccanismo di "letalità sintetica" in presenza di una concomitante perdita di funzione dei meccanismi di riparazione del DNA a doppio filamento mediante ricombinazione omologa (HR), nei quali le proteine BRCA1/2 svolgono un ruolo essenziale.

La perdita di funzione delle proteine BRCA1/2 quale effetto di mutazioni costituzionali o somatiche dei geni corrispondenti è la causa più frequente di frequente di mancato funzionamento del sistema HR.

Nel 2014 l'Agenzia Regolatoria Europea EMA (European Medicines Agency) ha approvato l'uso del PARP inibitore Olaparib come terapia nelle pazienti con recidiva platino-sensibile di carcinoma ovarico epiteliale sieroso di alto grado, di carcinoma delle tube di Fallopio e di carcinoma primitivo del peritoneo. Olaparib, che sfrutta le carenze dei meccanismi di riparazione del DNA tumorale per indurre selettivamente la morte delle cellule cancerose, è stato il primo inibitore di PARP ad essere approvato per pazienti affette da carcinoma ovarico, recidivante, legato a mutazione *BRCA* e platino-sensibile





ENIGMA is an international consortium of nine institutes focused on:

- determining the clinical significance of sequence variants in BRCA1, BRCA2 and other known or suspected breast cancer genes;
- applying the expert opinion to global databases and classification in databases;
- ensuring optimal and free-of-charge communication of such information at the provider and patient level.

An ENIGMA member is currently defined as a researcher or research group (consortium) who is willing to work collaboratively towards classification of variants and contribute data from families with undiagnosed sequence variants, as required to aid in the variant classification projects of all areas and/or conduct statistical analysis of family-based events aimed at classifying variants within a working group framework.

Familial Cancer (2015) 14:641–649
 DOI 10.1007/s10689-015-9817-9



ORIGINAL ARTICLE

Challenges to clinical utilization of hereditary cancer gene panel testing: perspectives from the front lines

Rebecca K. Marcus¹ · Jennifer L. Geurts^{1,2} · Jessica A. Grzybowski^{1,2} · Kiran K. Turaga¹ · T. Clark Gamblin¹ · Kimberly A. Strong³ · Fabian M. Johnston¹

Jamuar and Tan *Human Genomics* (2015) 9:10
 DOI 10.1186/s40246-015-0031-5



REVIEW

Open Access



Clinical application of next-generation sequencing for Mendelian diseases

Saumya Shekhar Jamuar^{1,2} and Ene-Choo Tan^{2,3*}

College of American Pathologists' Laboratory Standards for Next-Generation Sequencing Clinical Tests

Nazneen Aziz, PhD; Qin Zhao, PhD; Lynn Bry, MD, PhD; Denise K. Driscoll, MS, MT(ASCP)SBB; Birgit Funke, PhD; Jane S. Gibson, PhD; Wayne W. Grody, MD; Madhuri R. Hegde, PhD; Gerald A. Hoeltge, MD; Debra C. B. Leonard, MD, PhD; Jason D. Merker, MD, PhD; Rakesh Nagarajan, MD, PhD; Linda A. Palicki, MT(ASCP); Ryan S. Robetorye, MD; Iris Schrijver, MD; Karen E. Weck, MD; Karl V. Voelkerding, MD

Il test NGS di *BRCA*, effettuato in linea germinale (sangue periferico) o su tessuto tumorale, richiede un triplo livello di riferimenti:

- 1) *l'utilizzo del corretto genoma di riferimento*
- 2) *l'utilizzo del corretto trascritto di riferimento per i geni in analisi*
- 3) *l'utilizzo di database di analisi secondaria e terziaria che possano aiutare a definire tipo e grado di patogenicità delle varianti identificate nell'analisi*

- ✦ L'analisi in NGS dei geni BRCA1/2 è spesso complessa già a livello germinale per la presenza di numerose varianti di non facile interpretazione
- ✦ L'analisi effettuata a livello somatico è resa più ardua *dall'eterogeneità tumorale* e, se effettuata in campioni fissati, dai problemi relativi all'utilizzo di NGS su *questo tipo di materiale (FFPE)*

Per interpretare i numerosi dati prodotti da un'analisi NGS, il metodo migliore è quello di generare un algoritmo di analisi che tenga in considerazione diversi aspetti del dato ottenuto.

Nella nostra esperienza, i parametri sotto elencati risultano essere tra i principali discriminatori sia per la definizione della presenza di una variante che per la definizione della natura della variante stessa.

CRITERI DI VALUTAZIONE PER LA DEFINIZIONE DELLE VARIANTI DI BRCA1/2

PERCENTUALE DI FREQUENZA ALLELICA (MAF)

TIPO DI VARIANTE: SINONIMA, MISSENSO O NON SENSO

ZONA CODIFICANTE O NON CODIFICANTE

VALENZA PATOGENICA, BENIGNA O VUS

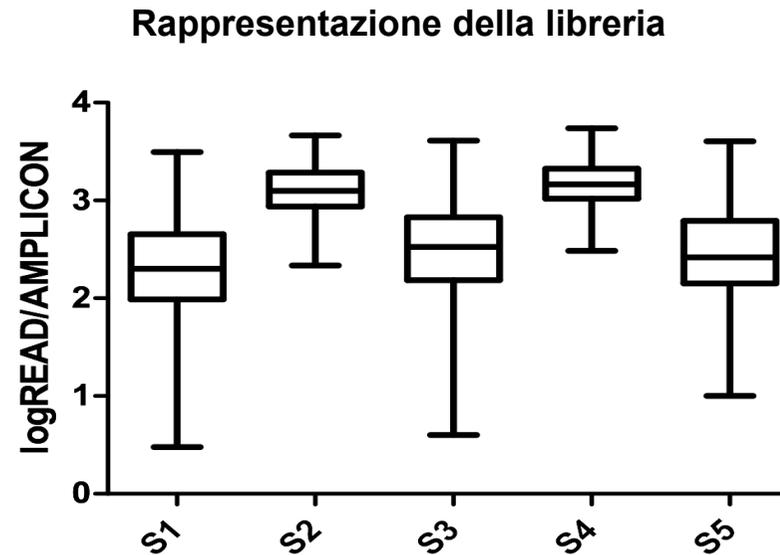
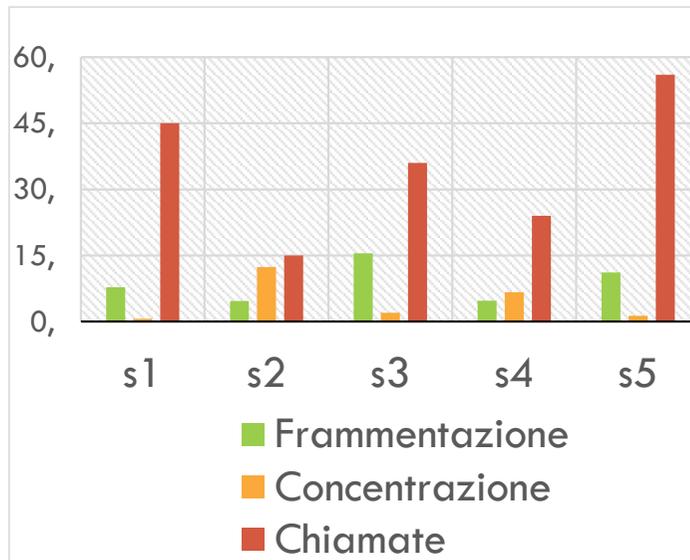
DISTRIBUZIONE NEI CAMPIONI IN ANALISI (CONFRONTO TRA CAMPIONI NELLA STESSA ANALISI)

MATERIALI E METODI

Al fine di ottenere un buon dato da materiale somatico, è necessario tenere in considerazione alcuni parametri:

1. La **quantità del DNA di partenza**: scarse quantità di DNA riducono di molto l'efficienza di preparazione della libreria e aumentano il numero di chiamate, molte delle quali sono artefatti
2. Il **grado di frammentazione del DNA**: tramite varie metodiche (qPCR, bioanalyzer etc) è possibile definire l'impatto della frammentazione nel proprio campione di DNA. Frammentazioni più elevate riducono drasticamente la qualità e quantità della libreria generata.

Nella nostra esperienza, metodiche diverse hanno avuto capacità differenti di generare librerie utili per il sequenziamento, ma in generale campioni di DNA di scarsa qualità hanno prodotto librerie di scarsa qualità con tutte le metodiche utilizzate.



ANALISI DEI DATI

- ✦ L'analisi dei dati richiede pipeline bioinformatiche dedicate.
- ✦ Oltre ai parametri di **read depth** e **coverage minimo**, sarebbe importante confrontare i risultati ottenuti dall'analisi di NGS somatica con quella dell'analisi NGS germinale dello stesso paziente.
- ✦ Possono essere utilizzati diversi tipi di software, che si differenziano per tipo di output, annotazione e tipo di analisi (locale o remoto). La scelta dipende da più fattori, tra i quali *la facilità di definizione della variante e del suo grado di patogenicità, la validazione CE-IVD del software e della pipeline, la contestualizzazione del dato in merito alle normative in ambito di privacy.*

Esempi di output dei dati con software diversi

ID	class	read	repeat	type	RefSeq ID	Ref variant	AF values	Samples	GSNP ID	VFS	gene	Application
in-174-124330	0	*		L2DE	NC_000010	C396A>G	0.001121	0	rs109426	1840	BRCA2	BRCA2:1111
in-174-12188348	0	*		L2DE	NC_000010	C396A>G	0.001121	0	rs109426	1840	BRCA2	BRCA2:1111
in-174-12188344	0	*		L2DE	NC_000010	C42>A>T	0.001121	0	rs17881	4257	BRCA1	BRCA1:2082
in-174-12188374	0	*		L2DE	NC_000010	C780T>C	0.001121	0	rs19597	1000	BRCA2	BRCA2:1243
in-174-12188377	0	*		L2DE	NC_000010	C2212>G	0.001121	0	rs101783	1840	BRCA2	BRCA2:1111

Gene	chr	Position	Ref	Alt	Depth	VFS	Application
BRCA2	11	11111	C396A>G	G>A	1840	0.001121	BRCA2:1111

Gene	Class	cDNA	Change	Antisense	in 10	Effect	Frequenza Allelica	ClassVar	LabClass
BRCA1	11	1331	C33A>C>A>G	13311111	rs1833717>rs1833717>rs1833717	missense_variant	0.0004444325943	Pathogenic	None
BRCA1	7	1442-342-1			rs179952	missense_variant	99.9% (1173/1172)	Benign	None
BRCA1	7	1441-1446T			rs20252294>rs17243495	missense_variant	11.99% (20194/20202)	None	None
BRCA2	2	118-126T			rs276174676>rs155558321	splice_region_variant, missense_variant	6.72% (1469/2190)	Conflicting interpretations of pathogenicity	None
BRCA2	9	1763-636AT			rs75197163	missense_variant	1.69% (3093/1826)	Benign	None
BRCA2	9	1763-682-A			rs205673	missense_variant	99.98% (51689)	Benign	None
BRCA2	10	1162+2288T			rs276174116>rs257180361	missense_variant	11.92% (9990/1252)	Conflicting interpretations of pathogenicity	None
BRCA2	11	11364-A>G	p.Lys1133>Leu		rs191485	synonymous_variant	51.99% (556/820)	Benign	None
BRCA2	11	1161100-C	p.Val217>Val		rs226076	synonymous_variant	100.0% (2/2)	Benign	None
BRCA2	14	1742A-A>G	p.Ole414>Ser		rs1739265	synonymous_variant	99.74% (321/324)	Benign	None
BRCA2	21	1175161T-C			rs4542465	missense_variant	49.94% (3241/2703)	Benign	None
DNAH9	12	11381-1316AT			rs2729447>rs207810003	missense_variant	18.88% (3820/855)	None	None
DNAH9	6	11595-190-C>T			rs249954	missense_variant	47.89% (1301/192)	None	None
DNAH9	5	1201A>G-C	p.Ole477>Ser		rs18512410	missense_variant	92.38% (761/1763)	None	None

ESPERIENZA 1- Patologia Molecolare, FPO-IRCCs, Candiolo

- *Esaminati 5 diversi campioni di tessuto fissato (FFPE) da tumore ovarico con due metodologie diverse; i risultati sono stati successivamente comparati con i dati disponibili dell'analisi germinale effettuata presso Genetica Medica, Università di Torino (Prof.Pasini)*
- *In tre casi, uno dei metodi ha generato librerie non adeguate per il successivo sequenziamento (Metodo 2).*
- *I campioni falliti con il Metodo 2 hanno mostrato comunque scarsa qualità anche con il Metodo 1 generando dati di difficile interpretazione (elevato numero di false chiamate)*

SAMPLE	Sede	Istotipo	[DNA] Qubit	BRCA1		BRCA2		%
				HGVS	Bic	HGVS	Bic	
1	OVAIO dx e sx	Sieroso G3	23	p.Thr1677Ter (c.5030_5033delCTAA)	p.Thr1677_Thr1677LeIlefs (c.5030_5033delCTAA)			38%
2	OVAIO sx	Papillare Sieroso G3	43,8	c.3331_3334delCAAG (p.Gln1111Asnfs)	p.Gln1111_Glu1112AsnMetfs (c.3331_3334delCAAG)			47%
3	OVAIO dx e sx	Sieroso G3 regressivo	15	p.Gln1756Profs73 (c.5266_5267insC)	c.5266_5267insC			68,59%
4	OVAIO dx e sx	Sieroso Papillare G3	21			p.Tyr1894Ter (c.5682C>G)	p.Tyr1894Ter (c.5682C>G)	48,99%
5	OVAIO dx e sx	Focolai Sieroso G3	18,3			p.Leu1627Serfs8 (c.4879_4879delC)	p.Leu1627_Leu1627Serfs (c.4879_4879delC)	44,58%

SAMPLE	Sede	Istotipo	[DNA] Qubit	BRCA1		BRCA2		%
				HGVS	Bic	HGVS	Bic	
1	OVAIO dx e sx	Sieroso G3	15	NA	NA	NA	NA	NA
2	OVAIO sx	Papillare Sieroso G3	43,8	c.3331_3334delCAAG (p.Gln1111Asnfs)	p.Gln1111_Glu1112AsnMetfs (c.3331_3334delCAAG)			51%
3	OVAIO dx e sx	Sieroso G3 regressivo	15	NA	NA	NA	NA	NA
4	OVAIO dx e sx	Sieroso Papillare G3	21			p.Tyr1894Ter (c.5682C>G)	p.Tyr1894Ter (c.5682C>G)	45,71%
5	OVAIO dx e sx	Focolai Sieroso G3	18,3	NA	NA	NA	NA	NA

L'analisi con Bioanalyzer ha dimostrato che nei 3 campioni critici la bassa qualità del DNA era dovuta principalmente alla **frammentazione**

ESPERIENZA 2- Lab Oncologia Molecolare, Fondazione Edo ed Elvo Tempia

Metodo utilizzato

- Intera sequenza codificante BRCA1/2 + sequenza codificante e 5'/3' UTR del gene PALB2
- **5 campioni** + 1 controllo su chip 318
- Valutazione campioni FFPE in **qPCR** (Curva standard)
- **Server** di analisi **locale** (off-line) aggiornato periodicamente
 - *Il Laboratorio di Oncologia Molecolare ha analizzato alcuni campioni di DNA estratto da **tessuto fissato (FFPE)**, confermandone le mutazioni precedentemente individuate da altri Laboratori.*
 - *Non tutti i campioni FFPE sono risultati utilizzabili per l'analisi in NGS a causa dell'eccessivo grado di **frammentazione** del DNA estratto.*
 - *Al fine di assicurare la qualità del dato prodotto, il Laboratorio ha partecipato al controllo di qualità europeo "**BRCA Ovarian Somatic Scheme**" organizzato dall'European Molecular Quality Network (EMQN).*
 - *Sono stati pubblicati sul sito EMQN i genotipi dei campioni testati e corrispondono a quanto refertato dal nostro Laboratorio.*
 - *Siamo in attesa di ricevere l'Individual Laboratory Report in cui sarà valutata anche la modalità di refertazione del dato*