Titolare della borsa di studio:

Signorino Elisabetta

Titolo del progetto di ricerca:

"Implementazione di metodiche di diagnostica molecolare innovative nell'ambito di una azienda ospedaliera "

Il progetto di ricerca da me svolto, in collaborazione con la S.C. Laboratorio Analisi (direttore Dr. Domenico Cosseddu) e con la S.C.D.U. Ematologia (direttore Prof. ssa Daniela Cilloni) consisteva nell'implementazione di nuove tecnologie di biologia molecolare volte a velocizzare la diagnosi specialistica di pazienti affetti da neoplasie ematologiche, sia croniche che soprattutto acute.

Le leucemie acute mieloidi (LAM) sono un gruppo eterogeneo di malattie neoplastiche che originano da un'alterata proliferazione e differenziazione della cellula staminale emopoietica e delle linee cellulari derivanti. Le cellule immature derivanti, i blasti leucemici, si accumulano nel midollo determinando alterazione o soppressione del processo di differenziazione e proliferazione emopoietica, con conseguente diminuita produzione di eritrociti, granulociti e piastrine. Nel prosieguo della malattia, alla pancitopenia periferica (anemia, neutropenia o piastrinopenia) segue l'invasione del sangue periferico da parte dei blasti, che possono infiltrare organi e apparati. Possono essere definite leucemie "de novo" quando insorgono come prima malattia, o "secondarie" quando si presentano in soggetti con pregressa esposizione a sostanze leucemogene (pesticidi, farmaci, chemioterapia, radiazioni). Le LAM colpiscono ogni anno in Italia circa 3000 persone, e rappresentano così un problema crescente per la popolazione generale, da contrastare con strategie innovative in ambito sanitario. Grazie agli ultimi studi di biologia molecolare è stato possibile individuare le basi genetiche del diverso comportamento clinico delle varie tipologie di leucemie. Lo studio delle anomalie molecolari presenti in ciascun paziente è dunque di crescente importanza e consente di definire in modo molto più preciso (di quanto non si possa fare basandosi solo su criteri clinici) la prognosi individuale, e soprattutto consente di scegliere il miglior trattamento possibile, in un'ottica di medicina personalizzata.

In circa il 50% dei casi di LAM, la mappatura cromosomica relativa alle cellule leucemiche mostra delle alterazioni molto peculiari: i cromosomi si spezzano ricombinandosi tra loro in maniera aberrante, dando quindi quadri caratteristici osservabili al microscopio ottico e a fluorescenza mediante le diverse tecniche di citogenetica. Alla base di queste alterazioni cromosomiche oggi

sappiamo esservi coinvolti numerosi geni, presenti in un numero relativamente alto di cromosomi, e precisi meccanismi molecolari. Alcuni geni, infatti, si "rompono" in punti specifici (detti breakpoints) e si ricombinano con altri geni, spesso ubicati in altri cromosomi, per formare nuovi tratti di DNA in grado di trascrivere RNA messaggeri anomali codificanti proteine "chimeriche" che, interferendo con le funzioni vitali della cellula, svolgono un ruolo base per la sua trasformazione da normale a leucemica. Questo processo è denominato traslocazione genica, e gli RNA messaggeri ibridi da essa prodotti sono usati in diagnostica molecolare come marcatori diagnostici identificabili con le tecniche di RT-PCR. Non esistono solo riarrangiamenti tra geni ma anche delezioni, mutazioni, duplicazioni e inserzioni che possono essere evidenziati con tecniche più avanzate come elettroforesi capillare (metodo Sanger) e NGS. È quindi evidente che la leucemia mieloide acuta non rappresenta una, ma molteplici malattie molecolari e nel corso degli ultimi anni vi è stato un progressivo incremento nella conoscenza della genetica molecolare della leucemia acuta mieloide (LAM).

Da dati di letteratura, circa il 60% delle LAM sono caratterizzate dalla presenza di specifiche alterazioni cromosomiche e molecolari che possono essere identificate mediante l'applicazione di techiche diagnostiche quali la citogenetica, l'ibridazione fluorescente in situ (FISH), la PCR e l'elettroforesi capillare. Il restante 40% dei pazienti con LAM non presenta alterazioni evidenti con le tecniche di routine; negli ultimi anni si sono rese disponibili piattaforme di sequenziamento di nuova generazione che hanno consentito di identificare in modo accurato, ampio e sensibile una varietà di alterazioni molecolari presenti in campioni ematici e midollari di pazienti oncoematologici e non solo. Il Next Generation Sequencing (NGS) è un metodo di sequenziamento del DNA che ha la capacità di processare milioni di frammenti (reads) in parallelo a un costo estremamente ridotto ed attualmente è il metodo di analisi del DNA col più basso tasso di errore mutazionale per singola base. L'NGS utilizza un procedimento molto simile a quello del Sequenziamento Sanger, tuttavia la principale differenza risiede nella quantità di campione che è possibile sequenziare. Mentre il metodo Sanger permette di sequenziare un singolo frammento di DNA di modeste dimensioni (500 – 1000 paia di basi), attraverso l'utilizzo della tecnologia NGS si è in grado di sequenziare più frammenti di DNA simultaneamente. I sistemi di sequenziamento adoperati nella tecnologia di nuova generazione sono molteplici, ognuno di questi è sviluppato da aziende biomediche differenti. La sensibilità del processo è pari all' 1-5% rispetto al 15-20% del metodo Sanger. Questo risulterà di fondamentale importanza soprattutto in futuro, nello studio della malattia minima residua, per cui al momento non ci sono ancora linee guida. L'NGS ha una

specificità elevata in quanto consente di analizzare più esoni, o anche tutti, dello stesso gene simultaneamente a differenza del Sanger che può essere utilizzato su singolo esone.

L'impiego di queste tecniche permette, in un solo esperimento, di effettuare studi di vario genere, tra i quali caratterizzazione simultanea di genomi, individuazione di riarrangiamenti cromosomici bilanciati e sbilanciati, individuazione di delezioni e copy number variations (CNV).

L'obiettivo dello studio è stato pertanto quello di proporre l'utilizzo di metodiche rapide, precise ed accurate che consentano la ricerca simultanea di mutazioni specifiche (singole, inserzioni e delezioni) frequenti e/o rare in geni coinvolti nella patogenesi delle neoplasie della linea mieloide, in particolare in pazienti affetti da Leucemia Acuta Mieloide (LAM), Leucemia Mieloide Cronica (LMC), Mielodisplasie (MDS) e neoplasie mieloproliferative (MPN).

Una corretta classificazione di queste neoplasie ematologiche, infatti, oggi non può prescindere dalla valutazione dei parametri citogenetici e molecolari determinanti la prognosi e l'outcome dei pazienti affetti, nonché l'indicazione ad un eventuale trapianto di midollo osseo. Inoltre, questo inquadramento è altresì fondamentale in virtù del fatto che oggi abbiamo a disposizione un maggior numero di farmaci inibitori con i quali possiamo impostare una targeted therapy personalizzata nel singolo caso. Lo scopo è stato anche quello di sostituirlo almeno in parte al sequenziamento che, pur essendo una metodica estremamente accurata ma meno sensibile, richiede tempi di analisi e di interpretazione decisamente maggiori comportando oltretutto costi più elevati.

Nello specifico è stata valutata e implementata, mediante manifestazione d'interesse dalla Ditta EliTech, l'acquisizione di 4 kit di biologia molecolare volti alla diagnosi di:

- Presenza della traslocazione BCR-ABL1 nelle isoforme p190, p195, p200, p210 (tipica delle LMC) e p230 (tipica delle Leucemie Neutrofiliche Croniche) all'esordio;
- Leucemia acuta promielocitica (LAP, un sottotipo di LAM che porta uno specifico riarrangiamento tra i cromosomi 15 e 17, per cui esiste una terapia specifica che spesso risulta essere salvavita) all'esordio;
- LMC con traslocazione tipica BCR-ABL1 p210 in follow-up per la determinazione della malattia minima residua;
- LMC e Leucemia Linfoblastica Acuta (LLA) con traslocazione BCR-ABL1 p190 in follow-up.

I primi due kit funzionano su tecnologia InGenius di EliTech, mentre le ultime due richiedono l'utilizzo di termociclatore Real-Time CFX96, strumentazioni già a disposizione del Laboratorio Analisi. E' stato effettuato il training specifico con l'azienda e i kit sono stati testati con successo. Tuttavia gli esami diagnostici non sono mai entrati in routine per i recenti tagli di budget.

In seconda battuta ci è stato richiesto dalla S.C.D.U. Ematologia l'acquisizione di una tecnologia NGS volta alla diagnostica specialistica delle neoplasie oncoematologiche. Al momento le analisi NGS vengono spedite all'A.O.U. San Luigi Gonzaga, con tempi di refertazione che si attestano su una media di circa 60 giorni, con punte di anche 90 giorni. Tempi che per la diagnostica oncoematologica sono troppo dilatati per consentire un intervento mirato ed efficace, visto la notevole disponibilità ad oggi di farmaci targeted per diverse lesioni genetiche che sono alla base di tali patologie. Nel 2024 sono stati richiesti circa 115 NGS, e l'Ematologia prevedeva per gli anni a venire un incremento fino a 150 all'anno.

Pertanto è stato redatto un capitolato per l'acquisizione di una tecnologia NGS in modo da poter accorciare i tempi diagnostici.

Tale capitolato è stato compilato da me dopo aver avuto diversi colloqui con i principali fornitori di questa tecnologia in Italia al momento, ovvero Illumina e ThermoFisher.

Illumina ci ha proposto l'acquisizione dei medesimi strumenti e kit attualmente in uso sia al San Luigi che alle Molinette. Il kit di SophIA Genetics, il SophIA Myeloid Solution, partendo da DNA genomico totale, permette di preparare delle librerie genomiche per singolo paziente ed in seguito selezionare geni interi o porzioni di essi mediante ibridazione con sonde specifiche (metodo a cattura) per il sequenziamento NGS su piattaforma Illumina. I dati di sequenziamento vengono infine analizzati sulla piattaforma di SophIA Genetics. Il kit è validato e certificato IVD, così come lo strumento. Io personalmente ho diretta esperienza di utilizzo di questo kit e di questo strumento, che ho perfezionato negli ultimi 4 anni. D'altra parte, però, il procedimento di preparazione delle librerie è molto laborioso (manualmente richiede circa tre giorni, rendendo neccessaria l'acquisizione di un preparatore a parte per l'implementazione in un Laboratorio Analisi) e consente l'analisi solo a livello del DNA, tralasciando eventuali traslocazioni, visibili da RNA, molto frequenti in patologie oncoematologiche. Come detto in precedenza poi le librerie vengono analizzate su strumento Illumina che, utilizzando un sequencing-by-synthesis con fluorescenza, richiede circa 60 ore. I tempi totali dell'analisi pertanto sono di circa 6 giorni per 16 pazienti.

ThermoFisher ci ha invece proposto l'acquisizione del loro strumento Genexus con kit Ion Torrent™ Oncomine™ Myeloid Assay GX v2. Lo strumento Genexus è completamente automatizzato ed effettua sia la preparazione delle librerie sia l'analisi NGS in sole 24 ore, in quanto utilizza una tecnologia diversa basata su variazioni di pH, per un numero di pazienti che può variare da 8 a 32, rendendo l'analisi più flessibile in termini di tempistiche e di richieste (non si deve aspettare di avere 16 pazienti alla volta, cosa che invece accade con l'altra tecnologia). D'altro canto, sebbene lo strumento sia certificato IVDR, il kit non ha certificazione, in quanto viene costantemente aggiornato per includere le ultime mutazioni scoperte. Pertanto i geni analizzati sono molti di più rispetto all'altro kit. Inoltre il kit Ion Torrent™ Oncomine™ Myeloid Assay GX v2 è disegnato in modo da consentire l'analisi non solo del DNA, ma anche delle traslocazioni da RNA, nonché dell'analisi di espressione di 5 geni overespressi nelle patologie oncoematologiche, rendendolo pertanto più completo sotto questo punto di vista.

Il capitolato è stato redatto in modo da non escludere nessuna delle due offerte, permettendo quindi di valutare anche l'offerta economica. Inoltre nel capitolato è stata inclusa l'acquisizione di una strumentazione per l'estrazione degli acidi nucleici, necessario punto di partenza per effettuare analisi su DNA ed RNA, nonché tutto il materiale di consumo e strumentazione accessoria al fine di portare a completamento l'analisi nei tempi più rapidi possibili, come richiesto dall'Ematologia.

Purtroppo al momento tale acquisizione è stata bloccata sia per il parere contrario della Regione dovuto in gran parte alla decisione, poi ribadita a tutte le Aziende, di un risparmio sulla spesa per dispositivi portando così all'impossibilità dell'acquisizione di nuove tecnologie. Mi preme comunque sottolineare come i due istituti che attualmente si fanno carico di questo tipo di analisi, ovvero il San Luigi e le Molinette, non riescano a stare al passo con le numerosissime richieste di questo tipo di analisi, sia per la scarsità di personale specializzato ma soprattutto perché in questo campo la medicina di precisione è fondamentale per provare ad eradicare la patologia ed arrivare ad un trapianto di cellule staminali che possa avere successo, quindi le richieste sono costantemente in aumento esponenziale. La necessità di un nuovo Hub che disponga di tale tecnologia e personale specializzato pertanto si sta facendo ogni giorno più pressante, se non altro per poter consentire ai pazienti oncoematologici l'accesso a cure specialistiche personalizzate in tempi rapidi, in quanto tali patologie possono evolvere in maniera rapida e incontrollata.

Torino, 12/09/2025

In fede,

La Borsista

Signorino Elisabetta

Elisabetta Signorino

Il Responsabile Scientifico del Progetto di Ricerca

Dr. Cosseddu Domenico

S.C. LABORATORIO ANALISI
Dr. D. COSSEDDU
DIR. MEDICO
N° 44892