



Società Italiana di Genetica Umana  
Italian Society of Human Genetic

# Linee di indirizzo sull'analisi dei geni *BRCA1* e *BRCA2* in ambito clinico: criteri di accesso al test, aggiornamento sulle piattaforme diagnostiche e interpretazione del test somatico

**Redatto da:** Gruppo di redazione\* costituitosi da tre Gruppi di Lavoro SIGU – GdL Genetica Oncologica, GdL Genetica Molecolare, GdL Farmacogenomica

**Coordinatori:** Daniela Turchetti, Enrico Tagliafico, Emilio Di Maria

**Estensori:** Davide Bondavalli, Ileana Carnevali, Arcangela De Nicolo, Emilio Di Maria, Marco Montagna, Lidia Moserle, Valeria Pensotti, Enrico Tagliafico, Maria Grazia Tibiletti, Silvia Tognazzo, Daniela Turchetti, Liliana Varesco

**Revisionato da:** Presidente e Consiglio Direttivo SIGU

**\*Gruppo di redazione:**

Francesca Ariani, Linda Battistuzzi, Loris Bernard, Benedetta Bertonazzi, Francesca Boaretto, Bernardo Bonanni, Davide Bondavalli, Adelaide Caligo, Daniele Calistri, Mariarosaria Calvello, Paola Carrera, Rossella Caselli, Angelo Cellamare, Fabiana Crò, Francesca Crosti, Arcangela De Nicolo, Giovanna De Vecchi, Emilio Di Maria, Irene Feroce, Simona Ferrari, Maurizio Genuardi, Daniela Giachino, Viviana Gismondi, Lea Godino, Milena Gusella, Cristiana Lo Nigro, Emanuela Lucci Cordisco, Isabella Mammi, Siranoush Manoukian, Eleonora Marchina, Maria Antonietta Mencarelli, Piergiorgio Modena, Marco Montagna, Lidia Moserle, Alfredo Orrico, Sandro Orrù, Valeria Pensotti, Maria Piane, Paolo Radice, Carla Ripamonti, Daniela Rivera, Enrico Tagliafico, Maria Grazia Tibiletti, Rossella Tita, Silvia Tognazzo, Daniela Turchetti, Vera Uliana, Liliana Varesco, Daniela Zuccarello.



## Indice

<b>Introduzione</b> .....	3
<b>Scopo del documento</b> .....	3
<b>Metodologia</b> .....	4
<b>Criteri per l'eleggibilità alla ricerca di varianti patogenetiche dei geni <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> in ambito clinico</b> .....	5
<b>Premesse</b> .....	5
<b>Metodi</b> .....	5
<b>Risultati: raccomandazioni per i criteri di eleggibilità al test BRCA</b> .....	6
<b>Considerazioni applicative</b> .....	11
<b>Sintesi</b> .....	14
<b>Le criticità associate al test NGS: analisi e possibili soluzioni</b> .....	15
<b>Fase pre-analitica</b> .....	16
<b>Fase analitica</b> .....	17
<b>Fase post-analitica</b> .....	23
<b>Criticità associate al test somatico</b> .....	25
<b>Implicazioni applicative</b> .....	26
<b>Problemi aperti e prospettive future</b> .....	27
<b>Appendice</b> .....	28
<b>Bibliografia</b> .....	29



## Introduzione

A oltre 20 anni dall'identificazione dei geni *BRCA1* e *BRCA2* e dallo sviluppo dei relativi test, l'applicazione dell'analisi è in continua evoluzione. In questi anni si sono ampliate le conoscenze sui fenotipi associati a difetti dei geni BRCA, si sono rese disponibili tecnologie di sequenziamento di nuova generazione e si sono estese le indicazioni ai fini terapeutici.

Recentemente, SIGU, insieme ad altre società scientifiche, ha contribuito alla stesura dei seguenti documenti riguardanti l'applicazione dei test BRCA (citiamo le ultime versioni aggiornate):

- Raccomandazioni per l'implementazione del test BRCA nelle pazienti con carcinoma ovarico e nei familiari a rischio elevato di neoplasia (v.2; gennaio 2019) [1];
- Raccomandazioni per l'implementazione del test BRCA nelle pazienti con carcinoma mammario e nei familiari a rischio elevato di neoplasia (ottobre 2019) [2];
- Raccomandazioni 2020 per l'implementazione dell'analisi mutazionale BRCA nei pazienti con adenocarcinoma del pancreas metastatico (luglio 2020) [3].

Sebbene i suddetti documenti rimangano validi per struttura e impostazione, il tema complessivo delle applicazioni cliniche del test genetico molecolare di *BRCA1* e *BRCA2* necessita di approfondimenti mirati a superare alcune criticità che, rilevate nella pratica, non sono affrontate in tali documenti, e di aggiornamenti alla luce delle più recenti raccomandazioni internazionali.

Gli studi sull'adozione delle linee guida hanno sottolineato i limiti nell'applicazione delle raccomandazioni e la necessità di migliorarne l'implementazione, come sottolineato anche dagli studi condotti in Italia [4,5].

## Scopo del documento

Il presente documento intende fornire linee di indirizzo condivise per l'applicazione delle indagini genetiche molecolari per la ricerca di varianti patogenetiche dei geni BRCA (*BRCA1* e *BRCA2*) sia in persone e famiglie con sospetto diagnostico o rischio genetico di sindrome ereditaria di suscettibilità a tumore della mammella e ovaio (BROVCA)<sup>1</sup> sia in pazienti con tumore BRCA-associato<sup>2</sup>.

È stato adottato il criterio dell'utilità clinica, cioè il valore aggiunto della procedura in termini di esiti di salute, relativamente all'intero percorso clinico offerto alla persona.

Secondo questo criterio, sono considerati in maniera separata i due diversi ambiti di applicazione clinica della ricerca di varianti BRCA: il **test a scopo preventivo**, finalizzato alla riduzione del rischio/delle conseguenze di una diagnosi di tumore mediante il riconoscimento e presa in carico dei soggetti ad alto rischio di tumore in quanto portatori di varianti patogenetiche BRCA, ed il **test a scopo terapeutico**, finalizzato ad individuare il trattamento appropriato in pazienti oncologici che presentano un tipo di tumore/fase di malattia che può essere associato ad alterazioni BRCA, germinali o somatiche, e per il/la quale studi clinici abbiano dimostrato la potenziale utilità del test BRCA in ambito di terapia medica.

<sup>1</sup> *Breast and Ovarian Cancer, familial, susceptibility to* – BROVCA, loci 1 & 2, OMIM #604370, #612555

<sup>2</sup> Il termine corrisponde a *BRCA-Related Cancer* della letteratura, e comprende le diverse forme neoplastiche causate da varianti patogenetiche dei geni *BRCA1* e *BRCA2*.



Il documento è rivolto all'ambito clinico, e in particolare alle strutture di genetica medica, sia cliniche sia di laboratorio, e ai professionisti impiegati in queste strutture.

Destinatari sono i soci SIGU che con diversi ruoli e funzioni si trovano a operare con pazienti (e famiglie) con sospetto BROVCA o con tumore BRCA-associato e/o ad analizzarne il materiale genetico.

Le linee di indirizzo qui riportate sono emerse dal consenso di un gruppo di stesura costituitosi da tre Gruppi di Lavoro SIGU – Genetica Oncologica, Genetica Molecolare e Farmacogenetica – e sono basate sulle più recenti raccomandazioni disponibili.

Queste linee di indirizzo potranno essere utilizzate per l'allestimento di percorsi diagnostico-terapeutici locali, e implementate in base all'analisi del contesto specifico. A questo scopo, potrà seguire una fase di disseminazione dei contenuti del documento, che ne faciliti la corretta implementazione laddove appropriato.

## Metodologia

- Evento iniziale con presentazione di esperienze e discussione delle problematiche da affrontare (Modena, 24 maggio 2019).
- Individuazione delle tre tematiche su cui lavorare:
  - o criteri di eleggibilità al test BRCA;
  - o gestione delle criticità legate ai nuovi metodi di analisi;
  - o interpretazione ai fini clinici dei dati prodotti dalle analisi somatiche.
- Costituzione dei tre relativi sottogruppi di lavoro (i componenti dei GdL Genetica Molecolare, Genetica Oncologica e Farmacogenomica sono stati invitati ad aderire, se interessati, a uno o più sottogruppi).
- Elaborazione e stesura delle tre sezioni corrispondenti alle tematiche individuate da parte dei sottogruppi; redazione della bozza a cura dei coordinatori.
- Discussione plenaria della bozza in occasione dell'incontro del GdL Oncologia (28 ottobre 2020, modalità remota).
- Revisione della bozza a cura dei coordinatori.



## SEZIONE 1:

# Criteri per l'eleggibilità alla ricerca di varianti patogenetiche dei geni *BRCA1* e *BRCA2* in ambito clinico

## Premesse

Gli studi sull'implementazione delle linee guida su *BRCA counselling & testing* raccomandano di sviluppare strategie che includono una formazione specifica e l'armonizzazione delle linee guida per aumentare la consapevolezza dei programmi e migliorare la concordanza delle linee guida nella pratica clinica [4,5].

Una recente rassegna sistematica ha evidenziato la presenza in ambito internazionale di un numero notevole di linee guida e raccomandazioni; inoltre l'analisi delle raccomandazioni ha evidenziato differenze tra aree e organizzazioni rispetto a valutazione, counselling e trattamento in pazienti con tumore della mammella associato a *BRCA1/2* [6].

Questa sezione del documento è dedicata all'individuazione di criteri generali e condivisi per stabilire l'indicazione alla ricerca di varianti patogenetiche nei geni *BRCA1* e *BRCA2*.

Assumiamo qui la validità analitica e la validità clinica del test genetico molecolare, ovvero, rispettivamente, la capacità del saggio di laboratorio di rilevare le varianti di interesse, e la validità dell'associazione tra variante genetica e diagnosi o rischio di malattia.

Inoltre, il quesito attiene esclusivamente all'*effectiveness* del test e non costituisce una valutazione complessiva in ordine alla sua implementazione nel percorso clinico, che invece prevederebbe la valutazione del contesto assistenziale, il punto di vista dell'utente, una valutazione economica, etc. Queste dimensioni di valutazione potranno essere oggetto di successivi impegni.

## Metodi

Per reperire le più recenti raccomandazioni è stata condotta una ricerca della letteratura secondaria focalizzata sulla produzione di raccomandazioni evidence-based pertinenti il quesito di ricerca, in particolare: i) linee guida o altri documenti normativi; ii) rassegne sistematiche (systematic reviews) di linee guida.

Quesito di ricerca:

- *What inclusion criteria for diagnostic and predictive testing of BRCA1 and BRCA2 genes lead to improved clinical outcome in patients with BRCA-related tumours and at-risk relatives?*
- Quali sono i criteri di inclusione per il test diagnostico e predittivo di *BRCA1* e *BRCA2* che portano a un esito clinico favorevole in pazienti con tumori correlati a *BRCA* e nei familiari a rischio?



Dall'analisi preliminare è emersa una rassegna sistematica aggiornata al 07.02.18 ("A systematic review of international guidelines and recommendations for the genetic screening, diagnosis, genetic counseling, and treatment of BRCA-mutated breast cancer") [6].

Di conseguenza la ricerca è stata limitata dal 2018 e aggiornata al 30.06.20.

## Risultati: raccomandazioni per i criteri di eleggibilità al test BRCA

Includendo la rassegna di Forbes et al. sopra citata [6] e le successive pubblicazioni, sono stati selezionati i seguenti documenti:

1. Forbes C, Fayter D, de Kock S, Quek RG. A systematic review of international guidelines and recommendations for the genetic screening, diagnosis, genetic counseling, and treatment of BRCA-mutated breast cancer. *Cancer management and research*. 2019;11:2321-37 [6]
2. US Preventive Services Task Force. Risk Assessment, Genetic Counseling, and Genetic Testing for BRCA-Related Cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *JAMA*. 2019;322(7):652-65
3. Gruppo di Lavoro AIOM - SIGU - SIBIOC - SIAPEC-IAP. Raccomandazioni 2019 per l'implementazione del test BRCA nelle pazienti con carcinoma mammario e nei familiari a rischio elevato di neoplasia. 2019 [2]
4. Gruppo di Lavoro AIOM - SIGU - SIBIOC - SIAPEC-IAP. Raccomandazioni per l'implementazione del test BRCA nelle pazienti con carcinoma ovarico e nei familiari a rischio elevato di neoplasia. 2019 [1]
5. Gruppo di Lavoro AIOM - SIGU - SIBIOC - SIAPEC-IAP Raccomandazioni 2020 per l'implementazione dell'analisi mutazionale BRCA nei pazienti con adenocarcinoma del pancreas metastatico. 2020 [3]

Tutti i documenti selezionati sono pubblicati nel 2019. L'articolo seguente è stato individuato come pertinente, ma non selezionato per l'estrazione delle raccomandazioni in quanto precedente alle raccomandazioni relative alle pazienti con carcinoma ovarico aggiornate al 2019.

- Eccles DM, Balmaña J, Clune J, Ehken B, Gohlke A, Hirst C, et al. Selecting Patients with Ovarian Cancer for Germline BRCA Mutation Testing: Findings from Guidelines and a Systematic Literature Review. *Advances in therapy*. 2016;33(2):129-50 [7].

Per ciascuno dei documenti 1-5 sopra riportati riportiamo di seguito una sintesi delle raccomandazioni attinenti allo scopo del documento e pertinenti il quesito specifico di questa sezione, distinguendo le due finalità cliniche (prevenzione e trattamento medico) quando il documento si occupa di entrambe

### 1.

**Forbes et al., 2019** [6] hanno reperito dalla letteratura 32 linee guida. Sottoposte all'analisi di qualità secondo il paradigma AGREE II, metà di queste hanno dimostrato un *risk of bias* e non sarebbero perciò appropriate per l'utilizzo clinico. Al termine dell'estrazione, le raccomandazioni sono state sintetizzate lungo quattro domini:

- *Recommendations for genetic counselling*
- *Recommendations relating to BRCA testing*



- *Recommendations relating to breast cancer screening*
- *Recommendations for the treatment of BRCA breast cancer*

Il primo e il secondo punto sono strettamente pertinenti al nostro quesito di ricerca. La sintesi delle raccomandazioni su questi punti è organizzata per le seguenti popolazioni [si veda *table 2* in Forbes et al., 2019 [6]]:

- *Women with no breast cancer*
- *Individuals (men and women) with no breast cancer*
- *Women with breast cancer*
- *Men with no breast cancer*
- *Men with breast cancer*

Per ognuno di questi gruppi nella sintesi sono riportate le costellazioni di storia familiare oncologica (raggruppate secondo due livelli di rischio) e le azioni ad esse associate (*referral to medical genetics services, genetic counselling, genetic testing, BRCA mutation testing, etc.*) che sono state riportate nelle linee guida valutate dalla rassegna sistematica. Oltre al tumore della mammella, nella storia familiare vengono presi in considerazione anche il tumore ovarico, pancreatico e prostatico.

## 2.

**Le raccomandazioni dall'US Preventive Services task force (USPSTF) [8,9]** includono lo spettro delle condizioni associate a *BRCA variants*. Sono focalizzate su una serie di domande chiave strutturate secondo il paradigma PICO (*Patients Intervention/exposure Comparison Outcome*) – riportate nel box seguente.

Risk Assessment, Genetic Counseling, and Genetic Testing for BRCA-Related Cancer in Women: Updated Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force [9]

Key questions:

1. In women with unknown BRCA1/2 mutation status, does risk assessment, genetic counseling, and genetic testing result in reduced incidence of BRCA1/2-related cancer and cause-specific and all-cause mortality?
- 2a. What is the accuracy of familial risk assessment for BRCA1/2-related cancer when performed by a nonspecialist in genetics in a clinical setting? What are the optimal ages and intervals for risk assessment?
- 2b. What are the benefits of pre-test genetic counseling in determining eligibility for genetic testing for BRCA1/2-related cancer? (Includes improved accuracy of risk assessment and pretest probability for testing and improved patient knowledge, understanding of benefits and harms of interventions to reduce risk, risk perception, satisfaction, and health and psychological outcomes.)
- 2c. What are optimal testing approaches to determine the presence of pathogenic BRCA1/2 mutations in women at increased risk for BRCA1/2-related cancer? (Includes testing other high-risk family members, including men, before testing the index patient and using specific types of tests or multigene panels.) BRCA Genetic Screening 8 Pacific Northwest EPC
- 2d. What are optimal post-test counseling approaches to interpret results and determine eligibility for interventions to reduce risk of BRCA1/2-related cancer? (Includes improved patient knowledge, understanding of benefits and harms of interventions to reduce risk, risk perception, satisfaction, and health and psychological outcomes.)
3. What are adverse effects of a) risk assessment, b) pre-test genetic counseling, c) genetic testing, and d) post-test counseling for BRCA1/2-related cancer? (Includes inaccurate risk assessment; inappropriate testing; false-positive and false-negative results; adverse effects on the patient's family relationships; overdiagnosis and overtreatment; false reassurance; incomplete testing; misinterpretation of test results; anxiety; cancer worry; and ethical, legal, and social implications.)
4. Do interventions reduce the incidence of BRCA1/2-related cancer and mortality in women at increased risk? (Includes intensive screening [earlier and more frequent screening; use of additional screening methods], use of risk-reducing medications [aromatase inhibitors; tamoxifen; raloxifene], and risk-reducing surgery [mastectomy; salpingo-oophorectomy; other procedures] when performed for prevention purposes.)



5. What are adverse effects of interventions to reduce risk for BRCA1/2-related cancer? (Includes immediate and long-term harms associated with screening, risk-reducing medications, and risk-reducing surgery and ethical, legal, and social

Queste linee guida riguardano il solo ambito preventivo e la popolazione femminile. Riportiamo di seguito le raccomandazioni finali:

- ✓ *The USPSTF found adequate evidence that the benefits of risk assessment, genetic counseling, and genetic testing are moderate in women whose family history is associated with an increased risk for harmful mutations in the BRCA1/2 genes – i.e. women with a personal or family history of breast, ovarian, tubal, or peritoneal cancer or who have an ancestry associated with BRCA1/2 gene mutations.*
  - *Recommendation: Assess with an appropriate brief familial risk assessment tool [Grade: B]<sup>3</sup>.*
  
- ✓ *The USPSTF found adequate evidence that the benefits of risk assessment, genetic counseling, and genetic testing are small to none in women whose family history is not associated with an increased risk for harmful mutations in the BRCA1/2 genes.*
  - *Recommendation: Do not perform routine risk assessment, genetic counseling, or genetic testing [Grade: D]<sup>4</sup>.*

La linea guida prevede una **valutazione strutturata del rischio ed elenca gli strumenti ritenuti accurati** ai fini dell'applicazione delle raccomandazioni – riportiamo di seguito il punto relativo:

**Risk assessment:**

*Patients with family or personal histories of breast, ovarian, tubal, or peritoneal cancer or ancestry associated with harmful BRCA1/2 mutations should be assessed using a familial risk assessment tool. The USPSTF found adequate evidence that the following tools are accurate in identifying women with increased likelihood of BRCA1/2 mutations and should be used to guide referrals to genetic counselling:*

- *Ontario Family History Assessment Tool*
- *Manchester Scoring System*
- *Referral Screening Tool*
- *Pedigree Assessment Tool,*
- *7-Question Family History Screening Tool*
- *International Breast Cancer Intervention Study instrument (Tyrer-Cuzick)*
- *brief versions of BRCAPRO*

**3.**

**Le raccomandazioni del Gruppo di Lavoro AIOM - SIGU - SIBIOC - SIAPEC-IAP per l'implementazione del test BRCA nelle pazienti con carcinoma mammario e nei familiari a rischio elevato di neoplasia si occupano dei due campi di applicazione:**

- I. Consulenza genetica oncologica e test BRCA a scopo preventivo

<sup>3</sup> Valutare con uno strumento appropriato di valutazione breve del rischio familiare [raccomandazione di grado B].

<sup>4</sup> Non eseguire routinariamente valutazione del rischio, consulenza genetica o test genetico [raccomandazione di grado D].



## II. Test BRCA a scopo terapeutico

Riportiamo di seguito l'estratto delle raccomandazioni relative entrambi i campi.

### I. Consulenza genetica oncologica e test BRCA a scopo preventivo

L'indicazione all'esecuzione del test è basata generalmente sulla storia personale e familiare, e tiene conto degli elementi usualmente impiegati per il riconoscimento dei tumori legati a predisposizione ereditaria: numero di parenti affetti, tipo di neoplasia, tumori primitivi multipli, età alla diagnosi, caratteristiche istologiche, immunoistochimiche e molecolari dei tumori. Queste variabili sono organizzate in criteri che, se soddisfatti, rendono indicato l'invio alla consulenza genetica – li riportiamo testualmente (da tabella 1, pag. 3 [2]).

#### Criteri per l'invio alla consulenza genetica oncologica del/della paziente con carcinoma mammario:

- ✓ Storia personale di:
  1. Carcinoma mammario maschile
  2. Donna con carcinoma mammario e carcinoma ovarico
  3. Donna con carcinoma mammario < 36 anni
  4. Donna con carcinoma mammario triplo negativo < 60 anni
  5. Donna con carcinoma mammario bilaterale < 50 anni
- ✓ Storia personale di carcinoma mammario < 50 anni e familiarità di primo grado\* per:
  - Carcinoma mammario < 50 anni
  - Carcinoma ovarico non mucinoso o borderline a qualsiasi età
  - Carcinoma mammario bilaterale
  - Carcinoma mammario maschile
- ✓ Storia personale di carcinoma mammario > 50 anni e familiarità per carcinoma mammario, ovarico in 2 o più parenti in primo grado\* tra loro (di cui uno in primo grado con lei)
- ✓ Storia familiare di: Variante patogenetica nota in un gene predisponente in un familiare  
[\* parenti di primo grado=genitori, fratelli/sorelle e figli. Per il lato paterno della famiglia, considerare anche familiari di secondo grado (nonna, zie)]

Questi criteri individuano situazioni associate a una probabilità superiore al 10% di identificare una VP BRCA germinale e rappresentano, quindi, un'indicazione all'esecuzione di un test con accettabile rapporto costi/benefici. Inoltre, è importante tenere presente che i criteri di avvio alla consulenza genetica per sospetto tumore ereditario BRCA-associato sono in evoluzione, sia in relazione alle maggiori capacità tecnologiche e alla più ampia disponibilità di percorsi di prevenzione strutturati, sia sulla spinta della disponibilità di farmaci specifici anche per altri tumori. Le indicazioni della linea guida sono state recepite in alcune Regioni italiane.

## II. Test BRCA a scopo terapeutico

Riconoscendo che la presenza di una variante patogenetica BRCA ha implicazioni terapeutiche per le donne che hanno già una diagnosi di neoplasia mammaria, la linea guida distingue il corpo di conoscenze disponibili in due condizioni cliniche (punti 2.1 e 2.2 [2]):

- Donne con diagnosi di carcinoma mammario in fase NON metastatica;
- Donne con diagnosi di carcinoma mammario in fase metastatica.



Riportiamo di seguito l'estratto dei punti chiave evidenziati nel documento (pagg. 6, 8, 9 [2]).

Test BRCA come test predittivo di efficacia alle terapie antitumorali:

▪ Donne con diagnosi di carcinoma mammario in fase NON metastatica

– Terapia antitumorale sistemica neoadiuvante:

Ad oggi i dati disponibili sul beneficio dell'aggiunta dei derivati del platino nel trattamento neoadiuvante delle pazienti con tumore mammario BRCA-correlato sono ancora controversi e non permettono di definire un potenziale trattamento personalizzato.

Attualmente le linee guida raccomandano di basare la decisione del tipo di chemioterapia o terapia ormonale sui fattori prognostici e predittivi consolidati per le forme sporadiche.

Nel setting neo-adiuvante, l'aggiunta dei sali di platino a una chemioterapia standard (contenente antracicline e taxani) può essere considerata nelle pazienti con neoplasia mammaria triplo negativa. L'uso degli inibitori di PARP in fase neo-adiuvante è ancora oggetto di valutazione in studi clinici.

– Terapia antitumorale sistemica adiuvante:

Nel setting adiuvante non esistono solidi dati prospettici sull'uso dei derivati del platino nelle pazienti con carcinoma mammario BRCA-correlato.

Il possibile ruolo dei PARP-inibitori dovrà essere stabilito dagli studi in corso.

Il trattamento endocrino adiuvante segue le stesse raccomandazioni date per le pazienti con carcinoma mammario senza varianti patogenetiche BRCA.

▪ Donne con diagnosi di carcinoma mammario in fase metastatica

La presenza di una variante patogenetica BRCA in donne con diagnosi di carcinoma mammario in fase metastatica può avere un impatto sulla scelta del trattamento antitumorale sistemico. Attualmente in Italia un inibitore di PARP, olaparib, è utilizzabile nell'ambito di un programma compassionevole per le pazienti con carcinoma mammario metastatico con alterazione BRCA germinale, sia nei tumori tripli-negativi che in quelli recettori ormonali positivi/HER2-negativi.

#### 4.

**Le raccomandazioni del Gruppo di Lavoro AIOM - SIGU - SIBIOC - SIAPEC-IAP per l'implementazione del test BRCA nelle pazienti con carcinoma ovarico e nei familiari a rischio elevato di neoplasia distinguono i due campi di applicazione, preventivo e terapeutico.**

Riportiamo di seguito l'estratto delle raccomandazioni relative all'utilizzo del test BRCA.

1. Test BRCA come test predittivo di efficacia alle terapie antitumorali:

– Si ribadisce la raccomandazione di proporre l'invio al test BRCA sin dal momento della prima diagnosi di carcinoma epiteliale ovarico non mucinoso e non borderline, di carcinoma delle tube di Falloppio o di carcinoma peritoneale primitivo.

– La proposta di esecuzione del test BRCA al momento della diagnosi deve avvenire fornendo una adeguata informazione su tutti gli aspetti collegati ai possibili risultati del test e rispettando i tempi decisionali della paziente.

Per il tumore ovarico viene raccomandato di completare l'analisi sul tessuto tumorale nel caso in cui la finalità del test sia di tipo terapeutico (l'accesso ai farmaci è infatti già possibile anche in presenza di alterazioni somatiche).



2. Test BRCA per la diagnosi di predisposizione ereditaria:

- Il test BRCA è consigliato a tutte le pazienti con carcinoma ovarico non mucinoso e non borderline, carcinoma delle tube di Falloppio o carcinoma peritoneale primitivo.
- È importante offrire il test BRCA sin dalla diagnosi.

5.

**Le raccomandazioni del Gruppo di Lavoro AIOM - SIGU - SIBIOC - SIAPEC-IAP per l'implementazione dell'analisi mutazionale BRCA nei pazienti con adenocarcinoma del pancreas metastatico** trattano il test BRCA come test predittivo di efficacia delle terapie e, nella versione del luglio 2020, includono il test BRCA per la diagnosi di predisposizione ereditaria. Riportiamo di seguito l'estratto delle raccomandazioni relative all'utilizzo del test BRCA in questi due ambiti.

Test BRCA come test predittivo di efficacia delle terapie antitumorali e gestione terapeutica dei pazienti con carcinoma pancreatico metastatico con variante patogenetica germline BRCA (punti salienti evidenziati nel box a pagg 8-9 [3]):

- Il test BRCA germinale dovrebbe essere offerto a tutti i pazienti con adenocarcinoma pancreatico metastatico:
  - a) nei pazienti in cui sia ipotizzabile un trattamento a base di derivati del platino, il test BRCA assume un significato predittivo di efficacia alle terapie antitumorali attualmente disponibili e, pertanto, i tempi di refertazione dovrebbero essere adeguati alla necessità clinica di programmare la migliore strategia terapeutica;
  - b) in tutti gli altri pazienti, non candidati a terapia con derivati del platino, rimane l'indicazione ad effettuare il test BRCA germinale per la diagnosi di predisposizione ereditaria e per il significato preventivo che assume l'identificazione di una VP costituzionale. In questo caso i tempi di refertazione dovranno mantenersi congrui ma, sulla base delle esigenze cliniche, potranno essere differenziati da quelli del percorso predittivo.

L'avvio al test BRCA deve essere effettuato nell'ambito di un percorso multidisciplinare.

La proposta di esecuzione del test BRCA deve avvenire fornendo una adeguata informazione su tutti gli aspetti collegati ai possibili risultati del test e rispettando i tempi decisionali del paziente.

## Considerazioni applicative

La rassegna di Forbes et al. [6] costituisce una fonte di informazione completa, pur aggiornata al 2018, relativamente al corpus di raccomandazioni relative a *BRCA testing*.

Tuttavia non costituisce una linea guida: le raccomandazioni sono state estratte e sintetizzate in un'utile sinossi, ma non sono state rivalutate in ordine alla loro applicazione clinica (*grading*, o forza della raccomandazione).

Le conclusioni dello studio sottolineano le discrepanze e il livello di qualità non sempre sufficiente.



Società Italiana di Genetica Umana  
Italian Society of Human Genetic

Le raccomandazioni dell'US Preventive Services task force (USPSTF) [8] costituiscono un sistema di raccomandazioni evidence-based sviluppato in una cornice scientificamente autorevole e secondo una metodologia affidabile. La linea guida prevede un piano di disseminazione efficace [10], che comprende anche l'informazione diretta alla popolazione target – si veda la pubblicazione dedicata su JAMA [11] di cui riportiamo la figura.

**Risk Assessment, Genetic Counseling, and Genetic Testing for BRCA-Related Cancer**

*BRCA1/2 gene mutations, which are passed down among families, are linked to an increased risk of breast and ovarian cancer in women. Some women may benefit from genetic testing for harmful BRCA1/2 mutations based on their personal and/or family history of breast or ovarian cancer.*

---

 **Population**  
Women without cancer symptoms with unknown BRCA1/2 mutation status

---

**USPSTF recommendation**

 The USPSTF recommends risk assessment for women with a personal or family history of breast, ovarian, tubal, or peritoneal cancer or who have an ancestry associated with harmful BRCA1/2 mutations with an appropriate risk assessment tool. Women with a positive result on the risk assessment tool should receive genetic counseling and, if indicated after counseling, genetic testing.

 The USPSTF recommends against risk assessment, genetic counseling, or genetic testing for women without risk factors for harmful BRCA1/2 mutations.

Tratto da “Should I Be Tested for BRCA Mutations?“, JAMA 2019 [11].

USPTF conferma la posizione contraria all'estensione del test BRCA a donne senza storia familiare o personale associata al rischio di varianti patogenetiche; raccomandano invece che i medici delle cure primarie valutino le persone con storia familiare o personale indicativa di suscettibilità a neoplasie associate a *BRCA1/2* e le indirizzino verso un percorso di counselling ed eventuale test genetico [9]. La posizione dell'USPSTF è in linea con la tendenza a portare la prima valutazione del rischio genetico legato a *BRCA1/2* nell'ambito delle cure primarie, secondo quello che in Europa è stato definito *mainstream genetics*[12]. Questo aspetto dovrà essere considerato relativamente all'applicazione delle raccomandazioni nel contesto del Sistema Sanitario Nazionale in Italia.

USPTF sottolinea l'utilità di strumenti di valutazione strutturata della storia personale e familiare. L'esito della valutazione non costituirà l'unico criterio di accesso al test BRCA, giacché sarà da considerare nell'ambito del percorso clinico. Tuttavia, l'utilizzo di strumenti validati, quali quelli contemplati della linea guida, può contribuire a migliorare l'appropriatezza dei percorsi e a uniformare le valutazioni al fine di renderle confrontabili tra diversi contesti assistenziali.

USPSTF sottolinea altresì che esistono numerosi difetti di conoscenza e che sono ancora irrisolte alcune questioni: chi debba effettuare la valutazione del rischio e la consulenza genetica, e come questi debbano



essere svolti; l'*effectiveness* delle diverse modalità, quali competenze sono necessarie; l'impatto di questi aspetti sulle scelte dei pazienti e sull'*outcome* del percorso.

Il documento USPTF [8] delinea anche le aree di ricerca ritenute più importanti [riportate nel box]

**Research needs and gaps:**

Research on risk assessment and testing for BRCA1/2 mutations has focused on short-term outcomes for highly selected women in referral centers.

To determine the best approaches for population based risk assessment and testing, more research is needed about mutation prevalence and effects on the general population as well as ethnicities or ancestries associated with BRCA1/2 mutations.

Because risk assessment is primarily based on family history, more research is needed to better understand how women with an unknown family history should be assessed for BRCA1/2 mutation risk.

Additional studies are needed, including comparative effectiveness trials, of approaches to risk screening and strategies to improve access to genetic counseling, as well as BRCA1/2 testing for high-risk individuals.

It would be helpful to understand which methods of delivery of genetic counseling are most effective, including those that can increase access to genetic counseling in rural or other settings with

limited access. Trials comparing types of clinicians and protocols could address these questions.

The consequences of genetic testing for individuals and their relatives require more study. Well designed investigations using standardized measures and diverse study populations are needed.

An expanded database or registry of patients receiving genetic counseling for inherited breast and ovarian cancer susceptibility or who are tested for BRCA1/2 mutations would provide useful information about predictors of cancer and response to interventions. Additional data are needed from women of varying socioeconomic and racial/ethnic groups.

In linea con quanto evidenziato da USPSTF, si ritiene opportuno promuovere studi comparativi sull'*effectiveness* dei modelli applicati nei centri italiani, individuando specifiche domande di ricerca ritenute prioritarie nel contesto nazionale.

Le raccomandazioni del gruppo di lavoro multidisciplinare AIOM - SIGU - SIBIOC - SIAPEC-IAP sono organizzate in tre distinti documenti, ciascuno per una specifica condizione clinica – tumore della mammella, tumore dell'ovaio, tumore metastatico del pancreas [1-3].

Le raccomandazioni sono ulteriormente classificate in base all'applicazione, in ragione dello sviluppo recente delle terapie mirate per le forme tumorali con varianti di *BRCA1* e *BRCA2* – questo aspetto sarà trattato anche nella terza sezione di questo documento per quanto riguarda il test somatico.

Le linee guida del Gruppo di Lavoro AIOM - SIGU – SIBIOC - SIAPEC-IAP relative al tumore della mammella riconoscono la presenza sul territorio nazionale di varie costellazioni di criteri (sia pur simili) per l'eleggibilità alla consulenza genetica e ribadiscono la necessità di contestualizzare i criteri tabellari nella specifica situazione familiare. Infine, riconoscono che il test a scopo terapeutico può essere richiesto anche al di fuori di criteri di sospetto BROVCA.

Nell'ambito della pratica clinica, i criteri di riferimento per l'avvio alla consulenza genetica debbono essere adeguatamente contestualizzati. In particolare, nei casi in cui l'effettuazione del test BRCA sia indispensabile per l'accesso a specifici trattamenti antitumorali, dovrà essere presa in considerazione l'opportunità di eseguirlo anche in pazienti che non rientrano nei criteri di invio alla consulenza genetica oncologica. Questa decisione deve essere condivisa nell'ambito della discussione collegiale del Gruppo multidisciplinare (vedi paragrafo 2.2 [2]).

Inoltre, tutte le linee guida del Gruppo di Lavoro AIOM - SIGU – SIBIOC - SIAPEC-IAP introducono nel contesto del test BRCA l'approccio *mainstream* già citato [12] con l'adozione presso le strutture



specialistiche (in particolare di Oncologia e Chirurgia), del cosiddetto mini-counseling per il test BRCA a fini terapeutici.

Il cosiddetto mini-counseling è suggerito, in particolare, per ridurre i tempi di attesa e il carico di lavoro per le figure professionali impegnate nel processo di counseling oncogenetico. Viene ribadita altresì la necessità di un expertise specifico perché durante un breve colloquio occorre veicolare i contenuti fondamentali della consulenza genetica oncologica adattandoli alla situazione clinica e familiare della paziente.

## Sintesi

- Le raccomandazioni delle Società Scientifiche Italiane riguardo l'accesso alla valutazione genetica si fondano sull'utilizzo di criteri di selezione descrittivi. USPTF sottolinea, tuttavia, l'utilità di strumenti di valutazione strutturata della storia personale e familiare. Sugeriamo di adottare uno o più strumenti validati, al fine di verificare ulteriormente la validità dei criteri nel contesto italiano e di rendere confrontabili le valutazioni tra diversi centri, anche a livello internazionale.
- Nell'informazione agli utenti deve essere rimarcato che l'esecuzione del test a scopo preventivo è sconsigliata in persone che non presentano criteri clinico-familiari di sospetto, in quanto i rischi superano i benefici, come sottolineato nelle raccomandazioni USPTF.
- Sebbene il gold-standard rimanga l'esecuzione del test nell'ambito di un percorso completo di consulenza genetica oncologica, laddove appropriato, in funzione dei percorsi esistenti nel contesto locale, può essere adottato l'approccio *mainstream*. Questo approccio favorisce un ruolo attivo del livello delle cure primarie nell'individuazione delle persone/famiglie che presentano requisiti di accesso alla valutazione del rischio, e delle strutture specialistiche (in particolare Oncologia e Chirurgia) con l'adozione del cosiddetto mini-counseling per il test BRCA a fini terapeutici.
- È essenziale che l'utilizzo dei criteri avvenga entro un protocollo condiviso tra le strutture di genetica, i medici di medicina generale e gli specialisti e che la gestione di eventuali casi complessi avvenga sempre con modalità multi-interdisciplinare, in modo da garantire l'approccio corretto e, quando necessario, personalizzato.
- Va promossa la formazione sul campo e l'aggiornamento costante dei professionisti coinvolti, adottando un approccio multidisciplinare e multiprofessionale.

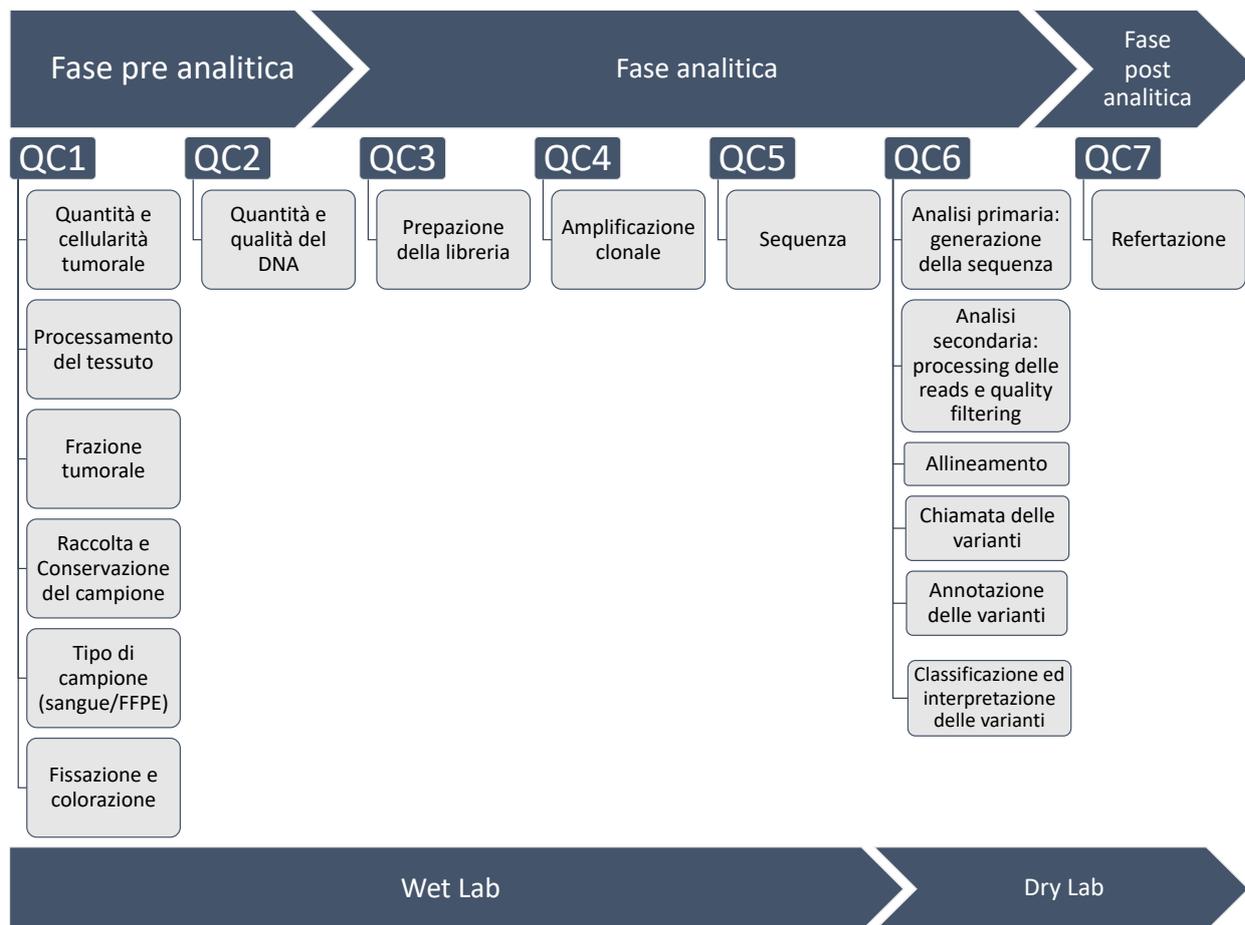


## SEZIONE 2:

# Le criticità associate al test NGS: analisi e possibili soluzioni

L'avvento del sequenziamento di nuova generazione (NGS) nella routine della diagnostica molecolare clinica, rende sempre più importante la standardizzazione delle metodiche e delle procedure nell'analisi mutazionale germinale e, ancora con più urgenza, in quella somatica. In questo documento si cercherà di riassumere le criticità di laboratorio legate al test BRCA allo scopo di fornire degli strumenti di valutazione dei singoli checkpoint analitici e suggerire possibili soluzioni.

I punti di controllo del monitoraggio della qualità includono: qualificazione pre-analitica del campione, valutazione del DNA, preparazione delle librerie destinate all'NGS, amplificazione clonale, sequenziamento, analisi dei dati e refertazione [13,14] (Figura 1).



**Figura 1.** I checkpoint del monitoraggio sequenziale della qualità (QC) del processo NGS. Il primo checkpoint è rappresentato dalla qualificazione pre-analitica del tessuto; altri punti di controllo includono quantità di DNA, preparazione delle librerie, amplificazione, sequenziamento e analisi dei dati.

Prenderemo quindi in considerazione ed esporremo alcuni suggerimenti per utilizzare al meglio un test BRCA sia nel contesto di un'analisi germinale sia in quello di una somatica, attraverso un compendio



ragionato della letteratura, unitamente alle evidenze e alle esperienze messe a disposizione dai medici e dai biologi dei laboratori di diagnostica molecolare/genomica che si sono adoperati alla stesura di questo documento.

## Fase pre-analitica

A differenza di quanto avviene per i test costituzionali, per il successo dell'analisi mutazionale somatica eseguita in NGS, gioca un ruolo chiave la fase pre-analitica Al-Kateb et al. [15] hanno dimostrato che su una casistica di 1528 campioni, il 90% dei fallimenti delle analisi NGS è stato da imputare a cause pre-analitiche. Una vasta letteratura è stata prodotta sui fattori che possono determinare il successo o il fallimento di un'analisi NGS somatica in fase pre-analitica [16-19]. Non ci sono studi simili per l'analisi germinale poiché per essa vengono usati prevalentemente campioni ematici freschi o congelati, per i quali non sussistono le problematiche legate alla fissazione e alla preservazione del tessuto; anche per questi tuttavia, sono valide le considerazioni di carattere generale.

La quantità di tessuto e il numero di cellule vitali sono i fattori che maggiormente influenzano la quantità di DNA isolabile da un preparato istologico fissato in formalina ed incluso in paraffina (FFPE) e rappresentano quindi le variabili più critiche. La resa media di DNA genomico, attesa da una singola cellula nucleata, è di circa 6 pg. Per ottenere 10 ng di DNA (la minima quantità di DNA richiesto da molti protocolli per la preparazione delle librerie basate su PCR) sono quindi necessarie circa 2000 cellule. Goswami et al. [17] hanno calcolato che occorrono (mediamente in base al tipo cellulare) 0.25-1 mm<sup>3</sup> di tessuto che, a seconda della sua grandezza, corrispondono a 5-10 sezioni spesse 10 µm. La percentuale di cellule vitali presenti nel tessuto ha un impatto molto significativo sulla quantità di DNA isolabile e quindi sul successo del sequenziamento. E' da tenere ben presente che la necrosi tumorale, che in genere porta all'autolisi dei componenti cellulari (cariolisi inclusa), è incompatibile con i test di sequenziamento; al contrario, l'apoptosi, che è associata alla frammentazione nucleare del DNA, si presume sia compatibile se la metodica prevede la preparazione di librerie con ampliconi di lunghezza breve. Molti farmaci chemioterapici, tra cui gli antimetaboliti e gli agenti alchilanti, esercitano i loro effetti antitumorali attraverso l'apoptosi. Pertanto, il tumore morfologicamente non vitale, nei campioni post-trattamento chemioterapico, può produrre DNA frammentato utilizzabile per i test molecolari.

Ancora, la capacità della tecnologia NGS di descrivere varianti geniche associate al tumore, dipende della grandezza della frazione tumorale presente nel tessuto da cui sarà isolato il DNA. Le linee guida più diffuse sui test somatici, al fine di minimizzare la quota di falsi negativi, consigliano l'utilizzo di preparati istologici con una frazione minima di arricchimento in cellule neoplastiche superiore al 20%. Il limite di rilevazione (limit of detection, LOD) dell'analisi dipenderà inoltre dalla profondità di copertura (vedi paragrafo "sequenziamento").

Da queste criticità nasce la raccomandazione che la fase pre-analitica preveda la designazione di personale di anatomia patologica/citopatologia dedicato alla selezione delle sezioni di tessuto o delle preparazioni citologiche. In particolare, al personale medico sarà richiesto di selezionare le aree più ricche di tessuto tumorale tra i campioni disponibili e di evidenziare le aree tumorali presenti nelle sezioni di tessuto FFPE su vetrini colorati con Ematossilina-Eosina (H&E) e di produrre un referto di consulenza che riporti la selezione e la quantificazione della frazione neoplastica e/o la presenza di aree necrotiche nella sezione di tessuto. Il personale di laboratorio dovrà quindi produrre altre sezioni in bianco (almeno 5 sezioni da 10 µm su vetrini non trattati) del tessuto FFPE selezionato ed occuparsi della selezione dell'area neoplastica, corrispondente all'area evidenziata dal patologo sulla sezione colorata. Diversamente, in caso di campione ad alta frazione di tessuto neoplastico, le sezioni del blocchetto potranno essere direttamente collezionate in tubo a fondo conico e consegnate al laboratorio. È importante, in ogni caso, che le informazioni riguardanti la selezione e la quantificazione della frazione neoplastica nel tessuto destinato all'analisi molecolare siano dettagliate in un report scritto. La tabella 1 riassume i principali fattori pre-analitici che possono influenzare il workflow in NGS per il test somatico.



Raccolta, processazione e conservazione del campione	<b>Tempi di invio del campione chirurgico/bioptico</b> <ul style="list-style-type: none"><li>Alterazioni (necrosi) del tessuto possono essere causate da una non corretta procedura di raccolta ed invio del campione al laboratorio di anatomia patologica. Le procedure di invio devono essere concordate con il patologo e seguire specifiche SOP</li></ul> <b>Tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE)</b> <ul style="list-style-type: none"><li>Alterazioni del tessuto possono essere causate da una non corretta procedura di fissazione in formalina (tempi di penetrazione della formalina, temperatura, ecc..)</li><li>Frammentazione e modificazioni del DNA possono verificarsi a seguito di una troppo lunga fissazione in formalina</li><li>La frazione neoplastica nelle sezioni bianche del blocchetto FFPE deve essere isolata sulla base dell'area messa in evidenza dal patologo sulla sezione colorata con HE</li></ul> <b>Tessuto congelato a fresco</b> <ul style="list-style-type: none"><li>DNA integro</li><li>Conservazione a lungo termine a -80 °C</li><li>La selezione del tessuto neoplastico non può essere effettuata</li></ul>
Dimensioni del tumore e cellularità	<b>Dimensioni Cellularità</b> <ul style="list-style-type: none"><li>Una elevata cellularità è in genere associata a successo dello studio NGS</li><li>Basse cellularità richiedono un numero maggiore di sezioni</li><li>La cellularità dipende anche dal tipo di neoplasia</li></ul>
Tipo di campione	<b>Campioni chirurgici</b> <ul style="list-style-type: none"><li>Sono generalmente associati a un'ottima resa in DNA</li></ul> <b>Biopsie</b> <ul style="list-style-type: none"><li>Resa variabile a seconda della dimensione e della cellularità neoplastica</li></ul> <b>Biopsie imaging-guidate</b> <ul style="list-style-type: none"><li>Sono in genere associate ad una bassa resa in DNA</li></ul>
Tipo e sede del tumore	<b>Tipo</b> <ul style="list-style-type: none"><li>Cistico, scleroso, sieroso ecc</li><li>Primario, metastatico</li></ul> <b>Sede</b> <ul style="list-style-type: none"><li>Superficiale, profondo</li></ul>
Frazione tumorale	<b>Fattori determinanti</b> <ul style="list-style-type: none"><li>Tipo istologico, infiltrato infiammatorio, componente stromale</li></ul>
Resa in DNA	<b>Fattori determinanti</b> <ul style="list-style-type: none"><li>Tipo istologico</li><li>Frazione tumorale</li><li>Metodologia di fissazione del tessuto</li><li>Metodologia di selezione della frazione tumorale</li></ul>
Vitalità cellulare	<b>Fattori determinanti</b> <ul style="list-style-type: none"><li>% di cellule necrotiche</li><li>% di cellule apoptotiche</li></ul>

**Tabella 1.** Fattori pre-analitici associati al successo dell'analisi mutazionale in NGS di campioni di tumore solido.

## Fase analitica

Linee guida sulle migliori pratiche di laboratorio per l'implementazione dell'NGS diagnostico sono già ampiamente presenti in letteratura [20,21]. Di seguito quindi riportiamo alcune precisazioni e commenti sui punti più salienti del processo analitico.

### 1. Preparazione delle librerie di sequenziamento

I geni *BRCA1* e *BRCA2* sono entrambi di grandi dimensioni e privi di *hot-spot* mutazionali. Inoltre, una proporzione significativa delle varianti germinali di *BRCA1/2* è costituita da grandi delezioni/duplicazioni [22-25]. Ancora, la percentuale degli eventi mutazionali acquisiti come varianti somatiche non è ancora conosciuta. Queste caratteristiche dei geni *BRCA* rendono il loro studio particolarmente impegnativo. L'offerta commerciale di test per l'analisi dei geni *BRCA* è variegata e comprende soluzioni differenti per



metodiche di arricchimento del target, per piattaforma di sequenziamento e, infine, per metodi di analisi e mining dei dati. Le metodiche di arricchimento del target genico per la generazione delle librerie destinate a sequenziamento NGS, sono basate o su ultra-multiplex PCR o su ibridazione (la cosiddetta “cattura”) [26-28] (Tabella 2).

Ditta	Descrizione	Target	Tecnologia	SNV/INDEL	CNV	Piattaforma NGS	VAF cut off	UMI	Software	CE-IVD (SNV)
Thermo Fisher	Ion Torrent™ OncoPrint™ BRCA Research Assay	BRCA1/2	Amplicon	Ger/Som	Ger/Som	Ion Torrent	5%	NO	Ion Reporter	NO
Agilent	BRCA MASTR Plus Dx	BRCA1/2	Amplicon	Ger/Som	Ger	Illumina		NO	Mastr Reporter	SI
Agilent	BRCA Tumor MASTR Plus Dx	BRCA1/2	Amplicon	Ger/Som	Ger	Illumina	1%	NO	Mastr Reporter	SI
SOPHiA Genetics	Hereditary Cancer Solution (HCS)	BRCA1/2 + 24 genes	Capure	Ger	Ger	Illumina		NO	SOPHiA DDM	SI
SOPHiA Genetics	Homologous Recombination Solution (HRS)	BRCA1/2 + 14 genes	Capure	Ger/Som	Ger/Som	Illumina	1%	NO	SOPHiA DDM	NO
SOPHiA Genetics	Mini Homologous Recombination Solution (HRS)	BRCA1/2 PTEN TP53	Capure	Ger/Som	Ger/Som	Illumina	1%	NO	SOPHiA DDM	NO
Devyser	Devyser BRCA1 & BRCA2 for NGS	BRCA1/2	Amplicon	Ger/Som	Ger/Som	Illumina	5%	NO	Amplicon Suite	SI
Diatech Pharmacogenetics	Myriapod® NGS BRCA1-2 panel	BRCA1/2 PALB2	Amplicon	Ger/Som	Ger/Som	Illumina Ion Torrent	5%	NO	Myriapod NGS Data Analysis Software	SI
QIAGEN	GeneRead QIAact BRCA Advanced DNA UMI Panel	BRCA1/2 TP53 PTEN	Amplicon	Ger/Som	Ger/Som	GeneRead	5%	SI		NO

**Tabella 2.** Soluzioni commerciali per lo studio dello stato mutazionale germinale/somatico dei geni BRCA1/2.

Entrambe le metodiche offrono vantaggi e svantaggi, la Tabella 3 riassume gli aspetti più importanti da tenere in considerazione nella scelta della strategia di preparazione delle librerie.

	Vantaggi	Svantaggi
<b>Amplicon based</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Minore DNA input richiesto</li> <li>Maggiore copertura sulla regione target</li> <li>Minore Turn Around Time (TAT)</li> <li>Procedure di wet lab più semplici</li> <li>Maggiore facilità di automazione della procedura</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>PCR duplicates / Allelic dropout</li> <li>Minore uniformità di copertura</li> <li>Difficile analisi di CNV</li> <li>Sensibile alle regioni di difficile amplificazione</li> <li>Difficile analisi delle regioni terminali degli ampliconi</li> </ul>
<b>Capture based</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>No allelic dropout</li> <li>Minore sensibilità agli artefatti di PCR</li> <li>Maggiore uniformità di copertura</li> <li>Dati più adatti alle analisi di CNV</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Maggiore DNA input richiesto</li> <li>Procedure di wet lab più complesse</li> <li>Maggiore TAT</li> <li>Più difficile da automatizzare</li> </ul>

**Tabella 3.** Principali vantaggi e svantaggi delle tecnologie di arricchimento del target genico.

La quantità di DNA di input richiesta per il sequenziamento NGS dipende dalla piattaforma, dalla dimensione del pannello genico e dal metodo di arricchimento del target e varia generalmente da 10 a 500 ng/campione. Le metodiche di arricchimento del target basate sulla ultra-multiplex PCR richiedono



una minor quantità di acido nucleico e possono essere più facilmente impiegate con campioni di DNA di peggiore qualità (con frammenti di basso peso molecolare, come sono tipicamente quelli ottenuti da campioni FFPE), ma risentono di tutti i limiti intrinseci della metodica di PCR, come ad esempio, l'introduzione di artefatti da parte della polimerasi.

Come sarà di seguito approfondito, tra le questioni analitiche più rilevanti vi è quella dell'analisi dei grandi riarrangiamenti (copy number variations, CNVs). La maggiore uniformità di copertura delle regioni di interesse che è fornita dalle metodiche di arricchimento del target basate sulla cattura, in genere, favorisce l'ottenimento di dati più robusti e l'applicazione di algoritmi di analisi delle CNVs. D'altro canto, l'analisi somatica è spesso pesantemente limitata dalla quantità e dalla qualità di DNA, che possono talvolta indirizzare la scelta del metodo di arricchimento del target verso le sole metodiche basate sulla PCR.

Il metodo di arricchimento dovrà essere scelto valutando i pro e i contro di ciascun approccio, la tipologia di campioni da analizzare (germinali o somatici), le tecnologie e gli strumenti analitici a disposizione del laboratorio. Rimane altresì mandatorio, che il disegno di arricchimento del target debba comprendere il 100% delle regioni codificanti e delle regioni canoniche di splicing dei due geni ed eventualmente regioni regolatorie od introniche, quando per esse siano state descritte varianti per le quali un effetto patogenico sia stato riconosciuto.

## 2. Sequenziamento

Le piattaforme NGS più diffusamente utilizzate nei laboratori clinici attualmente sono Ion Torrent Thermo Scientific ed Illumina. Il metodo con cui ciascuna piattaforma sequenzia (la prima con tecnologia a semiconduttore e dispensazione di un singolo nucleotide per ciclo di incorporazione e la seconda con tecnologia a rilevazione di fluorescenza e dispensazione di tutti i nucleotidi con terminatori reversibili) ne determina pro e contro, rendendola più o meno adatta a rispondere a specifiche situazioni di indagine. I tentativi di confronto sulle performance dei due sistemi [29-31] in estrema sintesi, si possono riassumere così: Ion Torrent è una piattaforma che offre un elevato livello di automazione del workflow (se in combinazione con il preparatore automatico ad essa dedicato), ha tempi di sequenziamento e di analisi molto rapidi ed una estrema facilità di utilizzo. Di contro, ha lo svantaggio di una minore accuratezza di sequenziamento delle regioni omopolimeriche > di 7 basi [32], che non sono infrequenti nei geni BRCA. La piattaforma Illumina ha tempi di sequenziamento più lunghi, ma ha una accuratezza di sequenziamento maggiore e, unitamente alla frequente associazione di questa piattaforma con le soluzioni commerciali che adottano la tecnologia di arricchimento del target basato su cattura, garantisce in genere, risultati con maggiore uniformità di copertura.

Indipendentemente dalla piattaforma utilizzata, il sequenziamento deve tuttavia garantire una copertura minima di 30X per il 100% delle regioni target. La profondità di sequenziamento da raggiungere a garanzia della copertura minima di 50X sarà differente in caso di analisi germinale o somatica. Ad esempio, se una variante germinale in eterozigosi sarà rilevata 25 volte ad una profondità di sequenziamento di 50X, una variante somatica con frequenza del 5%, per essere rilevata lo stesso numero di volte richiederà una profondità di sequenziamento di 500X. Nell'analisi somatica, inoltre, la profondità di sequenziamento andrà fissata in accordo con il limite di detection (LOD) che si stabilisce di ottenere ed in base alla percentuale di cellule tumorali contenute nel campione somatico analizzato. Una copertura minima di 250x viene considerata adeguata a garantire l'accuratezza del test somatico [33].

## 3. Analisi dei dati

Il workflow bioinformatico per analizzare e interpretare i risultati dell'analisi mutazionale BRCA1/2 in NGS, è una parte fondamentale del processo e la sua scelta dovrebbe richiedere molta attenzione [34].



Le fasi di analisi/mining dei dati possono essere schematizzate come segue: a) Analisi primaria (generazione della sequenza); b) Analisi secondaria (processing delle reads e quality filtering); c) Allineamento; d) Chiamata delle varianti; e) Annotazione delle varianti; f) Classificazione ed interpretazione delle varianti (Fig. 1). I file di output sono differenti: per l'analisi primaria/secondaria, i file FASTQ; per l'allineamento, i file BAM/BAI; per la chiamata delle varianti, i file VCF; per classificazione e interpretazione, il referto.

Le pipeline analitiche utilizzate nei laboratori, sono in genere composte da una combinazione di software commerciali, software di terze parti (spesso open source) ed "elementi su misura". È probabile che il grado di validazione di ciascuno di queste componenti sia molto variabile fatte salve le soluzioni commerciali certificate CE-IVD, progettate e validate per specifiche soluzioni diagnostiche. L'adozione di una pipeline analitica non CE-IVD impone che ogniqualevolta si implementino nuove release della pipeline sia necessario rivalutare il workflow analitico con campioni noti già caratterizzati in precedenza e/o con standard commerciali. Tanto per le analisi germinali che per quelle somatiche, sono disponibili standard contenenti miscele di DNA con varianti di sequenza a carico allelico noto. Questi campioni dovrebbero essere utilizzati nelle pratiche di controllo interno di qualità per ricalcolare le performance analitiche dell'intero processo, quali sensibilità, specificità, accuratezza, riproducibilità e ripetibilità.

Per limitare i risultati falsi positivi, inoltre, ogni variante genica dovrebbe essere confermata con una metodica alternativa prima di essere riportata nel referto.

Un particolare approfondimento deve essere fatto, a questo punto, sulle procedure messe in atto per tracciare il corretto percorso del campione ("sample tracking") e al controllo dei possibili errori in fase analitica dovuti ad una errata identificazione del campione.

L'attuale livello di automazione implementabile nelle procedure preanalitiche e analitiche non permette un tracciamento di tutte le fasi del processo, per cui il metodo più corretto sembra essere, al momento, un controllo a valle dell'intera procedura. La validazione delle varianti con metodica alternativa su un'altra aliquota di campione potrebbe essere adottata come metodo di controllo. Alternativamente potrebbero essere implementati metodi di sample tracking che utilizzano la validazione in RealTime PCR di SNPs altamente polimorfici che sempre più spesso vengono inclusi nelle strategie di arricchimento del target nella costruzione delle librerie. In ogni caso il tipo di controllo va tarato sull'analisi del rischio nelle procedure del singolo laboratorio e se il controllo deve essere spinto anche ai possibili errori in fase pre-analitica anche prima dell'estrazione del DNA.

Un'attenzione particolare merita la prevenzione dei risultati falsi negativi, che probabilmente rappresentano gli eventi più preoccupanti nell'ambito diagnostico. I risultati falsi negativi nel sequenziamento NGS dipendono da un numero molto elevato di fattori, per i quali è particolarmente difficile elaborare un'analisi del rischio. La Tabella 5 riporta i principali fattori associati a falsi negativi.

<b>Bassa Qualità del base calling e dell'allineamento delle sequenze</b>
<b>Regioni ricche in GC o in omopolimeri si amplificano male e hanno bassa copertura di sequenziamento;</b>
<b>Strand bias/drop out allelico</b>
<b>Errato cut off di filtraggio</b>
<b>Inserzioni o delezioni &gt;50nt</b>
<b>Presenza di sequenze ripetute</b>
<b>Eventi di gene conversion (pseudogeni)</b>
<b>Varianti che mappano in regioni non presenti nel disegno di target enrichment</b>
<b>Utilizzo di versioni di genome assembly obsolete</b>

**Tabella 5.** Eventi da tenere in considerazione per la prevenzione dei risultati falsi negativi nel sequenziamento NGS.

L'analisi delle CNVs merita un breve approfondimento.

L'analisi dei dati di NGS consente la valutazione delle CNVs nei geni *BRCA1/2* ed offre il vantaggio di utilizzare la medesima piattaforma e il medesimo flusso di lavoro dei campioni biologici, riducendo i tempi



necessari per l'analisi mutazionale completa dei geni *BRCA1/2*. Esistono molte soluzioni open-source e molte soluzioni commerciali dedicate all'analisi CNV su dati NGS. I parametri da tenere in attenta considerazione prima di sceglierne una sono la sua eventuale certificazione CE-IVD, la capacità di inferire la presenza di CNVs anche in analisi somatiche e non solo in analisi germinali ed il tipo di reference che l'algoritmo usa per calcolare la baseline di copy number 2, esterna o interna alla run di sequenziamento. Il tipo di reference usata per calcolare la baseline ha due principali conseguenze: la prima, che una reference esterna richiede la sua "costruzione", ossia il sequenziamento preventivo di 20-100 campioni che la vadano a costituire, al contrario un algoritmo che usa una reference interna alla run stessa, non richiede alcun sequenziamento pregresso. La seconda, che se si utilizza una reference esterna, l'algoritmo di CNV può essere impiegato anche per valutare il copy number genico di un singolo campione alla volta, mentre, se l'algoritmo utilizza una reference interna per calcolare la baseline, è necessario avere un numero minimo di campioni sequenziati contemporaneamente (in genere almeno 8) e non avere nella stessa corsa di sequenziamento campioni multipli con la stessa CNV, per esempio campioni derivanti da persone appartenenti alla stessa famiglia.

La tabella 4 riassume le caratteristiche dell'analisi CNV nelle principali soluzioni commerciali NGS.

Ditta	Descrizione	CNV	Piattaforma NGS	Software	Reference diploide	Minimo di campioni per eseguire l'analisi	CE-IVD (SNV)	CE-IVD (CNV ger)	CE-IVD (CNV som)
Thermo Fisher	Ion Torrent™ OncoPrint™ BRCA Research Assay	Ger/Som	Ion Torrent	Ion Reporter	esterna	1	NO	NO	NO
Agilent	BRCA MASTR Plus Dx	Ger	Illumina	Mastr Reporter	interna	8	SI	SI	NO
Agilent	BRCA Tumor MASTR Plus Dx	Ger	Illumina	Mastr Reporter	interna	8	SI	SI	NO
SOPHiA Genetics	Hereditary Cancer Solution (HCS)	Ger	Illumina	SOPHiA DDM	interna	8	SI	SI	NO
SOPHiA Genetics	Homologous Recombination Solution (HRS)	Ger/Som	Illumina	SOPHiA DDM	interna	8	NO	NO	NO
SOPHiA Genetics	Mini Homologous Recombination Solution (HRS)	Ger/Som	Illumina	SOPHiA DDM	interna	8	NO	NO	NO
Devyser	Devyser BRCA1 & BRCA2 for NGS	Ger/Som	Illumina	Amplicon Suite	interna	8	SI	SI	NO
Diatch Pharmacogenetics	Myriad® NGS BRCA1-2 panel	Ger/Som	Illumina Ion Torrent	Myriad NGS Data Analysis Software	interna	8	SI	SI	SI
QIAGEN	GeneRead QIAact BRCA Advanced DNA UMI Panel	Ger/Som	GeneRead		interna	8	NO	NO	NO

**Tabella 4.** Caratteristiche delle analisi CNV disponibili nelle principali soluzioni commerciali NGS.

Ad oggi, il test principalmente utilizzato per identificare o confermare la presenza di riarrangiamenti di grandi dimensioni nei geni *BRCA1/2* è l'MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification) e meno frequentemente il MAQ (Multiplex Amplicon Quantification), quest'ultimo certificato CE-IVD. Se da un lato i dati ottenuti con tali approcci risultano standardizzati, sensibili e riproducibili in un contesto germinale, d'altro canto non sono utilizzabili per la caratterizzazione o la conferma di alterazioni nel numero di copie in campioni da preparati FFPE. L'analisi di CNVs risulta perciò difficilmente confermabile con altra metodica nel campione somatico; seppur siano disponibili tecniche come FISH, RealTime QPCR, digitalPCR, etc, esse non sono sempre facilmente adottabili nel *turn around time* (TAT) di una routine diagnostica assistenziale.

Alcune considerazioni particolari meritano le procedure di annotazione e di classificazione delle varianti. Le soluzioni di analisi commerciali, anche quelle certificate IVD, sebbene ottimizzate per minimizzare i falsi positivi e/o falsi negativi nella chiamata delle varianti, spesso non implementano sistemi di queries estensive sui database di annotazione, alcuni dei quali possono essere il frutto di progetti di ricerca specifici, potrebbero essere privati o accessibili solo a pagamento. I centri di riferimento (laboratori hub)



dovrebbero curare l'implementazione delle proprie pipelines rendendole capaci di interrogare l'ultima versione disponibile dei database pubblici di annotazione ed integrare costantemente queste informazioni con quelle derivate dalle altre tipologie di database, al fine di massimizzare l'aggiornamento e il numero di informazioni disponibili su ciascuna variante. In ogni caso, per le procedure di classificazione è opportuno fare riferimento al documento SIGU del 2016: "L'interpretazione delle varianti di sequenza in geni di predisposizione a tumori: indicazioni operative per il laboratorio diagnostico". In linea con tale documento, la classificazione delle varianti germinali di BRCA1/2 dovrà basarsi in primis sulle linee-guida ENIGMA; nel caso queste non consentano l'assegnazione della specifica variante, occorrerà fare ricorso alle linee-guida ACMG-ANP [35-38]. Per quanto riguarda le mutazioni somatiche, si veda la sezione dedicata a pag. 25-26 di questo documento. In ogni caso, il referto dovrà riportare i criteri utilizzati perché semanticamente basati su evidenze che in taluni casi possono differire.

Appare chiaro che il processo di classificazione delle varianti, e la conseguente risposta al quesito clinico, è inevitabilmente dipendente dal momento in cui la variante stessa viene riscontrata e dalle evidenze scientifiche a disposizione in quel momento. La classificazione di una variante è quindi un processo che potrebbe essere destinato a variare nel tempo. Sebbene nessuna linea guida diagnostica obblighi il laboratorio ad una sistematica rivalutazione delle varianti e quindi dei referti, lo *statement* 21 delle linee guida europee per l'uso diagnostico dell'NGS [39] raccomanda al laboratorio di creare/implementare/usare un database di varianti che sia concepito per la gestione "nel tempo" della loro classificazione. A tal scopo, la realizzazione di sistemi di ri-annotazione periodica delle varianti geniche potrebbe essere utile per monitorare le varianti per le quali vengano descritte nuove evidenze di patogenicità o non patogenicità.

Infine, è fondamentale la gestione della sicurezza delle informazioni genetiche acquisite. Le soluzioni commerciali che forniscono sistemi di analisi in cloud dovrebbero, per esempio, essere certificate secondo lo standard ISO 27001 che è l'attuale framework di *best practice* riconosciuto a livello internazionale per la gestione della sicurezza delle informazioni. In ogni caso, la conservazione e condivisione dei dati genetici, così come dei campioni, avverrà nel rispetto delle indicazioni della Società italiana di Genetica Umana.

#### 4. Certificazione CE-IVD (La nuova normativa europea IVDR)

Il regolamento (UE) 2017/746 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 5 aprile 2017 relativo ai dispositivi medico-diagnostici in vitro e che abroga la direttiva 98/79/CE e la decisione 2010/227/UE della Commissione, costituisce il quadro normativo dell'Unione per i dispositivi medico-diagnostici in vitro. Tale normativa, nella quale si precisa che *"che tutti i test che forniscono informazioni sulla predisposizione a una condizione clinica o a una malattia, quali i test genetici, e i test che forniscono informazioni utili a prevedere la risposta o le reazioni a un trattamento (ad es. test diagnostici di accompagnamento — «companion diagnostics») sono dispositivi medico-diagnostici in vitro"*, è stata emanata nel 2017 e dovrà essere applicata a decorrere dal 26 maggio 2022. Di seguito si riportano solo i punti salienti; per maggiori informazioni si rimanda alla normativa completa che può essere scaricata dal sito dell'UE:

1. *Un dispositivo può essere immesso sul mercato o messo in servizio solo se è conforme al presente regolamento qualora sia debitamente fornito e correttamente installato, oggetto di un'adeguata manutenzione e utilizzato conformemente alla sua destinazione d'uso.*
2. *Un dispositivo deve soddisfare i requisiti generali di sicurezza e prestazione di cui all'allegato I a esso applicabili, tenuto conto della sua destinazione d'uso.*
3. *La dimostrazione della conformità ai requisiti generali di sicurezza e prestazione comprende una valutazione delle prestazioni a norma dell'articolo 56.*
4. *I dispositivi fabbricati e utilizzati all'interno di istituzioni sanitarie, a eccezione dei dispositivi destinati agli studi delle prestazioni, sono considerati messi in servizio.*
5. *A eccezione dei pertinenti requisiti generali di sicurezza e prestazione di cui all'allegato I, le prescrizioni del presente regolamento non si applicano ai dispositivi fabbricati e utilizzati esclusivamente in istituzioni sanitarie stabilite nell'Unione, purché siano soddisfatte tutte le seguenti condizioni:*



- a) *i dispositivi non siano trasferiti a un'altra persona giuridica;*
- b) *la fabbricazione e l'utilizzo dei dispositivi avvengano secondo sistemi adeguati di gestione della qualità;*
- c) **il laboratorio dell'istituzione sanitaria sia conforme alla norma EN ISO 15189 o, se del caso, le disposizioni nazionali, comprese le disposizioni nazionali in materia di accreditamento;**

***l'istituzione sanitaria giustifichi nella sua documentazione il fatto che le esigenze specifiche del gruppo di pazienti destinatario non possono essere soddisfatte o non possono essere soddisfatte con risultati del livello adeguato da un dispositivo equivalente disponibile sul mercato. [.....].***

Questa normativa rappresenterà quindi uno spartiacque tra il modo in cui sono stati offerti i test fino ad oggi e come dovranno essere offerti a partire da maggio 2022.

Non è tra i fini di questo documento il discutere nel dettaglio questa problematica, ma quello che appare chiaro è che non solo le ditte produttrici di reagenti e strumentazioni, ma anche tutti i laboratori e le aziende pubbliche e private che offrono questa diagnostica a livello assistenziale, dovranno confrontarsi con questa normativa.

## Fase post-analitica

### 1. Refertazione

Il referto deve essere scritto in conformità alle linee guida nazionali/internazionali, in modo chiaro e comprensibile anche ai non specialisti e contenere, come requisiti minimi, le seguenti informazioni:

- Identificazione dettagliata del laboratorio che esegue l'analisi
- Anagrafica del paziente
- Identificazione univoca del paziente
- Identificazione del medico o della struttura che ha richiesto l'analisi
- Data del prelievo e data di ricezione (accettazione) del campione (per permettere la precisa valutazione dei TAT)
- Tipo di materiale analizzato
- Quesito diagnostico
- Descrizione del test genetico eseguito e del metodo utilizzato
- Sensibilità e specificità analitiche del metodo utilizzato
- Eventuali limiti del metodo utilizzato
- Data del referto, corrispondente alla conclusione dell'indagine
- Risultato dell'analisi
- Tabella riassuntiva con le varianti patogenetiche (classe 5) o probabilmente patogenetiche (classe 4) identificate riportante: Gene | Sequenza di riferimento | Regione | Variante identificata (secondo HGVS – nel caso si utilizzi un'altra nomenclatura, fornire i dettagli necessari per l'identificazione univoca della variante) | Genotipo (VAF per i test somatici) | Interpretazione (classe di patogenicità)
- Dettaglio dei risultati riportante le specifiche su copertura del target genico e profondità media e minima sul target nel campione analizzato, eventuali varianti di significato incerto (VUS classe 3): riportare le VUS diviene fondamentale per permettere il completamento della valutazione, anche in centro diverso da quello refertante, una volta che vengano riclassificate le varianti
- Per i test somatici è altamente consigliato che il referto riporti i dati riguardanti il campione istologico, comprendendo, la diagnosi istologica e il medico che ha firmato il referto, il patologo, se diverso da chi ha fatto diagnosi, che ha selezionato l'area neoplastica nel preparato istologico e la % di cellule tumorali presenti nell'area selezionata del preparato istologico.
- Commento, interpretazione del risultato, scritto in forma comprensibile anche ai non specialisti;



- Conclusioni rispetto al quesito clinico e segnalazione degli eventuali approfondimenti diagnostici necessari per probando/consanguinei ed eventuale rimando a consulenza genetica e/o specialistica
- Firma/e del responsabile/i della/delle analisi di laboratorio
- Informazioni supplementari (metodo di estrazione del DNA, specificazione del target genico, piattaforme tecnologiche utilizzate e chimica utilizzata per la preparazione delle librerie, piattaforma di sequenziamento, bioinformatica (metodi di analisi dei risultati, piattaforme software utilizzate, inclusa la fonte (ad es. sviluppato internamente, di terze parti) e se l'analisi dei dati è stata eseguita localmente o in remoto (ad esempio, analisi in cloud), la politica di refertazione (quali sono le classi di varianti refertate) e di validazione delle varianti (se e quali metodiche), le certificazioni del laboratorio e gli schemi di controlli di qualità ai quali il laboratorio aderisce.



## SEZIONE 3:

# Criticità associate al test somatico

Quando la tecnologia NGS viene applicata all'analisi dei geni BRCA su tessuto tumorale, si incontrano problematiche specifiche di accuratezza e di interpretazione che meritano una trattazione dedicata. In questa sezione del documento si passeranno in rassegna le evidenze e gli strumenti attualmente disponibili, al fine di fornire un supporto alla refertazione e all'interpretazione clinica dei test somatici.

## Significato delle varianti a basso carico allelico

Gli aspetti tecnici dell'analisi BRCA su tessuto tumorale sono stati estesamente affrontati nella sezione precedente. In questa sede si vuole affrontare specificamente il problema dell'interpretazione delle varianti riscontrate in bassa percentuale. Se, infatti, la contaminazione da parte di tessuto non neoplastico e l'intrinseca eterogeneità del tessuto tumorale rendono ragione di una più bassa percentuale di copie di DNA recanti la variante rispetto a quanto atteso per una variante presente in tutte le cellule, per percentuali particolarmente basse si pone il problema della veridicità della variante identificata (possibile falso positivo da artefatto tecnico).

Come sottolineato nella sezione precedente, un fattore fondamentale da verificare, e possibilmente riportare nel referto, è la percentuale di cellule tumorali nel tessuto selezionato. Questa non dovrebbe essere inferiore al 20%, come riportato nelle raccomandazioni AIOM SIAPEC 2019; in caso di percentuale inferiore, dovrebbe essere introdotto un commento che sottolinei i limiti dell'esame nell'identificazione delle mutazioni somatiche (es. "considerando la composizione del campione analizzato, il risultato dell'analisi potrebbe non riflettere lo stato mutazionale del tumore").

Inoltre, occorre definire la soglia al di sopra della quale una variante è meritevole di essere riportata. La maggior parte dei laboratori adotta una soglia del 5% o del 10%, come emerge anche dalla revisione degli studi pubblicati (vedi tabella in appendice). Diversi autori sottolineano come varianti sotto il 10% abbiano un'alta probabilità di essere falsi positivi, sebbene ciò sia difficilmente dimostrabile per assenza di una tecnica alternativa in grado di confermare il dato.

Peraltro, anche quando si tratti di una mutazione vera, rimane da chiarire se una variante presente in bassa percentuale possa essere predittiva di risposta ai farmaci; infatti, la persistenza di almeno un allele normale nella cellula dovrebbe essere in grado di garantire la funzione BRCA, facendo venire a mancare i presupposti per la letalità sintetica perseguita con l'inibizione di PARP. Al momento non esistono dati che permettano di confermare o confutare questo assunto teorico.

## Interpretazione delle specifiche varianti ai fini della risposta ai farmaci

La classificazione delle varianti somatiche dei geni BRCA corrisponde, a tutt'oggi, alla classificazione delle varianti germinali, che è basata sul rischio associato di sviluppare tumori (linee guida ENIGMA e database generati sulla base delle informazioni fornite da test germinali, es. EXCHANGE).

Con lo sviluppo dell'oncologia di precisione, tuttavia, si sono creati database specificamente finalizzati a individuare i trattamenti appropriati sulla base delle alterazioni genetiche presenti nel tumore, che includono anche informazioni relative a mutazioni di BRCA1 e 2. Tra questi vi sono CIVIC (community-driven web source), OncoKB, costantemente aggiornato con le nuove evidenze sulle implicazioni terapeutiche di specifiche alterazioni geniche (per riportarne le informazioni nei referti è richiesta una



licenza istituzionale) e Varsome, basato su classificazione ACMG e collettore di informazioni di altri siti sulle mutazioni somatiche.

E' importante approfondire sempre i dati disponibili sul significato delle mutazioni somatiche individuate, in quanto è stato suggerito che alcune varianti classificate come VUS possano avere un'implicazione nella risposta alla terapia, mentre esistono evidenze che alcune varianti classificate come clinicamente significative (classe 4,5), e che, quindi, nella pratica tendono a essere considerate predittive di risposta a platino e inibitori di PARP (PARPi), non siano in realtà associate alla risposta terapeutica. Inoltre, gli studi clinici controllati che hanno dimostrato una migliore risposta al trattamento con PARPi delle pazienti con carcinoma ovarico portatrici di varianti BRCA avevano arruolato quasi esclusivamente portatrici di varianti germinali, per cui non hanno permesso di confermare l'equivalenza, ai fini predittivi, delle mutazioni somatiche. Complessivamente, i dati di letteratura sono parziali e a volte contrastanti e non permettono, pertanto, di trarre conclusioni certe sul significato di specifiche varianti ai fini dell'eleggibilità ai farmaci, possono però fornire informazioni aggiuntive rispetto alla classificazione convenzionale.

## Implicazioni applicative

Considerate le criticità sopra descritte, si ravvisa la necessità di condividere con i clinici e le pazienti le incertezze e i limiti dei test somatici per la valutazione delle mutazioni in BRCA ai fini terapeutici. Allo stesso tempo, tuttavia, appare opportuno tenere conto dei dati disponibili sulla possibile sensibilità ai farmaci, soprattutto per le VUS, affinché la mancata classificazione della variante non escluda automaticamente l'indicazione al trattamento.

A tal fine, si formulano i seguenti suggerimenti:

- Esplicitare nel referto la percentuale di cellule tumorali contenute nel campione e il carico allelico in percentuale delle eventuali varianti, sottolineando nel referto stesso e nell'eventuale relazione genetico-clinica che in presenza di basse percentuali non è a oggi noto il significato ai fini terapeutici
- Sottolineare nelle note o nell'allegato tecnico al referto, così come nella relazione genetico-clinica, che la classificazione riportata per una variante si basa sul rischio di cancro che essa comporta quando costituzionale, e che l'effetto sulla risposta alle terapie non è a tutt'oggi definito
  - Oltre alle linee-guida e strumenti consultate per l'interpretazione delle varianti germinali per le varianti somatiche consultare anche i seguenti (riportandoli nel referto):
    - CIViC (<https://civicdb.org/home>);
    - OncoKB (<https://www.oncokb.org/>);
    - Varsome (<https://varsome.com/>)
- Se esistono dati sperimentali che supportano la sensibilità o la resistenza ai farmaci, riportarli nelle note del referto e/o nella relazione genetico-clinica.
- Indicare nelle note o nell'allegato tecnico al referto che l'indagine eseguita non è in grado di rilevare altri meccanismi di inattivazione dei geni BRCA, quale la metilazione
- Per favorire la corretta informazione e interpretazione il test somatico deve essere inserito in un percorso multidisciplinare che preveda una consulenza onco-genetica o, almeno, una sessione di mini-counseling pre-test, con raccolta di specifico consenso informato, e consulenza oncogenetica post-test ogni qualvolta venga identificata una variante chiaramente o potenzialmente significativa ai fini della terapia o del rischio oncologico. In presenza di una storia clinica e familiare sospetta per rischio ereditario, la paziente deve essere avviata al percorso standard di consulenza genetica oncologica, la cui tempistica dovrà essere modulata sulle necessità terapeutiche.



## SEZIONE 4:

# Problemi aperti e prospettive future

La rapida evoluzione delle conoscenze sui geni BRCA e delle tecnologie diagnostiche crea le basi per continui cambiamenti nell'approccio e nell'interpretazione dei test; è pertanto prevedibile che gli orientamenti richiedano frequenti modifiche e integrazioni, rendendo necessari frequenti aggiornamenti del documento. In particolare, si riportano di seguito alcune aree di miglioramento che potrebbero comportare modifiche di atteggiamento nel prossimo futuro.

- **Limiti dell'analisi di sequenza nell'identificare tumori con deficit BRCA**  
Dai dati di letteratura emerge che una frazione non trascurabile di tumori ovarici (11% nello studio di Vos et al) presenta inattivazione epigenetica di BRCA1: si tratta cioè di tumori con deficit BRCA e, pertanto, verosimilmente responsivi a inibitori di PARP, che non vengono identificati dal test somatico attualmente in uso, basato sul solo sequenziamento genico. Se l'evidenza sarà consolidata, sarà indicato completare il test somatico con l'analisi della metilazione del promotore di BRCA1 o altra metodica atta a evidenziare l'inattivazione epigenetica.
- **Possibili differenze tra tumore ovarico primario e recidiva**  
Poiché sono riportati casi di reversione genica dopo linee multiple di chemioterapia, l'analisi effettuata sul tumore primitivo potrebbe non riflettere correttamente lo stato del tumore ai fini dell'eleggibilità alla terapia; ogni qualvolta possibile sarebbe utile eseguire l'analisi su tessuto tumorale neoformato.
- **Inserimento del carcinoma prostatico tra i criteri di accesso al test BRCA**  
L'identificazione di varianti patogenetiche di BRCA1/2 germinali o somatiche in pazienti con carcinoma prostatico, e l'eleggibilità alla terapia con PARP inibitori dei casi con tumori metastatici resistenti alla castrazione BRCA-positivi, hanno fatto sì che questa neoplasia fosse inserita in alcune linee-guida (es. NCCN) quale indicazione al test BRCA.
- **Inserimento del carcinoma mammario insorto tra i 37 e i 45 anni tra i criteri di accesso al test BRCA**  
Le linee-guida NCCN prevedono che tutte le donne con diagnosi di neoplasia mammaria al di sotto dei 46 anni possano accedere al test BRCA indipendentemente dalla storia familiare e dalle caratteristiche biopatologiche della neoplasia. Alcune limitate esperienze in Italia hanno evidenziato un tasso non trascurabile di varianti patogenetiche germinali di BRCA1/2 nelle donne con età compresa tra 37 e 45 anni. Se l'evidenza sarà consolidata e precisata in un campione più ampio, si porranno le basi per un innalzamento della soglia di età per l'accesso al test, che le raccomandazioni qui considerate fissano a 35 anni.



## Appendice

### Studi pubblicati sulle mutazioni somatiche di BRCA1/2 nel carcinoma ovarico

Riferimento	N° casi	Frazione di cellule neoplastiche (% minima)	Metodo	Sensibilità	Cut-off carico allelico (%)
Mafficini et al, Oncotarget 2016 [40]	47	70	ION Torrent	99.1%	NS
Capoluongo et al, Semin Oncol 2017 [41]	rev	15	NGS	NS	10%
Dougherty et al, Oncotarget 2017 [42]	209	20	Pannello Foundation 287 geni	97%	NS
Koczkowska et al, Cancer Med 2016 [43]	97	>55	Illumina	NS	4%
Enyedi et al, Oncotarget 2016 [44]	10	NS	Illumina ION Torrent	95-97%	10%
Wallace et al, Eur J Hum Genet 2016 [46]	68		Illumina Ion Torrent	-	>10%
Fumagalli et al, Cancers 2019 [47]	221	10-90%	Ion Torrent Oncomine	Concordanza S/G 87%	>5%
Ong et al, Gynecol Oncol 2019 [48]	60		Ion Torrent Oncomine	Concordanza S/G 80%	>5%
Kim et al, J Gynecol Oncol 2020 [49]	50	>50%	Ion Torrent Oncomine	Concordanza S/G 95-99%	5%-10% Indicano 10% per PPV al 71%
Kowalik et al, Pol J Pathol 2019 [50]	201	>70%	Ion Torrent Oncomine	NS	>5%
Jorge et al, Gynecol Oncol 2020 [51]	43		Illumina BROCApanel	NS	NS
Vos et al, J Natl Cancer Inst 2020 [52]	315		smMIP based NGS +MLPA	NS	NS

Legenda: NS= Non Specificato; S/G= Somatico/Germinale



## Bibliografia

- 1 Gruppo di Lavoro AIOM - SIGU - SIBIOC - SIAPEC-IAP. Raccomandazioni per l'implementazione del test BRCA nelle pazienti con carcinoma ovarico e nei familiari a rischio elevato di neoplasia, 2019,
- 2 Gruppo di Lavoro AIOM - SIGU - SIBIOC - SIAPEC-IAP. Raccomandazioni 2019 per l'implementazione del test BRCA nelle pazienti con carcinoma mammario e nei familiari a rischio elevato di neoplasia, 2019,
- 3 Gruppo di Lavoro AIOM - SIGU - SIBIOC - SIAPEC-IAP. Raccomandazioni 2020 per l'implementazione dell'analisi mutazionale BRCA nei pazienti con adenocarcinoma del pancreas metastatico. 2020
- 4 Marzuillo C, De Vito C, D'Addario M, Santini P, D'Andrea E, Boccia A, Villari P: Are public health professionals prepared for public health genomics? A cross-sectional survey in Italy. BMC Health Serv Res 2014;14:239.
- 5 Marzuillo C, De Vito C, Boccia S, D'Addario M, D'Andrea E, Santini P, Boccia A, Villari P: Knowledge, attitudes and behavior of physicians regarding predictive genetic tests for breast and colorectal cancer. Preventive Medicine 2013;57:477-482.
- 6 Forbes C, Fayter D, de Kock S, Quek RG: A systematic review of international guidelines and recommendations for the genetic screening, diagnosis, genetic counseling, and treatment of BRCA-mutated breast cancer. Cancer management and research 2019;11:2321-2337.
- 7 Eccles DM, Balmaña J, Clune J, Ehken B, Gohlke A, Hirst C, Potter D, Schroeder C, Tyczynski JE, Gomez Garcia EB: Selecting Patients with Ovarian Cancer for Germline BRCA Mutation Testing: Findings from Guidelines and a Systematic Literature Review. Advances in therapy 2016;33:129-150.
- 8 Force UPST: Risk Assessment, Genetic Counseling, and Genetic Testing for BRCA-Related Cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. JAMA 2019;322:652-665.
- 9 Nelson HD, Pappas M, Cantor A, Haney E, Holmes R: Risk Assessment, Genetic Counseling, and Genetic Testing for BRCA-Related Cancer in Women: Updated Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. Jama 2019;322:666-685.
- 10 Rajagopal PS, Nielsen S, Olopade OI: USPSTF Recommendations for BRCA1 and BRCA2 Testing in the Context of a Transformative National Cancer Control Plan. JAMA network open 2019;2:e1910142.
- 11 Jin J: Should I Be Tested for BRCA Mutations? JAMA 2019;322:702-702.
- 12 Burton H: Genetics and mainstream medicine - Service development and integration. 2011.
- 13 Gargis AS, Kalman L, Berry MW, Bick DP, Dimmock DP, Hambuch T, Lu F, Lyon E, Voelkerding KV, Zehnbauser BA, Agarwala R, Bennett SF, Chen B, Chin EL, Compton JG, Das S, Farkas DH, Ferber MJ, Funke BH, Furtado MR, Ganova-Raeva LM, Geigenmuller U, Gungelmann SJ, Hegde MR, Johnson PL, Kasarskis A, Kulkarni S, Lenk T, Liu CS, Manion M, Manolio TA, Mardis ER, Merker JD, Rajeevan MS, Reese MG, Rehm HL, Simen BB, Yeakley JM, Zook JM, Lubin IM: Assuring the quality of next-generation sequencing in clinical laboratory practice. Nat Biotechnol 2012;30:1033-1036.
- 14 Gargis AS, Kalman L, Lubin IM: Assuring the Quality of Next-Generation Sequencing in Clinical Microbiology and Public Health Laboratories. J Clin Microbiol 2016;54:2857-2865.
- 15 Al-Kateb H, Nguyen TT, Steger-May K, Pfeifer JD: Identification of major factors associated with failed clinical molecular oncology testing performed by next generation sequencing (NGS). Mol Oncol 2015;9:1737-1743.
- 16 Chen H, Luthra R, Goswami RS, Singh RR, Roy-Chowdhuri S: Analysis of Pre-Analytic Factors Affecting the Success of Clinical Next-Generation Sequencing of Solid Organ Malignancies. Cancers (Basel) 2015;7:1699-1715.



- 17 Goswami RS, Luthra R, Singh RR, Patel KP, Routbort MJ, Aldape KD, Yao H, Dang HD, Barkoh BA, Manekia J, Medeiros LJ, Roy-Chowdhuri S, Stewart J, Broaddus RR, Chen H: Identification of Factors Affecting the Success of Next-Generation Sequencing Testing in Solid Tumors. *Am J Clin Pathol* 2016;145:222-237.
- 18 Roy-Chowdhuri S, Goswami RS, Chen H, Patel KP, Routbort MJ, Singh RR, Broaddus RR, Barkoh BA, Manekia J, Yao H, Medeiros LJ, Staerke G, Luthra R, Stewart J: Factors affecting the success of next-generation sequencing in cytology specimens. *Cancer Cytopathol* 2015;123:659-668.
- 19 Arreaza G, Qiu P, Pang L, Albright A, Hong LZ, Marton MJ, Levitan D: Pre-Analytical Considerations for Successful Next-Generation Sequencing (NGS): Challenges and Opportunities for Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tumor Tissue (FFPE) Samples. *Int J Mol Sci* 2016;17
- 20 Aziz N, Zhao Q, Bry L, Driscoll DK, Funke B, Gibson JS, Grody WW, Hegde MR, Hoeltge GA, Leonard DG, Merker JD, Nagarajan R, Palicki LA, Robetorye RS, Schrijver I, Weck KE, Voelkerding KV: College of American Pathologists' laboratory standards for next-generation sequencing clinical tests. *Arch Pathol Lab Med* 2015;139:481-493.
- 21 Cree IA, Deans Z, Ligtenberg MJ, Normanno N, Edsjo A, Rouleau E, Sole F, Thunnissen E, Timens W, Schuurin E, Dequeker E, Murray S, Dietel M, Groenen P, Van Krieken JH, European Society of Pathology Task Force on Quality Assurance in Molecular P, Royal College of P: Guidance for laboratories performing molecular pathology for cancer patients. *J Clin Pathol* 2014;67:923-931.
- 22 Fachal L, Blanco A, Santamarina M, Carracedo A, Vega A: Large genomic rearrangements of BRCA1 and BRCA2 among patients referred for genetic analysis in Galicia (NW Spain): delimitation and mechanism of three novel BRCA1 rearrangements. *PLoS one* 2014;9:e93306.
- 23 Montagna M, Dalla Palma M, Menin C, Agata S, De Nicolo A, Chieco-Bianchi L, D'Andrea E: Genomic rearrangements account for more than one-third of the BRCA1 mutations in northern Italian breast/ovarian cancer families. *Hum Mol Genet* 2003;12:1055-1061.
- 24 Rouleau E, Jesson B, Briaux A, Nogues C, Chabaud V, Demange L, Sokolowska J, Coulet F, Barouk-Simonet E, Bignon YJ, Bonnet F, Bourdon V, Bronner M, Caputo S, Castera L, Delnatte C, Delvincourt C, Fournier J, Hardouin A, Muller D, Peyrat JP, Toulas C, Uhrhammer N, Vidal V, Stoppa-Lyonnet D, Bieche I, Lidereau R: Rare germline large rearrangements in the BRCA1/2 genes and eight candidate genes in 472 patients with breast cancer predisposition. *Breast Cancer Res Treat* 2012;133:1179-1190.
- 25 Kiyoi H, Naoe T: Biology, clinical relevance, and molecularly targeted therapy in acute leukemia with FLT3 mutation. *Int J Hematol* 2006;83:301-308.
- 26 Singh RR, Patel KP, Routbort MJ, Reddy NG, Barkoh BA, Handal B, Kanagal-Shamanna R, Greaves WO, Medeiros LJ, Aldape KD, Luthra R: Clinical validation of a next-generation sequencing screen for mutational hotspots in 46 cancer-related genes. *J Mol Diagn* 2013;15:607-622.
- 27 Frampton GM, Fichtenholtz A, Otto GA, Wang K, Downing SR, He J, Schnall-Levin M, White J, Sanford EM, An P, Sun J, Juhn F, Brennan K, Iwanik K, Maillet A, Buell J, White E, Zhao M, Balasubramanian S, Terzic S, Richards T, Banning V, Garcia L, Mahoney K, Zwirko Z, Donahue A, Beltran H, Mosquera JM, Rubin MA, Dogan S, Hedvat CV, Berger MF, Puzstai L, Lechner M, Boshoff C, Jarosz M, Vietz C, Parker A, Miller VA, Ross JS, Curran J, Cronin MT, Stephens PJ, Lipson D, Yelensky R: Development and validation of a clinical cancer genomic profiling test based on massively parallel DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 2013;31:1023-1031.
- 28 Kanagal-Shamanna R, Portier BP, Singh RR, Routbort MJ, Aldape KD, Handal BA, Rahimi H, Reddy NG, Barkoh BA, Mishra BM, Paladugu AV, Manekia JH, Kalhor N, Chowdhuri SR, Staerke GA, Medeiros LJ, Luthra R, Patel KP: Next-generation sequencing-based multi-gene mutation profiling of solid tumors using fine needle aspiration samples: promises and challenges for routine clinical diagnostics. *Mod Pathol* 2014;27:314-327.
- 29 Lam HY, Clark MJ, Chen R, Chen R, Natsoulis G, O'Huallachain M, Dewey FE, Habegger L, Ashley EA, Gerstein MB, Butte AJ, Ji HP, Snyder M: Performance comparison of whole-genome sequencing platforms. *Nat Biotechnol* 2011;30:78-82.



- 30 Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ, Constantinidou C, Gharbia SE, Wain J, Pallen MJ: Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol* 2012;30:434-439.
- 31 Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, Bertoni A, Swerdlow HP, Gu Y: A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics* 2012;13:341.
- 32 Feng W, Zhao S, Xue D, Song F, Li Z, Chen D, He B, Hao Y, Wang Y, Liu Y: Improving alignment accuracy on homopolymer regions for semiconductor-based sequencing technologies. *BMC Genomics* 2016;17 Suppl 7:521.
- 33 Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, Kamel-Reid S, Lubin IM, Pfeifer J, Temple-Smolkin RL, Voelkerding KV, Nikiforova MN: Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 2017;19:341-365.
- 34 Ellison G, Ahdesmäki M, Luke S, Waring PM, Wallace A, Wright R, Röthlisberger B, Ludin K, Merkelbach-Bruse S, Heydt C, Ligtenberg MJL, Mensenkamp AR, de Castro DG, Jones T, Vivancos A, Kondrashova O, Pauwels P, Weyn C, Hahnen E, Hauke J, Soong R, Lai Z, Dougherty B, Carr TH, Johnson J, Mills J, Barrett JC: An evaluation of the challenges to developing tumor BRCA1 and BRCA2 testing methodologies for clinical practice. *Hum Mutat* 2018;39:394-405.
- 35 Goldgar DE, Easton DF, Byrnes GB, Spurdle AB, Iversen ES, Greenblatt MS, Group IUGVW: Genetic evidence and integration of various data sources for classifying uncertain variants into a single model. *Hum Mutat* 2008;29:1265-1272.
- 36 Goldgar DE, Easton DF, Deffenbaugh AM, Monteiro AN, Tavtigian SV, Couch FJ, Breast Cancer Information Core Steering C: Integrated evaluation of DNA sequence variants of unknown clinical significance: application to BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet* 2004;75:535-544.
- 37 Tavtigian SV, Byrnes GB, Goldgar DE, Thomas A: Classification of rare missense substitutions, using risk surfaces, with genetic- and molecular-epidemiology applications. *Hum Mutat* 2008;29:1342-1354.
- 38 Tavtigian SV, Greenblatt MS, Goldgar DE, Boffetta P, Group IUGVW: Assessing pathogenicity: overview of results from the IARC Unclassified Genetic Variants Working Group. *Hum Mutat* 2008;29:1261-1264.
- 39 Matthijs G, Souche E, Alders M, Corveleyn A, Eck S, Feenstra I, Race V, Sistermans E, Sturm M, Weiss M, Yntema H, Bakker E, Scheffer H, Bauer P, EuroGentest, European Society of Human G: Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. *Eur J Hum Genet* 2016;24:2-5.
- 40 Mafficini A, Simbolo M, Parisi A, Rusev B, Luchini C, Cataldo I, Piazzola E, Sperandio N, Turri G, Franchi M, Tortora G, Bovo C, Lawlor RT, Scarpa A: BRCA somatic and germline mutation detection in paraffin embedded ovarian cancers by next-generation sequencing. *Oncotarget* 2016;7:1076-1083.
- 41 Capoluongo E, Ellison G, López-Guerrero JA, Penault-Llorca F, Ligtenberg MJL, Banerjee S, Singer C, Friedman E, Markiefka B, Schirmacher P, Büttner R, van Asperen CJ, Ray-Coquard I, Endris V, Kamel-Reid S, Percival N, Bryce J, Röthlisberger B, Soong R, de Castro DG: Guidance Statement On BRCA1/2 Tumor Testing in Ovarian Cancer Patients. *Seminars in oncology* 2017;44:187-197.
- 42 Dougherty BA, Lai Z, Hodgson DR, Orr MCM, Hawryluk M, Sun J, Yelensky R, Spencer SK, Robertson JD, Ho TW, Fielding A, Ledermann JA, Barrett JC: Biological and clinical evidence for somatic mutations in BRCA1 and BRCA2 as predictive markers for olaparib response in high-grade serous ovarian cancers in the maintenance setting. *Oncotarget* 2017;8:43653-43661.
- 43 Koczkowska M, Zuk M, Gorczynski A, Ratajska M, Lewandowska M, Biernat W, Limon J, Wasag B: Detection of somatic BRCA1/2 mutations in ovarian cancer - next-generation sequencing analysis of 100 cases. *Cancer medicine* 2016;5:1640-1646.
- 44 Enyedi MZ, Jaksa G, Pintér L, Sükösd F, Gyuris Z, Hajdu A, Határvölgyi E, Priskin K, Haracska L: Simultaneous detection of BRCA mutations and large genomic rearrangements in germline DNA and FFPE tumor samples. *Oncotarget* 2016;7:61845-61859.



- 45 Pennington KP, Walsh T, Harrell MI, Lee MK, Pennil CC, Rendi MH, Thornton A, Norquist BM, Casadei S, Nord AS, Agnew KJ, Pritchard CC, Scroggins S, Garcia RL, King MC, Swisher EM: Germline and somatic mutations in homologous recombination genes predict platinum response and survival in ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2014;20:764-775.
- 46 Wallace AJ: New challenges for BRCA testing: a view from the diagnostic laboratory. *Eur J Hum Genet* 2016;24 Suppl 1:S10-18.
- 47 Fumagalli C, Tomao F, Betella I, Rappa A, Calvello M, Bonanni B, Bernard L, Peccatori F, Colombo N, Viale G, Barberis M, Guerini-Rocco E: Tumor BRCA Test for Patients with Epithelial Ovarian Cancer: The Role of Molecular Pathology in the Era of PARP Inhibitor Therapy. *Cancers (Basel)* 2019;11
- 48 Ong PY, Poon SL, Tan KT, Putti TC, Ow SGW, Chen SJ, Chen CH, Lee SC: Using next-generation sequencing (NGS) platform to diagnose pathogenic germline BRCA1/2 mutations from archival tumor specimens. *Gynecologic oncology* 2019;155:275-279.
- 49 Kim Y, Cho CH, Ha JS, Kim DH, Kwon SY, Oh SC, Lee KA: An optimized BRCA1/2 next-generation sequencing for different clinical sample types. *Journal of gynecologic oncology* 2020;31:e9.
- 50 Kowalik A, Zalewski K, Kopczyński J, Siólek M, Lech M, Hińcza K, Kalisz J, Chrapek M, Zięba S, Furmańczyk J, Jedliński M, Chłopek M, Misiek M, Góźdz S: Somatic mutations in BRCA1&2 in 201 unselected ovarian carcinoma samples - single institution study. *Polish journal of pathology : official journal of the Polish Society of Pathologists* 2019;70:115-126.
- 51 Jorge S, McFaddin AS, Doll KM, Pennington KP, Norquist BM, Bennett RL, Pritchard CC, Swisher EM: Simultaneous germline and somatic sequencing in ovarian carcinoma: mutation rate and impact on clinical decision-making. *Gynecologic oncology* 2020;156:517-522.
- 52 Vos JR, Fakkert IE, de Hullu JA, van Altena AM, Sie AS, Ouchene H, Willems RW, Nagtegaal ID, Jongmans MCJ, Mensenkamp AR, Woldringh GH, Bulten J, Leter EM, Kets CM, Simons M, Ligtenberg MJL, Hoogerbrugge N: Universal Tumor DNA BRCA1/2 Testing of Ovarian Cancer: Prescreening PARPi Treatment and Genetic Predisposition. *J Natl Cancer Inst* 2020;112:161-169.