

CHẨN ĐOÁN TÁI SẮP XẾP GEN ALK BẰNG HÓA MÔ MIỄN DỊCH TRONG UNG THƯ PHỔI LOẠI CARCINOM TUYẾN TẠI BỆNH VIỆN PHẠM NGỌC THẠCH - TP. HỒ CHÍ MINH

Nguyễn Sơn Lam¹, Trần Đình Thanh²

TÓM TẮT

Phần mở đầu: Chẩn đoán biểu hiện tái sắp xếp gen ALK gần đây được sử dụng bằng kỹ thuật nhuộm hóa mô miễn dịch với kháng thể đặc hiệu D5F3 Ventana. Bên cạnh các kỹ thuật chẩn đoán khác như nhuộm FISH, giải trình tự gen thế hệ mới. Kỹ thuật chẩn đoán ALK với nhuộm hóa mô miễn dịch đã được công nhận và được sử dụng rộng rãi trên thế giới.

Phương pháp nghiên cứu: hồi cứu, thống kê mô tả trên 96 trường hợp ung thư phổi carcinôm tuyến có đột biến EGFR (-). Thực hiện chẩn đoán ALK bằng nhuộm hóa mô miễn dịch với kháng thể D5F3 Ventana. So sánh với kết quả chẩn đoán ALK bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới.

Kết quả: Tỷ lệ phát hiện ALK: 7,29%. Độ nhạy: 87,5%. Độ đặc hiệu: 100%. Giá trị tiên lượng dương: 100%. Giá trị tiên lượng âm: 98,87%. Giá trị tổng quát: 98,96%.

Kết luận: Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy giá trị cao của kỹ thuật hóa mô miễn dịch với kháng thể đặc hiệu D5F3 Ventana trong chẩn đoán biến đổi gen loại tái sắp xếp ALK. Kỹ thuật này cũng đã được công nhận trên thế giới và qua kết quả nghiên cứu này cũng có thể áp dụng rộng rãi tại Việt Nam trong các phòng xét nghiệm chuyên khoa giải phẫu bệnh.

Từ khóa: Tái sắp xếp gen ALK, Carcinôm tuyến, Kháng thể ALK D5F3 Ventana, Phương pháp nhuộm huỳnh quang lai ghép gen tại chỗ FISH, Giải trình tự gen thế hệ mới.

ABSTRACT

DIAGNOSIS FOR ALK REARRANGEMENT BY IMMUNOHISTOCHEMISTRY IN LUNG CANCER ADENOCARCINOMA AT PNT HOSPITAL - HO CHI MINH CITY

Nguyen Son Lam¹, Tran Dinh Thanh²

Introduction: Actually, diagnosis for ALK gene rearrangement has been used by IHC staining technique with the D5F3 Ventana specific antibody. In addition to other diagnostic techniques such as FISH staining, next generation sequencing. The technique of ALK with IHC staining has been recognized and widely used in the world.

Methods: A retrospective and descriptive statistics research on 96 cases of lung cancer adenocarcinoma with negative EGFR mutation which have been performed diagnosis ALK rearrangement by immunohistochemistry with D5F3 Ventana antibody and compared to the ALK diagnosis by next generation sequencing.

1. Bệnh viện Phạm Ngọc Thạch
2. BV Hoàn Mỹ Sài Gòn

- Ngày nhận bài (Received): 25/7/2018; Ngày phản biện (Revised): 14/8/2018;
- Ngày đăng bài (Accepted): 27/8/2018
- Người phản hồi (Corresponding author): Nguyễn Sơn Lam
- Email: drnsl1963@gmail.com, ĐT: 0913148308

Results: ALK detection rate: 7.29%; Sensitivity: 87.5%; Specificity: 100%, Positive Predictive Value: 100%, Negative Predictive Value: 98.87% and Overall Value: 98.96%.

Conclusion: Our research results demonstrate the high value of IHC with the D5F3 Ventana specific antibody in ALK rearrangement diagnosis. This technique has also been recognized around the world and this research result can also be widely used at pathology laboratory in Vietnam.

Key Words: ALK Rearrangement, Adenocarcinoma, ALK Antibody D5F3 Ventana), FISH: Fluorescence in situ hybridization, Next Generation Sequencing.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong ung thư phổi không tế bào nhỏ, đột biến gen EGFR chiếm tỉ lệ cao nhất (40 – 50% ở các bệnh nhân Châu Á) và có các ứng dụng lâm sàng đạt hiệu quả cao nhất [10, 16]. Tuy nhiên, bên cạnh một loại đột biến khác cũng có ý nghĩa điều trị quan trọng do đã có các thuốc nhắm tới đích điều trị này. Đó là loại đột biến do tái sắp xếp gen ALK (ALK Rearrangement). Hiện nay, trên thế giới có nhiều kỹ thuật chẩn đoán ALK như: kỹ thuật lai ghép gen tại chỗ có gắn huỳnh quang (FISH: Fluorescence in situ hybridization), Giải trình tự gen thế hệ mới (NGS: Next Generation Sequencing), và gần đây kỹ thuật hóa mô miễn dịch với các kháng thể đặc hiệu như D5F3 Ventana cũng đã được công nhận và sử dụng rộng rãi (FDA, IASLC, CAP, AMP, NCCN, ASCO, ESMO...) [1, 3, 6, 9, 11, 15, 18, 19, 21]. Theo các thống kê trên thế giới, biểu hiện tái sắp xếp gen ALK chiếm khoảng 2-6% các đột biến trong ung thư phổi không tế bào nhỏ. Tại Việt Nam, chưa có các nghiên cứu đánh giá về biểu hiện đột biến gen này.

Chúng tôi đưa ra nghiên cứu với các mục tiêu sau:

1) *Khảo sát tỉ lệ tái sắp xếp gen ALK trong các trường hợp ung thư phổi loại carcinôm tuyến.*

2) *Giá trị chẩn đoán biểu hiện tái sắp xếp ALK bằng kỹ thuật hóa mô miễn dịch với kháng thể đặc hiệu D5F3 Ventana.*

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các bệnh nhân nhập viện BV.Phạm Ngọc Thạch

có chẩn đoán ung thư phổi loại carcinôm tuyến đã có chẩn đoán đột biến EGFR (-) trong hai tháng từ 01/10/2017 đến 31/12/2017.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Chúng tôi thực hiện nghiên cứu hồi cứu, mô tả loạt lâm sàng bệnh nhân có chẩn đoán xác định ung thư phổi loại carcinôm tuyến dựa vào xét nghiệm giải phẫu bệnh trên các bệnh phẩm của phổi. Các số liệu sau khi thu thập sẽ được mã hóa và nhập vào máy vi tính, sử dụng phần mềm Stata 10 để xử lý. P nhỏ hơn 0,05 sẽ được xem như có ý nghĩa. Sử dụng phép kiểm chi bình phương để so sánh tỉ lệ khác biệt cho các biến định tính. Tất cả các phương pháp kiểm định giả thuyết được thực hiện bằng cách sử dụng kiểm định 2 bên (two-sided alternatives). Ngưỡng ý nghĩa là 0,05 ($p < 0,05$) để chấp nhận hay bác bỏ giả thuyết thống kê.

2.3. Chất liệu nghiên cứu

Các bệnh phẩm đúc khối nền (Paraffin Embedding) bao gồm: bệnh phẩm qua soi phế quản, bệnh phẩm sinh thiết dưới hướng dẫn CT-Scan, bệnh phẩm phẫu thuật phổi (phẫu thuật phổi hở, nội soi lồng ngực dưới màn hình video (VATS: Video-Assisted Thoracoscopic Surgery), bệnh phẩm sinh thiết màng phổi (sinh thiết màng phổi bằng kim Abrams, Castelain hay qua nội soi màng phổi) và bệnh phẩm sinh thiết các tổn thương di căn (hạch, mô mềm, xương...). Các bệnh phẩm đúc khối nền này được thực hiện nhuộm hóa mô miễn dịch với kháng thể đặc hiệu ALK D5F3 Ventana. Sau đó sẽ được đọc chẩn đoán dưới kính hiển vi quang học và tính điểm theo tiêu chuẩn của công ty sản xuất kháng thể Ventana (Tính điểm hai loại: dương tính

và âm tính)[2, 5, 12, 16, 19]. Kết quả nhuộm hóa mô miễn dịch ALK D5F3 được so sánh với kết quả giải trình tự gen thế hệ mới (Next Generation Sequencing) với hệ thống máy Ion GeneStudio S5 Series System của ThermoFisher Scientific (Gene Pro Center, Chulalongkorn University, Bangkok, Thái Lan). Các trị số được tính toán bao gồm: độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên lượng dương, giá trị tiên lượng âm và giá trị tổng quát của phương pháp chẩn đoán hóa mô miễn dịch ALK D5F3 Ventana [2, 6, 8, 11, 17, 19, 20, 21].

III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

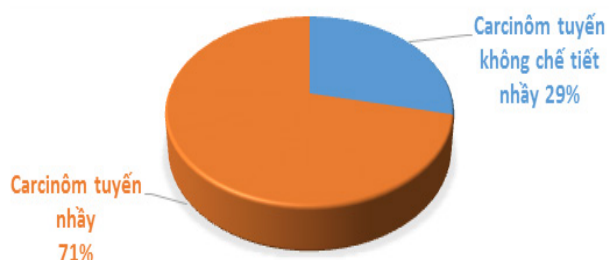
3.1. Các số liệu tổng quát

- Tổng số ca nghiên cứu: 96 ca gồm 34 nam, 62 nữ.
- Tuổi trung bình: $57 \pm 10,51$ tuổi.
- Số ca nhuộm ALK D5F3 Ventana dương tính:

7 ca / 96 ca = 7,29%

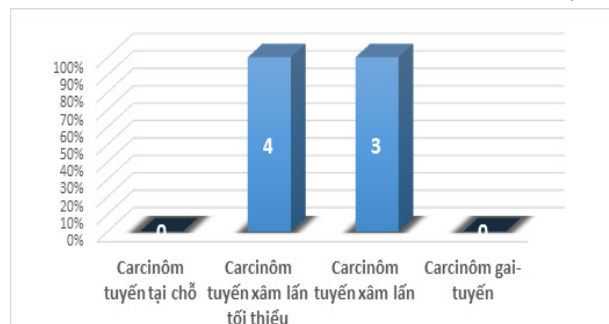
3.2. Phân phối biểu hiện ALK theo loại mô học

3.2.1. Theo loại tuyến chế tiết nhầy và không chế tiết nhầy



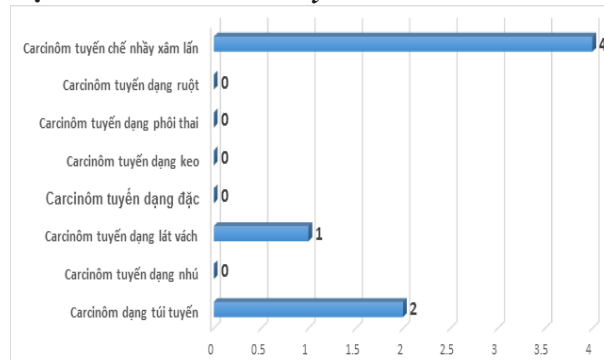
Biểu đồ 1: Phân phối số ca ALK D5F3 (+) theo loại mô học Carcinôm tuyến có và không có chế tiết nhầy

3.2.2. Theo các loại mô học của carcinôm tuyến



Biểu đồ 2: Phân phối ALK D5F3 (+) theo các loại mô học của các nhóm carcinôm tuyến thường gặp

3.2.3. Phân phối ALK D5F3 (+) theo các phân loại nhỏ của carcinôm tuyến



Biểu đồ 3: Phân phối ALK D5F3 (+) theo các loại mô học carcinôm tuyến thường gặp

Bàn luận: Biểu hiện ALK với kỹ thuật chẩn đoán hóa mô miễn dịch kháng thể D5F3 cho thấy đa số ở các loại carcinôm tuyến có chế tiết nhầy. Các loại mô học chiếm tỉ lệ cao là carcinôm dạng túi tuyến, carcinôm tuyến dạng lát vách và carcinôm tuyến chế nhầy xâm lấn. Các kết quả này cũng phù hợp với các nhận định từ các nghiên cứu khác trên thế giới ($p = 0,061 - 0,085$) với những kỹ thuật chẩn đoán ALK khác như: nhuộm FISH, PCR kỹ thuật số và giải trình tự gen thế hệ mới [3, 4, 5, 7, 8, 10, 13, 15, 16, 18, 20].

3.3. Các giá trị của kỹ thuật nhuộm hóa mô miễn dịch chẩn đoán ALK D5F3 Ventana

So sánh với kết quả của kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới (NGS), nghiên cứu của chúng tôi có các số liệu như sau: Số dương tính thật: 07 ca. Số dương tính giả: 0 ca. Số âm tính thật: 88 ca. Số âm tính giả: 1 ca. Các tính toán như sau:

- Độ nhạy: $\text{Dương tính thật} / (\text{Dương tính thật} + \text{Âm tính giả}) = 7 / (7 + 1) = 87,5\%$

- Độ đặc hiệu: $\text{Âm tính thật} / (\text{Âm tính thật} + \text{Dương tính giả}) = 88 / (88 + 0) = 100\%$

- Giá trị tiên đoán dương: $\text{Dương tính thật} / (\text{Dương tính thật} + \text{Dương tính giả}) = 7 / (7 + 0) = 100\%$

- Giá trị tiên đoán âm: $\text{Âm tính thật} / (\text{Âm tính thật} + \text{Âm tính giả}) = 88 / (88 + 1) = 98,87\%$

- Giá trị tổng quát: $(\text{Dương tính thật} + \text{Âm tính thật}) / \text{Tổng số ca nghiên cứu} = (7 + 88) / 96 = 98,96\%$

3.3.1. So sánh độ nhạy và độ đặc hiệu biểu hiện ALK trong ung thư phổi không tế bào nhỏ đối với các nghiên cứu khác trên thế giới: (bảng 1)

Bảng 1: So sánh độ nhạy và độ đặc hiệu xét nghiệm ALK D5F3 Ventana

	Kháng thể đặc hiệu ALK	Độ nhạy	Độ đặc hiệu	p
Mino K. và cs., 2010	D5F3 Ventana	100%	99%	0,078
Conklin và cs., 2013	D5F3 Ventana	100%	75%	0,061
Zwaenepoel và cs., 2014	D5F3 Ventana	96%	100%	0,082
Condé và cs., 2014	D5F3 Ventana	98%	100%	0,084
Cutz và cs., 2014	D5F3 Ventana	89%	97%	0,063
Gruber và cs., 2015	D5F3 Ventana	99%	95%	0,071
Lantuéjoul và cs., 2015	D5F3 Ventana	92%	76%	0,023
Savic và cs., 2015	D5F3 Ventana	96%	100%	0,077
Weiya W. và cs., 2015 [21]	D5F3 Ventana	95,9%	99,87%	0,069
Jung-S. P. và cs, 2016 [11]	D5F3 Ventana	85%	96%	0,066
Antonio M và cs., 2016 [2]	D5F3 Ventana	90,9%	99,8%	0,081
Nghiên cứu tại BV.PNT	D5F3 Ventana	87,5%	100%	

3.3.2. So sánh tỉ lệ phát hiện biểu hiện ALK đối với carcinôm tuyến (Với kháng thể D5F3 Ventana): (bảng 2)

Bảng 2: So sánh tỉ lệ phát hiện, độ nhạy và độ đặc hiệu trong carcinôm tuyến của phổi

	Độ nhạy %	Độ đặc hiệu %	Tỉ lệ phát hiện %	p
Spasenija S. và cs.; 2013 (Bệnh phẩm tế bào học) [20]	93,3	96	6,7	0,088
Lynette M. S. và cs.; 2013 [14]	93	98,5	7,9	0,061
Christina I S. và cs ; 2013. [4]	100	89	3,7	0,073
Leilei L và cs ; 08-2014 [13]	75	98,4	7,6	0,059
Maximilian V. L.và cs.; 11-2014	89	99	6,9	0,064
Antonio M. và cs.; 2015 [2]	90,9	99,8	6,2	0,089
Johanna S. M. cs., 2016 [10]	92,9	96,6	3,2	0,065
Nghiên cứu tại BV.PNT	87,5	100	7,29	

3.4. Bàn luận: Trong nghiên cứu của chúng tôi, khi so sánh với các nghiên cứu khác trên thế giới đều cho kết quả tương đương không có khác biệt có ý nghĩa thống kê. Trong 96 ca nghiên cứu chỉ có 1 ca âm tính giả được phát hiện bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới. Trường hợp này chúng tôi đã thực hiện nhuộm lại 3 lần đều cho kết quả âm tính, chứng tỏ đây là trường hợp âm tính giả thực sự. Nguyên nhân do số lượng tế bào có biểu hiện

ALK quá thấp trong mẫu mô (Dưới ngưỡng dương tính) và đối chiếu kết quả ALK chẩn đoán bằng giải trình tự gen thế hệ mới, nồng độ DNA cũng rất thấp, xấp xỉ với ngưỡng phát hiện. Những trường hợp âm tính giả này, theo các hướng dẫn trên thế giới, nếu vẫn nghi ngờ có biểu hiện ALK, chúng ta cần thực hiện xét nghiệm chẩn đoán ALK lại bằng kỹ thuật nhuộm FISH [4, 5, 7, 8, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 21].

IV. KẾT LUẬN

Với tỉ lệ phát hiện 7,29%, độ nhạy 87,5% và độ đặc hiệu 100% cho thấy khả năng cao trong chẩn đoán biến đổi gen loại tái sắp xếp ALK của kỹ thuật hóa mô miễn dịch với kháng thể đặc

hiệu D5F3 Ventana. Kỹ thuật này cũng đã được công nhận trên thế giới và qua kết quả nghiên cứu này cũng có thể áp dụng rộng rãi tại Việt Nam trong các phòng xét nghiệm chuyên khoa giải phẫu bệnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alice T. Shaw et al ; ALK in Lung Cancer: Past, Present, and Future; JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, VOLUME 31, NUMBER 8, MARCH 10 2013, p1105-1117.
2. Antonio M. , Alessia D. L. et al ; ALK Protein Analysis by IHC Staining after Recent Regulatory Changes: A Comparison of Two Widely Used Approaches, Revision of the Literature, and a New Testing Algorithm; Journal of Thoracic Oncology Vol. 11 No. 4: p487-495.
3. Christina I Selinger et al; Testing for ALK rearrangement in lung adenocarcinoma: a multi-center comparison of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization; ASCP 2013, Modern Pathology (2013) 26, p1545–1553.
4. Cristina Teixidó et al; Concordance of IHC, FISH and RT-PCR for EML4-ALK rearrangements; Translational Lung Cancer Research 2014;3(2):p70-74.
5. David G. Beer et.al.; ALK and Other Gene Fusions in Lung Cancer; ASCP, Diagnosis & Therapy on Lung Cancer, Ver.3-2017, p15-20.
6. Eunhee S. Y. et al ; Correlation of IHC and FISH for ALK Gene Rearrangement in Non-small Cell Lung Carcinoma - IHC Score Algorithm for FISH; Journal of Thoracic Oncology, Volume 6, Number 3, March 2011, p459-466.
7. Eugen C. M. et al ; ALK Status Testing in Non Small Cell Lung Carcinoma - Correlation Between Ultrasensitive IHC and FISH; 2013 American Society for Investigative Pathology and the Association for Molecular Pathology, 8, p234-256.
8. Greta A. et al; ALK Rearrangement in a Large Series of Consecutive Non-Small Cell Lung Cancers - Comparison Between a New Immunohistochemical Approach and Fluorescence In Situ Hybridization for the Screening of Patients Eligible for Crizotinib Treatment; Arch Pathol Lab Med - Vol 138, November 2014, p1449-1462.
9. Hyojin K. et al; Guideline Recommendations for Testing of ALK Gene Rearrangement in Lung Cancer: A Proposal of the Korean Cardiopulmonary Pathology Study Group; 2014 The Korean Society of Pathologists/The Korean Society for Cytopathology; Vol.5, 2014, p1-19.
10. Johanna S. M. M. et al ; Inconsistent results in the analysis of ALK rearrangements in non-small cell lung Cancer; BMC Cancer (2016) 16:603, p 01-15.
11. Jung-S. P. et al ; ALK immunohistochemistry for ALK gene rearrangement screening in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis; 2016 Wichtg Publishing, Role of ALK IHC in NSCLC, p414-423.
12. J. Ying et al ; Diagnostic value of a novel fully automated immunochemistry assay for detection of ALK rearrangement in primary lung adenocarcinoma; Annals of Oncology 24: 2589–2593, 2013.
13. Leilei Liu et al; Detection of EML4-ALK in Lung Adenocarcinoma Using Pleural Effusion with FISH, IHC, and RT-PCR Methods; National Natural Science Foundation of China, March 18, 2015, Vol.15, 01-09.
14. Lynette M. S. et al; Combined Use of ALK Im-

- munohistochemistry and FISH for Optimal Detection of ALK-Rearranged Lung Adenocarcinomas; *Journal of Thoracic Oncology*, Volume 8, Number 3, March 2013, p322-328.
15. Maximilian V. L et al; Multicenter Immunohistochemical ALK-Testing of NSCLC Shows High Concordance after Harmonization of Techniques and Interpretation Criteria; *Journal of Thoracic Oncology*, Volume 9, Number 11, November 2014, p1685-1692.
 16. Neal I. L. et al ; Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors - Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology; *Journal of Thoracic Oncology* 2018, Vol. 13 No. 3: p 323-358.
 17. Paul Hofman et.al.; ALK in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Pathobiology, Epidemiology, Detection from Tumor Tissue and Algorithm Diagnosis in a Daily Practice; *Cancers* 2017, 9, p.107-119.
 18. Rathi N. P. et al; Advances in the Diagnosis and Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer; 2014 American Association for Cancer Research; Molecular Cancer Therapies, p.556-561.
 19. Soda M, et al.; A Guide to Lung Cancer Testing ALK & ROS1; Pfizer Oncology; 2013 Edition 2, p.23-27.
 20. Spasenija S. et al; Detection of ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancers on Cytological Specimens; *Journal of Thoracic Oncology*, Volume 8, Number 8, August 2013, p.1004-1011.
 21. Weiya W. et al; Detection of ALK Rearrangements in Malignant Pleural Effusion Cell Blocks From Patients With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: A Comparison of Ventana Immunohistochemistry and Fluorescence In Situ Hybridization; *Cancer (Cancer Cytopathol)* 2015;123:117-22. 2014 American Cancer Society.