

ДИАГНОСТИЧЕН ИМУНОХИСТОХИМИЧЕН ПАНЕЛ ЗА ЕНДОСКОПСКИ БИОПСИИ ПРИ ТИПИЗИРАНЕ НА НЕОПЕРАБИЛНИ БЕЛОДРОБНИ КАРЦИНОМИ

оригинални
статии

Торакална Медицина
Том V, март 2015, бр.1

С. Генова, В. Беловеждов, Д. Сертева

Катедра по Обща и клинична патология и секция съдебна медицина,
Медицински факултет, МУ – Пловдив

Резюме

Увод: До две трети от злокачествените неоплазми на белия дроб са неоперабилни, а диагнозата се установява от цитология или на ендоскопски биопсии. Едва в една от четири биопсии се използва имунохистохимията като диагностичен метод. Персонализираната терапия налага конкретно посочване вида на карциномите.

Цел: Да проучим възможностите и ограниченията при типизиране на умерено и ниско диференцирани белодробни карциноми в ендоскопски материали и да определим оптимален панел за диагностика в ежедневната практика.

Материали и методи: В периода 2012-2014 г. в УМБАЛ „Св. Георги“ – Пловдив проспективно са изследвани 170 ЕБ на пациенти от Южна България с белодробен карцином. Първоначално биопсиите са типизирани с панел от Napsin A, TTF-1 и p63. Тройно негативните проби са дотипизирани със Synaptophysin.

Резултати: Биопсичният материал по групи е: I. Малки, „диагностични биопсии“: n=37 (21.7%); II. ЕБ: n=119 (75%); VATS (Видео Асистирана Торакоскопия) – n=34 (25%); ЩБ (Щипкова Биопсия при бронхоскопско изследване) – n=85 (50%). ИХХ типизирани са 12 случая (17.24%). Нетипизираните ИХХ хистологии са 82.76%. Разпределение на биопсиите без ИХХ съгласно СЗО 2004г. е: аденокарциноми (АК) – 73; плоскоклетъчни (ПКК) – 68; аденосквамозни – 8; едроклетъчни карциноми – 8; недиференцирани (НОТ) – 13; невроендокринни (НЕ) – 0. След ИХХ и класификация съобразно IASLC – 2011 г. разпределението е: АК – 89; ПКК – 67; АдСКК и едроклетъчни – 0; НЕ – 3; НОТ – 11. Сензитивност и специфичност на маркерите е: TTF1 – съответно 70.0% и 100%; Napsin A – 73.0% и 100%; p63 – 71.8% и 100%. Панел: Napsin A/TTF1 – 86.0% и 100%; Napsin A/ TTF1/p63 – 84.2% и 60.0%; Napsin A/TTF1/p63/+Synaptophysin – 93.5% и 100%.

Изводи: Тройният панел NapsinA/TTF1 и p63, + Synaptophysin, подобрява диагностиката на ниско и недиференцираните ЕБ със 78.6%, като нетипизираните биопсии са сведени до 6.49%.

Ключови думи: имунохистохимия, Napsin A, TTF1, p63, Synaptophysin

DIAGNOSTIC IMMUNOHISTOCHEMICAL PANEL IN THE DIAGNOSTICS OF ENDOSCOPIC BIOPSIES FROM UNRESECTABLE LUNG CANCER CASES

S. Genova, V. Belovegdov, D. Serteva

Department of General and Clinical Pathology and Forensic Medicine, Medical Faculty;
Medical University – Plovdiv

Abstract

Introduction: Up to two thirds of malignant neoplasms of the lung are surgically unresectable, and the diagnosis is established by cytology or endoscopic biopsies. Only one of four biopsies use the immunohistochemistry as a diagnostic method. Personalized therapy requires accurate sub-classification of cancers.

Objective: To investigate the possibilities and limitations of typing moderately and poorly differentiated lung cancers in endoscopic biopsies and determine optimal panel for diagnosis in practice.

Materials and Methods: All cases of 170 EB from South Bulgarian patients with lung cancer were studied between 2012-2014, in the "St. George" Hospital – Plovdiv. Initial biopsies are typed with Napsin A, TTF-1 and p63. Synaptophysin were applied in triple negative samples.

Results: Biopsy groups: I. Small "diagnostic biopsies" – n=37 (21.7%); II. EB – n=119 (75%); VATS (Video Assisted thoracoscopy) – n=34 (25%); EB – n=85 (50%). There are 12 (17.24%) cases reviewed by immunohistochemistry. Untyped IHC histologies are 82.76%. Distribution of biopsies without IHC according to WHO 2004 is: adenocarcinomas (AC) – 73; squamous cell carcinomas (SCC) – 68; adeno-squamous – 8; large cell carcinomas – 8; undifferentiated NOS – 13; neuroendocrine NE – 0. After IHC and the classification according to IASLC – 2011 the distribution is: ACs – 89; SCC – 67; AdSCC and large cells – 0; NE – 3; NOT – 11. The sensitivity and specificity of the markers are: TTF1 – respectively 70.0% and 100%; NapsinA – 73.0% and 100%; p63 – 71.8% and 100%. Panel: Napsin A/TTF1 – 86.0% and 100%; NapsinA/TTF1/p63 – 84.2% and 60.0%; NapsinA/TTF1/p63/+Synaptophysin – 93.5% and 100%.

Conclusions: Triple panel of NapsinA/TTF1 and p63, + Synaptophysin, improves the diagnosis of low and undifferentiated EB by 78.6% and NOS biopsies are reduced to 6.49%.

Key words: immunohistochemistry, Napsin A, TTF1, p63, Synaptophysin

Съгласно принципите наложени от СЗО, морфологията винаги е била кредитирана като „златен стандарт“ въз основа на ексцизиранни хирургично материали (16). По отношение на „малките биопсии“ или цитологията, само морфологичните критерии не са достатъчни (5). Няколко са независимите причини, като например: ниска диференциация, артефакти, както и присъщата хетерогенност на недребноклетъчните белодробни карциноми (НД-КБК). Мнозинството от биопсичните диагнози в практиката се поставят само на рутинна светлинна микроскопия. Едва 1 от 4 биопсии използват имунохистохимията (ИХХ) като диагностичен метод. Нейното значение е изключително съществено за категоричното определяне на хистологичния вид рак (3).

В последно време навлиза все по-широко таргетната терапия със специфични блокери на тирозин-киназата и се налага субтипизиране на НДКБК. Установено е, че пациентите с белодробен аденокарцином (АК) е по-вероятно да имат EGFR мутации в сравнение с плоскоклетъчните белодробни карциноми (ПКК). Освен това в схемата на химиотерапевтичното лечение на сквамозните карциноми следва да отпадне медикаментът Bevacizumab (Avastin), който предизвиква фатални, масивни белодробни кръвоизливи. От друга страна, той добре повлиява белодробните аденокарциноми в комбинация с carboplatin и paclitaxel (2, 12).

Приблизително 65-75 % от пациентите с НД-КБК са в напреднал стадий на болестта и не подлежат на хирургично лечение (18). В тези случаи диагнозата често се основава само на ендоскопски биопсии (ЕБ) и цитология. Приема се, че добре диференцираните тумори не представляват реално диагностично предизвикателство. Слабо диференцираните са тези, които налагат прецизно изследване, за идентификация на вида им. Неоперабилните карциноми в IIIb и IV стадий, най-често са и ниско диференцирани. Изследване на Edwards et al., 2000г. (3), върху малки биопсии показва, че само 63% от ЕБ и не повече от 45% от цитологичния материал може да бъде правилно класифициран. Други изследвания установяват, че около 50% от тях имат шанс да бъдат субтипизирани (8). Обикновено в практиката се използва широк панел от антители за диагностика на малки биопсии като: TTF1, CK7, CK5/6, HMWCK, p63, p40, Desmocollin 3, който в много случаи е обемен и икономически неизгоден.

Цел

Да се проучат възможностите и ограниченията при типизиране на умерено и ниско диференцирани НДКБК в ендоскопски материали и да се определи оптимален и икономически изгоден панел за диагностика в ежедневната практика.

Работната хипотеза е, че с помощта на ИХХ панел от Napsin A (NapsA), TTF1, p63 и Synaptophysin може максимално ефективно да

According to the principles set by the WHO, the morphology is always defined as the "gold standard" based on surgically resected specimens (16). For "small biopsies" or cytology, the morphological criteria are not sufficient (5). There are several independent reasons, such as: low differentiation, artifacts, and characteristic heterogeneity of non-small cell lung carcinomas (NSCLC). The majority of biopsies in the histopathological practice are diagnosed only on routine light microscopy. Only for 1 in 4 biopsies immunohistochemistry (IHC) was used as a diagnostic method. Its importance is extremely significant for the definite determination of the histological type of cancer (3).

Recently, the target therapy with specific blockers of tyrosine kinase was introduced and increasingly used as treatment, which imposed the subtyping of NSCLC. It has been found that patients with lung adenocarcinomas (AC) are more likely to carry EGFR mutations compared with squamous cell lung carcinomas (SCC). Moreover, the drug Bevacizumab (Avastin), part of the chemotherapy regime of squamous cell carcinomas should be withdrawn, since it causes fatal, massive pulmonary hemorrhage. On the other hand, it has a very good effect on lung adenocarcinomas in combination with carboplatin and paclitaxel (2, 12).

Approximately 65-75 % of patients with NSCLC are at an advanced stage of the disease and are inoperable (18). In these cases, the diagnosis is often based only on endoscopic biopsies (EB) and cytology. It is assumed that well differentiated tumors do not constitute real diagnostic challenge. The poorly differentiated tumors are those that require precise examination in order to determine their type. The unresectable carcinomas in stage IIIb and IV are most often poorly differentiated. A study of Edwards et al., 2000 (3), on small biopsies showed that only 63% of the EB and not more than 45% of the cytologic material, can be correctly classified. Other studies have found that about 50% of them have a chance to be sub-typed (8). In practice we usually use a large panel of antibodies to diagnose small biopsies, as: TTF1, CK7, CK5/6, HMWCK, p63, p40, Desmocollin 3, which in many cases is voluminous and uneconomical.

Objective

To investigate the possibilities and limitations in determining the type of moderately and poorly differentiated NSCLC in endoscopic specimens and to establish the optimal and economical panel for diagnosis in the daily practice.

The working hypothesis is that lung cancers can be most effectively sub-typed with the aid of an IHC panel of Napsin A (NapsA), TTF1, p63 and

original articles
DIAGNOSTIC IMMUNOHISTOCHEMICAL PANEL IN THE DIAGNOSTICS OF ENDOSCOPIC BIOPSIES FROM UNRESECTABLE LUNG CANCER CASES
Thoracic Medicine
Volume V, March 2015, Issue 1

бъдат субтипизирани белодробните карциноми в малки и ендоскопски биопсии.

Материали и методи

Проспективно изследвахме 170 ЕБ от пациенти с НДКБК в периода 2012-2014 г. Материалите са от УМБАЛ „Св. Георги“ – Пловдив и изпратени за консултация материали от Южна България (Пловдив, Пловдив-област, Хасковска, Кърджалийска области).

Всички биопсии са фиксирани с неутрален, буфериран формалин. В изследването е отчетено времето на фиксация на биопсиите – 6h-12h, 12-24h.

Първоначално карциномите са типизирани на светлинен микроскоп чрез рутинно оцветяване с Н.Е. по класификацията от СЗО – 2004г. Определена е хистологичната диференциация – високо, умерено, ниско и недиференцирани карциноми (G1, G2, G3, G4).

Впоследствие биопсиите са типизирани първоначално с панел от три маркера NapsA, TTF-1 и p63. Тройно негативните проби са третираны допълнително със Synaptophysin.

За имунохистохимичното изследване са изработени срезове с дебелина 4µm. За неутрализиране на ендогенната пероксидаза се използва Peroxidase Block, 3% Hydrogen peroxide за 5min и материалите са промити с wash буфер на течаща вода. (Приготвяне на wash буфер: 50ml буфер в 950ml вода). Визуализиращата система е DAB Chromogen 1.74% (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, Novo Link Polymer Detection System) стабилизирани разтвор на хромоген за визуализиране (на 1ml DAB, 1 капка хромоген).

Антителата, които са използвани за работа са: 1. TTF1, мише моноклонално антитяло, клон SPT24 в разреждане 1:200 за 30min на 25°; антигенното възстановяване е проведено на водна баня при 98° с pH 6.0. Ядрен маркер. 2. NCL-L-Napsin A; клон IP64, мише моноклонално антитяло; разреждане на антитялото в съотношение 1:400. Инкубиране за 30min на 25°. Топлинното разкриване на антигените е с ERS (Epitope Retrieval Solution), с pH 6.0. Цитоплазмен маркер. 3. Мише моноклонално антитяло p63 Protein (NCL-p63), разреждане 1:50. Антигенно демаскиране на висока температура (98°), под налягане, използван е 1ml M цитратен буфер (pH 8.0). Първичното антитяло е инкубирано за 60min на 25°. Ядрен маркер. 4. Synaptophysin – клон 27G12, мише моноклонално антитяло. Антигенно демаскиране: на висока температура (98°), под налягане, с 1ml M цитратен буфер (pH 6.0). Цитоплазмен маркер.

Отчитане на резултатите е въз основа на разработени методи съобщени от Mukhopadhyay и Katzenstein, 2011г. (7), и Ring et al., 2009 (11). За всяко антитяло, пробата се счита за положителна, ако 10% или повече туморни клетки са маркирани. Случаи с <10% оцветяване, със слаб интензитет и липса на фокално положително оцветени области със силен интензитет

Synaptophysin, on small and endoscopic biopsies.

Materials and methods

Prospective study of 170 EB of patients with NSCLC in the period 2012-2014. The specimens are from University hospital "St. George" – Plovdiv and the ones, sent for consultation from South Bulgaria (Plovdiv, Plovdiv-district, Haskovo and Kardzhali districts).

All biopsies were fixed in neutral buffered formalin. The study also reports the time of fixation of the biopsies – 6h-12h, 12-24h.

Firstly, cancers are typed by light microscopy, routine staining with H.E. and classified according to WHO 2004 classification. The grade of histological differentiation was determined – high, moderate, low and undifferentiated carcinomas (G1, G2, G3, G4).

Subsequently the biopsies are typed by an initial panel of three markers NapsA, TTF-1 and p63. Triple-negative samples were further tested for Synaptophysin.

The immunohistochemical tests are made on sections with 4µm thickness. The endogenous peroxidase is neutralized by Peroxidase Block, 3% Hydrogen peroxide for 5min and then the specimens are washed with wash buffer on tap water. (Preparation of the wash buffer: 50ml of buffer in 950ml water). The visualization system is DAB Chromogen 1.74% (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, Novo Link Polymer Detection System) stabilized solution of the chromogen for visualization (1ml DAB, 1 drop chromogen).

The following antibodies were used: 1. TTF1, mouse monoclonal antibody, clone SPT24, diluted 1:200 for 30min at 25°; antigen retrieval was performed in water bath at 98°, pH 6.0. Nuclear marker. 2. NCL-L-Napsin A; clone IP64, mouse monoclonal antibody; diluted 1:400. Incubation for 30min at 25°. Thermal retrieval of antigens with ERS (Epitope Retrieval Solution), with pH 6.0. Cytoplasmic marker. 3. Mouse monoclonal antibody p63 Protein (NCL-p63), 1:50. Antigen retrieval at high temperature (98°), under pressure, 1ml M citrate buffer (pH 8.0) is used. The primary antibody was incubated for 60min at 25°. Nuclear marker. 4. Synaptophysin – clone 27G12, a mouse monoclonal antibody. Antigen unmasking: at high temperature (98°), under pressure, with 1ml M citrate buffer (pH 6.0). Cytoplasmic marker.

Reporting of results is based on the developed methods reported by Mukhopadhyay and Katzenstein, 2011 (7) and Ring et al., 2009 (11). The sample is considered positive if 10% or more of the tumor cells are marked, for each antibody. Cases with <10%, low intensity stain and lack of focal positively stained areas with strong intensity are marked as negative (N-nuclear, C-cytoplasmic

са отбелязани като негативни (N-ядрено, C-цитоплазмено маркиране).

Всяко антитяло е изследвано за сензитивност и специфичност самостоятелно и в панел по формули (19).

Резултати

Постъпилите материали от Южна България (Хасковска и Кърджалийска области) са 93 случая (54.65%); 77 са от Пловдив и Пловдивска област (45.36%). Мъжете са 148 (87.06%), а жените – 22 (12.94%). Възрастта на пациентите варира от 39 до 83 години. Средна възраст мъже: 63.5г. (±6.5). Средна възраст жени: 60.5г. (±17.0). Съотношение мъже/жени е 148/22 = 6.7:1.

Разпределението на биопсичния материал по групи е както следва: I. Малки, „диагностични биопсии“ при неоперабилни тумори, получени чрез експлоративна торакотомия; n=37 броя (21.7%); II. Ендоскопски биопсии: общо n=119 случая (75%). Получени чрез VATS (Видео Асистирана Торакокопия) – n=34 биопсии (25%); чрез ЩБ (Щипкова Биопсия при бронхоскопско изследване) – n=85 биопсии (50%).

Изследвани са и метастази: в лимфни възли 7 (1.8%); в главен мозък 2 (0.8%); в прешлен 3 (1.2%); по една 1 (0.56%) метастаза в кожа и в перикард; общо 14 бр. – (4.8%) (Фиг. 1).

Хистологична диференциация на туморите (оцв. Х.Е.):

Като високо диференциран (G1) не е установен нито един тумор – 0 биопсии;

Умерено диференцирани (G2) са 101 биопсии (59.3%); ниско диференцирани (G3) – 56 случая (33.0%); а невъзможност за диференцировка има при 13 материала – недиференцирани карциноми (G4 хистологичен стадий – 7.7%). От всичките 170 получени биопсии на НДКБК като ниско и недиференцирани карциноми (G3, G4) са определени 69 биопсии (40.7%). Първоначално имунохистохимично типизирани са 12 случая (17.24%). Нетипизираните ИХХ хистологии са 82.76% (Табл. 1).

reaction).

Each antibody was tested for sensitivity and specificity independently and in a panel on formulas (19).

Results

The samples received from South Bulgaria (Haskovo and Kardzhali districts) were 93 cases (54.65%); 77 are from Plovdiv and the region (45.36%). Number of men – 148 (87.06%), and of women – 22 (12.94%). The age of patients ranged from 39 to 83 years. Average age in men is 63.5yrs (±6.5) and in women: 60.5yrs (±17.0). Male/female ratio is 148/22 = 6.7:1.

The distribution of the biopsy groups is as follows: I. Small, "diagnostic biopsies" from unresectable tumors, taken by exploratory thoracotomy; n=37 (21.7%); II. Endoscopic biopsies, total n=119 cases (75%). Obtained by VATS (Video Assisted Thoracoscopy) – n=34 biopsies (25%); bronchoscopy – n=85 biopsies (50%).

Metastases were also examined: in lymph nodes 7 (1.8%); brain 2 (0.8%); vertebra 3 (1.2%); one (0.56%) metastasis to the skin and one to the pericardium; total number of 14 (4.8%) (Fig. 1).

Histological differentiation of the tumors (H.E. staining):

Of all tumors classified as highly differentiated (G1) – 0 biopsies; moderately differentiated (G2) are 101 biopsies (59.3%); poorly differentiated (G3) – 56 cases (33.0%); and lack of differentiation is established in 13 specimens – undifferentiated (G4 histological grade – 7.7%). Of all 170 biopsies of NSCLC, 69 biopsies (40.7%) were classified as poorly or undifferentiated carcinomas (G3, G4). Initially, 12 cases (17.24%) were examined immunohistochemically. Biopsies without IHC typing are 82.76% (Table 1).

original articles

DIAGNOSTIC
IMMUNOHISTOCHEMICAL PANEL
IN THE DIAGNOSTICS OF ENDOSCOPIC
BIOPSIES FROM UNRESECTABLE
LUNG CANCER CASES

Thoracic Medicine
Volume V, March 2015, Issue 1

Фиг. 1. Разпределение на биопсичния материал по хирургичен достъп.

Fig. 1. Distribution of biopsy specimens according to the surgical access.

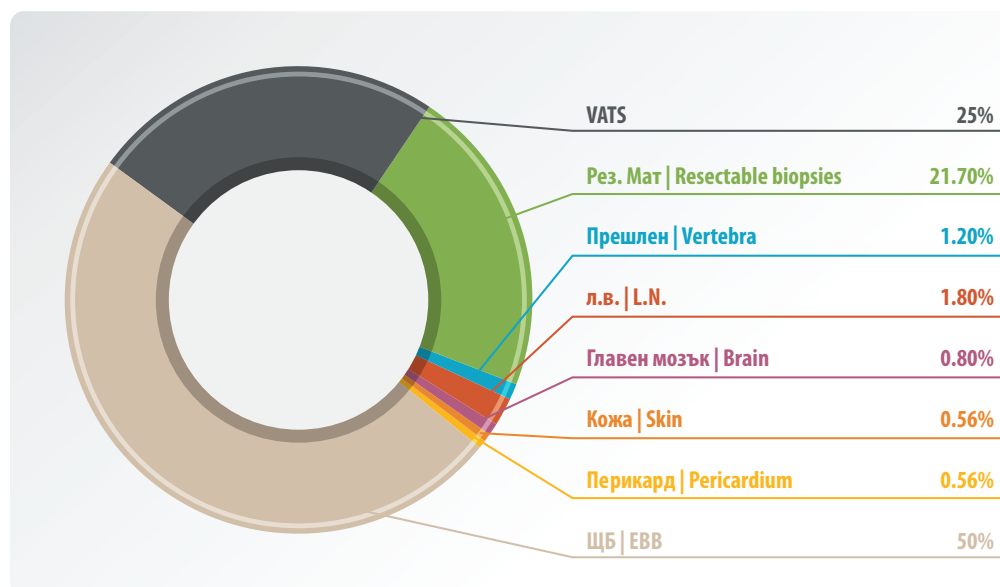


Табл. 1. Разпределение на биопсичния материал по възраст на пациентите, начин на вземане на материала, хистологична диференциация и ИХХ типизация.

Години	< 40-59 год.	50-59 год.	60-69 год.	70-80 < год.
Брой пациенти Процент	14 (8.2%)	36 (21.3%)	84 (49.5%)	36 (21.3%)
Биопсии	ЩБ	VATS	„диагностични биопсии“	други
Брой пациенти Процент	85 (50%)	34 (25%)	37 (21.7%)	14 (8.2%)
Хистологична диференциация	G2	G3	G4	G3 + G4
Брой пациенти Процент	101 (59.3%)	56 (33.0%)	13 (7.7%)	Общо 69 (40.7%)
ИХХ	ИХХ типизирани		Без ИХХ типизация	
Брой / Процент	12 (17.24%)		158 (82.76%)	

Table 1. Distribution of biopsy by age of patients, collection of biopsies, histological differentiation and immunohistochemistry.

Age groups	< 40-59 yrs	50-59 yrs	60-69 yrs	70-80 < yrs
Number of patients Rate	14 (8.2%)	36 (21.3%)	84 (49.5%)	36 (21.3%)
Biopsy	BB	VATS	„diagnostic biopsies“	Others
Number of patients Rate	85 (50%)	34 (25%)	37 (21.7%)	14 (8.2%)
Histological differentiation	G2	G3	G4	G3 + G4
Number of patients Rate	101 (59.3%)	56 (33.0%)	13 (7.7%)	Total 69 (40.7%)
IHC	IHC typed		Without IHC typing	
Number / Rate	12 (17.24%)		158 (82.76%)	

Разпределение на биопсиите съобразно първоначално диагностицираните материали класифицирани по СЗО от 2004 година, преди ИХХ типизиране показва следното: Аденокарциноми – n=73 случая (42.9%), от които: Солидни – 45 (61.7%); Папиларни – 11 (15.1%); БАК (лепидични) – 7 (9.6%); Ацинарни – 2 (2.7%); Муцинозни – 7 (9.6%); Аденоидно-кистични – 2 (2.7%); Аденосквамозни карциноми – 8 (4.7%). Плоскоклетъчни карциноми (ПКК) – n=68 случая (40.1%). Осем карцинома бяха типизирани по старата класификация като едроклетъчни (4.5%), а в 13 случая (7.6%) типизацията беше невъзможна и те са класифицирани като недребноклетъчни недиференцирани карциноми, неопределен тип (НДКБК-НОТ).

Разпределението на биопсичния материал след ИХХ типизиране съобразно последните критерии на Новата IASLC/American Thoracic Society/European Respiratory Society – Международна Мултидисциплинарна Класификация за НДКБК от 2011 година, за туморите на белия дроб (16): Аденокарциноми – n=89 случая (52.4%), от които: Солидни – 60/89 (67.4%); Папиларни – 11/89 (15.1%); БАК (лепидични) – 7/89 (9.6%); Муцинозни – 7/89 (9.6%); Ацинарни – 2/89 (2.7%); Аденоидно-кистични – 2/89 (2.7%); Плоскоклетъчни карциноми – n=67 случая (39.4%). Всички аденосквамозни

Distribution of biopsies according to the originally diagnosed specimens, classified by WHO 2004, before IHC typing revealed the following: Adenocarcinomas – n=73 cases (42.9%), of which: Solid – 45 (61.7%); Papillary – 11 (15.1%); BAC (lepidic) – 7 (9.6%); Acinar – 2 (2.7%); Mucinous – 7 (9.6%); Adenoid-cystic – 2 (2.7%); Adenosquamous carcinomas – 8 (4.7%). SCC – n=68 cases (40.1%). Eight carcinomas were typed by the old classification as large cell (4.5%) and in 13 cases (7.6%) typing was impossible and they were classified as non-small cell undifferentiated carcinomas, not other specified (NSCLC-NOS).

The distribution of biopsy specimens after IHC typing according to the latest criteria of the new IASLC/American Thoracic Society/European Respiratory Society – Multidisciplinary International Classification of NSCLC from 2011 of lung tumors (16): Adenocarcinomas – n=89 cases (52.4%), of which: Solid – 60/89 (67.4%); Papillary – 11/89 (15.1%); BAC (lepidic) – 7/89 (9.6%); Mucinous – 7/89 (9.6%); Acinar – 2/89 (2.7%); Adenoid-cystic – 2/89 (2.7%); SCC – n=67 cases (39.4%). All adenosquamous carcinomas are re-typed, as well as all large cell carcinomas; three were positive for Synaptophysin and were diagnosed as large cell

карциноми са ретипизирани, както и всички едроклетъчни карциноми, три са позитивни на Synaptophysin и са диагностицирани като едроклетъчни невроендокринни карциноми (ЕкНЕК), а в 11 случая (6.49%) всички маркери са негативни и те остават под рубриката недиференцирани карциноми (НОТ) (Табл. 2).

neuroendocrine carcinomas (LCNEC), while in 11 cases (6.49%) all markers are negative and remain under the rubric undifferentiated carcinomas (NOS) (Tab. 2):

original articles

DIAGNOSTIC IMMUNOHISTOCHEMICAL PANEL IN THE DIAGNOSTICS OF ENDOSCOPIC BIOPSIES FROM UNRESECTABLE LUNG CANCER CASES

Thoracic Medicine
Volume V, March 2015, Issue 1

Табл. 2. Субтипизиране на белодробните карциноми преди и след ИХХ.

Хистология:	Без ИХХ, СЗО – 2004 г.		След ИХХ типизиране IASLC – 2011 г.	
	Брой	Проценти %	Брой	Проценти %
Аденокарциноми				
Хистолог. варианти:	73/170	42.9	89/170	(52.4%)
Солидни	45/73	61.7	60/89	(67.4%)
Папиларни	11/73	15.1	11/89	(12.4%)
БАК (лепидични)	7/73	9.6	7/89	(7.84%)
Ацинарни	2/73	2.7	2/89	(2.24%)
Муцинозни	7/73	9.6	7/89	(7.84%)
Аденоиднокистични	2/73	2.7	2/89	(2.24%)
Аденосквамозни	8/170	(4.7)	0	0%
Плоскоклетъчни карциноми	68/170	40.1	67/170	(39.4%)
Едроклетъчни карциноми	8/170	4.5	0	0%
Недиференцирани карциноми, НОТ	13/170	7.6	11/170	(6.49%)
НЕ, едроклетъчен карцином	0	0	3/170	(1.76%)
Общо:	170	100	170	100%

Table 2. Subtyped lung cancers before and after IHC.

Histology:	No IHC, WHO – 2004 г.		After IHC IASLC – 2011 г.	
	Number	Percent %	Number	Percent %
Adenocarcinomas				
Histolog. types:	73/170	42.9	89/170	(52.4%)
Solid	45/73	61.7	60/89	(67.4%)
Papillary	11/73	15.1	11/89	(12.4%)
BAC (lepidic)	7/73	9.6	7/89	(7.84%)
Acinar	2/73	2.7	2/89	(2.24%)
Mucinous	7/73	9.6	7/89	(7.84%)
Adenoid cystic	2/73	2.7	2/89	(2.24%)
Adenosquamous	8/170	(4.7)	0	0%
Squamous cell carcinomas	68/170	40.1	67/170	(39.4%)
Large cell carcinomas	8/170	4.5	0	0%
Non-differentiated, NOS	13/170	7.6	11/170	(6.49%)
NEC, large cell	0	0	3/170	(1.76%)
Total:	170	100	170	100%

Разпределение на позитивността при първични белодробни ПКК. Сензитивност и специфичност в ПКК след тестване с два маркера TTF1/p63 и три маркера NapsA/TTF1/p63 на 170 ЕБ: След първоначалното типизиране с два маркера TTF1/p63, 56 от 67 ПКК дадоха TTF1(-)/p63(+) профил – 83.6%. Тринадесет умерено диференцирани ПКК (G2) са двойно негативни TTF1(-)/p63(-). След дотипизиране с Napsin A и оцветяване с PAS-диастаза, същите ендоскопски биопсии остават тройно негативни. От-

Distribution of the positivity in primary pulmonary SCC. Sensitivity and specificity in SCC after testing of 170 EB with two markers TTF1/p63 and three markers NapsA/TTF1/p63: After the initial typing with two markers TTF1/p63, 56 out of 67 SCC showed TTF1-/p63+ profile – 83.6%. Thirteen moderately differentiated SCC, (G2) are double negative TTF1-/p63-. After further testing with NapsA and staining with PAS-diastase, the same endoscopic biopsies remain triple negative. The negative reaction to NapsA confirmed squamous

оригинални статии

ДИАГНОСТИЧЕН
ИМУНОХИСТОХИМИЧЕН ПАНЕЛ
ЗА ЕНДОСКОПСКИ БИОПСИИ ПРИ
ТИПИЗИРАНЕ НА НЕОПЕРАБИЛНИ
БЕЛОДРОБНИ КАРЦИНОМИ

Торакална Медицина
Том V, март 2015, бр. 1

рицателната за NapsA реакция потвърждава плоскоклетъчната диференциация. В тези случаи наличието на междуклетъчни мостчета и липсата на муцин при оцветяване с PAS е в подкрепа на ПМК. Сензитивността за ПМК се оказва доста ниска – 71.8%, поради 22/170 двойно негативни биопсии (11 ПМК и 11 недиференцирани карциноми). Пределната точност е с умерени стойности 87.05%. Не се отчитат фалшиво позитивни резултати, поради което специфичността е 100%.

След тестване с три маркера TTF1/p63/NapsA, поради липса на фалшиво позитивни материали специфичността на p63 като маркер за ПМК остана 100%, но вероятността от фалшиво негативни резултати е – 16.4%. Чувствителността и пределната точност при типизиране с три маркера нарасна съответно на 85.9% и 93.5%. В ПМК са ретипизирани 6 АК, 4 недиференцирани карцинома, 2 АД-СКК и 2 едроклетъчни карцинома – общо 14 биопсии.

Сензитивност и специфичност на TTF1 в АК след тестване на 170 ендоскопски биопсии: Общо 70 от 89 аденокарциноми са позитивни на TTF1 (78.7%). От целия биопсичен масив фалшиво негативни са 30 случая. След дотипизиране с NapsA 16 биопсии дадоха позитивна експресия, но 11 остават двойно негативни. От трите ЕкНЕК карцинома нито един не експресира TTF1, което даде 100% специфичност на маркера (Фиг. 2).

Сензитивност и специфичност на NapsA в АК след тестване на 170 ендоскопски биопсии: Позитивна експресия на NapsA дадоха 73 от 89 аденокарцинома (82.02%). От всички ендоскопски биопсии фалшиво негативни са 27/170 случая, от които 13 биопсии са NapsA-/TTF1+; (14.6%). Нито един от останалите типове карциноми (ПМК и НЕ карциноми) не показва фалшива експресия на NapsA, което доказва 100% специфичност на маркера.

cell differentiation. In these cases the presence of intercellular bridges and absence of mucin staining with PAS is to support the diagnosis of SCC. The sensitivity for SCC has been quite low – 71.8%, due to the 22/170 double negative biopsies (11 SCC and 11 undifferentiated carcinomas). Marginal accuracy is in moderate value – 87.05%. No false positive results were detected and thus the specificity is 100%.

After testing with three markers TTF1/p63/NapsA, due to the lack of false positive specimens, the specificity of p63 as a marker for SCC is 100%, but the probability of false negative results was – 16.4%. Sensitivity and marginal accuracy of immunohistochemical typing with three markers increased to 85.9% and 93.5%, respectively. To SCC are retyped 6 adenocarcinomas, 4 undifferentiated carcinomas, 2 adenosquamous carcinomas (Ad-SCC) and 2 large cell carcinomas – a total of 14 biopsies.

Sensitivity and specificity of TTF1 in Adenocarcinomas after testing 170 endoscopic biopsies: A total of 70 out of 89 adenocarcinomas are positive for TTF1 (78.7%). Out of the whole set of biopsies only 30 cases were falsely negative. After additional typing with NapsA, 16 biopsies showed positive reaction, but 11 remained double negative. Out of the three LCNEC none expresses TTF1, which gave 100% specificity for the marker (Fig. 2).

Sensitivity and specificity of NapsA in AC after testing 170 endoscopic biopsies: 73 out of 89 adenocarcinomas (82.02%) showed positive expression for NapsA. Out of all endoscopic biopsies 27/170 are falsely negative, 13 of which were NapsA-/TTF1+; (14.6%). None of the other types of carcinomas (SCC and NEC) showed false expression for NapsA, demonstrating 100% specificity of the marker.

Фиг. 2.

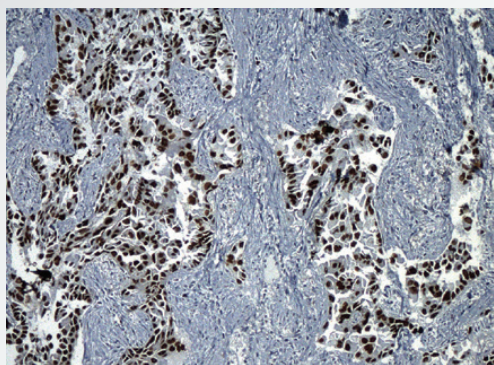
a) TTF1 (+), Ниско диференциран сквамиден АК. VATS, инфилтрация в плевра, ув.х10.

b) NapsinA, цитоплазмени гранули в ниско диференциран АК, ув.х20.

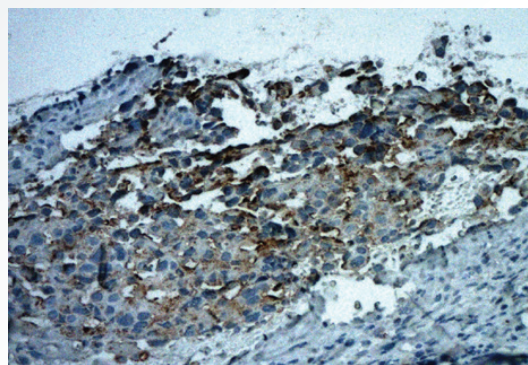
Fig. 2.

a) TTF1 (+), poorly differentiated squamoid AC, magnification x10. Insert: VATS, infiltration of the pleura, o. m. x4.

b) NapsinA, cytoplasmic granules in poorly differentiated AC, magnification x20.



a



b

Сензитивност и специфичност на два маркера NapsA/TTF1 в АК след тестване на 170 ендоскопски биопсии: От 89 аденокарцинома 86 са екзактно типизирани с два маркера NapsA/TTF1 (96.6%). Само три папиларни аденокарцинома остават двойно негативни, а 11 недиференцирани карциноми също не показват експресия. Чувствителността в АК с NapsA/TTF1 е 86.0%, а пределната точност 91.8% със 100% специфичност на изследването. Нито един материал не даде фалшива позитивност.

Сензитивност и специфичност за всички НДКБК след тестване с три маркера TTF1/p63/NapsA, n=170: При типизиране с три маркера се постигна висока сензитивност 91.6%, със 100% специфичност и пределна точност 95.6%. Тройно негативни остават 14 материала: три папиларни аденокарцинома и 11 недиференцирани карцинома, неопределен тип. NapsA подобри диагностиката с 14%, като позитивира 18 негативни за TTF1 АК и потвърди плоскоклетъчната природа на 13 сквамозни карцинома.

Сензитивност и специфичност в ЕБ след тестване с четири маркера TTF1/p63/NapsA/Synaptophysin: При тестване с четири маркера 11 ЕБ остават негативни по отношение и на четирите маркера и остават в групата на НОТ – неопределени. При тях субтипизирането е невъзможно. Тези биопсии са фиксирани под 12 часа в неутрален буферизиран формалин. Позитивни поне на един маркер са 159/170 ЕБ. Фалшива позитивност не е отчетена. С троен панел от NapsA/TTF1/p63 и добавен Synaptophysin в негативните случаи ние постигнахме 93.5% сензитивност при 100% специфичност, с пределна точност 96.7% (Фиг. 3).

След пълен имунохистохимичен анализ ние ретипизирахме 44/170 (25.9%) ЕБ. Всички 44 биопсии са ниско или недиференцирани (G3,

Sensitivity and specificity of two markers, NapsA/TTF1, in AC after testing 170 endoscopic biopsies: From 89 adenocarcinomas, 86 are typed with two markers – NapsA/TTF1 (96.6%). Only three papillary adenocarcinomas remain double negative and 11 undifferentiated carcinomas also showed no expression. The sensitivity of NapsA/TTF1 in AC is 86.0% and the marginal accuracy is 91.8% with 100% specificity of the study. No specimen showed false positivity.

Sensitivity and specificity for all NSCLC after testing with three markers, TTF1/p63/NapsA, n=170: When typing with three markers, high sensitivity of 91.6%, with 100% specificity and 95.6% marginal accuracy is achieved. Fourteen specimens remain triple negative: three papillary adenocarcinomas and 11 undifferentiated carcinomas, undefined type. NapsA improves the diagnosis by 14% as 18 TTF1 negative AC showed positive reaction for NapsA and it also confirmed the squamous cell nature of 13 squamous carcinomas.

Sensitivity and specificity in EB after testing with four markers TTF1/p63/NapsA/Synaptophysin: With four markers 11 EB are negative for all four and remain in the group of NOS – unspecified when testing. Their sub-typing is impossible. These biopsies were fixed less than 12 hours in neutral buffered formalin. 159/170 EB are positive for at least one of the four markers. False positivity is not reported. With triple panel of NapsA/TTF1/p63 and the addition of Synaptophysin in the negative cases, we achieved 93.5% sensitivity, 100% specificity, with marginal accuracy of 96.7% (Fig. 3).

After full immunohistochemical analysis 44/170 (25.9%) EB were typed. All 44 biopsies are low or undifferentiated (G3, G4). In our study, triple

original articles

DIAGNOSTIC IMMUNOHISTOCHEMICAL PANEL IN THE DIAGNOSTICS OF ENDOSCOPIC BIOPSIES FROM UNRESECTABLE LUNG CANCER CASES

Thoracic Medicine
Volume V, March 2015, Issue 1

Фиг. 3.

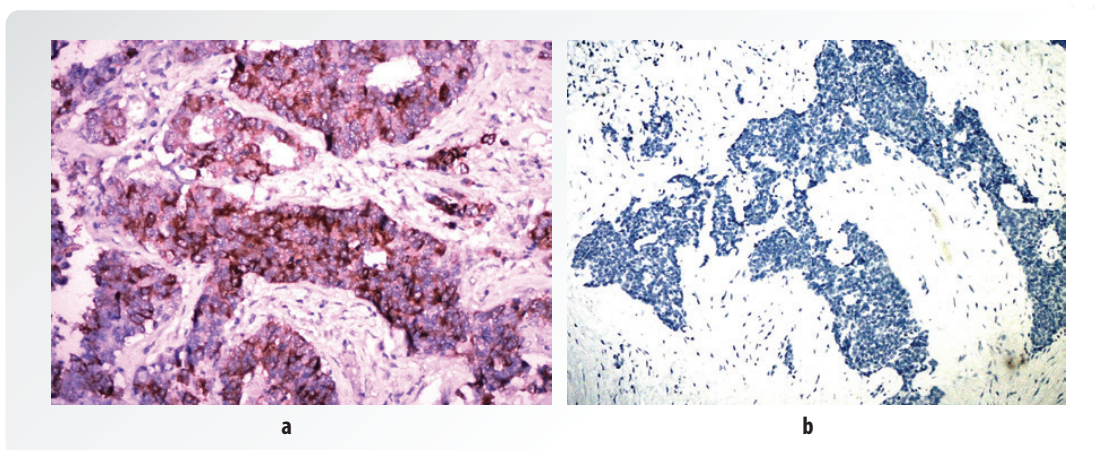
a) Synaptophysin (++) при тройно негативна ЕБ – ЕкНЕК. Гнезден строеж с glandularни структури симулиращи ниско диференциран аденокарцином ув.х20

b) TTF1 (-) ув. х10. NapsinA (-), p63 (-), не е показан.

Fig. 3.

a) Synaptophysin (++) in triple negative EB – LCNEC. Nested architecture with glandular structures simulating low differentiated adenocarcinoma, x20;

b) TTF1 (-), x10. NapsinA (-), p63 (-), not shown.



G4). В нашето изследване тройният панел + Synaptophysin, подобри диагностиката в 78.6% (44/56) от случаите на ниско диференцираните карциноми (Табл. 3).

panel + Synaptophysin improved the diagnosis in 78.6% (44/56) of the cases with poorly differentiated carcinomas (Table 3).

Табл. 3. Сензитивност и специфичност на имунохистохимични маркери самостоятелно и в панел, в първични белодробни карциноми тествани на ендоскопски материал. Легенда: ППС-позитивна предиктивна стойност; НПС-негативна предиктивна стойност; НЕ-невроендокринни.

Маркери	Хист. вид	Сензитивност	Специфичност	ППС	НПС	Пределна точност
Napsin A	АК	73.0%	100%	100%	72.2%	84.1%
TTF1	АК	70.0%	100%	100%	70.0%	82.3%
p63	ПКК	71.8%	100%	100%	80.7%	87.05%
NapsA/TTF1	АК	86.0%	100%	100%	83.3%	91.8%
NapsA/TTF1/p63	НДКБК +НЕ	91.6%	100%	100%	91.8%	95.6%
NapsA/TTF1/p63 +Synaptophysin	НДКБК +НЕ	93.5%	100%	100%	93.5%	96.7%
NapsA/TTF1/p63 +Synaptophysin + PAS-D	НДКБК +НЕ	95.5%	100%	100%	95.5%	96.9%

Table 3. Sensitivity and specificity of the immunohistochemical markers in primary lung carcinomas tested on endoscopic material alone and in panel. Legend: PPV- positive predictive value; NPV-negative predictive value; NEC-neuroendocrine carcinomas.

Markers	Hist. type	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	Overall accuracy
Napsin A	АК	73.0%	100%	100%	72.2%	84.1%
TTF1	АК	70.0%	100%	100%	70.0%	82.3%
p63	ПКК	71.8%	100%	100%	80.7%	87.05%
NapsA/TTF1	АК	86.0%	100%	100%	83.3%	91.8%
NapsA/TTF1/p63	НДКБК +НЕ	91.6%	100%	100%	91.8%	95.6%
NapsA/TTF1/p63 +Synaptophysin	НДКБК +НЕ	93.5%	100%	100%	93.5%	96.7%
NapsA/TTF1/p63 +Synaptophysin + PAS-D	НДКБК +НЕ	95.5%	100%	100%	95.5%	96.9%

Обсъждане:

В ежедневната практика хистологичното субтипизиране на НДКБК е въз основа на задълбочена хистологична преценка върху резекционни материали. По-голямата част от НДКБК – АК и ПКК, се разграничават чрез стандартни морфологични критерии. Това обаче може да доведе до грешки в интерпретацията на малките материали, тъй като в белодробните АК често има коагулационна некроза, при което клетки добиват сквамоиден вид, псевдокератозни промени и пикнотични ядра. На свой ред, в клетките на свамозните карциноми могат да се визуализират дегенеративни вакуоли, които симулират муцин, ядрата са мехурести, с големи нуклеоли, а при ниско диференцираните форми клетките губят своите мостчета и се окръглят (17). Тези затруднения се наблюдават особено често в „малките диагностичните биопсии“ – ендоскопски щипкови материали, видео асистираните торакоскопски материали (VATS), биопсии от метастази в лимфни възли,

Discussion

The histological subtyping of NSCLC in daily practice is based on a thorough assessment of the histological findings on resection specimens. The majority of NSCLC – AC and SCC, differ according to the standard morphological criteria. However, this can lead to errors in the interpretation of small specimens, since there is often coagulation necrosis in lung AC, due to which some cells acquire squamoid appearance, pseudokeratin changes and pyknotic nuclei. On the other hand, in the cells of squamous cell carcinomas there can be visualized degenerative vacuoles simulating mucin, the nuclei are big, with large nucleoli, and in low-differentiated carcinomas, the cells lose their intercellular bridges and become rounded (17). These difficulties occur explicitly often in the "small diagnostic biopsies" – bronchoscopic specimens, video-assisted thoracoscopic specimens (VATS) and biopsies of metastases in lymph nodes, skin, bones and other. Cytology, even if it is convincing, can hardly be a reliable criterion for

кожа, кости и други. Цитологията, дори когато е убедителна, трудно може да бъде надежден критерий за определяне на хистологичния вид.

Най-добри са възможностите за бърза и успешна диагностика чрез ендобронхиалната, ендоскопска, щипкова биопсия. В нашето изследване така взет, достатъчен за диагностика е бил половината от постъпилите материал ~ 50%. Другият леснодостъпен и информативен метод, чрез който са получени биоптати от парietална плевра е видео-асистираната торакоскопия – те съставляват ¼ от случаите. Близко една четвърт са и малките материали, биопсирани чрез торакоцентеза на неоперабилни карциноми, частични резекции от метастатични белодробни карциноми в лимфни възли, прешлени, мозък, кожа и перикард. Подобреното на инвазивната диагностика в повечето случаи (65.43%) се дължи на диагностичните нужди при неоперабилните белодробни карциноми, където заболяването е в IIIb и IV клинични стадии. Адекватната терапията при тези пациентите изисква хистологична типизация и мутационен анализ.

В нашето проучване, в ЕБ преобладават умерено диференцираните карциноми, като делът на ниско и недиференцираните тумори също е висок – 40.7%. Първоначално имунохистохимично типизирани са само 12 биопсии от 170, като нетипизираните са 82.76%.

След ИХХ типизиране броят на аденокарциномите нараства от 73 на 89. От 8 АдСКК – 2 са ретипизирани в ПКК, 4 в АК, а 2 не позитивират нито един маркер. В тези случаи най-често сквамOIDната природа на аденокарциномите, солиден вариант, са подвеждали в насока ПКК, едроклетъчни или смесени варианти.

Крайните резултати след ИХХ типизирането на ЕБ показват, че съществена дял от хистологичните варианти заемат солидните ниско диференцирани, (G3) АК – 60/89 (67.4%). На второ място са папиларните АК – 11/89 (15.1%), които са умерено диференцирани (G2) и въпреки, че могат да са двойно негативни на NapsA-/TTF1- (3/11 в нашите изследвания), а понякога и р63 позитивни, диагностиката им не е проблемна именно благодарение на папиларната структура.

В ЕБ от 89 АК, TTF1 е позитивен в 70 материала – 78.7%, като 19 АК остават отрицателни на TTF1 (21.4%). В целия изследван материал n=170, TTF1 показва сензитивност и специфичност съответно 70.0% и 100%, с пределна точност 82.3%. Нито един материал не даде фалшива позитивност, но отчитаме голям брой фалшиво негативни случаи, общо 30 (17.6%). Ендоскопските биопсии дали фалшиво отрицателни резултати са фиксирани по-малко от 12 часа. От тях при допълнително типизиране с NapsA, 16 ЕБ дават позитивност на NapsA, (TTF1-/NapsA+ профил). В целия ендоскопски материал отчитаме 13 отрицателни на NapsA АК (14.6%). Сензитивността и специфичност-

determining the histological type.

The best chances for quick and accurate diagnosis are found in bronchoscopic biopsies. In our study, about 50% of those specimens were in a sufficient quantity to be diagnosed. Another easily accessible and informative method by which biopsies of parietal pleura were obtained is the video-assisted thoracoscopy – they are ¼ of the cases. Nearly a quarter are also the small specimens of unresectable cancers, biopsied by thoracocentesis, partial resection of metastatic lung cancer in lymph nodes, spine, brain, skin and pericardium. The improvement of the invasive diagnosis in most cases (65.43%) is due to the diagnostic needs of unresectable lung cancer cases in IIIb and IV clinical stages. Adequate therapy for these patients requires histological typing and mutational analysis.

In our study, in the EB the moderately differentiated carcinomas prevail, but the share of the poorly and undifferentiated tumors is also high – 40.7%. Initially only 12 out of 170 biopsies were tested immunohistochemically, the untyped are 82.76%. After IHC typing, the number of adenocarcinomas increased from 73 to 89. Out of 8 adenocarcinomas increased from 73 to 89. Out of 8 adenocarcinomas – 2 are re-typed as SCC, 4 as AC and 2 are not positive for any marker. In these cases most often the squamoid nature of the adenocarcinomas, solid variant, is misleading in the direction of SCC, large cell or mixed variants.

The final results, after immunohistochemical typing of the EB, show that the solid poorly differentiated, (G3) ACs – 60/89 (67.4%) occupies a substantial proportion of the histological variants. In second place are the papillary AC – 11/89 (15.1%), which are moderately differentiated (G2), and although they may be negative for NapsA-/TTF1-, 3/11, and sometimes p63-positive, their diagnosis is not problematic, thank to their papillary structure.

In the EB 89 are AC and in 70 of them TTF1 is positive – 78.7%, while 19 AC remain negative for TTF1 (21.4%). In the total amount of specimens studied n=170, TTF1 shows sensitivity and specificity, 70.0% and 100%, respectively, with marginal accuracy of 82.3%. No specimen showed false positivity, but we report a large number of false negative cases, a total of 30 (17.6%). Endoscopic biopsies that are falsely negative are fixed less than 12 hours. Of these, after further typing with NapsA, 16 EB are positive for NapsA, (TTF1-/NapsA+ profile). Among all EB, we report 13 ACs, which are negative for NapsA (14.6%). The sensitivity and specificity of NapsA in EB is comparable to that of TTF1 (73.0% and 100% respectively,

**original
articles**

DIAGNOSTIC
IMMUNOHISTOCHEMICAL PANEL
IN THE DIAGNOSTICS OF ENDOSCOPIC
BIOPSIES FROM UNRESECTABLE
LUNG CANCER CASES

Thoracic Medicine
Volume V, March 2015, Issue 1

оригинални статии

ДИАГНОСТИЧЕН
ИМУНОХИСТОХИМИЧЕН ПАНЕЛ
ЗА ЕНДОСКОПСКИ БИОПСИИ ПРИ
ТИПИЗИРАНЕ НА НЕОПЕРАБИЛНИ
БЕЛОДРОБНИ КАРЦИНОМИ

Торакална Медицина
Том V, март 2015, бр.1

та на NapsA в EB е съпоставима с тази на TTF1 (съответно 73.0% и 100% с пределна точност 84.1%), По-ниска сензитивност на TTF1 в EB публикува Loo, 2010 (6) – 54% при специфичност 97%, а по-висока Sterlachi, 2012 (14) – 83.5% върху таканен микрочип (TM). Сходни с нашите резултати ~ 70%-75% докладват Rossi, 2004 (13) и Tacha, 2012 (15).

Комбинацията от два маркера NapsA/TTF1 в EB значително повишава чувствителността на 86.0% при 100% специфичност, с пределна точност 91.8%. От солидните нискодиференцирани карциноми 14 биопсии остават двойно негативни на NapsA-/TTF1-.

Сензитивността и специфичността с двойна комбинация от NapsA/TTF1 при субтипизиране на белодробните АК в редица проучвания дава вариабилни, но близки стойности: Fatima et al., 2011(4) – 74% и 87% върху диагностика на цитологичен материал; Ao Ming-Hui, 2014(1) – 85.7% и 75.0%; и 89.6% и 90.0% (TM); 74% сензитивност и 88% до 96% специфичност (core биопсии); Noh and Shim, 2011 (9) – 75% и 98%.

На EB p63 даде интензивна дифузна експресия в 56 от 67 ПКК, 11 от ПКК са негативни на p63. Диагностицирането им е възможно благодарение на умерено диференцираните случаи с ясни междуклетъчни мостчета и кератин, като TTF1 и NapsA са отрицателни в тези биопсии. В EB чувствителността на p63 също е ниска 71.8%, но със 100% специфичност, без фалшиво позитивни материали. Пределната точност е 87.05%. Нашите резултати за p63 върху EB са по-ниски от съобщените в литературата: 93.5% чувствителност и 80.0 % специфичност, TM (1).

Това налага използването на p63 винаги в съпоставка с маркери за АК. 12 от биопсиите (17.84%) типизирани като АК, АдСКК и недиференцирани карциноми са ретипизирани в ПКК, което потвърждава необходимостта от имунохистохимична верификация на биопсичния материал.

Pelosi et al., 2011 (10), препоръчва оптимален панел за тестване на малки биопсии и резекционен материал с TTF1, CK7, CK5/6, p63 и vimentin и постига коректна диагноза в 94% от биопсиите, като диагностичното уточняване прогресивно е нарастнала от: 67% коректност на светлинна микроскопия; до 84% при преглед на материала от експертни патолози; на 94% с използването на ИХХ. Позитивната предиктивна стойност в това изследване за ПКК е 97%, 88% за АК и 100% за саркоматоидни и аденосквамозни карциноми.

Loo, 2010, (6), с помощта на панел от p63, TTF1, HMWCK, CK5/6, S100A7 и оцветяване за муцин (Alcian blue/PAS) при типизиране на НД-КБК-НОТ в EB, не успяват да субтипизират само 7 % от случаите.

След пълен имунохистохимичен анализ ние ретипизирахме 44/170 (25.9%) от EB. Всичките 44 биопсии са ниско или недиференцирани (G3, G4), като подобрената диагностика след

with marginal accuracy of 84.1%). Loo, 2010 (6) published lower sensitivity of TTF1 in EB – 54%, at specificity of 97%, while Sterlachi, 2012, (14) – higher, at 83.5% on Tissue Microarray (TM). Similar to our results ~ 70%-75%, reported Rossi, 2004; (13) and Tacha, 2012; (15).

The combination of two markers NapsA/TTF1 in EB significantly increases the sensitivity to 86.0% at 100% specificity, with marginal accuracy of 91.8%. Fourteen of the solid poorly differentiated carcinomas remain double negative for NapsA- / TTF1-.

The sensitivity and specificity of the double combination of NapsA/TTF1 in the subtyped lung AC gave variable but similar values in numerous studies: Fatima et al., 2011, (4) 74% and 87% on cytological smears; Ao Ming-Hui, 2014(1) – 85.7% and 75.0%; and 89.6% and 90.0% (TM); 74% sensitivity and 88% to 96% specificity (core biopsy); Noh and Shim, 2011, (9) 75% and 98%.

On EB, p63 shows intensively diffuse expression in 56 out of 67 SCC, 11 SCC are negative for p63. The diagnosis is made possible thanks to the moderately differentiated cases with clear intercellular bridges and keratin, as TTF1 and NapsA are also negative in these biopsies. In the EB the sensitivity of p63 is also low 71.8%, but with 100% specificity, with no false-positive samples. The marginal accuracy is at 87.05%. Our results for p63 on EB is lower than reported in the literature: 93.5% sensitivity and 80.0% specificity, TM (Ao, 2014, (1)).

This requires the use of p63 always in comparison with markers for AC. 12 of the biopsies (17.84%) typed as AC, AdSCC and undifferentiated carcinomas are re-typed as SCC, which confirms the need for immunohistochemical verification of biopsy specimens.

Pelosi, 2011, (10) recommends an optimal panel for testing small biopsies and resection specimens with TTF1, CK7, CK5/6, p63 and vimentin and achieves a correct diagnosis in 94% of the biopsies, as diagnostics progressively increased: from 67% correctness of light microscopy, to 84% in the review of the specimens by expert pathologists; 94% with the use of IHC. The positive predictive value of this study for SCC was 97%, 88% for AC and 100% for sarcomatoid and adenosquamous carcinomas.

Loo, 2010, (6) used a panel of p63, TTF1, HMWCK, CK5/6, S100A7 and staining for mucin (Alcian blue/PAS) when typing the NSCLC-NOS. They fail to subtype only 7% of the cases.

Complete immunohistochemical analysis helped to re-type 44/170 (25.9%) of EB. All 44 biopsies were poorly or undifferentiated (G3, G4), and the improved diagnostics, after triple panel + Synaptophysin, in these cases showed 78.6%

троен панел + Synaptophysin, в тези случаи показва 78.6% (44/56) ефективност.

Нашият пропуск в субтипизирането е сведен до 6.49% от ЕБ при икономически по-изгоден панел.

Заклучение

В малки биопсични материали, в ниско диференцирани карциноми е уместно плоскоклетъчна диференциация да се приема само при дифузна и интензивна експресия на p63, при отрицателни TTF1 и Napsin A.

Двойният панел: моноклонално анти тяло NapsinA/TTF1 при типизация на ЕБ (един ядрен и един цитоплазмен маркер) подобряват чувствително диагностиката на първичните белодробни АК на малък и ендоскопски материал, като повишават пределната точност с почти 14%.

По-ниската чувствителност на ИХХ маркерите в ЕБ се свързва с кратката фиксация на материала (под 12 часа). Въпреки малките си размери (1-2 mm) фиксацията на щипкови, ендобронхиални, core и VATS биопсии за 12-24 часа, в неутрален буфериран формалин значително повишава чувствителността на имунохистохимичното изследване.

Тройният панел NapsinA/TTF1/p63, + Synaptophysin в негативните биопсии, подобрява диагностиката на ниско и недиференцираните ЕБ със 78.6%.

От авторите

Проучването е финансирано по проект спечелен в Медицински Университет – Пловдив. Изследването върху резекционни материали и сравнителната характеристика с резултатите в ендоскопските биопсии ще бъдат публикувани в следващи ръкописи.

(44/56) accuracy.

Our gap in subtyping is reduced to 6.49% of EB with a more economic panel.

Conclusion

In small biopsy specimens, in poorly differentiated carcinomas, squamous cell differentiation is only appropriate to be accepted if there is a diffuse and intensive expression of p63, in TTF1 and Napsin A negative cases.

The double panel of monoclonal antibody NapsinA/TTF1 used for typing EB (a nuclear and a cytoplasmic marker), significantly improve the diagnosis of the primary lung carcinoma in small and endoscopic specimens, increasing the marginal accuracy up to nearly 14%.

The lower sensitivity of TTF1 in EB is linked to the brief fixation of the material (under 12 hours). Despite their small size (1-2 mm), the fixation of bronchoscopic biopsies and VATS for 12-24 hours in neutral buffered formalin, significantly enhances the sensitivity of the immunohistochemical testing.

The triple panel of NapsinA/TTF1 and p63, with added Synaptophysin in the negative biopsies, improves the diagnosis of low and undifferentiated EB by 78.6%.

Acknowledgements

The study was funded by a project won at the Medical University of Plovdiv. The study on resection specimens and the comparative results with endoscopic biopsies will be published in subsequent manuscripts.

Книгопис:

References:

1. Ao Ming-Hui, Hui Zhang, L. Sakowski et al. The utility of a novel triple marker (combination of TTF1, napsin A, and p40) in the subclassification of non-small cell lung cancer. *Hum Pathol* 2014; 45(5): 926–934.
2. Drilon A, N Rekhtman, M Landanyi and P Paik. Squamous-cell carcinomas of the lung: emerging biology, controversies, and the promise of targeted therapy. *Lancet Oncol*. 2012; 13: e418–26.
3. Edwards SL, Roberts C, McKean ME, et al. Preoperative histological classification of primary lung cancer: accuracy of diagnosis and use of the non-small cell category. *J Clin Pathol* 2000; 53: 537–540.
4. Fatima N., C. Cohen, D. Lawson and M. Siddiqui. TTF-1 and Napsin A a double stain a useful marker for diagnosing lung adenocarcinoma on fine-needle aspiration cell block. *Cancer Cytopathology* 2011; 119:127-33.
5. Kerr K. Pulmonary adenocarcinomas: classification and reporting. *Histopathology* 2009; 54: 12–27.
6. Loo PS, Thomas SC, Nicolson MC et al. Subtyping of Undifferentiated Non-small Cell Carcinomas in Bronchial Biopsy Specimens. *J Thor Oncol* 2010; 5(4): 442–447.
7. Mukhopadhyay S and Katzenstein AL. Subclassification of non-small cell lung carcinomas lacking morphologic differentiation on biopsy specimens: utility of an immunohistochemical panel containing TTF-1, Napsin A, p63, and CK5/6. *Am J Surg Pathol* 2011; 35:15–25.
8. Nicholson AG, Gonzales D, Shah P et al. Refining the diagnosis and EGFR status of non-small cell lung carcinoma in biopsy and cytological material, using a panel of mucin staining, TTF-1, cytokeratin 5/6, and p63, and EGFR mutation analysis. *J Thorac Oncol* 2010; 5: 436–41.
9. Noh S and H Shim. Optimal combination of immunohistochemical markers for subclassification of non-small cell lung carcinomas: A tissue microarray study of poorly differentiated areas. *Lung Cancer* 2012; 76: 51–55.
10. Pelosi G, G. Rossi, F. Bianchi et al. Immunohistochemistry by means of widely agreed-Upon Markers (Cytokeratins 5/6 and 7, p63, Thyroid Transcription Factor-1, and Vimentin) on Small Biopsies of Non-small Cell Lung Cancer Effectively Parallels the Corresponding Profiling and Eventual Diagnoses on Surgical Specimens. *J Thor Oncol*. 2011; 6(6): 1039–49.
11. Ring BZ, Seitz RS, Beck RA et al. A novel five-antibody immunohistochemical test for subclassification of lung carcinoma. *Mod Pathol*. 2009; 22: 1032–1043.
12. Rossi G, Pelosi G, Graziano P, Barbareschi M, Papotti M. A reevaluation of the clinical significance of histological subtyping of non-small-cell lung carcinoma: diagnostic algorithms in the era of personalized treatments. *Int J Surg Pathol* 2009; 17: 206–218.
13. Rossi G., A. Marchioni, M Milani, R. Scotti et al. TTF-1, Cytokeratin 7, 34βe12, and CD56/ NCAM immunostaining in the subclassification of large cell carcinomas of the lung. *Am J Clin Pathol* 2004; 122: 884–893.
14. Sterlacci W, Sp. Savic, Th. Schmid et al. Tissue-sparing application of the newly proposed IASLC/ATS/ERS classification of adenocarcinoma of the lung shows practical diagnostic and prognostic impact. *Am J Clin Pathol*. 2012; 137: 946–56.
15. Tacha D., CH. Yu, R Bremer, W Qi and TH Haas. A6-antibody panel for the classification of lung adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2012; 20: 201–07.
16. Travis WD, E. Brambilla, M. Noguchi, AG. Nicholson et al. Diagnosis of lung adenocarcinoma in resected specimens. Implication of 2011 international association for the study of Lung Cancer/ American Thoracic Society/European Respiratory Society Classification. *Arch Pathol Lab Med*. 2012; 136: 1 – 23.
17. Travis WD, Rekhtman N, Riley GJ, et al. Pathologic diagnosis of advanced lung cancer based on small biopsies and cytology: a paradigm shift. *J Thorac Oncol* 2010; 5: 411–414.
18. Vinod SK, O'Connell DL, Simonella L et al. Gaps in optimal care for lung cancer. *J Thorac Oncol* 2008; 3: 871–9.
19. Yahya Z, H Ali, and H Hussein. Evaluation of the Sensitivity and Specificity of Immunohistochemical Markers in the Differential Diagnosis of Effusion Cytology. *Oman Medical Journal* 2013; 28 (6): 410-416.

original articles

DIAGNOSTIC IMMUNOHISTOCHEMICAL PANEL IN THE DIAGNOSTICS OF ENDOSCOPIC BIOPSIES FROM UNRESECTABLE LUNG CANCER CASES

Thoracic Medicine
Volume V, March 2015, Issue 1

Кореспонденция:

Д-р Силвия Генова,
Катедра по обща и клинична патология и секция съдебна медицина,
Медицински факултет,
Медицински Университет – Пловдив,
Бул. “В. Априлов” 15А

Correspondence:

Silvia Genova MD
Department of General and Clinical Pathology and Forensic Medicine,
Medical Faculty,
Medical University-Plovdiv
V. Aprilov blvd. 15A

e-mail: sylvia_genova@abv.bg