

Serie "Diagnosi e trattamento del carcinoma polmonare nell'era della terapia personalizzata" a cura di *Ciro Battiloro*

# La diagnosi del tumore del polmone nell'era delle terapie target. Il ruolo dello pneumologo interventista

## *Lung cancer diagnosis in the era of target therapies. The role of the interventional pulmonologist*

Giuseppe Failla<sup>1,2</sup>, Laura Serafino Agrusa<sup>2</sup>, Alba La Sala<sup>2</sup>, Paola Martucci<sup>1</sup>, Severo Campione<sup>3</sup>

<sup>1</sup> UOC Pneumologia Interventistica AORN A. Cardarelli, Napoli; <sup>2</sup> UOSD Endoscopia Bronchiale ARNAS Civico e Benfratelli, Palermo; <sup>3</sup> UOC Anatomia Patologica, Dipartimento delle Tecnologie Avanzate Diagnostico-Terapeutiche e dei Servizi sanitari, AORN A. Cardarelli, Napoli

### Riassunto

Il tumore polmonare è ad oggi, tra le varie forme di cancro, al primo posto per mortalità. In questo contesto, gli approcci diagnostici miniminvasivi stanno sostituendo quelli chirurgici per la diagnosi e per la stadiazione. I progressi nelle tecniche broncoscopiche consentono oggi una diagnosi tissutale sicura e sempre più efficace anche dei noduli polmonari. D'altro canto, tuttavia, la maggior parte delle diagnosi viene ancora eseguita in una fase avanzata e anche in questo scenario le tecniche broncoscopiche giocano un ruolo fondamentale nella diagnosi e nella stadiazione. In questa rassegna, offriamo una panoramica concisa dei significativi progressi nel campo della broncoscopia e li inseriamo nel contesto clinico. Affrontiamo anche le attuali indicazioni e modalità diagnostiche associate al campionamento delle lesioni polmonari centrali e periferiche. Viene data inoltre una descrizione sintetica delle tecniche di laboratorio adeguate ad una corretta manipolazione dei campioni cito-istologici. Nell'era delle terapie personalizzate, l'ottenimento di campioni adeguati è fondamentale per fornire una diagnosi istologica completa dei test predittivi di risposta a terapie su target molecolari e non, specifiche del cancro del polmone. La relazione delle terapie target con istologie specifiche e biomarcatori predittivi ha reso la gestione delle biopsie il fattore chiave per la migliore risposta terapeutica e per modificare favorevolmente la prognosi di questi pazienti.

**Parole chiave:** broncoscopia, tumore del polmone, EBUS-TBNA, biopsie transbronchiali, navigazione broncoscopica, diagnosi istologica

### Summary

*Lung cancer is the most lethal of all forms of cancer. In this context, minimally invasive diagnostic approaches are replacing more aggressive surgical ones for the diagnosis and staging of lung cancer. Advances in bronchoscopic technology have allowed for safe and increasingly effective tissue diagnosis of lung nodules. On the other hand, most diagnoses are still made in an advanced stage and also in this scenario, bronchoscopic techniques play a central role in diagnosis and staging. In this review, we offer a concise overview of the significant advances in the field of bronchoscopy and to put them into clinical context. We also address current diagnostic challenges associated with sampling central and peripheral lung lesions and make a concise description of laboratory techniques for proper sample handling. In the era of personalized therapies, obtaining adequate specimens is key to provide a specific histologic and molecular diagnosis of lung cancer. The relationship of target therapies with specific histologies and predictive biomarkers has made the handling of biopsies the key factor for success.*

**Key words:** bronchoscopy, lung cancer, EBUS-TBNA, transbronchial biopsy, navigational bronchoscopy, histologic diagnosis

Ricevuto il 2-3-2021  
Accettato il 26-3-2021

#### Corrispondenza

Giuseppe Failla  
UOC Pneumologia Interventistica  
AORN A. Cardarelli  
via A. Cardarelli 9, 80131 Napoli  
giuseppe.failla@aocardarelli.it

#### Conflitto di interessi

Gli autori dichiarano di non avere nessun conflitto di interesse con l'argomento trattato nell'articolo.

**Come citare questo articolo:** Failla G, Serafino Agrusa L, La Sala A, et al. La diagnosi del tumore del polmone nell'era delle terapie target. Il ruolo dello pneumologo interventista. Rassegna di Patologia dell'Apparato Respiratorio 2021;36:38-47. <https://doi.org/10.36166/2531-4920-A058>

© Copyright by Associazione Italiana Pneumologi Ospedalieri – Italian Thoracic Society (AIPO – ITS)



OPEN ACCESS

L'articolo è open access e divulgato sulla base della licenza CC-BY-NC-ND (Creative Commons Attribuzione – Non commerciale – Non opere derivate 4.0 Internazionale). L'articolo può essere usato indicando la menzione di paternità adeguata e la licenza; solo a scopi non commerciali; solo in originale. Per ulteriori informazioni: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.it>

## Introduzione

La diagnosi del cancro ai polmoni ha visto crescere il ruolo diagnostico della pneumologia interventistica negli ultimi 20 anni. Questi cambiamenti traggono origine da diversi fattori. Da un lato le modificazioni epidemiologiche che hanno mostrato un aumento della prevalenza dell'adenocarcinoma rispetto ad altri sottotipi di tumore polmonare, con incremento delle localizzazioni nelle porzioni polmonari più periferiche<sup>1-4</sup>. Dall'altro, la rapida espansione del panorama terapeutico e la personalizzazione delle opzioni di trattamento negli istotipi non microcitoma, ha condizionato poi la necessità di ottenere prelievi tissutali adeguati per la sottotipizzazione istologica e i test molecolari<sup>5,6</sup>.

Mentre in passato era sufficiente un piccolo campione biotico per distinguere tra tumore a piccole cellule e *non small cell lung cancer* (NSCLC), nella nuova era della medicina di precisione, fin dalla procedura diagnostica iniziale dovrebbe ottenersi idealmente materiale sia per la diagnosi istopatologica, che per i test specifici per le terapie target nonché per la stadiazione.

L'importanza di differenziare i sottotipi istologici ha avuto una forte spinta con la scoperta di mutazioni del recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) e con la successiva identificazione delle mutazioni ALK e ROS-1<sup>7-10</sup>. Mutazioni queste quasi esclusivamente associate ad adenocarcinomi e che possono essere trattate con terapia mirata per aumentare significativamente la risposta e la sopravvivenza libera da progressione di malattia<sup>11,12</sup>. Più recentemente, gli inibitori del *checkpoint* immunitario hanno dimostrato di essere efficaci in tutti gli istotipi di NSCLC aprendo la strada a nuovi biomarcatori tissutali associati alle neoplasie polmonari e sottolineando ancora di più la necessità di ottenere un prelievo tissutale adeguato per tali indagini, in modo relativamente indipendente dal sottotipo istologico<sup>13-17</sup>.

Lo spostamento epidemiologico verso tumori primitivi polmonari con frequente localizzazione periferica ha infine aumentato la difficoltà di ottenere un adeguato materiale diagnostico, ragion per cui è nata la necessità di affinare le tecniche diagnostiche. Ed infatti nelle ultime decadi, la tecnologia della diagnostica broncoscopica è stata contraddistinta da un notevole sviluppo, dovuto soprattutto all'avvento dell'ecoendoscopia polmonare (EBUS, *endo-bronchial ultrasound*) che ha segnato un momento di svolta nella storia della moderna pneumologia interventistica. Tali progressi tecnologici hanno consentito un significativo miglioramento della resa diagnostica endoscopica<sup>18</sup>.

Sulla scorta di tali premesse è ormai chiaro che l'ottenimento di campioni di tessuto neoplastico adeguati e rappresentativi sia fondamentale in tutti gli step dell'inquadramento del paziente oncologico, non soltanto al momento della diagnosi istopatologica e della definizione del profilo

predittivo di risposta, ma anche nell'identificazione di mutazioni di resistenza dopo le prime linee di terapia.

## Approccio diagnostico

La scelta della procedura invasiva più appropriata per la tipizzazione della malattia dipende principalmente dalla sede centrale o periferica (prendendo a riferimento le vie aeree di maggior calibro) del tumore primitivo e dall'eventuale presenza di metastasi linfonodali mediastiniche e/o a distanza<sup>19,20</sup>. L'utilità e la sicurezza delle metodiche di prelievo disponibili variano a seconda delle caratteristiche sia del paziente che del tumore, e di conseguenza lo pneumologo interventista si trova di fronte a situazioni sempre più complesse che devono essere affrontate pianificando in maniera individualizzata il migliore e più accurato approccio diagnostico ed in molti casi stadiativo, a partire dalla indispensabile valutazione delle immagini della TC del paziente, preferibilmente acquisita con mezzo di contrasto ed eventualmente integrata dalla PET.

## Lesioni polmonari centrali

Le lesioni polmonari definite "centrali" in relazione alla prossimità con le vie aeree di grosso calibro, visibili endoscopicamente o localizzate nel 1/3 interno del polmone, vengono tipizzate nella maggioranza dei casi attraverso la broncoscopia flessibile e il materiale diagnostico istologico e/o citologico viene ottenuto mediante pinze flessibili standard, *washing* o *brushing* bronchiale o, in caso di tumori visibili ma aventi una superficie con aspetto estesamente necrotico, con aghi transbronchiali (TBNA), che consentano di prelevare materiale in profondità dalla lesione<sup>21</sup>. Il rendimento diagnostico complessivo per le lesioni centrali è pari al 90% circa (Tab. I)<sup>19,22</sup>. L'uso della criobiopsia endobron-

**Tabella I.** Sensibilità delle varie modalità diagnostiche per la diagnosi e la stadiazione di cancro ai polmoni (da McLean et al., 2018<sup>22</sup>, mod.).

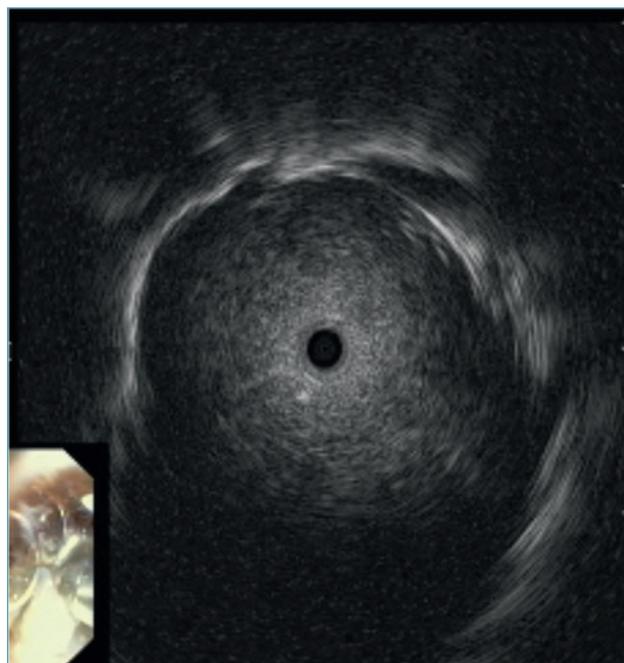
Modalità diagnostica	Sensibilità (%)	
	Centrale	Periferica
Citologia su espettorato	71	49
Broncoscopia	88	78
Lavaggio bronchiale	47	43
<i>Brushing</i>	56	54
Biopsia	74	57
TTNA CT guidato	-	90
RP-EBUS	-	73
Navigazione elettromagnetica	-	68
Criobiopsia	95	74
EBUS/TBNA	82	-

chiale può consentire l'ottenimento di campioni istopatologici più grandi e di migliore qualità contribuendo a migliorare ulteriormente la resa diagnostica della broncoscopia rispetto alla biopsia con pinze (95%), con nessun aumento degli eventi avversi<sup>23</sup>. Esistono anche tumori "centrali" che non hanno un'estensione all'interno della via aerea di calibro medio-grande ma si accrescono in prossimità di questa (pattern peribronchiale). Tali lesioni possono essere biopsiate in *real time* per via ecoendoscopica transbronchiale (EBUS, *endobronchial ultrasound*) o, nel caso di sviluppo periesofageo, anche per via ecoendoscopica transesofagea (EUS, *endoscopic ultrasound*)<sup>24,25</sup>.

## Lesioni polmonari periferiche

Le lesioni polmonari "periferiche" (PPL), non visibili endoscopicamente e la cui tipizzazione pone in molti casi maggiori difficoltà di approccio, trovano nella broncoscopia flessibile una delle principali metodiche che consente di eseguire una diagnosi appropriata. La presenza del segno radiologico noto come "bronchus sign" (espressione di un bronco/bronchiolo, che termina all'interno della PPL), le dimensioni > 2 cm e il pattern solido, sono tra i più importanti fattori predittivi positivi del successo dell'approccio broncoscopico definito anche transbronchiale. L'approccio transbronchiale è oggi in ascesa soprattutto grazie all'introduzione di sistemi di guida attraverso i quali è possibile raggiungere le PPL. Oltre alla tradizionale guida fluoroscopica, ancora oggi largamente utilizzata, negli ultimi anni si sono perfezionate numerose tecniche tra cui l'ecoendoscopia radiale (r-EBUS), la broncoscopia virtuale, la navigazione elettromagnetica, la guida con TC *cone beam*, che possono all'occorrenza integrarsi tra loro<sup>26-28</sup>.

La r-EBUS prevede l'utilizzo di minisonde ecografiche da 20 MHz, estremamente sottili e che possono essere introdotte con catetere guida o nude nel canale operativo di broncoscopi sottili o ultrasottili, con la possibilità di raggiungere le porzioni periferiche dell'albero bronchiale. La sonda radiale, attraverso un movimento rotatorio, esplora il parenchima polmonare intorno la via aerea a 360° e quando penetra all'interno di una lesione solida, il classico artefatto da polmone normalmente areato (*snow storm pattern*) lascia il posto ad un'immagine ad ecostruttura alterata compatibile con il target (Fig. 1). Per procedere al campionamento la sonda ecoendoscopica viene rimossa e al suo posto vengono introdotti gli strumenti di prelievo (pinze, aghi). In particolare, l'utilizzo di aghi specificamente progettati per i prelievi con agoaspirazione (TBNA) periferica aumenta il potere diagnostico della procedura del 17%<sup>26,29</sup>. Il principale limite della r-EBUS è rappresentato dall'assenza di una



**Figura 1.** Pattern r-EBUS di nodulo polmonare (*pattern concentrico*).

rotta di navigazione, ovvero essa è in grado di identificare la lesione una volta raggiunta ma non ha in sé un sistema di navigazione che indichi il percorso endobronchiale che conduce alla lesione stessa. Questo ha portato allo sviluppo di varie tecnologie di navigazione applicate alla broncoscopia come quella elettromagnetica (*electromagnetic navigational bronchoscopy*, ENB), quella virtuale (*virtual bronchoscopic navigation*)<sup>30</sup>, ed ancora la *cone beam* TC.

Tali sistemi, sulla scorta del dato TC in precedenza acquisito, elaborano e registrano una rotta che viene sincronizzata con l'anatomia bronchiale del paziente durante la procedura endoscopica. Tuttavia i dati ottenuti dalla TC pre-procedurale potrebbero non corrispondere perfettamente a quelli della broncoscopia "reale", con conseguente riduzione della *performance* diagnostica. Negli ultimi anni appare sempre più promettente la *Cone-Beam* CT (CBCT), una tecnica di *imaging* biomedico in cui una tomografia computerizzata viene realizzata mediante dei fasci di raggi X a forma di cono. L'apparecchiatura CBCT, montata su un arco C, permette di ottenere immagini in tempo reale di un paziente che si sottopone ad una procedura endoscopica. La CBCT si dimostra un sistema di guida di altissimo livello per l'approccio al nodulo polmonare periferico, garantendo di raggiungere circa i 3/4 delle lesioni, e incrementando sensibilmente (fino all'89,9% dei casi) l'efficacia della navigazione degli altri sistemi di guida con i quali si può integrare, ma mantenendo l'accuratezza diagnostica all'incirca del 72%<sup>31</sup>.

Altro aspetto da non sottovalutare è rappresentato dall'alto costo di queste tecnologie che restano pertanto appannaggio solo di alcuni centri.

Una approfondita conoscenza della anatomia bronchiale e polmonare, sviluppata dallo pneumologo interventista con l'esperienza, può peraltro consentire nella pratica clinica quotidiana la lettura visuale delle diramazioni bronchiali. Questo metodo di navigazione definito "mentale" e ben documentato in letteratura, prevede, attraverso l'analisi di una TC a strato sottile, l'elaborazione visuale di una mappa delle diramazioni bronchiali, da seguire per raggiungere il target. Con questa tecnica ci si focalizza sulle vie aeree d'interesse, ponendo cioè attenzione solo alle biforcazioni e all'orientamento delle vie aeree che conducono al target in una determinata regione e non a tutto l'albero tracheo-bronchiale<sup>32</sup>.

Utilizzando le più moderne tecnologie di guida al prelievo la resa diagnostica complessiva nelle lesioni "periferiche" si aggira ancora oggi intorno al 70% (Tab. 1)<sup>33</sup>; malgrado ciò l'approccio broncoscopico rimane quello più consigliato nella diagnostica dei tumori polmonari, perché permette con un singolo esame di ottenere più informazioni (esclusione di lesioni centrali sincrone, stadiazione linfonodale mediastinica) a fronte di un basso tasso di complicanze (pneumotorace 1,6%, sanguinamento maggiore 0,2%, ipossiemia refrattaria 0,2%, insufficienza respiratoria 0,2%)<sup>26,33,34</sup>, inferiore alle tecniche transtoraciche alternative (vedi oltre).

Altra metodica di campionamento delle PPL è infatti l'agobiopsia/agoaspirato transparietale TC-guidata (TTNA). Tale tecnica presenta un'elevata resa diagnostica, che raggiunge in alcune casistiche il 90%, a fronte però, di un tasso di complicanze maggiore rispetto alle tecniche broncoscopiche. È infatti gravato da un rischio di pneumotorace più elevato (10-30% a seconda del calibro dell'ago usato, del numero di passaggi e delle caratteristiche delle lesioni campionate, della coesistenza di enfisema), specie nelle lesioni molto più vicine al diaframma, nelle lesioni < 2 cm, e nelle lesioni prevalentemente o esclusivamente a vetro smerigliato (GGO)<sup>35-38</sup>. Sempre più utilizzata, per le lesioni sub-pleuriche a ridosso della parete toracica, l'agobiopsia transparietale ECO-guidata che offre il vantaggio, rispetto alla TTNA TC guidata, di eseguire dei prelievi in *real time* e non espone a radiazioni ulteriori il paziente. Tuttavia la scelta della tecnica da utilizzare dipende non solo dai dati di resa diagnostica o dai tassi di complicanze ma soprattutto dall'esperienza, dalla disponibilità di personale formato e di tecnologie del centro coinvolto nell'iter diagnostico del paziente oncologico.

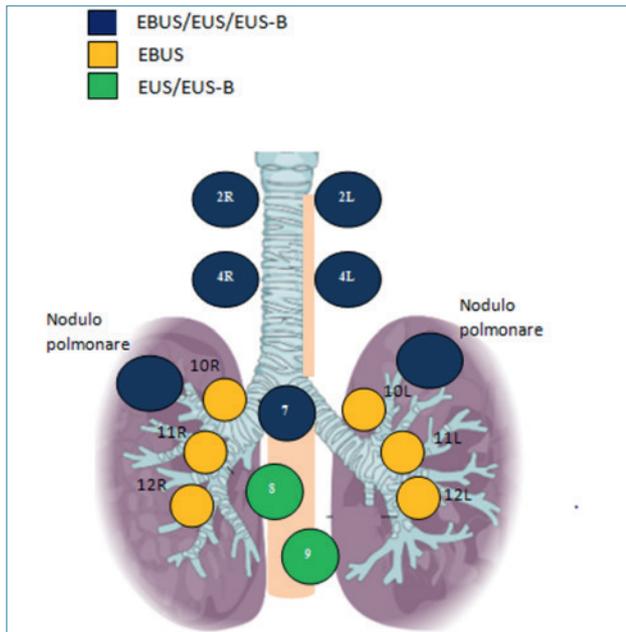
## Lesioni ilo-mediastiniche

L'introduzione negli anni ottanta della metodica TBNA

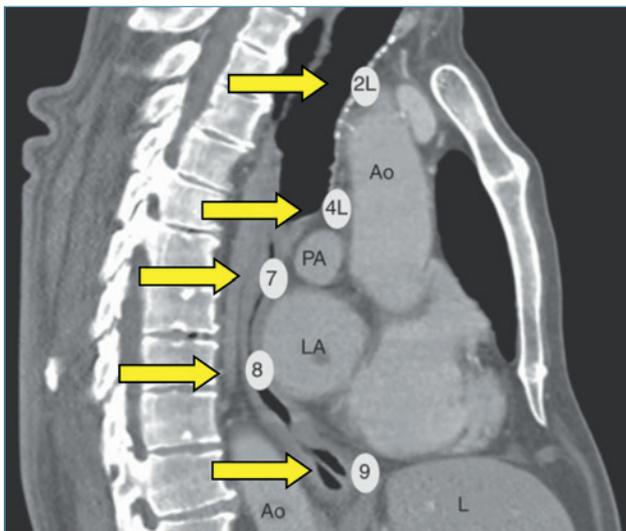
(*Trans Bronchial Needle Aspiration*) ha rivoluzionato invece l'accesso alle lesioni o alle adenopatie ilari e mediastiniche non visibili endoscopicamente ma a contatto con le vie aeree di grosso calibro. Le stazioni linfonodali approcciabili sono quindi: le paratracheali (2R, 2L, 4R, 4L), le sottocarenali (7) e le ilari (stazioni 10 R e L e 11 R e L). La tecnica di prelievo si basa sull'agoaspirazione transbronchiale e si è dimostrata in grado di fornire un'elevatissima specificità ed una buona sensibilità che varia in rapporto a diversi fattori quali: le dimensioni del linfonodo (bassa per linfonodi ≤ 1 cm), la sede linfonodale coinvolta (la sensibilità è maggiore per 4 R e 7) e l'esperienza dell'operatore. Negli ultimi anni l'uso dell'ecoendoscopia bronchiale applicata alla TBNA (EBUS TBNA) ha consentito di superare i limiti della metodica convenzionale (cieca), in termini di sicurezza della procedura, di variabilità dei risultati, e di quantità del materiale prelevato. L'EBUS TBNA usa una tecnologia ad ultrasuoni, attraverso una sonda convessa lineare posta all'estremità distale di un eco-broncoscopio, che consente la diretta visualizzazione ecografica delle stazioni linfonodali a contatto con le vie aeree e il loro campionamento. Lo strumento ecoendoscopico, infatti, è dotato di canale operativo la cui angolazione è tale da consentire l'introduzione di aghi dedicati eseguendo un prelievo in *real time*. La strumentazione è fornita inoltre di segnale ecocolor Doppler che permette il riconoscimento dei vasi sanguigni, elemento questo che aumenta l'accuratezza del prelievo e la sicurezza dello stesso, oltre a fornire informazioni utili alla identificazione della natura della lesione. Le peculiarità della EBUS-TBNA le consentono di raggiungere una sensibilità diagnostica superiore al 90%, anche per lesioni e linfonodi di piccole dimensioni, così soppiantando l'uso della TBNA convenzionale e sostituendosi oggi del tutto alla mediastinoscopia quale tecnica *gold standard* per la stadiazione linfonodale mediastinica<sup>39-41</sup>. L'EBUS-TBNA non è in grado di campionare linfonodi non adiacenti alle vie aeree ecco perché negli ultimi anni si è sempre più diffuso l'approccio transesofageo (*Endoscopic Ultra Sound*, EUS) che, integrandosi al precedente, consente di ampliare le possibilità di campionamento ai linfonodi periesofagei e del legamento polmonare (stazioni 8 e 9) oltre che fornire una via di accesso alternativa per le stazioni mediastiniche sinistre (2L e 4L) e sottocarenali (7) (Fig. 2)<sup>42</sup>.

Le due metodiche (EBUS ed EUS), utilizzate in combinazione, con due diversi strumenti o con un singolo strumento (EUS-B), consentono così una stadiazione mediastinica sistematica (Fig. 3)<sup>43</sup>.

Un'ampia mole di dati suggerisce infatti che l'EBUS insieme all'EUS o EUS-B aumenti la resa diagnostica con una sensibilità dell'utilizzo integrato dell'EBUS-



**Figura 2.** La natura complementare dell'ecoendoscopia endobronchiale ed endoesofagea per la mappatura sistemica dei linfonodi mediastinici.

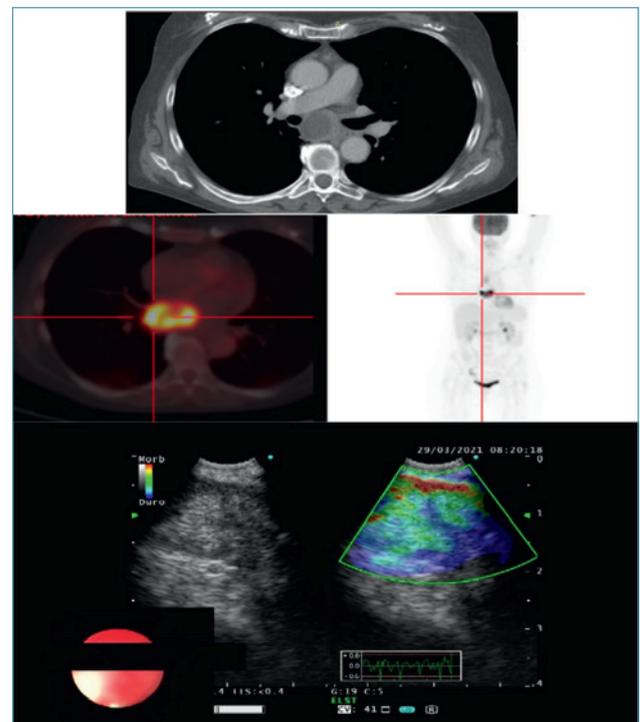


**Figura 3.** Scansione TC sagittale con le principali stazioni linfonodali mediastiniche accessibili mediante EUS-B (da Bugalho et al., 2018<sup>43</sup>, mod.).

TBNA+EUS (o EUS-B) pari al 93% e un valore predittivo negativo del 97%<sup>44,45</sup>. L'accuratezza diagnostica della procedura dipende dalla selezione dei linfonodi target e dalla probabilità pre-test che un linfonodo sia coinvolto. Convenzionalmente, la selezione del target durante l'EBUS-TBNA è basata su criteri dimensionali e morfologici (bordi, ecogenicità, visualizzazione delle strutture ilari, presenza di necrosi coagulativa) che differenzino i linfonodi verosimilmente benigni da quelli verosimilmente maligni<sup>46</sup>. La TC-PET appare di notevole

ausilio nel coadiuvare tale distinzione tuttavia non riconosce le micrometastasi linfonodali<sup>47</sup>. Negli ultimi anni è stata messa a punto una nuova tecnica sonografica, l'elastografia, che riesce a valutare la "compressibilità" tissutale basandosi sul concetto che i tessuti più "soffici" si deformano più facilmente con la compressione rispetto ai tessuti resi più duri dall'infiltrazione neoplastica (Fig. 4).

Trasformando queste informazioni sonografiche in codice colore, durante la procedura è possibile orientare il prelievo verso le porzioni più "dure" del target selezionato<sup>48</sup>. La procedura ecoendoscopica viene eseguita in sedazione moderata o profonda, utilizzando per lo più aghi di calibro 21-22 gauge (sono disponibili aghi da 25, 22, 21, e 19 G), eseguendo un numero minimo di tre passaggi separati per campionare il tessuto<sup>45,49</sup>. Secondo le attuali linee guida, l'EBUS-TBNA è indicata in tutti i tumori centrali, nei tumori periferici > 3 cm, nei linfonodi > 1 cm alla TC, nel coinvolgimento N1 alla PET, e nei linfonodi < 1 cm positivi alla PET (SUV > 2)<sup>50</sup>. La mediastinoscopia, ad oggi, trova quindi indicazione esclusivamente nei casi di sospetto coinvolgimento linfonodale N2-N3 dopo procedimento endoscopico transbronchiale o transesofageo non diagnostico<sup>42,51</sup>, ovvero nel *restaging* in setting particolari.



**Figura 4.** L'EBUS LINEARE conferma la presenza di voluminosa linfadenopatia a densità disomogenea a livello della stazione 7, ipercaptante in modo non uniforme. L'elastografia mostra un pattern polimorfo, in cui le aree di colore BLU sono indicative di una riduzione della elasticità tissutale (ridotta compressibilità) e possono indirizzare il prelievo con ago.

La videotoroscopia con approccio uniportale in sedazione, spesso appannaggio dello pneumologo interventista (toroscopia "medica"), consente di effettuare biopsie pleuriche nel sospetto di lesioni estese alla pleura e/o metastatiche specie in presenza di versamento pleurico. Se eseguita con tecnica chirurgica bi o triportale ed in anestesia generale (VATS) consente infine di eseguire biopsie in alcune stazioni linfonodali mediastiniche non accessibili alla EBUS/EUS-TBNA (pre e parortiche, staz 5 e 6). Nella stadiazione dei linfonodi mediastinici para-aortici e prevascolari (staz 3) attualmente la VATS è preferibile alla mediastinotomia anteriore<sup>52</sup>.

## Gestione del materiale prelevato

Come già ripetuto più volte, l'ascesa delle terapie target ha cambiato le risposte che si cercano dall'analisi dei campioni cito-istologici. I trattamenti contro il cancro del polmone sono stabiliti, pertanto infatti, non solo in base all'istologia ma anche alla presenza di specifiche mutazioni di *driver* oncogenici. Poiché più dell'80% dei pazienti con cancro del polmone riceve una diagnosi in fase avanzata, nella stragrande maggioranza dei casi le piccole biopsie e i campioni citologici rappresentano il materiale diagnostico definitivo<sup>53</sup>. Questi campioni devono essere utili non solo al patologo per formulare una diagnosi di precisione ma anche all'oncologo per avere la possibilità di richiedere al Laboratorio di Patologia Molecolare la ricerca dei geni e delle loro mutazioni che permetteranno di eseguire delle precise scelte terapeutiche. Il campione anatomico va trattato pertanto con attenzione in tutte le diverse fasi del percorso, suddivisibili in fase pre-analitica, analitica e post-analitica. La fase pre-analitica inizia con il prelievo del materiale che poi dovrà essere allestito. Questo è un momento complesso che trova il suo inizio in sala endoscopica e il suo sviluppo presso il laboratorio di anatomia patologica. Generalmente le biopsie bronchiali e transbronchiali vengono fissate in formalina così come i campioni citologici da agoaspirato, che verranno processati allo stesso modo dei campioni bioptici attraverso l'allestimento del citoincluso o *cell block*. I campioni da citologia esfoliativa o aspirativa (broncoaspirato, BAL, espettorato, agoaspirato transbronchiale o transtoracico) vengono fissati in alcool 95° e successivamente inclusi in paraffina, oppure possono essere in parte strisciati su vetrino e successivamente fissati (fissativi spray, immersione in alcool). La preparazione ottimale dei campioni può comunque variare tra le varie istituzioni in base alle preferenze/competenze degli specialisti patologi che decideranno quindi il migliore metodo di allestimento dei campioni<sup>41</sup>. I preparati su striscio possono essere utilizzati anche per la valutazione rapida dell'adeguatezza

del campione (ROSE: *Rapid On Site Evaluation*) mediante colorazione rapida (*Diff-Quick* o analoga) effettuata o da un citopatologo presente in sala endoscopica o da uno pneumologo interventista che abbia eseguito un opportuno training. Vari studi hanno mostrato che sebbene la ROSE offra un *feedback* immediato sulla qualità del campione ottenuto, pare non influire sull'accuratezza diagnostica della procedura, mentre può influenzare l'operatore nel decidere di prelevare campioni aggiuntivi per test molecolari, campioni per esami colturali ed inoltre consente di evitare di prolungare l'esame o di dovere ricorrere a procedimenti diagnostici aggiuntivi con i rischi a questi associati<sup>54,55</sup> (Fig. 5).

La fase analitica prevede l'osservazione del materiale processato al microscopio, l'esecuzione dell'immunocistochimica (IHC) e successivamente delle indagini di biologia molecolare. Le indagini di IHC, per la definizione dell'istotipo, possono essere applicate sia su campioni bioptici che su preparati citologici, ma oltre all'istotipo, l'IHC può analizzare alcuni dei biomarcatori predittivi di risposta alla terapia medica, come ad esempio il *Programmed Death-Ligand 1* (PD-L1). Durante le procedure di agoaspirazione semplice/guidata (transbronchiale, transtoracica, transesofagea) o nei versamenti (pleurici o extra-pleurici), è sempre raccomandabile riuscire ad eseguire uno o più *cell-block*, partendo da materiale citologico<sup>56</sup>. L'allestimento del citoincluso, accanto a preparati citologici convenzionali strisciati, permette infatti di poter eseguire, con maggiore facilità e con la stessa attendibilità del campione bioptico, approfondimenti di immunocistochimica e di ibridazione in situ a scopo diagnostico (es. TTF-1 e p40) e predittivo (es. ALK, ROS1, PD-L1)<sup>57-59</sup> (Fig. 6). In definitiva, ad oggi in tutti i pazienti con NSCLC in stadio IIIB-IIIC (non candidati a trattamenti loco-regionali), e in stadio IV, risulta raccomandato completare la diagnosi morfologica con la caratterizzazione delle mutazioni di EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) e BRAF (*B-Raf proto-oncogene*), la definizione delle traslocazioni a carico di ALK (*Anaplastic Lymphoma Kinase*) e ROS-1 (*Proto-oncogene tyrosine-protein kinase ROS*) e la valutazione dei livelli di espressione del PD-L1 (secondo i *cut-off* validati dagli studi clinici registrativi)<sup>56</sup>. I suddetti test sono validati sulla maggior parte dei campioni citologici ottenuti soprattutto dall'EBUS-TBNA che, dato il suo basso profilo di rischio e il suo elevato potere diagnostico, è diventata la tecnica di prelievo più utilizzata, spesso come unica, nella diagnosi del tumore del polmone. La possibilità di eseguire le analisi di biologia molecolare dipende in gran parte dal numero assoluto di cellule tumorali (preferibilmente > 100), dalla loro percentuale presente nel materiale, dal loro grado di conservazione e dal tipo e dalla sensibilità del test mole-

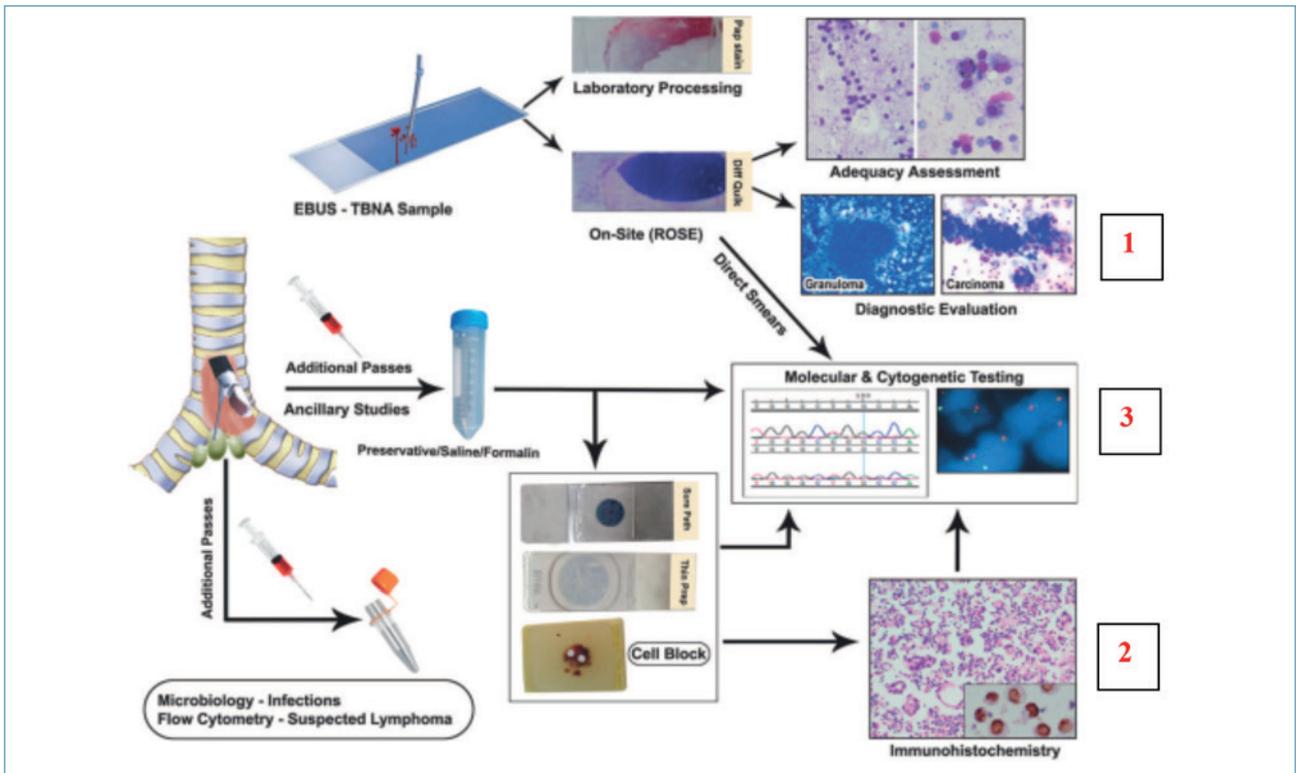


Figura 5. Diagramma schematico che mostra i passaggi che un campione di EBUS TBNA segue dal suo prelievo al laboratorio di Anatomia Patologica e Genetica Molecolare (da Jain et al., 2017<sup>55</sup>, mod.).

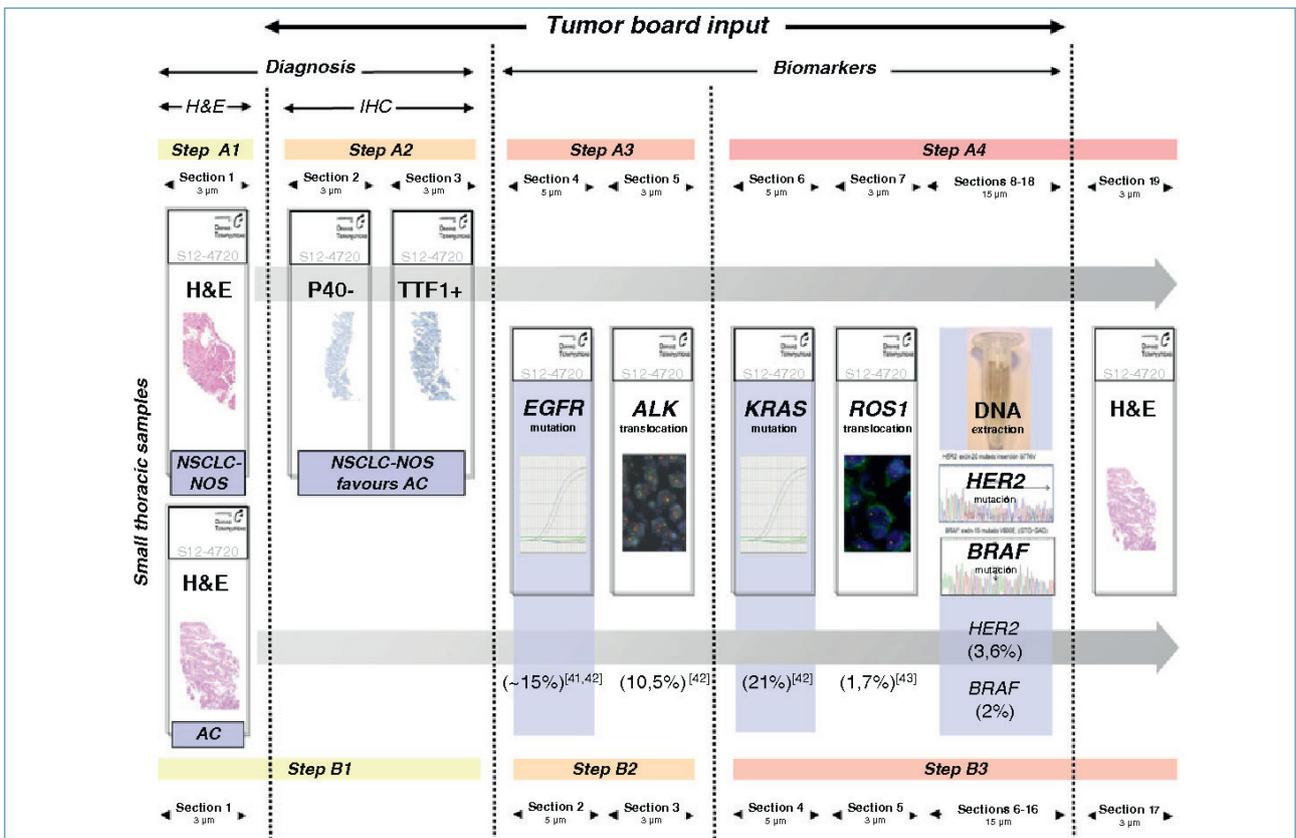


Figura 6. Diagramma schematico che mostra le sezioni che un campione istologico o citoincluso in paraffina contenente materiale neoplastico dovrebbe prevedere in unico taglio dal suo allestimento per effettuare tutte le determinazioni necessarie ad una completa profilazione di Anatomia Patologica e Genetica Molecolare (da Conde et al., 2013<sup>59</sup>, mod.).

colare utilizzato. Unendo questi aspetti l'analisi molecolare ad esempio sui campioni di EBUS-TBNA può essere eseguita nell'88-96% dei casi. Sebbene non esista uno studio prospettico che valuti il numero di passaggi necessari per ottenere campioni adeguati per i test molecolari, sembra che un numero di 4 passaggi dovrebbe essere sufficiente. Pare invece che il tipo di ago, l'aspirazione, l'uso di minipinza o di criosonda, il tipo di sedazione, e il tempo trascorso all'interno dell'adenopatia non influenzino il risultato dei test<sup>41,59,60</sup>.

La fase post-analitica, infine, è quella in cui viene elaborato il referto citoistologico con le conseguenti conclusioni diagnostiche, questo dovrebbe riportare la descrizione morfologica della malattia, il dato immunostochimico e la caratterizzazione biomolecolare e dei biomarcatori quanto più completa possibile.

## Bibliografia

- 1 Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2014;136:E359-386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- 2 Wynder EL, Muscat JE. The changing epidemiology of smoking and lung cancer histology. *Environ Health Perspect* 1995;103(suppl 8):143-148. <https://doi.org/10.1289/ehp.95103s8143>
- 3 Anthony JA, Malcolm VB, Jonathan MS. Epidemiology of lung cancer: looking to the future. *J Clin Oncol* 2005;23:3175-3185. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.10.462>
- 4 Charloux A, Quoix E, Wolkove N, et al. The increasing incidence of lung adenocarcinoma: reality or artefact? A review of the epidemiology of lung adenocarcinoma. *Int J Epidemiol* 1997;26:14-23. <https://doi.org/10.1093/ije/26.1.14>
- 5 Reck M, Rabe KF. Precision diagnosis and treatment for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2017;377:849-861. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1703413>
- 6 Ramnath N, Dilling TJ, Harris LJ, et al. Treatment of stage III non-small cell lung cancer: diagnosis and management of lung cancer, 3<sup>rd</sup> ed. American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2013;143(5 Suppl):e314S-e340S. <https://doi.org/10.1378/chest.12-2360>
- 7 Johnson DH, Fehrenbacher L, Novotny WF, et al. Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:2184-2191. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.11.022>
- 8 Zhang Y-L, Yuan J-Q, Wang K-F, et al. The prevalence of EGFR mutation in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 2016;7:78985-78993. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12587>
- 9 Davies KD, Mahale S, Astling DP, et al. Resistance to ROS1 inhibition mediated by EGFR pathway activation in non-small cell lung cancer. *PLoS One* 2013;8:e82236. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082236>
- 10 Chia PL, Mitchell P, Dobrovic A, John T. Prevalence and natural history of ALK positive non-small-cell lung cancer and the clinical impact of targeted therapy with ALK inhibitors. *Clin Epidemiol* 2014;6:423-432. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S69718>
- 11 Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors. Guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn* 2013;15:415-453. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2013.03.001>
- 12 Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1-positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2016;375:1823-1833. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1606774>
- 13 Mathew M, Safyan RA, Shu CA. PD-L1 as a biomarker in NSCLC: challenges and future directions. *Ann Transl Med* 2017;5:375. <https://doi.org/10.21037/atm.2017.08.04>
- 14 Gandini S, Massi D, Mandalà M. PD-L1 expression in cancer patients receiving anti PD-1/PD-L1 antibodies: a systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2016;100:88-98. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.02.001>
- 15 Teixidò C, Vilariño N, Reyes R, Reguart N. PD-L1 expression testing in non-small cell lung cancer. *Ther Adv Med Oncol* 2018;10:1758835918763493. <https://doi.org/10.1177/1758835918763493>. eCollection 2018
- 16 Hamanishi J, Mandai M, Matsumura N, et al. PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment: perspectives and issues. *Int J Clin Oncol* 2016;21:462-473. <https://doi.org/10.1007/s10147-016-0959-z>
- 17 Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 2014;515:563-567. <https://doi.org/10.1038/nature14011>
- 18 Schreiber G, McCrory DC. Performance characteristics of different modalities for diagnosis of suspected lung cancer: summary of published evidence. *Chest* 2003;123:115S-128S. [https://doi.org/10.1378/chest.123.1\\_suppl.115s](https://doi.org/10.1378/chest.123.1_suppl.115s)
- 19 Trisolini R, Natali F, Fois A. Up-to date role of interventional pulmonology in the diagnosis and staging of non-small-cell lung cancer. *Shanghai Chest* 2017;1:50. <http://doi.org/10.21037/shc.2017.10.06>
- 20 Chandrika S, Yarmus L. Recent developments in advanced diagnostic bronchoscopy. *Eur Respir Rev* 2020;29:190184. <https://doi.org/10.1183/16000617.0184-2019>
- 21 Tournoy KG, Rintoul RC, van Meerbeeck JP, et al. EBUS-TBNA for the diagnosis of central parenchymal lung lesions not visible at routine bronchoscopy. *Lung Cancer* 2009;63:45-49. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2008.04.004>
- 22 McLean AEB, Barnes DJ, Troy LK. Diagnosing lung cancer: the complexities of obtaining a tissue diagnosis in the era of minimally invasive and personalised medicine. *J Clin Med* 2018;7:163 <https://doi.org/10.3390/jcm7070163>
- 23 Hetzel J, Eberhardt R, Herth FJF, et al. Cryobiopsy increases the diagnostic yield of endobronchial biopsy: a multicentre trial. *Eur Respir J* 2012;39:685-690. <https://doi.org/10.1183/09031936.00033011>

- 24 Kuijvenhoven JC, Livi V, Morandi L, et al. The expanding role of endobronchial ultrasound in patients with centrally located intrapulmonary tumors. *Lung Cancer* 2019;134:194-201. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2019.06.006>
- 25 Almeida FA, Salam S, Mehta AC, et al. Sampling utility of the convex probe endobronchial ultrasound visible intrapulmonary lesion. *J Bronchology Interv Pulmonol* 2018;25:290-299. <https://doi.org/10.1097/LBR.0000000000000509>
- 26 Ost DE, Ernst A, Li X, et al. Diagnostic yield and complications of bronchoscopy for peripheral lung lesions. Results of the AQUIRE Registry. *Am J Respir Crit Care Med* 2016;193:68-77. <https://doi.org/10.1164/rccm.201507-1332OC>
- 27 Chen A, Chenna P, Loissele A, et al. Radial probe endobronchial ultrasound for peripheral pulmonary lesions. A 5-year institutional experience. *Ann Am Thorac Soc* 2014;11:578-582. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201311-384OC>
- 28 Steinfort DP, Vincent J, Heinze S, et al. Comparative effectiveness of radial probe endobronchial ultrasound versus CT-guided needle biopsy for evaluation of peripheral pulmonary lesions: a randomized pragmatic trial. *Respir Med* 2011;105:1704-1711. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2011.08.008>
- 29 Ali MS, Trick W, Mba BI, et al. Radial endobronchial ultrasound for the diagnosis of peripheral pulmonary lesions: a systematic review and meta-analysis. *Respirology* 2017;22:443-453. <https://doi.org/10.1111/resp.12980>
- 30 Ishida T, Asano F, Yamazaki K, et al.; Virtual Navigation in Japan Trial Group. Virtual bronchoscopic navigation combined with endobronchial ultrasound to diagnose small peripheral pulmonary lesions: a randomised trial. *Thorax* 2011;66:1072-1077. <https://doi.org/10.1136/thx.2010.145490>
- 31 Verhoeven RLJ, Futterer JJ, Hoefsloot W, van der Heijden EHF. Cone-beam CT image guidance with and without electromagnetic navigation bronchoscopy for biopsy of peripheral pulmonary lesions. *J Bronchology Interv Pulmonol* 2021;28:60-69. <https://doi.org/10.1097/LBR.0000000000000697>
- 32 Kho SS, Nyanti LE, Chai CS, et al. Feasibility of manual bronchial branch reading technique in navigating conventional rE-BUS bronchoscopy in the evaluation of peripheral pulmonary lesion. *Clin Respir J* 2020. <https://doi.org/10.1111/crj.13297>
- 33 Memoli JSW, Nietert PJ, Silvestri GA. Meta-analysis of guided bronchoscopy for the evaluation of the pulmonary nodule. *Chest* 2012;142:385-393. <https://doi.org/10.1378/chest.11-1764>
- 34 Katsis JM, Rickman OB, Maldonado F, Lentz RJ. Bronchoscopic biopsy of peripheral pulmonary lesions in 2020: a review of existing technologies. *J Thorac Dis* 2020;12:3253-3262. <https://doi.org/10.21037/jtd.2020.02.36>
- 35 Li H, Boiselle PM, Shepard JO, et al. Diagnostic accuracy and safety of CT-guided percutaneous needle aspiration biopsy of the lung: comparison of small and large pulmonary nodules. *Am J Roentgenol* 1996;167:105-109. <https://doi.org/10.2214/ajr.167.1.8659351>
- 36 Manhire A, Charig M, Clelland C, et al. Guidelines for radiologically guided lung biopsy. *Thorax* 2003;58:920-936. <https://doi.org/10.1136/thorax.58.11.920>
- 37 Kazerooni EA, Lim FT, Mikhail A, Martinez FJ. Risk of pneumothorax in CT-guided transthoracic needle aspiration biopsy of the lung. *Radiology* 1996;198:371-375. <https://doi.org/10.1148/radiology.198.2.8596834>
- 38 Wiener RS, Schwartz LM, Woloshin S, Welch HG. Population-based risk for complications after transthoracic needle lung biopsy of a pulmonary nodule: an analysis of discharge records. *Ann Intern Med* 2011;155:137-144. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-155-3-201108020-00003>
- 39 Vaidya PJ, Kate AK, Yasufuku K, Chhajed PN. Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration in lung cancer diagnosis and staging. *Expert Rev Respir Med* 2015;9:45-53. <https://doi.org/10.1586/17476348.2015.992784>
- 40 Um S-W, Kim KW, Jung S-H, et al. Endobronchial ultrasound versus mediastinoscopy for mediastinal nodal staging of non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2015;10:331-337. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000388>
- 41 van der Heijden EHF, Casal RF, Trisolini R, et al. World Association for Bronchology and Interventional Pulmonology, Task Force on Specimen Guidelines. Guideline for the acquisition and preparation of conventional and endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration specimens for the diagnosis and molecular testing of patients with known or suspected lung cancer. *Respiration* 2014;88:500-517. <https://doi.org/10.1159/000368857>
- 42 Vilmann P, Frost Clementsen P, Colella S, et al. Combined endobronchial and esophageal endosonography for the diagnosis and staging of lung cancer: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline, in cooperation with the European Respiratory Society (ERS) and the European Society of Thoracic Surgeons (ESTS). *Eur J Cardiothorac Surg* 2015;48:1-15. <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezv194>
- 43 Bugalho A, de Santis M, Slubowski A, et al. Trans-esophageal endobronchial ultrasound-guided needle aspiration (EUS-BNA): a road map for the chest physician. *Pulmonol* 2018;24:32-41. <https://doi.org/10.1016/j.rppnen.2017.10.004>
- 44 Oki M, Saka H, Ando M, et al. Endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration and endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration: are two better than one in mediastinal staging of non-small cell lung cancer? *J Thorac Cardiovasc Surg* 2014;148:1169-1177.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2014.05.023>
- 45 Fielding D, Kurimoto N. Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration for diagnosis and staging of lung cancer. *Clin Chest Med* 2018;39:111-123. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2017.11.012>
- 46 Schmid-Bindert G, Jiang H, Kähler G, et al. Predicting malignancy in mediastinal lymph nodes by endobronchial ultrasound: a new ultrasound scoring system. *Respirology* 2012;17:1190-1198. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2012.02223.x>
- 47 Shingyoji M, Takajima T, Yoshino M, et al. Endobronchial ultrasonography for positron emission tomography and computed tomography-negative lymph node staging in non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2014;98:1762-1767. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2014.05.078>
- 48 Dietrich C, Jenssen C, Arcidiacono PG, et al. Endoscopic ultrasound: elastographic lymph node evaluation. *Endosc Ultrasound* 2015;4:176-190. <https://doi.org/10.4103/2303-9027.162995>

- 49 VanderLaan PA, Wang HH, Majid A, Folch E. Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration (EBUS-TBNA): an overview and update for the cytopathologist. *Cancer Cytopathol* 2014;122:561-576. <https://doi.org/10.1002/cncy.21431>
- 50 Rivera MP, Mehta AC, Wahidi MM. Establishing the diagnosis of lung cancer: diagnosis and management of lung cancer. 3<sup>rd</sup> ed. American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2013;143(5 Suppl):e142S-e165S. <https://doi.org/10.1378/chest.12-2353>
- 51 Silvestri GA, Gonzales AV, Jantz MA, et al. Methods for staging non-small cell lung cancer: diagnosis and management of lung cancer. 3<sup>rd</sup> ed. American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2013;143(5 Suppl):e211S-e250S. <https://doi.org/10.1378/chest.12-2355>
- 52 Yasufuku K, Pierre A, Darling G, et al. A prospective controlled trial of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration compared with mediastinoscopy for mediastinal lymph node staging of lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2011;142:1393-1400.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2011.08.037>
- 53 Thunnissen E, Kerr KM, Herth FJF, et al. The challenge of NSCLC diagnosis and predictive analysis on small samples. Practical approach of a working group. *Lung Cancer* 2012;76:1-18. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2011.10.017>
- 54 Trisolini R, Cancellieri A, Tinelli C, et al. Rapid on-site evaluation of transbronchial aspirates in the diagnosis of hilar and mediastinal adenopathy: a randomized trial. *Chest* 2017;139:395-401. <https://doi.org/10.1378/chest.10-1521>
- 55 Jain D, Craig Allen T, Aisner DL, et al. Rapid on-site evaluation of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspirations for the diagnosis of lung cancer: a perspective from members of the Pulmonary Pathology Society. *Arch Pathol Lab Med* 2017;141:253-262. <https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0114-SA>
- 56 Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. Diagnosis of lung cancer in small biopsies and cytology: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification. *Arch Pathol Lab Med* 2013;137:668-684. <https://doi.org/10.5858/arpa.2012-0263-RA>
- 57 Dong Z, Li H, Zhou J, et al. The value of cell block based on fine needle aspiration for lung cancer diagnosis. *J Thorac Dis* 2017;9:2375-2382. <https://doi.org/10.21037/jtd.2017.07.91>
- 58 Saqi A. The state of cell blocks and ancillary testing: past, present, and future. *Arch Pathol Lab Med* 2016;140:1318-1322. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0125-RA>
- 59 Conde E, Angulo B, Izquierdo E, et al. Lung adenocarcinoma in the era of targeted therapies: histological classification, sample prioritization, and predictive biomarkers. *Clin Transl Oncol* 2013;15:503-508. <https://doi.org/10.1007/s12094-012-0983-z>
- 60 Jiang S, Liu X, Chen J, et al. A pilot study of the ultrathin cryoprobe in the diagnosis of peripheral pulmonary ground-glass opacity lesions. *Transl Lung Cancer Res* 2020;9:1963-1972. <https://doi.org/10.21037/tlcr-20-957>