

destinare all'esame FISH in modo che quest'ultima possa essere facilmente individuata durante l'osservazione con il microscopio a fluorescenza. Per quanto concerne i preparati citologici, si possono allestire campioni in modo ottimale e mirato alla tecnica FISH, oppure usare strisci colorati già allestiti, e quindi smontati e decolorati. I preparati citologici routinari ottenuti per striscio, fissati in alcool e colorati con Papanicolaou, Diff-Quick o May-Grünwald-Giemsa, sono frequentemente l'unico materiale disponibile. In questo caso le aree del vetrino contenenti il maggior numero di cellule neoplastiche vanno preventivamente circoscritte con matita vetrografica. I citoinclusi devono essere trattati come preparati istologici routinari.

L'allestimento del campione per l'ibridizzazione, prevede un pretrattamento delle sezioni in due fasi distinte: la prima con calore, la seconda enzimatica. A tal fine, sono disponibili Kit commerciali. Poiché il pretrattamento dipende dalla natura del tessuto, ed in particolare dalla quantità di tessuto connettivo presente nel campione, si suggerisce l'uso di Kit dedicati al pretrattamento dei tumori polmonari (es. Abbott Vysis paraffin pretreatment 4, Abbott Molecular, Inc., IL, USA). La procedura di pretrattamento deve essere messa a punto e validata in ogni laboratorio, in quanto è strettamente correlata alla procedura di fissazione ed inclusione.

Procedura FISH

La tecnica FISH per scopi diagnostici viene generalmente effettuata mediante kit commerciali dedicati che hanno il vantaggio di standardizzare le procedure riducendo le differenze intra e interlaboratorio. Poiché i kit contengono protocolli dettagliati per le procedure tecniche, queste ultime non vengono in questa sede discusse in dettaglio. La formazione del personale coinvolto nelle fasi di lavoro (dalla selezione del materiale, all'allestimento, lettura e refertazione) svolge un ruolo chiave per l'accuratezza dell'esame. È assolutamente sconsigliabile destinare risorse all'ottimizzazione di questa tecnica se le richieste diagnostiche sono sporadiche, poiché il rischio di non raggiungere standard operativi adeguati a fronte di notevoli spese è elevato. È stato valutato che un laboratorio può garantire un'adeguatezza tecnologica solo se effettua un minimo di 150 determinazioni FISH annuali.

Tipologie di sonde

Sono disponibili in commercio diversi tipi di sonde specifiche per il locus 2p23 contenente il gene ALK. Negli Stati Uniti la sonda Vysis LSI ALK Break Apart Rearrangement Probe, all'interno di un KIT diagnostico, è stata approvata da FDA come "companion test" di crizotinib. Essa è costituita da due sonde a DNA marcate con due fluorocromi differenti (orange e green) premiscolate e ottimizzate in un buffer di ibridazione. Le sonde riconoscono specifiche sequenze di DNA poste a monte e a valle del sito di rottura e con l'osservazione della posizione dei due fluorocromi si può identificare la rottura. Infatti, se il gene è integro i fluorocromi sono vicini e si percepiscono come appaiati o fusi, mentre se il gene è interrotto essi si allontanano e si osservano chiaramente distanziati (più di due diametri dei segnali luminosi in fluorescenza). Anche la presenza isolata del fluorocromo orange in assenza di green, e non viceversa, deve essere considerata come indice di riarrangiamento. Prima del montaggio del vetrino per l'osservazione, i preparati vengono contro-colorati con DAPI per evidenziare il nucleo cellulare.

Lettura del preparato

L'analisi è effettuata con un microscopio a fluorescenza, dotato di filtri adatti per i fluorocromi usati, adeguata lampada per la fluorescenza e obiettivi ad alto ingrandimento (40x, 60x o 100x in immersione ad olio). La prima osservazione deve essere condotta con filtro per DAPI, a 20x identificando le aree neoplastiche sulle quali valutare il gene. In queste aree si aumenta l'ingrandimento e si osservano i segnali luminosi intranucleari, contandoli e tabulando i dati. L'esame viene effettuato sull'intera sezione valutando almeno 50 nuclei neoplastici per stabilire il cut-off di positività: il paziente è considerato positivo e candidato alla terapia con crizotinib se la neoplasia presenta >50% dei nuclei con riarrangiamento e negativa se presenta <10% dei nuclei riarrangiati. Un

campione è considerato ambiguo se presenta una percentuale di nuclei con riarrangiamento compresa tra il 10% e il 50%. In questi casi il preparato deve essere valutato da un secondo operatore. Se la media delle percentuali di riarrangiamento riportate nelle due osservazioni è superiore o uguale al 15%, il caso è considerato positivo.

Nel 5-10% dei casi non si osserva il riarrangiamento, bensì un aumento delle copie del gene. Il significato di questa alterazione ai fini del trattamento con inibitori di ALK non è ancora noto.

Refertazione

La refertazione è parte integrante della procedura diagnostica e dovrebbe contenere le seguenti informazioni:

- L'identificazione del paziente e del medico/struttura che ha richiesto l'analisi.
- Il materiale utilizzato per l'analisi.
- La metodica impiegata per l'esecuzione dell'analisi e la tipologia del test commerciale utilizzato.
- I risultati del test, espressi in termini di negatività o positività per il riarrangiamento del gene ALK ed in quest'ultimo caso deve essere indicata la percentuale di nuclei con riarrangiamento sul numero totale dei nuclei sottoposti ad analisi.
- Il referto deve essere compilato su un modello prestabilito e firmato dall'anatomopatologo e dall'esecutore del test molecolare.
- In considerazione dell'impatto sulla strategia terapeutica, il tempo per la refertazione non deve superare le due settimane dalla richiesta della determinazione.

Bibliografia

Bartlett AI, Staryznski J, Robson T, et al: Heterogeneous HER2 gene amplification: impact on patient outcome and a clinically relevant definition. *Am J Clin Pathol* 2011; 136: 266-74.

Camidge DR, Bang YJ, Kwak EL, et al: Progression-free survival (PFS) from a phase I study of crizotinib (PF-02341066) in patients with ALK-positive non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 2011; 29: Abstract 2501.

Christensen, JG, Zou HY, Arango ME, et al.: Cytoreductive antitumor activity of PF-2341066, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experimental models of anaplastic large-cell lymphoma. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 3314-22.

Crinò L: Initial phase II results with crizotinib in advanced ALK-positive non-small cell lung cancer (NSCLC): PROFILE 1005. *J Clin Oncol* 2011; 29: Abstract 7514

Kwak, EL, Bang YJ, Camidge DR, et al: Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2010; 363: 1693-703.

Soda, M., Choi YL, Enomoto M, et al.: identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007; 448: 561-6.

Shaw AT, Yeap BY, Solomon BJ, et al: Effect of crizotinib on overall survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring ALK gene rearrangement: a retrospective analysis. *Lancet Oncol* 2011; 12: 1004-12

Travis, WD, Brambilla E, Noguchi M, et al: The new IASLC/ATS/ERS international multidisciplinary lung adenocarcinoma classification. *J Thorac Oncol* 2011; 6: 244-285.

US Food and Drug Administration. FDA labeling information – Xalkori. FDA website [online], http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/202570s0001b1.pdf (2011).

Zou, HY, Lee JH, Arango ME, et al: An orally available small-molecule inhibitor of c-Met, PF-2341066, exhibits cytoreductive antitumor efficacy through antiproliferative and antiangiogenic mechanisms. *Cancer Res* 2007; 67: 4408-17.

Raccomandazioni per l'analisi dei riarrangiamenti del gene ALK nel carcinoma polmonare non a piccole cellule

A cura del Gruppo di Lavoro di AIOM e SIAPEC-IAP

AIOM: Andrea Ardizzoni, Lucio Crinò, Cesare Gridelli, Nicola Normanno, Giorgio Scagliotti, Carmine Pinto (*Coordinatore*)

SIAPEC-IAP: Antonio Marchetti, Mauro Papotti, Giulio Rossi, Massimo Barberis, Eugenio Maiorano, Gian Luigi Taddei, Claudio Clemente (*Coordinatore*)

Questo materiale è stato realizzato grazie ad un grant incondizionato di



Raccomandazioni per l'analisi dei riarrangiamenti del gene ALK nel carcinoma polmonare non a piccole cellule

Indicazioni cliniche

L'analisi delle alterazioni molecolari di ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase) si rende necessaria per la scelta della migliore strategia terapeutica in pazienti selezionati con carcinoma polmonare non a piccole cellule (*Non-small Cell Lung Cancer*: NSCLC), in stadio IIB e IV che, in presenza di riarrangiamenti del gene, possono beneficiare del trattamento con inibitori di ALK.

Il crizotinib (PF-02341066; Pfizer) è un tirosinchinasi inibitore orale selettivo di ALK e MET, che inibisce la tirosin-fosforilazione di ALK. In uno studio clinico di fase I sono stati valutati il profilo di tossicità e l'efficacia di crizotinib in una coorte di pazienti con NSCLC e riarrangiamento di ALK. I dati dello studio sono stati recentemente aggiornati, nei 119 pazienti trattati, che avevano ricevuto nel 29 % dei casi 1 precedente linea di chemioterapia e nel 59% ≥ 2 linee, venivano osservate risposte obiettive nel 61% dei pazienti ed una stabilità di malattia nel 27 % dei casi, con un controllo di malattia nel 88% dei pazienti. La sopravvivenza libera da progressione era pari a 10 mesi. La principale tossicità di grado 3-4 è risultata in un aumento reversibile, dopo interruzione del trattamento, della GPT nel 4% dei pazienti. La sopravvivenza (OS) mediana dello studio non è stata raggiunta, con OS a 1 anno del 74% e a 2 anni del 54%. Questi dati hanno portato negli Stati Uniti il 26 Agosto 2011 all'approvazione accelerata di crizotinib, da parte della Food and Drug Administration (FDA), per il trattamento dei pazienti con NSCLC, in stadio localmente avanzato o metastatico, che risultano positivi per riarrangiamento di ALK. L'uso del crizotinib è ristretto ai pazienti i cui tumori risultano positivi alla alterazione di ALK mediante un test approvato dalla FDA (attualmente l'Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit, Abbott Molecular, Inc., IL, USA). Il 17 Agosto 2011 l'European Medicines Agency (EMA) in Europa ha accettato la sottomissione regolatoria di crizotinib per il trattamento di pazienti con NSCLC in stadio avanzato, ALK-positivi, pretrattati. I risultati dello studio allargato di fase I sono stati confermati da uno studio completato di fase II, che in 136 pazienti tutti pretrattati dalla seconda linea in poi, ha ottenuto un controllo di malattia del 90%, con una risposta complessiva del 50% ed una sopravvivenza libera da progressione (PFS) non ancora raggiunta con un follow up mediano di oltre 10 mesi. Questo studio, PROFILE 1005, prevedeva la determinazione centralizzata con FISH del riarrangiamento di ALK. Il crizotinib è in valutazione in due studi randomizzati di fase III in pazienti con NSCLC ALK-positivi, PROFILE 1007 e PROFILE 1014, che confrontano l'efficacia e la tossicità di crizotinib con la chemioterapia standard come seconda e prima linea di terapia, rispettivamente.

Indicazioni all'analisi dei riarrangiamenti di ALK

L'esame di ALK trova indicazione nei pazienti con NSCLC con istotipo adenocarcinoma, carcinoma a grandi cellule, carcinoma misto con adenocarcinoma, o NSCLC non altrimenti specificato (*not otherwise specified*: NOS) che presentano la più alta probabilità di riscontro di riarrangiamenti del gene. In base alle conoscenze attuali, la determinazione delle alterazioni di ALK può essere eseguita su pezzo operatorio oppure su prelievo biotico o citologico del tumore primitivo e/o della metastasi. Il riarrangiamento di ALK è presente nel 2-7% dei NSCLC. Nei pazienti a più alta probabilità in assoluto di alterazioni di ALK, ovvero non fumatori, deboli fumatori (< 15 pacchetti/anno o ≤ 5 sigarette al giorno) ed ex-fumatori (da ≥ 15 anni) con gli istotipi suddetti, per i quali non sia disponibile un adeguato materiale, può essere indicato un ulteriore prelievo biotico per permettere la successiva determinazione molecolare quando clinicamente indicato.

L'inserimento dell'analisi di ALK in un algoritmo diagnostico per i pazienti con NSCLC è ancora materia di discussione nella comunità scientifica internazionale. Per i casi con ampia disponibilità di tessuto, l'esame immunocitochimico potrebbe essere inserito tra le indagini iniziali, in quanto potenzialmente utile per una prima selezione dei casi da approfondire mediante FISH. Secondo un'altra linea di pensiero, in assenza attualmente di un KIT diagnostico validato per l'espressione del gene ALK nel tumore polmonare, l'analisi immunocitochimica dovrebbe essere utilizzata per studio e/o ricerca e non a fini diagnostici. Dato che le mutazioni di EGFR e di KRAS ed il riarrangiamento di ALK sono in genere mutualmente esclusivi, la conoscenza dello stato mutazionale di EGFR

e KRAS, se disponibile, è un altro elemento utile per la selezione dei pazienti da sottoporre ad analisi per ALK. Per i casi con limitata disponibilità di tessuto non è possibile definire un algoritmo in quanto la scelta delle analisi da effettuare dovrà essere presa caso per caso. Elementi da considerare in questa scelta sono la linea di trattamento e, quindi, la disponibilità o meno di un farmaco molecolare per la linea di trattamento interessata, e le caratteristiche clinico-patologiche. Ad esempio, le mutazioni di ALK sono più frequenti nei tumori ricchi di mucina intracellulare o con aspetto a cellule con castone, che sono invece di solito negativi per le mutazioni di EGFR. Tuttavia, alla luce delle più recenti scoperte che potrebbero a breve rendere disponibili nuovi farmaci per pazienti con specifiche alterazioni molecolari, i casi con limitata disponibilità di tessuto dovrebbero rappresentare una eccezione nel processo diagnostico dei pazienti con NSCLC, quantomeno per alcune categorie di pazienti sopra-elencate.

Basi scientifiche

I riarrangiamenti del gene ALK sono stati descritti per la prima volta nel 2007 come piccole inversioni nel cromosoma 2p inducenti una fusione di parti del gene EML4 con parti del gene ALK nel NSCLC. La risultante proteina di fusione, ad attività chinasi, conferiva alle cellule un forte stimolo proliferativo. Il crizotinib, inizialmente sviluppato come inibitore di MET, ha dimostrato sperimentalmente una forte attività inibente su ALK.

Oltre a EML4 sono stati riportati altri partners di fusione con il gene ALK (TFG, KIF5B, etc.). I prodotti di queste traslocazioni sono proteine chimeriche in cui la attività tirosin chinasi di ALK è costitutivamente attivata, innescando così un processo aberrante di fosforilazione di substrati cellulari a valle delle stesse oncoproteine ALK-chimeriche. I dati clinici relativi alle fusioni di ALK con altre proteine sono ancora esigui.

Come le mutazioni del gene EGFR, anche i riarrangiamenti del gene ALK si osservano con assoluta prevalenza in alcuni particolari istotipi del NSCLC. Pertanto, un accurato inquadramento istopatologico risulta oggi essenziale nell'iter diagnostico e terapeutico dei pazienti con neoplasia polmonare.

Inquadramento diagnostico isto-citopatologico

Il NSCLC rappresenta oggi un'area diagnostica impegnativa per l'anatomopatologo, per diverse ragioni: 1. la definizione dell'istotipo è diventata un punto importante nell'approccio terapeutico al paziente con NSCLC; 2. l'incidenza dell'adenocarcinoma è aumentata a partire dagli inizi degli anni '90 e questo istotipo è significativamente correlato ad alterazioni molecolari (mutazioni di EGFR, BRAF, HER2/neu, KRAS, fusione di ALK) che rappresentano bersagli per selettivi inibitori; 3. è necessario oggi formulare una diagnosi sempre più precisa di istotipo e d'altra parte ottimizzare la gestione del materiale tumorale (spesso molto limitato) per fornire tutte le informazioni necessarie per la migliore scelta terapeutica.

La diagnosi di NSCLC non ha mai rappresentato una reale entità per il patologo; in realtà si tratta di un termine coniato dalla comunità oncologica negli anni '70 ai fini del trattamento. La terapia nei carcinomi polmonari si basava sulla distinzione dicotomica tra carcinoma a piccole cellule e NSCLC. L'uso del termine in diagnostica è stato mantenuto fino ai primi anni 2000, ma l'introduzione di farmaci efficaci di nuova generazione e di molecole a bersaglio molecolare ha di fatto reso necessaria una più precisa classificazione del carcinoma polmonare, in particolare per quanto concerne il gruppo di neoplasie con caratteristiche clinico-patologiche e molecolari completamente differenti, che costituiscono il NSCLC. Come emerge dalla recente classificazione degli adenocarcinomi polmonari, è necessario affrontare ogni caso attraverso un approccio integrato multidisciplinare costante. Per una corretta diagnosi, è sempre necessario mettere il patologo nelle migliori condizioni per definire gli aspetti morfologici ed eventualmente per richiedere opportune indagini ancillari. I dati essenziali che dovrebbero essere presenti nella richiesta di un esame citologico comprendono lo stato di fumatore, i dati anamnestici significativi ed i risultati delle indagini di laboratorio e radiologiche.

Per la diagnosi di carcinoma polmonare (primitivo vs metastatico; epiteliale vs non-epiteliale) e la sottotipizzazione del NSCLC, è fondamentale un accurato

studio morfologico corredato da analisi immunocitochimiche. Nella sottotipizzazione di un NSCLC poco differenziato in cui la morfologia non sia risultata sufficientemente informativa, il primo pannello anticorpale da utilizzare è rappresentato da un marcatore di fenotipo adenocarcinoma, il TTF-1, ed uno di istotipo squamoso/epidermoide, p63. In breve, la positività per TTF-1 (anche focale) senza o con la co-espressione di p63 è sempre indicativa di un fenotipo adenocarcinoma, mentre solo la completa negatività per TTF-1 e positività diffusa ed intensa per p63 è indice di carcinoma squamocellulare. La negatività per TTF-1 e p63 può rappresentare la vera sfida diagnostica. In questo caso è opportuno valutare la possibilità di un adenocarcinoma poco differenziato (utilizzando ad esempio un secondo marcatore di profilo adenocarcinoma-napsina A- ed uno di fenotipo squamoso- p40 e/o desmocollina-3 e/o CK5/6), un carcinoma sarcomatoide (se presenti cellule neoplastiche fuse e/o giganti), un'altra forma di neoplasia polmonare poco comune o una neoplasia metastatica al polmone. Nel caso di un carcinoma polmonare poco differenziato in cui sia la morfologia che l'immunocitochimica siano risultati non dirimenti, è opportuno mantenere la dizione di NSCLC-NOS. Si stima che un Laboratorio di Anatomia Patologica di buona qualità dovrebbe tenere la soglia di diagnosi di NSCLC-NOS (sia su citologia che istologia) sotto il 10% di tutte le diagnosi di carcinoma primitivo del polmone.

La sottotipizzazione del NSCLC e le indagini molecolari possono essere efficacemente garantite sia su materiale citologico che istologico, purché il materiale inviato al Laboratorio sia quantitativamente e qualitativamente adeguato. In considerazione di particolari criteri diagnostici applicabili solo su campione operatorio, le diagnosi di carcinoma a grandi cellule, carcinoma adenosquamoso e carcinoma pleomorfo/sarcomatoide non sono ritenute fattibili su prelievo citologico e piccola biopsia.

Preparazione dei campioni per la diagnosi isto-citopatologica

Esistono numerose metodiche per ottenere campioni cito-istologici per diagnosi di NSCLC. Per raggiungere il massimo risultato è fondamentale la scelta della tecnica e del tipo di campione in rapporto al quadro clinico del paziente affetto da patologia polmonare ed alla diagnosi differenziale posta inizialmente sulla base dei dati clinico-laboratoristici e radiologici.

Per quanto concerne i preparati citologici, il liquido pleurico ed il lavaggio broncoalveolare devono essere trasportati in provette sterili entro un'ora al Laboratorio per essere allestiti immediatamente (oppure in caso di impossibilità vanno conservati momentaneamente in frigorifero a +4-5 °C), mentre gli aspirati vanno strisciati su vetrini e fissati (con alcool 95° o cytofix) immediatamente quando si utilizzino colorazioni quali ematossilina-eosina o Papanicolaou. Una fissazione all'aria è idonea per colorazioni vitali quali May-Grunwald-Giemsa e Diff-Quick. Quando possibile, è buona pratica cercare di ottenere un citoincluso (ovverosia la possibilità di ricavare un blocchetto in paraffina a partire da materiale aspirato citologico) ed assistere con esame estemporaneo del citologico il broncoscopista o il radiologo in caso di aspirati transbronchiali o transtoracici, rispettivamente (cosiddetta *ROSE, rapid-on-site evaluation*) per valutare la rappresentatività del materiale.

Le biopsie vanno poste in contenitori con fissativo a base di formaldeide tamponata al 10% per non meno di 12 ore e non più di 24 ore. Le biopsie saranno poi incluse in blocchetti di paraffina che consentiranno il taglio di sezioni sottili (tra 2 e 4 micron di spessore) che, colorate in ematossilina-eosina, potranno essere esaminate al microscopio. Conservare materiale fresco da congelare ("tissue bank") è utile solamente quando si dispone di campioni operatori in grado di fornire sia tessuto per diagnosi, stadiazione e indagini molecolari di routine ma anche di materiale per eventuali future ricerche. Da una biopsia e dal citoincluso è in genere possibile ottenere un discreto numero di ulteriori sezioni bianche da utilizzare per indagini speciali di istochimica (PAS, *periodic-acid-Schiff*, Alcian/Blue-PAS per evidenziare le mucine) o di immunocitochimica.

Metodologie per l'analisi di ALK

Per guidare le decisioni terapeutiche in pazienti con NSCLC l'analisi genetica di ALK si affianca alla ricerca di mutazioni del gene EGFR (vedi linee guida dedi-

cate). Diverse tecnologie sono state sviluppate per l'analisi di questo marcatore.

FISH

L'ibridizzazione in situ in fluorescenza (FISH) rappresenta in questo momento il metodo elettivo per la ricerca di riarrangiamenti del gene ALK. Questo metodo, infatti, è stato utilizzato nei trials clinici che hanno portato all'approvazione del trattamento con crizotinib. L'attuale protocollo diagnostico-terapeutico individua nel 15% di nuclei riarrangiati in FISH la soglia per potere considerare il caso come "positivo" e il paziente candidabile al trattamento. La tecnologia è disponibile in Kit commerciali sviluppati per uso diagnostico, tra cui: il kit diagnostico certificato dall'FDA Abbott Vysis (ALK Break Apart FISH Probe Kit, Abbott Molecular, Inc.). Tale Kit è corredato di un protocollo dettagliato sulle procedure tecniche e l'interpretazione dei dati. Sono disponibili altri kit commerciali non ancora approvati da FDA (es. ZytoLight® SPEC ALK/EML4 TriCheck™ Probe, ZytoVision, Bremerhafen, Germany). In ogni caso, la determinazione dei riarrangiamenti ALK dovrebbe essere validata accuratamente nei singoli laboratori diagnostici, con l'analisi di un adeguato numero di controlli positivi e negativi, prima di implementare l'attività clinica.

Immunocitochimica

L'espressione della proteina ALK potrebbe rappresentare un potenziale marcatore di avvenuta riarrangiamento del gene e/o di risposta agli inibitori di ALK. L'introduzione nei laboratori di Anatomia Patologica di un metodo di screening di facile utilizzo e a costo sostenibile, quale una immunocolorazione, è assolutamente auspicabile. Sono stati a tal fine sviluppati, utilizzati a scopo di studio e riportati in letteratura, tre anticorpi monoclonali anti-ALK, il clone 5A4 (Leica/Novocastra, e pre-diluito Abcam), il clone ALK1 (Dako) e il clone D5F3 (Cell Signalling Technology). Al momento attuale, dei tre anticorpi solo i primi due sono commercialmente disponibili, mentre il clone D5F3 è disponibile solamente per scopi di ricerca. I risultati ottenuti con questi anticorpi in studi comparativi con la metodica FISH sono promettenti, particolarmente quelli ottenuti con il clone 5A4 che riconosce una proteina ricombinante, ma al momento insufficienti per trarre conclusioni definitive.

Analisi mediante Reverse-transcription PCR (RT-PCR)

L'RT-PCR può essere effettuata su DNA complementare (cDNA) ottenuto per sintesi dall'RNA messaggero (mRNA) per evidenziare direttamente il processo di fusione di ALK con EML4 o altre proteine utilizzando primers dedicati. La tecnologia risulta estremamente sensibile e molto specifica. Pertanto, negli studi è stata utilizzata come gold standard per valutare la sensibilità dell'analisi FISH e immunocitochimica. Tuttavia, la RT-PCR ha numerosi svantaggi per una applicazione nella pratica clinica: a) è richiesto un mRNA di alta qualità non ottenibile da tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina; b) sono richiesti dei sistemi complessi di amplificazione PCR multiplex a seguito della grande variabilità dei tipi di fusione; c) solo le alterazioni note vengono riconosciute dal test.

Preparazione dei campioni per l'esame FISH

Il materiale biologico su cui viene eseguita la FISH per lo studio delle fusioni del gene ALK può essere costituito sia da campioni istologici che citologici rappresentativi del tumore primitivo e/o della metastasi. Tuttavia, è opportuno considerare che i kit diagnostici sono stati sviluppati e validati solo su campioni istologici fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE). Per quanto concerne i campioni istologici, si consiglia di effettuare sezioni leggermente più spesse (5 micron) di quelle utilizzate per l'istopatologia, al fine di ottenere migliori risultati in corso di lettura. Le sezioni devono essere montate su vetrini pretrattati per FISH e le sezioni devono essere fatte aderire mediante essiccamento per un'ora a 60°C o overnight a 45°C. Prima della valutazione con FISH, è necessario controllare una sezione contigua a quella da analizzare colorata con Ematossilina-Eosina, in modo da riconoscere e valutare le aree neoplastiche di interesse. Nel caso in cui la componente neoplastica sul campione sia esigua, è consigliabile segnare con matita retrografica l'area da esaminare sul vetrino da