



DIPARTIMENTI DI MEDICINA SPECIALISTICA
SOC CLINICA EMATOLOGICA
CENTRO TRAPIANTI e TERAPIE CELLULARI

Udine, 03/09/2021

Direttore: Prof. Renato Fanin

Clinica Certificata ISO 9001:2008 e JACIE 6

Tel 0432/559662 - Fax 0432/559660

direzione.ematologia@asufc.sanita.fvg.it

Progetto

Titolo: Creazione di una rete di Laboratori per la Diagnostica Molecolare Avanzata e la Ricerca sulle Leucemie Acute Mieloidi, come Centro di Riferimento per il Triveneto.

Acronimo: LAMlabFVG

Durata: 2 annualità

Propraga temporale di 12 mesi fino a 03/02/2020 secondo decreto n.811 del 30/05/2018.

Partners: Istituto di Genetica Medica (UNIUD) e Istituto di Genomica Applicata (IGA)

Cod. CUP: J22F16000140003

SINTESI DELLA RICERCA

La diagnostica molecolare è in continua evoluzione e appare sempre più evidente come malattie apparentemente simili presentino differenze molecolari che si traducono in prognosi estremamente differenti. Inoltre, grazie all'avanzamento dei farmaci, specifiche alterazioni molecolari, presenti singolarmente o in associazione, rappresentano dei veri e propri bersagli farmacologici innovativi o profili indicativi della chemio-responsività della malattia stessa. Una caratterizzazione molecolare approfondita oggi giorno può pertanto permettere di applicare approcci terapeutici personalizzati, con la riduzione delle tossicità e l'aumento dell'efficacia.

Tuttavia, l'estrema sensibilità e complessità delle metodiche molecolari potrebbero esporre ad un alto rischio di variabilità nel risultato, con conseguente potenziale esposizione a diagnosi o valutazioni erranee. Per evitare questo rischio, a livello italiano, il GIMEMA (Gruppo Italiano Malattie EMatologiche dell'Adulto) ha avviato un'operazione di standardizzazione, definita come



rete LabNet, per la diagnostica molecolare di diverse patologie ematologiche, che prevede la condivisione di linee guida di laboratorio fino a campagne di scambio di campioni o materiali

biologici di riferimento (come colture cellulari o RNA certificati) per verificare la concordanza analitica e ridurre la variabilità tra laboratori. Al momento, solo pochi laboratori italiani sono divenuti Centro di Riferimento LabNet per le Leucemie Acute Mieloidi (LabNetAML) verso cui convogliare tutte le analisi provenienti da centri sprovvisti di laboratori allineati. Tali centri offrono la garanzia di una adeguata ed uniforme diagnostica molecolare sia ad uso clinico che per i pazienti arruolati a protocolli sperimentali.

Ad oggi, la Clinica Ematologica di Udine è tra i primi centri italiani per numero di trapianti allogenici all'anno e per casi arruolati a protocolli clinici GIMEMA; pertanto per i suoi pazienti è fondamentale poter disporre di una diagnostica affidabile e all'avanguardia in loco, poiché, limitando le prestazioni fuori del territorio regionale, non solo si riduce l'impatto sui costi, ma soprattutto si azzerano i disagi in termini di tempi di attesa e di disagi di trasporto. Inoltre, la realtà locale è già caratterizzata per la presenza di laboratori e professionisti di alto livello.

Infine, grazie al continuo sviluppo delle biotecnologie, la possibilità di sequenziare moltissime regioni geniche fino a interi genomi sta diventando un approccio sempre più accessibile per la diagnostica, pur presentando ancora numerose variabili in termini sia di metodica che di interpretazione del risultato. In regione è presente un centro di eccellenza di queste biotecnologie, l'Istituto di Genomica Applicata (IGA), che sta già applicando tali approcci a molti ambiti e che può permettere di implementare ed ottimizzare tali tecnologie innovative a pochi passi dalla realtà dell'Azienda Sanitaria Universitaria Friuli Centrale.

Il progetto ha previsto pertanto di sviluppare i laboratori già esistenti e dedicati alla diagnostica ematologica molecolare (il laboratorio della Clinica Ematologica e il laboratorio dell'Istituto di Genetica), coinvolgendo una realtà di eccellenza regionale ed italiana quale l'Istituto di Genomica Applicata, senza creazione di strutture aggiuntive.

Risultati conseguiti

Il progetto ha portato al conseguimento dell'Allineamento per la rete GIMEMA LabNetAML per le mutazioni molecolari canoniche delle Leucemie Acute Mieloidi (LAM), grazie alle competenze del laboratorio della Clinica Ematologica e del laboratorio dell'Istituto di Genetica Medica, sotto il coordinamento della dott.ssa Eleonora Toffoletti della Clinica Ematologica secondo le indicazioni del board scientifico dei professori R. Fanin, G. Damante, M. Morgante. La stretta rete tra i laboratori ha permesso di identificare un percorso ottimale del campione che ad oggi viene centralizzato presso il laboratorio della Clinica Ematologica e manipolato secondo le linee guida GIMEMA. Il bancaggio delle cellule blastiche dell'esordio avviene pertanto senza sprechi di materiale, con aumento della sensibilità analitica e riduzione della quantità di prelievi di sangue midollare, ulteriore beneficio per il paziente sottoposto a indagine.

Al termine del progetto il trasferimento di competenze è stato pieno e ad oggi ASUFC e la Clinica Ematologica di Udine dispongono per il paziente oncoematologico di tutte le analisi del pannello GIMEMA e precisamente:

-del pannello "base": analisi qualitative per PML/RARA (bcr1-2-3), BCR/ABL p190 e p210, RUNX1/RUNX1T1, CBFb/MYH11, FLT3 ITD, FLT3 D835 e D836, mutazione di NPM1;

-del pannello diagnostico "avanzato": analisi qualitative delle mutazioni di cKIT, DNMT3A, IDH1/2, CEBPA, NRAS/KRAS, MLLPTD, RUNX1, TET2, TP53, ASXL1, EZH2. In PCR quantitativa: PML/RARA, RUNX1/RUNX1T1, CBFb/MYH11, BCR/ABL p210 e p190, WT1, principali mutazioni di NPM1.

Inoltre, nel processo di miglioramento della qualità voluto dal progetto, il laboratorio della Cl. Ematologica e dell' Ist. di Genetica fin dall'inizio hanno ampliato il pannello di controlli esterni di qualità a cui sottostare, mentre la rete LabNet GIMEMA li ha richiesti come obbligatori solo recentemente.

Nell'ambito dello sviluppo di nuovi approcci diagnostici, il progetto ha portato a mettere a punto l'analisi di un innovativo pannello genico per le LAM, in cui vengono studiate simultaneamente le mutazioni a carico di 30 geni fondamentali per la patogenesi, la prognosi e la strategia terapeutica delle LAM, sfruttando la tecnologia del Next Generation Sequencing (NGS). Il pannello consente, in un'unica seduta, di studiare fino a 16 campioni ad una sensibilità analitica di un logaritmo maggiore rispetto al sequenziamento sanger tradizionale, cioè spingendosi fino al 5%. Oltre all'aumento della sensibilità e dell'informatività, tale approccio consente di ridurre i tempi analitici, garantendo la copertura di tutto il pannello avanzato di GIMEMA in un'unico test. Nel percorso di ottimizzazione previsto dal progetto, sono state analizzate 80 corse di campioni di leucemici retrospettivi, eseguiti in parte presso l'IGA e in parte presso ASUFC ed effettuando validazioni indipendenti delle mutazioni identificate con altri approcci tradizionali, ottenendo concordanza del 100%. Il pannello, marchiato anche CE IVD ed idoneo alla diagnostica, è stato infine ottimizzato sulle strutture ospedaliere ASUFC/Clinica Ematologica, e la validazione è stata confermata anche tramite controlli esterni di qualità associati a un'analisi bioinformatica dedicata che ha portato al conseguimento del Certificato di qualità "Analytical Performance Report" di Sophia Genetics. Sempre nell'ambito dello sviluppo di una caratterizzazione molecolare approfondita con tecnologie innovative, il progetto ha portato alla valutazione dello studio del genoma delle LAM, con l'approccio Whole Genome Sequencing, e successivamente con l'approccio Clinical Exome Sequencing, poiché caratterizzato da una maggior profondità di lettura. La presenza di numerosi subcloni leucemici all'esordio limita l'applicabilità di tale approccio, in quanto, seppur teoricamente di grande completezza, risulta in un'analisi a bassa profondità di lettura che necessiterebbe di ulteriori sforzi in termini economici e analitici per fornire una ricaduta clinica.

Il progetto ha permesso di sviluppare competenze di altissima specializzazione nel campo delle biotecnologie e dell'oncoematologia molecolare potenziando laboratori e competenze del territorio regionale, garantendo una caratterizzazione molecolare della LAM all'avanguardia in loco, disponibile a scopo diagnostico per tutti i pazienti ematologici presenti in regione.

Ad oggi, il Laboratorio risulta l'unico in regione ad aver ricevuto il riconoscimento nazionale GIMEMA - Rete LabNet per le Leucemie Acute Mieloidi. Tale risultato è stato perseguito nell'ambito della certificazione all'eccellenza del nostro Presidio Ospedaliero S. Maria della Misericordia e all'interno dei criteri di economicità ed efficienza, senza duplicazione di strutture

o di team di lavoro. La ricaduta clinica è avvenuta in maniera rapida ed efficiente, ed è stata effettuata fin dalle prime fasi del progetto. Infatti, grazie all'avvio della sinergia tra laboratori, si è perseguita la centralizzazione del campione presso il Laboratorio della Clinica Ematologica con riduzione di sprechi e aumento della standardizzazione preanalitica. Successivamente, è stata implementata la qualità e la molteplicità delle analisi molecolari ad approccio tradizionale, ottenendo il riconoscimento della rete nazionale GIMEMA LabNet AML. Infine, è stata avviata in diagnostica routinaria l'analisi approfondita in NGS del pannello genico per le LAM, con metodica certificata e riconosciuta, ottenuta grazie l'acquisizione di competenze specifiche in tale campo innovativo.

Firma e timbro del Principal Investigator

prof. Renato Fanin