



Prädiktive Immunzytochemie beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom

Luka Brcic¹ · Spasenija Savic Prince²

¹ Diagnostik und Forschungsinstitut für Pathologie, Medizinische Universität Graz, Graz, Österreich

² Pathologie, Institut für Medizinische Genetik und Pathologie, Universitätsspital Basel, Basel, Schweiz

In diesem Beitrag

- **Immunzytochemie**
Allgemeine präanalytische, analytische und postanalytische Aspekte • Analytische Validierung und Qualitätskontrolle
- **PD-L1**
PD-L1-Immunzytochemie: Auswertekriterien
- **Prädiktive Immunzytochemie als Surrogat für onkogene Rearrangements: ALK, ROS1 und pan-TRK**
ALK • ROS1 • NTRK

Zusammenfassung

Die Immunchemie ist eine zeit-, tumorproben- und kosteneffiziente Methode zur Untersuchung prädiktiver Biomarker bei fortgeschrittenen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC). Die Immunhistochemie (IHC) an Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebettetem (FFPE) Tumorgewebe hat sich für den Nachweis der PD-L1-Expression sowie für die ALK-, ROS1- und neuerdings auch für die NTRK-Untersuchung bewährt. Zytologische Proben als Quelle für prädiktive Markeranalysen sind sehr wichtig, da bis zu 40 % aller NSCLC rein zytologisch diagnostiziert werden. Trotz der etablierten Rolle der Zytologie in der Lungenkarzinomdiagnostik wurden keine kommerziellen IHC-Assays für zytologische Proben validiert. Die prädiktive Immunzytochemie (ICC) ist am einfachsten an FFPE-Zellblöcken (CB) durchzuführen, da für FFPE-Histologie standardisierte Protokolle verwendet werden können. CB sind jedoch nicht immer verfügbar. Nicht als CB verarbeitete zytologische Präparate sind weniger standardisiert als histologische Präparate und weisen eine erhebliche präanalytische Variabilität auf. Daher ist eine strenge zytologiespezifische Optimierung, Validierung und Qualitätskontrolle von ICC-Protokollen erforderlich. Unter dieser Voraussetzung ist die prädiktive ICC, die in der Regel an Papanicolaou-gefärbten Zytologien durchgeführt wird, robust und zuverlässig. Dieses wertvolle zytologische Material sollte für prädiktive Biomarkeranalysen genutzt werden, um Patientinnen und Patienten nicht dem unnötigen Risiko einer erneuten Probenentnahme auszusetzen. Diese Übersichtsarbeit beleuchtet präanalytische, analytische und postanalytische Aspekte, die ICC-Ergebnisse beeinflussen können, und fasst die veröffentlichten Daten zur prädiktiven ICC für PD-L1, ALK und ROS1 bei NSCLC zusammen.

Schlüsselwörter

Prädiktiv · Immunzytochemie · Lungenkarzinom · Zytologie · Biomarker

Die Immunhistochemie (IHC) zur Bestimmung von prädiktiven Biomarkern ist beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) gut etabliert. Sie liefert zeitnah therapeutisch relevante Ergebnisse und ist für die Selektion von Patientinnen und Patienten für eine Erstlinien-Immuntherapie unerlässlich. Bei bis zu 40 % aller Lungenkarzinome sind zytologische Proben das einzige Tumormaterial, welches für prädiktive Biomarkeranalysen zur Verfügung steht. Eine zuverlässige prädiktive Immunzytoche-

mie (ICC) ist daher ein klinisch relevanter Bedarf.

Die Behandlungsmöglichkeiten für Patientinnen und Patienten mit einem fortgeschrittenen, inoperablen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC), haben sich erheblich verbessert. In der Regel werden NSCLC durch kleine Biopsien und/oder zytologische Proben diagnostiziert. Prädiktive Biomarker einschließlich des morphologischen Subtyps, des PD-L1-Status und der Ergebnisse von zielgerichteten onkogenen Treiberänderungen stehen in direktem



QR-Code scannen & Beitrag online lesen

Zusammenhang mit der Wahl einer spezifischen onkologischen Therapie [7].

Angesichts der wachsenden Zahl behandlungsrelevanter Biomarker kann die prädiaktive Immunchemie zeit-, tumorproben- und kosteneffiziente Ergebnisse liefern. Sie ist bei Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebettetem (FFPE) Tumorgewebe für die PD-L1-, ALK-, ROS1- und neuerdings auch für die NTRK-Testung gut etabliert [12, 18, 24, 27].

Im Allgemeinen ist die ICC an zytologischen Proben gängige Praxis und liefert Ergebnisse von guter Qualität. Eine Herausforderung für robuste und zuverlässige ICC-Ergebnisse besteht darin, dass die präanalytische Verarbeitung von zytologischen Proben im Vergleich zu histologischen Proben weit weniger standardisiert ist und eine zytologiespezifische Protokoll-optimierung, Validierung und Qualitätskontrolle erfordert [8]. Diese Übersichtsarbeit beleuchtet präanalytische, analytische und postanalytische Aspekte, die die ICC-Ergebnisse beeinflussen können, und fasst die veröffentlichten Daten der prädiaktiven ICC für PD-L1, ALK und ROS1 bei NSCLC zusammen.

Immunzytochemie

Allgemeine präanalytische, analytische und postanalytische Aspekte

Zytologische Proben können auf unterschiedliche Weise verarbeitet werden: als konventionelle Abstriche, Zytoprinpräparate oder Flüssigzytologien sowie FFPE-Zellblöcke (CB) [8]. Der Einfachheit halber werden alle nicht als CB verarbeiteten zytologischen Proben in diesem Artikel als konventionelle Zytologie bezeichnet.

Ein FFPE-CB ist die einfachste zytologische Präparationsart für die ICC, da standardisierte Protokolle, welche für histologische Proben etabliert wurden, verwendet werden können. Im Allgemeinen sind die Ergebnisse der ICC an CB robust und reproduzierbar. Es sollte jedoch bedacht werden, dass es keine standardisierte Methode für die CB-Herstellung gibt. So werden z. B. unterschiedliche Entnahmemedien und Vorfixierungsmittel (Ethanol, Formalin, Methanol) verwendet, die die Immunreaktivität beeinflussen und Anpassungen des IHC-Protokolls erfordern können [8, 9].

CB sind aber nicht immer verfügbar und weisen häufig eine zu tiefe Zellularität auf. Eine kürzlich durchgeführte Umfrage unter europäischen Labors hat gezeigt, dass Papanicolaou (Pap)-gefärbte oder luftgetrocknete konventionelle Zytologien immer noch das wichtigste zytologische Material für die ICC sind [25]. Eine ICC auf dem diagnostischen, Pap-gefärbten Zytologiepräparat stellt sicher, dass die zu untersuchenden Zielzellen vorhanden sind. Es wird empfohlen, in der Lungenzytologie positiv geladene Objektträger zu verwenden, da dies die Adhärenz der Zellen verbessert und verhindert, dass sie sich während der technischen ICC-Verarbeitung ablösen und verloren gehen. Die Pap-Färbung beeinträchtigt die ICC nicht und es ist kein separater Entfärbungsschritt erforderlich [8].

Konventionelle Zytologien sind Präparate mit hoher präanalytischer Variabilität (unterschiedliche Entnahmeverfahren, Konservierungs- und Transportmedien, Präparationsverfahren und Fixationslösungen). Daher sind in der Regel zytologiespezifische Anpassungen der Analysevariablen und eine separate Validierung der ICC-Protokolle erforderlich, da sich die präanalytische Aufbereitung deutlich von FFPE-Proben unterscheidet.

Zahlreiche analytische Variablen können die Färbereaktion der Immunchemie beeinflussen, darunter die Sensitivität und Spezifität des primären Antikörpers, die Antikörperkonzentration, die Bedingungen für die Antigendemaskierung, die Sensitivität der Nachweismethode und die Kalibrierung der Färbung mit geeigneten Positivkontrollen. Im Vergleich zu IHC-Protokollen erfordern ICC-Protokolle für konventionelle zytologische Proben oft keine oder eine geringere Vorbehandlung, und oft muss die Antikörperverdünnung angepasst werden [8].

Postanalytisch ist die Identifikation der zu untersuchenden Karzinomzellen auf dem Objektträger und die Anwendung adäquater Auswertekriterien entscheidend für eine zuverlässige ICC-Interpretation. Nicht-neoplastische Zellen, insbesondere Makrophagen, können mit verschiedenen Antikörpern reagieren. Dreidimensionale Zellverbände können eine unspezifische

Immunfärbung im Zentrum der Verbände aufweisen [19]. Degenerierte Zellen und Nekrosen können ebenfalls zu unspezifischen Färbereaktionen führen und sollten bei der Beurteilung nicht berücksichtigt werden [8].

Erwähnenswert ist, dass die ICC die DNA nicht schädigt, sodass ICC-gefärbte Zytologiepräparate für weitere molekulare prädiaktive Analysen verwendet werden können. Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ist an ICC-gefärbten Proben gut anwendbar, wenn 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) als Chromogen verwendet wird, während 3,3-Diaminobenzidin (DAB) die FISH-Signale aufgrund einer Autofluoreszenz stark überlagert [20].

Analytische Validierung und Qualitätskontrolle

Zur Erstellung und Optimierung eines ICC-Protokolls sind Positiv- und Negativkontrollen erforderlich. Die Kontrollproben müssen auf die gleiche Weise verarbeitet und fixiert werden wie die klinischen Proben. Positive und negative Zytologiekontrollen können aus handelsüblichen Zellkulturen (erhältlich für ALK, ROS1 und PD-L1), aus übrig gebliebenen Ergussflüssigkeiten oder aus Frischgewebeabstrichen von Resektionspräparaten (Lungenkarzinomresektate, für PD-L1 auch Plazenta) hergestellt werden [8]. Eine weitere Validierung sollte an einer Reihe von klinischen NSCLC-Proben erfolgen, indem die ICC-Ergebnisse mit dem Goldstandard verglichen werden. Dabei kann es sich um gepaarte histologische Proben mit validierten IHC-Ergebnissen oder mit Ergebnissen molekularer Analysen (z. B. für ALK, ROS1 oder pan-TRK) handeln. Im Allgemeinen gilt ein laborentwickelter Test (LDT) als technisch valide, wenn er mindestens 90% Übereinstimmung mit dem Referenztest aufweist.

Zytologiespezifische Empfehlungen für die analytische Validierung von prädiaktiven ICC-Protokollen sind nicht verfügbar; es wurden jedoch allgemeine Empfehlungen für die analytische Validierung vorgeschlagen, um genaue und reproduzierbare immunchemische prädiaktive Resultate zu gewährleisten [3]. Zu diesen Empfehlungen gehört, dass für die anfängliche analytische Validierung eines neuen prä-

diktiven Protokolls mindestens 20 positive und 20 negative Kontrollen getestet werden sollten, was für ALK, ROS1 und pan-TRK unrealistisch ist, da die Prävalenz dieser onkogenen Fusionen bei NSCLC sehr tief ist.

Die Verwendung eines ICC-Protokolls, welches bereits von einem anderen Labor validiert wurde, kann die Einführung eines neuen ICC-Tests vereinfachen. Da die präanalytischen Bedingungen weniger standardisiert sind als bei FFPE-Proben und die lokalen Bedingungen variieren können, ist eine Validierung erforderlich, um das Protokoll bei Bedarf auf die lokalen Bedingungen anzupassen.

Nach Einführung eines neuen prädiktiven ICC-Tests in die klinische Diagnostik, bietet ein prospektives Monitoring der ICC-Ergebnisse (z.B. Prävalenz der PD-L1-Expressionsniveaus bei verschiedenen Grenzwerten und Prävalenz von ALK-, ROS1- und pan-TRK-positiven Ergebnissen) eine kontinuierliche Qualitätskontrolle und ist hilfreich, um Veränderungen in der analytischen Testleistung zu erkennen und um reproduzierbare Resultate sicherzustellen [3]. So wird die Bioplaza-Onlineplattform beispielsweise von mehreren Pathologielabors in Europa genutzt, um ihre kodierten PD-L1-Ergebnisse prospektiv zu verfolgen und die Prävalenz positiver Ergebnisse mit dem jeweiligen nationalen Durchschnitt zu vergleichen [6].

Die externe Qualitätskontrolle (EQC) ist ein wichtiges Instrument zur Qualitätssicherung. Derzeit gibt es nur einen EQC-Dienst (das UK NEQAS-Zytologiemodul) für die ICC an zytologischen Proben. Bisher bietet es nur Module für eine begrenzte Anzahl von ICC-Markern, wobei PD-L1, ALK oder ROS1 noch nicht beinhaltet sind. Dies unterstreicht die Notwendigkeit einer internen Qualitätskontrolle und einer Ausweitung der auf zytologische Proben zugeschnittenen EQC-Angebote [9, 25].

PD-L1

Eine Untersuchung des PD-L1-Status ist bei metastasierten NSCLC für alle histologischen Subtypen erforderlich, um Patientinnen und Patienten für eine Pembrolizumab-Monotherapie zu identifizieren [18]. Bei metastasierten NSCLC mit hoher PD-L1-

Expression (Tumor Proportion Score, TPS, $\geq 50\%$) und negativem Nachweis zielgerichtet angehebarer onkogener Treiberalterationen ist die Pembrolizumab-Monotherapie die Erstlinienbehandlung der Wahl.

Die PD-L1-Untersuchung kann an FFPE-Tumorgewebe mit hoch standardisierten, in klinischen Studien validierten, PD-L1-IHC-Assays durchgeführt werden oder mit weniger kostspieligen PD-L1-IHC-LDT, die nicht an einen spezifischen Färbeautomaten gebunden sind [11].

Keiner der kommerziellen PD-L1-Assays wurde von den Herstellern für zytologische Proben validiert.

Studienergebnisse zeigen, dass für FFPE-CB Histologie-standardisierte PD-L1-IHC-Protokolle gut verwendet werden können. Mehrere Studien zeigen übereinstimmende PD-L1-Ergebnisse mit gepaarten histologischen NSCLC-Proben sowohl für kommerzielle PD-L1-Assays als auch für LDT. Die Gesamtkonkordanzrate liegt dabei $>90\%$ bei Verwendung des klinisch relevanten TPS-Grenzwertes von 50% [4].

Publizierte Daten für konventionelle Zytologien sind noch begrenzt. Erste retrospektive Studien haben an Pap-gefärbten zytologischen Präparaten eine hohe Übereinstimmung der PD-L1-Ergebnisse mit gepaarten FFPE-Proben gezeigt, sowohl bei Verwendung des 22C3- als auch des SP263-Antikörperklons [13, 17]. Die Daten sind jedoch uneinheitlich, da nachfolgende Studien unterschiedliche Konkordanzraten aufwiesen, was wahrscheinlich auf eine unzureichende Validierung zurückzuführen ist [2, 16].

Für die Etablierung eines neuen PD-L1-ICC-Protokollens sind als Positivkontrollen Pap-gefärbte Zytospins der Karpas-299- (diffuse PD-L1-Färbung mit mittlerer Intensität) und der LNCap-Zelllinien (fokale PD-L1-Färbung mit schwacher Intensität) gut geeignet. Zur Validierung der PD-L1-ICC sollten die Positivkontrollen im klinischen Validierungsset (z.B. Pap-gefärbte NSCLC-Zytologieproben mit bekanntem PD-L1-IHC-Status gepaarter Histologien) das gesamte Spektrum der PD-L1-Färbeintensitäten bei unterschiedlichen Expressionsniveaus (einschließlich schwacher Färbung und geringem Anteil gefärbter Zellen) repräsentieren, um eine angemessene Kalibrierung der ICC zu gewährleisten.

In der diagnostischen Routine am Universitätsspital Basel werden 35% aller PD-L1-Untersuchungen bei NSCLC an Pap-gefärbten zytologischen Präparaten durchgeführt (berechnet aus >1000 PD-L1-Ergebnissen, Daten nicht gezeigt). Die PD-L1-ICC entspricht einem SP263 LDT auf der BOND-MAX-Färbemaschine (Leica Biosystems GmbH, Deutschland). Als kontinuierliche QC-Maßnahme wird die Prävalenz der PD-L1-Resultate bei verschiedenen Expressionsgrenzwerten (TPS $<1\%$, $1-49\%$ bzw. 50%) prospektiv mit der Bioplaza-Onlineplattform überwacht. Die Prävalenz von NSCLC mit hoher PD-L1-Expression (TPS $\geq 50\%$) ist dabei vergleichbar zwischen Biopsien (unter Verwendung des SP263-Assays) und Pap-gefärbten zytologischen Präparaten (30% bzw. 27% , $p=0,49$) und entspricht den erwarteten Werten der publizierten Literatur. Diese Daten aus der klinischen Routinepraxis unterstreichen, dass die PD-L1-ICC an konventionellen Pap-gefärbten Präparaten zuverlässige Resultate für den klinisch relevanten Grenzwert (TPS $\geq 50\%$) liefern kann.

Eine kürzlich veröffentlichte nationale Studie aus den Niederlanden, bei der retrospektiv Daten aus der diagnostischen Routine ausgewertet wurden, zeigte jedoch eine größere Variabilität der PD-L1-Positivitätsraten zwischen verschiedenen Labors bei zytologischen Proben im Vergleich zu histologischen Proben (bei einem TPS-Grenzwert von 50%). Dies untermauert die Notwendigkeit einer sorgfältigen Etablierung und Validierung von PD-L1-ICC-Protokollen sowie von Qualitätskontrollmaßnahmen [10].

PD-L1-Immunzytochemie: Auswertekriterien

Für eine zuverlässige Beurteilung des PD-L1-Status müssen mindestens 100 vitale Tumorzellen vorhanden sein [8]. An CB gelten für Tumorzellen die gleichen Auswertekriterien wie für FFPE-Histologien. Eine Tumorzelle ist positiv für PD-L1, wenn eine teilweise oder vollständige Membranfärbung vorhanden ist, unabhängig von der Intensität der Färbung. Nekrotische Tumorzellen und eine zytoplasmatische Färbereaktion werden nicht berücksichtigt. Bei CB kann es schwierig sein, Tumor-

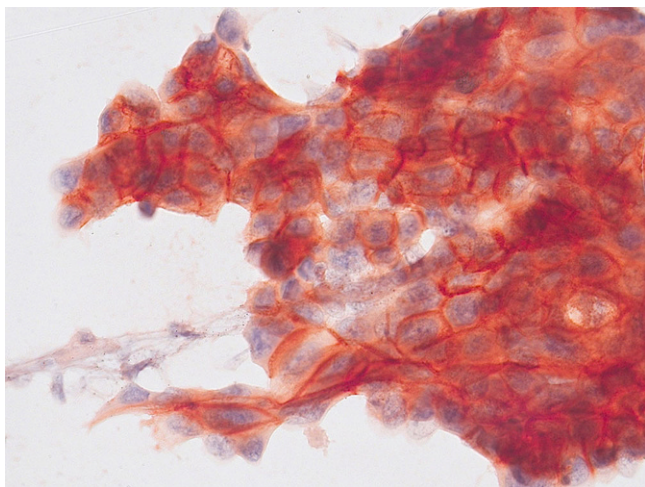


Abb. 1 ▲ PD-L1-Immunzytochemie (ICC) an einem Ausstrichpräparat einer transbronchiale Nadelaspiration eines mediastinalen Lymphknotens. Fast alle Zellen des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC) sind positiv für PD-L1 (SP263-Antikörper auf dem BOND-MAX-Färbeautomaten, Chromogen AEC, Originalvergrößerung 400:1). Die ICC wurde an einem in Delaunay fixierten und nach Papanicolaou gefärbten Ausstrich durchgeführt

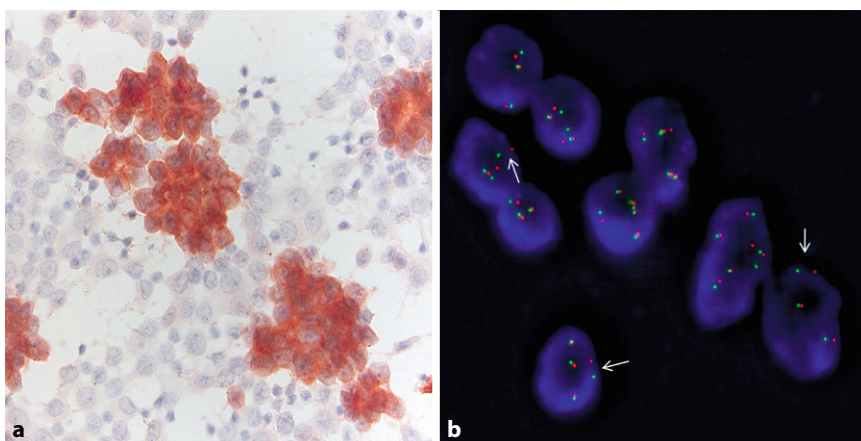


Abb. 2 ▲ ALK-Immunzytochemie (ICC) und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) an zytologischen Ausstrichpräparaten eines ALK-positiven Adenokarzinoms der Lunge im Pleuraerguss. **a** Starke und homogene zyttoplasmatische Immunfärbung der Karzinomzellen (5A4-Antikörper auf dem BOND-MAX-Färbeautomaten, Chromogen AEC, Originalvergrößerung 400:1). **b** Die ALK-FISH (Vysis ALK-Break-apart-FISH-Sonde, Abbott, Abott Park, USA) bestätigt das ALK-Rearrangement mit Bruchsignalen (Pfeile) in insgesamt 60 % der Karzinomzellkerne (Originalvergrößerung 1000:1). Die ICC und FISH wurden an in Delaunay fixierten und nach Papanicolaou gefärbten Ausstrichen durchgeführt

zellen von umliegenden nicht-neoplastischen Zellen, z.B. von Makrophagen, zu unterscheiden, was zu Fehlinterpretationen führen kann. Eine Immunfärbung mit einem Epithelmarker (z.B. TTF-1, BerEp4) auf einem entsprechenden Schnitt kann bei der Identifizierung von Tumorzellen für die Bewertung der PD-L1-Expression nützlich sein. Makrophagen weisen zudem häufig eine membranäre PD-L1-Expression auf und können als interne Positivkontrolle dienen.

Bei konventionellen Zytologien sind die Zellen auf den Objektträgern nicht angeschnitten und weisen daher eine intakte Zellmembran auf. Durch diese intakte Zellmembran ist die membranäre Immunfärbung weniger deutlich erkennbar und erscheint als diffuses „pseudozytoplasmatisches“ PD-L1-Färbemuster [8, 26]. In vielen Fällen ist jedoch eine membranäre Akzentuierung der Immunfärbung zu erkennen (■ **Abb. 1**).

Die PD-L1-Expression ist nicht auf Tumorzellen beschränkt, sondern wird auch von Immunzellen (IC) exprimiert. Eine PD-L1-Auswertung von tumorassoziierten IC ist an zytologischen Präparaten nicht zuverlässig möglich, da eine Unterscheidung zwischen tumorassoziierten IC und IC außerhalb des Tumorbettes nicht möglich ist. Beim NSCLC ist der PD-L1-Status jedoch nur für die Verordnung eines Medikaments, nämlich Pembrolizumab, verpflichtend notwendig und für den dafür benötigte TPS werden nur Tumorzellen in die Auswertung einbezogen.

Prädiktive Immunzytochemie als Surrogat für onkogene Rearrangements: ALK, ROS1 und pan-TRK

Bei metastasierten NSCLC sind zielgerichtete Medikamente für *ALK*-, *ROS1*-, *NTRK*- und neuerdings auch *RET*-Fusionen zugelassen. Insgesamt handelt es sich um seltene Alterationen mit einer Prävalenz von *ALK*-, *ROS1*-, *RET*- und *NTRK*-Rearrangements von 3–5 %, 1–2 %, 1–2 % bzw. 0,2 % in kaukasischen Populationen [24].

Bei onkogenen Genfusionen handelt es sich um Tyrosinkinase, die aus strukturellen Umlagerungen auf DNA-Ebene resultieren. Wichtig ist, dass die Fusion die Funktion der Tyrosinkinase erhält und für die Überexpression des Fusionsproteins und die konstitutive Aktivierung der Kinase optimiert ist. Die immunchemisch nachgewiesene *ALK*-, *ROS1*- und pan-*TRK*-Expression ist ein Surrogat für die jeweiligen Rearrangements, da die Proteine dieser Gene in ihrer nativen Form im Wesentlichen nicht exprimiert werden.

Obwohl sich angesichts der steigenden Anzahl therapierelevanter genetischer Alterationen bei NSCLC ein Upfront DNA- und RNA-basiertes Next Generation Sequencing (NGS) anbietet mit gleichzeitiger Untersuchung prädiktiver Mutationen, Amplifikationen und Fusionen, ist ein substanzieller Anteil kleiner NSCLC-Proben nicht für eine zusätzliche RNA-basierte NGS-Analyse ausreichend [24]. Der DNA-basierte Nachweis von Rearrangements mittels Break-apart-FISH erfordert nur wenige Tumorzellen (meist nur 50), ist jedoch eine kostspielige Screeningmethode und erfordert ein hohes Maß an Fachwissen. Der immunde-

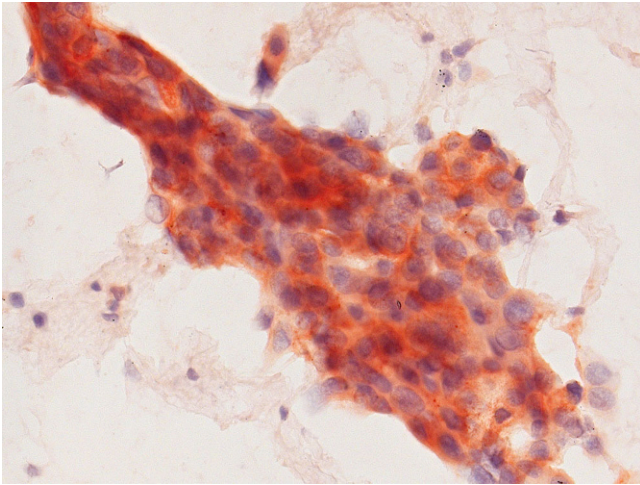


Abb. 3 ▲ ROS1-Immunzytochemie (ICC) an einem zytologischen Ausstrichpräparat eines ROS1-positiven Adenokarzinoms der Lunge (bestätigt durch *ROS-1* Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung): Zytoplasmatische Immunfärbung der Karzinomzellen mit unterschiedlicher Intensität (D4D6-Antikörper auf dem BOND-MAX-Färbeautomaten, Chromogen AEC, Originalvergrößerung 400:1). Die ICC wurde an einem in Delaunay fixierten und nach Papanicolaou gefärbten Ausstrich einer transbronchialen Nadelaspiration eines mediastinalen Lymphknotens durchgeführt

mische Nachweis von Fusionen auf Proteinebene ist eine breit verfügbare, kosteneffiziente Screeningmethode mit schneller Durchlaufzeit und kann einfach in prädiktive Testalgorithmen implementiert werden [15].

Im Gegensatz zur PD-L1-Immunchemie, bei der die PD-L1-Expression eine kontinuierliche Variabel mit beträchtlicher Heterogenität darstellt, liefert die Immunchemie bei onkogenen Fusionen in der Regel ein schwarz-weißes Resultat. Die meisten NSCLC mit einem *ALK*-, *ROS1*- oder *NTRK*-Rearrangement weisen ein deutlich sichtbares, diffuses immunchemisches Färbemuster der entsprechenden Proteine auf, was die Auswertung einfach macht. Da die Immunfärbung diffus und homogen über die Tumorzellen verteilt ist, reichen Proben mit nur 20 Tumorzellen für die Auswertung sowohl an histologischen als auch an zytologischen Proben aus [8].

ALK

Auf Grundlage vergleichender Studienergebnisse ist die ALK-IHC unter Verwendung des 5A4- (LDT) oder D5F3-Antikörper (LDT oder Assay) eine gleichwertige Alternative zur *ALK*-FISH, die früher als Goldstandard für die *ALK*-Untersuchung galt. Ein positives ALK-IHC-Ergebnis ist ausreichend für eine Behandlung mit einem ALK-Tyrosinkinase-Inhibitor [12]. Der au-

tomatisierte D5F3-*ALK*-Assay für BenchMark-Färbegeräte (Ventana Medical Systems, Inc., USA) kann die Einführung der *ALK*-IHC für FFPE-Proben erleichtern, da er keine umfangreiche lokale Revalidierung erfordert.

Für FFPE-CB zeigen *ALK*-IHC-Protokolle mit 5A4 oder D5F3 eine gute Übereinstimmung der Resultate mit der *ALK*-FISH. Mehrere Studien zeigen im Vergleich zur FISH eine Sensitivität von 100%, wobei die Spezifität etwas variabler ist und zwischen 83 und 100% liegt [8].

Die *ALK*-ICC kann an konventionellen zytologischen Proben eine hohe Übereinstimmung mit *ALK*-FISH- oder *ALK*-IHC-Ergebnissen von gepaarten histologischen NSCLC-Proben erzielen. Die Spezifitäten liegen zwischen 97 und 100%. Die Sensitivitäten sind jedoch variabler (66–100%), was die Notwendigkeit einer strengen Validierung und Qualitätskontrolle unterstreicht [19]. Es sollte auch bedacht werden, dass FISH ein schwieriger Goldstandard ist mit einer Rate an berichteten falsch positiven Resultaten von >10%, und das in erfahrenen FISH Labors [19, 21, 23].

Bei *ALK*-positiven NSCLC ist die *ALK*-Immunfärbung in der Regel zytoplasmatisch und diffus in allen Tumorzellen vorhanden und zeigt eine mittlerer bis starke Intensität (Abb. 2). Im Gegensatz zur *ALK*-IHC an histologischen Proben sollte ein positives

ALK-ICC-Ergebnis durch eine molekulare Methode bestätigt werden. Die Schwelle für die Einleitung einer molekularen Analyse sollte niedrig sein, um eine hohe Sensitivität zu gewährleisten. Selbst weniger als 20 positive Tumorzellen, unabhängig von der Färbintensität, sollten als diagnostisch angesehen werden und eine Bestätigungsuntersuchung mittels FISH oder NGS auslösen.

ROS1

Für *ROS1* gibt es 2 verfügbare Antikörperklone, den D4D6 (Cell Signaling Technology, USA) und den später eingeführten SP384 (Ventana Medical Systems, Inc.). Im Gegensatz zu *ALK* gibt es für *ROS1* keinen kommerziellen IHC-Assay.

Die D4D6-*ROS1*-IHC ist hochsensitiv für den Nachweis von *ROS1*-Rearrangements. Da die Spezifität im Vergleich zur *ALK*-IHC variabler ist, muss ein positives *ROS1*-IHC-Ergebnis durch eine molekulare Methode bestätigt werden, bevor eine Behandlung eingeleitet werden kann [12].

FFPE-CB und Pap-gefärbte Zytologiepräparate sind für die *ROS1*-ICC geeignet [1, 22, 28]. Vljajic et al. wiesen an 295 prospektiven Pap-gefärbten zytologischen NSCLC-Proben identische Ergebnisse für die D4D6-*ROS1*-ICC und für molekulare Untersuchungen (*ROS1*-FISH oder RNA-basierter NGS) nach. Die *ROS1*-ICC detektierte 13 *ROS1*-positive NSCLC (Sensitivität und Spezifität von 100%) [28]. Die Merkmale der *ROS1*-ICC-Färbung sind mit der *ROS1*-IHC an histologischen Proben vergleichbar. Positive NSCLC zeigen in der Regel eine diffuse zytoplasmatische Färbung, obwohl die Färbung heterogen sein und die Intensität der Färbung zwischen den Tumorzellen variieren kann (Abb. 3; [1]). Wie bei *ALK* sollte auch hier der Schwellenwert für die Einleitung einer molekularen Analyse niedrig gehalten werden.

Unspezifische *ROS1* Färbungen können bei nicht-neoplastischen Zellen, insbesondere bei reaktiven Typ-II-Pneumozyten und Makrophagen vorkommen [1].

NTRK

NTRK umfasst 3 Gene, *NTRK1*, -2 und -3, die für die Transmembran-Rezeptor-Tyrosinkinasen TRKA, -B bzw. -C kodieren. Die Häu-

figkeit von *NTRK*-Fusionen ist bei NSCLC sehr gering (0,02 %) und kann alle 3 *NTRK*-Gene betreffen [24]. Bei einer so tiefen Prävalenz ist die *NTRK*-FISH kein geeignetes Instrument für das Screening bei NSCLC, da für jedes der 3 *NTRK*-Gene 3 separate FISH-Tests erforderlich sind.

TRKA, -B und -C weisen einen hohen Grad an Homologie zwischen den Kinasedomänen auf und können alle mit dem pan-TRK-Antikörperklon EPR17341 (Abcam, Cambridge, UK) nachgewiesen werden. Ein kommerzieller CE-IVD pan-TRK(EPR17341)-Assay für BenchMark-Färbeautomaten (Ventana Medical Systems, Inc.) ist für FFPE-Proben erhältlich.

Es gibt noch keine veröffentlichten zytologiespezifischen Daten zur pan-TRK-ICC.

Die Expression von TRKA, -B und -C in adulten Geweben ist auf neurale Komponenten (z. B. kortikales Gehirn) und die Hoden beschränkt. Diese Gewebe können zur Erstellung von Positivkontrollen für die Etablierung einer pan-TRK-ICC verwendet werden. Die TRK-Expression kann in Intensität und subzellulärer Lokalisierung variieren, ist aber in den meisten Fällen zytoplasmatisch. Eine nukleäre Expression wird typischerweise bei *NTRK3*-Fusionen beobachtet [5]. Eine TRK-Färbung in $\geq 1\%$ der Tumorzellen gilt als positives IHC-Ergebnis, da Tumore mit einer *NTRK3*-Fusion eine sehr fokale oder schwache TRK-Färbung aufweisen können. Die Sensitivität der pan-TRK-IHC ist hoch für *NTRK1* und *NTRK2* (96,2 bzw. 100 %), aber nur 79,4 % für *NTRK3*-Fusionen. *NTRK3*-Fusionen können somit verpasst werden, sind aber äußerst selten bei NSCLC. Die Gesamtsensitivität und -spezifität der ICC beträgt bei NSCLC 87,5 % bzw. 100 % [24]. Nach den aktuellen Empfehlungen muss ein positives pan-TRK-IHC-Ergebnis noch durch eine molekulare Methode (FISH oder RNA-basiertes NGS) bestätigt werden [14].

Fazit für die Praxis

- Zytologische Proben sollten für prädiktive Biomarkeranalysen genutzt werden, um Patientinnen und Patienten nicht dem unnötigen Risiko einer erneuten Probenentnahme auszusetzen.
- Immunzytochemische (ICC) Untersuchungen an zytologischen Proben sind gängige Praxis und für die Diagnose und prädiktive

Biomarkeranalysen unverzichtbar geworden.

- An FFPE-Zellblöcken (formalinfixiert und paraffineingebettet, FFPE) kann die prädiktive ICC in der Regel zuverlässig mit standardisierten Protokollen, die für histologische Proben entwickelt wurden, durchgeführt werden.
- Da sich konventionelle zytologische Proben deutlich von FFPE-Proben unterscheiden, erfordert die Etablierung von prädiktiven ICC-Protokollen meist eine zytologiespezifische Anpassung der analytischen Variablen und eine separate Validierung.
- Qualitätskontrollmaßnahmen sind von entscheidender Bedeutung, um eine hohe Qualität prädiktiver ICC-Ergebnisse zu gewährleisten.

Korrespondenzadresse

PD Dr. Spasenija Savic Prince

Pathologie, Institut für Medizinische Genetik und Pathologie, Universitätsspital Basel
Schönbeinstrasse 40, 4031 Basel, Schweiz
Spasenija.SavicPrince@usb.ch

Danksagung. Besonderer Dank gilt Prof. Lukas Bubendorf, einer treibenden Kraft in der Etablierung und Untersuchung prädiktiver Biomarkeranalysen an zytologischen Präparaten. Dank auch dem ganze Zytopathologieteam des Instituts für medizinische Genetik und Pathologie am Universitätsspital Basel.

Funding. Open access funding provided by University of Basel

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. L. Brcic erhielt Referentenhonorare von Amgen, AstraZeneca, BMS, Eli Lilly, Janssen, MSD, Merck, Novartis und hat an Advisory Boards von Eli Lilly, Janssen, MSD, Merck, Novartis, teilgenommen. S. Savic Prince erhielt Referentenhonorare von Novartis Pharma Schweiz AG, Astra Zeneca AG und Merck Schweiz AG und hat an Advisory Boards von Astra Zeneca AG und Merck Schweiz AG teilgenommen.

Für diesen Beitrag wurden von den Autoren keine Studien an Menschen oder Tieren durchgeführt. Für die aufgeführten Studien gelten die jeweils dort angegebenen ethischen Richtlinien.

Open Access. Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden.

Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten

Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen.

Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Literatur

1. Bubendorf L, Buttner R, Al-Dayel F et al (2016) Testing for ROS1 in non-small cell lung cancer: a review with recommendations. *Virchows Arch* 469:489–503
2. Capizzi E, Ricci C, Giunchi F et al (2018) Validation of the immunohistochemical expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) on cytological smears in advanced non small cell lung cancer. *Cancer Treat Res* 126:9–14
3. Fitzgibbons PL, Bradley LA, Fatheree LA et al (2014) Principles of analytic validation of immunohistochemical assays: guideline from the College of American Pathologists Pathology and Laboratory Quality Center. *Arch Pathol Lab Med* 138:1432–1443
4. Gosney JR, Boothman AM, Ratcliffe M et al (2020) Cytology for PD-L1 testing: a systematic review. *Cancer Treat Res* 141:101–106
5. Hechtman JF (2022) *NTRK* insights: best practices for pathologists. *Mod Pathol* 35(3):298–305
6. Merck Sharp and Dohme (2022) BioPlaza. <https://www.bioplaza.com/mha/>. Zugegriffen: 01.02.2022
7. National Comprehensive Cancer Network (2022) Homepage. <https://www.nccn.org>. Zugegriffen: 01.02.2022
8. Jain D, Nambirajan A, Borczuk A et al (2019) Immunocytochemistry for predictive biomarker testing in lung cancer cytology. *Cancer Cytopathol* 127:325–339
9. Kirbis IS, Maxwell P, Flezar MS et al (2011) External quality control for immunocytochemistry on cytology samples: a review of UK NEQAS ICC (cytology module) results. *Cytopathology* 22:230–237
10. Koomen BM, Voorham QJM, Epskamp-Kuijpers C et al (2021) Considerable interlaboratory variation in PD-L1 positivity in a nationwide cohort of non-small cell lung cancer patients. *Cancer Treat Res* 159:117–126
11. Lantuejoul S, Sound-Tsao M, Cooper WA et al (2020) PD-L1 testing for lung cancer in 2019: perspective from the IASLC Pathology Committee. *J Thorac Oncol* 15:499–519
12. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL et al (2018) 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. *J Thorac Oncol* 13:323–358
13. Lozano MD, Abengozar-Muela M, Echeveste JI et al (2019) Programmed death-ligand 1 expression on direct Pap-stained cytology smears from non-small cell lung cancer: comparison with cell

- blocks and surgical resection specimens. *Cancer Cytopathol* 127:470–480
14. Marchio C, Scaltriti M, Ladanyi M et al (2019) ESMO recommendations on the standard methods to detect NTRK fusions in daily practice and clinical research. *Ann Oncol* 30:1417–1427
 15. Matter MS, Chijioko O, Savic S et al (2020) Narrative review of molecular pathways of kinase fusions and diagnostic approaches for their detection in non-small cell lung carcinomas. *Transl Lung Cancer Res* 9:2645–2655
 16. Munari E, Zamboni G, Sighele G et al (2019) Expression of programmed cell death ligand 1 in non-small cell lung cancer: Comparison between cytologic smears, core biopsies, and whole sections using the SP263 assay. *Cancer Cytopathol* 127:52–61
 17. Noll B, Wang WL, Gong Y et al (2018) Programmed death ligand 1 testing in non-small cell lung carcinoma cytology cell block and aspirate smear preparations. *Cancer Cytopathol* 126:342–352
 18. Plancharid D, Popat S, Kerr K et al (2018) Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 29:iv192–iv237
 19. Savic S, Bode B, Diebold J et al (2013) Detection of ALK-positive non-small-cell lung cancers on cytological specimens: high accuracy of immunocytochemistry with the 5A4 clone. *J Thorac Oncol* 8:1004–1011
 20. Savic S, Bubendorf L (2012) Role of fluorescence in situ hybridization in lung cancer cytology. *Acta Cytol* 56:611–621
 21. Savic S, Diebold J, Zimmermann AK et al (2015) Screening for ALK in non-small cell lung carcinomas: 5A4 and D5F3 antibodies perform equally well, but combined use with FISH is recommended. *Cancer Treat Res* 89:104–109
 22. Sholl LM, Sun H, Butaney M et al (2013) ROS1 immunohistochemistry for detection of ROS1-rearranged lung adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol* 37:1441–1449
 23. Sholl LM, Weremowicz S, Gray SW et al (2013) Combined use of ALK immunohistochemistry and FISH for optimal detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas. *J Thorac Oncol* 8:322–328
 24. Solomon JP, Linkov I, Rosado A et al (2020) NTRK fusion detection across multiple assays and 33,997 cases: diagnostic implications and pitfalls. *Mod Pathol* 33:38–46
 25. Srebotnik Kirbis I, Rodrigues Roque R, Bongiovanni M et al (2020) Immunocytochemistry practices in European cytopathology laboratories—review of European Federation of Cytology Societies (EFCS) online survey results with best practice recommendations. *Cancer Cytopathol* 128:757–766
 26. Tejerina E, García Tobar L, Echeveste JI et al (2021) PD-L1 in cytological samples: a review and a practical approach. *Front Med (Lausanne)* 8:668612
 27. Thunnissen E, Allen TC, Adam J et al (2018) Immunohistochemistry of pulmonary biomarkers: a perspective from members of the pulmonary pathology society. *Arch Pathol Lab Med* 142:408–419
 28. Vljajnic T, Savic S, Barascud A et al (2018) Detection of ROS1-positive non-small cell lung cancer on cytological specimens using immunocytochemistry. *Cancer Cytopathol* 126:421–429

Predictive immunocytochemistry in non-small cell lung carcinoma

Predictive immunochemistry is a time-, tumor sample- and cost-efficient method for testing the increasing number of predictive biomarkers in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). Immunohistochemistry (IHC) on formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tumor tissue has an established role in detecting PD-L1 expression and in ALK, ROS1, and more recently NTRK testing. Cytology specimens as a source for predictive biomarker testing in NSCLC is very important as up to 40% of all NSCLC are diagnosed by cytology alone.

Despite the established role of cytology in lung cancer diagnosis, no commercial IHC assays have been validated for cytology specimens.

FFPE cell blocks (CB) are the most straightforward cytology preparation for predictive immunocytochemistry (ICC) as the results are valid using protocols standardized for FFPE histology. But CB are not always available.

With non-CB cytology specimens being less standardized than FFPE histology and with considerable preanalytical variability, rigorous cytology-specific ICC protocol optimization, validation, and quality control are required. With this prerequisite, predictive ICC, most commonly performed on Papanicolaou-stained cytology specimens, is robust and reliable on non-CB preparations. This valuable material should not be underutilized for predictive biomarker testing, as this would put patients at risk of unnecessary repeat sampling. This review highlights preanalytical, analytical, and postanalytical aspects that may influence ICC results and summarizes the published data on predictive ICC for PD-L1, ALK, and ROS1 in NSCLC.

Keywords

Predictive · Immunocytochemistry · Lung cancer · Cytology · Biomarkers