

**Programma di “Valutazione Esterna di Qualità”**



**IMMUNOISTOCHEMICA  
&  
FISH**

**United Kingdom  
National External  
Quality Assessment  
Schemes**

**Informazioni e  
Scheme Handbook  
2014-15**

**Distribuito da:**

**Codex srl Via A.Vespucci 12 16156 Genova**

**Tel 0106671491—010661745 Fax 0106967166 Email: [info@codexitalia.it](mailto:info@codexitalia.it) Sito web: [www.codexitalia.it](http://www.codexitalia.it)**

Indice	Pagina
1.0 INTRODUZIONE ALL'IMMUNOISTOCHEMICA & ISH	2
2.0 IMMUNOISTOCHEMICA	2
2.1 Procedura di valutazione	2
2.2 Interpretazione dei risultati ottenuti	2
2.2.1 Interpretazione dei risultati ottenuti (escluso modulo HER-2 ICC)	2
2.2.2 Interpretazione dei risultati ottenuti per il modulo HER-2 ICC	3
2.2.3 Interpretazione dei punteggi di valutazione per HER2 Gastrico ICC	4
2.3 Raccomandazioni per i tessuti in house	4
2.3.1 Raccomandazioni per i tessuti in house: tutti i moduli	4
2.3.2 Raccomandazioni per i tessuti in house: modulo per recettori ormonali mammari	5
2.4 Report dei partecipanti	5
2.4.1 Report individuali dei partecipanti	5
2.4.2 Report grafici & dati tecnici per ciascuna distribuzione	6
2.4.2.1 Grafici/Tabelle/Metodi migliori	6
2.4.2.2 Esempio di dati tecnici nel report	6
2.4.2.3 Esempio dei "migliori metodi" selezionati	7
2.4.2.4 Esempio di immagini selezionate	7
2.4.3 Giornale elettronico	7
2.5 Laboratori non Inglesi	8
2.6 Invio dello schema educativo	8
2.7 Aiuto ai partecipanti	8
2.8 Procedura di ricorso e assistenza	8
2.9 Procedura di reclamo	8
2.10 Incontri scientifici e seminari	8
2.11 Workshop pratici	8
2.12 Registrazione delle performance al termine dell'anno/Certificato di partecipazione	8
2.13 Riassunto dei vantaggi di membership UK NEQAS-ICC & ISH	8
2.14 Responsabilità del partecipante	9
2.15 Politica della riservatezza	9
2.16 Anticorpi non disponibili	9
2.17 Colori di moduli e vetrini	10
3.0 MODULI DI IMMUNOISTOCHEMICA	10
MODULO 1: Patologia generale	10
MODULO 2: Patologia mammaria (recettori ormonali)	10
MODULO 3: Patologia mammaria (HER-2 Immunocitochimica)	10
MODULO 4: Patologia linfatica	11
MODULO 5: Neuropatologia	11
MODULO 6: Citopatologia	11
MODULO 7: Patologia del tratto alimentare	12
MODULO 8: HER-2 Gastrico (schema pilota)	12
4.0 IBRIDAZIONE FLUORESCENTE IN SITU	12
4.1 Introduzione	12
4.2 Modulo HER-2 ISH interpretativo	12
4.2.1 Procedura di valutazione del modulo HER-2 ISH interpretativo	12
4.2.1 Interpretazione del punteggio ottenuto	13
4.4 Laboratori non Inglesi	13
4.5 Invio dello schema educativo	13
4.6 Registrazione delle performance al termine dell'anno/Certificato di partecipazione	13
4.7 Modulo pilota HER-2 tecnico	13
4.8 Modulo HER-2 ISH interpretativo e tecnico per la risoluzione dei problemi	14
4.9 Aiuto ai partecipanti	14
4.10 Procedura di ricorso e assistenza	14
4.11 Procedura di reclamo	14
4.12 Incontri scientifici e seminari	14
4.13 Workshop pratici	14
4.14 Riassunto dei vantaggi della partecipazione all'UK NEQAS-ISH	14
4.15 Registrazione per la partecipazione all' UK NEQAS-ISH	15
4.16 Moduli	15
5.0 NUOVI MODULI	15
5.1 EML4-ALK NSCL MODULO PILOTA	15
5.2 Modulo interpretativo basato sul web	15
5.3 CMET nei polmoni	15
5.5 Agenti infettivi	15
6.0 SCHEMI ASSOCIATI E MODULI	15
7.0 BIBLIOGRAFIA	16
\ 8.0 Utilizzo del sistema di inserimento dati via web e accesso ai reports on line	16
8.1 Notifica della nuova spedizione e reports	16
8.2 Accesso al sito	16
8.3 Selezione del programma di interesse	17
8.3.1 Selezione del modulo usando il menù a tendina "Select a programme"	17
8.3.2 Guida alle differenti icone	17
8.3.3 Selezione della distribuzione	17
8.4 Sezione Metodi/Protocolli & Reports	18
8.4.1 Inserimento dati	18
8.4.2 Analisi e raccolta dei dati	18
8.4.3 Report	19
8.5 Uscire dal sistema	19
9.0 Membri del Comitato Direttivo per gli schemi tecnici in patologia cellulare	19

## 1.0 INTRODUZIONE ALL'IMMUNOISTOCHEMICA & ISH

L'External Quality Assessment Scheme per l'Immunostochimica fu fondato nel 1985 Gerry Reynolds all'ospedale Mount Vernon, Middlesex. Nel 1988 lo schema è stato riconosciuto dal Dipartimento della Salute britannico e da allora è conosciuto come UK National External Quality Assessment Scheme per l'Immunostochimica (UK NEQAS-ICC), recentemente è stata aggiunta l'IBRIDAZIONE FLUORESCENTE IN SITU (ISH). Attualmente UK NEQAS-ICC & ISH offre 7 differenti moduli di immunostochimica ad intervalli di circa 3 mesi. Secondo i seguenti schemi:

- MODULO 1: General Pathology
- MODULO 2: Breast Pathology (recettori ormonali)
- MODULO 3: Breast Pathology (HER-2 Immunostochimica)
- MODULO 4: Lymphoid Pathology
- MODULO 5: Neuropatology
- MODULO 6: Cytopatology
- MODULO 7A: Alimentary Tract Pathology (Pilot) – GIST (CD117, DOG-1)
- MODULO 7B: Alimentary Tract Pathology – HNPCC (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2)
- MODULO 8: HER2 Gastrico
- MODULO 9: HER2 Mammario (interpretative e tecnico)

I dettagli di ciascun modulo vengono descritti nelle pagine successive.

**L'Ibridazione fluorescente in-situ** è diventata ora il maggior strumento per la patologia cellulare e il Dott. John Barlett guida il modulo ISH EQA per HER-2.

## 2.0 IMMUNOISTOCHEMICA

### 2.1 Procedura di valutazione

A ogni distribuzione vengono spediti ai laboratori sezioni di tessuto fissate in formalina e incluse in paraffina (per lo schema della citologia cellule centrifugate e fissate in alcol). I partecipanti possono scaricare i fogli delle istruzioni per ciascun modulo dal sito UK NEQAS. Generalmente viene richiesto di rilevare 2 differenti antigeni (1 per le patologie mammarie) sui vetrini ricevuti dalla UK NEQAS e di rispedire il preparato migliore insieme ad uno "in house" (che serve come controllo) processato per lo stesso marcatore. Per molti moduli uno degli antigeni richiesti è ripetuto per un periodo di 12 mesi e serve come "gold standard". Questo permette ai partecipanti di apportare le modifiche raccomandate se la qualità dei preparati è valutata sotto gli standards e verificare i miglioramenti tecnici nella spedizione successiva.

#### Servizio di subappalto

UK NEQAS ICC& ISH ha diversi fornitori per fornire i materiali di controllo ai partecipanti. I fornitori sono organizzazioni pubbliche e private britanniche e non. Tutto il materiale, prima di essere distribuito, viene validato dalla UK NEQAS; questo servizio è affidato a laboratori competenti e accreditati. Il materiale non viene fornito ai partecipanti da terzi e la UK NEQAS si assume la responsabilità dei subcontratti e dei service.

Ai partecipanti viene inoltre richiesto di completare un questionario on line fornendo brevi dettagli sul metodo e sugli anticorpi utilizzati. I vetrini recanti un codice di laboratorio unico (per favorire l'anonimato) vengono successivamente valutati da un pool di esperti formati da un biomedico senior o da un clinico o da un consulente di istopatologia.

### 2.2 Interpretazione dei risultati ottenuti

#### 2.2.1 Interpretazione dei risultati ottenuti (escluso HER-2 ICC)

Ogni assistente può assegnare un voto sino a 5 (esclusi i moduli per patologia mammaria HER-2 ICC e ISH) usando per ciascun antigene le linee guida. Si può così raggiungere un punteggio massimo di 20. Viene considerato un livello soddisfacente un punteggio maggiore di 12/20. Un risultato "borderline"(tra 10 e 12/20) indica che alcune informazioni possono essere ottenute dal vetrino e la qualità della colorazione è "sub ottimale". Infine se il punteggio è inferiore a 10 /20 indica una tecnica non adatta a dimostrare l'antigene richiesto.

La tabella sottostante illustra le linee guida usate dagli assistenti per assegnare i punteggi.

Punteggio	Colorazione osservata
0	Nessun vetrino spedito
1/2	Anticorpo non rilevato o rilevazione molto debole, risultati falsi positivi o falsi negativi, colorazione non specifica o inappropriata; colorazione non interpretabile; eccessivo danno nella morfologia; eccessiva colorazione con ematosillina
3	Debole rilevazione dell'anticorpo richiesto. Eccessivo background, colorazione diffusa, colorazione con ematosillina scarsa, debole o eccessiva.
4/5	Buona/eccellente rilevazione degli anticorpi richiesti

Nota: i voti vengono anche diminuiti per motivi spiegati nel report individuale come ad esempio: bassa qualità del tessuto di controllo in house, inclusa inadeguata scelta/bassa qualità del tessuto di controllo, scarsa/inadeguata fissazione, morfologia delle cellule danneggiata (eccessivo recupero)

**Tabella 1:** linee guida usate il punteggio dei principali moduli di patologia (esclusi HER2 IHC & ISH)

### 2.2.2 Interpretazione dei risultati per il modulo HER-2 ICC

- I 4 assessors attribuiscono un'interpretazione alla colorazione della membrana a ciascuno dei 4 campioni (A-D) distribuiti.
  - Gli assessors attribuiranno un fino a 5 punti (vedi sotto); la somma dei punteggi dei 4 assessors può arrivare ad un punteggio massimo di 20.
  - La valutazione deriva dal punteggio attribuito indipendentemente dei 4 assessors usando un metodo adattato, inizialmente pensato dal Clinical Trial Assay in cui si tiene conto della percentuale di positività e dell'intensità di membrana.
  - A causa della natura delle linee cellulari, che mostrano una variabilità nella popolazione complessiva tra il 30% e il 90%, non si possono applicare i criteri di percentuale complessiva di colorazione a ciascuna linea cellulare. Per questa ragione le sezioni di riferimento vengono preparate per la colorazione ogni 50-53 sezioni tagliate usando kit HER2 ICC standardizzati (Dako Herceptest, Leica Oracle, e Ventana Pathway 4B5). Questo fornisce un punto di riferimento per valutare il livello previsto delle colorazioni dei vetrini forniti dai partecipanti.
- UK NEQAS ICC & ISH ha ideato un EQA algoritmo specifico per valutare sia linee cellulari che sezioni di tessuto, in modo da fornire molto velocemente un ulteriore feedback tecnico.

Linee cellulari	Livello di colorazione atteso	Livelli di colorazione accettabili	Descrizione del pattern usata dagli assessors
SK-BR-3	3+	solo 3+	Le linee cellulari 3+ hanno un'ampia gamma di colorazione completa della membrana mostrando un'intensa colorazione. Solo questo livello di colorazione della membrana è ritenuto accettabile per questa linea cellulare
MDA-MB-453	2+	2+ o 1+2 o 2+3 o 2+1 o 3+2+	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1+2+ o 2+1+: la colorazione è leggermente più debole del previsto con membrane che mostrano più 1+ rispetto a 2+(1+2+) o colorazione di membrana 2+ presente ma mostrando anche colorazione 1+ (2+/1+).</li> <li>• 2+/3+ o 3+/2+: la colorazione è leggermente più debole del previsto con membrane che mostrano più 2+ rispetto a 3+ (2+/3+) o colorazione di membrana 3+ presente ma mostrando anche colorazione 2+ (3+/2+).</li> </ul>
MDA-MB-175	1+	1+ o 0/1+ o 1+/0	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0/1+: colorazione è più verso il debole del 1+ ma ancora accettabile</li> <li>• 1+/0: colorazione è più verso il debole del 1+ ma ancora accettabile</li> </ul>
MDA-MB-231	0	0 o 0/1+ o 1+/0	le cellule mostrano una colorazione della membrana molto debole
<b>“U”/ punteggio non interpretabile:</b> gli assessors possono anche attribuire un punteggio “U” che indica che la linea cellulare/le sezioni di tessuto sono “non interpretabili”. Un punteggio di U/3+, o U/2+ o U/1+ o U/0, per le rispettive linee cellulari indica punteggi borderline non interpretabili indicando che la colorazione è interpretabile ma è richiesto un miglioramento tecnico			
Nota: gli assessors osservano ciascuna linea cellulare per vedere se la membrana cellulare e la colorazione sono indicate come previsto. Gli assessors abbasseranno il punteggio o il partecipante fallirà per le seguenti ragioni: morfologia danneggiata, eccessiva colorazione citoplasmatica/di fondo, eccessiva colorazione ematosilina, insufficiente colorazione della membrana, colorazione di membrana falsa positiva/negativa, eccessiva colorazione delle ghiandole normali (tessuto in house), morfologia danneggiata delle cellule o tessuti, bassa qualità del tessuto di controllo in house, inclusa inadeguata scelta/bassa qualità del tessuto di controllo, scarsa/inadeguata fissazione, morfologia delle cellule danneggiate (eccessivo recupero)			

Una volta che gli assessors hanno valutato l'interpretazione della membrana per ciascun campione NEQAS, viene attribuito un punteggio massimo individuale fino a 5 punti basato sull'interpretazione della colorazione della membrana e sulla qualità tecnica. Il punteggio complessivo deriva dalla somma dei punteggi degli assessors fino ad un massimo di 20, come mostrato sotto:

Punteggio e interpretazione	Interpretazione
<b>16-20/20 Eccellente</b>	Tutti i 4 assessors concordano che la colorazione è ai livelli attesi per tutti i 4 campioni distribuiti
<b>13-15/20 Accettabile</b>	Alcuni assessors notano qualche lieve problema tecnico, ma nel complesso la colorazione è idonea per l'interpretazione
<b>10-12/20 Borderline accettabile</b>	Globalmente i campioni hanno un'interpretazione borderline (ancora clinicamente rilevante) indicando che devono essere apportate implementazioni tecniche. I punteggi possono essere diminuiti per i seguenti motivi: colorazione di membrana maggiore o minore di quella attesa, colorazione citoplasmatica, danno della morfologia
<b>4-9/20</b>	Globalmente i campioni hanno una qualità inaccettabile per l'interpretazione clinica e devono essere apportate implementazioni tecniche. I punteggi possono essere diminuiti per i seguenti motivi:

	colorazione di membrana falsa positiva o falsa negativa. Eccessiva colorazione citoplasmatica, eccessivo danno della morfologia, eccessiva colorazione delle ghiandole normali
--	--

### 2.2.3 Interpretazione dei punteggi di valutazione per HER2 Gastrico ICC

- Il punteggio per le HER2 gastriche è basato sulle linee guida originali impostate da Hoffman e Ruschoff per le resezioni chirurgiche.
- Prima di spedire i vetrini, e a causa dell'eterogeneità dei tessuti gastrici, le sezioni di riferimento sono preparate e colorate ogni 25-28 sezioni seriali usando kits commerciali attualmente disponibili (Dako HerceptTest, Leica Oracle e Roche Ventana 4B5).
- I campioni vengono successivamente validati da ISH per fornire l'espressione genica ogni 25-28 sezioni seriali.
- La valutazione di ciascun dei 4 campioni (A-D) viene fatta indipendentemente con un microscopio multi-head: ogni assessor fornisce la propria interpretazione sulla colorazione della membrana.
- UK NEQAS ICC usa un criterio specifico per attribuire un punteggio alle sezioni di tessuto, in modo da fornire ai partecipanti ulteriori valutazioni tecniche (vedi tabella sotto):

colorazione attesa	Criteri di punteggio utilizzati da UK NEQAS ICC & ISH
<b>3+</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3+ come attesa</li> <li>• 2+/3+ o 3+/2+: la colorazione è leggermente più debole di quanto atteso con la membrana che mostra maggiormente colorazione 2+ piuttosto che 3+ (2+/3+) o colorazione 3+ presente ma con presenza di colorazione 2+ (3+/2+)</li> </ul>
<b>2+</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1+/2+ o 2+/1+: la colorazione è leggermente più debole di quanto atteso con la membrana che mostra maggiormente colorazione 1+ piuttosto che 2+ (1+/2+) o colorazione 2+ presente ma con presenza di colorazione 1 (2+/1+)</li> <li>• 2+/3+ o 3+/2+: la colorazione è leggermente più debole di quanto atteso con la membrana che mostra maggiormente colorazione 2+ piuttosto che 3+ (2+/3+) o colorazione 3+ presente ma con presenza di colorazione 2+ (3+/2+)</li> </ul>
<b>1+</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0/1+: colorazione è più verso il debole 1+ ma ancora accettabile</li> <li>• 1+/0: colorazione è più verso il debole 1+ ma ancora accettabile</li> </ul>
<b>Neg</b>	0/1+ o 1+/0: la colorazione mostra una colorazione molto debole
<b>“U”</b>	<p>Non interpretabile: indica che le linee cellulari o le sezioni di tessuto sono “non interpretabile” a causa dei seguenti motivi:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• U/x: borderline interpretabile. Un punteggio U/x per esempio U/3+ o U/2+ o U/1+ o U/0 indica che la colorazione è solo leggibile e sono richiesti miglioramenti.</li> </ul> <p>Qualsiasi altro punteggio alla membrana che viene assegnato è ritenuto non accettabile</p>

Una volta che gli assessor valutano l'interpretazione della membrana per ciascun campione NEQAS, viene attribuito un punteggio massimo individuale fino a 5 punti basato su l'interpretazione della colorazione della membrana e sulla qualità tecnica. Un punteggio minimo complessivo deriva dalla somma dei punteggi degli assessor fino ad un massimo di 20, come mostrato sotto:

Punteggio e interpretazione	Interpretazione
<b>16-20/20 Eccellente</b>	Tutti i 4 assessor concordano che la colorazione è ai livelli attesi per tutti i 4 campioni distribuiti
<b>13-15/20 Accettabile</b>	Alcuni assessor notano qualche lieve problema tecnico, ma nel complesso la colorazione è idonea per l'interpretazione
<b>10-12/20 Borderline accettabile</b>	Globalmente i campioni hanno un'interpretazione borderline (ancora clinicamente rilevante) indicando che devono essere apportate implementazione tecniche. I punteggi possono essere diminuiti per i seguenti motivi: colorazione di membrana maggiore o minore di quella attesa, colorazione citoplasmatica, danno della morfologia
<b>4-9/20</b>	Globalmente i campioni hanno una qualità inaccettabile per l'interpretazione clinica e devono essere apportate implementazione tecniche. I punteggi possono essere diminuiti per i seguenti motivi: colorazione di membrana falsa positiva o falsa negativa. Eccessiva colorazione citoplasmatica, eccessivo danno della morfologia, eccessiva colorazione delle ghiandole normali

## 2.3 Raccomandazioni per i tessuti in-house

### 2.3.1 Raccomandazioni per i tessuti in-house: tutti i moduli

- Per tutti i moduli, i tessuti in-house devono includere controlli appropriati per l'antigene richiesto. I voti possono essere abbassati a causa di controlli inappropriati.

- Per esempio
  - Modulo per il tratto alimentare GIST (GIST ed appendice)
  - Modulo per il tratto alimentare NHPCC (tumore ed appendice)
  - Modulo per linfoma (sezione di tumore e dove appropriato sezione di tonsilla)
  - Modulo per i recettori ormonali mammari (vedi sezione 2.3.2)
  - Modulo HER-2 mammario e gastrico ICC (vedi sezione 2.3.3)

### 2.3.2 Raccomandazioni per i tessuti in-house: modulo per i recettori ormonali mammari

• I tessuti di controllo in-house DEVONO essere costituiti da tessuto\* mammario composito, posto su un singolo vetrino come schematizzato di seguito:

- 1- >80% positività tumorale ad elevata intensità (Allred/Quick punteggio 7-8)
- 2- 30-70% positività tumorale con medio/bassa intensità (Allred/Quick punteggio 3-6)
- 3- Negatività tumorale, con normale positività delle ghiandole colorate (Allred/Quick 0)

\* Le linee cellulari sono un'alternativa accettabile, ma quelli inclusi nei kit commerciali non sono adatti

## 2.4. Report dei partecipanti

### 2.4.1 Reports individuali dei partecipanti

Alla fine di ogni distribuzione i partecipanti ricevono la comunicazione via e-mail che i report sono disponibili e scaricabili sul sito UK NEQAS ICC & ISH (vedi sezione 7.0)

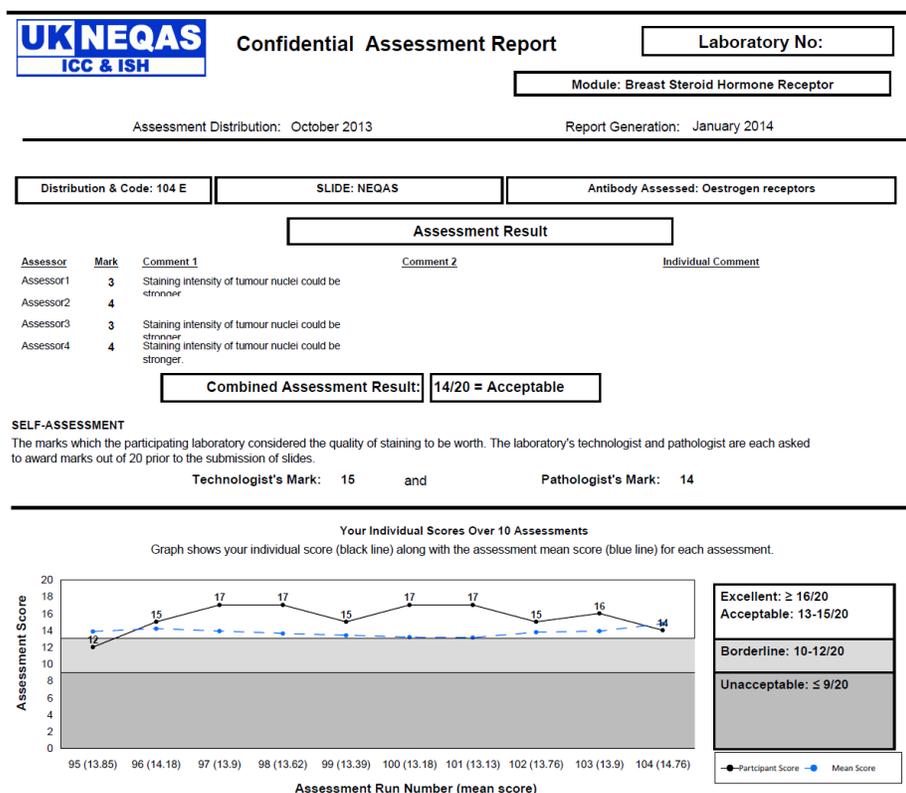
Nel report ci sono:

- A) punteggi individuali degli assistenti fino a 5 ed un punteggio totale fino a 20
- B) in alcuni casi gli assistenti danno anche come feedback un commento predefinito o un commento a testo libero (commenti individuali) per aiutare il partecipante a migliorare la propria metodica. Agli assessors viene sempre richiesto un commento per punteggi pari 3 o minori.

I reports riportano anche i punteggi di autovalutazione forniti dai laboratori partecipanti, che permettono una comparazione diretta con i punteggi dati dal team degli assessors UK Neqas.

Il report mostra anche una rappresentazione grafica delle media mobile delle performance dei partecipanti nelle ultime 10 distribuzioni (comparato col punteggio medio) di ciascun modulo.

Di seguito è rappresentato un esempio di report per il modulo dei recettori ormonali.

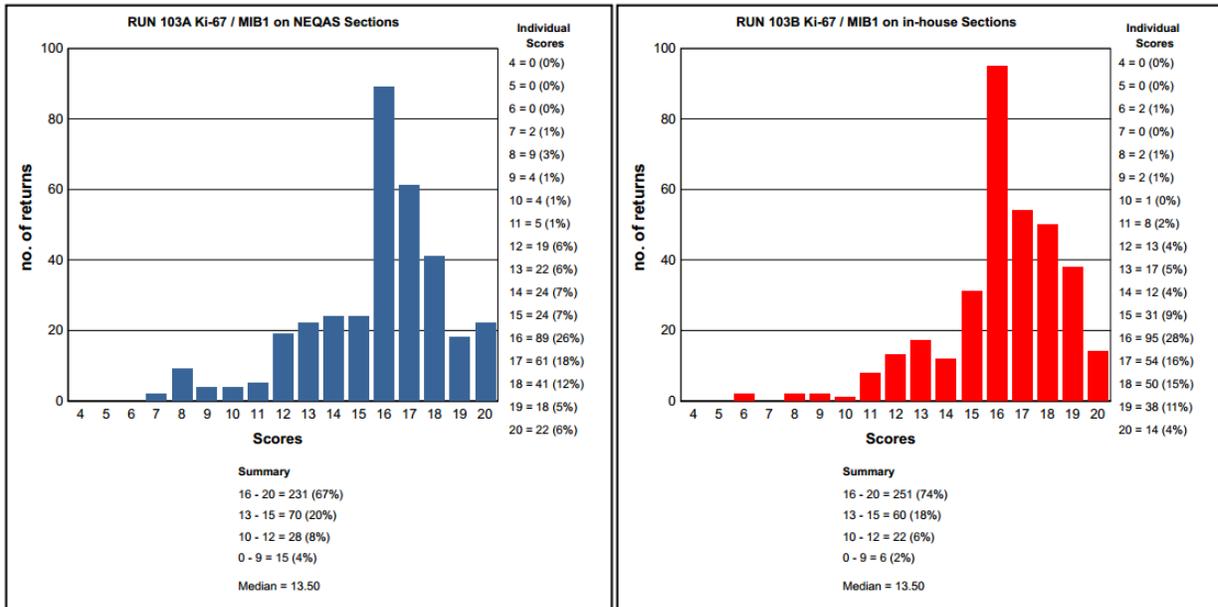


Esempio di report Individuale (modulo General pathology) dopo ciascuna distribuzione.

### 2.4.2 Report grafici & dati tecnici per ciascuna distribuzione

Dopo aver completato la valutazione, i partecipanti potranno accedere grafici e tabelle tecniche che mostrano gli anticorpi usati, i sistemi automatici, i metodi di recupero ecc. Inoltre, nella sezione “migliori metodi” vengono elencati i migliori metodi ottenuti dai dati tecnici dei partecipanti. Per ulteriori informazioni sull’accesso alle informazioni vedere sezione 7.4.3.

#### 2.4.2.1 Grafici/Tabella/Metodi migliori:



#### 2.4.2.2 Esempio di dati tecnici nel report

Le tabelle tecniche mostrano gli anticorpi scelti, i sistemi automatici e i metodi di recupero. I dati mostrano anche il numero di partecipanti che utilizzano un particolare metodo (N) e la percentuale (%) dei metodi che hanno ottenuto un punteggio maggiore di 12/20 per la maggior parte dei moduli

General Pathology Run: 103		
Primary Antibody : Ki-67 / MIB1		
Antibody Details	N	%
Cell Marque 275R-14/15/16/17/18 (SP6)	6	100
Dako IR/IS626 (clone MIB-1)	17	88
Dako M7187 (clone Ki-67 )	6	83
Dako M7240 ( clone MIB1)	190	87
Dako N1574 (clone Ki67)	1	100
Leica NCL-Ki67-MM1 (MM1)	2	50
Leica NCL-L-Ki67-MM1 (MM1)	2	100
Leica PA0118 (MM1)	7	100
Leica PA0230 (K2)	9	100
Leica RTU-Ki67-MM1 (MM1)	2	100
NeoMarkers RM 9106 (clone SP6)	11	64
Novocastra NCL-Ki67 (clone MM1)	38	84
Other	7	86
Vector VP K452 (clone MM1)	2	0
Vector VP-RM04 (clone SP6)	1	100
Ventana 760-2910	4	100
Ventana 790-4286 (clone30-9)	34	97

General Pathology Run: 103		
Ki-67 / MIB1		
Automation	N	%
BioGenex GenoMX 6000i	3	100
BioGenex Optimax	1	0
Dako Autostainer	7	100
Dako Autostainer Link 48	43	91
Dako Autostainer plus	9	89
Dako Autostainer Plus Link	10	90
LabVision Autostainer	5	40
Leica Bond Max	67	85
Leica Bond X	1	100
Leica Bond-III	41	80
Menarini - Intellipath FLX	4	75
None (Manual)	7	71
Other	2	100
Shandon Sequenza	4	100
Ventana Benchmark	7	100
Ventana Benchmark ULTRA	51	92
Ventana Benchmark XT	77	91
Ventana NexES	0	0

### 2.4.2.3 Esempio dei “migliori metodi” selezionati

#### 92 HER2 IHC - Method 1

Participant scored Acceptable(UK NEQAS Slide ) and Acceptable(control slide) using this method.

**Primary Antibody:** Dako HercepTest K5207 (poly) , 30 Mins, RT °C Prediluted

**Automator:** Dako Autostainer plus

**Method:** AS PER KIT

**Main Buffer:** AS PER KIT

**HMAR:** Dako PTLINK , Buffer: as per kit

**EAR:**

**Chromogen:** AS PER KIT , RT °C., Time 1: 10 Mins

**Detection:** Dako HerCep Test Auto'r (K5207) , 30 Mins, RT °C Prediluted

#### 92 HER2 IHC - Method 2

Participant scored Acceptable(UK NEQAS Slide ) and Acceptable(control slide) using this method.

**Primary Antibody:** Dako HercepTest K5207 (poly) , 30 Mins, 22 °C Prediluted

**Automator:** Dako Autostainer plus

**Method:** AS PER KIT

**Main Buffer:** AS PER KIT

**HMAR:** Water bath 95-98 OC, Buffer: as per kit

**EAR:**

**Chromogen:** AS PER KIT , 22 °C., Time 1: 10 Mins

**Detection:** Dako HerCep Test Auto'r (K5207) , 30 Mins, 22 °C Prediluted

### 2.4.2.4 Esempio di immagini selezionate

Selected Images showing Optimal and Sub-optimal Immunostaining

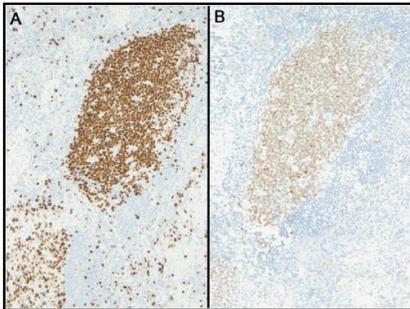


Fig 1. (A & B) Ki-67 staining in the UK NEQAS distributed tonsil section. (A) Optimal demonstration: The nuclear staining is strong and distinct in 80-90% of the germinal centre B-cells. Stained using Dako MIB-1 antibody, 1:100, PT link pre-treatment, pH9 buffer for 20 mins (B) weak staining with many of the cells expected to stain not demonstrated.

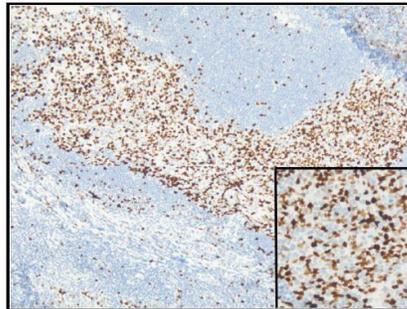


Fig 2. Sub-optimal staining of Ki-67 in the UK NEQAS tonsil section (compare to Fig 1A). Although the cells expected to stain are strongly demonstrated, the morphology of the cells has been damaged, most likely caused by over-pre-treatment. Stained using Novocastra MM1 clone, using Biocare Decloaking chamber and stained on a Dako Autostainer.

### 4.3 Giornale elettronico

Dopo ogni valutazione tutti i dati vengono raccolti in un giornale elettronico (E-Journal) che può essere scaricato dal sito ([www.ukneqasicc.ucl.ac.uk/neqasicc.shtml](http://www.ukneqasicc.ucl.ac.uk/neqasicc.shtml)) 1-2 settimane dopo il completamento della valutazione.

The screenshot displays the 'Run 103/32' report for 'Immunocytochemistry'. It includes a table of modules with their respective pass rates, a grid of immunostaining images (A, A', A'', B, B', B'', C, C', C''), and logos for Roche and Dako. The text 'Immunocytochemistry Improving Immunocytochemistry for Over 25 Years' is prominently displayed.

## 2.5 Laboratori non-UK

Allo schema partecipano attualmente laboratori provenienti da 50 differenti paesi e sono ben accette le partecipazioni di laboratori UK e non UK. In alcuni paesi i partecipanti sono un numero abbastanza consistente e di conseguenza ora vengono chiamati a giudicare anche assistenti stranieri.

## 2.6 Invio dello schema educativo

Una delle principali intenzioni dello schema è fornire informazioni utili su metodi e reagenti che permettano di migliorare la qualità dell'immunoistochimica. A tal fine, le principali tecniche utilizzate dai partecipanti sono raccolte in un database e successivamente tabulate per mostrare la proporzione dei partecipanti che utilizzano un reagente particolare che ottiene una colorazione accettabile. I risultati di queste analisi vengono pubblicati nel report nell'analisi di ciascuna distribuzione. Questi resoconti contengono inoltre foto a colori con dimostrazione ottimale degli antigeni valutati, esempi di metodi con punteggio alto e carte di frequenza che illustrano la distribuzione dei punteggi dei partecipanti per ciascuna distribuzione. (vedi sezione 2.4)

## 2.7 Aiuto ai partecipanti

I partecipanti che hanno difficoltà tecniche o richiedono informazioni su particolari anticorpi o reagenti possono contattare gli organizzatori dello schema o il responsabile dell'assistenza.

**In Italia ci si può rivolgere a CODEX srl tel 010661745-0106671491 Fax 0106967166 Email: [info@codexitalia.it](mailto:info@codexitalia.it)**

Si può richiedere la sostituzione di vetrini rotti contattando CODEX srl in Italia.

I contatti in Gran Bretagna sono i seguenti:

Organizzatore dello schema: **Sig. Keith Miller**, tel: 020 7679 6048, email: [k.miller@ucl.ac.uk](mailto:k.miller@ucl.ac.uk)

Responsabile dello schema: **Dott. Merdol Ibrahim**, tel 020 7679 8678, email: [merdol.Ibrahim@ucl.ac.uk](mailto:merdol.Ibrahim@ucl.ac.uk)

Assistente del responsabile dello schema **sig.ra Suzanne Parry**, tel 020 7554 8626, email: [s.parry@ucl.ac.uk](mailto:s.parry@ucl.ac.uk)

Responsabile dell'ufficio: **Sig.ra Ai Lin Rhodes**, tel 020 7554 8679, email: [rmkdalr@ucl.ac.uk](mailto:rmkdalr@ucl.ac.uk)

Responsabile della qualità **sig. Neil Bilbe**, 020 7554 8677, email: [n.bilbe@ucl.ac.uk](mailto:n.bilbe@ucl.ac.uk)

## 2.8 Procedura di ricorso & assistenza da UK NEQAS-ICC & ISH

I partecipanti che non sono soddisfatti della valutazione ricevuta possono far ricorso, i vetrini saranno valutati una seconda volta. La seconda valutazione viene effettuata al primo incontro degli assistenti dopo la richiesta della nuova valutazione. Se i punteggi della seconda valutazione sono differenti da quelli originari verrà spedito il report con il punteggio e il database modificati accompagnati da una lettera di spiegazione.

Importante: verranno riesaminati i punteggi dei vetrini originali. La Uk Neqas non può riassegnare o aggiornare i punteggi ottenuti con i nuovi vetrini.

## 2.9 Procedura di reclamo

I reclami devono essere spediti all'organizzatore dello schema Sig. Keith Miller, Dept of Histopathology, UCL Medical School, Rockefeller Building, University St, London WC 1E 6JJ

## 2.10 Incontri scientifici e seminari

UK NEQAS-ICC organizza incontri scientifici e seminari. Insieme al programma scientifico questi permettono di disquisire sull'immunoistochimica e sulla VEQ con altri partecipanti e con gli assistenti UK NEQAS-ICC.

## 2.11 Workshop pratici

Vengono regolarmente offerti workshop pratici in associazione con l'università di Westminster, Londra, UK e loro Biomedical Science Short\_Courses Unit. Siccome i reagenti e il materiale per queste esercitazioni è costoso, l'Università richiede una tassa per questo servizio. Ulteriori informazioni si possono ricevere contattando il Dott. Tony Madgwick dell'Università di Westminster tel +44(0)20 7911 5000, email: [madgwuia@wmin.ac.uk](mailto:madgwuia@wmin.ac.uk)

## 2.12 Registrazione delle performance a fine anno/ Certificato di partecipazione

Al termine dell'anno lo schema fornisce ai partecipanti un certificato di partecipazione con il riassunto dei risultati ottenuti durante l'anno. Il certificato può essere scaricato dal sito UK Neqas.

## 2.13 Riassunto dei vantaggi della partecipazione all'UK NEQAS-ICC & ISH

- 4 spedizione all'anno
- fornitura di moduli specifici per necessità specifiche del partecipante
- valutazione di 2 antigeni per spedizione (1 per lo schema della mammella e gastrico) su vetrini UK NEQAS e "in house"
- report (punteggi) con valutazioni e commenti costruttivi quando la qualità di colorazione è sub-ottimale (3 punti, o meno, attribuiti da 1 o più assors)
- grafici riassuntivi in ciascun report che mostrano le performance ottenute nel tempo
- certificato di partecipazione

- aiuto in linea per i partecipanti
- incontri scientifici e seminari
- newsletter degli schemi che includono:
  - carte di frequenza che illustrano la distribuzione degli errori dei partecipanti per ciascuna distribuzione
  - stampe a colori che mostrano la dimostrazione ottimale degli antigeni
  - esempi di metodi con punteggio alto
  - tabelle dei principali anticorpi e reagenti immunochimica usati dai partecipanti

#### 2.14 Responsabilità del partecipante

Come partecipante alla veq UK NEQAS si hanno alcune responsabilità:

- informare la UK NEQAS ICC & ISH di qualunque cambio di referente e dei dettagli del contatto; senza un indirizzo di posta elettronica valido il partecipante non riceve le informazioni importanti
- assicurarsi che i vetrini siano confezionati in modo da evitare rotture e la conseguente non valutazione e spedirli nelle scatole con le etichette dei colori relativi a diversi moduli per favorire il riconoscimento
- assicurarsi che i vetrini siano etichettati in modo chiaro e cancellando la propria identità dove è necessario
- inserire i risultati entro la data di chiusura dell'esercizio – risposte inviate in ritardo verranno “registrate”
- il mancato completamento del repertorio degli anticorpi equivale alla mancata risposta (punteggio 0) e quindi ad una scarsa valutazione
- devono essere inseriti nel sito la conferma di ricezione dei vetrini, i propri protocolli e i dati tecnici
- fornire le proprie procedure includendo la processazione dei vetrini e l'interpretazione dei risultati
- la UK NEQAS cerca di garantire la più ampia gamma possibile di markers per ciascun modulo ma non può coprire tutti gli antigeni o i tipi di tessuto.
- ogni volta che si contatta la UK NEQAS va indicato il proprio codice di laboratorio

#### 2.15 Politica della riservatezza

UK NEQAS ICC & ISH mantiene i risultati delle performance dei partecipanti riservati.

#### 2.16 Anticorpi non disponibili

**N.B. Se un anticorpo non è disponibile per una determinata distribuzione:**

- informare UK NEQAS ICC & ISH
- dove è possibile verrà suggerito un marcatore alternativo
- selezionare l'opzione “Antibody Not Stocked” nel sito
- non inserire i dati sul sito
- inserire i dati sulla versione cartacea che si può scaricare nella sezione dei metodi alla voce “instructions”, spedire la versione cartacea e i vetrini alla UK NEQAS ICC & ISH
- nell'area “self Assessment” del metodo indicare l'anticorpo usato in alternativa a quello richiesto (vedi figura sotto)

- UK NEQAS ICC & ISH può far riferimento al vostro repertorio degli anticorpi per un controllo incrociato per verificare che avete dichiarato di non disporre di tale anticorpo.
- ci si aspetta che tutti i laboratori abbiano a disposizione gli anticorpi “Gold standard” elencati nel manuale
- se un partecipante contatta UK NEQAS ICC & ISH per chiedere un'alternativa agli anticorpi gold standard, la UK NEQAS ICC & ISH non è in grado di fornirli oppure si informerà perché il laboratorio non utilizza quel particolare anticorpo.

I vetrini verranno trattati e valutati come quelli che utilizzano gli anticorpi originali e verranno conteggiati ai fini della registrazione delle performance del partecipante. E' importante quindi non scegliere l'anticorpo senza contattare la UK NEQAS ICC & ISH siccome solo i marcatori utili possono essere valutati.

## 2.17 Colori di moduli e vetrini UKNEQAS ICC & ISH

Modulo	Colore del vetrino	
General pathology	Blu	Le etichette sui vetrini possono corrispondere o non corrispondere agli stessi colori dei vetrini. Ogni cambio al questa listi viene indicato nella lettera che accompagna i vetrini
Breast Hormonal	Rosa	
Neuropathology	Giallo	
Lymphoid Pathology	Verde	
Cytology	Pesca	
GIST	Pesca	
Lynch Syndrome/HNPCC	Pesca	
Gastric HER2	Lavanda	
Breast HER2 IHC & ISH	Bianco	

## 3 MODULI DI IMMUNOISTOCHEMICA

Attualmente i laboratori possono partecipare a 6 differenti moduli di immunohistochimica (più un modulo pilota), scegliendo in base alla propria specializzazione. I moduli sono i seguenti:

### MODULO 1: patologia generale COD: NEQGEPATH

Questo modulo prevede 4 invii all'anno con 2 antigeni per ciascuna distribuzione. Uno di questi antigeni è richiesto ad ogni invio (gold standard), mentre l'altro è diverso ad ogni spedizione.

La valutazione si baserà su entrambe le sezioni (UK Neqas e "in house"). L'obiettivo è di assicurare che i markers utilizzati per la valutazione siano quelli usati dalla maggior parte dei partecipanti. Gli antigeni che devono essere testati verranno scelti dalla lista sottostante

#### Gli antigeni "Gold standard" per il 2014-2015 sono i markers CK7 e CK20

#### Markers epiteliali

Citocheratina ad ampio spettro  
Antigene di membrana epiteliale (EMA)

#### Markers endoteliali

I partecipanti possono usare i seguenti:  
Von Willebrand Factor (antigene connesso a FVIII),  
CD31, CD34

#### Markers muscolari

Actina del muscolo liscio  
Desmin

#### Markers urologici e prostatici

Antigene prostatico specifico  
LP34 o Beta 34E12  
Citocheratina 7  
Citocheratina 20  
Citocheratina 5 o Citocheratina 5/6  
P63

#### Markers neuroendocrini

Cromogranina  
Enolasi neuronale specifica (NSE)  
Synaptophysina  
CD56

#### Markers mesoteliali

I partecipanti possono usare i seguenti:  
Antigene Carcinoembrionale (CEA), AUA-1  
Ber-EP4, HBME-1, Citocheratina 5/6, Carletina  
Trombomodulina

#### Markers per melanoma (escluso S-100)

HMB45  
Melanina A

#### Markers linfoidi

Markers di cellule T es. CD3  
Markers di cellule B es. CD20, CD 79a  
Antigene comune leucocitario (CD45)  
CD68

#### Miscellanea

Tireoglobulina  
Ki-67 o MIB 1  
Gonadotropina corionica umana (HCG)  
Calcitonina  
CD56  
TTF1  
WT1

### MODULO 2: Patologia Mammaria (recettori ormonali) Cod: NEQBRPATH

Questo modulo prevede 4 invii all'anno con 1 antigene per ciascuna distribuzione. L'antigene deve essere testato su vetrini preparati da UK NEQAS ICC & ISH e vetrini in house, pre-colorati e colorati da UK NEQAS ICC & ISH per il confronto.

#### Il "Gold standard" per il 2012-2013 verrà scelto tra (ER) e progesterone (PR)

### MODULO 3: Patologia Mammaria HER-2 HIC: Cod: NEQHERIHC

Questo modulo prevede 4 invii all'anno per la valutazione di HER-2 su vetrini preparati da UK NEQAS (linee cellulari fissate in formalina e incluse in paraffina) e su vetrini in house.

**MODULO 4: Patologia Linfatica Cod: NEQLYPATH**

Prevede 4 invii con la valutazione di 2 antigeni per ogni invio. L'antigene "gold standard" viene richiesto ad ogni invio.

I 4 antigeni sono scelti dalla lista seguente (ma non rivelati prima che la distribuzione venga generata). La ricerca degli antigeni dovrà essere eseguita sulle sezioni preparate da UK NEQAS e sulle sezioni in house. L'obiettivo è di assicurare che i markers utilizzati per la valutazione siano quelli usati dalla maggior parte dei partecipanti.

**L'antigene "Gold standard" per il 2014-2015 è CD5**

Alk-1	CD43
Bcl-2	CD56
Bcl-6	CD61
CD1a	CD68
CD2	CD79a
CD4	CD138
CD5	Cyclin D1
CD8	IgD
CD10	IgM
CD15	Ig catene leggere
CD21	Ki-67/MIB1
CD20	PAX-5
CD23	Terminal deoxynucleotidyle transferase (Tdt)

**MODULO 5: Neuropatologia Cod: NEQNEPATH**

I vetrini vengono spediti 4 volte all'anno ad ogni invio devono essere testati 2 antigeni. L'antigene "Gold standard" viene richiesto ad ogni invio.

Gli antigeni, a parte il "Gold standard", vengono scelti dalla lista seguente che è studiata in modo selezionare gli antigeni più utilizzati dai partecipanti

**L'antigene "Gold standard" per il 2014-2015 è MIB1****Marker neurologici & neuroendocrini**

Proteine del Neurofilamento (NFP),	Tau-protein
Proteina Acidica Gliale Fibrillare (GFAP)	Ki-67 / MIB1
Enolasi Neurone Specifica (NSE)	Proteina Tau
Cromogranina	IDH
Proteina S-100	
Ormone della crescita (GH)	
Ormone Adrenocorticotropo (ACTH)	
Ormone Follicolo Stimolante (FSH)	
Ormone Luteinizzante (LH)	
Ormone Tiroide Stimolante (TSH)	
Prolattina	
Beta-amiloide	
Sinaptofisina	

**Marker per la malattie metastatiche**

Citocheratina ad ampio spettro
Citocheratina 7
Citocheratina 20
Antigene Comune Leucocitario (LCA)
Antigene Prostatico Specifico
Fosfatasi Acida
Desmina
EMA
CD34
CD68

**MODULO 6: Citopatologia Cod: NEQCYPATH**

Anche questo schema prevede 4 invii all'anno con la valutazione di 2 antigeni testati su preparazioni cellulari citocentrifugate inviate dalla UK Neqas e su di preparazioni citologiche "in house".

L'antigene "gold standard" viene richiesto ad ogni invio mentre l'antigene che varia è scelto dalla lista seguente

**L'antigene "Gold standard" per il 2014-2015 è CD45**

<b>Lymphoma Markers</b>	<b>Adenocarcinoma</b>
CD3	EMA/HMFG-2
CD20	Citocheratina
CD45	Ki67

### Mesothelioma Markers

HBME-1  
Calretinina  
Trombomodulina  
Cytokeratina 5/6

### Melanoma Markers

S-100  
HMB-45  
Melan A

### MODULO 7: Patologia del tratto alimentare

In risposta alla richiesta sempre maggiore di anticorpi specifici per il tumore dello stroma gastro-intestinale (GIST) e per il cancro colon rettile ereditario non polipoide (NHPCC) sono nati due moduli separati, ognuno prevede 4 invii all'anno. Questi schemi sono diventati effettivi e non più pilota.

Per il modulo GIST viene richiesto il CD117 come "gold standard", il secondo anticorpo verrà scelto tra: DOG-1, CD34; SMA; S100 e Desmina.

Per la sindrome di Lynch viene chiesto di accoppiare gli anticorpi MLH1 & PMS2 e MSH2 & MSH6 due volte l'anno

L'iscrizione ai 2 moduli avviene separatamente.

### Modulo 7A: tumore dello stroma gastro-intestinale (GIST)

- "gold standard" CD117
- anticorpi secondari DOG-1 CD34; SMA; S100 e Desmina.

### Modulo 7B: sindrome di Lynch

MLH1 & PMS2 o MSH2 & MSH6

### MODULO 8: HER-2 Gastrico

Questo modulo prevede 4 invii all'anno per la valutazione di HER-2 su vetrini preparati da UK NEQAS e su vetrini in house. UK NEQAS fornisce sezioni di tumore gastrico che mostrano diversi livelli di espressione della proteina di membrana.

## 4.0 IBRIDAZIONE *IN-SITU*

### 4.1 Introduzione

UK Neqas per l'ibridazione *in-situ* (UK NEQAS-ISH) è coordinato dal Dott. Ibrahim Merdol (manager del modulo UK NEQAS ICC).

Lo schema HER2 ISH prevede 4 invii all'anno.

Attualmente UK NEQAS ICC & ISH offre un modulo HER-2 ISH (ibridazione in situ fluorogenica e cromogenica) INTERPRETATIVO totalmente accreditato e un modulo HER-2 ISH TECNICO pilota, spedita insieme al modulo interpretativo. La fattibilità della valutazione tecnica dell'ibridazione in situ fluorogenica è ancora da verificare.

#### Importante

UK NEQAS sta cercando di integrare il modulo interpretativo e quello tecnico in un unico modulo. Ulteriori dettagli verranno forniti nel corso del 2014-2015

### 4.2 Modulo HER-2 ISH interpretativo

#### 4.2.1 Procedura di valutazione del modulo HER-2 ISH interpretativo

Ad ogni invio vengono spedite ai partecipanti linee cellulari fissate in formalina e incluse in paraffina, scelte da un pannello con uno status HER2 noto. Ai laboratori viene richiesto di dimostrare l'amplificazione del gene HER2 attraverso la determinazione della ratio HER2/Cromosoma 17 oppure del numero di copie di HER2 (in accordo con le linee guida UK NEQAS HER2 ISH);

In questo modulo, vengono spediti diversi pannelli di campioni con tumore mammario per assicurare la copertura dei range diagnostici più critici. Ai partecipanti viene chiesto di completare un breve questionario riguardante i dettagli della sonda e del metodo utilizzati.

I risultati ottenuti da ciascun laboratorio verranno confrontati con quelli ottenuti, usando lo stesso campione, da un pannello di laboratori di riferimento inglesi e verrà utilizzato uno status HER2 noto. I risultati saranno valutati, per ciascuno dei 4 pellets, in relazione all'accuratezza con cui i risultati dei laboratori riflettono quelli ottenuti dai laboratori di riferimento e tenendo conto della variabilità accettabile tra un osservatore e l'altro. Ogni assessor rivede i risultati dei laboratori di riferimento e determina i range per definire "appropriato" (entro limiti tecnici accettabili), "accettabile" (risultati al di fuori dei limiti normali ma marginalmente), "inappropriato" (al di fuori dei limiti accettabili di variazione) e "misdiagnosis" (risultati al di fuori dei limiti accettabili portando ad una errata diagnosi dello status HER-2) I risultati dei

partecipanti verranno valutati come “appropriato” (entro i limiti accettabili, 3 punti), “accettabile” (risultati al di fuori dei limiti normali ma marginalmente, 2 punti), “inappropriato” (al di fuori dei limiti accettabili di variazione, 1 punto) “misdiagnosis” (risultati al di fuori dei limiti accettabili portando ad una errata diagnosi dello status HER-2, 0 punti)

#### 4.2.2 Interpretazione del punteggio ottenuto

- 1- livello di performance “Appropriato”: quando i 4 risultati sono dentro il range fornito da laboratori di riferimento. Indicato da un punteggio di 12/12.
- 2- livello di performance “Accettabile”: dove le performance rientrano in un punteggio paria a +/- 10% rispetto ai risultati dei laboratori di riferimento. In questo caso 1 o 2 campioni sono stati valutati come “Accettabili” o 1 campione era “Inappropriato”. Indicato da un punteggio di 9-11/12.
- 3- livello di performance “Inappropriato”: dove il partecipante ha raggiunto un punteggio > (+/-) 10% rispetto ai risultati dei laboratori di riferimento. In questo caso 2 o più linee cellulari erano “Inappropriate” o 3-4 campioni erano “Accettabili”. Indicato da un punteggio di  $\leq 8/12$
- 4- livello di performance “Inappropriato” verrà attribuito se uno dei campioni ha ottenuto in punteggio “misdiagnosis”

#### 4.4 Laboratori non-UK

Lo schema accoglie attualmente membri da 50 differenti paesi e sono ben accette le partecipazioni di laboratori UK e non UK. In alcuni paesi i partecipanti sono un numero abbastanza consistente e di conseguenza ora ci sono alcuni assistenti stranieri che sono chiamati a giudicare.

#### 4.5 Invio dello schema educativo

Una delle principali intenzioni dello schema è fornire informazioni utili su metodi e reagenti che permettano di migliorare la qualità dell’ibridazione *in situ*. A tal fine, le principali tecniche utilizzate dai partecipanti sono raccolte in un database e successivamente tabulate per mostrare la proporzione dei partecipanti che utilizzano un particolare reagente che ottiene una valutazione accettabile. I risultati di queste analisi vengono pubblicati nel report nell’analisi di ciascuna distribuzione. Questi reports contengono inoltre foto a colori con dimostrazione ottimale degli antigeni valutati, esempi di metodi con punteggio alto e carte di frequenza che illustrano la distribuzione dei punteggi dei partecipanti per ciascuna distribuzione.

#### 4.6 Registrazione delle performance a fine anno/ Certificato di partecipazione

Al termine dell’anno lo schema fornisce ai partecipanti un certificato di partecipazione con il riassunto dei risultati ottenuti durante l’anno. Il certificato può essere scaricato dal sito UK Neqas.

#### 4.7 Modulo Pilota HER2-ISH tecnico (pilota)

La valutazione viene effettuata attorno ad un microscopio multi-head con cui ciascun vetrino viene valutato indipendentemente dai 4 assessors i quali daranno un voto sino a 5. I punteggi vengono sommati fino a raggiungere un massimo di 20, i punteggi sono accompagnati da un commento.

Vengono valutate individualmente la qualità della colorazione ISH ma non verranno contate le sonde in quanto questo verrà fatto nella valutazione dello schema interpretativo

Punteggi individuali degli assessors (solo CISH)	Punteggi e risultati totali (CISH & FISH)	Interpretazione del punteggio
0	0	Vetrino non inviato per la valutazione
1&2	4-9/20 <b>Non accettabile</b>	Le linee cellulari e/o i tessuti in house non accettabili per l’interpretazione, con almeno 3 di 4 assessors che indicano che ci sono problemi nell’ibridazione che possono essere dovuti a : eccessiva/debole colorazione del nucleo, bassa qualità della sonda di ibridazione, mancanza del n° di copie HER-2/CEP1 o eccessiva colorazione di sfondo
3	10-12/20 <b>Borderline</b>	Le linee cellulari e/o i tessuti in house non sono interpretabili, con 2 dei 4 assessors che indicano che ci potrebbe essere un miglioramento rispetto a: eccessiva/debole colorazione del nucleo, livello della sonda di ibridazione o eccessiva colorazione di sfondo
4-5	13-15/20= <b>accettabile</b> 16-20/20= <b>accettabile</b> <b>Eccellente</b>	Le linee cellulari e/o i tessuti in house mostrano standard di colorazione buono/molto buono e adatto per l’analisi interpretativa

#### 4.8 Modulo HER-2 ISH interpretativo e tecnico per la risoluzione dei problemi

La combinazione dei risultati del modulo HER2 ISH “Interpretativo” e “Tecnico” permette ai laboratori un ulteriore risoluzione dei loro problemi tecnici come mostra la guida sottostante:

Risultato interpretativo	Risultato tecnico	
Appropriato/Acceptabile	Accettabile	Le linee cellulari mostrano un buona colorazione standard e sono state interpretate correttamente
Inaccettabile	Accettabile	Le linee cellulari mostrano un buona colorazione standard <b>ma</b> ci sono problemi nell’interpretazione es: il numero di copie HER2 e/o CEP17 sovrastimate/sottostimate. <b>Si raccomanda di rivedere i criteri di punteggio/conteggio</b>
Appropriato/Acceptabile	Inaccettabile	Le linee cellulari sono inaccettabili per l’interpretazione e ci dovrebbe essere cautela nell’interpretazione di questi vetrini. <b>Si raccomanda di ottimizzare il metodo (kit/saggio) o se si utilizza un kit standardizzato seguire esattamente le istruzioni. L’interpretazione, sebbene appaia corretta, potrebbe portare ad un’interpretazione non corretta dei casi clinici</b>
Inaccettabile	Inaccettabile	Le linee cellulari sono inaccettabili per colorazione tecnica ed interpretazione. <b>Questa situazione porta molto probabilmente ad una non corretta interpretazione dei casi clinici.</b> <b><u>Se c’è una persistente bassa performance i laboratori dovrebbero: chiedere assistenza ai produttori di kit, chiedere assistenza alla UK NEQAS o ai colleghi, rivalidare i protocolli (in modo retrospettivo e prospettivo), rivedere i criteri di punteggio, inviare i casi clinici a centri di riferimento per confermare i risultati.</u></b>

#### 4.9 Aiuto ai partecipanti

I partecipanti che hanno difficoltà tecniche o richiedono informazioni su particolari anticorpi o reagenti sono incoraggiati a contattare gli organizzatori dello schema o il responsabile dell’assistenza.

**In Italia ci si può rivolgere a CODEX srl tel 010661745-0106671491 Fax 0106967166 Email: info@codexitalia.it**

Si può richiedere la sostituzione di vetrini rotti contattando l’ufficio UK NEQAS-ICC o CODEX srl in Italia.

I contatti in Gran Bretagna sono i seguenti:

Organizzatore dello schema: **Dr John Bartlett**, tel: 0131 777 3584, email: [jbartlett@staffmail.ed.ac.uk](mailto:jbartlett@staffmail.ed.ac.uk)

Organizzatore dello schema: **Sig. Keith Miller**, tel: 020 7679 6048, email: [k.miller@ucl.ac.uk](mailto:k.miller@ucl.ac.uk)

Responsabile dello schema: **Dott. Merdol Ibrahim**, tel 020 7679 8678, email: [merdol.Ibrahim@ucl.ac.uk](mailto:merdol.Ibrahim@ucl.ac.uk)

Responsabile dell’ufficio: **Sig.ra Ai Lin Rhodes**, tel 020 7554 8679, email: [rmkdalr@ucl.ac.uk](mailto:rmkdalr@ucl.ac.uk)

Personale dell’ufficio: **Sig.ra Maricarmen Perez**, 020 7554 8677

#### 4.10 Procedura di ricorso & assistenza da UK NEQAS-ICC & ISH

I partecipanti che non sono soddisfatti della valutazione ricevuta possono far ricorso, i vetrini saranno valutati una seconda volta. La seconda valutazione viene effettuata al primo incontro degli assistenti dopo la richiesta della nuova valutazione. Se i punteggi della seconda valutazione sono differenti da quelli originari verrà spedito il report con il punteggio e il database modificati accompagnati da una lettera di spiegazione.

#### 4.11 Procedura di reclamo

I reclami devono essere spediti all’organizzatore dello schema Sig. Keith Miller, Dept of Histopathology, UCL Medical School, Rockefeller Building, University St, London WC1E 6JJ

#### 4.12 Incontri scientifici e seminari

UK NEQAS-ICC organizza incontri scientifici e seminari. Insieme al programma scientifico questi permettono di disquisire sull’immunoistochimica e sulla VEQ con altri partecipanti e con gli assistenti UK NEQAS-ISH.

#### 4.13 Workshop pratici

Vengono regolarmente offerti workshop pratici in associazione con l’università di Westminster, Londra, UK e loro Biomedical Science Short\_Courses Unit. Siccome i reagenti e il materiale per queste esercitazioni è costoso, l’Università richiede una tassa per questo servizio. Per ulteriori informazioni contattare il Dott. John Bartlett.

#### 4.14 Riassunto dei vantaggi della partecipazione all’UK NEQAS-ICC & ISH

Come per l’immunoistochimica. Vedere pag 8

#### 4.15 Registrazione per la partecipazione

I laboratori che desiderano partecipare all'UK NEQAS-ICC sono invitati a leggere la descrizione dettagliata. Ulteriori informazioni e guide, se richieste, possono essere ottenute contattando la CODEX srl a Genova Tel 0106671491-010661745 Fax 0106967166 Email: info@codexitalia.it

#### 4.16 Moduli

##### Modulo 1: HER-2 ISH modulo interpretativo

##### Modulo 1b: HER-2 ISH modulo tecnico

N.B. Il modulo tecnico viene spedito insieme al modulo interpretativo e non ci può abbonare separatamente

#### Lista della Commissione giudicatrice

Dott. John Bartlett (Edimburgo), Prof. Ian Ellis (Nottingham), Prof. Bharat Jasani (Cardiff), Prof. Elaine Kay (Dublino), Prof. Andy Handby (Leeds), Dott.ssa Jane Starczynski (Toronto) e Dott.ssa Silvana Di Palma (Guildford), Dott. Mike Morgan (Cardiff), Dott Tony O'Grady (Dublino).

## 5.0 NUOVI MODULI

### 5.1 EML4-ALK NSCLC MODULO PILOTA

Data di inizio: Agosto 2014

Lo scopo di questo modulo è di testare EML4K-ALK nelle cellule di carcinoma non a piccole cellule (NSCLC), che provvederà a fornire informazioni approfondite e cioè se i laboratori possono identificare correttamente le mutazioni ALK in campioni di controllo precedentemente testati per l'espressione di EM4-ALK utilizzando le metodiche scelte (FISH e/o IHC).

### 5.2 Modulo interpretativo basato sul web

Data di inizio: da determinarsi

Stiamo pianificando un modulo educativo interamente basato sul web in cui ci sono i vetrini scannerizzati. Inizialmente ci saranno vetrini per i recettori ormonali, mammari HER-2 IHC & ISH e gastrici HER2 IHC

### 5.3 CMET nei polmoni

Data di inizio: da determinarsi

### 5.4 HPV

Data di inizio: da determinarsi

### 5.5 Agenti infettivi (ad esempio EBV)

Data di inizio: da determinarsi

## 6.0 SCHEMI ASSOCIATI E MODULI

### 6.2 Schema EQA per patologia molecolare

UK NEQAS per genetica molecolare fornisce una VEQ per le malattie ereditarie.

I progressi nella comprensione delle malattie genetiche ha portato ad una rivoluzione nella sperimentazione di tecnologie e UK NEQAS per la genetica molecolare fornisce una verifica esterna di qualità in questo campo in rapida evoluzione.

Questo progresso ha visto emergere test molecolari di istopatologia che includono test molecolari su campioni di pazienti affetti da tumore. Al fine di fornire una valutazione globale della qualità del servizio del laboratorio, UK NEQAS ICC & ISH e UK NEQAS per la genetica molecolare si sono unite per formare **UK NEQAS per Patologia Molecolare** per fornire una VEQ per la varietà dei test molecolari inclusi:

- cancro colon rettale
- cancro del polmone a cellule non piccole
- melanoma
- tumore dello stroma gastro-intestinale

Per ulteriori informazioni e contattare Dott.ssa Sandi Deans (organizzatrice dello schema) [sandra.deans@nuth.nhs.uk](mailto:sandra.deans@nuth.nhs.uk)

## 7.0

### BIBLIOGRAFIA

1. Bartlett JM, Starczynski J, Atkey N, Kay E, O'Grady A, Gandy M, Ibrahim M, Jasani B, Ellis IO, Pinder SE, Walker RA. HER2 testing in the UK: recommendations for breast and gastric in-situ hybridisation methods. *J Clin Pathol*. 2011 64 (8):649-653
2. Bartlett JM, Campbell FM, Ibrahim M et al., (2011) A UK NEQAS ISH multicenter ring study using the Ventana HER2 dual-color ISH assay. *Am J Clin Pathol*. (1):157-62.
3. Bartlett JM, Campbell FM, Ibrahim M et al., (2010) A UK NEQAS ICC and ISH multicentre study using the Kreatech Poseidon HER2 FISH probe: intersite variation can be rigorously controlled using FISH. *Histopathology*. 56(3):297-304.
4. Bartlett JM, Campbell FM, Ibrahim M et al., (2009) Chromogenic in situ hybridization: a multicenter study comparing silver in situ hybridization with FISH. *Am J Clin Pathol*. 132(4):514-520.
5. Barker C, Ibrahim M, Miller K, Reid V. (2009) Nondestructive quality control of HER2 control cell line sections: the use of interferometry for measuring section thickness and implications for HER2 interpretation on breast tissue. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 17(6):536-542.
6. Bartlett JM, Ibrahim M, Jasani B et al., (2009) External quality assurance of HER2 FISH and ISH testing: three years of the UK national external quality assurance scheme. *Am J Clin Pathol*. 131(1):106-111.
7. Ibrahim M, Dodson A, Barnett S, et al., (2008) Potential for false-positive staining with a rabbit monoclonal antibody to progesterone receptor (SP2): findings of the UK National External Quality Assessment Scheme for Immunocytochemistry and FISH highlight the need for correct validation of antibodies on introduction to the laboratory. *Am J Clin Pathol*. 129(3):398-409.
8. O'Grady A, Allen D, Happerfield L, Johnson N, Provenzano E, Pinder SE, Tee L, Gu M, Kay EW. An immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization-based comparison between the Oracle HER2 Bond Immunohistochemical System, Dako HercepTest, and Vysis PathVysion HER2 FISH using both commercially validated and modified ASCO/CAP and United Kingdom HER2 IHC scoring guidelines. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2010 18(6):489-93.
9. Walker RA, Bartlett JM, Dowsett M, Ellis IO, Hanby AM, Jasani B, Miller K, Pinder S. (2008) HER2 testing in the UK: further update to recommendations. *J Clin Pathol*. 61(7):818-824.
10. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN et al., (2007) American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 131(1):18-43. Bartlett JM, Campbell FM, Ibrahim M et al., (2011) A UK NEQAS ISH multicenter ring study using the Ventana HER2 dual-color ISH assay. *Am J Clin Pathol*. (1):157-62.
11. A UK NEQAS ISH multicenter ring study using the Ventana HER2 dual-color ISH assay. Bartlett JM, Campbell FM, Ibrahim M, O'Grady A, Kay E, Faulkes C, Collins N, Starczynski J, Morgan JM, Jasani B, Miller K. *Am J Clin Pathol*. 2011 Jan;135(1):157-62.

## 8.0 Utilizzo del sito UK NEQAS ICC & ISH per l'inserimento dei risultati e l'accesso ai reports on line

### 8.1 Notifica della nuova spedizione e dei reports

I laboratori partecipanti vengono avvisati via e-mail dall'invio dei campioni.

Il sito per l'inserimento dei risultati è: [www.ukneqasicc.org.uk](http://www.ukneqasicc.org.uk)

### 8.2 Accesso al sito

Una volta entrati nel sito si deve cliccare su "Participant log in button" quindi si inseriscono i dati di accesso che verranno inviati all'indirizzo e-mail fornito con la registrazione. I dati di accesso consistono in:

**Numero di laboratorio:** è il codice che identifica il laboratorio e che compare su tutti i documenti ricevuti dalla UK NEQAS.

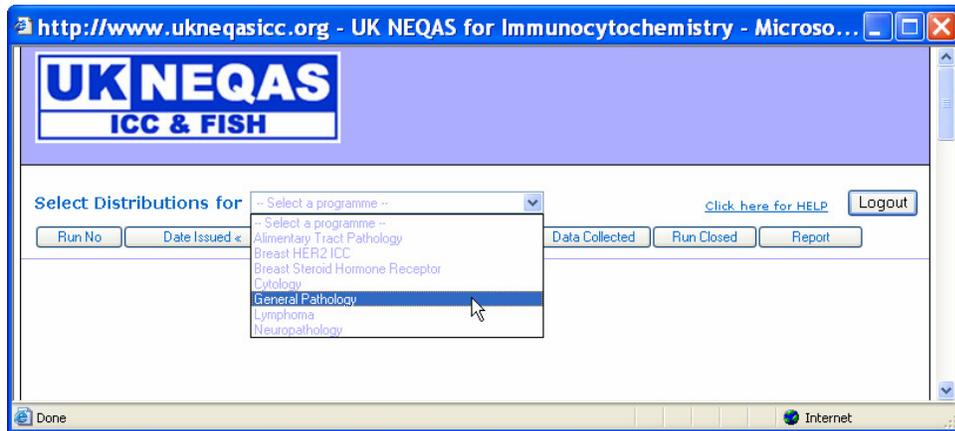
**Identity:** è il numero di 4 cifre generato casualmente dalla UK NEQAS

**Password:** è un codice alfanumerico di 6 caratteri che identifica in maniera univoca il laboratorio partecipante.

L'identity e la password servono per garantire un alto livello di sicurezza.

### 8.3 Selezione del programma di interesse

#### 8.3.1. Selezione del modulo usando il menù a tendina ---Select a Programme---



Il menù a tendina consente di visualizzare l'elenco dei programmi a cui il partecipante è iscritto

#### 8.3.2 Guida alle icone

The screenshot shows the same website as above, but with the dropdown menu set to "General Pathology". Below the dropdown menu, there are buttons for "Annual Reports", "Click here for HELP", and "Logout". Below these buttons, there is a table with columns for "Run No", "Date Issued", "Closing Date", "Completed", "Data Collected", "Run Closed", and "Report". The table contains one row of data for Run No 78, Date Issued 03/06/2007, and Closing Date 29/06/2007. Below the table, there are seven columns of text explaining the icons used in the table: "Numero della spedizione", "Data di spedizione", "Ultimo giorno per l'inserimento dei risultati", "Mostra se sono stati inseriti risultati", "Mostra se UKNEQAS ha raccolto i risultati", "Mostra se UKNEQAS ha raccolto i dati", and "Indica se il report è disponibile".

Run No	Date Issued	Closing Date	Completed	Data Collected	Run Closed	Report
78	03/06/2007	29/06/2007	✓	✓	✓	✓

Numero della spedizione  
Data di spedizione  
Ultimo giorno per l'inserimento dei risultati  
Mostra se sono stati inseriti risultati  
Mostra se UKNEQAS ha raccolto i risultati  
Mostra se UKNEQAS ha raccolto i dati  
Indica se il report è disponibile

#### 8.3.3 Selezione della distribuzione

Evidenziare la distribuzione desiderata per entrare nella sezione Metodi e Reports (come mostrato nella figura sottostante)

The screenshot shows the same website as above, but with the first row of the table highlighted in blue. This indicates that the distribution with Run No 78 is selected.

Run No	Date Issued	Closing Date	Completed	Data Collected	Run Closed	Report
78	03/06/2007	29/06/2007	✓	✓	✓	✓

## 8.4 Sezione Metodi/Protocolli e Reports

### 8.4.1 Inserimento dati

Usare il menù a tendina per selezionare l'anticorpo primario. Se l'anticorpo primario non compare nell'elenco si deve selezionare "Other" e quindi cliccare sul quadratino a destra che aprirà una finestra in cui scrivere l'anticorpo usato.

Quando un significativo di laboratori utilizza l'anticorpo introdotto selezionando "Other" questo verrà aggiunto alla lista selezionabile.

Sebbene si raccomandi di riempire tutte le aree alcuni campi sono **obbligatori** e **devono** essere compilati perchè si possano salvare i risultati.

**I campi obbligatori sono: Metodo, Anticorpi e Detection.**

Se in questi campi non vengono inseriti i dati o se la combinazione dei dati inseriti non è valida il sistema non consente il salvataggio dei dati.

Cliccando il tasto "**complete**" i risultati possono essere "raccolti" dalla UK NEQAS

Il tasto "**save**" consente di salvare i risultati ed eventualmente modificarli

Con il tasto "**back**" si esce dalla pagina senza salvare i dati

### 8.4.2 Analisi e raccolta dei dati

Una volta che viene chiusa una distribuzione la pagina dei risultati viene bloccata e i dati non possono essere modificati.

### **8.4.3 Reports**

Una volta che il report è disponibile i partecipanti vengono avvisati via e-mail. Dopo la ricezione dell'e-mail nella sezione di inserimento dei risultati vicino al tasto "Complete" comparirà il pulsante "Report".

Cliccando su "Report" verrà aperta una finestra con i reports disponibili. Cliccando con il tasto sinistro verrà aperto il report con internet explorer; cliccando con il tasto destro il report verrà scaricato sul computer.

### **8.5 Uscire dal sistema**

Per uscire dalla sezione selezionare "back" per ritornare alle distribuzioni.

## **9.0 Membri del Comitato Direttivo per gli schemi tecnici in patologia cellulare**

### **Presidente**

Dott.sa Barbara Totty, direttrice del Laboratorio di Istopatologia dell'ospedale di Addenbrooke, Cambridge

e-mail: barbara.totty@addenbrookes.nhs.uk

### **Membri del comitato**

Dr Alan Ramsay rappresentante dei patologi del Royal College

e-mail: a.ramsay@ich.ucl.ac.uk.

David Evans, organizzatore della UK Neqas per la tecnica di patologia cellulare

e-mail: david.evans@nuth.northy.nhs.uk.

Alan Brown, gruppo di consulenza

e-mail: [Allan.Brown@kingstonhospital.nhs.uk](mailto:Allan.Brown@kingstonhospital.nhs.uk).

Peter Ruddy, rappresentante IBMS

e-mail: peter.ruddy@uh.n-i.nhs.uk.

Keith Miller, organizzatore dello schema UK NEQAS di Immunoistochimica & ISH

e-mail: k.miller@ucl.ac.uk.

Dott. Merdol Ibrahim, direttore schema UK NEQAS di Immunoistochimica & ISH

e-mail: merdol.ibrahim@ucl.ac.uk