



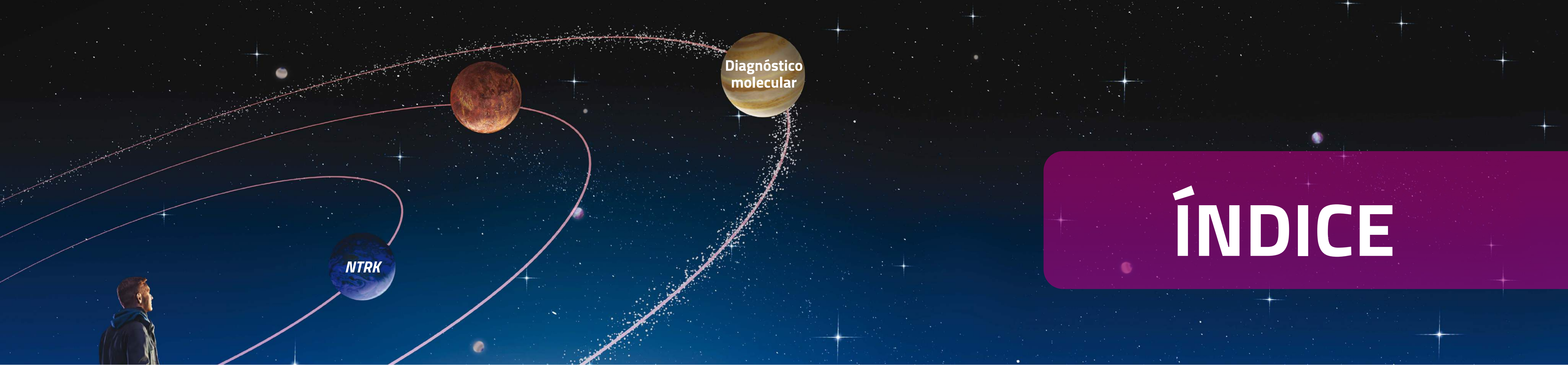
## GUÍA PARA EL DIAGNÓSTICO DE FUSIONES *NTRK*

**Cada paciente con cáncer es único, tratémoslo como tal<sup>1,2</sup>.**

Se están estudiando terapias dirigidas que permiten ampliar las opciones de tratamiento de pacientes con biomarcadores accionables, como los pacientes con tumores que presenten fusión del gen *NTRK*. Para identificar a estos pacientes, se requiere un buen diagnóstico mediante pruebas moleculares de calidad.

Visite [www.encuentrk.es](http://www.encuentrk.es) para obtener más información.

Roche



# ÍNDICE



**Fusiones *NTRK*: Definición y frecuencia**



**Determinación de fusiones *NTRK*: Qué dicen las guías**



**Técnicas para la identificación de fusiones *NTRK***



**Preguntas frecuentes**

## Fusiones *NTRK*: Definición y frecuencia

Las fusiones que afectan al gen del receptor tirosina quinasa neurotrófico (*NTRK*) son drivers oncogénicos presentes en una amplia variedad de tumores pediátricos y de adultos que se pueden tratar con terapias dirigidas<sup>1-3</sup>.

- La familia del receptor quinasa de la tropomiosina (TRK) está formada por tres proteínas: TRKA, TRKB y TRKC, codificadas por los genes *NTRK1*, *NTRK2* y *NTRK3*, respectivamente<sup>3</sup>.

Las fusiones *NTRK* son más frecuentes en determinados tumores raros, aunque también se han detectado con menos frecuencia en tumores más comunes<sup>4</sup>

<5%<sup>1,4-6</sup>

- Cáncer colorrectal (0,02 a 0,3%)
- Cáncer de tiroides (1,5%)
- Cáncer de pulmón no microcítico (<1%)
- Colangiocarcinoma (3% a <5%)
- Melanoma (0,3%)
- Glioblastoma (1,1% a <5%)
- Cáncer de células escamosas de cabeza y cuello (0,2% a <5%)

5% a 25%<sup>1,4</sup>

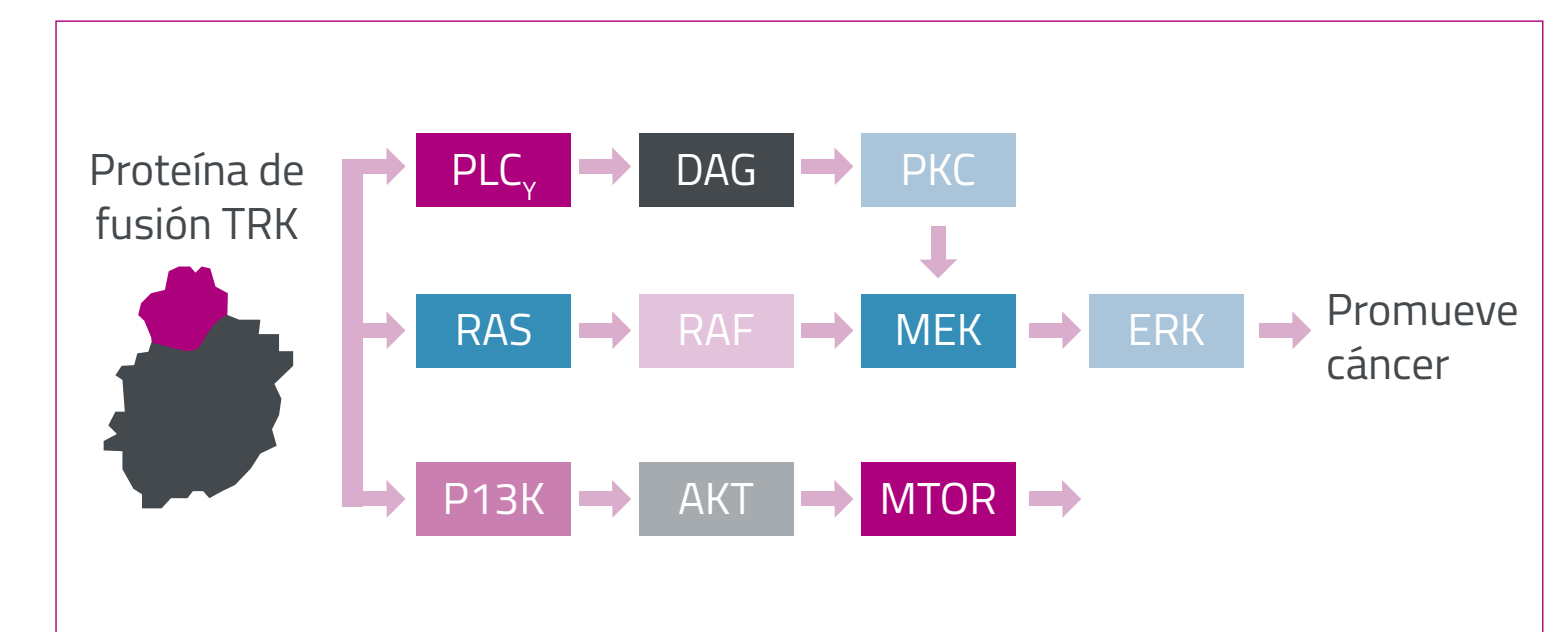
- Tumor del estroma gastrointestinal (5% a 25%)
- Cáncer papilar de tiroides (12,3% a 25%)
- Melanoma spitzoide (16,4% a 25%)

>80%<sup>1,4,7,8</sup>

- Carcinoma secretor de mama (~94%)
- Fibrosarcoma infantil (>90%)
- Nefroma mesoblástico congénito (83% a >90%)
- MASC (Carcinoma de glándula salival análogo al secretor de mama) (93% al 100%)

### Las fusiones *NTRK* causan el cáncer a través de una señalización anómala<sup>1,2,9,10</sup>

- Las fusiones *NTRK* producen una proteína quimérica oncogénica que activa cascadas de señalización implicadas en la proliferación celular, supervivencia y angiogénesis<sup>1,2</sup>.
- Las fusiones *NTRK* y otras alteraciones oncogénicas suelen ser mutuamente excluyentes<sup>2,11</sup>.
- Cada gen *NTRK* se puede fusionar con distintos genes; hasta la fecha se han identificado al menos 25 fusiones *NTRK* distintas<sup>1-3,11</sup>.



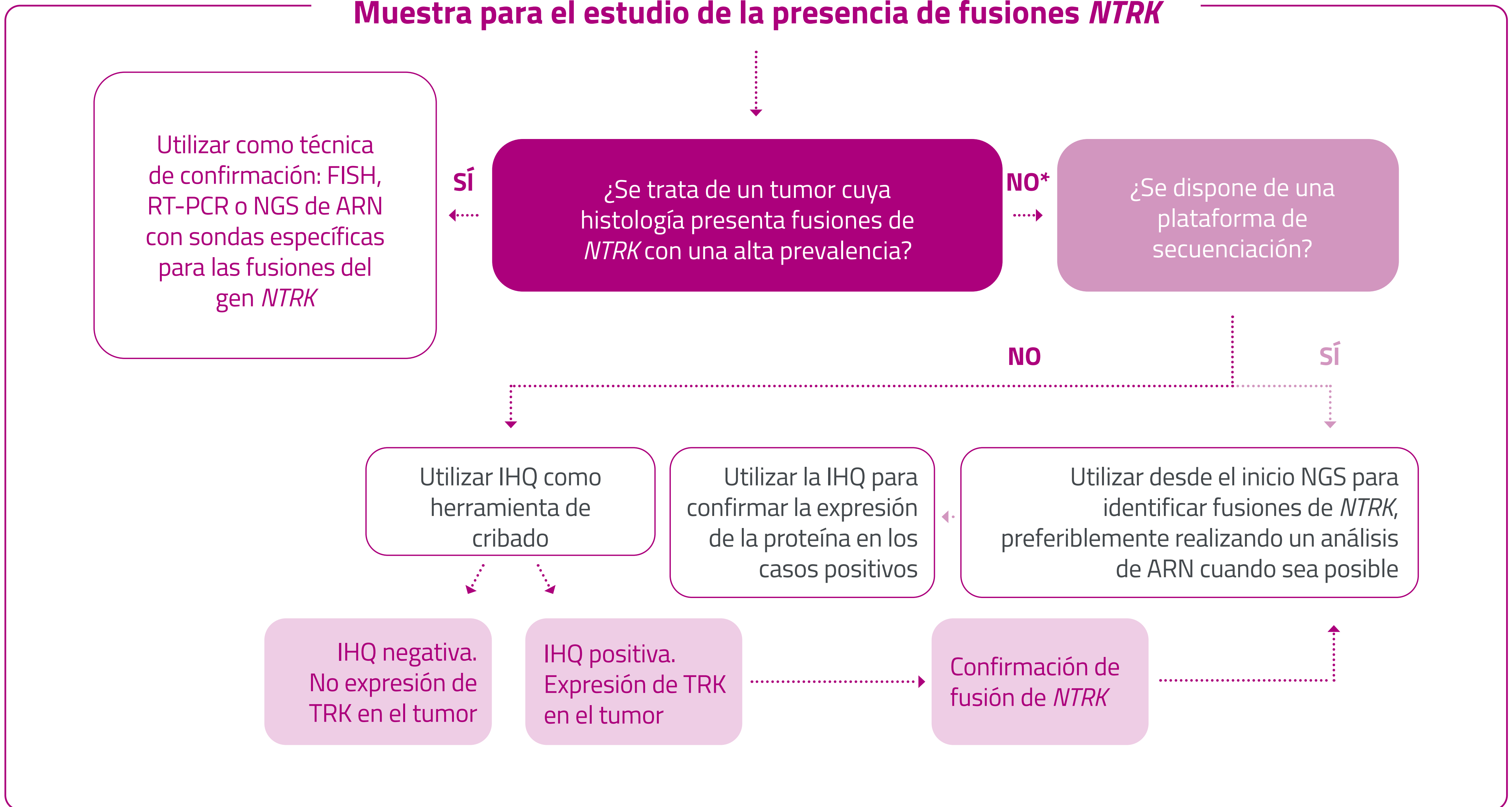
La detección de las fusiones *NTRK* no está protocolizada todavía entre las pruebas diagnósticas de rutina. El análisis del perfil molecular mediante secuenciación de nueva generación (NGS) puede identificar a pacientes con fusión *NTRK* y mejorar la atención de estos pacientes<sup>12</sup>.



# Determinación de fusiones NTRK: Qué dicen las guías

## Recomendaciones ESMO para la detección de fusiones NTRK<sup>13</sup>

### Muestra para el estudio de la presencia de fusiones NTRK



\*Esta población estaría representada probablemente por «cualquier cáncer en estadio avanzado, en particular si se ha demostrado que es negativo para otras alteraciones genéticas conocidas analizadas de rutina, y especialmente si se diagnostica en pacientes jóvenes».



## Determinación de fusiones NTRK: Qué dicen las guías

### Consenso multidisciplinar para la optimización de la detección de alteraciones de genes *NTRK* (SEOM, SEAP, SEHOP)<sup>14</sup>



Selección por tipo de paciente

Pacientes adultos y pediátricos con tumores sólidos que:

1. Son metastásicos o es probable que la resección quirúrgica produzca una alta morbilidad, y
2. Han progresado después del tratamiento o no hay terapia alternativa satisfactoria.



Selección por prevalencia histológica

Prevalencia baja de genes de fusión *NTRK* y de expresión de *NTRK*

- Cáncer de pulmón
- Cáncer de colon, mama o tiroides
- Melanoma
- Colangiocarcinoma, cáncer de páncreas
- Tumor spitzoide
- Carcinoma papilar de tiroides

Prevalencia baja de genes de fusión *NTRK* (pero expresión frecuente de *NTRK*)

- Tumores neuroendocrinos
- Glioma
- Sarcomas
- GIST

Prevalencia alta de fusión *NTRK*

- Fibrosarcomas infantiles
- Carcinoma glándulas salivares y mama
- Nefroma mesobástico congénito

Determinaciones moleculares de rutina

Sí

TRK incluido

No

TRK no incluido

Si los drivers conocidos son negativos

Realizar cribado panTRK IHQ

Si es positiva

Utilizar NGS con un panel amplio que incluya los genes *NTRK*

Determinaciones de FISH de rutina

Sí

Si es negativa

No

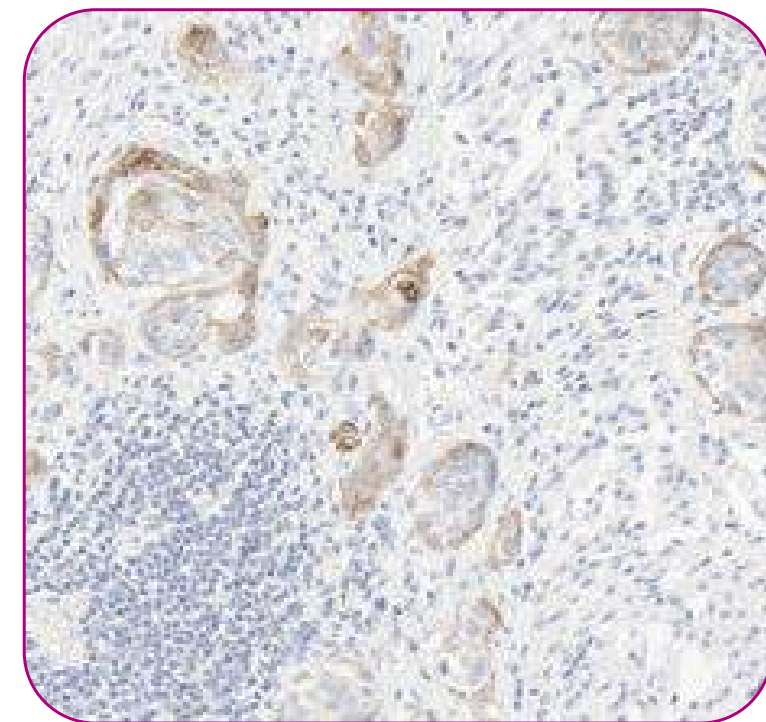
# Técnicas para la identificación de fusiones *NTRK*

## TÉCNICAS DISPONIBLES PARA LA DETECCIÓN DE FUSIONES *NTRK 1, 2 Y 3*

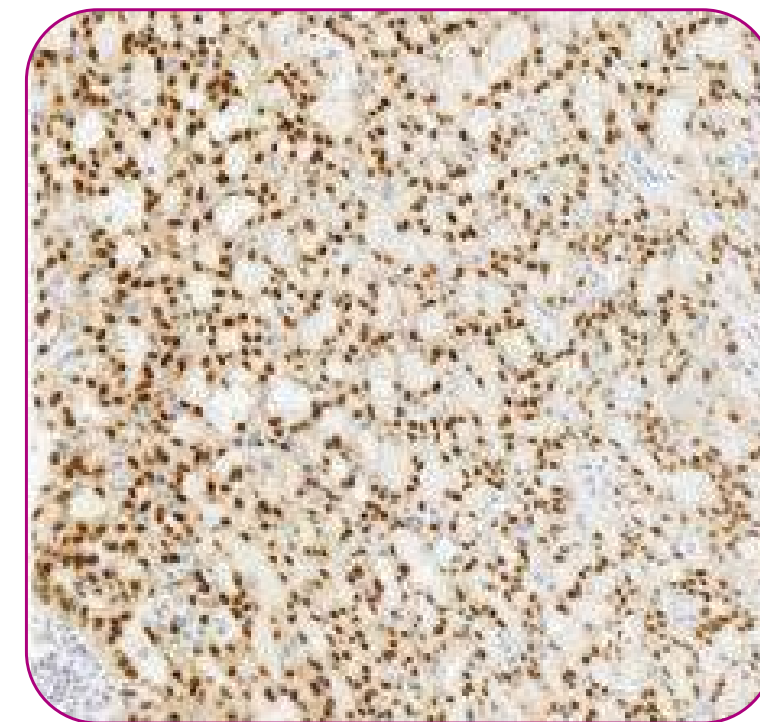
	NGS	IHQ	FISH	RT-PCR
<b>Capacidad para detectar fusiones diferentes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Puede detectar fusiones en los tres genes <i>NTRK</i>, así como el <i>partner</i> de fusión y la posición de la fusión<sup>1,15</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Los anticuerpos pan-TRK pueden detectar la presencia de la proteína codificada por cualquiera de los tres genes <i>NTRK</i><sup>15,23</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Requiere una sonda diferente para cada gen<sup>29</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Requiere múltiples reacciones con cebadores específicos y puede pasar por alto variantes desconocidas<sup>32</sup></li> </ul>
<b>Requisitos de la muestra</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>La cantidad necesaria varía dependiendo de la plataforma de NGS<sup>16</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Requiere tejido específico<sup>18,24,25</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Requiere tejido específico<sup>18</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Requiere tejido específico<sup>32,33</sup></li> </ul>
<b>Células/ADN/ARN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>≥20% de células tumorales<sup>17</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt;50% de células tumorales<sup>26,27</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt;50% de células tumorales<sup>30</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>0,1-0,5 µg de ARN<sup>18,34</sup></li> </ul>
<b>Tiempo hasta el resultado</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>2-21 días<sup>18-21</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>0,5-2 días<sup>18,28</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>2-10 días<sup>18,31</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1 día<sup>18</sup></li> </ul>
<b>Análisis de múltiples genes además de fusiones <i>NTRK</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>SÍ<sup>18</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>NO<sup>18</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>NO<sup>18</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>NO<sup>18</sup></li> </ul>
<b>Ventajas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>Técnica recomendada para la detección fusiones <i>NTRK</i><sup>22</sup></b></li> <li>Puede detectar genes de fusión nuevos (dependiendo del ensayo utilizado)<sup>22</sup></li> <li>Se puede utilizar para evaluar simultáneamente varias dianas accionables, conservando el tejido que en ocasiones es escaso<sup>22</sup></li> <li>El análisis basado en ARN se centra en las secuencias codificadoras, no en intrones<sup>22</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Bajo coste<sup>22</sup></li> <li>Fácilmente disponible<sup>22</sup></li> <li>Detecta TRKA, B y C<sup>22</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Las fusiones <i>NTRK</i> con patrones desconocidos se pueden detectar mediante FISH con sondas de rotura (<i>break-apart</i>)<sup>22</sup></li> <li>FISH ya está disponible en la mayoría de laboratorios y centros<sup>22</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Alta sensibilidad y especificidad<sup>22</sup></li> <li>Bajo coste por ensayo<sup>22</sup></li> </ul>
<b>Desventajas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Las plataformas de NGS basadas en ADN disponibles en el mercado pueden no ser capaces de identificar todas las fusiones <i>NTRK</i>, especialmente las que afectan a los genes <i>NTRK2</i> y <i>NTRK3</i>, que tienen regiones intrónicas grandes<sup>22</sup></li> <li>La NGS basada en ARN está limitada por la calidad del ARN<sup>22</sup></li> <li>Coste elevado</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Casos positivos por IHQ requieren confirmación por NGS<sup>22</sup></li> <li>Puede no ser específica de la fusión <i>NTRK</i>, ya que detecta tanto proteínas normales como de fusión<sup>22</sup></li> <li>Posibles falsos negativos para fusiones que afectan a TRKC<sup>22</sup></li> <li>No existe estandarización de algoritmos de valoración de la expresión<sup>22</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Se requiere un FISH para cada gen de <i>NTRK</i> si no se conoce la secuencia diana<sup>22</sup></li> <li>Las traslocaciones cromosómicas complejas pueden dar lugar a falsos positivos<sup>22</sup></li> <li>Los resultados falsos positivos pueden superar el 30%<sup>22</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Es necesario conocer las secuencias diana (es decir, no se pueden detectar fácilmente patrones de fusión nuevos)<sup>22</sup></li> <li>Una prueba RT-PCR multiplex completa podría ser difícil debido al número potencialmente grande de posibles patrones de fusión 5'<sup>22</sup></li> </ul>

# Técnicas para la identificación de fusiones *NTRK*

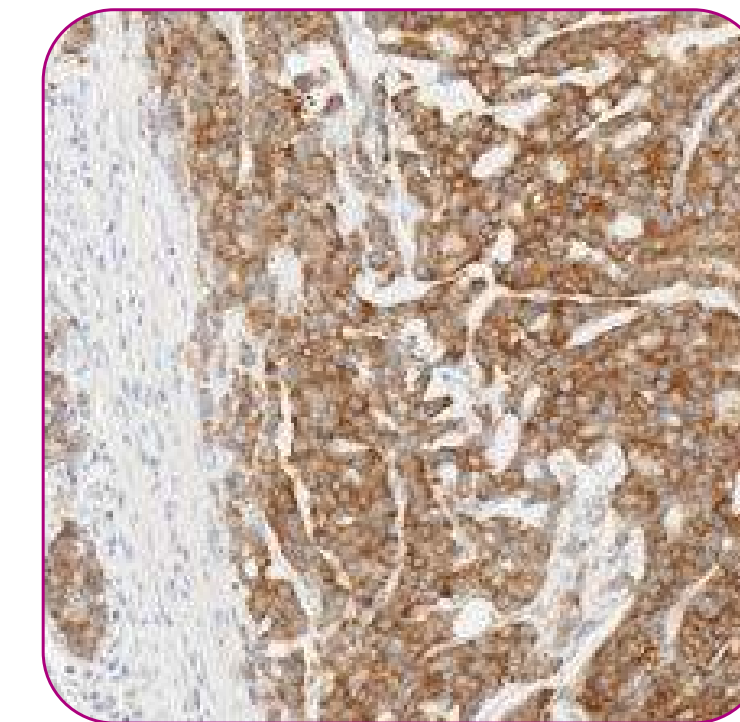
## Ejemplos de resultados de expresión de las proteínas TRK por IHQ y confirmación de fusión *NTRK* por NGS



Expresión de proteína en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello con TRK nativa (20x)<sup>35</sup>



Expresión de proteína en carcinoma secretor de glándula salival con fusión de TRK (20x)<sup>36</sup>



Expresión de proteína en carcinoma colorrectal con fusión de TRK (20x)<sup>36</sup>

### Ejemplo de informe de NGS

Cuando solicite una prueba, asegúrese de que se analizan las fusiones de los tres genes *NTRK*: *NTRK1*, *NTRK2* y *NTRK3*<sup>1,3</sup>

Los resultados de la NGS le ayudarán a identificar qué tumores sólidos son positivos para la fusión de *NTRK*.

El contenido específico en el informe de su muestra dependerá del método analítico y del laboratorio.

INFORME DE ANATOMÍA PATOLÓGICA	Paciente NSI	Tipo de tumor Adenocarcinoma de pulmón	N.º TRF TRXXXXXX
<b>PACIENTE</b> Enfermedad: <b>Adenocarcinoma de pulmón</b> Nombre: <b>NSI</b> Fecha de nacimiento: <b>NSI</b> Sexo: <b>Mujer</b> N.º de historia clínica: <b>NSI</b>	<b>MÉDICO</b> Médico solicitante: <b>NSI</b> Centro médico: <b>NSI</b> Receptor adicional: <b>NSI</b> ID del centro médico: <b>NSI</b> Patólogo: <b>NSI</b>	<b>MUESTRA</b> Sitio de la muestra: <b>NSI</b> ID de la muestra: <b>NSI</b> Tipo de muestra: <b>NSI</b> Fecha de recogida: <b>NSI</b> Muestra recibida: <b>NSI</b>	<b>RESULTADOS DE LA PRUEBA</b> <div style="background-color: #800040; color: white; padding: 2px; text-align: center;">Marcadores detectados</div> <div style="background-color: #d8bfd8; padding: 2px; text-align: center;">NTRK1</div>
<b>OTRAS ALTERACIONES Y BIOMARCADORES IDENTIFICADOS</b> Los resultados notificados en esta sección no son prescriptivos ni concluyentes para el uso autorizado de ningún producto terapéutico específico. Consulte la sección de servicios profesionales para obtener información adicional.			
Estado de microsatélites: MS estable <sup>a</sup>	<i>PTCH1</i> : T416S	Pérdida de <i>CDKN2A/B</i> <sup>a</sup>	
Carga mutacional del tumor: 11 mutaciones/Mb <sup>a</sup>	<i>TP53</i> : R267P	Amplificación de <i>EGFR</i> <sup>a</sup>	<b>EJEMPLO DE INFORME</b>

**NSI**: no se indica; **NTRK**: Gen del receptor tirosina quinasa neurotrófico; **TRK**: receptor quinasa tropomiosina.

<sup>a</sup>Consulte el apéndice para ver las declaraciones de limitación relacionadas con la detección de cualquier alteración del número de copias, reordenamientos génicos y resultados de inestabilidad de microsatélites o carga mutacional del tumor en esta sección.

# Preguntas frecuentes sobre el diagnóstico de fusiones *NTRK*

General

IHQ

NGS

Guías



Diagnóstico  
molecular

NTRK

## Preguntas frecuentes

### GENERAL

#### ¿Qué tipos de técnicas diagnósticas se pueden usar para detectar fusiones *NTRK*?

Las fusiones *NTRK* se pueden detectar usando diversos métodos diagnósticos, como secuenciación de nueva generación (NGS), inmunohistoquímica (IHQ), que detecta la expresión de proteína tanto nativa como de fusión, hibridación in situ con fluorescencia (FISH) y reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)<sup>1,23,37</sup>. Todos los casos con IHQ Pan TRK-positiva deben determinarse por NGS para confirmar la presencia de la fusión *NTRK*<sup>22</sup>.

#### ¿Cómo funciona cada una de las pruebas diagnósticas y cuáles son sus ventajas y limitaciones?

- La NGS se basa en tecnologías de secuenciación de ADN y ARN que son capaces de procesar en paralelo múltiples secuencias de ADN o ARN y proporciona una visión más completa de varios biomarcadores. La NGS puede detectar fusiones en los tres genes *NTRK* (debe tener cobertura para la fusión de los genes *NTRK* 1, 2 y 3), así como el gen y la posición de la fusión *NTRK*. Sin embargo, el tiempo hasta los resultados con la NGS puede ser más largo que con IHQ o FISH<sup>1,18,23,24</sup>.
- La IHQ es una prueba para biomarcadores proteicos que utiliza anticuerpos específicos para detectar la expresión del componente TRK de la proteína de fusión. Un anticuerpo dirigido contra la región conservada puede detectar proteínas nativas o de fusión derivadas de las proteínas TRKA, TRKB o TRKC<sup>23,37</sup>.
- Al igual que la IHQ, las sondas para FISH no pueden distinguir variantes de fusión. Los ensayos FISH a menudo son laboriosos y más caros que la IHQ cuando se realizan ensayos múltiples<sup>15,23</sup>.
- La RT-PCR requiere de varias pruebas para cada gen ya que no se conoce la ubicación del reordenamiento génico. Es muy fiable para las variantes de fusión conocidas, pero requiere múltiples reacciones con cebadores específicos para las variantes conocidas y puede pasar por alto la detección de variantes desconocidas o no analizadas<sup>32</sup>.

## IHQ

### ¿Cuál es el papel de la NGS en comparación con la IHQ en la detección de *NTRK*?

Según la ESMO, en tumores sólidos en los que son frecuentes las fusiones *NTRK*, se recomienda un panel de NGS que incluya las fusiones *NTRK*. En el caso de tumores con una frecuencia muy baja de fusiones *NTRK*, pero en los que es común el cribado molecular, se recomienda la inclusión de los genes *NTRK* en el análisis mediante NGS de rutina. En tumores con una frecuencia baja de fusiones *NTRK*, para los que no se disponga de NGS o no se realice de forma rutinaria para un tipo histológico, se debe realizar el cribado mediante IHQ con pan-TRK, **siendo necesaria la confirmación de los resultados positivos mediante NGS**<sup>22</sup>.

### ¿En qué se diferencia la IHQ de la NGS?

La IHQ es una técnica para biomarcadores proteicos que utiliza anticuerpos específicos para detectar la expresión del componente TRK de la proteína de fusión<sup>2</sup>. La NGS se basa en tecnologías de secuenciación de ADN o ARN que son capaces de procesar en paralelo múltiples secuencias de ADN o ARN y proporciona información sobre varios biomarcadores, incluyendo alteraciones raras y alteraciones frecuentes. La NGS puede detectar fusiones en los tres genes *NTRK*, así como el *partner* de fusión de *NTRK* y la posición. Sin embargo, el tiempo hasta los resultados con la NGS puede ser más largo que con la IHQ. La IHQ detecta principalmente la expresión génica a nivel de proteína. No detecta la fusión en sí<sup>1,15,23,24,38</sup>.

### ¿La IHQ permite detectar todas las fusiones *NTRK*?

Para poder detectar todas las proteínas TRK, los anticuerpos deben detectar las proteínas TRKA, TRKB y TRKC. Algunos clones son menos sensibles que otros y algunos informes indican que la sensibilidad de la IHQ para algunas fusiones de *NTRK3* es menor que para *NTRK1* y *NTRK2*<sup>37</sup>.

### ¿La IHQ detecta las fusiones *NTRK*?

El ensayo VENTANA® pan-TRK (EPR17341) es un ensayo analítico CE-IVD diseñado para la detección inmunohistoquímica de la región C-terminal de las proteínas TRK A, B y C que se sabe están conservadas entre las proteínas nativas y las proteínas de fusión quiméricas. Puesto que el ensayo VENTANA® pan-TRK (EPR17341) no puede diferenciar entre las proteínas nativas y las fusiones de *NTRK*, es importante señalar que las proteínas TRK no se expresan de forma normal en tejido no neuronal, por lo que dicha expresión puede ser indicativa de una fusión que debería confirmarse con otros métodos<sup>15,39,40</sup>.

### ¿Cuál es la sensibilidad de la IHQ?

Se ha descrito que los anticuerpos pan-TRK tienen una sensibilidad del 95 al 100% y una especificidad de hasta el 100%<sup>15,23</sup>.

### ¿Existe un algoritmo de *scoring* o criterios para determinar la positividad de la IHQ?

No, no existe algoritmo de puntuación ni criterios para determinar la positividad de la IHQ. El ensayo VENTANA® pan-TRK (EPR17341) es un ensayo analítico CE-IVD diseñado para la detección inmunohistoquímica de la región C-terminal de las proteínas TRK A, B y C que se sabe están conservadas entre las proteínas nativas y las proteínas de fusión quiméricas<sup>39,41</sup>.

## NGS

### ¿Cuándo debo utilizar la NGS basada en ARN en lugar de la basada en ADN?

La NGS detecta ADN o ARN a nivel de nucleótido, exón o genoma completo. En la NGS basada en ARN, los intrones se han eliminado en el ARN tras el *splicing*, lo que elimina las limitaciones técnicas de la cobertura intrónica. Además, la detección de las fusiones a nivel de ARN proporciona una prueba directa de que son transcritas de forma funcional, y el análisis de la secuencia resultante del *splicing* puede determinar si la proteína se podría transcribir y estar dentro del marco de lectura. Los transcritos de la fusión también pueden detectarse con elevado nivel de confianza en el ARN de muestras de baja pureza tumoral puesto que las fusiones se expresan a menudo en tejido. No obstante, este método depende en gran medida de la calidad y longitud del ARN. La secuenciación basada en el ADN puede proporcionar una caracterización más completa de las alteraciones genéticas en el genoma. Una NGS costaría igual si es ARN o ADN y el tiempo es el mismo, pero con esta técnica la sensibilidad se podría ver reducida en alteraciones del tipo fusiones<sup>4,22,37,42,43</sup>.

### ¿Puedo utilizar biopsias líquidas para el análisis de las fusiones NTRK?

La biopsia líquida puede ser útil en el caso de pacientes que carecen de muestras de tejido o con muestras de tejido que no son óptimas<sup>44</sup>.

### ¿La NGS pasa por alto algunas fusiones de NTRK?

La NGS puede detectar fusiones en los tres genes *NTRK* (debe tener cobertura para la fusión de los genes *NTRK* 1, 2 y 3), así como el *partner* de fusión de *NTRK* y la posición. Una desventaja de la NGS basada en ADN es que está limitada por el tamaño de los intrones<sup>1,15,37</sup>.

## Guías

### ¿Qué guías y/o consensos existen para la determinación de fusiones *NTRK*?

» Las guías del *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) para el tratamiento según el tipo de cáncer incluyen el análisis de las fusiones *NTRK*.

- **Cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) v3.2019 / categoría 2A:** recomienda el análisis de la fusión *NTRK* como parte del amplio perfil molecular en pacientes con adenocarcinoma avanzado o metastásico, de células grandes o CPNM sin especificar, basado en datos recientes<sup>38</sup>. [ACCESO GUÍA](#)

A partir de agosto de 2019, algunas guías adicionales de la NCCN que consideran el análisis de la fusión *NTRK* como opción incluyen las siguientes:

- **Cáncer rectal v2.2019 / categoría 2A:** recomienda el análisis de la fusión *NTRK* en pacientes con cáncer colorrectal metastásico<sup>45</sup>. [ACCESO GUÍA](#)
  - **Melanoma cutáneo v2.2019 / categoría 2A:** recomienda el análisis de la fusión *NTRK* como técnica molecular novedosa para el diagnóstico y pronóstico de melanoma cutáneo<sup>46</sup>. [ACCESO GUÍA](#)
  - **Primario oculto v2.2019 / categoría 2A:** según el criterio del médico, el análisis de la proteína TRK se puede considerar parte del amplio análisis mediante IHQ (una prueba positiva debe confirmarse posteriormente mediante NGS)<sup>47</sup>. [ACCESO GUÍA](#)
  - **Cáncer de colon v2.2019 / categoría 2A:** recomienda el análisis de la fusión *NTRK* en pacientes con cáncer colorrectal metastásico<sup>48</sup>. [ACCESO GUÍA](#)
  - **Cánceres de cabeza y cuello v2.2019 tumores de glándulas salivales / categoría 2A:** recomienda la detección del estado de fusión *NTRK* para el carcinoma secretor<sup>49</sup>. [ACCESO GUÍA](#)
- » SEHOP-SEAP-SEOM. Diagrama para la determinación de alteraciones en el gen *NTRK* en cáncer avanzado<sup>14</sup>. [ACCESO](#)
- » Además, existen consensos internacionales como el de las sociedades JSCO—ESMO—ASCO—JSMO—TOS, que establecen recomendaciones sobre en qué pacientes se deben buscar fusiones *NTRK*<sup>50</sup>. [ACCESO CONSENSO](#)

# Para pacientes con tumores sólidos, Deje que el diagnóstico sea su guía


 NTRK

Si desea más información sobre análisis molecular, visite [www.encuentrtrk.es](http://www.encuentrtrk.es).

**Referencias:** 1. Vaishnavi A, *et al.* TRKing down an old oncogene in a new era of targeted therapy. *Cancer Discov.* 2015;5(1):25-34. 2. Lange AM, *et al.* Inhibiting TRK proteins in clinical cancer therapy. *Cancers (Basel).* 2018;10(4):pii:E105. 3. Amatu A, *et al.* NTRK gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types. *ESMO Open.* 2016;1(2):e000023. 4. Cocco E, *et al.* NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15(12):731-47. 5. Gatalica Z, *et al.* Molecular characterization of cancers with NTRK gene fusions. *Mod Pathol.* 2019;32(1):147-53. 6. Farago AF, *et al.* Clinicopathologic features of non-small-cell lung cancer harboring an NTRK gene fusion. *JCO Precis Oncol.* 2018;2018. 7. Sethi R, *et al.* Mammary analogue secretory carcinoma: update on a new diagnosis of salivary gland malignancy. *Laryngoscope.* 2014;124(1):188-195. 8. Okamura R, *et al.* Analysis of NTRK alterations in pan-cancer adult and pediatric malignancies: implications for NTRK-targeted therapeutics. *JCO Precis Oncol.* 2018;2018. 9. Khotskaya YB, *et al.* Targeting TRK family proteins in cancer. *Pharmacol Ther.* 2017;173:58-66. 10. de Lartigue J. TRK inhibitors advance rapidly in "tumoragnostic" paradigm. *Oncology Live.* 2017;18(15). <https://www.onclive.com/publications/Oncology-live/2017/vol-18-no-15/trk-inhibitors-advance-rapidly-in-tumoragnosticparadigm>. Accessed May, 2021. 11. Stransky N, *et al.* The landscape of kinase fusions in cancer. *Nat Commun.* 2014;5:4846. 12. Kumar-Sinha C, *et al.* Landscape of gene fusions in epithelial cancers: seq and ye shall find. *Genome Med.* 2015;7:129. 13. Marchiò C, *et al.* ESMO recommendations on the standard methods to detect NTRK fusions in daily practice and clinical research. *Ann Oncol.* 2019;30(9):1417-1427. 14. Garrido P, *et al.* Multidisciplinary consensus on optimising the detection of NTRK gene alterations in tumours. *Clin Transl Oncol.* 2021 Feb 23. doi: 10.1007/s12094-021-02558-0. 15. Hechtman JF, *et al.* Pan-Trk immunohistochemistry is an efficient and reliable screen for the detection of NTRK fusions. *Am J Surg Pathol.* 2017;41(11):1547-51. 16. Chen H, *et al.* Analysis of pre-analytic factors affecting the success of clinical next-generation sequencing of solid organ malignancies. *Cancers (Basel).* 2015;7(3):1699-1715. 17. Cleveland Clinic Laboratories. CC-SIGN® NTRK Plus Gene Fusion NGS Panel. <https://clevelandcliniclabs.com/2019/01/31/new-cc-sign-ntrk-gene-analysis/>. Accessed May, 2021. 18. Du X, *et al.* ALK-rearrangement in non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Thorac Cancer.* 2018;9(4):423-430. 19. NeoGenomics. NTRK NGS Fusion Profile. <https://neogenomics.com/test-menu/ntrk-ngs-fusion-profile>. Accessed May, 2021. 20. Thermo Fisher Scientific. Oncomine NTRK Testing Flyer. 2018. Available for download at <https://www.oncomine.com/ngs-for-pathologists>. Accessed May, 2021. 21. Molecular MD. NGS Lung-Thyroid Fusion Cancer Panel. December 16, 2016. [www.molecularmd.com](http://www.molecularmd.com). Accessed May, 2021. 22. Penault-Llorca F, *et al.* Testing algorithm for identification of patients with TRK fusion cancer. *J Clin Pathol.* 2019;72(7):460-467. 23. Murphy DA, *et al.* Detecting gene rearrangements in patient populations through a 2-step diagnostic test comprised of rapid IHC enrichment followed by sensitive next-generation sequencing. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2017;25(7):513-523. 24. Su D, *et al.* High performance of targeted next generation sequencing on variance detection in clinical tumor specimens in comparison with current conventional methods. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017;36(1):121. 25. Stack EC, *et al.* Multiplexed immunohistochemistry, imaging, and quantitation: a review, with an assessment of tyramide signal amplification, multispectral imaging and multiplex analysis. *Methods.* 2014;70(1):46-58. 26. Hung YP, *et al.* Evaluation of pan-TRK immunohistochemistry in infantile fibrosarcoma, lipofibromatosis-like neural tumour and histological mimics. *Histopathology.* 2018;73(4):634-644. 27. Rudzinski ER, *et al.* Pan-Trk immunohistochemistry identifies NTRK rearrangements in pediatric mesenchymal tumors. *Am J Surg Pathol.* 2018;42(7):927-935. 28. NeoGenomics. Pan-TRK. <https://neogenomics.com/test-menu/pan-trk>. Accessed May, 2021. 29. Kummur S, *et al.* TRK inhibition: a new tumor-agnostic treatment strategy. *Target Oncol.* 2018;13(5):545-556. 30. Luk PP, *et al.* Biomarkers for ALK and ROS1 in lung cancer: immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Arch Pathol Lab Med.* 2018;142(8):922-928. 31. Empire Genomics. NTRK3 Break Apart FISH Probe. <https://www.empiregenomics.com/fish-probes/hd-probes/NTRK3+Break+Apart+FISH+Probe>. Accessed May, 2021. 32. Ali G, Bruno R, Savino M in lung cytology? *Arch Pathol Lab Med.* 2018;142(4):480-9. 33. Liu ML, *et al.* Rt-PCR gene expression profiling of RNA from paraffinembedded tissues prepared using a range of different fixatives and conditions. *Methods Mol Biol.* 2011;724:205-37. 34. Tatematsu T, *et al.* Investigation of neurotrophic tyrosine kinase receptor 1 fusions and neurotrophic tyrosine kinase receptor family expression in non-small-cell lung cancer and sensitivity to AZD7451 in vitro. *Mol Clin Oncol.* 2014;2(5):725-30. 35. Roche (via PR NewsWire). Roche launches first IVD pan-TRK immunohistochemistry assay. November 27, 2018. <https://www.prnewswire.com/news-releases/roche-launches-first-ivd-pan-trk-immunohistochemistry-assay-300755647.html>. Accessed May, 2021. 36. Roche Tissue Diagnostics. VENTANA pan-TRK (EPR17341) Assay: Package Insert 1017533EN Rev A. [https://productlibrary.ventana.com/ventana\\_portal/executeSearch.do](https://productlibrary.ventana.com/ventana_portal/executeSearch.do). Accessed May, 2021. 37. Solomon JP, Benayed R, Hechtman JF, Ladanyi M. Identifying patients with NTRK fusion cancer. *Ann Oncol.* 2019;30(Suppl8):viii16-viii22. 38. Referenced with permission from the NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) for Non-Small Cell Lung Cancer. V.2.2020. ©National Comprehensive Cancer Network, Inc 2019. All rights reserved. Published December 23, 2019. Accessed May, 2021. To view the most recent and complete version of the guideline, go online to [www.NCCN.org](http://www.NCCN.org). 39. Roche (via PR NewsWire). Roche launches first IVD pan-TRK immunohistochemistry assay. Nov 27, 2018. <https://www.prnewswire.com/news-releases/roche-launches-first-ivd-pan-trk-immunohistochemistryassay-300755647.html>. Accessed May, 2021. 40. Roche Tissue Diagnostics. VENTANA pan-TRK (EPR17341) Assay: Package Insert 1017533EN Rev A. [https://productlibrary.ventana.com/ventana\\_portal/executeSearch.do](https://productlibrary.ventana.com/ventana_portal/executeSearch.do). Accessed May, 2021. 41. Fedchenko N, *et al.* Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue - a review. *Diagn Pathol.* 2014;9:221. 42. Xu T, *et al.* Gene fusion in malignant glioma: an emerging target for next-generation personalized treatment. *Transl Oncol.* 2018;11(3):609-18. 43. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2009;10(1):57-63. 44. Aguado C, *et al.* Fusion gene and splice variant analyses in liquid biopsies of lung cancer patients. *Transl Lung Cancer Res.* 2016;5(5):525-31. 45. Referenced with permission from the NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) for Rectal Cancer. V.1.2020. ©National Comprehensive Cancer Network, Inc 2019. All rights reserved. Published December 19, 2019. Accessed May, 2021. To view the most recent and complete version of the guideline, go online to [www.NCCN.org](http://www.NCCN.org). 46. Referenced with permission from the NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) for Cutaneous Melanoma. V.1.2020. ©National Comprehensive Cancer Network, Inc 2019. All rights reserved. Published December 19, 2019. Accessed May, 2021. To view the most recent and complete version of the guideline, go online to [www.NCCN.org](http://www.NCCN.org). 47. Referenced with permission from the NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) for Occult Primary (Cancer of Unknown Primary [CUP]). V.2.2020. ©National Comprehensive Cancer Network, Inc 2020. All rights reserved. Published January 31, 2020. Accessed May, 2021. To view the most recent and complete version of the guideline, go online to [www.NCCN.org](http://www.NCCN.org). 48. Referenced with permission from the NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) for Colon Cancer. V.1.2020. ©National Comprehensive Cancer Network, Inc 2019. All rights reserved. Published December 19, 2019. Accessed May, 2021. To view the most recent and complete version of the guideline, go online to [www.NCCN.org](http://www.NCCN.org). 49. Referenced with permission from the NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) for Head and Neck Cancers. V.3.2019. ©National Comprehensive Cancer Network, Inc 2019. All rights reserved. Published September 16, 2019. Accessed May, 2021. To view the most recent and complete version of the guideline, go online to [www.NCCN.org](http://www.NCCN.org). 50. Yoshino T, *et al.* JSCO-ESMO-ASCO-JSMO-TOS: international expert consensus recommendations for tumour-agnostic treatments in patients with solid tumours with microsatellite instability or NTRK fusions. *Ann Oncol.* 2020;31(7):861-72.

