



Associazione Italiana Oncologia Medica

## **REPORT FINALE DEL PROGETTO: “CONTROLLO DI QUALITÀ E VALIDAZIONE DEL TEST PER LA DETERMINAZIONE DEL RIARRANGIAMENTO DEL GENE ALK NEL CARCINOMA POLMONARE”**

Il progetto di controllo di qualità per la determinazione del riarrangiamento del gene ALK, diretto e coordinato da un gruppo di lavoro di AIOM e SIAPEC-IAP, ha la finalità di migliorare lo standard qualitativo per questa determinazione e permettere sull'intero territorio nazionale adeguate valutazioni nella selezione dei pazienti con carcinoma polmonare non-a piccole cellule avanzato, suscettibili di un trattamento con Crizotinib.

L'adesione al Progetto Controllo di Qualità è stata volontaria e ha riguardato i centri di anatomia patologica/biologia molecolare che effettuano correntemente questa determinazione con finalità clinica.

Il Comitato Scientifico AIOM e SIAPEC-IAP del progetto è coordinato da Carmine Pinto (Segretario Nazionale AIOM) e Claudio Clemente (Presidente Nazionale SIAPEC-IAP) ed è composto per l'AIOM da Andrea Ardizzoni (Parma), Lucio Crinò (Perugia), Cesare Gridelli (Avellino), Nicola Normanno (Napoli), Giorgio Scagliotti (Torino) e per la SIAPEC-IAP da Antonio Marchetti (Chieti), Mauro Papotti (Torino), Massimo Barberis (Milano), Giulio Rossi (Reggio Emilia), Renato Franco (Napoli), Gian Luigi Taddei (Firenze).

Il programma ha avuto una lunga fase preparatoria iniziata nell'estate del 2012 finalizzata alla selezione dei campioni da utilizzare per lo svolgimento del controllo di qualità. Sono stati raccolti n.30 inclusioni in paraffina di cui 20 con riarrangiamento del gene ALK evidenziato con metodica FISH. In particolare, i campioni sono stati forniti da cinque Anatomie Patologiche Chieti-Marchetti, Milano-Barberis, Torino-Papotti, Napoli-Franco, Modena-Rossi.

Da queste inclusioni ne sono state selezionate n.10 basandosi sullo spessore dei preparati, sulla percentuale di cellule neoplastiche e, nei casi positivi per riarrangiamento di ALK con metodo FISH, sulla percentuale delle cellule con espressione immunohistochimica di ALK valutata mediante l'anticorpo monoclonale D5F3 (Cell Signaling Technology).

A partire dai 10 campioni selezionati, si è quindi provveduto, presso il centro di Chieti (Marchetti), all'allestimento di una serie di tissue microarray (TMA). A tal fine, da ciascun blocco di tessuto sono state prelevate con "puncher" da 2 mm porzioni tumorali con alta percentuale di cellule positive per riarrangiamento di ALK ed inserite in un TMA da 10 spot (uno per campione).

Da ciascun TMA sono stati allestiti 5 preparati su vetrino, ciascuno con una sezione in bianco da 5 µM, e sottoposti ad analisi FISH per il riarrangiamento di ALK presso i cinque centri di riferimento. In tutti i centri l'analisi FISH è stata effettuata utilizzando la sonda Vysis ALK Break a Part Rearrangement Probe (Abbott Diagnostic Kit). Non tutti i centri hanno utilizzato lo stesso protocollo di pre-ibridazione.

I risultati ottenuti dai 5 centri di riferimento sono riassunti nella tabella 1.

**Tabella 1**

CENTER	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 5	Case 6	Case 7	Case 8	Case 9	Case 10
1	N	N	N	P	P	P	N	P	N	N
2	N	N	N	P	P	P	N	P	N	N
3	N	N	N	P	P	P	N	P	N	N
4	N	NV	N	P	P	P	N	P	NV	N
5	N	NV	N	P	P	P	N	P	NV	N

Come emerge chiaramente dalla tabella 1, è stato ottenuto un elevato livello di concordanza. Tuttavia, i casi 2 e 9 sono risultati non valutabili (NV), per assenza di segnale FISH, da due centri di riferimento e pertanto sono stati considerati come casi critici. Si è ritenuto opportuno utilizzare anche i due casi critici per il controllo di qualità esterno al fine di evidenziare eventuali criticità nell'espletamento del test o nell'interpretazione dei risultati. Si è comunque deciso di non considerare come errore la non valutabilità dei campioni critici.

In data 12 novembre 2012 si è proceduto ad inviare un vetrino con una sezione di TMA da 5 µM ai 37 centri registrati ed ammessi al programma. Le sezioni ottenute dai TMA sono state rivalutate con FISH, prima dell'invio, per conferma del risultato alla ventesima e all'ultima sezione. Ai centri è stato richiesto di effettuare l'analisi FISH per il riarrangiamento di ALK con la metodica utilizzata di routine. I campioni sono stati anonimizzati e ai laboratori sono state concesse 3 settimane per la esecuzione del test e l'invio dei risultati attraverso il sito web dedicato, [www.ALKquality.it](http://www.ALKquality.it)

Il Comitato Scientifico ha definito i criteri di valutazione dei risultati. Dopo ampia discussione, anche in base ai criteri forniti dalle linee guida della European Society of Pathology per i controlli di qualità, si è deciso di assegnare ad ogni campione un punteggio massimo di 2 punti da ridurre in caso di errori, la cui tipologia è raggruppata come riportato in tabella 2:

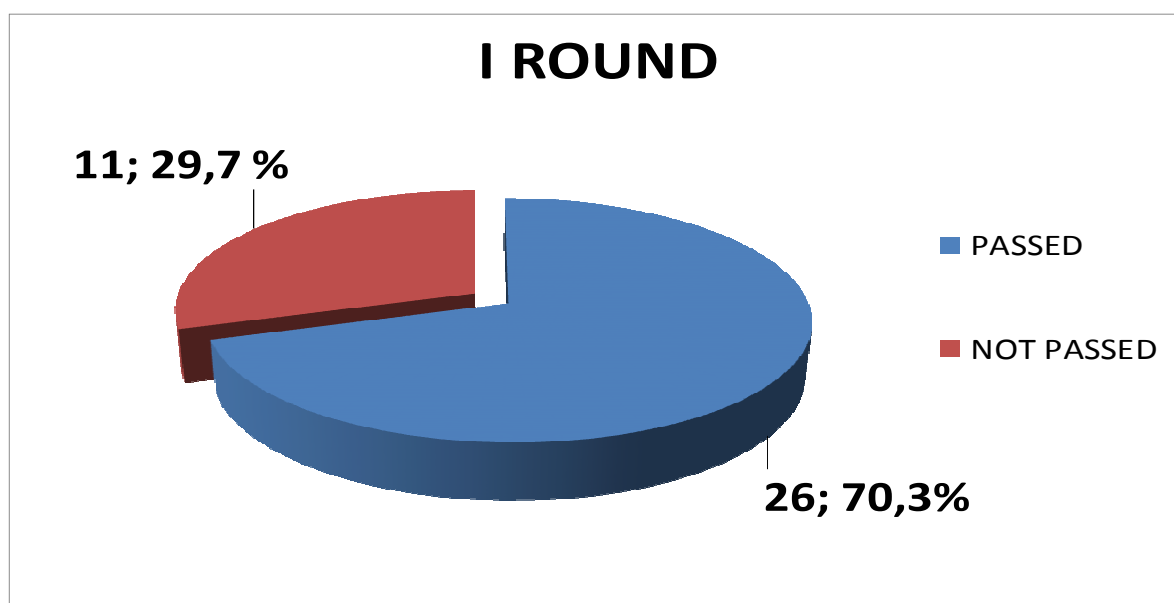
**Tabella 2**

<b>Results evaluated according to a pre-defined scoring system</b>	
<b>CRITERIA</b>	<b>MARKS</b>
<b>Correct genotype</b>	<b>2.00</b>
<b>Analytical failure</b>	<b>1.0 for the first error, 0 from the second</b>
<b>Incorrect genotype (false-positive or false negative)</b>	<b>0</b>

Sulla base degli stessi criteri, il Comitato Scientifico ha deciso di porre come soglia per il superamento del Controllo di qualità un punteggio pari a 18.

Il Comitato Scientifico ha quindi proceduto ad analizzare i risultati del controllo di qualità forniti dai singoli centri. Dei 37 centri registrati, 26 (70%) hanno ottenuto un punteggio uguale/superiore a 18 e hanno pertanto superato il I round (Fig.1).

**Fig. 1**

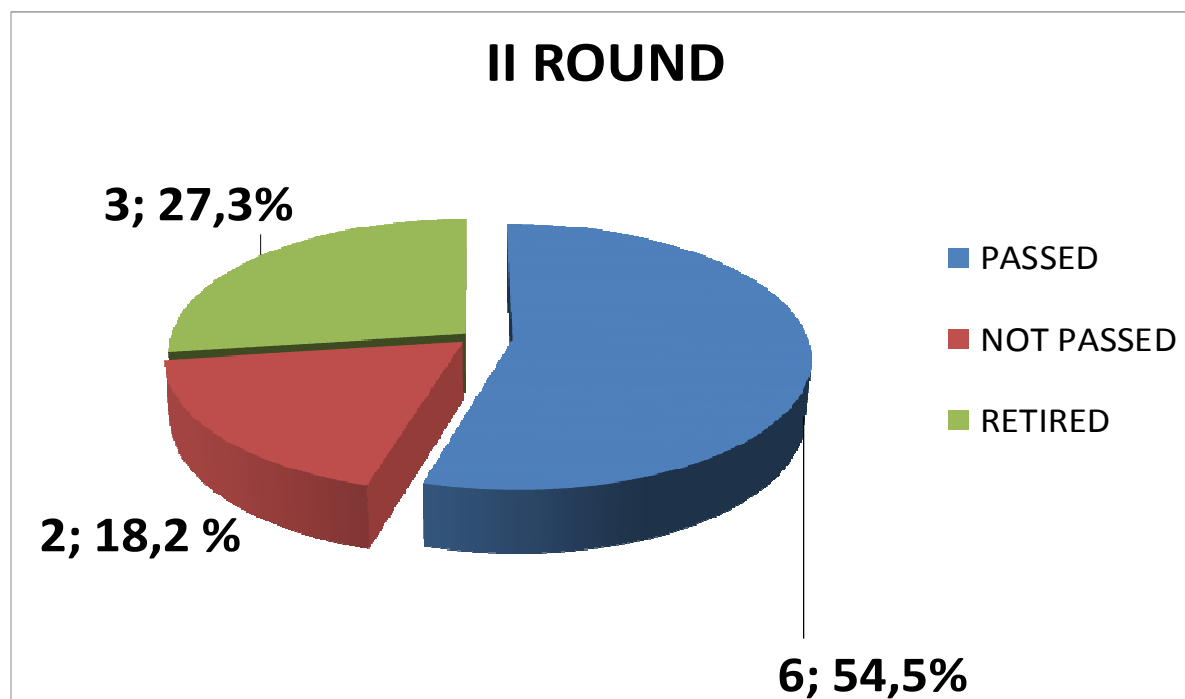


L'analisi globale dei risultati ha evidenziato che gli errori erano distribuiti in maniera casuale e rappresentati da falsi negativi, falsi positivi ed analisi non riuscite.

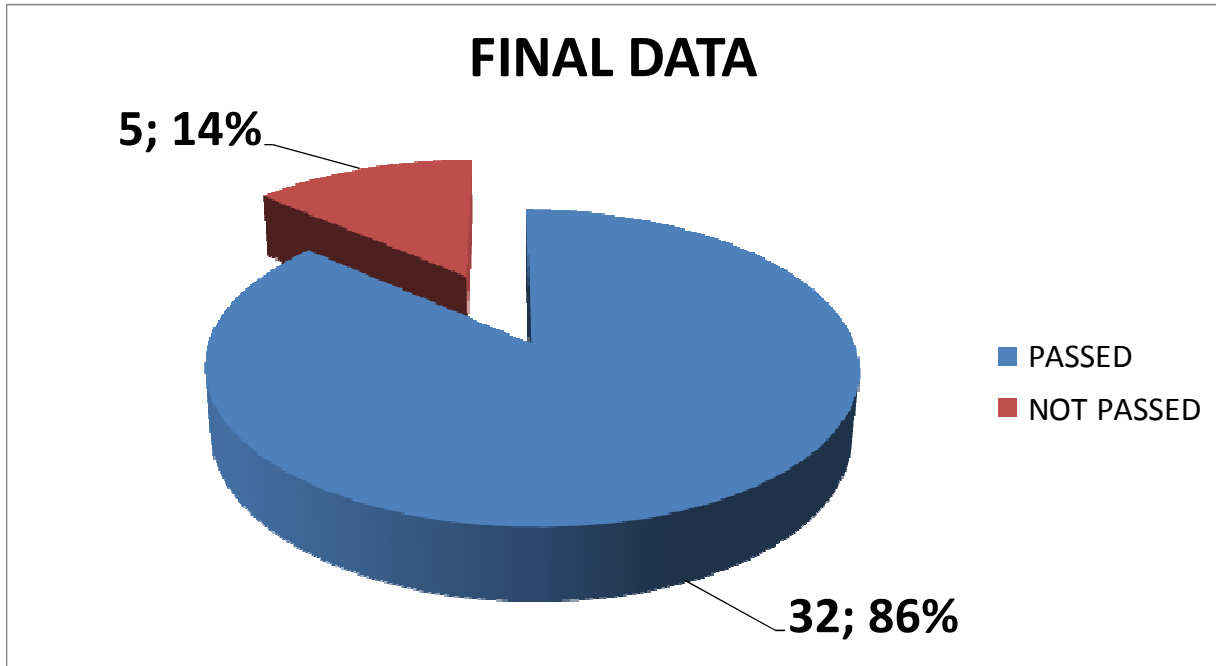
Agli 11 centri che non hanno superato il I round è stata offerta la possibilità di partecipare ad un II round, per il quale si è deciso di inviare lo stesso materiale del I round. I campioni per il II round sono stati spediti in data 28 febbraio 2013 ed anche in questo caso sono state concesse 3 settimane ai centri per completare le analisi.

Come riportato in Fig.2, degli 11 centri ammessi al II round, 6 hanno ottenuto un punteggio uguale/superiore a 18 e hanno pertanto superato il test, 3 non hanno inviato i risultati e 2 hanno ottenuto nuovamente un punteggio inferiore alla soglia minima stabilita.

**Fig.2**



**Fig. 3**



In conclusione, i centri che hanno superato il controllo di qualità per l'analisi del riarrangiamento di ALK sono 32, di cui 26 al I round ed 6 al II round (Fig.3). Con riferimento ai due campioni critici inseriti nel controllo di qualità, 7 (22%) dei 32 centri che hanno superato il controllo hanno definito tali campioni come non valutabili. Il dato è stato registrato ma, come prestabilito, non considerato un errore. La presenza di questi due campioni ha permesso di evidenziare una criticità nella fase di pre-ibridazione del test FISH che attualmente è in fase di studio.

Ai 32 centri che hanno superato il controllo di qualità per la determinazione del riarrangiamento del gene ALK si devono aggiungere i 5 centri che hanno svolto una funzione di coordinamento nell'ambito del controllo di qualità, per un totale di 37 centri certificati da AIOM e SIAPEC, come da elenco allegato.