



Ministero della Salute

Consiglio Superiore di Sanità

Sessione LII (2019-2022)

Presidente: Prof. Franco Locatelli

Sezione I

*Presidente: Prof. Bruno Dallapiccola
Segretario tecnico: Dr. Stefano Moriconi*

“Trasferimento delle Tecniche Omiche nella pratica clinica”



Coordinatore: Prof. Bruno Dallapiccola

14 luglio 2020

INDICE

1. SOMMARIO ESECUTIVO.....	3
RACCOMANDAZIONI.....	5
2. ANALISI GENOMICHE NELLA PRATICA CLINICA	
2.1 Analisi tradizionali.....	7
2.2 Analisi “omiche”.....	8
2.3 Malattie rare.....	12
2.3.1 <i>Impatto economico del WES (Whole Exome Sequencing)</i>	14
2.3.2 <i>Esperienze esemplificative sull’uso del WES nelle malattie rare in Italia</i>	15
2.4. Diagnosi prenatale.....	17
2.4.1 <i>Esoma prenatale</i>	17
2.4.2 <i>Screening prenatale non invasivo sul sangue fetale</i>	20
2.5. Malattie oncologiche.....	22
2.5.1 <i>Terapie bersaglio contro mutazioni somatiche</i>	22
2.5.2 <i>Mutazioni germinali e suscettibilità ereditaria ai tumori</i>	23
2.5.3 <i>Sviluppo di tecnologie affidabili per l’analisi genomica nel DNA circolante (biopsia liquida)</i>	24
2.5.4 <i>Microbiota e tumori</i>	25
2.5.5 <i>Traslazione della medicina di precisione in oncologia</i>	25
2.5.6 <i>Database di informazioni cliniche e genomiche</i>	26
2.6. Malattie complesse	
2.6.1. <i>Malattie cardiovascolari</i>	26
2.6.2. <i>Malattie neurodegenerative</i>	28
2.6.3. <i>Diabete</i>	29
2.7. Farmacogenetica.....	30
2.8. Metabolomica.....	31
2.8.1 <i>Malattie rare del metabolismo</i>	32
2.9. Proteomica.....	33
2.10 Integrazione dei dati omici per la fenotipizzazione profonda nella medicina di precisione.....	35
2.11 Microbioma e microbiomica.....	35
2.12 Integrazione dei dati omici e metaomici per la fenotipizzazione profonda.....	36
2.13 Malattie infettive.....	37
Introduzione.....	37
2.13.1. <i>Il processo di “discovery” di biomarcatori nel contesto dell’interazione “ospite-parassita”</i> ..	38
2.13.2. <i>Appropriatezza del campionamento per la produzione di dati omici rappresentativi del processo infettivo</i>	39
2.13.3 <i>Conclusioni</i>	44
3. STATO DELL’ARTE A LIVELLO DELL’UNIONE EUROPEA E INTERNAZIONALE.	45
3.1. L’iniziativa Europea “1+M genomes”	46
<i>Glossario/Acronimi</i>	48
Gruppo di lavoro “TTO” Consiglio Superiore di Sanità.....	51

1. SOMMARIO ESECUTIVO

Negli ultimi venti anni la ricerca genetica ha vissuto una vera e propria rivoluzione tecnologica grazie allo sviluppo di metodi di sequenziamento massivo del DNA, che hanno abbattuto di oltre 100mila volte i costi e i tempi delle analisi genomiche e ne hanno aumentato esponenzialmente la processività, permettendone l'utilizzo su larga scala. La diffusione e il miglioramento delle tecnologie di scansione del genoma umano alla risoluzione di una singola base hanno permesso di sviluppare modelli applicativi che garantiscono lo studio contemporaneo di diversi livelli del flusso dell'informazione biologica, mediante il sequenziamento della porzione codificante del genoma (esoma; *Whole Exome Sequencing*, WES), il sequenziamento dell'intero genoma (*Whole Genome Sequencing*, WGS), la valutazione qualitativa e quantitativa delle popolazioni di RNA messaggero e non codificante che caratterizzano le cellule e i tessuti (trascrittoma), la caratterizzazione delle modifiche epigenetiche del genoma che partecipano al controllo dell'espressione genica (epigenoma), in particolare al suo profilo di metilazione (metiloma). Altre importanti innovazioni tecnologiche in ambito biomedico permettono di caratterizzare sistematicamente la composizione dei metaboliti e delle proteine (comprese le modificazioni reversibili e non delle proteine), applicata a sistemi semplici e complessi (metaboloma e proteoma). L'utilizzo di queste tecnologie ha richiesto lo sviluppo di nuovi approcci analitici bioinformatici, in grado di gestire e processare un'enorme quantità di dati generati, nonché di strumenti di archiviazione dei dati generati. L'applicazione trasversale di queste tecnologie, che spazia dall'ambito biomedico a quello biotecnologico, interessa, ad ampio spettro, le scienze teoriche ed applicate e richiede l'integrazione di conoscenze e competenze multidisciplinari (ad es. medicina, fisica, ingegneria, informatica, robotica, scienze umane, etica). L'interdisciplinarietà di questi approcci rende necessario lo sviluppo di un nuovo paradigma, basato sull'interazione di reti di saperi, di competenze e di infrastrutture, al fine di garantire elevati livelli di applicazione e interpretazione dei dati.

L'insieme di queste tecnologie cosiddette “-omiche” consente di caratterizzare ad altissima risoluzione i sistemi biologici, e il loro uso sistematico determinerà la crescita esponenziale della “medicina di precisione”, attraverso il rapido raggiungimento della diagnosi, la comprensione dei meccanismi delle malattie e l'identificazione di approcci terapeutici basati sulla stratificazione dei pazienti, in grado di garantire una più efficace presa in carico.

Il raggiungimento della diagnosi rappresenta ancora oggi una rilevante criticità per il Sistema Sanitario Nazionale (SSN). Negli ultimi anni, l'applicazione diagnostica dell'analisi esomica, diventata indagine di prima linea in molte condizioni cliniche, in particolare nelle malattie rare e orfane di diagnosi in età pediatrica, ha permesso di raggiungere importanti risultati e di ottenere un inquadramento definitivo in circa il 50% dei pazienti. Questi dati esemplificano la necessità di considerare l'applicazione integrata delle tecnologie -omiche come unica risposta al bisogno di diagnosi nei pazienti in cui gli approcci in precedenza utilizzati non hanno avuto successo. Oltre al raggiungimento della diagnosi, la comprensione delle basi biologiche delle malattie è preliminare allo sviluppo di terapie personalizzate e di precisione. Questo obiettivo è particolarmente importante nelle condizioni in cui le diverse variazioni del genoma, pur sottendendo alla stessa condizione clinica, modificano in maniera specifica i normali processi cellulari.

La genomica fornisce un supporto basilare anche alle patologie acquisite, multifattoriali e oncologiche. Ad esempio, la possibilità di caratterizzare e stratificare a livello nosologico le malattie onco-ematologiche permette di sviluppare terapie mirate, basate su specifici bersagli molecolari. Recentemente sono state implementate nuove strategie, basate su approcci -omici complementari, in grado di analizzare le interazioni tra i processi cellulari e l'esosoma, e definirne i rapporti con le malattie e i fenotipi complessi, come avviene nell'analisi del microbioma.

Nel 2016 la Sezione I del CSS ha elaborato un'indagine preliminare *“Impatto socio-economico sul sistema sanitario delle tecniche di sequenziamento di seconda generazione (NGS) nell'inquadramento dei pazienti senza diagnosi”* finalizzata ad porre in evidenza, alla luce delle più recenti evidenze scientifiche ed innovazioni tecnologiche, l'indubbio vantaggio dell'uso delle tecniche NGS, in particolare l'analisi WES (*Whole Exome Sequencing - sequenziamento dell'esoma*) sollecitandone l'implementazione sul piano nazionale e la loro inclusione nei LEA, sia in relazione al loro elevato successo nella risoluzione dei pazienti “senza diagnosi” opportunamente selezionati, sia in relazione alla significativa riduzione dei costi a carico del SSN, evidenziata dall'analisi del rapporto tra gli ingenti costi delle ospedalizzazioni e delle indagini strumentali e di laboratorio precedenti la diagnosi, rispetto a quelli delle tecniche NGS¹.

Nel 2018 la Conferenza Permanente per i Rapporti tra lo Stato le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano (Intesa 26 ottobre 2017 ai sensi dell'articolo 8, comma 6, della legge 5 giugno 2003, n. 131, tra il Governo, le regioni e le Province autonome di Trento e di Bolzano) ha approvato il *«Piano per l'innovazione del sistema sanitario basata sulle scienze -omiche»*².

Muovendo da queste considerazioni, il Gruppo di Lavoro (GdL) del CSS ha ritenuto di **proporre una serie di Raccomandazioni finalizzate ad offrire soluzioni qualitativamente innovative adottabili dal nostro sistema sanitario**, il cui impatto economico e di sostenibilità sarebbe comunque positivo, consentendo di ridurre i costi attuali diretti ed indiretti.

Il Gruppo di Lavoro, al fine di valutare la possibile **inclusione del sequenziamento dell'esoma nei LEA**, sottolinea che al momento sono note le basi biologiche di circa 6.000 malattie mendeliane, a fronte delle oltre 8.000 già identificate. Considerato inoltre che circa l'8% di esse sono eterogenee, ovvero correlate alla mutazione di geni diversi, e che il progresso scientifico identifica continuamente nuovi geni-malattia, non è possibile stilare un elenco dettagliato di condizioni alle quali applicare il sequenziamento dell'esoma.

Ritiene tuttavia utile indicare quali principali ambiti applicativi:

¹ CSS Sezione I *“Impatto socio-economico sul sistema sanitario delle tecniche di sequenziamento di seconda generazione (NGS) nell'inquadramento dei pazienti senza diagnosi”* (2016)

² *«Piano per l'innovazione del sistema sanitario basata sulle scienze omiche»* (Rep. Atti n. 176/CSR). (18A00323) (G.U. Serie Generale, n. 13 del 17 gennaio 2018).

1. Le malattie genetiche o di presunta natura genetica che ancora sfuggono ad un preciso inquadramento da parte dello specialista, che perciò per definizione sono rare, e che possono essere risolte da queste indagini in oltre il 50% dei casi;
2. Le malattie oncologiche, in quanto la stratificazione dei pazienti, in base al genotipo, è preliminare all'implementazione di terapie di precisione;
3. Le malattie infettive, in particolare l'analisi del microbioma, le cui modificazioni, in termini di disbiosi, correlano con numerose patologie complesse.

Per queste considerazioni e **al fine di garantirne l'appropriatezza, la prescrizione delle analisi genomiche dovrà essere unicamente di competenza dello specialista dell'area di pertinenza della malattia e/o al genetista clinico.**

Il GdL evidenzia altresì che il continuo abbattimento dei costi di queste analisi si traduce in un **significativo vantaggio anche in termini economici**, rispetto all'impegno che correntemente sostiene il SSN lungo l'iter diagnostico che spesso non è conclusivo.

Nella prospettiva dei pazienti e dei loro familiari, **la genomica offre la possibilità di ottenere diagnosi più rapide, terapie più appropriate e consulenze genetiche mirate.**

Nei prossimi anni è ipotizzabile che altre scienze -omiche, in particolare la proteomica e la metabolomica, completeranno il loro trasferimento dai laboratori di ricerca nella pratica clinica. È altresì prevedibile che **l'integrazione delle tecnologie -omiche nella clinica fungerà da volano per lo sviluppo della medicina dei sistemi e questa convergenza di saperi e di dati consentirà di decrittare in maniera più accurata la complessità delle malattie e sviluppare programmi di presa in carico sempre più personalizzati.**

Nelle Raccomandazioni sono riportati i criteri relativi ad alcuni aspetti fondamentali di impiego delle indagini del genoma/esoma. Tra questi, in particolare, i requisiti dei centri clinici e dei laboratori che effettuano le analisi genomiche, prefigurando anche la non rimborsabilità in assenza dei requisiti di appropriatezza prescrittiva, ovvero dell'assenza della certificazione e della partecipazione regolare a controlli di qualità nazionali ed internazionali (EMQN).

RACCOMANDAZIONI

R1. Prevedere l'inserimento nei Livelli Essenziali di Assistenza (LEA) dell'analisi di sequenziamento dell'Esoma come indagine di primo accesso o come approfondimento diagnostico, da garantire secondo condizioni di erogabilità da definire in applicazione del punto R2, al fine di consentire il rispetto dei criteri di appropriatezza in relazione allo specifico quesito clinico.

R2. Definire le condizioni di erogabilità delle prestazioni di cui al punto R1, per evitare l'esecuzione di analisi inutili o addirittura dannose. Autorizzare la prescrizione di queste analisi solo agli specialisti di genetica medica e agli specialisti della malattia per la quale viene prescritto il test.

R3. Vincolare l'esecuzione delle indagini di cui al punto R1, così come previsto per tutte le prestazioni di Genetica applicate alle patologie costituzionali, alla consulenza genetica pre- e post-test, che costituisce parte integrante del percorso diagnostico. Prevedere un adeguato supporto psicologico nel caso di diagnosi che comportino un forte impatto emotivo.

R4. Garantire che le analisi genomiche siano eseguite esclusivamente presso strutture specializzate con comprovata esperienza, dotate di infrastrutture e competenze, comprese quelle bioinformatiche, indispensabili ad analizzare ed interpretare i dati di sequenziamento. I criteri di accreditamento di tali strutture devono includere la verifica dell'adeguata certificazione (ISO 15189 o simili; *Laboratory accreditation and certification*; <http://www.eurogentest.org/>) e la partecipazione regolare a controlli di qualità nazionali ed internazionali (EMQN);

R5. Refertare i risultati delle analisi mediamente entro 15 giorni (in regime d'urgenza) e entro 3 mesi (pratica clinica ordinaria) dalla data di acquisizione del campione biologico. Assicurare la rivalutazione periodica dei risultati dell'analisi, in base ad eventuali nuove conoscenze e all'evoluzione clinica della malattia.

R6. Introdurre nei LEA gli esami -omici dedicati allo studio delle comunità microbiche complesse basati sull'analisi metagenomica del microbiota intestinale, eventualmente allargata ad altri distretti (ad es. analisi del microbioma delle vie respiratorie) da garantire secondo condizioni di erogabilità da definire in applicazione delle R2 e R3, al fine di consentire il rispetto dei criteri di appropriatezza in relazione allo specifico quesito clinico.

R7. Sviluppare un modello *hub and spoke*, con i centri clinici capillarmente distribuiti sul territorio, dotati di personale medico formato per la richiesta e la gestione delle analisi genomiche (almeno uno specialista in genetica medica e altri specialisti di branca), per garantire che le analisi genomiche vengano effettuate presso un ristretto numero di centri (*hub*) con comprovata esperienza, selezionati in base a criteri oggettivi che tengano conto del bacino di utenza. In accordo con questo modello dovrà essere strutturata una rete di centri clinici e di laboratori di genomica interoperanti (piattaforme tecnologiche), per evitare la ripetizione delle indagini e la dispersione delle risorse, consentire la condivisione dei dati e l'analisi integrata dei dati clinici e -omici e la creazione di un database nazionale.

R8. Prevedere che i centri clinici afferiscano ad una rete sovraregionale/nazionale e, quando richiesto per le malattie molto rare, anche sopranazionale, per facilitare lo scambio di conoscenze ed esperienze nell'ambito di sessioni di telemedicina/teleconsulto.

R9. Prevedere che i laboratori di genomica della rete operino in stretta sinergia con i centri di ricerca, in grado di valutare funzionalmente i dati genomici ed ottimizzarne la traslazione nella clinica. Gli IRCCS potrebbero operare come centri catalizzatori del coordinamento nazionale permanente.

R10. Promuovere un Piano Nazionale per la medicina di precisione (PNMP), individuando come centri *hub* quelli che già hanno acquisito specifiche competenze nel settore, documentate dalla produzione scientifica e dalle attività cliniche pertinenti, in linea con il *Piano per l'innovazione del sistema sanitario basata sulle scienze -omiche del Ministero della salute (2018)*.

2. ANALISI GENOMICHE NELLA PRATICA CLINICA

2.1. ANALISI TRADIZIONALI

L'analisi del cariotipo ha rappresentato, alla fine degli anni '50, il primo esempio di analisi genomica, sia pure a bassissima risoluzione, trasferita nella pratica clinica. Le tecniche citogenetiche standard, ad una risoluzione metafasica media (circa 320 bande per corredo aploide), consentono di identificare sbilanciamenti cromosomici di dimensioni uguali o superiori alle 10 megabasi (1 Mb = 10 milioni di basi), mentre le tecniche molecolari attuali permettono o di raggiungere una risoluzione a livello di singola base (ISCN, 2016³).

Una parte del divario esistente tra l'analisi citogenetica convenzionale e il singolo gene è stato colmato dalle tecniche di citogenetica molecolare. L'impiego di molecole fluorescenti ha permesso di standardizzare l'ibridizzazione in situ fluorescente (FISH), basata sul legame diretto (combinato con un fluorocromo) o indiretto (attraverso una molecola intermedia incorporata nella sonda) con le basi del DNA. In questo modo è stato possibile aumentare la risoluzione dell'analisi citogenetica convenzionale e identificare sbilanciamenti al di sotto della risoluzione cromosomica standard (Bishop, 2010⁴).

L'ibridizzazione genomica comparativa (CGH) analizza le variazioni del numero delle copie (CNV) sui cromosomi, in termini di guadagno/duplicazione o perdita/delezione. Sviluppata all'inizio degli anni '90, questa tecnica si basa su una FISH quantitativa a due colori. Anche se la CGH migliora in maniera sostanziale la risoluzione dell'analisi e perciò eleva la possibilità di riconoscere gli sbilanciamenti genomici, il guadagno di informazione è ancora relativamente limitato (non oltre le 3 Mb). Ha perciò rappresentato un significativo progresso, alla fine degli anni '90, lo sviluppo della CGH basata sugli array (array-CGH), nella quale i cromosomi metafasici sono sostituiti da sequenze di DNA adese ad un vetrino di supporto. L'array-CGH ha rimpiazzato in larga misura l'analisi cromosomica nella pratica clinica. Il suo principio è sostanzialmente quello della CGH, e consiste in un'ibridizzazione genomica comparativa che utilizza come substrato un array anziché le metafasi.

L'analisi mediante array che utilizzano polimorfismi dei singoli nucleotidi (SNP-array) ha consentito, più recentemente, di ottenere risoluzioni di 5-10 kb. Oltre a fornire informazioni sulle variazioni nel numero delle CNV, queste piattaforme identificano le regioni di omozigosi e perciò i geni potenzialmente correlati alle malattie recessive, le aneuploidie in mosaico, anche quando presenti in bassa percentuale, e le disomie uni parentali. La capacità diagnostica di queste tecniche può essere ulteriormente ottimizzata dall'associazione, sulla stessa piattaforma, dell'array-CGH e dello SNP-array (van den IJssel, 2005⁵).

³ ISCN 2016. An International System for Human Cytogenomic Nomenclature - ISCN McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M Edts, Karger, Basel 2016

⁴ Bishop R. Applications of fluorescence in situ hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance. *Bioscience Horizons*, 2010;3:85-95.

⁵ van den IJssel P, Tijssen M, Chin S-F, Eijk P, Carvalho B, Hopmans E, Holstege H, Bangarusamy DK, Jonkers J, Meijer GA, Caldas C, Ylstra B. Human and mouse oligonucleotide-based array CGH. *Nuclei Acid Res*, 2005;33(22)e192.

Le prime metodologie di sequenziamento del DNA risalgono agli anni '70. La strategia sviluppata da Sanger (1977⁶), basata sul metodo enzimatico dei terminatori di catena e sulla migrazione elettroforetica dei prodotti della reazione di sequenziamento, viene utilizzata ancora oggi per il sequenziamento dei singoli frammenti di DNA. Questo metodo, che consente di ottenere sequenze fino a 800-1000 basi, è stato automatizzato per moltiplicare l'applicabilità ed agevolare il processo di analisi. Tuttavia, gli elevati costi di produzione di ogni indagine e la sua relativa efficacia diagnostica non consentono di applicare tale tecnica su larga scala.

2.2. ANALISI “-OMICHE”

Il sequenziamento ad elevato parallelismo o sequenziamento di seconda generazione (cosiddetto *Next Generation Sequencing* - NGS), introdotto nella pratica clinica da circa una decina d'anni, ha la capacità di sequenziare contemporaneamente molti frammenti di DNA. Questa tecnologia consente di analizzare, ad un costo di produzione effettivo relativamente contenuto, milioni di sequenze di DNA in ogni singolo test e, grazie alla possibilità di analizzare successivamente in maniera automatica i dati grezzi di sequenziamento, di acquisire un'enorme quantità di informazioni sul genoma individuale. In questo modo è possibile sequenziare in pochi giorni un intero genoma, un'analisi che, con le tecniche tradizionali, richiederebbe anni.

Il parallelo sviluppo di strumenti bioinformatici, necessari nella gestione e nell'analisi dei dati di sequenziamento, consente di raggiungere obiettivi conoscitivi in precedenza impensabili. In particolare, è diventato possibile sviluppare test diagnostici più rapidi ed efficienti e identificare, in modo più efficace, numerosi nuovi geni-malattia.

La maggior parte delle malattie geniche sono eterogenee, ovvero possono essere causate da mutazioni di geni diversi nei diversi pazienti. Per molto tempo, la loro caratterizzazione molecolare ha utilizzato l'approccio del sequenziamento “gene-per-gene”, una strategia estremamente dispendiosa in termini di tempo e costi. Le tecniche di sequenziamento di seconda generazione consentono di superare questi limiti e numerosi laboratori le utilizzano oggi correntemente per la caratterizzazione molecolare delle malattie. Questo approccio è particolarmente efficiente nel caso delle malattie rare e orfane di diagnosi.

Un primo metodo di sequenziamento parallelo si basa sull'arricchimento di specifiche regioni genomiche (quelle nelle quali si localizzano i geni-malattia) e sul loro sequenziamento massivo in parallelo, analizzando diversi pazienti contemporaneamente. Utilizzando le tecniche NGS è possibile testare contemporaneamente fino a 96 campioni, ciascuno per il pannello dei geni-malattia responsabili della condizione sospettata a livello clinico, ottenendo dati analizzabili in pochi giorni. Queste tecniche hanno perciò rivoluzionato i protocolli dei test genetici, in quanto consentono di ottenere risultati diagnostici in tempi brevi, contenendo i costi di

⁶ Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977;74:5463–5467.

produzione del test e mantenendo elevata la qualità dei risultati. Inoltre, hanno avuto notevoli ricadute cliniche, sia nel caso delle malattie ad elevata eterogeneità, sia in quelle associate ad un fenotipo sfumato o privo di caratteristiche patognomoniche, in cui può essere problematico ipotizzare una diagnosi clinica. Di fatto, l'analisi simultanea di tutti i geni potenzialmente associati alla malattia in esame riduce i tempi necessari all'identificazione del difetto molecolare, a tutto vantaggio della consulenza genetica e della presa in carico del paziente.

Sebbene il sequenziamento dell'intero genoma sia in linea di principio la strategia d'eccellenza per lo studio della variabilità genetica interindividuale, presenta ancora alcune problematiche che ne limitano l'applicazione su larga scala, in particolare le capacità computazionali richieste dall'analisi, l'archiviazione dell'enorme massa di dati prodotti, la loro interpretazione e il più elevato costo di gestione.

Per queste ragioni, le tecniche di sequenziamento di seconda generazione vengono oggi spesso utilizzate per il sequenziamento dell'esoma. Con questo approccio, basato sull'arricchimento dei frammenti genomici che si riferiscono alle sequenze geniche codificanti per proteine e per sottoclassi selezionate di RNA che hanno una funzione regolatoria (ad es. microRNA), è possibile limitare l'analisi all'1-2% del genoma, escludendo perciò le regioni non-codificanti e, di conseguenza, perdendo informazioni che possono avere un impatto sull'espressione genica. Le attuali conoscenze sulle cause genetiche delle malattie mendeliane suggeriscono che la maggior parte delle loro mutazioni consistano in cambiamenti nella sequenza codificante di un gene o in un'anomalia nel processamento del trascritto. Pertanto, l'esoma è una porzione arricchita del genoma, nella quale è utile cercare le mutazioni di potenziale impatto clinico. Ne consegue che il suo sequenziamento è fondamentale nella diagnosi delle malattie rare e nella comprensione delle basi molecolari di molte patologie mendeliane, come documentano le diagnosi ottenute negli ultimi anni su larghe coorti di pazienti senza diagnosi e le centinaia di geni-malattia identificati con questa tecnica.

Un approccio complementare al sequenziamento dell'esoma o del genoma è il sequenziamento del trascrittoma, cioè degli RNA trascritti da una popolazione omogenea o eterogenea di cellule. In linea di principio, il trascrittoma è in grado di caratterizzare l'intero profilo di espressione del campione biologico, in termini quantitativi e qualitativi, e permette di identificare sia gli eventi molecolari ad impatto clinico che interessano le regioni codificanti, sia quelli che, coinvolgendo le regioni regolatorie, determinano cambiamenti nel processamento dei trascritti o nella loro stabilità. Quest'analisi consente anche di identificare i riarrangiamenti strutturali del genoma ad impatto quantitativo o qualitativo a livello dell'RNA messaggero. Il suo limite è legato alla disponibilità del tessuto da analizzare. Gli ambiti nei quali può essere applicata efficacemente sono quelli delle malattie muscolari e, verosimilmente, delle condizioni sindromiche associate a quadri clinici multisistemici.

Indipendentemente dallo specifico tipo di sequenziamento utilizzato (esoma, genoma o trascrittoma), l'analisi e l'interpretazione dei dati di sequenziamento necessitano di numerosi strumenti bioinformatici per il processamento delle sequenze ottenute e l'annotazione, il filtraggio e la prioritizzazione delle varianti identificate. Le piattaforme di sequenziamento generano un'enorme quantità di dati grezzi, che sono

convertiti in sequenze nucleotidiche mediante strumenti computazionali. I *file* generati di solito si trovano in un formato che contiene, oltre alla lettura delle sequenze nucleotidiche, *score* di qualità associati ad ogni base letta. La risoluzione a singola base sequenziata richiede l'analisi dei *file* mediante un complesso flusso di lavoro bioinformatico che permette, in una prima fase, di allineare le sequenze prodotte al genoma di riferimento e, successivamente, di identificare ed annotare funzionalmente le varianti che lo caratterizzano. La fase di allineamento viene eseguita con sistemi computazionali che confrontano ciascuna delle sequenze prodotte con il genoma di riferimento, permettendo il loro corretto posizionamento. Per garantire l'affidabilità di questi sistemi ed ottenere una valutazione globale dell'efficienza del sequenziamento, si applicano di solito diversi parametri di qualità. Tra essi, particolarmente rilevanti sono la copertura (*coverage*), cioè la percentuale di sequenze genomiche bersaglio lette dal sequenziamento, e la profondità (*depth*), ossia il numero di letture riferite ad una specifica base della sequenza genomica d'interesse. La fase successiva dell'approccio bioinformatico è la "chiamata delle varianti", che identifica le posizioni in cui le sequenze allineate differiscono dalle sequenze di riferimento. L'elenco ottenuto viene successivamente annotato: ad ogni variante vengono associate tutte le informazioni disponibili in letteratura e nelle banche-dati. Le varianti ottenute possono essere processate con metodi euristici di priorizzazione e filtraggio, al fine di ridurre l'alto numero di varianti e selezionare quelle con significato funzionale. In genere, nella prima fase si eliminano le varianti ad alta frequenza allelica nella popolazione generale, che si suppone non abbiano un impatto patologico su un fenotipo classificato come raro. A tale scopo, si utilizzano banche-dati pubbliche e *in-house*, che permettano di identificare le varianti che hanno bassa frequenza nella popolazione o che non sono state identificate in precedenza. In una seconda fase, si raccolgono e si valutano le informazioni disponibili su ciascuna variante e sul relativo gene, in modo da ordinare, per priorità, le prime in base al loro effetto predetto, e i geni in base alla loro rilevanza biologica (ad es. espressione, funzione), rispetto al fenotipo d'interesse. Per l'annotazione e la predizione funzionale delle varianti si utilizzano diversi strumenti, ognuno dei quali ha punti di forza e debolezza. Per questa ragione, in genere, si attua una strategia di priorizzazione in grado di sfruttare più strumenti di predizione. L'ultima fase dell'analisi è l'interpretazione dei dati, che non è automatizzabile, almeno con gli attuali strumenti, e richiede particolare attenzione ed esperienza e conoscenza specifica. Questa fase è fortemente influenzata dal dettaglio delle informazioni cliniche raccolte sul paziente e può richiederne la rivalutazione.

Le analisi -omiche, anche nel caso di negatività, offrono il vantaggio di potere essere rivalutate nel tempo. Dato che l'interpretazione è strettamente dipendente dai dati clinici (il fenotipo di un bambino può evolvere e definirsi nel tempo) e dalle conoscenze sui geni e sulle varianti disponibili al momento dell'analisi, il dato di un esoma o di qualsiasi altro approccio genomico può essere rielaborato a distanza di tempo.

Il sequenziamento dell'esoma si è dimostrato particolarmente efficiente in ambito diagnostico ed è usato come test di prima linea nei grandi centri internazionali e in alcuni centri italiani. Recenti studi concordano per un tasso di diagnosi (*detection rate*) di circa il 30-50% nei pazienti affetti da malattie genetiche senza diagnosi o con diagnosi non certa. Tuttavia, il successo nel raggiungimento di una diagnosi molecolare attraverso il sequenziamento dell'esoma può variare considerevolmente in base alle caratteristiche della

malattia in esame (ad es. una condizione inquadrabile in uno specifico gruppo di condizioni cliniche, come una paraplegia spastica, una retinopatia, una osteocondrodisplasia, ecc.) e alla strategia di sequenziamento utilizzata (analisi del solo probando rispetto all'analisi del nucleo familiare).

L'uso clinico del sequenziamento del genoma offre in teoria la massima risoluzione e informazione. Se da un lato, la resa diagnostica del sequenziamento dell'intero genoma sembrerebbe essere solo di poco superiore a quella del sequenziamento dell'esoma (guadagno di informazione circa 10% nei casi negativi all'esoma), tale analisi consente anche di identificare la presenza di riarrangiamenti strutturali (ad es. CNV, traslocazioni, inversioni), che solo occasionalmente possono essere individuati con il sequenziamento dell'esoma. Occorre tuttavia sottolineare che le potenzialità del WGS non si conoscono ancora completamente ed è perciò auspicabile che si possa iniziare ad utilizzarlo in centri con documentata competenza, disponendo di investimenti dedicati. La possibilità di integrare i dati genomici ottenuti con approcci complementari (ad es. trascrittoma associato al sequenziamento del genoma) illustra paradigmaticamente le straordinarie potenzialità delle tecnologie -omiche nella pratica clinica.

Un aspetto di particolare rilevanza, relativo all'uso delle nuove tecnologie di sequenziamento genomico, riguarda l'identificazione di variazioni di sequenza in geni-malattia non correlate con il quadro clinico che ha richiesto l'accertamento molecolare (cosiddetti *incidental findings*). Questo aspetto è importante in considerazione dell'elevato potere risolutivo di queste analisi e i potenziali risvolti etici. Esistono specifiche indicazioni sull'opportunità di comunicare o meno tali risultati ai pazienti che ne facciano specifica richiesta, e ciò sottolinea l'importanza di attivare un percorso di consulenza genetica pre- e post-test, gestito da specialisti che abbiano familiarità con l'interpretazione dei dati genomici, nonché di utilizzare moduli di consenso dedicati, che prendano in considerazione tutte le possibili opzioni da parte degli utenti.

I dati disponibili indicano che il tasso di errore nel sequenziamento di seconda generazione è molto basso, ma non trascurabile, ed è strettamente dipendente dal tipo di variazione (singolo cambiamento nucleotidico vs inserzione/delezione di più basi) e dal suo contesto di sequenza. Per questa ragione è indispensabile validare sempre le varianti selezionate con il sequenziamento Sanger, o altre tecniche, sebbene rappresenti ancora oggi la tecnica di sequenziamento di riferimento.

La caratterizzazione del metiloma, cioè il profilo dello stato di metilazione del DNA, offre un'ulteriore opportunità in ambito diagnostico, ancora largamente inesplorata. La metilazione del nucleotide citosina, quasi esclusivamente nel contesto del dinucleotide CpG, è una modificazione epigenetica del DNA, dinamica e cellula-specifica, che partecipa al controllo dell'espressione genica. Un numero crescente di malattie genetiche è dovuto o associato a modificazioni locali o globali dello stato di metilazione. Pertanto, l'identificazione dei profili dello stato di metilazione specifici della malattia (*epi-signature*) rappresenta un approccio analitico complementare in grado di confermare molecularmente un'ipotesi diagnostica basata su criteri clinici. Questa analisi può essere altrettanto efficiente per la stratificazione dei pazienti diretta all'uso di terapie farmacologiche di precisione, come già di fatto avviene in ambito oncologico. Lo studio del

metiloma può essere effettuato con diverse metodiche, che utilizzano la deaminazione delle citosine non metilate con sodio bisolfito, seguita dal sequenziamento o dall'analisi d'ibridazione (Rauluseviciute, 2019⁷).

2.3. MALATTIE RARE

Le malattie rare offrono un modello paradigmatico di sviluppo su larga scala di una nuova concezione dell'attività diagnostica, basata sull'introduzione di strumenti analitici innovativi che trasferiscono nella pratica clinica le tecniche -omiche.

Si tratta di un gruppo eterogeneo di condizioni che interessano, per circa il 60% dei casi, la fascia pediatrica e che, in circa l'80% dei casi, hanno una causa genetica o a larga componente genetica. Il loro numero complessivo configura un problema sanitario di grande impatto sociale (verosimilmente circa un milione di persone affette in Italia, esclusi i tumori rari). Pur nella peculiarità delle circa 8.000 malattie rare ad oggi identificate, i pazienti affetti da queste condizioni e le loro famiglie condividono bisogni assistenziali e sociali comuni, come l'incertezza della diagnosi, che li spinge verso una vera e propria odissea diagnostica costellata da visite ripetute, indagini ed analisi costose e variegate. Le difficoltà nella diagnosi sono tra l'altro giustificate dal fatto che circa l'85% delle malattie rare note ha una frequenza inferiore ad un soggetto affetto per milione di persone (Wakap, 2020⁸). Per questo, circa la metà dei pazienti non ottiene la diagnosi, il 25% la raggiunge in un tempo compreso tra i 5 e i 30 anni durante i quali circa il 40% di essi riceve diagnosi sbagliate e trattamenti inappropriati o addirittura interventi chirurgici non necessari (EURORDIS, 2009⁹; Molster, 2016¹⁰). Questo scenario è stato significativamente rivoluzionato dalla disponibilità delle tecniche di sequenziamento di seconda generazione.

Uno dei primi studi effettuato negli USA presso il *Baylor College of Medicine*, relativo a 2000 pazienti, ha riportato una risoluzione diagnostica nel 25% dei pazienti, con percentuali variabili tra il 20%, nel caso dei soggetti che non presentavano sintomi neurologici, ed il 36% in quelli affetti da problemi neurologici (atassia, disturbi del movimento) (Yang, 2014¹¹). Nel progetto nazionale canadese FORGE, l'analisi WES di 362 famiglie ha permesso di caratterizzarne il difetto molecolare in 188 (51,7%), comprese 105 (29%) con mutazioni in geni-malattia noti e 83 in nuovi geni-malattia. In 28 famiglie è stata identificata una possibile mutazione

⁷ Rauluseviciute I, Drabløs F, Rye MB. DNA methylation data by sequencing: experimental approaches and recommendations for tools and pipelines for data analysis. *Clin Epigenet*, 2019;11:193.

⁸ Wakap SN, Lambert DM, Olry A, Rodwell C, Gueydan C, Lanneau V, Murphy D, Le Cam Y, Rath A. Estimating Cumulative Point Prevalence of Rare Diseases: Analysis of the Orphanet Database. *Eur J Hum Genet*, 2020;28:165-173

⁹ EURORDIS. The Voice of 12,000 Patients, 2009. www.eurordis.org

¹⁰ Molster CD, Urwin L, Di Pietro M, Fookes D, Petrie S, van der Laan, Dawkins H. Survey of healthcare experiences of Australian adults living with rare diseases. *Orphanet J Rare Dis*, 2016;11:30.

¹¹ Yang Y, Muzny DM, Xia F, Niu Z, Person R, Ding Y, Ward P, Braxton A, Wang M, Buhay C, Veeraraghavan N, Hawes A, Chiang T, Leduc M, Beuten J, Zhang J, He W, Scull J, Willis A, Landsverk M, Craigen WJ, Bekheirnia MR, Stray-Pedersen A, Liu P, Wen S, Alcaraz W, Cui H, Walkiewicz M, Reid J, Bainbridge M, Patel A, Boerwinkle E, Beaudet AL, Lupski JR, Plon SE, Gibbs RA, Eng CM. Molecular Findings Among Patients Referred for Clinical Whole-Exome Sequencing. *JAMA*, 2014;312:1870-1879

patogenetica in un nuovo gene-malattia (Sawyer, 2016¹²). Questa elevata percentuale di successi diagnostici è stata attribuita all'eterogeneità genetica dei quadri clinici indagati, alla loro presentazione atipica, alla loro estrema rarità, al mancato raggiungimento della diagnosi molecolare con le tecniche tradizionali, alla scelta di analizzare il trio (probando + genitori). Numerosi studi successivi hanno confermato l'efficienza diagnostica di questa analisi e la sua estrema versatilità (Bamshad, 2019¹³; Boycott, 2019¹⁴). Inoltre la possibilità di rivalutare a distanza i dati molecolari, alla luce delle nuove conoscenze, incrementa la resa diagnostica, con un ulteriore guadagno pari a circa il 10% (Nambot, 2018¹⁵; Salfati, 2019¹⁶).

L'utilità di applicare queste nuove tecnologie in ambito clinico è stata dimostrata anche in situazioni di emergenza/urgenza. Petrikin et al. (2015)¹⁷ hanno analizzato, mediante WGS, 35 neonati senza diagnosi, che presentavano quadri clinici variabili riconducibili ad una probabile patologia genetica, in un reparto di terapia intensiva neonatale di quarto livello. Il 57% dei pazienti ha ottenuto una diagnosi definitiva, che ha permesso di prendere decisioni terapeutiche mirate sul piano medico e/o chirurgico (neonatologia di precisione) o comunque ha fornito una classificazione nosologica che ha indirizzato il neonato alle cure palliative. Circa il 45% delle diagnosi non erano state prese in considerazione nell'iniziale ipotesi diagnostica dei neonati.

Un *position paper* della Società Italiana di Pediatria (SIP), della Società Italiana di Neonatologia (SIN), della Società Italiana Malattie Genetiche Pediatriche e Disabilità Congenite (SIMGePed) e della Società Italiana di Genetica Umana (SIGU) ha raccomandato l'applicazione del WES nei neonati ricoverati nei reparti di terapia

¹² Sawyer SL, Hartley T, Dymont DA, Beaulieu CL, Schwartzenuber J, Smith A, Bedford HM, Bernard G, Bernier FP, Brais B, Bulman DE, Chardon JW, Chitayat D, Deladoëy J, Fernandez BA, Frosk P, Geraghty MT, Gerull B, Gibson W, Gow R, Graham GE, Green JS, Heon E, Horvath G, Innes AM, Jabado N, Kim RH, Koenekoop RK, Khan A, Lehmann OJ, Mendoza-Londono R, Michaud JL, Nikkel SL, Penney LS, Polychronakos C, Richer J, Rouleau GA, Samuels ME, Siu VM, Suchowersky O, Tarnopolsky MA, Yoon G, Zahir FR, FORGE Canada Consortium, Care4Rare Canada Consortium, Majewski J, Boycott KM. Utility of whole-exome sequencing for those near the end of the diagnostic odyssey: time to address gaps in care. *Clin Genet*, 2016;89: 275–284.

¹³ Bamshad MJ, Nickerson DA, Chong JX. Mendelian gene discovery: fast and furious with no end in sight. *Am J Hum Genet*, 2019;105:448–455.

¹⁴ Boycott KM, Hartley T, Biesecker LG, Gibbs RA, Innes AM, Riess O, Belmont J, Dunwoodie SL, Jovic N, Lassmann T, Mackay D, Temple IK, Visel A, Baynam G. A diagnosis for all genetic diseases: the horizon and the next frontiers. *Cell*, 2019;177:32-37.

¹⁵ Nambot S, Thevenon J, Kuentz P, Duffourd Y, Tisserant E, Bruel AL, Mosca-Boidron AL, Masurel-Paulet A, Lehalle D, Jean-Marcas N, Lefebvre M, Vabres P, Chehadeh-Djebbar SE, Philippe C, Tran Mau-Them F, St-Onge J, Jouan T, Chevarin M, Poé C, Carmignac V, Vitobello A, Callier P, Rivière JB, Faivre L, Thauvin-Robinet C, Orphanomix Physicians Group. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of rare disorders with congenital anomalies and/or intellectual disability: substantial interest of prospective annual reanalysis. *Genet Med*, 2018;20:645-54.

¹⁶ Salfati EL, Spencer EG, Topol SE, Muse ED, Rueda M, Lucas JR, Wagner GN, Campman S, Topol EJ, Torkamani A. Re-analysis of whole-exome sequencing data uncovers novel diagnostic variants and improves molecular diagnostic yields for sudden death and idiopathic diseases. *Genome Med*, 2019;11:83.

¹⁷ Petrikin JE, Willig LK, Smith LD, Kingsmore SF. Rapid whole genome sequencing and precision neonatology. *Semin Perinatol*, 2015;39:623-631.

intensiva, per velocizzare l'accesso alla diagnosi con significative ricadute, in termini di terapia/trattamento, ove disponibile (Borghesi, 2017¹⁸).

2.3.1. *Impatto economico del WES*

Un importante aspetto dell'applicazione delle tecnologie -omiche riguarda i costi e l'impatto del loro uso nel SSN. In particolare, meritano particolare attenzione le stime ottenute sulle malattie rare e orfane di diagnosi. Per rilevare l'insieme dei costi, diretti ed indiretti, a carico del SSN per ciascun episodio clinico considerato è necessario ricostruire tutti gli interventi effettuati nel corso dell'intera odissea diagnostica che precede la diagnosi finale. In breve, si tratta di rilevare il valore dei costi di produzione delle numerose e eterogenee prestazioni diagnostiche ricevute dal paziente.

Valencia et al. (2015)¹⁹ hanno stimato il contenimento nei costi che si otterrebbe con l'uso diagnostico delle tecniche WES. Lo studio ha riguardato 40 pazienti nel 30% dei quali era stata raggiunta la diagnosi. Sebbene sia stato sottovalutato il costo dell'analisi esomica che ha ignorato i costi indiretti, è apparso chiaro che il valore dei test genetici non conclusivi eseguiti prima di accedere al WES (microarray, pannelli genomici, analisi di singoli geni) era significativamente superiore.

Uno studio olandese ha confrontato l'efficacia del WES rispetto agli strumenti diagnostici tradizionali, comprese le visite specialistiche, i ricoveri ospedalieri, le tecniche di diagnostica per immagini, i test genetici e metabolici e le analisi biochimiche (Monroe, 2016²⁰). Sono stati analizzati i costi complessivi del percorso diagnostico in un gruppo di pazienti pediatrici affetti da disabilità intellettiva di origine genetica. A fronte di un successo diagnostico del WES del 30% circa, il costo medio per paziente è risultato significativamente più basso rispetto al quello di un percorso diagnostico tradizionale. I costi sono stati calcolati in base alle tariffe di rimborso del sistema sanitario olandese. I costi del WES per singolo trio, indicizzati per l'anno 2014 in base alle tariffe di rimborso del sistema sanitario olandese, sono risultati di 3.972 \$, omnicomprensivi del prelievo del sangue venoso, della registrazione dei campioni, dell'estrazione del DNA, della preparazione del campione, del sequenziamento, dell'interpretazione delle varianti, della refertazione, dell'archiviazione dei

¹⁸ Borghesi A, Mencarelli MA, Memo L, Ferrero GB, Bartuli A, Genuardi M, Stronati M, Villani A, Renieri A, Corsello G, their respective Societies. Intersociety policy statement on the use of whole-exome sequencing in the critically ill newborn infant. *Ital J Pediatr*, 2017;43:100.

¹⁹ Valencia CA, Husami A, Holle J, Johnson JA, Qian Y, Mathur A, Wei C, Indugula SR, Zou F, Meng H, Wang L, Li X, Fisher R, Tan T, Begtrup AH, Collins K, Wusik KA, Neilson D, Burrow T, Schorry E, Hopkin R, Keddache M, Harley JB, Kaufman KM, Zhang K. Clinical impact and cost-effectiveness of whole exome sequencing as a diagnostic tool: a pediatric center's experience. *Front Pediatr*, 2015;3:67.

²⁰ Monroe GR, Frederix GW, Savelberg SMC, de Vries TI, Duran KJ, van der Smagt JJ, Terhal PA, van Hasselt PM, Kroes HY, Verhoeven-Duif NM, Nijman IJ, Carbo EC, van Gassen KL, Knoers NV, Hövels AM, van Haelst MM, Visser G, van Haften G. Effectiveness of whole-exome sequencing and costs of the traditional diagnostic trajectory in children with intellectual disability. *Genet Med*, 2016;18:949-56.

dati informatici e delle infrastrutture. La durata media del percorso diagnostico dei pazienti con disabilità intellettiva inclusi nello studio è risultata di 6 anni e mezzo ed i costi, precedenti al WES, sono stati calcolati in base alle visite specialistiche, ai ricoveri ospedalieri, alla diagnostica per immagini, ai test genetici, metabolici e alle analisi biochimiche. In media i pazienti si erano sottoposti a 61 visite specialistiche, con un costo medio di 3.012 \$; avevano effettuato in media 16 indagini diagnostiche per immagini (prevalentemente radiografie e risonanza magnetica), con un costo medio di 1.439 \$. Ogni paziente si era sottoposto in media a 7 test genetici, con un costo medio di 6.588 \$. Due terzi dei test avevano riguardato l'analisi di singoli geni. Ogni paziente si era sottoposto in media a 1,5 array-CGH/SNP-array, con un costo medio di 1.361 \$. Infine, ogni paziente aveva effettuato mediamente 6 test metabolici, con un costo medio di 2.818 \$. In totale, il costo medio dell'intero percorso dedicato alla diagnosi, precedente il WES, era stato di 16.409 \$, con un'incidenza media dei costi dei test genetici sull'intero percorso, pari al 42%. È stato anche ipotizzato lo scenario che prevede il WES come analisi di prima scelta. Per questo, in base ai risultati del WES, i pazienti sono stati suddivisi in due gruppi, rispettivamente con e senza diagnosi, e, per ciascuno di essi, sono stati calcolati i costi eleggibili. Sia nel caso dei pazienti che avevano ottenuto la diagnosi che in quelli rimasti non diagnosticati, il WES avrebbe consentito di evitare tutti i costi delle altre indagini genetiche, ad eccezione dell'array-CGH/SNP-array. Per entrambi i gruppi l'array CGH/SNP-array è l'indagine di elezione per studiare le anomalie di numero delle copie. Nei pazienti che avevano ottenuto la diagnosi molecolare, il risparmio sui costi dei test genetici e metabolici sarebbe stato rispettivamente di 4.986 \$ e 2.533 \$, mentre, nei casi rimasti senza diagnosi, il WES avrebbe potuto sostituire le altre indagini genetiche, con un risparmio medio di 5.699 \$. Pertanto il WES, se utilizzato come indagine di prima linea abbatterebbe del 50% i costi delle visite specialistiche, dei ricoveri ospedalieri, della diagnostica per immagini, degli altri test genetici, metabolici e delle analisi biochimiche, con un risparmio medio di circa 1.660 \$ nei pazienti che ottengono la diagnosi e di 4.269 \$ in quelli che rimangono senza diagnosi.

2.3.2. Esperienze esemplificative sull'uso del WES nelle malattie rare in Italia

Un programma di ricerca dell'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma, negli ultimi 5 anni, basato sull'analisi esomica di nuclei familiari, in una coorte di circa 750 pazienti orfani di diagnosi, ha dimostrato un tasso di diagnosi del 43% e l'identificazione di nuove possibili cause di malattia (geni candidati) in un ulteriore 20% dei pazienti. Lo studio ha inoltre identificato oltre 25 nuovi geni-malattia, ha caratterizzato clinicamente un elevato numero di entità nosologiche e ha definito nuove correlazioni genotipo-fenotipo, a conferma dell'utilità clinica dell'analisi esomica. Questi risultati hanno avuto una immediata ricaduta clinica, nell'implementazione di un programma strategico di traslazione delle tecniche -omiche nel laboratorio di diagnosi genetica, che, a partire dal 2018, ha analizzato oltre 10.000 esomi, registrando un tasso di successo del 65%. Un analogo modello è in fase di implementazione nella Rete Pediatrica degli IRCCS (Rete IDEA) attraverso diversi progetti finanziati dal Ministero della Salute.

Negli ultimi anni il Laboratorio di Genetica Medica dell'ASST Papa Giovanni XXIII di Bergamo ha eseguito il WES in diagnostica su circa 1.500 nuclei familiari di pazienti pediatrici reclutati prevalentemente da centri

della Lombardia. La resa diagnostica è stata di circa il 50%. La struttura ha anche attivato uno studio prospettico multicentrico che si propone di valutare, in termini di costo-efficacia, il WES come primo test genetico nei pazienti pediatrici ambulatoriali con sospetta malattia genetica, rispetto all'iter diagnostico standard.

Presso l'U.O. interaziendale di Genetica Medica del Policlinico di Sant'Orsola di Bologna, negli ultimi anni sono stati analizzati oltre 1.000 esomi con finalità diagnostiche e di ricerca su pazienti con malattie genetiche, isolate o familiari, ottenendo una resa diagnostica media del 25% e nel programma dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico di Sant'Orsola Bologna, dedicato alla diagnostica innovativa rivolta ai pazienti valutati durante l'attività di consulenza genetica, è stato raggiunto un tasso diagnostico superiore al 40%.

Relativamente all'impatto economico delle analisi genomiche sul SSN, l'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù ha effettuato uno studio su 211 pazienti analizzati mediante WES e ha calcolato il costo complessivo dei ricoveri e delle indagini strumentali e di laboratorio precedenti il test, che è risultato in media di 11.572 €, con oscillazioni comprese tra 75.840 e 160 €, in rapporto alla complessità della patologia e all'età del probando, a fronte di un costo stimato per il WES di un trio pari a circa 3.000 €. Questi dati, riferiti al 2017 hanno permesso di calcolare che ogni anno di ritardo diagnostico costa mediamente 2.146 € per singolo paziente, con variazioni tra € 18.320 ed € 48 (Radio, 2019²¹). È in corso un'ulteriore analisi dell'impatto economico e della riduzione dell'odissea diagnostica correlati all'applicazione delle analisi genomiche nell'ambito di una rete strutturata di centri clinici connessi mediante sistemi di teleconsulenza, con centralizzazione delle indagini molecolari. I risultati preliminari confermano l'efficacia e la sostenibilità dell'approccio multidimensionale proposto su 312 pazienti afferenti a 24 centri di riferimento italiani per le malattie rare, valutati nell'ambito di 35 riunioni multidisciplinari di teleconsulenza, che hanno documentato una riduzione superiore al 25% dei costi diagnostici calcolati in base alle tabelle di rimborso ministeriali²², con un tasso di successo diagnostico complessivo superiore al 60%.

Questi risultati sono in linea con quelli di altri Centri con comprovata esperienza nell'uso diagnostico del WES. Il costo del WES per l'intero nucleo familiare, calcolato dal controllo di gestione dell'ASST Papa Giovanni XXIII è stato stimato in 4.350 €, un valore che deve comunque tenere conto dell'evoluzione delle piattaforme di sequenziamento e del costante abbattimento dei costi delle analisi.

Queste valutazioni economiche, dinamiche nel tempo e comunque dipendenti dalla tecnologia -omica utilizzata, evidenziano il vantaggio della centralizzazione delle analisi genomiche e della creazione di una rete

²¹ Radio FC, M. Ruzzeddu, Bartuli A, Novelli A, Tartaglia A, Dallapiccola B. Cost-effectiveness of exome sequencing: an Italian pilot study on undiagnosed patients. *New Genet Societ*, 2019;38:249-263.

²² Ministero della salute

(http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?lingua=italiano&id=3662&area=programmazioneSanitariaLea&menu=vuoto)

di centri di riferimento, di comprovata competenza nella produzione e nell'analisi dei dati genomici, in grado di soddisfare i bisogni di tutto il Paese.

Il Ministero della Salute e la Fondazione per la Ricerca dell'Ospedale di Bergamo hanno finanziato rispettivamente all'Ospedale Bambino Gesù e all'ASST Papa Giovanni XXIII due ulteriori studi prospettici rivolti a valutare l'utilità clinica dell'analisi genomica eseguita in regime d'urgenza ai pazienti con sospetta malattia genetica, in condizioni cliniche critiche, ricoverati in reparti di terapia intensiva. I primi dati ottenuti dall'ASST Papa Giovanni XXIII indicano la possibilità di ottenere risultati mediamente in 9 giorni, con un'efficienza diagnostica del 60% e, perciò, la possibilità di fornire indicazioni a trattamenti personalizzati e specifici in oltre la metà dei casi. Inoltre, il Servizio di Genetica Medica dell'Università di Bologna sta svolgendo una ricerca, finanziata dal Ministero della Salute, sull'utilità clinica dell'indagine genomica nei pazienti con patologie del neurosviluppo, negativi all'analisi dell'esoma. Il progetto si propone anche di valutare l'efficacia del sequenziamento massivo dell'intero genoma in termini di costi, al fine di supportare i processi decisionali nel SSN.

Nel complesso, i dati già oggi disponibili indicano che le analisi genomiche rappresentano uno strumento efficace di diagnosi, che viene ottenuta nel 30-50% dei pazienti senza diagnosi. Il trasferimento di queste analisi nella pratica clinica rappresenta, dal punto di vista costo/efficacia, un importante contributo alla *spending review* del SSN, in quanto è potenzialmente in grado di eliminare i costi diretti legati alle ipotesi diagnostiche formulate nel tempo che, spesso rappresentano anni di peregrinazioni tra le regioni. In termini numerici, si può stimare che il rapporto tra l'applicazione del WES e i costi diretti e indiretti che il paziente senza diagnosi e la sua famiglia sostengono è circa 1:8. In pratica, fissando in un massimo di 3-5.000 € il costo di un WES, il costo medio dei pazienti senza diagnosi nel lungo percorso delle ipotesi diagnostiche si aggira tra 35.000 e 60.000 €. Pertanto, l'impiego sistematico delle NGS determinerebbe un significativo risparmio per il SSN, in quanto consentirebbe di ottenere, in tempi ragionevolmente brevi, una diagnosi certa in una percentuale significativa dei pazienti, evitando gli inutili costi delle numerose, conclusive indagini strumentali e di laboratorio (Consiglio Superiore di Sanità, 2016²³).

2.4. DIAGNOSI PRENATALE

2.4.1. Esoma prenatale

La diagnosi prenatale comprende indagini strumentali e di laboratorio effettuate durante la gravidanza finalizzate a monitorare la salute dell'embrione/feto, a partire dalle prime fasi dello sviluppo fino ai momenti che precedono il parto.

²³ Consiglio Superiore di Sanità - Sezione I - "Impatto socio-economico sul sistema sanitario delle tecniche di sequenziamento di seconda generazione (NGS) nell'inquadramento dei pazienti senza diagnosi" (2016)

La diagnosi genetica prenatale, a seconda dell'epoca e dell'indicazione clinica, utilizza una serie di indagini diverse (cariotipo, array-CGH, analisi molecolari). La loro appropriatezza viene valutata in base all'utilità del risultato per la gestione della gravidanza e non solo sulla loro resa diagnostica. In questo senso, per un uso razionale delle risorse del SSN, deve essere scoraggiato nelle gravidanze che non sono a rischio il ricorso indiscriminato alle indagini genetiche di natura predittiva.

Le tecniche NGS, in particolare il WES, hanno modificato l'approccio diagnostico delle malattie genetiche. Considerato che l'obiettivo primario della analisi genetiche prenatali è fornire spiegazioni rispetto al riscontro di patologie fetali e alla loro gestione clinica, è necessario che dalle analisi genomiche emergano risultati chiari e perciò tali da non creare dubbi interpretativi. Per questo, è importante che l'analisi sia effettuata sul trio (feto + genitori) e che si possa disporre di dati clinici il più possibile completi (ecografie, anamnesi familiare, eventuali riscontri autoptici in caso di interruzione della gravidanza). La limitatezza dei dati obiettivi del feto e la scarsa conoscenza del fenotipo prenatale delle malattie rare, che per lo più vengono diagnosticate dopo la nascita, rende spesso difficile l'interpretazione dei risultati delle analisi genomiche. Per questo, sul referto devono essere riportate solo le varianti classificate come patogenetiche o probabilmente patogenetiche, segnalando le varianti di significato incerto o sconosciuto (*Variations Of Uncertain Significance* - VOUS) solo se associate ad un quadro clinico noto. È pertanto importante la consulenza pre-test e post-test e la gestione di tutto il percorso diagnostico presso laboratori accreditati, che si possano avvalere di professionisti in possesso di specifiche competenze cliniche e di laboratorio.

Una criticità è quella dei tempi, dato che la diagnosi prenatale deve essere refertata in un arco temporale stretto, mentre l'analisi dell'esoma richiede tempi relativamente lunghi, che comprendono, tra l'altro, quelli necessari a confermare con metodi alternativi le eventuali varianti patogenetiche identificate. Tuttavia, disponendo di un'organizzazione ottimale, è possibile ottenere risultati nell'arco di una decina di giorni. Non va comunque dimenticato che il WES, analogamente ad altre indagini genetiche, ha dei limiti, in quanto non individua gli sbilanciamenti genomici (CNV), i piccoli riarrangiamenti intragenici e le mutazioni da espansione di triplette.

Sono ancora poco numerosi i lavori scientifici relativi all'uso del WES nella diagnosi prenatale, che peraltro si sono focalizzati solo su alcuni aspetti, soprattutto la resa diagnostica, in assenza di dati di follow-up o di analisi di costo-efficacia. Tutti gli studi recenti hanno riguardato casistiche selezionate, in particolare le gravidanze con difetti eco-evidenziati, con cariotipo e array-CGH normali. Best et al. (2018)²⁴ hanno effettuato una meta-analisi di 31 studi, riportando una resa diagnostica compresa tra il 6,2 e l'80%. Le rese diagnostiche più elevate sono state ottenute per le indagini effettuate su trio e sui feti con anomalie multiple o con quadri ecografici riconducibili a specifici gruppi di malattie (ad es. displasie scheletriche). La capacità

²⁴ Best S, Wou K, Vora N, Van der Veyver IB, Wapner R, Chitty LS. Promises, pitfalls and practicalities of prenatal whole exome sequencing. *Prenat Diagn*, 2018;38:10-19.

del WES di aumentare la resa diagnostica in corso di gravidanza è emersa anche da un recente studio di Xue et al. (2020)²⁵, che hanno analizzato una serie di feti che avevano presentato un aumento della translucenza nucale ed un array-CGH negativo. Altri studi, come quelli di Lord et al. (2019)²⁶ e di Wapner et al. (2012)²⁵, pur confermando la potenzialità del WES di incrementare la resa diagnostica, hanno sottolineato le criticità organizzative ed etiche dell'utilizzo di questa analisi in ambito prenatale, l'importanza di ricorrere al WES solo in casi selezionati, la necessità di disporre di competenze per l'interpretazione dei risultati e le difficoltà della consulenza pre- e post-test.

In sintesi, gli studi fino ad oggi disponibili sono eterogenei per la numerosità dei casi analizzati, i criteri di inclusione, l'epoca gestazionale monitorata e i criteri utilizzati nell'interpretazione dei risultati. Spesso le informazioni cliniche si limitano ai rilievi ecografici e solo un numero esiguo di studi ha avuto un follow-up autoptico o post-natale. L'*International Society for Prenatal Diagnosis* (ISPD) ha stilato nel 2018²⁷ alcune raccomandazioni rivolte ai laboratori che offrono le analisi genomiche prenatali. In sintesi:

1. I pannelli multigenici, il WES e il WGS possono essere utilizzati nelle gravidanze con feti malformati, negativi alla *Chromosomal Microarray Analysis* (CMA) o in cui si sospetti una patologia associata a SNV o nei casi di ricorrenza familiare di anomalie senza diagnosi.
2. È sconsigliata l'introduzione delle tecniche -omiche nella routine della diagnosi prenatale, ad eccezione di casi particolari che richiedano di accelerare i tempi della diagnosi oppure per finalità di ricerca.
3. Le analisi dovrebbero essere eseguite solo presso laboratori accreditati, che rispondono a definiti standard di qualità, con esperienza nell'esecuzione e nella gestione delle analisi -omiche, e solo all'interno di un percorso che preveda la consulenza pre-test e la consulenza multidisciplinare post-test.

La letteratura e le Società scientifiche condividono quindi l'idea che l'uso delle analisi esomiche in epoca prenatale abbia la capacità di aumentare la resa diagnostica. Tuttavia, al momento dovrebbero essere

²⁵ Xue S, Yan H, Chen J, Li N, Wang J, Liu Y, Zhang H, Li S, Zhang W, Chen D, Chen M. Genetic examination for fetuses with increased fetal nuchal translucency by genomic technology. *Cytogenet Genome Res.* 2020 Feb 8.doi:10.1159/000506095.

²⁶ Lord J, McMullan DJ, Eberhardt RY, Rinck G, Hamilton SJ, Quinlan-Jones E, Prigmore E, Keelagher R, Best SK, Carey GK, Mellis R, Robart S, Berry IR, Chandler KE, Cilliers D, Cresswell L, Edwards SL, Gardiner C, Henderson A, Holden ST, Homfray T, Lester T, Lewis RA, Newbury-Ecob R, Prescott K, Quarrell OW, Ramsden SC, Roberts E, Tapon D, Tooley MJ, Vasudevan PC, Weber AP, Wellesley DG, Westwood P, White H, Parker M, Williams D, Jenkins L, Scott RH, Kilby MD, Chitty LS, Hurlles ME, Maher ER. Prenatal assessment of genomes and exomes consortium. Prenatal exome sequencing analysis in fetal structural anomalies detected by ultrasonography (PAGE): a cohort study. *Lancet*, 2019;393:747-757.

²⁵ Wapner RJ, Martin CL, Levy B, Ballif BC, Eng CM, Zachary JM, Savage M, Platt LD, Saltzman D, Grobman WA, Klugman S, Scholl T, Simpson JL, McCall K, Aggarwal VS, Bunke B, Nahum O, Patel A, Lamb AN, Thom EA, Beaudet AL, Ledbetter DH, Shaffer LG, Jackson LN. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *New Engl J Med.* 2012;367:2175-2184.

²⁷ International Society for Prenatal Diagnosis; Society for Maternal and Fetal Medicine; Perinatal Quality Foundation. Joint Position Statement from the International Society for Prenatal Diagnosis (ISPD), the Society for Maternal Fetal Medicine (SMFM), and the Perinatal Quality Foundation (PQF) on the use of genome wide sequencing for fetal diagnosis. *Prenat Diagn.* 2018 Jan;38:6-9.

riservate a casi selezionati, ad esempio per definire il rischio di ricorrenza di una patologia, in considerazione delle criticità organizzative, etiche e le ancora limitate conoscenze. Infine, oltre ai limiti tecnici del WES, quale la copertura incompleta di alcune regioni, il suo utilizzo nella diagnosi prenatale è reso ancora più complesso dalla limitata definizione del fenotipo del feto, che peraltro evolve nel tempo, e dalle incomplete conoscenze sui geni critici durante lo sviluppo (Feldkamp, 2017²⁸). Di fatto, alcune patologie mendeliane ad esordio prenatale sono incompatibili con la vita postnatale oppure possono essere causate da mutazioni alleliche in geni responsabili di malattie nosologicamente diverse o che comportano fenotipi meno gravi nella vita postnatale (Petrovski, 2019²⁹).

2.4.2. Screening prenatale non invasivo sul sangue fetale

Un'importante applicazione prenatale delle tecniche -omiche riguarda lo screening non invasivo sul sangue materno (*Non Invasive Prenatal Testing* o NIPT).

Il rinnovo cellulare fisiologico produce nel sangue frammenti di DNA libero, che, nelle donne in gravidanza, sono in parte di derivazione placentare, in conseguenza di processi apoptotici. Questa quota di DNA placentare, definita *cell free fetal DNA* (cffDNA) corrisponde mediamente, attorno alla X settimana di amenorrea al 10% circa del DNA libero totale. Il cffDNA può essere identificato nel sangue materno ed utilizzato per lo screening delle aneuploidie cromosomiche (Chiu, 2008³⁰; Fan, 2008³¹).

A partire dal 2008, sono state sviluppate varie metodiche ed algoritmi di screening sul sangue materno, basati sul sequenziamento massivo parallelo, che si sono rivelati altamente accurati nella ricerca delle principali aneuploidie, in particolare le trisomie 13, 18 e 21, che rappresentano il 50-70% delle aberrazioni numeriche. Lo screening delle microdelezioni e delle microduplicazioni cromosomiche mediante NIPT non è ancora stato validato dal punto di vista analitico e clinico, a causa della bassa prevalenza di queste mutazioni (Gil, 2017³²;

²⁸ Feldkamp ML, Carey JC, Byrne JLB, Krikov S, Botto LD. Etiology and clinical presentation of birth defects: population based study. *BMJ*, 2017;357: j2249.

²⁹ Petrovski S, Aggarwal V, Giordano JL, Stosic M, Wou K, Bier L, Spiegel E, Brennan K, Stong N, Jobanputra V, Ren Z, Zhu X, Mebane C, Nahum O, Wang Q, Kamalakaran S, Malone C, Anyane-Yeboah K, Miller R, Levy B, Goldstein DB, Wapner RJ. Whole-exome sequencing in the evaluation of fetal structural anomalies: a prospective cohort study. *Lancet*, 2019;393:758-767.

³⁰ Chiu RW, Chan KC, Gao Y, Lau VY, Zheng W, Leung TY, Foo CH, Xie B, Tsui NB, Lun FM, Zee BC, Lau TK, Cantor CR, Lo YM. Non invasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008;105:20458-20463

³¹ Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Non invasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008;105:16266-16271.

³² Gil MM, Accurti V, Santacruz B, Plana MN, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2017;50:302-314.

Barrett, 2014³³; Chitty, 2008³⁴; Koumbaris, 2016³⁵; Cleynen, 2014³⁶; Koumbaris, 2019³⁷). Per questo, al momento, le Società scientifiche nazionali ed internazionali ne sconsigliano l'uso clinico. Un'analoga cautela riguarda lo screening delle malattie mendeliane. Sebbene questi test vengono offerti da aziende private, contestualmente allo screening delle aneuploidie cromosomiche, la loro validità ed utilità clinica non è al momento definita e l'*American College of Obstetricians and Gynecologists* (2019) ne ha fortemente sconsigliato l'utilizzo clinico (ACOG, 2019³⁸).

Nel 2015, il Consiglio Superiore di Sanità (CSS) ha redatto delle Linee-Guida sullo screening prenatale non invasivo basato sul DNA, e ne ha esaminato criticamente i diversi aspetti, compresa l'appropriatezza del test, che deve essere preceduto da un controllo ecografico fetale accurato associato all'analisi di marker biochimici materni (cosiddetto Test Combinato) attorno alla 11-14 settimana di gestazione, da parte di operatori accreditati (CSS, 2015³⁹). Nel 2016, il CSS ha redatto un secondo documento, che ha analizzato l'impatto socio-economico del NIPT in Sanità pubblica (CSS, 2016⁴⁰).

Il NIPT, in quanto basato sull'analisi del DNA, è, a tutti gli effetti, un test genetico. Tuttavia, è un test di screening, perciò non diagnostico, e pertanto i risultati positivi, che individuano un rischio elevato di aneuploidia fetale, devono essere confermati con un test diagnostico invasivo, preferibilmente sugli amniociti.

Come ogni altro test genetico, il NIPT deve essere inserito in un percorso che preveda una consulenza pre-test e post-test con uno specialista in Ostetricia e Ginecologia e/o in Genetica Medica, al fine di fornire tutte le informazioni necessarie a comprendere le caratteristiche del test e soprattutto i suoi limiti, anche in

³³ Barrett AN, Chitty LS. Developing non-invasive diagnosis for single-gene disorders: the role of digital PCR. *Methods Mol Biol*, 2014;1160:215-228

³⁴ Chitty LS, van der Schoot CE, Hahn S, Avent ND. SAFE-the special non-invasive advances in fetal and neonatal evaluation network: aims and achievements. *Prenat Diagn*, 2008;28:83-88

³⁵ Koumbaris G, Kypri E, Tsangaras K, Achilleos A, Mina P, Neofytou M, Velissariou V, Christopoulou G, Kallikas I, González-Liñán A, Benusiene E, Latos-Bielenska A, Marek P, Santana A, Nagy N, Széll M, Laudanski P, Papageorgiou EA, Ioannides M, Patsalis PC. Cell-free DNA analysis of targeted genomic regions in maternal plasma for non-invasive prenatal testing of trisomy 21, trisomy 18, trisomy 13, and fetal sex. *Clin Chem*, 2016;62:848-855.

³⁶ Cleynen A, Koskas M, Lebarbier E, Rigaiil G, Robin S. Segmentor3IsBack: an R package for the fast and exact segmentation of Seq-data. *Algorithms Mol Biol*, 2014;9(1):6.

³⁷ Koumbaris G, Achilleos A, Nicolaou M, Loizides C, Tsangaras K, Kypri E, Mina P, Sismani C, Velissariou V, Christopoulou G, Constantoulakis P, Manolakis E, Papoulidis I, Stambouli D, Ioannides M, Patsalis P. Targeted capture enrichment followed by NGS: development and validation of a single comprehensive NIPT for chromosomal aneuploidies, microdeletion syndromes and monogenic diseases. *Mol Cytogenet*, 2019;12:48.

³⁸ ACOG - American College of Obstetricians and Gynecologists 2019. Practice Advisory: cell-free DNA to screening for single-gene disorders. <https://www.acog.org/Clinical-Guidance-and-Publications/Practice-Advisories/Cell-free-DNA-to-Screen-for-Single-Gene-Disorders>.

³⁹ Consiglio Superiore di Sanità - Sezione I: Linee-Guida, Screening prenatale non invasivo basato sul DNA (Non Invasive Prenatal Testing – NIPT), Ministero della Salute (Maggio 2015. www.salute.gov.it).

⁴⁰ Consiglio Superiore di Sanità - Sezione I: "Impatto socio-economico del test del cfDNA/NIPT in Sanità pubblica" (2016)

rapporto alle altre tecniche di diagnosi prenatale disponibili; la sua sensibilità e specificità; il valore predittivo positivo (PPV) e negativo (NPV); i parametri su cui si basa l'interpretazione clinica del risultato.

2.5. MALATTIE ONCOLOGICHE

La medicina molecolare consente oggi di decifrare le malattie in base ai meccanismi causali genetici (analisi genomica) e ambientali (analisi epigenomica) e di valutare i rischi di malattia a livello individuale, ottenendo una sofisticata e dettagliata stratificazione dei malati secondo parametri di medicina di precisione o personalizzata. La medicina molecolare, essenzialmente diagnostica, e la medicina di precisione, essenzialmente terapeutica, formano la "medicina di stratificazione" (Sondka, 2018⁴¹; Feindberg, 2016⁴²).

L'oncologia è la disciplina nella quale è più evidente l'impatto della medicina di stratificazione, come esemplificano l'introduzione di linee-guida per numerose "terapie bersaglio", basate sulla diagnosi di specifiche alterazioni genetiche che contribuiscono alla crescita tumorale, e diverse "Immunoterapie" con anticorpi monoclonali contro *checkpoint* inibitori della risposta immunitaria, che contribuiscono "all'escape" delle cellule neoplastiche dalla risposta antitumorale mediata dai linfociti T. Alcune di queste terapie hanno cambiato in modo sostanziale la storia naturale di numerosi tipi di tumore (Osmani, 2018⁴³; Galluzzi, 2014⁴⁴).

2.5.1. Terapie bersaglio contro mutazioni somatiche

L'innesco del processo di trasformazione e il mantenimento del fenotipo neoplastico sono dovuti all'accumulo di mutazioni somatiche in oncogeni e geni oncosoppressori. Le cosiddette "terapie bersaglio" sono alla base delle cure di precisione in oncologia e consistono di piccole molecole o anticorpi monoclonali che interferiscono con specifici bersagli molecolari (ad esempio proteine mutate) coinvolte nella crescita e nella metastatizzazione dei tumori.

⁴¹ Sondka Z, Bamford S, Cole CG, Ward SA, Dunham I, Forbes SA. The COSMIC Cancer Gene Census: describing genetic dysfunction across all human cancers. *Nat Rev Cancer*, 2018;18:696-705. PMID: 30293088

⁴² Feinberg AP, Koldobskiy MA, Göndör A. Epigenetic modulators, modifiers and mediators in cancer aetiology and progression. *Nat Rev Genet*, 2016;17:284-99. PMID: 26972587

⁴³ Osmani L, Askin F, Gabrielson E, Li QK. Current WHO guidelines and the critical role of immunohistochemical markers in the subclassification of non-small cell lung carcinoma (NSCLC): Moving from targeted therapy to immunotherapy. *Semin Cancer Biol*, 2018;52:103-109. PMID: 29183778

⁴⁴ Galluzzi L, Vacchelli E, Bravo-San Pedro JM, Buqué A, Senovilla L, Baracco EE, Bloy N, Castoldi F, Abastado JP, Agostinis P, Apte RN, Aranda F, Ayyoub M, Beckhove P, Blay JY, Bracci L, Caignard A, Castelli C, Cavallo F, Celis E, Cerundolo V, Clayton A, Colombo MP, Coussens L, Dhodapkar MV, Eggermont AM, Fearon DT, Fridman WH, Fučíková J, Gabrilovich DI, Galon J, Garg A, Ghiringhelli F, Giaccone G, Gilboa E, Gnjatic S, Hoos A, Hosmalin A, Jäger D, Kalinski P, Kärre K, Kepp O, Kiessling R, Kirkwood JM, Klein E, Knuth A, Lewis CE, Liblau R, Lotze MT, Lugli E, Mach JP, Mattei F, Mavilio D, Melero I, Melief CJ, Mittendorf EA, Moretta L, Odunsi A, Okada H, Palucka AK, Peter ME, Pienta KJ, Porgador A, Prendergast GC, Rabinovich GA, Restifo NP, Rizvi N, Sautès-Fridman C, Schreiber H, Seliger B, Shiku H, Silva-Santos B, Smyth MJ, Speiser DE, Spisek R, Srivastava PK, Talmadge JE, Tartour E, Van Der Burg SH, Van Den Eynde BJ, Vile R, Wagner H, Weber JS, Whiteside TL, Wolchok JD, Zitvogel L, Zou W, Kroemer G. Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget*, 2014;5:12472-12508. PMID: 25537519

Sono stati approvati numerosi farmaci molecolari per terapie-bersaglio di tumori che portano specifiche mutazioni somatiche. Sono illustrativi l'*imatinib* nei pazienti con la mutazione *BCR-ABL1* nella leucemia mieloide cronica; il *trastuzumab* nelle pazienti con tumore del seno, positive per *HER2*; *erlotinib* e *gefitinib* nei pazienti con tumore del polmone portatori di mutazioni di *EGFR*; *vemurafenib* e *dabrafenib* nei pazienti con melanoma, portatori di mutazioni di *BRAF^{V600E}* (Jackson, 2015⁴⁵).

Più recentemente, le terapie-bersaglio vengono combinate nelle sperimentazioni cliniche con anticorpi contro *checkpoint* inibitori della risposta immunitaria e queste combinazioni stanno aprendo una nuova era nella terapia dei tumori maggiormente immunogenici (ad es. melanoma, vie urinarie, polmone, tumori ipermutati del colon), cioè quelli derivanti da esposizioni ai mutageni ambientali (sole, inquinamento, stili di vita, ecc.) o con mutazioni nei meccanismi del riparo del DNA (Hughes, 2016⁴⁶).

Questi studi stanno creando un cambiamento epocale nelle terapie oncologiche. Si parla oggi di “terapie agnostiche”, che non guardano più alla localizzazione e all'istotipo del tumore, ma ad alcune alterazioni geniche presenti nelle proteine del tumore da bersagliare con piccole molecole (ad es. *entrectinib* e *larotrectinib* per la fusione genica del recettore della tirosin-chinasi NTRK) o a proteine di membrana (ad es. *pembrolizumab*, un anticorpo monoclonale specifico per il *checkpoint* PD1) (Webster, 2020⁴⁷).

2.5.2. Mutazioni germinali e suscettibilità ereditaria ai tumori

Negli ultimi anni sono state identificate decine di varianti geniche costituzionali in grado di conferire predisposizione all'insorgenza dei tumori (CPG, *Cancer Predisposing Genes*). Questi geni codificano proteine con ruolo in diversi processi cellulari (ad es. alcuni meccanismi del riparo del DNA). Se una persona eredita specifiche varianti del gene *MSH*, avrà 80% di probabilità di ammalarsi di tumore dell'intestino nel corso della vita; se una donna eredita alcune varianti del gene *BRCA1*, avrà una probabilità di ammalarsi di tumore del seno del 90%. Ad oggi, sono noti oltre cento CPG che conferiscono un rischio moderato o elevato o di cancro (da 2 a 20 volte). L'identificazione di mutazioni germinali nei CPG nei pazienti oncologici consente di studiare il rischio d'insorgenza della malattia nei familiari, e di attuare piani di prevenzione secondaria con mezzi diagnostici (ad es. mammografia o colonscopia) o di contenimento del rischio (ad es. aspirina nel tumore del colon) (Wang, 2015⁴⁸).

⁴⁵ Jackson SE, Chester JD¹. Personalised cancer medicine. *Int J Cancer*, 2015;137:262-266. PMID: 24789362

⁴⁶ Hughes PE, Caenepeel S, Wu LC. Targeted Therapy and Checkpoint Immunotherapy Combinations for the Treatment of Cancer. *Trends Immunol*, 2016;37:462-476. PMID 27216414

⁴⁷ Webster RM. Tumour-agnostic therapies . *Nature Reviews Drug Discovery*, Published online: 28 January 2020; doi:10.1038/d41573-020-00015-1

⁴⁸ Wang Q. Cancer predisposition genes: molecular mechanisms and clinical impact on personalized cancer care: examples of Lynch and HBOC syndromes. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2015;37:143-149. PMID: 26616728

Recentemente, sono stati identificati diversi farmaci che agiscono selettivamente sui tumori con mutazioni ereditarie dei CPG: i tumori ereditari della mammella o dell'ovaio con mutazioni germinali di *BRCA1/2* sono sensibili agli inibitori di PARP (ad es. *olaparib*) (Nielsen, 2016⁴⁹); i tumori ereditari non-poliposici del colon (sindrome di Lynch) con mutazioni germinali dei geni del DNA *mismatch repair* (*MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS2*) sono particolarmente sensibili al trattamento con gli inibitori dei *checkpoint* immunologici (Le, 2015⁵⁰); i tumori associati alla poliposi familiare adenomatosa sono particolarmente sensibili agli anti-infiammatori non-steroidi e agli inibitori di *EGFR* (Agarwal, 2014⁵¹; Saglam, 2018⁵²); i tumori dei pazienti con sclerosi tuberosa (astrocitoma a cellule giganti, angiomiolipoma) sono particolarmente sensibili agli inibitori di mTOR (Franz, 2017⁵³).

2.5.3. Sviluppo di tecnologie affidabili per l'analisi genomica nel DNA circolante (biopsia liquida)

La possibilità di analizzare le alterazioni genomiche dei tumori nel DNA circolante ha la potenzialità di modificare radicalmente il nostro approccio alla diagnosi, ma soprattutto al monitoraggio dei trattamenti anti-tumoral. Si stanno mettendo a punto protocolli altamente sensibili e specifici di biopsia liquida, che avranno indicazioni diagnostiche nei pazienti per i quali il tessuto tumorale non sia accessibile (ad es. tumori del SNC), oppure per il follow-up delle terapie e il monitoraggio delle recidive durante e dopo terapie (ad es. per identificare la malattia minima residua dopo terapia chirurgica); infine, per un possibile screening delle persone a rischio di sviluppare neoplasie (Siravegna, 2017⁵⁴).

⁴⁹ Nielsen FC, van Overeem Hansen T, Sørensen CS. Hereditary breast and ovarian cancer: new genes in confined pathways. *Nat Rev Cancer*, 2016;16: 599-612. PMID: 27515922.

⁵⁰ Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, Skora AD, Luber BS, Azad NS, Laheru D, Biedrzycki B, Donehower RC, Zaheer A, Fisher GA, Crocenzi TS, Lee JJ, Duffy SM, Goldberg RM, de la Chapelle A, Koshiji M, Bhajee F, Huebner T, Hruban RH, Wood LD, Cuka N, Pardoll DM, Papadopoulos N, Kinzler KW, Zhou S, Cornish TC, Taube JM, Anders RA, Eshleman JR, Vogelstein B, Diaz LA Jr. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med*, 2015;372:2509-2520. PMID: 26028255

⁵¹ Agarwal R, Liebe S, Turski ML, Vidwans SJ, Janku F, Garrido-Laguna I, Munoz J, Schwab R, Rodon J, Kurzrock R, Subbiah V; Pan-Cancer Working Group. Targeted therapy for hereditary cancer syndromes: hereditary breast and ovarian cancer syndrome, Lynch syndrome, familial adenomatous polyposis, and Li-Fraumeni syndrome. *Discov Med*, 2014;18:331-339. PMID: 25549704

⁵² Saglam O, Conejo-Garcia J. PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors in advanced cervical cancer. *Integr Cancer Sci Ther*, 2018;5. doi: 10.15761/ICST.1000272. Epub 2018 Apr 14. DOI: 10.15761/ICST.1000180

⁵³ Franz DN, Capal JK. mTOR inhibitors in the pharmacologic management of tuberous sclerosis complex and their potential role in other rare neurodevelopmental disorders. *Orphanet J Rare Dis*, 2017;12:51. doi: 10.1186/s13023-017-0596-2. PMID: 28288694

⁵⁴ Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017;14:531-548. PMID: 28252003

2.5.4. Microbiota e tumori

Alcuni studi recenti hanno dimostrato che esistono delle *signature* del microbiota intestinale che correlano con la risposta a *checkpoint* immuno-inibitori. In particolare, il microbiota contribuirebbe allo sviluppo del tumore e alla sua diffusione metastatica. In particolare, sono stati riportati specifici batteri (“signature batteriche”) tipici del microbiota intestinale dei pazienti affetti da cancro del colon. È stata anche suggerita una peculiarità del profilo del microbiota intestinale in diversi tipi di tumore e dei metaboliti generati dal microbiota, che potrebbero essere utilizzati come biomarcatori della risposta alle terapie anti-tumorali (Zitvogel, 2018⁵⁵).

2.5.5. Traslazione della medicina di precisione in oncologia

I punti su cui si misurerà il successo della medicina di precisione in oncologia comprendono:

1. l’aumento significativo del numero dei tumori per i quali si renderanno disponibili terapie molecolari;
2. l’aumento significativo del numero dei pazienti (tra quelli eleggibili) che potranno accedere ai trattamenti molecolari;
3. la sostenibilità per il SSN dei costi dei trattamenti molecolari, attraverso un miglioramento della stratificazione dei pazienti da trattare.

L’implementazione della medicina di precisione in oncologia comporterà la mappatura in tutti i pazienti dei geni (ad oggi circa 100) le cui mutazioni nelle cellule neoplastiche indirizzano verso specifici trattamenti, e delle varianti alleliche che predicono un rischio di tumore. Questa caratterizzazione molecolare potrà essere realizzata su: a) campioni tumorali, al fine di identificare l’*actionable genome* somatico; b) DNA prelevato dal sangue periferico delle persone con tumori familiari, al fine di identificare l’*actionable genome* germinale (Sondka, 2018⁵⁶).

Al momento il sequenziamento dell’intero genoma o dell’intero esoma è ancora troppo costoso (non nell’esecuzione *wet*, ma nell’interrogazione *in silico* dei dati) per uno screening di popolazione e l’approccio iniziale maggiormente indicato appare il sequenziamento di geni selezionati (ad es. sequenziamento di pannelli di geni). Si disporrà quindi di specifici pannelli genici a basso costo (meno di 500 €) in grado di identificare tutte le lesioni geniche rilevanti (CNV, *copy number variants*; SNV, *single nucleotide variants*; traslocazioni) (Payne, 2018⁵⁷).

⁵⁵ Zitvogel L, Ma Y, Raoult D, Kroemer G, Gajewski TF. The microbiome in cancer immunotherapy: Diagnostic tools and therapeutic strategies. *Science*, 2018;359:1366-1370. PMID: 29567708

⁵⁶ Sondka Z, Bamford S, Cole CG, Ward SA, Dunham I, Forbes SA. The COSMIC Cancer Gene Census: describing genetic dysfunction across all human cancers. *Nat Rev Cancer*, 2018;18:696-705. PMID: 30293088

⁵⁷ Payne K, Gavan SP, Wright SJ, Thompson AJ. Cost-effectiveness analyses of genetic and genomic diagnostic tests. *Nat Rev Genet*, 2018;19:235-246. PMID: 29353875

In conclusione, tutti i pazienti con tumori potranno disporre di un percorso diagnostico che, al momento della diagnosi, sarà in grado di identificare contemporaneamente le mutazioni somatiche (per definire la migliore terapia) e le varianti germinali (per identificare il rischio genetico di tumore). In questo modo sarà possibile mappare il rischio di malattia ed avviare lo studio dei familiari dei pazienti portatori di varianti ereditarie dei CPG, con la conseguente implementazione di programmi specifici di prevenzione secondaria.

2.5.6. Database di informazioni cliniche e genomiche

L'integrazione dei dati dei pazienti sarà fondamentale per implementare l'oncologia di precisione, che diventerà sostenibile attraverso:

1. il miglioramento della prevenzione primaria e secondaria,
2. una maggiore efficacia attraverso l'integrazione tra i database mutazionali, contenenti i dati genomici dei pazienti collegati ai dati clinici, e i database dell'*actionability* somatica, in grado di raccogliere le informazioni disponibili sul significato clinico delle alterazioni genomiche somatiche e delle varianti germinali associate al rischio di tumore. Questi database dovrebbero essere integrati al fine di fornire informazioni di supporto alle decisioni cliniche.

Sostenibilità. Si ritiene che la medicina di stratificazione sia economicamente sostenibile e comporti una ridotta tossicità dei trattamenti.

2.6. MALATTIE COMPLESSE

L'integrazione di approcci multiomici (genomica, epigenomica, trascrittomica, proteomica, metabolomica) rappresenta un potente approccio nella comprensione dei meccanismi patogenetici delle malattie multifattoriali (cardiovascolari, neurodegenerative, metaboliche, ecc.). In particolare, tale integrazione contribuisce in maniera significativa a definire il ruolo funzionale dei loci identificati attraverso gli studi di associazione genetica (*Genome Wide Association Studies – GWAS*⁵⁸) e consente di caratterizzare nuove vie metaboliche e possibili bersagli farmacologici. Infine, è la base dei nuovi approcci analitici, come le *network analysis* e il *machine learning*, essenziali per la medicina di precisione. Al momento, l'utilizzo delle tecniche omiche nello studio e nella diagnosi delle malattie multifattoriali è ancora prevalentemente in una fase di ricerca, anche se alcuni modelli sono già stati trasferiti nella pratica clinica.

2.6.1. Malattie cardiovascolari

Le patologie cardiovascolari (CVD) comprendono un gruppo eterogeneo di condizioni cliniche, come le coronaropatie (*Coronary Artery Disease* o CAD), le cardiomiopatie, l'ictus. L'integrazione delle tecniche -

⁵⁸ GWAS Catalog. <https://www.ebi.ac.uk/gwas/>

omiche in questo ambito della medicina è critica per comprenderne i meccanismi patogenetici. Esempi della loro integrazione nell'ambito cardiovascolare comprendono il locus 9p21 (Jarinova, 2009⁵⁹), che i GWAS hanno associato alla CAD (McPherson, 2007⁶⁰; Wang, 2011⁶¹) e la regione del cluster genico CELSR2-PSRC1-MYBPHL-SORT sul cromosoma 1p13.3, associato ai livelli delle lipoproteine a bassa densità (LDL-C) e al rischio cardiovascolare (Willer, 2008⁶²; Kathiresan, 2008⁶³).

Un esempio affascinante, a livello di popolazione, è lo studio GeneRISK⁶⁴, che ha riguardato i fattori di rischio genetico delle malattie cardiovascolari e l'uso delle informazioni genetiche per la loro prevenzione. Questo studio, realizzato negli anni 2015-2018 in diverse regioni della Finlandia, ha coinvolto 7.321 partecipanti e il loro follow-up è tuttora in corso. Utilizzando i dati -omici sono stati definiti vari punteggi di rischio poligenico (*Polygenic Risk Scores* - PRS), che sono stati comunicati e spiegati ai partecipanti attraverso una consulenza. I PRS sono stati costruiti utilizzando numerosi loci di rischio genetico, spesso identificati mediante GWAS, nella popolazione studiata. Utilizzando i PRS è possibile prevedere il rischio di malattia in una popolazione indipendente, fare diagnosi presintomatiche e definire prognosi accurate. A distanza di un anno e mezzo dalla comunicazione dei PRS, l'89% dei partecipanti ha dichiarato di avere compreso le informazioni ricevute, il 90% ha affermato che erano state molto utili, il 97% ha ritenuto molto importante conoscere il proprio PRS e comprendere il rischio cardiovascolare, così da modificare gli stili di vita. Gli effetti più significativi di questa conoscenza, tra i partecipanti che presentavano un rischio superiore al 10%, hanno riguardato le scelte di dimagrire, smettere di fumare e consultare il medico.

⁵⁹ Jarinova O, Stewart AF, Roberts R, Wells G, Lau P, Naing T, Buerki C, McLean BW, Cook RC, Parker JS, McPherson R. Functional analysis of the chromosome 9p21.3 coronary artery disease risk locus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:1671-1677.

⁶⁰ McPherson R, Pertsemidis A, Kavaslar N, Stewart A, Roberts R, Cox DR, Hinds DA, Pennacchio LA, Tybjaerg-Hansen A, Folsom AR, Boerwinkle E, Hobbs HH, Cohen JC. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science* 2007;316:1488-1491.

⁶¹ Wang F, Xu CQ, He Q, Cai JP, Li XC, Wang D, Xiong X, Liao YH, Zeng QT, Yang YZ, Cheng X, Li C, Yang R, Wang CC, Wu G, Lu QL, Bai Y, Huang YF, Yin D, Yang Q, Wang XJ, Dai DP, Zhang RF, Wan J, Ren JH, Li SS, Zhao YY, Fu FF, Huang Y, Li QX, Shi SW, Lin N, Pan ZW, Li Y, Yu B, Wu YX, Ke YH, Lei J, Wang N, Luo CY, Ji LY, Gao LJ, Li L, Liu H, Huang EW, Cui J, Jia N, Ren X, Li H, Ke T, Zhang XQ, Liu JY, Liu MG, Xia H, Yang B, Shi LS, Xia YL, Tu X, Wang QK. Genome-wide association identifies a susceptibility locus for coronary artery disease in the Chinese Han population. *Nat Genet.* 2011;43:345-349

⁶² Willer CJ, Sanna S, Jackson AU, Scuteri A, Bonnycastle LL, Clarke R, Heath SC, Timpson NJ, Najjar SS, Stringham HM, Strait J, Duren WL, Maschio A, Busonero F, Mulas A, Albai G, Swift AJ, Morken MA, Narisu N, Bennett D, Parish S, Shen H, Galan P, Meneton P, Hercberg S, Zelenika D, Chen WM, Li Y, Scott LJ, Scheet PA, Sundvall J, Watanabe RM, Nagaraja R, Ebrahim S, Lawlor DA, Ben-Shlomo Y, Davey-Smith G, Shuldiner AR, Collins R, Bergman RN, Uda M, Tuomilehto J, Cao A, Collins FS, Lakatta E, Lathrop GM, Boehnke M, Schlessinger D, Mohlke KL, Abecasis GR. Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nat Genet.* 2008;40:161-169.

⁶³ Kathiresan S, Melander O, Guiducci C, Surti A, Burt NP, Rieder MJ, Cooper GM, Roos C, Voight BF, Havulinna AS, Wahlstrand B, Hedner T, Corella D, Tai ES, Ordovas JM, Berglund G, Vartiainen E, Jousilahti P, Hedblad B, Taskinen MR, Newton-Cheh C, Salomaa V, Peltonen L, Groop L, Altshuler DM, Orho-Melander M. Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. *Nat Genet.* 2008 Feb;40(2):189-97. doi:10.1038/ng.75. Epub 2008 Jan 13.

⁶⁴ GeneRISK. <https://thl.fi/en/web/thl-biobank/for-researchers/sample-collections/generisk-study>.

L'impiego delle tecnologie -omiche consente di caratterizzare in maniera molto accurata, a livello molecolare, i tessuti patologici, e di integrare questi dati con quelli clinici e strumentali. Già oggi, la disponibilità del tessuto patologico, o di una biopsia liquida, nei pazienti affetti da una malattia oncologica, consente di personalizzare le terapie, integrando i dati genomici, di laboratorio, clinici e strumentali (ad es. diagnostica per immagini). Tuttavia, in ambito cardiovascolare questa *pipeline* ha ancora limitate applicazioni pratiche, a causa delle difficoltà di acquisizione del tessuto cardiaco, dato che la biopsia endomiocardica rimane essenzialmente limitata ai trapianti o ai soggetti con grave insufficienza cardiaca, in presenza di un forte sospetto di miocardite. La biopsia liquida del cuore viene comunque già utilizzata nella clinica per monitorare la presenza di lesioni miocardiche o di infarto attraverso la misurazione dei livelli di troponina. Nel lungo periodo, l'impiego diagnostico e prognostico della biopsia liquida per la caratterizzazione accurata dei genotipi dipenderà dalla capacità di analizzare le cellule circolanti tessuto-specifiche, i biomarcatori circolanti organo-specifici, come i microRNA e il DNA libero provenienti dalle cellule sane e malate e perciò con profili genomici diversi. In prospettiva, queste indagini potranno essere integrate con i profili epigenetici, ad esempio la metilazione del DNA, l'organizzazione della cromatina e i microRNA, che si stanno rivelando informativi nella patologia cardiovascolare.

2.6.2. Malattie neurodegenerative

Le patologie neurodegenerative dell'adulto comprendono malattie a crescente prevalenza nella popolazione anziana. Sebbene le malattie neurodegenerative legate all'età, come la malattia di Alzheimer (AD), il Parkinson (PD), la demenza fronto-temporale (FTLD) e la sclerosi laterale amiotrofica (SLA) differiscano nelle caratteristiche cliniche, tutte condividono la degenerazione progressiva dei neuroni, che causa deficit cognitivi, progressiva disabilità intellettiva, alterazioni della funzione motoria e del controllo emotivo. Condividono anche la mancanza di terapie in grado di modificare significativamente la progressione della malattia e la mancanza di strumenti di diagnosi precoce e di definizione della prognosi. Le tecnologie -omiche sono potenzialmente in grado di identificare possibili *signature* molecolari/-omiche sulle cellule, sui tessuti e sul materiale autoptico dei pazienti. Gli studi GWAS hanno già identificato numerosi loci/varianti associate alle patologie neurodegenerative. Ad esempio, gli studi funzionali sul locus *TMEM106B*, correlato alla FTLD con inclusioni TDP-43 (FTLD-TDP) (Van Deerlin, 2010⁶⁵) hanno permesso di associare alcuni genotipi a quadri

⁶⁵ Van Deerlin VM1, Sleiman PM, Martinez-Lage M, Chen-Plotkin A, Wang LS, Graff-Radford NR, Dickson DW, Rademakers R, Boeve BF, Grossman M, Arnold SE, Mann DM, Pickering-Brown SM, Seelaar H, Heutink P, van Swieten JC, Murrell JR, Ghetti B, Spina S, Grafman J, Hodges J, Spillantini MG, Gilman S, Lieberman AP, Kaye JA, Woltjer RL, Bigio EH, Mesulam M, Al-Sarraj S, Troakes C, Rosenberg RN, White CL 3rd, Ferrer I, Lladó A, Neumann M, Kretschmar HA, Hulette CM, Welsh-Bohmer KA, Miller BL, Alzualde A, Lopez de Munain A, McKee AC, Gearing M, Levey AI, Lah JJ, Hardy J, Rohrer JD, Lashley T, Mackenzie IR, Feldman HH, Hamilton RL, Dekosky ST, van der Zee J, Kumar-Singh S, Van Broeckhoven C, Mayeux R, Vonsattel JP, Troncoso JC, Kril JJ, Kwok JB, Halliday GM, Bird TD, Ince PG, Shaw PJ, Cairns NJ, Morris JC, McLean CA, DeCarli C, Ellis WG, Freeman SH, Frosch MP, Growdon JH, Perl DP, Sano M, Bennett DA, Schneider JA, Beach TG, Reiman EM, Woodruff BK, Cummings J, Vinters HV, Miller CA, Chui HC, Alafuzoff I, Hartikainen P, Seilhean D, Galasko D, Masliah E, Cotman CW, Tuñón MT, Martínez MC, Munoz DG, Carroll SL, Marson D, Riederer PF, Bogdanovic

clinici a prognosi peggiore e ad un più rapido declino cognitivo (Tropea, 2019⁶⁶). Sono state anche identificate associazioni tra alcune varianti di questo locus e la compromissione cognitiva dei pazienti affetti da SLA (Vass, 2011⁶⁷) e da PD (Van Deerlin, 2019⁶⁵). Questi dati -omici possono essere utilizzati per definire i cosiddetti PRS, analogamente a quanto avviene per la patologia cardiovascolare. Un esempio significativo riguarda il PD dove il calcolo dei PRS su 1.805 varianti ha permesso di definire una *Receiver Operating Curve* (ROC - AUC) di 0,692 (Ibanez, 2019⁶⁸).

2.6.3. Diabete

La medicina di precisione del diabete si è concentrata prevalentemente sull'identificazione di varianti del DNA identificate mediante studi GWAS, anche se è noto che esse spiegano solo una frazione della variabilità individuale. Per un approccio personalizzato alla gestione dei pazienti diabetici è necessario:

1. comprendere come i diversi quadri clinici rispondano ai farmaci ed influenzino il decorso della malattia;
2. identificare le *signature* molecolari/omiche per stratificare i diversi gruppi clinici e conoscerne la prognosi;
3. dimostrare che l'aumento delle conoscenze relative ai due precedenti punti porterà realmente ad un cambiamento nella gestione del paziente diabetico e a migliorarne la terapia e la prognosi.

Relativamente al primo punto, la farmacogenomica sta producendo risultati clinicamente importanti. Sono significativi gli esempi della sensibilità alla sulfonilurea nei pazienti con diabete MODY (*HNF1A*) ad esordio giovanile; la sensibilità alla sulfonilurea nei pazienti con diabete di tipo 2, in presenza di varianti a funzione ridotta del citocromo P450 2C9 (gene *CYP2C9*) e conseguente riduzione del metabolismo delle sulfoniluree; l'alta tolleranza farmacologica (cioè la ridotta risposta al farmaco) alla metformina associata alle varianti a funzione ridotta del trasportatore dei cationi organici (*OCT1*), un quadro potenzialmente inducibile e/o aggravabile con l'impiego di farmaci che inibiscono *OCT1*.

N, Schellenberg GD, Hakonarson H, Trojanowski JQ, Lee VM. Common variants at 7p21 are associated with frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 inclusions. *Nat Genet*, 2010;42:234-239.

⁶⁶ Tropea TF, Mak J, Guo MH, Xie SX, Suh E, Rick J, Siderowf A, Weintraub D, Grossman M, Irwin D, Wolk DA, Trojanowski JQ, Van Deerlin V, Chen-Plotkin AS. TMEM106B effect on cognition in Parkinson disease and Frontotemporal dementia. *Ann. Neurol*. 2019, 85, 801-811.

⁶⁷ Vass R, Ashbridge E, Geser F, Hu WT, Grossman M, Clay-Falcone D, Elman L, McCluskey L, Lee VM, Van Deerlin VM, Trojanowski JQ, Chen-Plotkin AS. Risk genotypes at TMEM106B are associated with cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*. 2011;121:373-380.

⁶⁸ Ibanez L, Farias FHG, Dube U, Mihindukulasuriya KA, Harari O. Polygenic Risk Scores in Neurodegenerative Diseases: a Review, *Current Genetic Medicine Reports*, 2019;7:22-29.

Per quanto riguarda il secondo punto, i progressi tecnologici consentono oggi di affrontare problematiche molto più complesse che tengono conto dell'epigenetica, compresa quella tessuto-specifica (epigenomica), dell'espressione genica (trascrittomica) e dell'integrazione di questi dati di espressione con le esposizioni ambientali e farmacologiche, che possono essere evidenziate con analisi su larga scala dei metaboliti (metabolomica) e delle proteine (proteomica). Le alterazioni del profilo metabolomico di un individuo (metabotipo), associato alla terapia (farmacometabolomica), è uno dei tratti distintivi della medicina di precisione, in quanto il metabotipo può contribuire a definire in maniera più accurata la risposta farmacologica e persino l'eterogeneità della malattia. Sono già disponibili diversi esempi illustrativi in neonatologia, in pediatria e in psichiatria.

Esiste un crescente interesse nei confronti del ruolo svolto dal microbioma intestinale nel metabolismo dei farmaci (Li, 2015⁶⁹). Un esempio illustrativo riguarda la sua relazione con la digossina e la cardiotoxicità, considerato che circa il 10% della popolazione viene colonizzato con un batterio anaerobico intestinale, *Eubacterium lentum*, che metabolizza e inattiva oltre il 40% della digossina assunta, prima del suo assorbimento. La co-somministrazione di antibiotici che interrompono questa inattivazione provoca cardiotoxicità (Lindenbaum, 1981⁷⁰). Relativamente al diabete, è stato dimostrato che la metformina svolge un ruolo nell'intestino, alterando il microbioma così da spiegare almeno parte delle problematiche dell'efficacia e dell'intolleranza associate al suo utilizzo (Sun, 2018⁷¹). Lo studio del microbioma e del metaboloma associato all'ospite, in relazione alla risposta alla metformina, rappresenta quindi un'area di crescente interesse ed alcuni studi hanno già valutato con successo l'impatto di un modulatore del microbioma sull'intolleranza alla metformina (Burton, 2015⁷²).

2.7. FARMACOGENETICA

L'attività degli enzimi che metabolizzano i farmaci varia notevolmente da soggetto a soggetto sia a causa di fattori generali (età, sesso, stato infiammatorio, etc.), che per cause genetiche, ovvero la presenza di varianti nel DNA che fa sì che soggetti diversi metabolizzino più o meno velocemente ed efficacemente i farmaci. Queste variazioni farmacogenetiche (ad es. acetilazione, idrolisi, ossidazioni o altre reazioni che metabolizzano i farmaci) portano a rilevanti conseguenze cliniche. Ad esempio, i pazienti che metabolizzano

⁶⁹ Li H, Jia W. Cometabolism of microbes and host: implications for drug metabolism and drug-induced toxicity. *Clin Pharmacol Ther*, 2013;94:574-581.

⁷⁰ Lindenbaum J, Rund DG, Butler VP Jr, Tse-Eng D, Saha JR. Inactivation of digoxin by the gut flora: reversal by antibiotic therapy. *N Engl J Med*, 1981;305:789-94.

⁷¹ Sun L, Xie C, Wang G, Wu Y, Wu Q, Wang X, Liu J, Deng Y, Xia J, Chen B, Zhang S, Yun C, Lian G, Zhang X, Zhang H, Bisson WH, Shi J, Gao X, Ge P, Liu C, Krausz KW, Nichols RG, Cai J, Rimal B, Patterson AD, Wang X, Gonzalez FJ, Jiang C. Gut microbiota and intestinal FXR mediate the clinical benefits of metformin. *Nat Med*. 2018;24:1919-1929.

⁷² Burton JH, Johnson M, Johnson J, Hsia DS, Greenway FL, Heiman ML. Addition of a gastrointestinal microbiome modulator to Metformin improves Metformin tolerance and fasting glucose levels. *J Diabetes Sci Technol*. 2015;9:808-814.

alcuni farmaci velocemente possono richiedere dosi maggiori o più frequenti per raggiungere adeguate concentrazioni terapeutiche. Uno degli esempi più noti riguarda la warfarina (acenocumarolo), che ancora oggi rappresenta il trattamento anticoagulante più comune nella pratica medica. È da tempo nota una notevole variabilità nella risposta al farmaco, che in alcuni soggetti determina gravi complicazioni emorragiche che possono portare a morte il paziente. Questa variabilità nella risposta individuale alla warfarina dipende da alcune varianti (polimorfismi) nella sequenza in due geni, *CYP2C9* e *VKORC1*. Il primo codifica per un citocromo appartenente al complesso del citocromo P450 ed alcune sue varianti (*CYP2C9*2* e *CYP2C9*3*) si associano ad una minore degradazione della warfarina, che, rimanendo in circolo più a lungo, protrae il suo effetto. Invece, il gene *VKORC1* codifica per un bersaglio enzimatico della vitamina K (vitamina K-epossido-reduttasi) sul quale la warfarina esercita un'azione inibitoria. Se nella sequenza del gene *VKORC1* è presente un polimorfismo (-1639G>A) ne consegue un minore effetto coagulante. Pertanto la presenza di queste varianti nei geni *CYP2C9* e *VKORC1*, e, ancor più, la loro presenza simultanea, causa un aumento del rischio emorragico nei soggetti in terapia con la warfarina, richiedendo, di fatto, l'impiego di dosi più basse di farmaco. Un altro esempio è quello dell'azatioprina, farmaco per il quale ora viene regolarmente analizzato il genotipo della tiopurina metiltransferasi al fine di determinare la dose iniziale più appropriata.

2.8. METABOLOMICA

La metabolomica fornisce una misura quantitativa dei metaboliti a basso peso molecolare presenti in una cellula, tessuto, organo o in un organismo. Viene anche definita come la misura dinamica della risposta multiparametrica di un organismo vivente ad una perturbazione fisiopatologica o ad una variazione genica (Nicholson, 2008⁷³). Consente di ottenere un profilo che rappresenta lo stato effettivo metabolico dell'organismo nel contesto ambientale. Infatti, il metaboloma, ovvero l'insieme dei metaboliti presenti nel sistema studiato è molto sensibile alle variazioni dell'ambiente. Di conseguenza il profilo metabolico ottenuto da liquidi biologici umani o animali (ad es. urina, plasma, saliva, feci) o da estratti cellulari microbici, vegetali o animali, rappresenta il fenotipo metabolico risultante dalla funzione del genoma nel particolare contesto ambientale (Miccheli, 2015⁷⁴). L'analisi metabolomica può procedere secondo due approcci, in maniera *targeted* (mirata) o *untargeted* (non mirata). Nel primo caso, che generalmente si utilizza quando si conoscono almeno alcune delle specie che potenzialmente svolgono un ruolo chiave nello sviluppo di alcune funzionalità o processi biologici, o se ne sospetti comunque a priori la possibile importanza in una data patologia, le determinazioni sperimentali sono incentrate esclusivamente nella ricerca e nella quantificazione di tali sostanze. Al contrario, nell'approccio *untargeted* si sfrutta la possibilità di operare un profilo quanto più possibile completo del sistema dei metaboliti di interesse attraverso tecniche strumentali analitiche ad

⁷³ Nicholson JK, Lindon JC. Systems biology: metabonomics. *Nature*, 2008,455:1054-1056.

⁷⁴ Miccheli A, Marini F. Scienze omiche. *Enciclopedia Italiana*, IX Appendice, Treccani, 2015.

elevato rendimento di informazioni (*high throughput*) e, per definire il ruolo e l'importanza delle diverse specie, si impiegano elaborazioni statistiche di natura multivariata (Miccheli, 2015⁷³).

2.8.1 Malattie rare del metabolismo

Le malattie congenite del metabolismo (IEM) sono patologie genetiche ereditarie, con incidenze variabili, spesso rare, dovute alla totale o parziale assenza o ridotta attività di un enzima, di una proteina strutturale o di un trasportatore (Sanderson, 2006⁷⁵). Una recente classificazione ha suddiviso le IEM in due principali categorie:

1. malattie metaboliche che coinvolgono un solo sistema funzionale o un solo organo;
2. malattie metaboliche caratterizzate da difetti biochimici che influenzano una via metabolica comune a numerose cellule/organi, oppure ristretta ad un organo, che dà origine ad una malattia sistemica (Saudubray, 2018⁷⁶). Questa seconda categoria è stata successivamente suddivisa in tre classi: malattie del metabolismo intermedio che influenzano i livelli di piccole molecole (ad es. il catabolismo degli amminoacidi); malattie che coinvolgono prevalentemente il metabolismo energetico (ad es. malattie mitocondriali); malattie che coinvolgono molecole complesse (ad es. difetti lisosomiali o perossisomiali).

Generalmente, lo studio e la diagnosi delle IEM si eseguono mediante analisi biochimiche mirate (“targeted”), su sangue o urine, utilizzando protocolli dedicati.

Il SSN si è dotato di “Disposizioni per l'avvio dello screening neonatale per la diagnosi precoce delle malattie metaboliche ereditarie” (G.U. 267 del 15-11-2016), che individuano metodiche analitiche, basate sulla spettrometria di massa tandem (MS/MS), applicate su spot di sangue, per effettuare lo screening neonatale esteso. In base alla classificazione in aminoacidopatie, acidemie organiche, disturbi del ciclo dell'urea e disturbi dell'ossidazione degli acidi grassi, le analisi sono indirizzate sui metaboliti bioindicatori (*biomarkers*) del difetto enzimatico. Tuttavia, gli stessi biomarcatori possono essere condivisi da patologie metaboliche diverse e perciò è necessario procedere in un secondo momento con tecniche in grado di effettuare diagnosi differenziali.

Un singolo biomarcatore o un insieme di due metaboliti possono fungere da biomarcatori per più di una IEM. Ad esempio, la metionina e i livelli di cisteina sono utilizzati per la diagnosi di omocistinuria, deficit di metionina adenosiltransferasi e deficit di adenosilomocisteina idrolasi. I livelli di istidina vengono utilizzati per la diagnosi di istidinemia e deficienza di formiminotransferasi (Shlomi, 2009⁷⁷). Nonostante l'indubbio

⁷⁵ Sanderson S, Green A, Preece MA, Burton H. The incidence of inherited metabolic disorders in the West Midlands, UK. *Arch Dis Child*, 2006;91:896-899.

⁷⁶ Saudubray JM, Garcia-Cazorla A. Inborn errors of metabolism overview: pathophysiology, manifestations, evaluation and management. *Pediatr Clin North Am*, 2018;65:179-208.

⁷⁷ Shlomi T, Cabili MN, Ruppin E. Predicting metabolic biomarkers of human inborn errors of metabolism. *Mol Syst Biol*, 2009;5:263.

valore e l'indiscutibile ruolo dello screening neonatale esteso effettuato con metodiche mirate (*targeted*), si sta valutando la potenzialità delle tecniche metabolomiche *untargeted* per migliorare la potenza dello screening, in particolare nel caso di IEM con maggiore difficoltà diagnostica (Mussap, 2018⁷⁸). Ad esempio, le malattie da accumulo lisosomiale hanno un alto grado di variabilità fenotipica e genetica e sono multisistemiche. La malattia di Fabry, causata da una deficienza dell'enzima α -galattosidasi-A, mette a dura prova lo screening diagnostico: l'analisi LC/MS *targeted* identifica un accumulo di due intermedi, liso-GB₃ e GB₃, mentre uno studio metabolomico *untargeted* ha dimostrato la presenza di 20 isoforme di GB₃, associate a quadri clinici di diversa gravità e prognosi (Boutin, 2014⁷⁹). L'analisi metabolomica *untargeted* è stata proposta come tecnica di affiancamento alle metodiche in uso nello screening neonatale esteso (Ismail, 2002⁸⁰).

2.9. PROTEOMICA

L'altra principale scienza -omica che studia la funzione dei sistemi cellulari è la proteomica. Questa disciplina si occupa di identificare e quantificare le proteine e loro modificazioni post-traduzionali, reversibili e non, presenti in un proteoma, ossia un sistema biologico semplice o complesso (preparati cellulari, campioni umani o animali diretti, campioni umani o derivati [arricchiti], campioni ambientali o alimentari), mediante metodi biofisici e biochimici. Dato che le proteine sono coinvolte in quasi tutte le attività biologiche, il proteoma è una fonte fondamentale di informazioni per la comprensione della biologia delle cellule, dei tessuti, degli organismi, e, quindi, per identificare potenziali biomarcatori per lo screening e la diagnosi delle malattie, per monitorarne il trattamento ed esplorarne i possibili meccanismi patogenetici. Ne deriva la necessità di sviluppare sia la proteomica traslazionale che quella clinica, in particolare allo scopo di differenziare il proteoma delle cellule sane e di quelle ammalate, per individuare proteine potenzialmente utilizzabili come marker precoci nel sangue, nell'urina o nei tessuti neoplastici, o che siano in grado di predire la risposta alla terapia o la probabilità di recidive dopo un trattamento. In questo contesto, è fondamentale il ruolo svolto dalle nuove piattaforme proteomiche, soprattutto dalle tecniche analitiche separative, quali la cromatografia, in particolare la gascromatografia e la cromatografia in fase liquida (*high pressure liquid chromatography*, HPLC), e dalla spettrometria di massa (SM), il metodo analitico che, ionizzando le molecole di un campione biologico attraverso un fascio di elettroni ad energia nota (campo magnetico), permette di identificare e quantizzare gli ioni prodotti in funzione del loro rapporto massa/carica, secondo un profilo

⁷⁸ Mussap M, Zaffanello M, Fanos V. Metabolomics: a challenge for detecting and monitoring inborn errors of metabolism. *Ann Transl Med*, 2018;67:338.

⁷⁹ Boutin M, Auray-Blais C. Multiplex tandem mass spectrometry analysis of novel plasma lyso-Gb(3)-related analogues in Fabry disease. *Anal Chem*, 2014;86:3476-3483.

⁸⁰ Ismail IT, Showalter MR, Fiehn O. Inborn errors of metabolism in the era of untargeted metabolomics and lipidomics. *Metabolites*, 2020 Jan 6;10(1). pii: E25.

direttamente associabile alla loro struttura chimica. Fondamentalmente, un esperimento proteomico basato sulla SM consiste nell'estrarre e nel purificare le proteine dalle matrici, nell'analisi diretta (approccio *top-down*) o nella digestione enzimatica (approccio *bottom-up*), nella separazione opzionale delle proteine/peptidi basata sulla cromatografia liquida, nel rilevamento in massa e in intensità delle proteine/peptidi e dei loro frammenti indotti dalla SM, e nell'identificare e nel quantificare le proteine mediante analisi di dati *de novo* o su database (Aebersold, 2003⁸¹).

La sfida attuale consiste nel ridurre le difficoltà tecniche e nel colmare il divario tra le modalità di scoperta dei potenziali biomarcatori e la loro determinazione quantitativa nella pratica clinica. Per accelerare la scoperta e l'utilizzo di biomarcatori clinicamente utili, è necessario perciò spostare l'attenzione dalla loro identificazione alla loro quantificazione, relativa ed assoluta, in base alla complessità del campione e alla variabilità della matrice (Domon, 2010⁸²). Rafforzare quest'aspetto consente di migliorare la precisione delle misurazioni e rendere i dati proteomici interscambiabili tra i laboratori (Oeckl, 2018⁸³; Shuford, 2017⁸⁴). Nuove strategie per la calibrazione esterna, mediante standard condivisi tra i laboratori, permetteranno di correggere le distorsioni derivanti dall'eterogeneità dei campionamenti o degli strumenti, nel monitoraggio di ogni esperimento di spettrometria di massa (Pino, 2018⁸⁵). Inoltre, la crescente disponibilità di banche dati pubbliche di spettrometria di massa e l'uso sempre più frequente di librerie spettrali sta migliorando l'identificazione delle proteine, anche quando si utilizzano processi di caratterizzazione su larga scala (*proteome profiling shot gun*), in modalità processiva e sistematica sia nello spazio (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry imaging*, *MALDI TOF MS imager*; *single cell proteomics*), che nel tempo (processo di *data-dependent acquisition*, DDA). In questa modalità, lo spettrometro di massa seleziona gli ioni più intensi, che vengono poi frammentati ed analizzati nella cosiddetta fase di *SM tandem*. Viceversa, nella modalità *data independent acquisition* (DIA) vengono frammentati tutti i precursori in una certa massa e si acquisiscono tutti i dati di massa, come nella metodologia SWATH (*Sequential Windowed Acquisition of All Theoretical Fragment ions*), in cui la SM divide il range di massa selezionato in piccole finestre per l'analisi dei precursori, producendo un *time-resolved recording* degli ioni frammentati di tutti i precursori peptidi eluiti in base alla cromatografia. L'analisi dei dati in modalità DIA è particolarmente complessa per l'alta eterogeneità degli spettri associati ai vari ioni generati

⁸¹ Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 2003; 422:198-207.

⁸² Domon B, Aebersold R. Options and considerations when selecting a quantitative proteomics strategy. *Nat. Biotechnol*, 2010;28:710-721.

⁸³ Oeckl P, Steinacker P, Otto M. Comparison of internal standard approaches for SRM analysis of alpha-synuclein in cerebrospinal fluid. *J Proteome Res*, 2018;17:516-523

⁸⁴ Shuford CM, Walters JJ, Holland PM, Sreenivasan U, Askari N, Ray K, Grant RP. Absolute protein quantification by mass spectrometry: not as simple as advertised. *Anal Chem*, 2017;89:7406-7415.

⁸⁵ Pino LK, Searle BC, Huang EL, Noble WS, Hoofnagle AN, MacCoss MJ. Calibration using a single-point external reference material harmonizes quantitative mass spectrometry proteomics data between platforms and laboratories. *Anal Chem*, 2018;90:13112-13117.

(Hu, 2016⁸⁶; Gillet, 2012⁸⁷), ma nuovi *software* possono risolvere molti problemi, compresa la selezione dei falsi positivi e dei falsi negativi e la deconvoluzione degli spettri complessi. L'analisi SWATH è attualmente impiegata per l'identificazione e la quantificazione proteomica su larga scala, traendo vantaggio dalla crescente disponibilità di librerie spettrali, con il vantaggio di ridurre notevolmente il tempo e lo spazio computazionale. Per questa ragione, gli approcci che utilizzano analisi indipendenti dei dati sembrano promettenti per le future applicazioni rivolte all'uso della proteomica clinica per scoprire nuovi biomarcatori. Questi approcci consentono di ottenere una proteomica di precisione, la punta più avanzata della medicina di precisione.

2.10. INTEGRAZIONE DEI DATI OMICI PER LA FENOTIPIZZAZIONE PROFONDA NELLA MEDICINA DI PRECISIONE

Le tecniche -omiche consentono la valutazione complessiva dei geni/trascritti/proteine/metaboliti dei sistemi biologici in specifiche condizioni fisiopatologiche e in tempi diversificati. Questo approccio di "medicina dei sistemi", ottenuto con la generazione, l'armonizzazione e l'integrazione dei dati -omici, è in grado di decodificare, attraverso l'integrazione dei metadati di un soggetto, le malattie complesse, cosiddette multifattoriali. Tuttavia, dato che le attività cellulari di proliferazione, metabolismo, risposta ai nutrienti e ai patogeni possono rappresentare una risposta dell'interazione tra l'ospite e l'esposoma (Putignani, 2016⁸⁸; Putignani, 2019⁸⁹), il microbiota intestinale, che svolge un ruolo di modulazione funzionale dei geni in condizioni fisiologiche e patologiche, dovrebbe essere considerato come tratto enterofenotipico, potenzialmente informativo nel valutare le variabili individuali rivolte alla definizione della malattia.

2.11. MICROBIOMA E MICROBIOMICA

L'intestino umano è un complesso sistema ecologico composto da cellule procariotiche ospiti e simbiotiche, che svolge un ruolo centrale nella salute. I virus, i miceti e i parassiti eucariotici intestinali (cioè i protozoi e gli elminti) sono gli altri componenti di questa comunità coevoluta con l'ospite, in grado di modificare la composizione/attività dei microbi intestinali attraverso molecole escrete/secrete oppure evocando una risposta dal sistema immunitario dell'ospite. Allo stesso tempo, i batteri possono esercitare effetti profondi sulla fisiologia e sulla sopravvivenza degli altri componenti della nicchia ecologica intestinale. Si instaura così

⁸⁶ Hu A, Noble W S, Wolf-Yadlin A. Technical advances in proteomics: new developments in data-independent acquisition. *F1000Research*, 2016; 5:F1000 Faculty Rev-419.

⁸⁷ Gillet L C, Navarro P, Tate S, Röst H, Selevsek N, Reiter L, Bonner R, Aebersold R. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol Cell Proteomics*, 2012;11:O111. 016717.

⁸⁸ Putignani L, Dallapiccola B. Foodomics as part of the host-microbiota-exposome interplay. *J Proteomics*, 2016;16:147:3-20.

⁸⁹ Putignani L, Gasbarrini A, Dallapiccola B. Potential of multiomics technology in precision medicine. *Curr Opin Gastroenterol*, 2019;35:491-498.

un complesso equilibrio dinamico ecologico-funzionale che, in condizioni di equilibrio, caratterizza lo stato di eubiosi intestinale di un soggetto sano, e, in risposta agli stimoli ambientali di varia natura, si modifica verso la disbiosi.

Le *pipeline* dei dati metagenomici, sviluppate per lo studio dei procarioti, sono diventate strumenti fondamentali per l'annotazione del DNA eucariotico delle comunità del microbiota intestinale, compresi il micoma (lieviti e funghi filamentosi), i parassiti protozoi e i nematodi (parassitoma), e il viroma. I dati metagenomici disponibili provenienti dagli studi effettuati in aree geografiche ed etnie diverse possono essere utilizzati per produrre profili standard di microbioma di popolazioni sane, che sono alla base dell'identificazione degli indici di disbiosi associati a specifici quadri patologici.

Accanto ai profili metagenomici, sono fondamentali i profili metaproteomici, che permettono di descrivere gli *scaffold* proteici associati alle popolazioni microbiche attive, e le classi di proteine e le vie metaboliche iper- o ipo-rappresentate, associate ai diversi microbiomi intestinale (Levi Mortera, 2019⁹⁰; Levi Mortera, 2016⁹¹).

L'integrazione tra i dati -omici e il profilo metaomico nell'interazione ospite-microbiota-ambiente può fornire un quadro completo per decodificare il fenotipo delle malattie semplici o complesse, ed è in grado di identificare marcatori diagnostici. La microbiomica si è perciò imposta come disciplina dedicata allo studio della fisiopatologia del microbioma, alla sua modulazione e al suo impatto sulla salute e su specifiche malattie, compresa la risposta alle terapie.

2.12. INTEGRAZIONE DEI DATI OMICI E METAOMICI PER LA FENOTIPIZZAZIONE PROFONDA

I dati -omici derivanti dall'ospite, fusi con quelli metaomici provenienti dalla microbiomica nei sistemi basati sul *machine learning* consentono di produrre modelli che evolvono in base ai dati inseriti, fornendo algoritmi sempre più completi di *clinical decision support system* (CDSS) per ogni specifica patologia

⁹⁰ Levi Mortera S, Soggiu A, Vernocchi P, Del Chierico F, Piras C, Carsetti R, Marzano V, Britti D, Urbani A, Roncada P, Putignani L. Metaproteomic investigation to assess gut microbiota shaping in newborn mice: a combined taxonomic, functional and quantitative approach. *J Proteomics*, 2019; 203:103378.

⁹¹ Levi Mortera S, Del Chierico F, Vernocchi P, Rosado MM, Cavola A, Chierici M, Pieroni L, Urbani A, Carsetti R, Lante I, Dallapiccola B, Putignani L. Monitoring perinatal gut microbiota in mouse models by mass spectrometry approaches: parental genetic background and breastfeeding effects. *Front Microbiol*, 2016;7:1523. eCollection 2016.

2.13 MALATTIE INFETTIVE

Introduzione

Il 15% dei decessi annuali nel mondo è direttamente attribuibile alle malattie infettive (WHO⁹²). L'aumento di agenti patogeni resistenti ai farmaci, la rapida diffusione delle malattie emergenti e riemergenti, favorite da un'estesa globalizzazione e la diffusione considerevole delle cosiddette malattie tropicali trasmesse dai vettori, a causa dei continui cambiamenti climatici, stanno mettendo un crescente numero di persone a rischio di infezioni acute o croniche potenzialmente letali. Pertanto, l'infettivologia deve affrontare sfide che richiedono una rivoluzione nella capacità di comprendere rapidamente, scoprire e sviluppare nuovi sistemi profilattici, diagnostici, strategie terapeutiche e curative per un'ampia varietà di patogeni umani.

L'attuale emergenza di sanità pubblica, legata alla nuova infezione da coronavirus SARS-CoV-2, che il nostro ed altri Paesi stanno sperimentando in modo pandemico, oltre che impegnare le autorità sanitarie internazionali (Organizzazione Mondiale della Sanità, *European Centre for Disease Prevention*, *Center for Disease Control*), nazionali (Ministero della Salute e Istituto Superiore di Sanità) e regionali, sta mettendo alla prova specialisti del settore sanitario, clinici e laboratoristi, ma anche ricercatori per valutare soluzioni operative di identificazione e trattamento dei casi sulla base di efficaci soluzioni diagnostiche e cliniche, ma soprattutto per il contenimento e l'interruzione delle potenziali catene di trasmissione, al fine di arginare l'evento pandemico. Questa fase è fondamentale per la produzione di adeguate raccomandazioni sanitarie di prevenzione rivolte alla popolazione, e, quindi, di contenimento dell'infezione.

Per affrontare queste sfide è necessario che le applicazioni mediche della ricerca traslazionale più avanzata nel settore infettivologico si orientino sempre più verso approcci di biologia dei sistemi, per permettere di produrre dati -omici in grado di descrivere le complesse reti molecolari che sottendono i processi infettivi (Aderem, 2011⁹³; Hillmer, 2015⁹⁴). Finora, gli approcci diagnostici, e, quindi, le conseguenze terapeutiche nella gestione del paziente infettivo, sono stati orientati alla sola caratterizzazione del patogeno nelle fasi dell'invasione e/o propagazione, o alla risposta dell'ospite, intesa come risposta anticorpale o come identificazione di biomarcatori circolanti. Questi approcci hanno attualmente nei LEA una bassa rappresentatività, principalmente associata agli agenti eziopatogenetici batterici e virali, mentre esclude in larga misura altri patogeni, come i parassiti e i miceti. Pertanto, mentre c'è ancora molto da fare per implementare i LEA con strumenti diagnostici appropriati ed esaustivi nell'ambito delle malattie infettive, le nuove conoscenze apportate dalle discipline -omiche stanno producendo evidenze sull'interazione ospite-

⁹² World Health Organization. WHO global health estimates 2016: disease burden by cause, age, sex, by country and by region, 2000–2016, WHO, 2018

⁹³ Aderem A, Adkins JN, Ansong C, Galagan J, Kaiser S, Korth MJ, Law GL, McDermott JG, Proll SC, Rosenberger C, Schoolnik G, Katze MG. A systems biology approach to infectious disease research: innovating the pathogen-host research paradigm. *mBio* 2011;2:e00325-e00410.

⁹⁴ Hillmer RA. Systems biology for biologists. An approachable introduction to systems biology for experimentalists. *PLoS Pathog*, 2015;11:e1004786.

patogeno in grado di modificare sostanzialmente il modo di affrontare in sanità la patologia infettiva. Con queste premesse, è chiaro che la biologia dei sistemi, come evidenziato negli altri capitoli di questo documento, potrà permettere di caratterizzare in maniera olistica l'interazione ospite-parassita e, quindi, modellizzare come rete biologica un sistema vivente (Kitano, 2002⁹⁵; Scie Ideker, 2001⁹⁶).

Mentre gli approcci riduzionisti cercano di semplificare o isolare l'impatto di un singolo componente (un patogeno, una malattia, una localizzazione endemica) nel più grande contesto di un processo biologico globale, gli approcci di sistema (comunità di microorganismi, globalizzazione, pandemia) mirano a fornire un modello comprensivo di un processo, attraverso la quantificazione di tutte le componenti osservabili e delle loro relazioni. I modelli che ne derivano sono quindi molto potenti, in quanto consentono di comprendere il ruolo delle componenti che non sono facilmente descrivibili con gli approcci precedenti, possono chiarire nuove relazioni tra le componenti e decifrare le proprietà emergenti mediante computazioni multivariate. Quando si utilizza un approccio multiomico, il sistema può essere una comunità microbica complessa (microbioma), un organismo o un tessuto, una singola cellula, o un compartimento cellulare o un insieme di molecole. Allo stesso modo, le componenti del sistema possono essere diverse, dai singoli organismi o cellule alle proteine, ai geni, ai metaboliti.

2.13.1. L'applicazione degli approcci di sistema alle malattie infettive

L'applicazione degli approcci di sistema alle malattie infettive è particolarmente complessa, in quanto coinvolge due componenti principali: l'ospite e l'agente patogeno (Casadevall, 1999⁹⁷; Fishbach, 2010⁹⁸; Aderem, 2011⁹³). La duplice natura di questi sistemi aumenta esponenzialmente la loro complessità, in quanto è necessario considerare come le variazioni in entrambe le componenti alterino le dinamiche dell'intera correlazione, così come le interazioni tra ogni componente dello specifico sistema e le interazioni con il microbioma umano (Costea, 2018⁹⁹), che può essere considerato il terzo sistema, a più componenti, nell'interazione ospite-patogeno-microbioma. I patogeni non solo si adattano e modificano l'architettura molecolare dei loro ospiti per ottimizzare la loro replicazione, ma influenzano anche la risposta dell'ospite all'infezione. Ulteriori variabili ambientali e immunologiche, agendo sia sull'ospite che sul patogeno,

⁹⁵ Kitano, H. Systems biology: a brief overview. A foundational introduction to the principles of systems biology.

⁹⁶ Scie Ideker T, Galitski T, Hood LA. New approach to decoding life: systems biology. *Ann Rev Genomics Hum Genet*, 2001;2:343-272.nce, 2002;295:1662-1664.

⁹⁷ Casadevall A, Pirofski LA. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun*, 1999;67:3703-3713.

⁹⁸ Fischbach MA, Krogan NJ. The next frontier of systems biology: higher-order and interspecies interactions. *Genome Biol*, 2010;11:208.

⁹⁹ Costea PI, Hildebrand F, Arumugam M, Bäckhed F, Blaser MJ, Bushman FD, de Vos WM, Dusko Ehrlich S, Fraser CM, Hattori M, Huttenhower C, Jeffery IB, Knights D, Lewis JD, Ley RE, Ochman H, O'Toole PW, Quince C, Relman DA, Shanahan F, Sunagawa S, Wang J, Weinstock GM, Wu GD, Zeller G, Zhao L, Raes J, Knight R, Bork P. Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition, *Nature Microbiol*, 2018;3:8-16.

contribuiscono allo stato di malattia, che è specifico per ogni specie, ogni ceppo microbico, più o meno patogeno, e per ogni individuo infetto (Casadewall, 1999⁹⁷).

Per creare i modelli di un sistema così complesso e catturare meccanismi sconosciuti, è cruciale selezionare appropriati controlli, utilizzare piattaforme -omiche e metaomiche (genomica/metagenomica, genomica funzionale, epigenomica, proteomica/metaproteomica e metabolomica) con processività elevata, e ottimizzare le misurazioni quantitative (Domon, 2010¹⁰⁰; Pino, 2018¹⁰¹). Per interpretare i dati e generare il modello -omico è opportuno selezionare metodi di *machine learning*, per generare *decision support systems* (DSS) (Putignani, 2019¹⁰²) e *clinical DSS*, come recentemente riportato per il COVID-19, con la produzione di un saggio rapido derivato da approcci integrati multiomici, per distinguere rapidamente i casi gravi da quelli lievi e identificare i pazienti potenzialmente critici prima dell'arrivo dei sintomi nelle unità di terapia intensiva (Tárnok, 2020¹⁰³).

Sia il processo di generazione dei dati -omici che di integrazione computazionale e modellizzazione dei dati spingono ad una moderna medicina di laboratorio, che permette accesso a *data warehouse*, disponibili in rete agli specialisti, sia per la fase diagnostica che per la gestione clinica del paziente.

2.13.2. Appropriatezza del campionamento per la produzione di dati omici rappresentativi del processo infettivo

Gli approcci di sistema cercano di definire un quadro del campione o del processo biologico globale, per generare un modello che serve come primo passo per capire l'evento infettivo (Aderem, 2011⁹³; Hillmer, 2015⁹⁴; Huang, 2018¹⁰⁴). È necessario definire in primo luogo il sistema soggetto al modello, incluse le sue componenti, in grado di rappresentare al meglio il binomio ospite-parassita. I sistemi-modello, come i campioni dei pazienti, possono essere ideali per comprendere il processo infettivo dell'ospite, ma alcune loro limitazioni possono restringere le tecnologie effettivamente applicabili. Ad esempio, i macrofagi tissutali sono critici regolatori della risposta immune locale e importanti siti d'infezione per molti patogeni virali, come l'HIV, il virus dell'influenza A, il virus dengue, ma il loro numero isolabile dai tessuti dei pazienti è limitato, e la loro variabilità agli stimoli ambientali ne esclude l'uso negli esperimenti -omici, che richiedono un discreto numero di cellule. Al contrario, le linee cellulari immortalizzate offrono un'importante flessibilità tecnica,

¹⁰⁰ Domon B, Aebersold R. Options and considerations when selecting a quantitative proteomics strategy. *Nat. Biotechnol*, 2010;28:710-721.

¹⁰¹ Pino LK, Searle BC, Huang EL, Noble WS, Hoofnagle AN, MacCoss MJ. Calibration using a single-point external reference material harmonizes quantitative mass spectrometry proteomics data between platforms and laboratories. *Anal Chem*, 2018;90:13112-13117.

¹⁰² Putignani L, Gasbarrini A, Dallapiccola B. Potential of multiomics technology in precision medicine. *Curr Opin Gastroenterol*, 2019;35:491-498.

¹⁰³ Tárnok A. Machine learning, COVID-19 (2019-nCoV), and multi-omics. *Cytometry A*, 2020;97:215-216.

¹⁰⁴ Huang S. The tension between big data and theory in the "omics" era of biomedical research. *Perspect Biol Med*, 2018;6:472-488.

anche se possono non rappresentare accuratamente il processo biologico di interesse (Pan, 2009¹⁰⁵; Sandberg, 2005¹⁰⁶; Ross, 2020¹⁰⁷).

Allo stesso modo la tipologia del campione è importante per creare il modello -omico del patogeno e per identificare, alla fine del processo investigativo, lo specifico ceppo, lo stadio infettivo e la relativa virulenza. È inoltre importante considerare la robustezza dato -omico prodotto e come esso possa differenziare i sistemi in studio rispetto ai gruppi di controllo, in ogni fase analizzata e con l'appropriato numero di repliche biologiche e tecniche, al fine di valutare i fattori confondenti durante il processo di collezione dei dati e per rendere fruibili le piattaforme -omiche come strumenti di medicina di laboratorio (Hasin, 2017¹⁰⁸; Jenkins, 2016¹⁰⁹; Lapatas, 2016¹¹⁰).

A tale fine, tutti i dati -omici richiedono controlli specifici di qualità, in quanto presentano una quantità intrinseca di varianza tecnica, che deve essere misurata e considerata statisticamente, come descritto recentemente per le applicazioni cliniche della proteomica quantitativa (Pino LK¹¹¹). Ciò richiede, pertanto, la gestione delle tecnologie -omiche e del dato infettivologico da parte di operatori esperti, prima di sottoporlo al clinico per una valutazione interdisciplinare. Nel corso dell'infezione si verificano, infatti, migliaia di mutazioni molecolari interdipendenti, che rappresentano cambiamenti diretti ai patogeni e risposte dirette all'ospite. Mentre questi cambiamenti possono essere accuratamente misurati e modellati confrontando i sistemi infetti con i sistemi non infetti, l'ampiezza di questi cambiamenti e la mancanza di chiare relazioni causali possono complicare la generazione dei dati multidimensionali tipici delle piattaforme -omiche. Per questo, i profili -omici generati, che possono rappresentare per lo specifico campione l'evento infettivo, devono essere filtrati mediante modelli chemiometrici, che aiutano nella trasferibilità del modello al problema clinico (Szymańska¹¹²).

Inoltre, per affinare il modello può essere utile l'inclusione mirata di altri parametri o condizioni. Pertanto, è possibile includere perturbazioni specifiche dell'ospite o patogeni mutanti per restringere specifici processi, monitorare la risposta dell'ospite su diversi punti temporali, per fornire una risoluzione temporale o trattare

¹⁰⁵ Pan C, Kumar C, Bohl S, Klingmueller U, Mann M. Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell type-specific functions. *Mol Cell Proteomics*, 2009;8:443-450.

¹⁰⁶ Sandberg R, Ernberg I. The molecular portrait of in vitro growth by meta-analysis of gene-expression profiles. *Genome Biol*, 2005;6: R65.

¹⁰⁷ Ross DT, Scherf U, Eisen MB, Perou CM, Rees C, Spellman P, Iyer V, Jeffrey SS, Van de Rijn M, Waltham M, Pergamenschikov A, Lee JC, Lashkari D, Shalon D, Myers TG, Weinstein JN, Botstein D, Brown PO. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet*, 2000;24:227-35.

¹⁰⁸ Hasin Y, Seldin M, Lusi A. Multi-omics approaches to disease. *Genome Biol*, 2017;18:83.

¹⁰⁹ Jenkins J. What is the key best practice for collaborating with a computational biologist? *Cell Syst*, 2016;3:7-11.

¹¹⁰ Lapatas V, Stefanidakis M, Jimenez RC, Via A, Schneider MV. Data integration in biological research: an overview. *J Biol Res*, 2016;22: 9.

¹¹¹ Pino LK, Searle BC, Huang EL, Noble WS, Hoofnagle AN, MacCoss MJ. Calibration using a single-point external reference material harmonizes quantitative mass spectrometry proteomics data between platforms and laboratories. *Anal Chem*, 2018;90:13112-13117.

¹¹² Szymańska, 2012

il sistema con un composto chimico in grado di alterare la dinamica dell'infezione in modi prevedibili (Elde, 2012¹¹³; Weekes, 2014¹¹⁴; Jean Beltran, 2017¹¹⁵; Rauch, 2017¹¹⁶).

Collezione dei dati

Quasi ogni dato può essere considerato un dato di sistema, a condizione che offra una visione quantitativa e completa delle componenti all'interno di un determinato sistema. Le NGS hanno permesso di affrontare domande epidemiologiche sulla diffusione globale dei patogeni, stanno aprendo nuove intuizioni sulla co-evoluzione ospite-patogeno e consentono di trasferire nuove conoscenze sul ruolo del microbioma, del viroma, del micoma e del parassitoma nella salute umana e nelle malattie (Elde, 2012¹¹²; Rauch, 2017¹¹⁵; Liu, 1996¹¹⁷; Elde, 2009¹¹⁸; Bryant, 2013¹¹⁹; Marzano, 2017¹²⁰; Collins, 2018¹²¹; Carey, 2018¹²²; iHMP, 2019¹²³).

La citometria a flusso, la citometria di massa e l'imaging ad alto contenuto permettono di ottenere sostanziali progressi conoscitivi sulla dinamica dell'infezione e sulla risposta sistemica a livello delle cellule e dei tessuti. I recenti adattamenti delle *pipelines* NGS allo studio della struttura della cromatina e delle modifiche

¹¹³ Elde NC, Child SJ, Eickbush MT, Kitzman JO, Rogers KS, Shendure J, Geballe AP, Malik HD. Poxviruses deploy genomic accordions to adapt rapidly against host antiviral defenses. *Cell*, 2012;150:831-841.

¹¹⁴ Weekes MP, Tomasec P, Huttlin EL, Fielding CA, Nusinow D, Stanton RJ, Wang ECY, Aichele R, Murrell I, Wilkinson GWG, Lehner PJ, Gygi SP. Quantitative temporal viromics: an approach to investigate host-pathogen interaction. *Cell*, 2014;157:1460-1472.

¹¹⁵ Jean Beltran PM, Federspiel JD, Sheng X, Cristea IM. Proteomics and integrative omic approaches for understanding host-pathogen interactions and infectious diseases. *Mol Syst Biol*, 2017;13:922.

¹¹⁶ Rauch BJ, Silvis MR, Hultquist JF, Waters CS, McGregor MJ, Krogan NJ, Bondy-Denomy J. Inhibition of CRISPR-Cas9 with bacteriophage proteins. *Cell*, 2017;168:150-158.

¹¹⁷ Liu, RW, Paxton A, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, NR Landau. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*, 1996;86:367-377.

¹¹⁸ Elde N C, Child SJ, Geballe AP, Malik HS. Protein kinase R reveals an evolutionary model for defeating viral mimicry. *Nature*, 2009;457:485-489.

¹¹⁹ Bryant J, Grogono DM, Greaves D, Foweraker J, Roddick I, Inns T, Reacher M, Haworth CS, Curran MD, Harris SR, Peacock SJ, Parkhill J, Floto RA. Whole-genome sequencing to identify transmission of *Mycobacterium abscessus* between patients with cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet*, 2013;381:1551-1560.

¹²⁰ Marzano V, Mancinelli L, Bracaglia G, Del Chierico F, Vernocchi P, Di Girolamo F, Garrone S, Tchidjou Kuekou H, D'Argenio P, Dallapiccola B, Urbani A, Putignani L. "Omic" investigations of protozoa and worms for a deeper understanding of the human gut "parasitome". *PLoS Negl Trop Dis*, 2017;11:e0005916.

¹²¹ Collins J, Robinson C, Danhof H, Knetsch CW, van Leeuwen HC, Lawley TD, Auchtung JM, Britton RA. Dietary trehalose enhances virulence of epidemic *Clostridium difficile*. *Nature*, 2018;553:291-294.

¹²² Carey AF, Rock JM, Krieger IV, Chase MR, Fernandez-Suarez M, Gagneux S, Sacchetti JC, Ioerger TR, Fortun SM. TnSeq of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates reveals strain-specific antibiotic liabilities. *PLoS Pathog*, 2018;14:e1006939.

¹²³ Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium. The integrative human microbiome project. *Nature*, 2019;569:641-648.

pigenetiche del DNA e dell'RNA consentono di identificare nuove modalità di adattamento della cellula alle infezioni e alle infiammazioni (Arvey, 2012¹²⁴; Kennedy 2017¹²⁵; Bengsch, 2018¹²⁶; Hamdane, 2019¹²⁷).

Gli stessi sviluppi tecnologici che hanno permesso le rivoluzioni negli approcci genomici hanno anche rivoluzionato la comprensione del ricablaggio trascrizionale cellulare durante l'infezione, con capacità risolutive a livello di singola cellula (trascrittomica) (Sychev, 2017¹²⁸; Lupberger, 2019¹²⁹; Bradley, 2018¹³⁰; Russell, 2018¹³¹). La moderna spettrometria di massa ci sta aiutando a comprendere sia le modalità con le quali i patogeni riprogrammano l'architettura delle cellule ospiti modificandone l'espressione proteica, sia le interazioni proteina-proteina, sia le strutture proteiche e le modificazioni post-traduzionali (proteomica) (Weekes, 2014¹¹³; Huttenhain, 2019¹³²; Jean Beltran, 2016¹³³). I progressi nella spettrometria di massa a piccole molecole consentono di migliorare la caratterizzazione dei metaboliti e dei lipidi noti e di identificare nuove molecole coinvolte nella regolazione dell'infezione e nella risposta dell'ospite (metabolomica e

¹²⁴ Arvey A, Tempera I, Tsai K, Chen H-S, Tikhmyanova N, Klichinsky M, Leslie C, Lieberman PM. An atlas of the Epstein-Barr virus transcriptome and epigenome reveals host-virus regulatory interactions. *Cell Host Microbe*, 2012;12:233-245.

¹²⁵ Kennedy EM, Bogerd HP, Kornepati AVR, Kang D, Ghoshal D, Marshall JB, Poling BC, Tsai K, Gokhale NS, Horner SM, Cullen BR. Posttranscriptional m(6)A editing of HIV-1 mRNAs enhances viral gene expression. *Cell Host Microbe*, 2017;22:830.

¹²⁶ Bengsch B, Ohtani T, Khan O, Setty M, Manne S, O'Brien S, Gherardini PF, Herati RS, Huang AC, Chang K-M, Newell EW, Bovenschen N, Pe'er D, Albelda SM, Wherry EJ. Epigenomic-guided mass cytometry profiling reveals disease-specific features of exhausted CD8 T cells. *Immunity*, 2018;48:1029-1045.

¹²⁷ Hamdane N, Jühling F, Crouchet E, Saghire HE, Thumann C, Oudot MA, Bandiera S, Saviano A, Ponsolles C, Roca Suarez AA, Li S, Fujiwara N, Ono A, Davidson I, Bardeesy N, Schmidl C, Bock C, Schuster C, Lupberger J, Habersetzer F, Doffoël M, Piardi T, Sommacale D, Imamura M, Uchida T, Ohdan H, Aikata H, Chayama K, Boldanova T, Pessaux P, Fuchs BC, Hoshida Y, Zeisel MB, Duong FHT, Baumert TF. HCV-induced epigenetic changes associated with liver cancer risk persist after sustained virologic response. *Gastroenterology*, 2019;156:2313-2329.

¹²⁸ Sychev ZE, Hu A, DiMaio TA, Gitter A, Camp ND, Noble WS, Wolf-Yadlin A, Lagunoff M. Integrated systems biology analysis of KSHV latent infection reveals viral induction and reliance on peroxisome mediated lipid metabolism. *PLoS Pathog*, 2017;13:e1006256

¹²⁹ Lupberger J, Croonenborghs T, Roca Suarez AA, Van Renne N, Jühling F, Oudot MA, Virzi A, Bandiera S, Jamey C, Meszaros G, Brumar D, Mukherji A, Durand SC, Heydmann L, Verrier ER, Saghire HE, Hamdane N, Bartenschlager R, Fereshetian S, Ramberger E, Sinha R, Nabian M, Everaert C, Jovanovic M, Mertins P, Carr SA, Chayama K, Dali-Youcef N, Ricci R, Bardeesy NM, Fujiwara N, Gevaert O, Zeisel MB, Hoshida Y, Pochet N, Baumert TF. Combined analysis of metabolomes, proteomes, and transcriptomes of hepatitis C virus-infected cells and liver to identify pathways associated with disease development. *Gastroenterology*, 2019; 157:537-551.

¹³⁰ Bradley T, Ferrari G, Haynes BF, Margolis DM, Browne EP. Single-cell analysis of quiescent HIV infection reveals host transcriptional profiles that regulate proviral latency. *Cell Rep*, 2018;25:107-117.

¹³¹ Russell AB, Trapnell C, Bloom JD. Extreme heterogeneity of influenza virus infection in single cells. *eLife* 2018;7:e32303.

¹³² Huttenhain R, Xu J, Burton LA, Gordon DE, Hultquist JF, Johnson JR, Satkamp L, Hiatt J, Rhee DJ, Baek K, Crosby DC, Frankel AD, Marson A, Harper JW, Alpi AF, Schulman BA, Gross JD, Krogan NJ. ARIH2 is a Vif-dependent regulator of CUL5-mediated APOBEC3G degradation in HIV infection. *Cell Host Microbe*, 2019;26:86-99.

¹³³ Jean Beltran PM, Mathias RA, Cristea IM. A portrait of the human organelle proteome in space and time during cytomegalovirus infection. *Cell Syst* 2016;3:361-373.

lipidomica) (Zampieri, 2018¹³⁴; Rother, 2018¹³⁵; Yuan, 2019¹³⁶; Fontaine, 2015¹³⁷). Le applicazioni combinatorie degli approcci -omici vengono sempre più utilizzate nello studio delle interazioni tra ospite e patogeno (Shah, 2018¹³⁸; Eckhardt, 2019¹³⁹).

Gli standard per la raccolta e la comunicazione degli altri dati -omici variano ancora ampiamente, ma una delle maggiori sfide attuali è la standardizzazione della raccolta dei dati e la definizione dei parametri di riferimento per la standardizzazione delle misurazioni -omiche e per l'analisi dei dati post controllo di qualità (Lapatas, 2015¹⁴⁰), da eseguire rispetto ai controlli positivi noti o ad appropriati *gold standard* (Tripathi, 2015¹⁴¹; Mirrashidi, 2015¹⁴²; Jager, 2011¹⁴³).

¹³⁴ Zampieri M, Szappanos B, Buchieri MV, Trauner A, Piazza I, Picotti P, Gagneux S, Borrell S, Gicquel B, Lelievre J, Papp B, Sauer U. High-throughput metabolomic analysis predicts mode of action of uncharacterized antimicrobial compounds. *Sci. Transl Med*, 2018;10:eaal3973:

¹³⁵ Rother M, Gonzalez E, Teixeira da Costa AR, Wask L, Gravenstein I, Pardo M, Pietzke M, Gurumurthy RK, Angermann J, Laudeley R, Glage S, Meyer M, Chumduri C, Kempa S, Dinkel K, Unger A, Klebl B, Klos A, Meyer TF. Combined human genome-wide RNAi and metabolite analyses identify IMPDH as a host-directed target against chlamydia infection. *Cell Host Microbe*, 2018;23:661-671.

¹³⁶ Yuan S, Chu H, Fuk-Woo Chan, Ye Z-W, Wen L, Yan N, Lai P-M, Tee K-M, Huang J, Chen D, Li C, Zhao X, Yang D, Chiu MC, Yip C, Kwok-Man Poon V, Chung-Sing Chan C, Sze K-H, Zhou J, Hau-Yee Chan I, Kok K-H, Kai-Wang To K, Yi-Tsun Kao R, Yiu-Nam Lau J, Jin D-Y, Perlman S, Yuen K-Y. SREBP-dependent lipidomic reprogramming as a broad-spectrum antiviral target. *Nat. Commun*, 2019;10:120.

¹³⁷ Fontaine KA, Sanchez EL, Camarda R, Lagunoff M. Dengue virus induces and requires glycolysis for optimal replication. *J Virol*, 2015;89:2358-2366.

¹³⁸ Shah PS, Link N, Jang GM, Sharp PP, Zhu T, Swaney DL, Johnson JR, Von Dollen J, Ramage HR, Satkamp L, Newton B, Hüttenhain R, Petit MJ, Baum T, Everitt A, Laufman O, Tassetto M, Shales M, Stevenson E, Iglesias GN, Shokat L, Tripathi S, Balasubramaniam V, Webb LG, Aguirre S, Willsey AJ, Garcia-Sastre A, Pollard KS, Cherry S, Gamarnik AV, Marazzi I, Taunton J, Fernandez-Sesma A, Bellen HJ, Andino R, Krogan NJ. Comparative flavivirus-host protein interaction mapping reveals mechanisms of dengue and zika virus pathogenesis. *Cell*, 2018;175:1931-1945.

¹³⁹ Eckhardt, M. Wei Zhang # 4, Andrew M Gross 4, John Von Dollen 1 3, Jeffrey R Johnson 1 2 3, Kathleen E Franks-Skiba 1 3, Danielle L Swaney 1 2 3 5, Tasha L Johnson 3, Gwendolyn M Jang 1 3, Priya S Shah 1 3, Toni M Brand 6, Jacques Archambault 7, Jason F Kreisberg 4 5, Jennifer R Grandis 5 6, Trey Ideker 8 5, Nevan J Krogan 9 2 3 5. Multiple routes to oncogenesis are promoted by the human papillomavirus-host protein network. *Cancer Discov*, 2018;8:1474-489.

¹⁴⁰ Lapatas V, Stefanidakis M, Jimenez R C, Via A, Schneider MV. Data integration in biological research: an overview. *J. Biol. Res*, 2015;22:9.

¹⁴¹ Tripathi S, Pohl MO, Zhou Y, Rodriguez-Frandsen A, Wang G, Stein DA, Moulton DH, DeJesus P, Che J, Mulder LCF, Yáñez E, Andenmatten D, Pache L, Manicassamy B, Albrecht RA, Gonzalez MG, Nguyen Q, Brass A, Elledge S, White M, Shapira S, Hacohen, Karlas A, Meyer TF, Shales M, Gatorano A, Johnson JR, Jang G, Johnson T, Verschuere E, Sanders D, Krogan N, Shaw M, König R, Stertz S, García-Sastre A, Chanda SK. Meta- and orthogonal integration of influenza "OMICs" data defines a role for UBR4 in virus budding. *Cell Host Microbe*, 2015;18:723-735.

¹⁴² Mirrashidi KM, Elwell CA, Verschuere E, Johnson JR, Frando A, Von Dollen J, Rosenberg O, Gulbahce N, Jang G, Johnson T, Jäger S, Gopalakrishnan AM, Sherry J, Dunn JD, Olive A, Penn B, Shales M, Cox JS, Starnbach MN, Derre I, Valdivia R, Krogan NJ, Engel J. Global mapping of the Inc-human interactome reveals that retromer restricts chlamydia infection. *Cell Host Microbe*, 2015;18:109

¹⁴³ Jager S, Cimermancic P, Gulbahce N, Johnson JR, McGovern KE, Clarke SC, Shales M, Mercenne G, Pache L, Li K, Hernandez H, Jang GM, Roth SL, Akiva E, Marlett J, Stephens M, D'Orso I, Fernandes J, Fahey M, Mahon C, O'Donoghue AJ, Todorovic A, Morris JH, Maltby DA, Alber T, Cagney G, Bushman FD, Young JA, Chanda SK, Sundquist WI, Kortemme T, Hernandez RD, Craik CS, Burlingame A, Sali A, Frankel AD, Krogan NJ. Global landscape of HIV-human protein complexes. *Nature*, 2011;481:365-370.

2.13.3 Indicazioni

- Considerata la complessità del processo infettivo e dell'interazione ospite-parassita (ad es. percentuale di cellule infette, diversità della cellula bersaglio, pluralità degli agenti patogeni coinvolti nel processo invasivo e propagativo), la medicina di laboratorio che si occuperà di report infettivologici basati su metadati dovrà utilizzare una nuova statistica dei metadati, elaborata su base multivariata, per produrre modelli patologici dell'evento infettivo a livello del singolo individuo e della popolazione. Sarà importante registrare a tal fine nel tempo gli eventi infettivi, includendo più punti, quali l'inoculo iniziale, il tempo in cui l'infezione diventa produttiva, il tempo del picco dell'infezione e il successivo decremento, la risposta anticorpale di popolazione, laddove opportuna, per una sorveglianza attiva dell'infezione, come acquisito nel caso dell'attuale pandemia per SARS-CoV-2.
- Particolare attenzione dovrà essere rivolta alla costituzione ed implementazioni di biobanche "wet" e "dry" (digitali) per la raccolta/conservazione di campioni umani (ad es. campioni ematici, fecali, respiratori, tissutali), e campioni derivati (metaboliti, proteine, acidi nucleici), per potenziare lo studio -omico delle risposte dell'ospite a seguito dell'evento infettivo e dopo isolamento e caratterizzazione dello specifico agente patogeno. Sarà opportuno istituire ed implementare collezioni di agenti infettivi, quali batteri, funghi, virus, parassiti, con catalogazione tassonomica controllata e aggiornata, secondo le conoscenze più avanzate, coadiuvata, se possibile, dalla presenza di preparati colturali e/o microscopici che ne permettano l'identificazione più corretta (ad es. collezione di acidi nucleici per la tipizzazione a livello di specie e di ceppo, come il ribotipo e il cariotipo). Allo Scopo sarà strategico implementare database di "pattern recognition systems", basati sul biobancaggio digitale di profili di identificazione e di tipizzazione mediante spettrometria di massa MALDI TOF MS Biotyper. I metadati prodotti dovranno includere le condizioni di coltura cellulare, così come gli standard di riferimento, e dovranno collegarsi a protocolli dettagliati di biosicurezza. Analogamente alla raccolta delle misurazioni -omiche, gli standard per la raccolta di metadati dovranno differire nel tempo, in relazione all'ospite e al patogeno, ma anche alla tecnologia prescelta. I report dei metadati per le biobanche "dry" dovranno sempre considerare i principali "drivers" dell'evento infettivo o le relative co-varianti, quali la globalizzazione, il clima, le abitudini sociali e demografiche, l'eterogeneità dei sistemi sanitari nel mondo. In particolare, i database di profili di microbioma umano dovranno progressivamente contenere, via via che la tecnologia lo consentirà, dati sulle comunità microbiche complesse riferiti a batteriomi, viromi, micomi e parassitomi, come già parzialmente anticipato nel Documento "Il microbiota umano: aspetti diagnostici, preclinici e clinici" della Sezione III del Consiglio Superiore di Sanità (2018).
- È opportuno che si valuti costantemente l'esigenza di trattare i report diagnostici della medicina di laboratorio infettivologica come prodotti di una medicina che integra la medicina umana con quella veterinaria. Pertanto, i processi epidemici e pandemici in atto dovranno essere, pertanto, revisionati secondo una mentalità "one-health", in modo che i profili diagnostici derivati e i conseguenti bersagli

degli interventi si avvalgano dei nuovi approcci e protocolli clinici e dei nuovi strumenti per il disegno di bersagli vaccinali ottimizzati. A tal fine, sarà strategico promuovere studi traslazionali e clinici basati sulla generazione e la condivisione di dati -omici, attraverso la sinergia delle società scientifiche di medicina umana e medicina veterinaria per lo sviluppo graduale e crescente della caratterizzazione delle patologie infettive nell'ambito della prospettiva "one health".

L'utilizzo delle piattaforme -omiche e dei dati -omici derivati permetterà di trarre enormi benefici dall'applicazione di questi approcci per comprendere la relazione tra l'agente patogeno e l'ospite, nonché tra la malattia e l'esito del trattamento. Come disciplina relativamente giovane, la biologia dei sistemi ha sostanziali margini di miglioramento e crescita, ma anche un immenso potenziale per scoprire le complessità dei sistemi biologici e progettare terapie di prossima generazione nella medicina personalizzata infettivologica.

3. STATO DELL'ARTE A LIVELLO DELL'UNIONE EUROPEA E INTERNAZIONALE

La crescente disponibilità di analisi genomiche ha avuto un significativo impatto nella pratica clinica, come documentano i progressi nella scoperta di nuovi geni-malattia, in particolare 850 malattie rare negli ultimi 10 anni (Omim-org¹⁴⁴; Orphanet¹⁴⁵), le decine di migliaia di associazioni stabilite tra le varianti genetiche e i fenotipi/malattie complesse (Genome Wide Association Studies¹⁴⁶), gli oltre 2.000 geni e le migliaia di mutazioni somatiche associate ai tumori (Cancer Genetics Web 128¹⁴⁷; Catalogue of Somatic Mutations in Cancer¹⁴⁸). Per questo, una parte significativa della cosiddetta rivoluzione genetica può essere identificata nella rivoluzione tecnologica, che, negli ultimi anni, ha consentito a milioni di persone di accedere alle analisi genomiche, così come era stato predetto (Stephens, 2015¹⁴⁹). D'altra parte, le analisi di costo-efficacia hanno largamente documentato i vantaggi economici per i sistemi sanitari dell'accresciuta disponibilità di queste tecniche (Payne, 2018¹⁵⁰), parallelamente ai benefici per i pazienti, in termini di capacità diagnostiche e razionalizzazione delle terapie, proponendo un nuovo paradigma per la presa in carico dei pazienti senza diagnosi, nei quali le analisi genomiche dovrebbero precedere l'implementazione di altre costose attività cliniche, laboratoristiche e strumentali spesso non risolutive (Lu, 2014¹⁵¹).

A livello mondiale, numerosi Paesi hanno avviato programmi di analisi genomiche sostenute con fondi dedicati. Sono illustrativi i progetti dei 100mila genomi del *Genomics England 2012* o dell'*Estonian Genome Project 2000*; la *National Genome Strategy 2015-2020* della Finlandia, pianificata per analizzare 500mila genomi; l'ambizioso progetto *All of Us* degli Stati Uniti che prevede di analizzare 1milione di genomi; la *Precision Medicine Initiative* della Cina che prevede di sequenziarne 100milioni. Altre iniziative sono state attivate in altri Paesi, ad esempio in Arabia Saudita (*Saudi Human Genome Program 2013*), Australia (*Australian Genomics 2016-2021*), Brasile (*Brazil Initiative on Precision Medicine 2015*), Danimarca (*Genome Denmark 2012*), Francia (*Genomic Medicine Plan 2016-2025*), Giappone (*Japan Genomic Medicine Program 2015*), Qatar (*Qatar Genome 2015*), Olanda (*RADICON 2016-2015*), Svizzera (*Swiss Personalized Health Network 2016-2020*), Turchia (*Turkish Genome Project 2017-2023*). In Italia, la Conferenza Stato-Regioni ha approvato nel 2017 il "Piano per l'innovazione del Sistema Sanitario basato sulle scienze -omiche", che, a

¹⁴⁴ Online Mendelian Inheritance in Man. www.omim-org

¹⁴⁵ Orphanet. www.Orpha.net

¹⁴⁶ Genome Wide Association Studies. <https://www.ebi.ac.uk/gwas>

¹⁴⁷ Cancer Genetics Web. <http://www.cancerindex.org/geneweb>

¹⁴⁸ Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>

¹⁴⁹ Stephens ZD, Lee SY, Faghri F, Campbell RH, Zhai C, J. Efron, Iyer R, Schatz MC, Sinha S, Robinson GE. Big data: astronomical or genomics? *PLoS Biol.* 2015;13: e1002195.

¹⁵⁰ Payne K, Gavan SP, Wright SJ, Thompson AJ. Cost-effectiveness analyses of genetic and genomic diagnostic tests. *Nature Reviews Genetics* 2018;19:235-246.

¹⁵¹ Lu JT, Campeau PM, Lee BH. Genotype-phenotype correlation: promiscuity in the era of Next-Generation Sequencing. *N Engl J Med*, 2014;371;593-596.

differenza dei progetti attivati in altri Paesi, non è supportato da finanziamenti dedicati e perciò non si è ancora tradotto in azioni concrete (Ministero della Salute¹⁵²).

Numerosi progetti di ricerca, compresi alcuni sviluppati in Italia, hanno avuto la funzione di volano nel trasferire alla clinica i protocolli sviluppati nel loro contesto. Tuttavia, la complessità della genomica e i continui progressi in termini di conoscenze e di sviluppo tecnologico richiedono azioni coordinate, per garantire che tutte le potenzialità derivanti dalla loro implementazione su larga scala siano messe al servizio dei beneficiari (Stark, 2019¹⁵³).

3.1. L'iniziativa Europea "1+M genomes"

Nell'aprile del 2018, tredici Stati membri dell'Unione Europea, tra cui l'Italia, hanno firmato una dichiarazione "Towards access of at least 1 million sequenced genomes in the EU by 2022" (Declaration, 2018¹⁵⁴; EU 1+Million Genomes, 2018¹⁵⁵), successivamente sottoscritta da un'altra decina di Paesi. L'idea alla base di questo progetto è la costruzione di una rete federata transfrontaliera, in grado di collegare le raccolte di genomi nazionali associati a dati clinici accurati, che hanno un potenziale impatto sulla salute e sulle terapie dei cittadini Europei (EU Comm. 2017¹⁵⁶; EU Comm. 2017¹⁵⁷).

Di fatto, la genomica è in grado di predire il rischio di gravi condizioni cliniche, come le malattie rare, i tumori e numerose malattie comuni e complesse, che rappresentano i tre gruppi di patologie su cui si focalizza il progetto. Attraverso la genomica è possibile personalizzare le terapie, predire la suscettibilità alle malattie e le reazioni avverse ai farmaci. Per questo, la condivisione dei dati disponibili in maniera frammentaria in Europa all'interno di una struttura digitale transfrontaliera sicura (EU Council: Health in the digital Society, 2017¹⁵⁸; EU Council, 2017¹⁵⁹) dovrebbe consentire di ottenere significativi progressi, nel rispetto della legislazione che regola la protezione dei dati personali e i principi etici, garantendo standard di interoperabilità per i dati genomici e clinici (GDPR, 2016¹⁶⁰).

Una struttura di questo tipo è destinata ad avere un impatto diretto sui pazienti, garantendo la sostenibilità sanitaria e la disponibilità delle cure in Europa; contribuisce a identificare le cause delle malattie nei pazienti

¹⁵² Ministero della Salute. Piano per l'innovazione del Sistema Sanitario basato sulle scienze omiche. (www.salute.gov.it)

¹⁵³ Stark Z, Dolman L, Manolio TA, Ozenberger B, Hill SL, Caulfield MJ, Levy Y, Glazer D, Wilson J, Lawler M, Boughtwood T, Braithwaite J, Goodhand P, Birney E, North KN. Integrating genomics into healthcare: a global responsibility. *Am J Hum Genet*, 2019;104:13-20.

¹⁵⁴ Declaration of cooperation "Towards access to at least 1 million sequenced genomes in the EU by 2022". 10 April 2018.

¹⁵⁵ European "1+Million Genomes" initiative. <https://ec.europa.eu/digital-single-market/en/european-1-million-genomes-initiative>.

¹⁵⁶ European Commission: Transformation of Health and Care in the Digital Single Market -

¹⁵⁷ European Commission's Digital Single Market mid-term review

¹⁵⁸ Council conclusions on "Health in the digital society – making progress in data-driven innovation in the field of health", adopted on 8 December 2017

¹⁵⁹ Council Conclusions on "Encouraging Member States driven Voluntary Cooperation between Health Systems", adopted on 16 June 2017

¹⁶⁰ Regolamento (Ue) 2016/679. General Data Protection Regulation (GDPR)

senza diagnosi, premessa alla loro presa in carico terapeutica; consente di identificare e trattare i pazienti affetti da tumori in una fase più precoce della malattia; identifica le variazioni genetiche che causano o predispongono alle malattie comuni e complesse; migliora il riconoscimento dei profili farmacogenomici e identifica nuovi bersagli molecolari alla base della medicina di precisione; rafforza l'efficacia della prevenzione migliorando l'accuratezza degli screening e abbattendo i costi; contribuisce ad aumentare gli investimenti, la crescita economica e l'occupazione.

La tabella di marcia del progetto comprende tre principali obiettivi:

1. Coinvolgere le parti interessate a livello locale, regionale, nazionale ed europeo, al fine di definire i requisiti per l'accesso transfrontaliero ai genomi e ai dati della medicina personalizzata;
2. Tradurre i requisiti per la qualità dei dati, gli standard, le infrastrutture tecnologiche, gli aspetti etici, legali e sociali, in specifiche tecniche e in linee-guida di implementazione, in grado di raccogliere le migliori pratiche disponibili in Europa;
3. Sviluppare un sistema di governo dei dati coordinati, per consentire a livello Europeo il processamento su larga scala delle informazioni correlate alla salute, nel contesto legale della protezione dei dati, per supportare gli obiettivi della loro condivisione.

In ultima analisi, 1+MG si propone di migliorare la salute dei cittadini, garantire la sostenibilità futura dei sistemi sanitari, potenziare la ricerca e lo sviluppo biomedico e clinico in Europa, supportato dai *big data*.

GLOSSARIO:

Allele: forma alternativa di un gene, che occupa la stessa posizione su una coppia di cromosomi omologhi.

Annotazione delle varianti: identificare i dati disponibili nei database e/o in letteratura e verificare se si tratti di polimorfismi, varianti funzionali, mutazioni patogene già note in letteratura o varianti nuove e perciò di eventuale significato incerto.

Coverage: copertura delle regioni analizzate.

Depth: profondità di lettura delle basi del DNA (numero delle volte che viene letto ogni singolo nucleotide).

Disomia uniparentale: condizione nella quale i due omologhi di una coppia di cromosomi vengono ereditati dallo stesso genitore.

Esoma: parte del genoma formato dagli esoni, ovvero la porzione codificante del DNA. Pur essendo solo l'1-2% del materiale genetico umano, è costituito da oltre 30 megabasi (Mb) di DNA ed è responsabile di tutta (o quasi) la costruzione del nostro organismo. Le sue variazioni di sequenza determinano oltre il 90% delle anomalie congenite e delle suscettibilità alle malattie.

Eterozigosi: condizione genetica di una cellula o di un organismo costituita dalla presenza di una coppia di alleli diversi in un determinato gene.

Fenotipo: aspetto fisico, biochimico e fisiologico di una persona, dovuto all'interazione del genoma con l'ambiente.

Gene: parte della molecola del DNA di un cromosoma che dirige la sintesi di una specifica catena polipeptidica.

Genoma: insieme di tutte le informazioni genetiche depositate nella sequenza del DNA contenuto nel nucleo delle cellule sotto forma di cromosomi.

Incidental findings: riscontro incidentale di una variante clinicamente rilevante non associata all'indicazione clinica.

LEA: Livelli Essenziali di Assistenza.

Locus: sede fisica di un gene sul cromosoma.

Malattie mendeliane: malattie genetiche che seguono i modelli di trasmissione dei caratteri semplici (malattie monogeniche) e sono dovute alle mutazioni di un singolo gene, definito gene malattia.

Mutazione: modificazione stabile e trasmissibile del patrimonio genetico, a livello di un gene o dei cromosomi; le mutazioni dei gameti sono ereditarie.

Omozigosi: condizione in cui ognuno dei due o più alleli dello stesso gene, presenti in ciascun cromosoma omologo, codificano in maniera identica.

Prioritizzazione e filtraggio: selezione delle varianti che potrebbero avere un significato fenotipico.

Sequenziamento: metodica che permette di determinare l'ordine dei nucleotidi nella molecola del DNA.

Sequenziamento Sanger: metodo di sequenziamento enzimatico a terminazione di catena.

Varianti polimorfiche: sostituzioni nucleotidiche del DNA che si presentano con una frequenza superiore all'1% nella popolazione.

ACRONIMI:

ACC	Alleanza Contro il Cancro
AD	<i>Alzheimer Disease</i> (malattia di Alzheimer)
Array-CGH:	<i>Array Comparative Genomic Hybridization</i> (array ad ibridizzazione genomica comparativa).
CDSS	<i>clinical decision support system</i>
cffDNA	<i>cell free fetal DNA</i>
CGH	Ibridizzazione genomica comparativa
CMA	<i>Chromosomal Microarray Analysis</i>
CNV	<i>Copy Number Variants</i> (variazione del numero di copie di una regione del genoma).
CPG	<i>Cancer Predisposing Genes</i>
CVD	<i>Cardio Vascolar Diseases</i>
DDA	<i>Data-dependent acquisition</i>
DIA	<i>Data independent acquisition</i>
DNA	Acido Desossiribonucleico o deossiribonucleico.
DSSs	<i>decision support systems</i>
FISH	Ibridizzazione in situ fluorescente
FLTD	Demenza fronto-temporale
Gdl	Gruppo di Lavoro
GWAS	<i>Genome Wide Association Studies</i>
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
IRCCS	Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico
LEA	Livelli Esseziali di Assistenza
MS	Massa Tandem
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i> (sequenziamento di nuova/seconda generazione).
NIPT	<i>Non Invasive Prenatal Testing</i>
NPV	valore predittivo negativo
PD	<i>Parkinson disease</i> (morbo di Parkinson)
PNMP	Piano Nazionale per la medicina di precisione
PPV	valore predittivo positivo
PRS	<i>Polygenic Risk Scores</i>
RNA	Acido Ribonucleico
ROC	<i>Receiver Operating Curve</i>
SLA	Sclerosi Laterale Amiotrofica
SM	Spettrometria di massa
SNP-array:	<i>Single Nucleotide Polymorphism array</i> (array dei polimorfismi dei singoli nucleotidi).
SNV	<i>Single Nucleotide Variants</i>

SSN Servizio Sanitario Nazionale

SWATH *Sequential Windowed Acquisition of All Theoretical Fragment ions*

TTO Trasferimento Tecniche Omiche

VOUS *Variations Of Uncertain Significance* (varianti di significato incerto).

WES *Whole Exome Sequencing* (sequenziamento dell'esoma).

WGS *Whole Genome Sequencing* (sequenziamento del genoma)

WHO World Health Organization (Organizzazione Mondiale della Sanità – OMS)



Ministero della Salute

Consiglio Superiore di Sanità

Sessione LII (2019-2022)

Sezione I

Presidente: Prof. Bruno Dallapiccola
Segretario tecnico: Dr. Stefano Moriconi

Gruppo di lavoro

“Trasferimento delle Tecniche Omiche nella pratica clinica” (TTO)

Prof. Bruno Dallapiccola

Presidente Sezione I CSS - Coordinatore

Professore Ordinario di Genetica Medica - Direttore scientifico IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma. Componente del Comitato Nazionale per la Bioetica (Presidenza Consiglio dei Ministri)

Dr. Stefano Moriconi

Segretario tecnico GdL

Dirigente medico, Coordinatore e Direttore della Struttura tecnica di Segreteria della Sezione I del Consiglio Superiore di Sanità, Ministero della salute

Prof. Sergio Abrignani

Consigliere Sezione I CSS

Professore Ordinario di Patologia Generale, Dip.to Scienze cliniche e di comunità, Padiglione Invernizzi, Università di Milano - Direttore Scientifico IRCCS Istituto Nazionale di Genetica Molecolare (INGM) “Romeo ed Enrica Invernizzi”

Prof. Francesco Longo

Consigliere Sezione I CSS

Professore Associato in Management pubblico, Dip.to Analisi delle politiche e management Pubblico, Università Bocconi di Milano

Paolo Gasparini

Direttore Dip.to dei Servizi e di Diagnostica avanzata e Direttore U.O.C. Genetica Medica, IRCCS Burlo Garofalo, Trieste

Dott.ssa Maria Iascone

Azienda Ospedaliera Papa Giovanni XXIII ·· SMEL 4 Citogenetica e Genetica Medica.

Prof. Alfredo Miccheli

Ricercatore confermato, Responsabile Laboratorio di Metabolomica NMR della Sapienza, Dip.to di Biologia ambientale, Università di Roma “Sapienza”

Dr. Antonio Novelli

Direttore U.O.C. Laboratorio di Genetica Medica, IRCCS Osp.le Pediatrico “Bambino Gesù”, Roma

Dott.ssa Lorenza Putignani

Responsabile UOS Parassitologia, Dip.to dei Laboratori – Responsabile UdR Microbioma Umano, Area Malattie Genetiche e Rare, IRCCS Osp.le Pediatrico “Bambino Gesù”, Roma.

Prof. Marco Seri

Professore Ordinario di Genetica Medica, Dip.to di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università Alma Mater di Bologna Direttore U.O. di Genetica Medica, Azienda Ospedaliera Universitaria di Bologna, Policlinico di Sant'Orsola

Dott. Marco Tartaglia

Responsabile, Area di Ricerca "Genetica e Malattie Rare", IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

Dott.ssa Annalisa M. Scopinaro

Presidente UNIAMO Federazione Italiana Malattie rare (F.I.M.R.) Onlus

Dott.ssa Federica Miragliotta

Sezione I CSS

Collaboratore amministrativo, Segreteria tecnica Sezione I CSS, D.G. Organi Collegiali per la Tutela della Salute, Ministero della Salute

Direzione generale Programmazione sanitaria (D.G.Prog.S.) Ministero della salute

Dott.ssa Maria Elena Congiu

Dirigente biologo - Ufficio 5 - LEA assistenza territoriali e sociosanitaria, D.G. Programmazione sanitaria, Ministero della Salute

Dott.ssa Bianca Maria Valentina Polizzi

Dirigente medico - Ufficio 5 - LEA assistenza territoriali e sociosanitaria, D.G. Programmazione sanitaria, Ministero della Salute

IL SEGRETARIO DELLA SEZIONE I

Dr. Stefano Moriconi

IL PRESIDENTE DELLA SEZIONE I

Prof. Bruno Dallapiccola