

## Raccomandazioni degli esperti per l'implementazione del test di CLDN18.2

Con l'emergere di nuovi biomarcatori del tumore G/GGE, è fondamentale che i laboratori di anatomia patologica conoscano e adottino le migliori pratiche relative ai test di immunoistochimica (IHC).

Sviluppata da un comitato di esperti di patologia, questa guida è stata concepita per aiutare i laboratori ad avviare i test per CLDN18.2.

Questa istruzione operativa ha l'esclusiva finalità di indentificare i passaggi per il corretto svolgimento del test. L'accuratezza nello svolgimento, la lettura e l'interpretazione dei risultati rimangono nella esclusiva responsabilità dell'operatore sanitario che svolgerà l'attività.



### 1 **Raccomandazioni in evidenza:** Principi di convalida analitica dei test IHC<sup>1,2</sup>

**NOTA:** le seguenti raccomandazioni sono applicabili ai test IHC nel tumore G/GGE.

#### RACCOMANDAZIONE 1

**I laboratori devono validare tutti i test IHC prima di introdurli nella pratica clinica.**

I set di validazione devono includere risultati di espressioni positive, negative e borderline:

- **Controllo positivo** – Tessuti che contengono l'antigene di interesse espresso a livelli superiori a una certa soglia
- **Controllo negativo** – Tessuti che non contengono l'antigene di interesse

I tessuti normali non dovrebbero comprendere l'intero set di validazione.

I set di validazione devono riflettere l'uso previsto del test e l'indicazione di interesse (ad esempio, gastrica).

#### RACCOMANDAZIONE 2

**Per la validazione iniziale dei test utilizzati in ambito clinico, è necessario raggiungere una concordanza di almeno il 90% tra il nuovo test e il test comparatore.**

Se la concordanza è inferiore al 90%, è necessario indagare la causa.

#### RACCOMANDAZIONE 3

**Per la validazione analitica iniziale dei biomarcatori predittivi, devono essere utilizzati 40 casi di validazione (20 positivi, 20 negativi).**

Se il patologo decide che sono sufficienti meno di 40 casi di validazione, è necessario documentare la motivazione di tale decisione.

I laboratori possono scegliere di utilizzare set di tessuti con un numero di casi superiore a quello minimo raccomandato.

Se i risultati di validazione non soddisfano lo standard di concordanza del 90%, è necessario determinare la causa di questo risultato e le opportune misure di mitigazione (testare tessuti aggiuntivi, modificare le condizioni del test).

#### RACCOMANDAZIONE 4

**Quando possibile, i laboratori dovrebbero utilizzare tessuti di validazione trattati con gli stessi fissativi e metodi di lavorazione dei casi da analizzare clinicamente.**

I tessuti inclusi nel set di validazione devono essere rappresentativi dei campioni che si ricevono nella pratica clinica di routine.

Il set di validazione deve fornire una gamma rappresentativa di intensità e pattern di espressione.

### RACCOMANDAZIONE 5

**I laboratori possono utilizzare sezioni intere, microarray di tessuti (TMA) e/o blocchi multi-tessuto (MTB) nei loro set di validazione, a seconda dei casi.**

Le sezioni intere devono essere utilizzate se i TMA/MTB non sono appropriati per l'antigene target o se il direttore medico del laboratorio non può confermare che la fissazione e il trattamento dei TMA/MTB sono simili a quelli dei campioni clinici.

I TMA/MTB contengono molteplici tessuti positivi e negativi precedentemente analizzati (consentono di confrontare i risultati di più tessuti analizzati con un protocollo di analisi identico).

**I TMA/MTB presentano dei limiti:**

- Biomarcatori con alti livelli di eterogeneità (PD-L1, HER2 gastrico)
- A causa delle dimensioni ridotte di ciascun campione di tessuto, i TMA/MTB presentano solitamente meno cellule positive all'antigene e cellule di controllo negative rispetto alle sezioni intere
- L'espressione nel TMA (inclusa la mucosa gastrica normale come controllo positivo) può non rappresentare in modo affidabile l'intero tumore
- Espressione tissutale limitata (es. BCL-6)

### RACCOMANDAZIONE 6

**Quando un nuovo lotto di anticorpi viene introdotto nella pratica clinica per un test esistente convalidato, i laboratori devono confermare le prestazioni del test con almeno un caso positivo noto e un caso negativo noto.**

Quando si utilizza un nuovo lotto di anticorpi, è necessario verificare che le prestazioni del test non siano cambiate.

I laboratori devono confermare le prestazioni del test attraverso le seguenti modalità (anche se non limitatamente ad esse):

- **Fornitore dell'anticorpo** (stesso clone)
- **Diluizione dell'anticorpo**
- **Tempi di incubazione o recupero** (stesso metodo)

La conferma che le prestazioni del test non sono cambiate è necessaria in caso di piccole modifiche al metodo di analisi.

I laboratori potrebbero voler includere i marcatori positivi borderline:

- Si devono considerare 2 casi positivi (1 debole e 1 forte).

### RACCOMANDAZIONE 7

**I laboratori devono confermare le prestazioni del test analizzando un numero sufficiente di casi per garantire che i test raggiungano costantemente i risultati attesi.**

I laboratori devono confermare le prestazioni del test quando cambia uno qualsiasi dei seguenti elementi:

- **Tipo di fissativo**
- **Metodo di recupero dell'antigene** (ad esempio, variazione del pH, tampone diverso, piattaforma termica diversa)
- **Sistema di rilevamento dell'antigene**
- **Apparecchiature per il trattamento o l'analisi dei tessuti**
- **Condizioni ambientali del test** (Ad esempio, il trasferimento del laboratorio)
- **Approvvigionamento idrico del laboratorio**

### RACCOMANDAZIONE 8

**I laboratori devono eseguire una riconvalida completa (equivalente alla convalida analitica iniziale) quando il clone dell'anticorpo viene modificato per un test già convalidato.**

### RACCOMANDAZIONE 9

**Il laboratorio deve documentare tutte le convalide e le verifiche in conformità ai requisiti normativi e di accreditamento.**

2

Pre-Analisi & Best Practice<sup>3</sup>

<b>METODO DI LAVORAZIONE</b>
Spessore della sezione per i campioni chirurgici: ≤5 mm
Rapporto massa/volume: ≥4:1 (ottimale: ≥10:1)
Temperatura di trasporto: ambiente
<b>METODO DI STABILIZZAZIONE</b>
Tipo di fissativo: formalina tamponata con fosfato neutro al 10%
Tempo di permanenza nel fissativo: 6-24 ore (include il tempo di permanenza in formalina nel trasformatore; il tempo può variare a seconda del tipo di tessuto, ad esempio, campione chirurgico, biopsia)
<b>VARIABILI DEL TRASFORMATORE DI TESSUTI</b>
Programma di manutenzione: Raccomandazione del produttore o deviazione convalidata dal programma
Tipo di paraffina: a bassa fusione <60°C
Tempo totale di permanenza nel trasformatore: 7,5-8 ore (vietate le pratiche non standard: ad esempio "rabboccare con soluzioni non standard")
<b>GENERALE</b>
Le condizioni di conservazione sono quelle ambientali (ad esempio, 20-25°C).
Documentare i dati per tutte le raccomandazioni.

3

Preparazione del campione e considerazioni sul test<sup>4,5</sup>

I tessuti processati di routine, fissati in formalina e inclusi in paraffina, sono idonei all'uso con gli anticorpi primari – test VENTANA CLDN18 (43-14A) IVD, anticorpo LSBio PathPlus™ CLDN18 e anticorpo ricombinante Abcam Anti-Claudin 18 (43-14A).
Per l'IHC si raccomanda di tagliare sezioni di tessuto dello spessore di circa 4 µm e di montarle su vetrini con carica positiva.
Prima della colorazione, i vetrini tagliati devono essere asciugati completamente a temperatura ambiente (asciugati all'aria) o con essiccazione offline (in forno) a 60°C per 60 minuti.
I vetrini devono essere colorati tempestivamente (si consiglia entro una settimana), poiché l'antigenicità delle sezioni di tessuto tagliate può diminuire nel tempo e può essere compromessa da fattori ambientali durante la conservazione prolungata.
Si raccomanda di eseguire i controlli positivi e negativi insieme ai campioni non noti.
Si raccomanda di includere nel campione non noto i controlli di corsa positivi e negativi (ovvero, i controlli a livello di sistema).

Informazioni sul Comitato di esperti CLDN18.2

Il Comitato di esperti CLDN18.2 è composto da alcuni tra i più importanti antropatologi del mondo con l'obiettivo di sviluppare e condividere le best practice per quanto riguarda le modalità di analisi, interpretazione e refertazione dell'espressione di CLDN18.2.

Gli esperti di cui sopra sono stati coinvolti in qualità di consulenti retribuiti da Astellas Pharma Inc. e hanno ricevuto un compenso per il loro tempo.



**Matteo Fassan, MD, PhD**  
Padova, Italia



**Christoph Röcken, MD**  
Kiel, Germania



**Takeshi Kuwata, MD, PhD**  
Tokyo, Giappone



**Josef H. Rüschhoff, MD**  
Kassel, Germania



**Kristina A. Matkowskyj, MD, PhD**  
Madison, WI, USA

**Bibliografia:** 1. College of American Pathologists. IHC assays—New evidence-based guideline for analytic validation (04-01-2004). <https://documents.cap.org/documents/ihc-validation-webinar-handout.pdf>. Accessed 03-30-2023. 2. Fitzgibbons PL, Bradley LA, Fatheree LA, et al. Principles of analytic validation of immunohistochemical assays: Guideline from the College of American Pathologists Pathology and Laboratory Quality Center. Arch Pathol Lab Med. 2014;138(11):1432-1443. doi:10.5858/arpa.2013-0610-CP. 3. Compton CC, Robb JA, Anderson MW, et al. Preanalytics and precision pathology: pathology practices to ensure molecular integrity of cancer patient biospecimens for precision medicine. Arch Pathol Lab Med 2019;143(11):1346-63. 4. VENTANA CLDN18 (43-14A) assay [package insert]. 5. Jasani B, Schildhaus HU, Taniere P, et al. Global ring study determining reproducibility and comparability of CLDN18 testing assays in gastric cancer. Poster presented at: ESMO Targeted Anticancer Therapies Congress; March 6-8, 2023; Paris, France.