

Meer doen op minder cellen: predictieve biomarkers in cytologie

MIRTHE DE BOER – PATHOLOOG RIJNSTATE ARNHEM

BREGJE KOOMEN – AIOS PATHOLOGIE UMC UTRECHT

Disclosures

Geen belangenverstrengeling.

Mentimeter vraag 1

Welke rol(len) heb je binnen de pathologie (meerdere antwoorden mogelijk)

- A. Analist histologie
- B. Analist cytologie
- C. Analist moleculaire pathologie
- D. Analist immunologie
- E. Leidinggevende/manager
- F. KMBP-er
- G. AIOS
- H. Patholoog
- I. Ik heb geen rol binnen de pathologie
- J. Anders namelijk:

Cytologie in de huidige praktijk

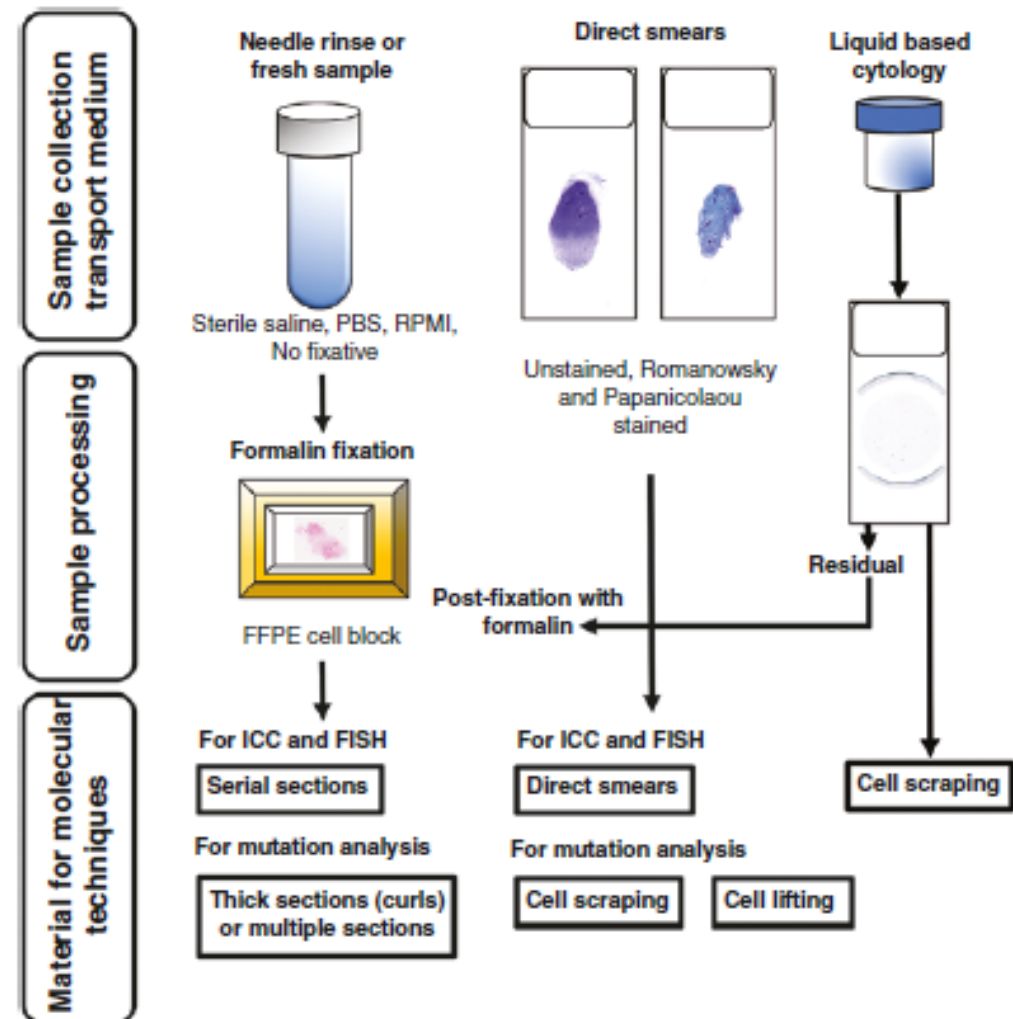
- Screening
- Primaire (pre-operatieve) diagnostiek
- Disseminatieonderzoek bij bekende maligniteit
 - Bevestiging van een klinische verdenking (bijvoorbeeld metastase)
- Predictief onderzoek bij bekende maligniteit (moleculair/immuuncytochemisch)



Voordeel	Nadeel/risico
Minimaal invasief	Beperkt materiaal, mogelijk niet representatief
Snel	Niet altijd geschikt, weefselverband ontbreekt
Goedkoop	Heterogene bewerking
Betrouwbaar (bij ervaring)	Training/ervaring noodzakelijk
Soms betere DNA kwaliteit	Soms beperkte mogelijkheden voor aanvullend onderzoek

Aanvullende bepalingen mogelijkheden en variabelen

- Punctietechniek en opvangmethode
- Kwaliteit preparaat:
 - Hoe oud is het preparaat/blokje
 - Vitaliteit/fixatie van de cellen
- Fixatiemethode en duur
- Nafixatie en duur
- Inblokmethode
- Eventuele eerdere kleuring preparaat
- ICC kleuring en kleurprotocol
- Moleculaire techniek



De toekomst van de cytologie

- Verdere ontwikkelingen/technieken moleculair onderzoek
- Verdere ontwikkelingen therapieën en mogelijk bijbehorende predictieve bepalingen
- Digitale cytologie
- AI ondersteunde screening



Mentimeter vraag 2

Zijn alle immuuncytochemische kleuringen die jullie uitvoeren op cytologisch (ingeblokt) materiaal apart gevalideerd?

- A. Ja, elke kleuring is per bewerkingsmethode gevalideerd, niet gevalideerde kleuringen voeren wij niet uit.
- B. Een deel van de kleuringen is gevalideerd, bij de niet gevalideerde kleuringen staat een aparte opmerking en negatieve kleuringen of kleuringen waarbij een interne positieve controle ontbreekt worden als niet betrouwbaar beschouwd.
- C. Nee, de kleuringen op cytologie zijn niet gevalideerd.
- D. Niet van toepassing, ons cytologisch ingeblokke materiaal wordt het zelfde bewerkt als histologisch weefsel. Aparte validatie is niet nodig.
- E. Weet ik niet.

Mentimeter vraag 3

Ervaar je wel eens problemen met betrekking tot de immuuncytochemie?

- A. Ja, de kleuringen, ook de gevalideerde kleuringen, zijn soms onbetrouwbaar/van wisselende kwaliteit.
- B. Ja, de niet gevalideerde kleuringen zijn van wisselende kwaliteit. De gevalideerde kleuringen zijn wel heel betrouwbaar.
- C. Nee.
- D. Weet ik niet.
- E. Anders.....

Predictieve biomarker: PD-L1

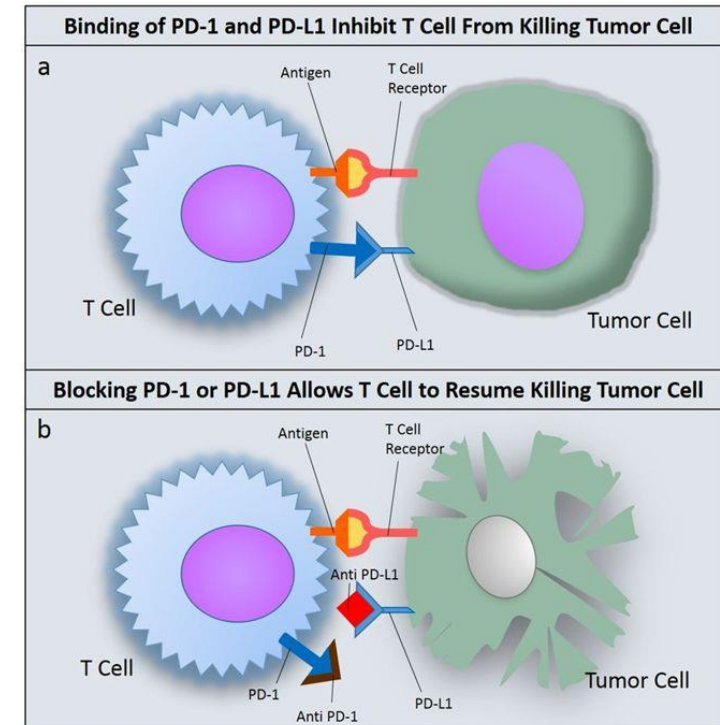
Predictieve biomarker voorspelt de responskans op therapie

Immunotherapie gericht tegen PD-1/PD-L1 in veel kankersoorten
(o.a. long, hoofd-hals, blaas, cervix, mamma)

PD-L1 immuunhistochemie fungeert als predictieve marker

- Percentage PD-L1 positieve tumorcellen (TPS)
- Verschillende cutoff waarden in klinische praktijk

PD-L1 expressie bepaalt dus therapiekeuze en moet accuraat gemeten worden!



Caldwell et al. *Scientific Reports*. 2017;7(1):13682.

Landelijke variatie in PD-L1 positiviteit

Studie naar variatie in PD-L1 positiviteit tussen pathologielabs in NL

PALGA data: alle patiënten met niet-kleincellig longcarcinoom (NSCLC) in NL bij wie PD-L1 werd bepaald (periode 1,5 jaar)

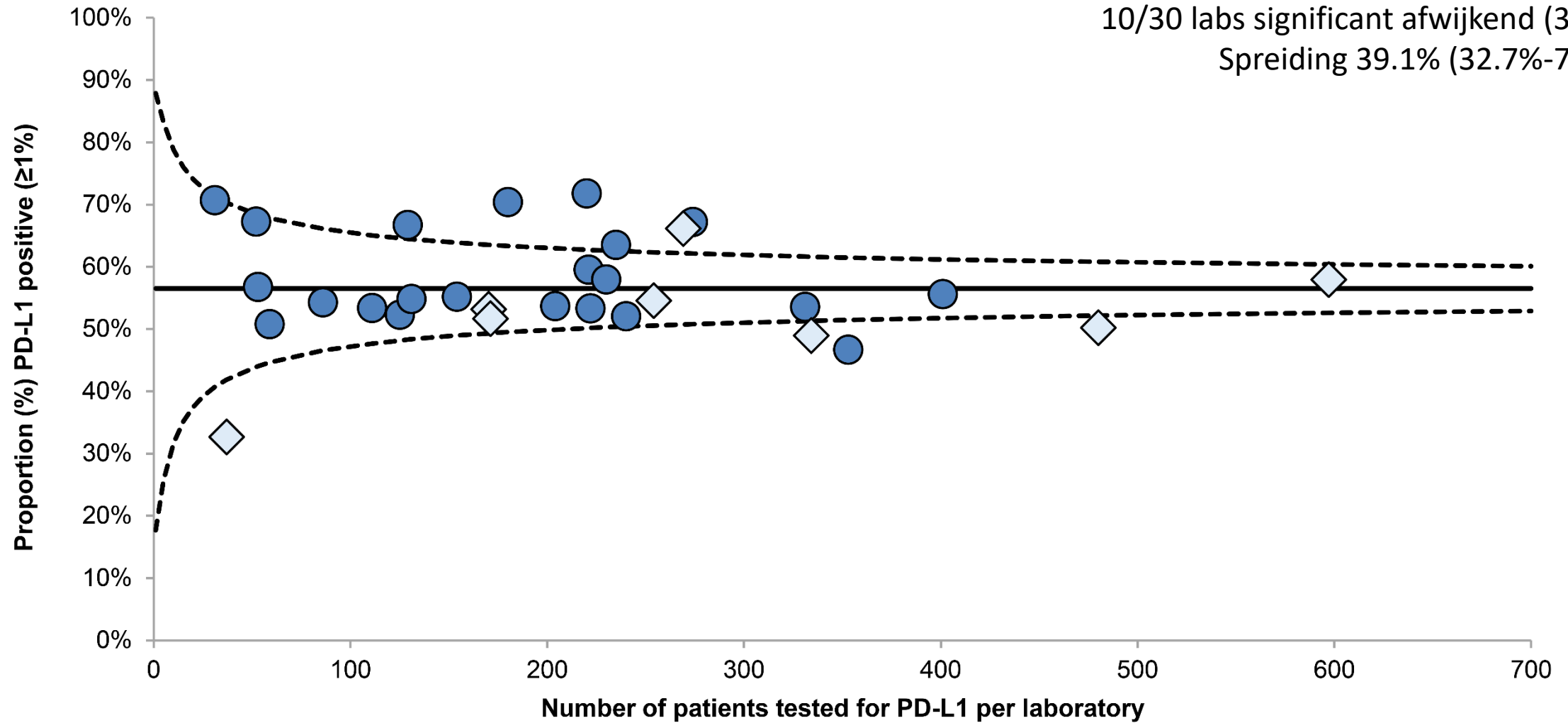
- 8725 patiënten in totaal
- Bij 6755 patiënten PD-L1 kleuring op histologie
- Bij 2300 patiënten PD-L1 kleuring op cytologie (niet gevalideerd in clinical trials)

Voor ieder lab gemiddelde PD-L1 positiviteit bepaald o.b.v. 1% cutoff en 50% cutoff

Hoe groot is de variatie in PD-L1 positiviteit tussen labs?

a: histology; $\geq 1\%$ cutoff

Gemiddelde PD-L1 positiviteit = 56.5%
10/30 labs significant afwijkend (33.3%)
Spreiding 39.1% (32.7%-71.8%)



— Mean national proportion

- - - 95% confidence limits

● Individual laboratory, non-academic (case mix adjusted)

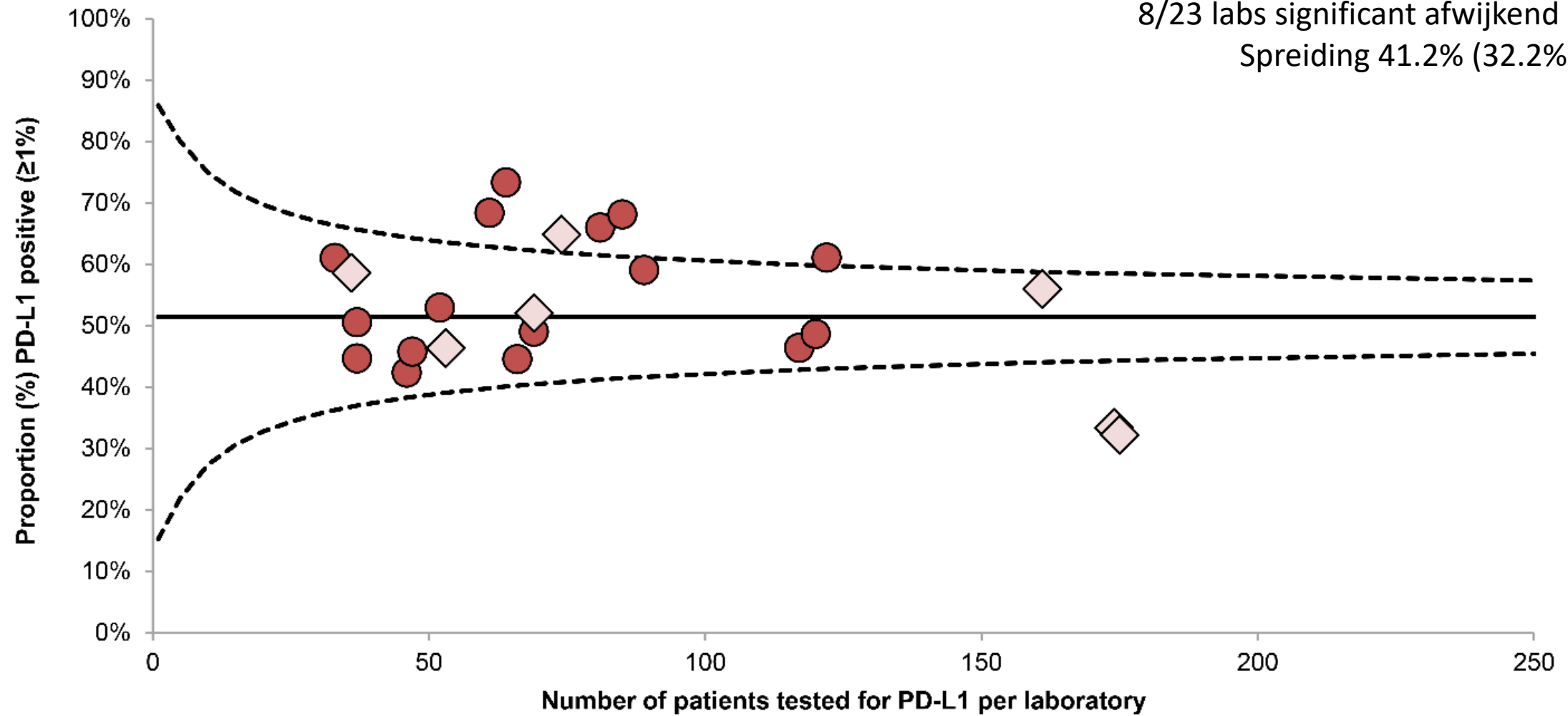
◇ Individual laboratory, academic (case mix adjusted)

a: cytology; $\geq 1\%$ cutoff

Gemiddelde PD-L1 positiviteit = 51.4%

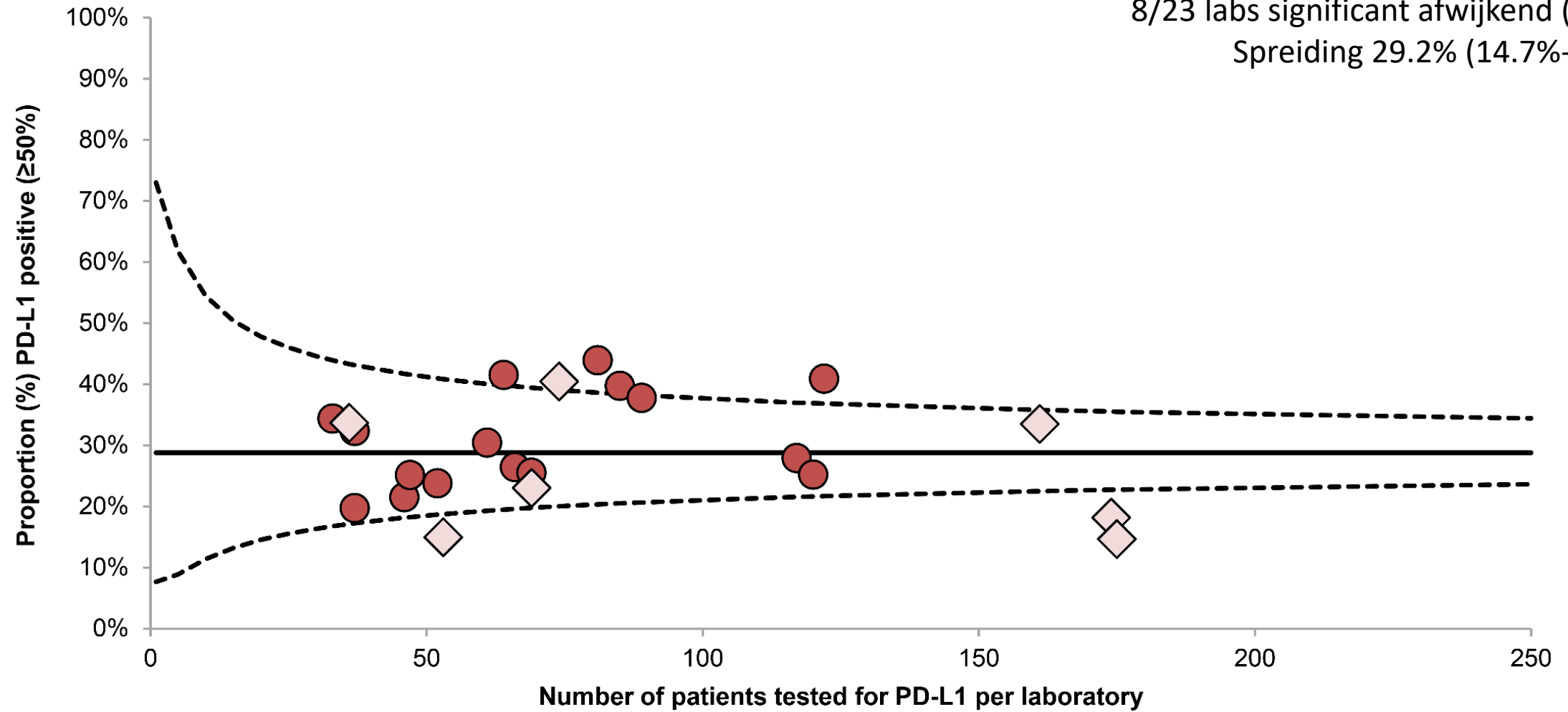
8/23 labs significant afwijkend (34.8%)

Spreading 41.2% (32.2%-73.4%)



b: cytology; $\geq 50\%$ cutoff

Gemiddelde PD-L1 positiviteit = 28.8%
8/23 labs significant afwijkend (34.8%)
Spreading 29.2% (14.7%-43.9%)



— Mean national proportion

- - - 95% confidence limits

● Individual laboratory, non-academic (case mix adjusted)

◇ Individual laboratory, academic (case mix adjusted)

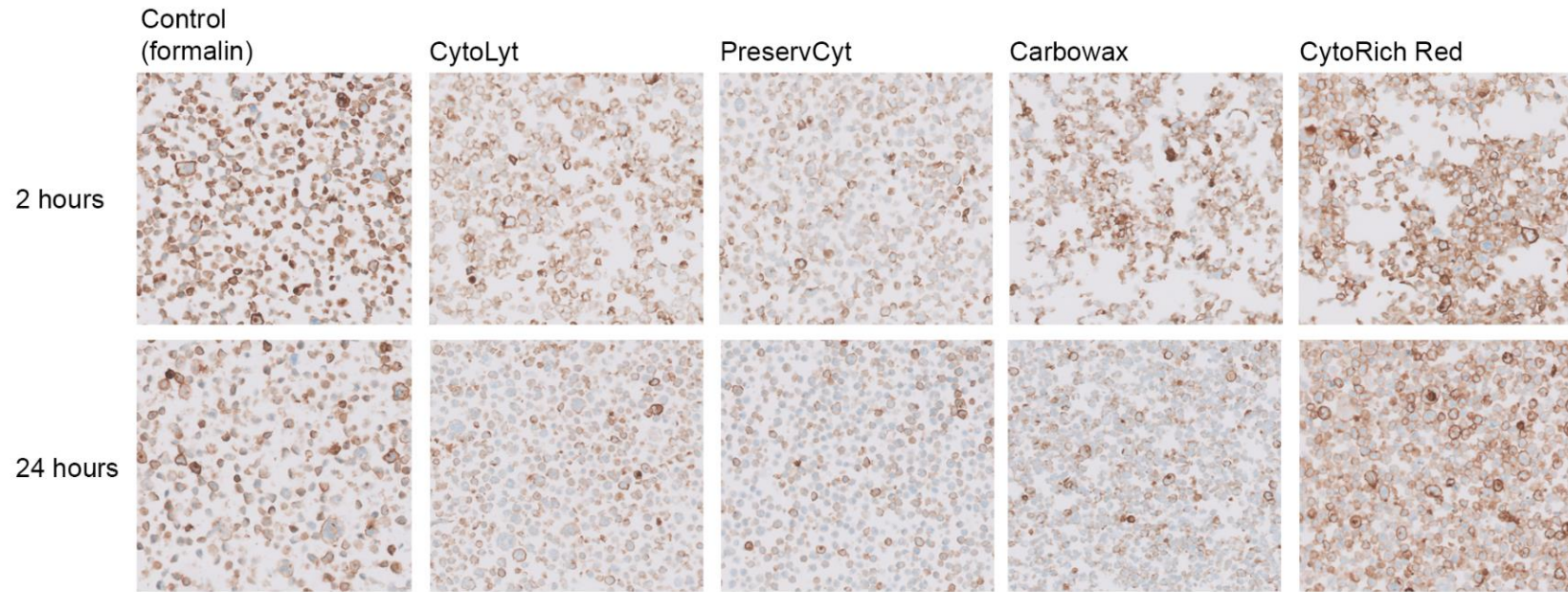
Variatie tussen labs is groot!

Bij histologie meeste variatie bij 1% cutoff → vermoedelijk speelt interobserver variatie een belangrijke rol

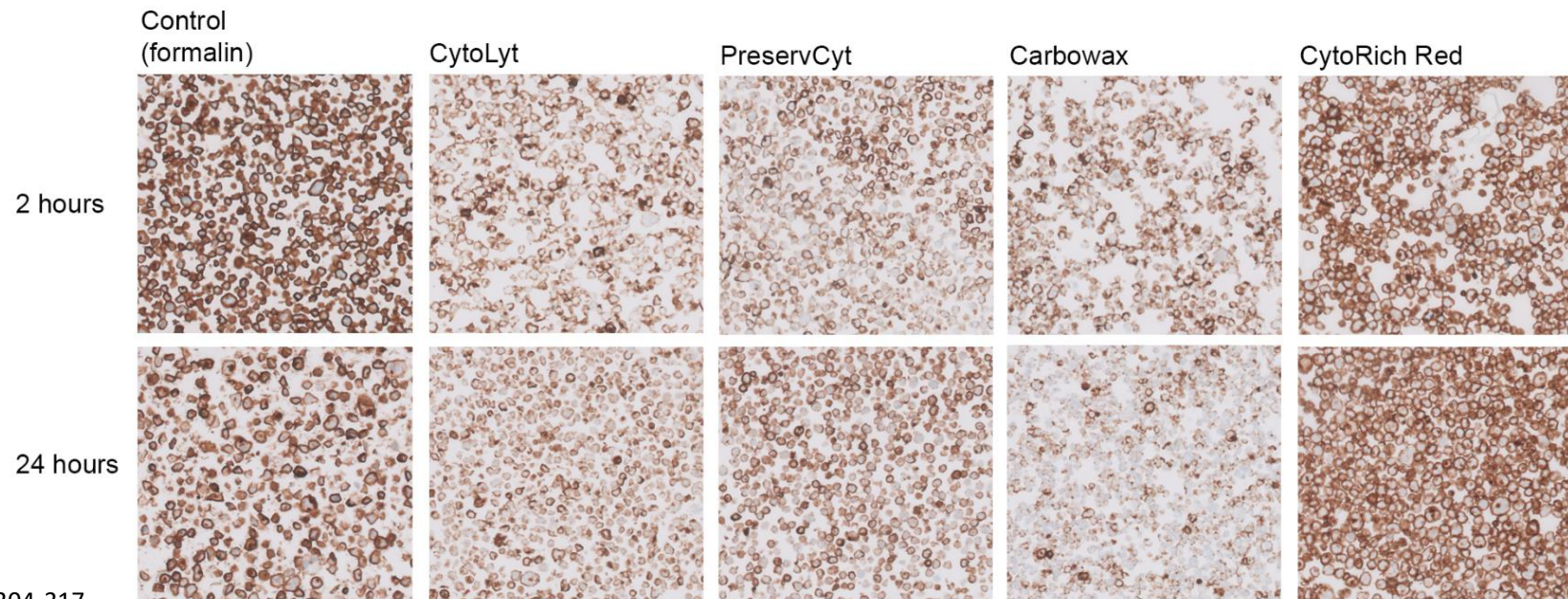
Bij cytologie veel variatie bij beide cutoffs → aanvullende verklaringen voor deze mate van variatie?

Hypothese: verschillen in bewerking van cytologisch materiaal hebben invloed op PD-L1 immunexpressie (m.n. fixatief)

SP263



22C3 LDT



Variatie in bewerking cytologisch materiaal?

Vanuit Nederlands Expertise Netwerk Cytologie (NENC):

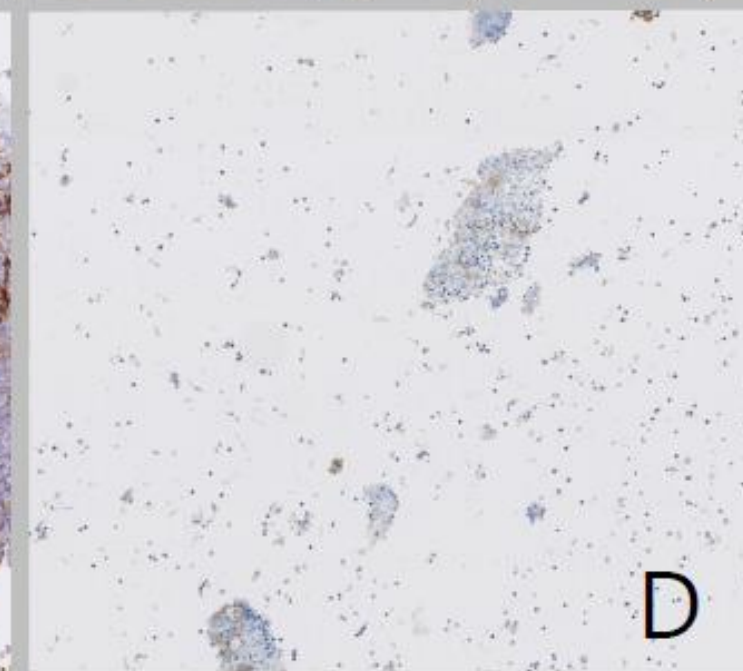
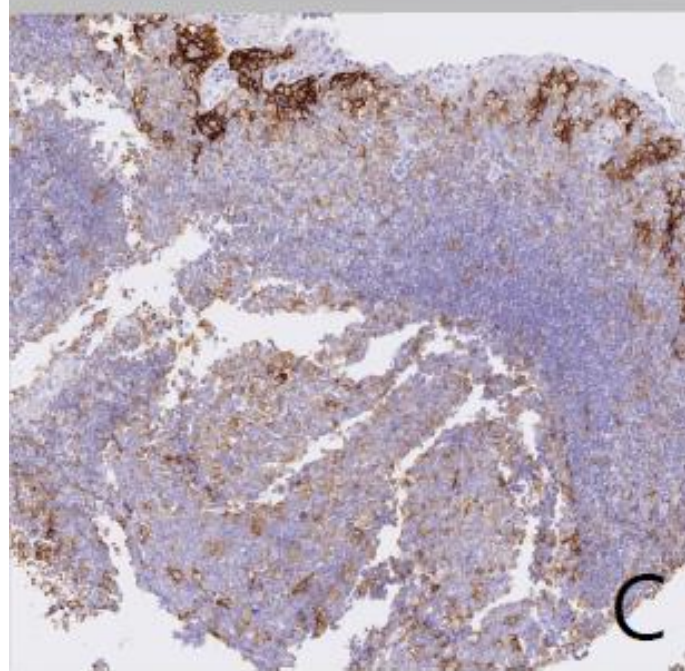
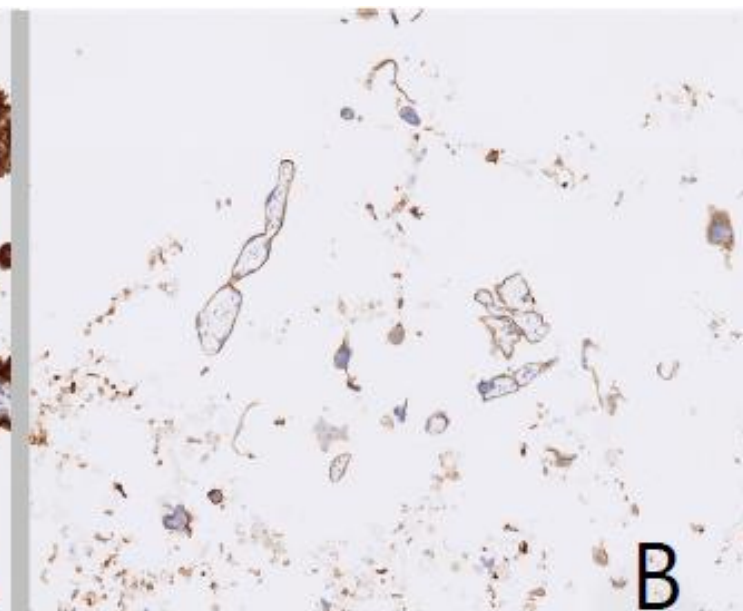
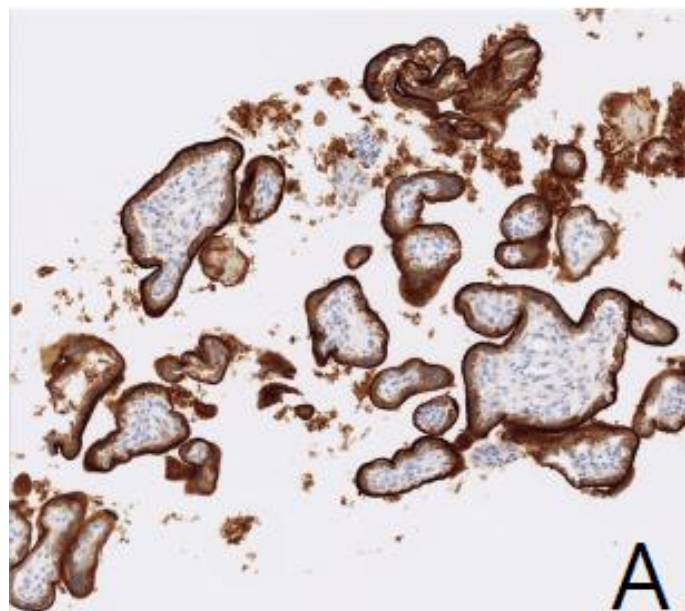
Enquêtes naar labs in NL:

- Hoe wordt cytologisch materiaal waarop PD-L1 kleuringen worden gedaan bewerkt? (ontvangstmedium, fixatief, nafxatie, inbloommethode)

Van ieder lab cytologisch bewerkt tonsil/placenta-materiaal volgens eigen methode, gekleurd voor PD-L1 met eigen kleuring en controle

- Alle ingestuurde coupes beoordeeld door expertpanel

Collection medium	Fixative	Post-fixation	Cell block	PD-L1 staining
Cytolyt	Formalin (3-7h)	PerservCyt	Cellient	weak and heterogeneous (n=1)
				good (n=1)
	Formalin (>8h)	N/A	Shandon Cytoblock	good (n=2)
	Cytolyt (24h)	Formalin (3u)	AGAR	aberrant staining (n=1)
	PerservCyt	N/A	Cellient	weak and heterogeneous (n=2)
		Formalin (0.5h)	Cellient	weak and heterogeneous (n=2)
Formalin	Formalin (36h)	N/A	AGAR	heterogeneous (n=1)
				good (n=2)
	PerservCyt	N/A	Cellient	good (n=1)
RPMI	N/A	N/A	AGAR	good (n=1)
	Formalin	N/A	AGAR	good (n=1)
	Formalin (0.5-24h)	N/A	AGAR	good (n=2)
Unifix	Formalin (0.5-24h)	N/A	AGAR	good (n=2)
	N/A	N/A	AGAR	heterogeneous (n=1)
CytosRich Red	CytosRich red	N/A	AGAR	heterogeneous (n=1)
		Formalin (2h)	AGAR	good (n=1)
Fixcyt	N/A	N/A	AGAR	good (n=1)



a: $\geq 1\%$ cutoff

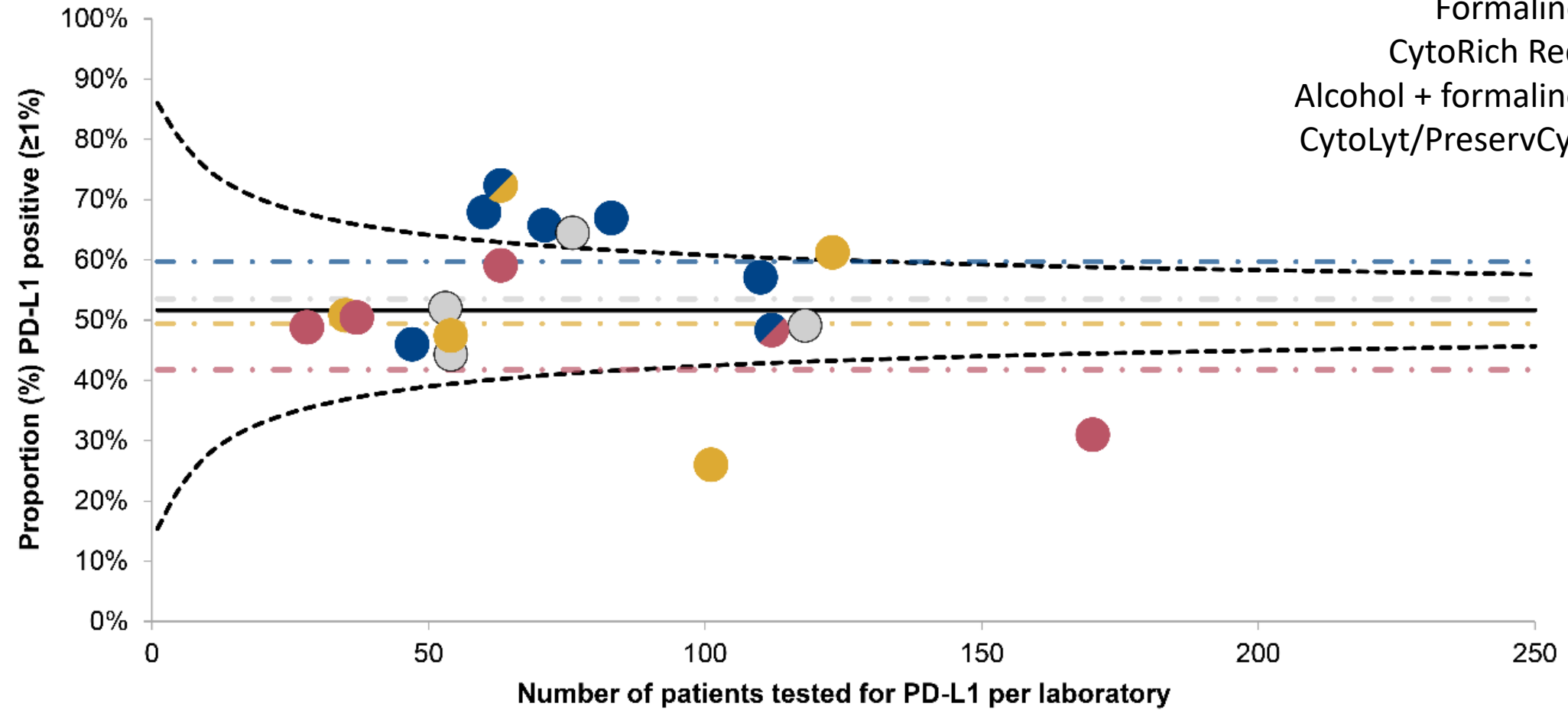
Gemiddelde PD-L1 positiviteit:

Formaline = 59.7%

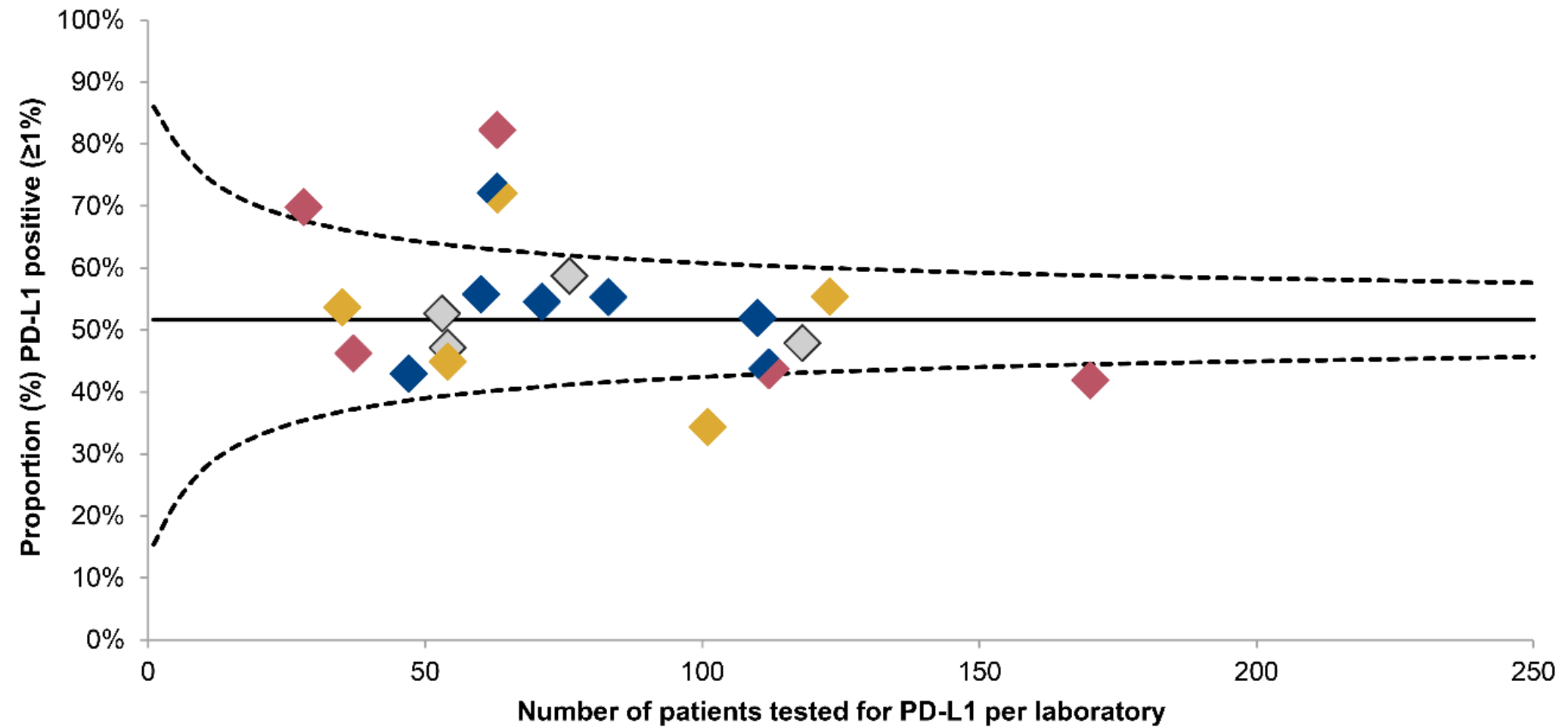
CytoRich Red = 53.9%

Alcohol + formaline = 49.4%

CytoLyt/PreservCyt = 41.8%



a: $\geq 1\%$ cutoff



Conclusie

Veel variatie in PD-L1 positiviteit tussen labs in NL (zowel histologie als cytologie)
→ potentieel klinische consequenties!

Veel variatie in bewerkingsmethode cytologie tussen labs in NL

Verschillen in bewerkingsmethoden lijken verschil in PD-L1 positiviteit in cytologie deels te verklaren

Is er meer uniformiteit nodig en hoe bereiken we dit?

Referenties

Caldwell C, Johnson CE, Balaji GA, Hammer RD, Kannan R. Identification and Validation of a PD-L1 Binding Peptide for Determination of PDL1 Expression in Tumors. Scientific Reports. 2017;7(1):13682.

Koomen BM, Voorham QJM, Epskamp-Kuijpers CCHJ, et al. Considerable interlaboratory variation in PD-L1 positivity in a nationwide cohort of non-small cell lung cancer patients. Lung Cancer. 2021;159:117-126.

Koomen BM, van der Starre-Gaal J, Vonk JM, et al. Formalin fixation for optimal concordance of programmed death-ligand 1 immunostaining between cytologic and histologic specimens from patients with non-small cell lung cancer. Cancer Cytopathology. 2021;129(4):304-317.

Koomen BM, de Boer M, van Dooijeweert C, et al. Nationwide differences in cytology fixation and processing methods and their impact on interlaboratory variation in PD-L1 positivity. Virchows Archiv. 2023;482(4):707-720.

Acknowledgements

PALGA Foundation

Isala Zwolle

- Nils 't Hart

Erasmus MC Rotterdam

- Jan von der Thüsen

UMC Groningen

- Wim Timens
- Stefan Willems

Mentimeter vraag 4

Worden er in jullie laboratorium immuuncytochemische kleuringen uitgevoerd op cellen die in aanraking zijn geweest met alcohol/methanol?

A. Ja.

B. Nee.

C. Weet ik niet.