



Raccomandazioni regionali per la diagnosi anatomo-patologica nello screening per il tumore della mammella

Gruppo Patologi Screening Mammografico della Regione Veneto

Regione del Veneto
Assessorato alla Sanità e alla Programmazione Socio-Sanitaria

Direzione Prevenzione, Sicurezza Alimentare, Veterinaria
Unità Organizzativa Prevenzione e Sanità Pubblica
Coordinamento Regionale Screening Oncologici



Raccomandazioni regionali per la diagnosi anatomo-patologica nello screening per il tumore della mammella

Gruppo Patologi Screening Mammografico della Regione Veneto

Regione del Veneto
Assessorato alla Sanità e alla Programmazione Socio-Sanitaria

Direzione Prevenzione, Sicurezza Alimentare, Veterinaria
Unità Organizzativa Prevenzione e Sanità Pubblica
Coordinamento Regionale Screening Oncologici

A cura di:

Capitolo 1

Luca Anselmi (U.O. Anatomia Patologica, Genova)
Simonetta Bianchi (Anatomia Patologica AOU Careggi, Firenze)
Giovanni Capitanio (U.O. Anatomia Patologica, Venezia)
Francesca Caumo (U.O. Radiologia, Centro Prevenzione Senologica Azienda ULSS n° 20 Verona)
Dulio Della Libera (U.O. Anatomia Patologica, Azienda ULSS n° 2 Feltre - BL)
Alfonso Frigerio (Centro regionale Screening mammografico - Torino)
Licia Laurino (U.O. Anatomia Patologica, Azienda ULSS n° 9 Treviso)
Ettore Macrì (U.O. Anatomia Patologica, Azienda ULSS n° 1 Belluno)
Doralba Morrone (Struttura Complessa di Senologia Clinica, Istituto per lo Studio e la Prevenzione Oncologica ISPO Firenze)
Adriana Paduos (Centro di Riferimento per l'Epidemiologia e la Prevenzione Oncologica Torino)
Antonio Ponti (Centro di Riferimento per l'Epidemiologia e la Prevenzione Oncologica Torino)
Francesca Pietribiasi (Anatomia Patologica ASL TO5)
Gianni Saguatti (U.O. di Senologia AUSL Bologna)
Maria Sironi (U.O. di Anatomia Patologica, Chiavari, Genova)
Antonio Rizzo (U.O. Anatomia Patologica, Azienda ULSS n° 8 Asolo, coordinatore Gruppo regionale patologi screening mammografico)

Capitolo 2

Giovanni Capitanio (U.O. Anatomia Patologica, Venezia)
Quirino Piubello (U.O.C. Anatomia Patologica, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata Verona)
Antonio Rizzo (U.O. Anatomia Patologica, Azienda ULSS n° 8 Asolo, coordinatore Gruppo regionale patologi screening mammografico)

Capitolo 3

Stefania Dante (U.O. Anatomia Patologica, ULSS 6 Vicenza)
Enrico Orvieto (U.O. Anatomia Patologica, Azienda Ospedaliera Padova)
Ida Pavon (U.O. Anatomia Patologica ULSS 13 Dolo (Venezia))

Regione del Veneto

Area Sanità e Sociale

Direzione Prevenzione, Sicurezza Alimentare,

Veterinaria

Dr.ssa Francesca Russo

Unità Organizzativa Prevenzione e Sanità Pubblica

Dr.ssa Chiara Ziprani

CRSO - Coordinamento Regionale Screening

Oncologici

Dr. Sandro Cinquetti

Capitolo 4

Licia Laurino (U.O. Anatomia Patologica, Azienda ULSS n° 9 Treviso)

Capitolo 5

Stefania Dante (U.O. Anatomia Patologica, ULSS 6 Vicenza)
Ida Pavon (U.O. Anatomia Patologica, ULSS 13 Mirano)

Coordinamento del Gruppo Regionale Patologi dello Screening Mammografico:

Antonio Rizzo (U.O. Anatomia Patologica, Azienda ULSS n° 8 Asolo, Referente Gruppo regionale patologi screening mammografico)

Coordinamento editoriale:

Antonio Rizzo, Chiara Fedato, Alessandra Greco, Manuel Zorzi, Adriana Montaguti.

Gruppo Regionale Patologi dello Screening Mammografico. CRSO - Coordinamento Regionale Screening Oncologici.

Documento elaborato e distribuito al Gruppo regionale patologi e radiologi screening mammografico nel giugno 2016
Revisione prevista: 2020

Aggiornamento Allegato A della DGR n. 296/2016

Progetto grafico

Evidenzia immagine&comunicazione - Belluno

Stampa

CLEUP - Padova
Novembre 2016

Il documento è disponibile in formato PDF sul sito della Regione Veneto al seguente indirizzo:

www.regione.veneto.it/web/sanita/screening-oncologici

Dorsoduro 3439/A - 30123 Venezia

Tel. +39 041 2791352 - Fax +39 041 2791355

crso@regione.veneto.it

<https://www.regione.veneto.it/web/sanita/screening-oncologici>



REGIONE DEL VENETO

Indice

Introduzione	1
01. Procedure diagnostiche cito-istologiche pre-operatorie	4
Premessa	6
1. Introduzione	9
2. Uso delle tecniche diagnostiche preoperatorie	9
3. Scelta della tecnica di campionamento	10
4. Diagnostica istologica: refertazione delle agobiopsie (NCB /VAB/VAB3D)	14
4.1 Categorie Diagnostiche	14
B1 - Tessuto normale / Inadeguato	16
B2 - Lesione benigna	16
B3 - Lesioni ad incerto potenziale di malignità	16
Management dei B3	18
Comunicazione della diagnosi	19
B4 - Lesione sospetta per malignità	19
B5 - Lesione neoplastica maligna	19
4.2 Problemi e limiti diagnostici	20
4.3 Lesioni rare	21
4.4 Fattori prognostici	21
5. Diagnostica citologica	23
5.1 Uso dell'esame citologico (FNA)	23
5.2 Modalità di prelievo	23
5.3 Allestimento	24
5.4 Informazioni cliniche	24
5.5 Criteri citologici generali di benignità e malignità	25
5.6 Refertazione	25
C1 - Inadeguato / non rappresentativo	26
C2 - Benigno	26
C3 - Atipia in lesione probabilmente benigna	26
C4 - Sospetto per malignità o carcinoma probabile	27
C5 - Maligno o carcinoma o altre neoplasie	27
5.7 Limiti	27
5.7.1 Falsi positivi	27
5.7.2 Falsi negativi	28
5.7.3 Diagnosi di carcinoma duttale in situ (DCIS)	28
5.7.4 Lesioni rare	29
6. Bibliografia	30
7. Controllo di qualità	35
Indicatori e minimi standard suggeriti per la citologia	37
Indicatori e minimi standard suggeriti per le biopsie	37
8. Bibliografia controllo di qualità	38
9. Ruolo della citologia agoaspirativa nella stadiazione del carcinoma della mammella	39
Bibliografia:	41
Allegato 1 - Richiesta di esame agobiottico della mammella (NCB)	44
Allegato 2 - Richiesta di esame citologico della mammella (FNA)	45

02. Procedure diagnostiche del campione operatorio 46

1. Esame macroscopico e campionamento del materiale chirurgico della mammella	48
2. Invio del materiale chirurgico	48
2.1 Fissazione in formalina	48
2.2 Richiesta di esame istologico	49
2.3 Integrità/Orientamento del campione	49
3. Esame macroscopico del campione chirurgico	49
3.1 Esame “esterno” del campione	50
3.2 Marcatura dei margini chirurgici con inchiostro di china o tempere acriliche	50
3.3 Sezionamento del campione e suo esame “interno”	50
3.4 Esame radiologico del materiale chirurgico	50
3.5 Campionamento	50
3.6 Considerazioni generali	51
3.7 Raccomandazioni specifiche in relazione ai differenti tipi di campione chirurgico	51
3.8 Mastectomia	52
3.8.1 Mastectomia “Nipple Sparing”	53
4. Esame microscopico e diagnosi finale	53
5. Bibliografia	54
ALLEGATO 1	56
ALLEGATO 2	57
ALLEGATO 3	58
ALLEGATO 4	59
ALLEGATO 5	60
SCHEMA DI REFERTAZIONE	62
ALLEGATO 6	66
1 - Diagnosi e refertazione delle lesioni epiteliali proliferative	66
2 - Diagnosi e refertazione dei cdis	68
3 - Carcinoma microinvasivo	68
4 - Diagnosi e refertazione del carcinoma invasivo	68
5 - Valutazione e refertazione dei dati prognostici /predittivi	69
Grado di differenziazione	71
Schema per la valutazione del grado istologico	71
ALLEGATO 7	74
ALLEGATO 8	76
Bibliografia	77

03. Linfonodo sentinella 78

1. Modalità di esecuzione	80
1.1 Esame intraoperatorio	81
1.2 Esame esclusivo in paraffina	81
1.3 Esame ibrido (Criostato, Immunocitochimica e Paraffina)	81
2. Refertazione	82
3. Commenti aggiuntivi	83
4. Linfonodo sentinella in tumore recidivo sulla stessa mammella	83
5. Bibliografia	85
ALLEGATO 1	86

1. Introduzione	90
2. Fase preanalitica (comune a tutte le determinazioni di immunoistochimica e di ibridazione in situ)	91
2.1 Tissue handling	91
2.2 Tipo di fissazione	92
2.3 Durata della fissazione	92
2.4 Antigen retrieval	92
3. Recettori steroidei (ER-PR)	92
3.1 FASE ANALITICA	92
3.1.1. Scelta del clone	92
3.1.2. Controlli di reazione	92
3.2.FASE POSTANALITICA	92
3.2.1 Interpretazione dei risultati	92
3.2.2 Refertazione	93
4. Marcatore di proliferazione ki-67	93
4.1. FASE ANALITICA	93
4.1.1. Scelta del clone	93
4.1.2. Controlli di reazione	93
4.2. FASE POSTANALITICA	93
4.2.1 Interpretazione dei risultati	93
4.2.2 Refertazione	93
5. HER2	94
5.1. FASE ANALITICA	94
5.1.1 Scelta del clone	94
5.2. FASE POSTANALITICA	94
5.2.1 Interpretazione dei risultati	94
5.2.2 Refertazione	96
6. Tecniche di ibridazione in situ: fish, cish, sish	96
6.1 ISH: interpretazione dei risultati	96
6.1.1 ISH DOPPIA SONDA	97
6.1.2 ISH SINGOLA SONDA	98
6.2 POLISOMIA DEL CROMOSOMA 17	99
7. Controllo di qualità'	100
7.1 Controlli positivi di reazione, interni	100
7.2 Controlli positivi e negativi di reazione, esterni (on slide)	100
8. Bibliografia	101

1. Diagnostica pretrattamento chemioterapico primario	106
1.1 Valutazione del tumore	106
1.1.1 Modalità di Prelievo	106
1.1.2 Valutazione della cute	106
1.2 Valutazione dello stato dei linfonodi	106
1.3 Marcatura del tumore	107
1.4 Valutazione istologica del campione biptico	107
2. Diagnostica dopo chemioterapia primaria	108
2.1 Notizie cliniche	108

2.2 Esame Macroscopico	108
2.3 Campionamento del pezzo operatorio	109
2.4 Campionamento del cavo ascellare	109
2.5 Esame microscopico	109
2.5.1 Valutazione istologica della mammella	109
2.5.2 Valutazione istologica dei linfonodi	110
2.5.3 Valutazione dei fattori prognostici predittivi	110
2.5.4 Recettori ormonali	110
2.5.5 Espressione della proteina HER2	110
2.5.6 Espressione di Mib1/Ki-67	111
2.5.7 Quantificazione della regressione tumorale	111
3. Risposta tumorale	111
4. Risposta linfonodale	111
5. Stazione ypnm	112
Refertazione	112
6. Bibliografia	113

Introduzione

Il Gruppo regionale veneto dei patologi dello screening mammografico nasce nel 2004 su iniziativa del Registro Tumori del Veneto, col supporto finanziario della Regione Veneto, allo scopo di uniformare le procedure diagnostiche e di promuovere il miglioramento continuo della qualità.

In questi anni il Gruppo ha intrapreso e realizzato diverse linee di lavoro:

- linee guida screening mammografico (1^a edizione 2006, 2^o edizione 2012);
- 8 confronti interistituzionali tra tutte le ULSS della Regione su casistica citologica, istologica su vetrino virtuale e sull'analisi dei parametri immunoistochimici di predittività di risposta alla terapia, con un progetto di formazione a distanza;
- promozione di momenti formativi altamente qualificanti, quali lo slide seminar su casistica di patologia mammaria complessa;
- valutazione degli standard e dei parametri di qualità del percorso diagnostico preoperatorio;
- partecipazione a gruppi di lavoro multidisciplinari per la definizione di un percorso diagnostico-terapeutico regionale;

spazio web all'interno del sito del Registro Tumori del Veneto, con la disponibilità di documenti, linee guida di riferimento, relazioni dei corsi organizzati e con una pagina di bibliografia ragionata. (<http://www.registro-tumoriveneto.it/screening/gpv/home.asp?p=home>)

La terza edizione del documento che qui presentiamo è il risultato dell'impegno profuso dai patologi e segno tangibile di un interesse partecipativo collegiale che tali problematiche richiedono. Nella miriade di linee guida, documenti di riferimento e protocolli diagnostici pubblicati in letteratura, questo lavoro rappresenta una sintesi condivisa a livello regionale, tenendo conto anche delle peculiarità organizzative della nostra realtà sanitaria.

Nel documento abbiamo voluto anche promuovere un lavoro di collaborazione con il GISMA (Gruppo Italiano Screening Mammografico), in un'ottica sempre più multidisciplinare. Questo per giungere ad un percorso diagnostico integrato delle lesioni mammarie screen-detected, attraverso l'indicazione della metodica di approfondimento più idonea rispetto al quadro radiologico osservato (capitolo primo "*Procedure diagnostiche cito-istologiche pre-operatorie*"). Tale approccio affianca e concretizza il modello organizzativo del percorso diagnostico-terapeutico della nostra Regione, proponendo un riferimento in termini di appropriatezza e di corretta gestione delle sempre più modeste risorse.

Inoltre, sulla scia della istituzione delle Breast Units, intese come strumento strategico finalizzato all'approccio multidisciplinare, questo documento rappresenta un modello cui riferirsi per tutte le pazienti con lesioni mammarie, a prescindere dalle modalità di accesso (screening, spontaneo o clinico). Il tutto nell'ottica di un'offerta sanitaria unitaria, complessiva ed altamente qualificata.

In questa edizione sono stati rivisti e modificati tutti i capitoli delle linee guida, alla luce degli ultimi dati della letteratura e ponendo come centrale il momento multidisciplinare nelle decisioni diagnostico-terapeutiche più complesse:

- nel primo capitolo, sono state riviste le flow charts delle procedure diagnostiche preoperatorie, con una particolare attenzione al management dei B3, introducendo altresì la valutazione preoperatoria del cavo ascellare
- nel capitolo secondo "*Procedure diagnostiche del campione operatorio*" è stata approfondita la problematica della tracciabilità e della corretta fissazione e campionamento dei campioni operatori; è stata altresì inserita come opzionale le modalità di refertazione dell'infiltrato linfocitario tumorale. Infine, sono state inse-

rite modalità di campionamento della mammella, della tuba e dell'ovaio in mastectomie ed annessiectomie profilattiche in donne con mutazione per BRCA1, BRCA2.

- il capitolo quarto "*Tecniche speciali*" è del tutto rielaborato rispetto al precedente, sia nel titolo, in quanto è stata inserita la sezione relativa alla ibridazione in situ (FISH, CISH, SISH), sia nei contenuti, alla luce dei documenti di consenso dell'ASCO/CAP 2013 e GIPAM 2015;
- visto il progressivo affermarsi della terapia neoadiuvante, molto sentita è stata l'esigenza di elaborare un protocollo standardizzato per l'esame e la stadiazione del campione operatorio in tali pazienti (capitolo quinto).

Il lavoro finora svolto dal Gruppo regionale dei patologi dello screening mammografico è segno di maturità in considerazione degli obiettivi raggiunti e di sicuro auspicio per la prosecuzione di tale impegno.

Siamo quindi fiduciosi che questo documento possa rappresentare un punto di riferimento per tutti i patologi della nostra Regione e diventare terreno di confronto con omologhi gruppi di altre realtà territoriali e di altre discipline, nell'ottica del miglioramento continuo della qualità.

Antonio Rizzo

Coordinatore Gruppo regionale patologi screening mammografico





Procedure diagnostiche
cito-istologiche
pre-operatorie



Questo protocollo aggiorna la precedente versione del 2012, adottando quanto sviluppato su quella base da un gruppo di lavoro del GISMA (Gruppo Italiano Screening Mammografico) (www.gisma.it)

- Revisione a cura di:
- Simonetta Bianchi (U.O. Anatomia Patologica, AOU Careggi - Firenze)
- Francesca Caumo (U.O. Radiologia, Centro Prevenzione Senologica - Azienda ULSS n° 20 Verona)
- Duilio Della Libera (U.O. Anatomia Patologica, Azienda ULSS n° 2 Feltrina - BL)
- Alfonso Frigerio (Centro Regionale Screening Mammografico – Torino)
- Licia Laurino (U.O. Anatomia Patologica, Azienda ULSS n° 9 Treviso)
- Doralba Morrone (Struttura Complessa di Senologia Clinica, Istituto per lo Studio e la Prevenzione Oncologica ISPO Firenze)
- Adriana Paduos (Centro di Riferimento per l'Epidemiologia e la Prevenzione Oncologica, Torino)
- Antonio Ponti (Centro di Riferimento per l'Epidemiologia e la Prevenzione Oncologica, Torino)
- Francesca Pietribiasi (U.O. Anatomia Patologica, ASL TO5)
- Gianni Saguatti (U.O. di Senologia, AUSL Bologna)
- Antonio Rizzo (U.O. Anatomia Patologica, Azienda ULSS n° 8 Asolo, coordinatore Gruppo regionale patologi screening mammografico)

Premessa

Dalla seconda metà degli anni '90 (Distante V et al, Eur J Cancer 2004) il Gruppo Italiano per lo screening mammografico (GISMa), con l'Osservatorio nazionale screening e il coordinamento del CPO Piemonte, conduce ogni anno una survey cosiddetta SQTm, dal nome dell'applicativo informatico (www.qtweb.it/sqtm) utilizzato per la registrazione e l'analisi dei dati, sulla diagnosi e la terapia dei casi screen detected, i cui risultati vengono pubblicati con regolarità (Ponti A et al, Epi Prev 2015). SQTm custodisce 51418 cancri e lesioni benigne della mammella operati nel periodo 2000-2014, vale a dire circa la metà dei casi screen detected in Italia nello stesso periodo. La datawarehouse è a disposizione dei ricercatori del GISMa interessati ad approfondire specifici problemi e a contribuire alla letteratura scientifica.

Da questa fonte sono state tratte le informazioni su 13148 lesioni operate della mammella (carcinomi invasivi, DCIS, lesioni intraepiteliali e lesioni benigne) diagnosticate allo screening nel triennio 2012-2014 in sette Regioni in donne di età 45-74, avendo escluso i casi trattati con chemioterapia neoadiuvante, allo scopo di descrivere la pratica della diagnosi preoperatoria e in particolare la gestione dei B3.

Il 54.7% dei 13.148 casi è stato sottoposto a prelievo con ago sottile per ottenere una diagnosi preoperatoria citologica. Solo leggermente inferiore (53.2%, n=6.995) è la proporzione di casi sottoposti anche o esclusivamente a needle core biopsy (NCB) per ottenere una diagnosi preoperatoria istologica o microistologica. Delle 6.995 NCB, 959 (13.7%) hanno avuto diagnosi di B3, mentre 78.0% sono state classificate come B5, 3.2% come B4 e 5.1% come B1 o B2. La distribuzione della proporzione di B3 per Regione è illustrata in *Tabella 1*.

A tutte queste lesioni è stata data indicazione chirurgica: eventuali B3 indirizzate alla sola sorveglianza non sono comprese in questo data set. La diagnosi post operatoria è illustrata in Tabella 2, dalla quale 58 lesioni (6.0%) sono state escluse perché la diagnosi era ignota.

Il valore predittivo positivo di una diagnosi di B3 è il 26.7% per tutti i tumori maligni e scende al 8.9% se si considerano solo i carcinomi invasivi.

Tabella 1

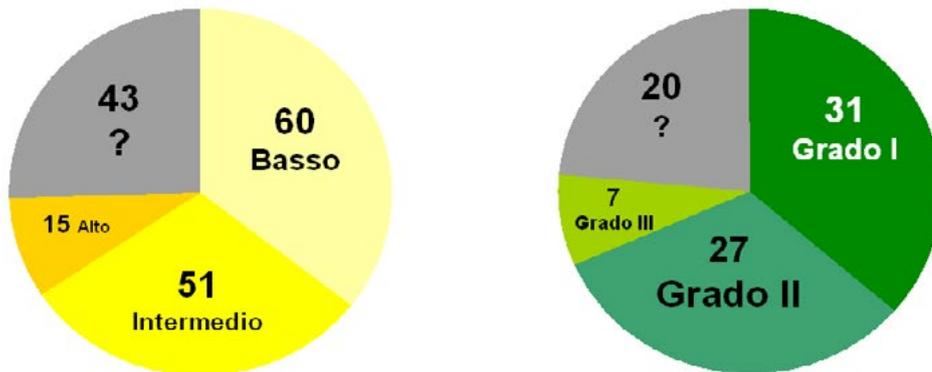
Regione	B3	B1-5	% B3
Emilia Romagna	448	3208	14.0%
Friuli Venezia Giulia (Trieste)	6	57	10.5%
Lazio	38	572	6.6%
Lombardia (Milano)	31	582	5.3%
Piemonte	419	2390	17.5%
Toscana (Firenze)	12	124	9.7%
Valle d'Aosta	5	60	8.3%
TOTALE	959	6993	13.7%

Tabella 2

Benigni (38.8%)	350	Tessuto normale	9
		Cisti	8
		Fibroadenoma	57
		Lesioni colonnari senza atipie	9
		Modificazioni fibrocistiche	25
		Ectasie duttali	38
		Ectasie duttali	3
		Filloide benigno	69
		Radial scar	16
		Altro tipo benigno	19
Intraepiteliali (33.0%)	297	LIN1	24
		LIN2	38
		DIN1a (FEA)	59
		DIN1b (ADH)	172
		Lesione papillare atipica	1
		Altro tipo intraepiteliale	3
In situ (18.8%)	169	Duttale NOS	4
		D. cribriforme	37
		D. solido	31
		D. micro papillare	11
		D. papillare	9
		Altro	18
		Ignoto	59
Invasivi (9.4%)	85	Duttale NOS	45
		Lobulare	7
		Tubulare	8
		Altro	6
		Ignoto	19

La distribuzione dei 169 DCIS (a sx) e degli 85 tumori invasivi (a dx) per grado nucleare e per grado secondo Elston-Ellis, rispettivamente, è illustrata come pie chart nella Figura 1. La percentuale di grado elevato è molto minore, sia nei DCIS sia nei tumori invasivi, di quanto normalmente si osserva nelle serie di casi di screening.

Figura 1



Quanto ha influito l'*imaging* a determinare la decisione di prescrivere la chirurgia per questi casi? Dei B3 il 6.8% era R5 e il 38.0% R4; 3.7% U5 e 23.0% U4.

Il 31.5% presentava alla mammografia microcalcificazioni, in un terzo circa dei casi con caratteristiche puntiformi – pulverulente, una tipologia molto più frequente nei B3 che nei B5 (3%). Per quanto riguarda il restante pattern radiologico, nel 46% dei B3 vs 25% dei B5 non ve ne è alcuno significativo, nel 14% dei B3 vs 5% dei B5 è opacità regolare, nel 15% vs 33% è opacità irregolare. La distorsione si attesta all'11% in entrambe.

In sintesi:

- il prelievo con ago sottile è ancora molto utilizzato per la diagnosi pre-operatoria dei casi screen detected in Italia;
- nei casi in cui viene utilizzata la needle core biopsy, i B3 rappresentano il 14% di tutte le diagnosi, ma la variabilità regionale è molto elevata (range 5% - 18%);
- raramente il quadro mammografico o ecografico rappresenta il motivo principale dell'indicazione chirurgica nei B3 (R5 o U5 < 10%), ma in un terzo / un quarto dei casi concorre alla decisione (R4 o U4). Nella maggioranza dei casi di B3 la prescrizione terapeutica dipende esclusivamente dal giudizio istopatologico pre-operatorio;
- le lesioni B3 operate sono in un quarto dei casi tumori maligni, ma i tumori in situ e quelli di basso grado sono nettamente prevalenti.

Questi dati insieme a quelli derivanti da una revisione della letteratura hanno indotto una riflessione multidisciplinare in sede GISMa che è sfociata nella preparazione di questo documento.

1. Introduzione

L'inquadramento diagnostico della patologia mammaria fornito da procedure biottiche minimamente invasive, è propedeutico alla corretta programmazione del trattamento terapeutico.

Fino a qualche anno fa l'agoaspirato con ago sottile (FNA), coadiuvato da un adeguato supporto clinico e radiologico strumentale, costituiva una procedura di semplice e di rapida esecuzione, ben tollerata dalla paziente, a basso costo che permetteva una diagnosi accurata nella grande maggioranza dei casi di lesioni mammarie "sintomatiche". L'introduzione e la diffusione delle metodiche di screening, unitamente alla definizione di un nuovo spettro di lesioni mammarie screen detected, ha introdotto nuove metodiche di indagine biottica minimamente invasiva (Minimal Invasive Biopsy/MIB) basate sull'utilizzo di aghi di maggior diametro (Needle Core Biopsy/NCB), talora supportati da procedure automatizzate e informatizzate (VAB Vacuum Assisted Biopsy / VAB 3D). L'utilizzo delle metodiche MIB limita le indicazioni della FNA, consigliando il passaggio dalla citologia alla microistologia, al fine di incrementare la specificità e la sensibilità diagnostica. Tali metodiche infatti hanno permesso di ridurre gli esami inadeguati, di definire in modo conclusivo la natura benigna di molte lesioni proliferative mammarie, di chiarire il significato biologico delle microcalcificazioni e, nell'ambito delle neoplasie maligne, la distinzione fra forme preinvasive e invasive con particolare interesse per le neoplasie lobulari, talora con il ricorso a metodiche ancillari immunoistochimiche e di ibridazione in situ (FISH/CISH), utili e necessarie a stabilire profili immunofenotipici necessari a trattamenti chemioterapeutici adiuvanti.

2. Uso delle tecniche diagnostiche preoperatorie

L'utilizzo delle tecniche di MIB in patologia mammaria richiede un processo continuo di controllo della qualità diagnostica che si ottiene con un approccio multidisciplinare e la condivisione dell'orientamento e delle criticità diagnostiche.

In questa visione si è reso necessario definire protocolli operativi per il trattamento dei campioni biottici e operatori con l'adozione di definite check-list per i report clinico-patologici che garantiscano un numero adeguato e sufficiente di elementi diagnostici (minimal data set), la conoscenza dell'inquadramento strumentale radiologico e l'utilizzo di un sistema diagnostico con categorie definite secondo le indicazioni europee. Auspicabile la correlazione fra i dati strumentali radiologici, patologici e, nel caso di intervento, operatori.

In generale l'approccio multidisciplinare dovrebbe costituire la regola in caso di lesioni screen detected al fine di incrementare la sensibilità diagnostica, riducendo di pari passo inadeguati e falsi negativi. La conoscenza della categoria diagnostica radiologica ed ecotomografica infatti è in grado, correlando il dato morfologico atteso con il quadro istologico del campione microistologico in esame, di verificarne l'adeguatezza e la rappresentatività.

Ogni campione ottenuto con metodiche cito-istologiche dovrebbe essere corredato dai dati clinico-strumentali, anamnesi personale, dati radiologici ed ecotomografici compreso il tipo della lesione (massa, addensamento parenchimale, distorsione parenchimale, microcalcificazioni), topografia della biopsia (lateralità e quadrante mammario), tecnica utilizzata, numero di campioni ottenuti, presenza di microcalcificazioni in base alla radiografia dei frustoli da MIB (vedi allegati 1 e 2) e la percentuale di massa (solitamente distorsione) o calcificazioni residue nel caso di approccio sotto guida stereotassica.

3. Scelta della tecnica di campionamento

Nella valutazione diagnostica preoperatoria di una lesione mammaria clinicamente evidente o screen detected assume fondamentale importanza la scelta della tecnica di campionamento. In generale la metodica di prima istanza è rappresentata dalla biopsia percutanea preoperatoria (NCB /VAB/VAB3D), che consente di attuare una valutazione istopatologica e di approntare tutti gli approfondimenti diagnostici immunohistochimici a valore prognostico / predittivo.

In caso di ripetizione del prelievo risulta opportuno effettuare il campionamento mediante VAB, se precedentemente si era eseguito una NCB, al fine di ottenere un campione più rappresentativo da esaminare, ottenendo quindi una maggiore accuratezza della diagnosi patologica. Con l'introduzione della tomosintesi si è sviluppata la possibilità di eseguire prelievi biotici sotto guida 3D, metodica che consente di avere automaticamente la profondità della lesione ed effettuare prelievi più accurati e veloci. Altre metodiche, per esempio il *BLES (Breast Lesion Excision System)* di efficacia tuttora in via di definizione, potrebbero consentire, attraverso l'asportazione della lesione nella sua totalità, una più accurata analisi del campione e definizione diagnostica preoperatoria delle lesioni B3, ad incerto potenziale di malignità.

Nei casi in cui non ci sia una correlazione tra l'imaging e la categoria diagnostica istopatologica della MIB è auspicabile la ripetizione della MIB con sistemi VAB ed aghi 8-7 gauge.

La discussione multidisciplinare e l'eventuale ricorso a metodiche di imaging quali ad es. la Risonanza Magnetica con mdc, dato l'elevato VPN di tale indagine, consentiranno di formulare il giudizio definitivo per l'invio del caso a follow-up o all'opportuno trattamento (1).

Saranno inviati a biopsia chirurgica escissionale i casi in cui per motivi tecnici o per scelta della paziente, non verrà eseguita la procedura di prelievo indicata.

In generale, il ricorso alla citologia agoaspirativa mediante ago sottile (FNA) va riservato principalmente alle lesioni mammarie formanti massa, che siano clinicamente o ecograficamente evidenti, o in prima istanza alla valutazione di linfadenopatie ascellari correlate. Il prelievo può presentare incertezze interpretative nei confronti delle neoplasie lobulari e delle lesioni proliferative mammarie con atipia. In questi casi è utile rivalutare il caso in sede multidisciplinare e procedere di comune accordo alla rivalutazione istologica (FIG. 2)

In generale l'accuratezza del prelievo con ago sottile (FNA) dipende dalla adeguatezza e rappresentatività della lesione indagata, da un adeguato allestimento (striscio, fissazione e colorazione) e da una corretta interpretazione diagnostica. In caso di preparati a bassa cellularità per sclerosi (fibroadenoma con sclerosi o adenosi sclerosante) o di neoplasie a cellule disperse (carcinoma lobulare), la FNA può portare ad un tasso di inadeguati del 10-15% (6, 7, 8, 9, 10, 11). La metodica talora tende a fornire preparati in cui le cellule presenti sono isolate dal contesto complessivo del tessuto. In particolare nelle lesioni con maggior diametro, in particolare se presumibilmente benigne, il prelievo con ago sottile potrebbe non consentire un adeguato campionamento e raccolta di materiale cellulare. Pertanto tale metodica presenta maggiori problemi rispetto alla microistologia, in relazione al quesito radiologico, in particolare per la diagnosi differenziale tra lesioni benigne proliferative e carcinomi ben differenziati (11, 12, 13, 14). Per tali motivi è richiesta un'adeguata preparazione professionale, la partecipazione conseguente a periodici controlli di qualità e la valutazione ed il raggiungimento degli standard richiesti dalle Linee Guida Europee (2006) (vedi paragrafo 4.6).

L'incertezza diagnostica che può così determinarsi, impone la rivalutazione del caso, con conseguente necessità della ripetizione del prelievo mediante MIB.

La **Biopsia percutanea preoperatoria** rappresenta una metodica diagnostica a buona tollerabilità, elevata sensibilità e specificità. Permette un'adeguata programmazione terapeutica consentendo nella maggioranza dei casi la diagnosi della natura della lesione. In questi casi evita di inviare al chirurgo lesioni mammarie benigne anche complesse per la possibilità di effettuare panel diagnostici immunohistochimici e molecolari. In caso di malignità consente in prima istanza di definire se la neoplasia è in situ o invasiva, oltre a caratterizzare al meglio la neoplasia in termini di istotipo, grading e fattori prognostico/predittivi anche biologici utili in caso di terapia neoadiuvante (status dei recettori ormonali e di HER2, indici di proliferazione cellulare), di evitare il

ricorso a esami intraoperatori e intraprendere una corretta programmazione terapeutica.

In generale il ricorso alla Needle Core Biopsy (NCB) si riserva a lesioni formanti massa, aree di opacità e addensamenti parenchimali o grossi cluster di microcalcificazioni. (FIG.3)

Cluster di microcalcificazioni dubbie o sospette (R3-R5), o aree di distorsione parenchimale vengono generalmente avviate all'agobiopsia con aspirazione automatica (VAB/VAB 3D) che consente l'asportazione sotto guida stereotassica di un'ampia area tessutale sede della lesione (15, 16) (FIG 4).

La **Needle Core Biopsy (NCB)** viene eseguita con dispositivi automatici mediante aghi di 12-18 gauge di diametro. Il più comunemente usato, anche per la buona quantità di tessuto che si ottiene, è il 14 G. L'esame di almeno cinque frustoli per lesioni formanti massa e dieci frustoli per microcalcificazioni sono il numero che presenta la più alta concordanza con la biopsia a cielo aperto (16a, 17). Inoltre, per i casi in cui sia necessario una terapia neoadiuvante, è opportuno che il campionamento sia costituito da almeno 4-6 frustoli prelevati da aree diverse della neoplasia (75), in particolare per neoplasie T2-T3 o nei casi di neoplasie multiple.

Le metodiche VAB di prima linea (11-9 gauge) e VAB di seconda linea (8-7 G) possono essere impiegate anche per la valutazione di aree mammarie con aspetti di distorsione parenchimale. La tecnica del prelievo prevede l'utilizzo di una guida biottrica (probe), posizionata e centrata con controllo mammografico stereotassico sull'area lesionale. La guida biottrica incorpora un canale che è in grado, effettuando una rotazione di 360° all'interno della lesione in pressione negativa, di eseguire un campionamento multiplo (da 6 a 24) su aree contigue asportando mediamente un cilindro di parenchima mammario in cui è compresa, seppur frazionata, la lesione. Generalmente vengono effettuati 12 prelievi, condotti su preordinate direttrici topografiche, idealmente riconducibili al quadrante di un orologio: sei prelievi in corrispondenza delle ore pari e sei prelievi in corrispondenza delle ore dispari. In presenza di microcalcificazioni, i frustoli vengono radiografati ed immediatamente posti in formalina tamponata al 10%. La metodica consente inoltre il posizionamento di una clip radio-opaca amagnetica come repere chirurgico per eventuali successivi interventi. La VAB presenta una notevole accuratezza diagnostica, in particolare nei carcinomi duttali in situ, aumentando la sensibilità nelle forme microinvasive associate al carcinoma duttale in situ DCIS (21). La diagnosi di DCIS su agobiopsie stereotassiche eseguite su cluster di microcalcificazioni sottende nel 20% dei casi (18, 21) un carcinoma invasivo nel successivo campione chirurgico.

La recente introduzione di una VAB di seconda linea (con ago 8-7 gauge) di tipo "escissionale" dopo una prima diagnosi di B1/B3/B4 ottenuto mediante ago di 14 o 11-9 gauge consentono di giungere ad una definizione diagnostica preoperatoria di B2 o B5 in una buona percentuale di casi, migliorando il valore predittivo negativo o positivo del percorso diagnostico preoperatorio (67). La VAB diagnostica (11 gauge) può quindi essere considerata la metodica di prima scelta in focolai di microcalcificazioni e distorsioni architetturali. La VAB "escissionale" troverebbe indicazione dopo una diagnosi di B1/B3/B4 su prelievo con ago 14 G o 11-9 G (67, 69).

L'interpretazione del materiale agobiottrico richiede una consolidata esperienza e conoscenza della complessità delle lesioni mammarie. Inoltre, la diagnosi su agobiopsia, analogamente a quanto richiesto per la FNA, dovrebbe essere parte integrante dell'approccio multidisciplinare clinico-radiologico come da schema allegato.

Il risultato B1 o B2, in caso di sospetto clinico e/o radiologico, impone la necessità di ripetere il prelievo con VAB o VAB3D (sia che sia inadeguato o sia che risulti da manovra di prelievo errata).

Se ci si trova al cospetto di microcalcificazioni ad alto sospetto radiologico (R4,R5), in caso di esito B1, B2, B3 o B4, il prelievo dovrà essere ripetuto mediante VAB di 2° linea, con aghi 8-7 G.

Inoltre è sempre raccomandata, secondo linee guida, la diagnosi preoperatoria di C5/B5, per ottenere una corretta pianificazione del trattamento.

Solo in caso di esito B2 si potrà decidere nell'ambito della valutazione multidisciplinare, per l'invio del caso a follow-up.

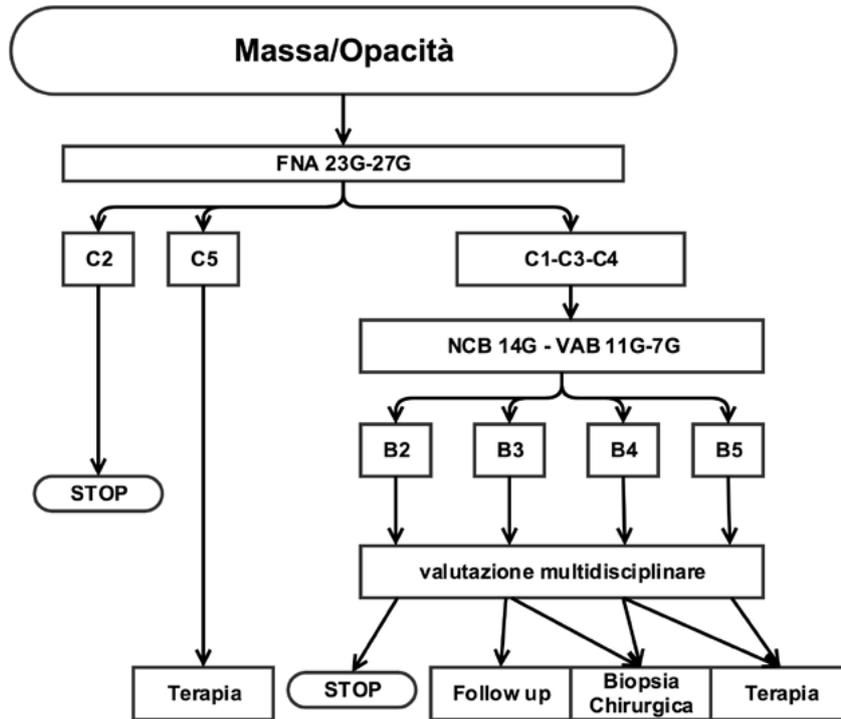


Figura 2: Flow chart percorso diagnostico preoperatorio per lesioni formanti massa/opacità

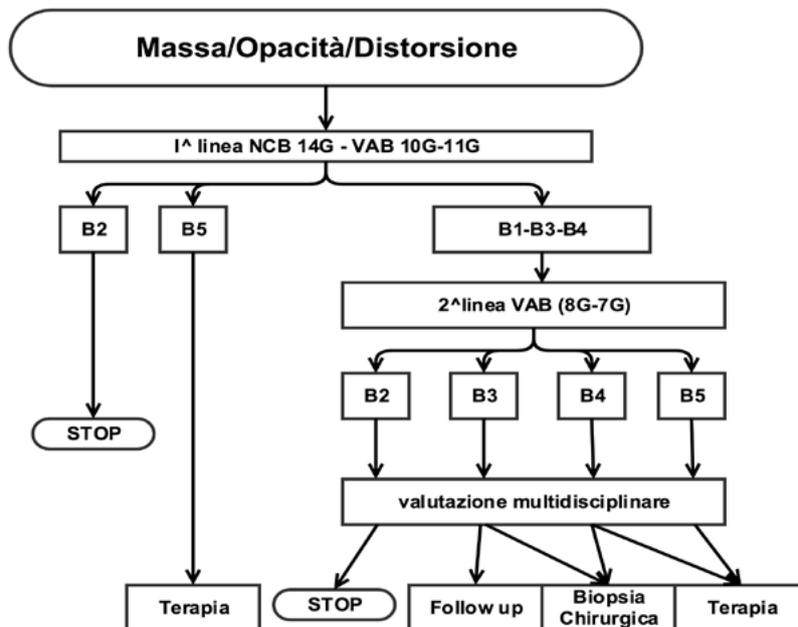


Figura 3: Flow chart percorso diagnostico preoperatorio per lesioni formanti massa/opacità/distorsione

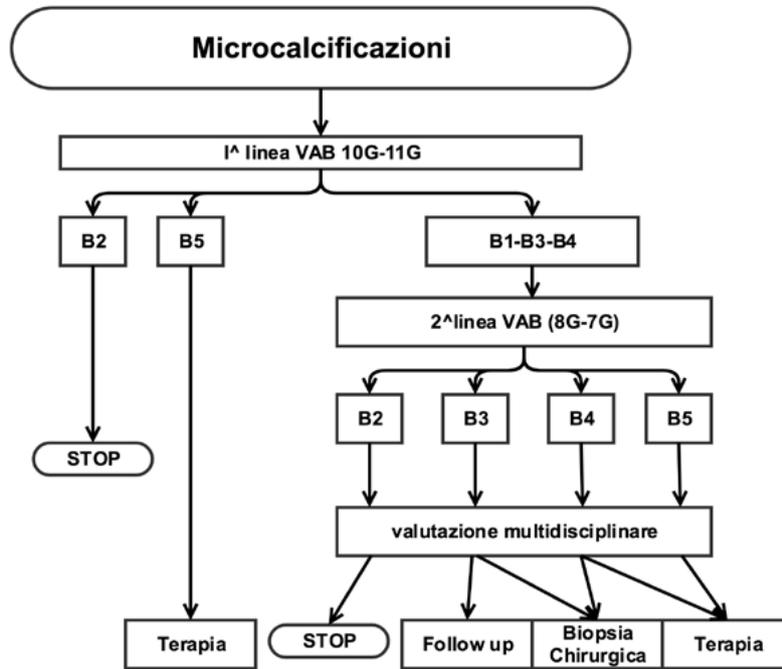


Figura 4: Flow-chart percorso preoperatorio per microcalcificazioni

4. Diagnostica istologica: refertazione delle agobiopsie (NCB /VAB/VAB3D)

Una corretta interpretazione del materiale ottenuto mediante agobiopsia richiede la conoscenza dei dettagli clinici e strumentali (mammografia/ecografia) attraverso un opportuno schema di richiesta (allegati 1 e 2) in cui siano indicati:

- L'unità operativa da cui proviene il materiale
- La lateralità, indicata per esteso evitando contrazioni o abbreviazioni
- Il quadrante
- La categoria di classificazione radiologica sec. BIRADS (R/U)
- L'aspetto radiologico
- La tecnica di localizzazione
- Il numero dei frustoli
- La presenza di calcificazioni

Le biopsie eseguite per microcalcificazioni devono essere necessariamente radiografate affinché si abbia la conferma radiologica della adeguatezza del prelievo. La radiografia deve accompagnare i campioni biotici. Le modalità di fissazione del tessuto devono basarsi su procedure standard evitando fissativi in grado di dissolvere le calcificazioni.

Per garantire una corretta valutazione dei parametri immunofenotipici e molecolari, necessari per la corretta definizione dei protocolli terapeutici, è indispensabile che le biopsie vengano poste in fissativo immediatamente dopo la radiografia dei frustoli. Si raccomanda di mettere al massimo 4 frustoli da NCB per cassetta e 2 frustoli da VAB per cassetta e poste in formalina neutra tamponata (pH intorno a 7) al 10% e consegnate al Laboratorio di Anatomia Patologica nel più breve tempo.

Per ogni blocchetto così ottenuto, nel caso di microcalcificazioni, viene allestito un preparato istologico (vetrino) con tre sezioni in E.E. (ematossilina-eosina) a tre diversi livelli separati da 40 micron. Se nel preparato istologico non si evidenziano le microcalcificazioni, il blocchetto viene seriato. È opportuno ricordare come le microcalcificazioni di ossalato di calcio non sono generalmente visibili con la colorazione ematossilina eosina; si consiglia in questi casi la visione senza condensatore e a diaframma chiuso o in luce polarizzata, prima della seriazione del blocchetto.

Nell'organizzazione dei percorsi diagnostici è opportuno che i diversi operatori coinvolti nella gestione dei campioni tissutali concordino gli accorgimenti organizzativi atti a garantirne una fissazione immediata, adeguata e completa riducendo i tempi di ischemia fredda del campione ed evitando nel contempo una overfissazione del campione. Si raccomanda infine, se necessario, di predisporre dei cicli opportuni di processazione e inclusione che tengano conto della peculiarità del campione biotico e delle tematiche associate all'espressione antigenica (fasi di fissazione alcoolica vs espressione HER2).

4.1 Categorie Diagnostiche

L'analisi dei frammenti agobiopici può comportare alcune difficoltà interpretative legate in parte alle caratteristiche della lesione mammaria, in parte alla metodica di campionamento e all'allestimento dei frustoli microistologici.

Il campionamento con prelievi multipli tende a frammentare la lesione e a creare una sorta di discontinuità

morfologica sulle diverse parti tessutali. Tale problema si accentua in caso di lesioni complesse e composte da più componenti proliferative. In entrambi i casi è di aiuto il supporto radiologico che fornisce un'immagine lesionale a cui far riferimento e la possibilità di approfondimenti morfofunzionali con le indagini immunoistochimiche.

Il campionamento inoltre, soprattutto in caso di NCB, può riguardare una parte dell'intera lesione e quindi sottostimarne la reale natura ed estensione. È di comune osservazione il riscontro di un carcinoma infiltrante associato a focolai di DCIS con micro calcificazioni nel 20% dei casi.

In quest'ottica è di aiuto la correlazione radiologico-patologica. Nei casi di lesione formanti massa, distorsioni o asimmetrie parenchimali il dato atteso in base al sospetto radiologico valutato con la classificazione BIRADS può aiutare nell'interpretazione del dato istologico. Della stessa importanza appare l'inquadramento radiologico delle calcificazioni rispetto al quadro morfologico e all'associazione con quadri ben definiti di patologia mammaria.

Il riscontro nel materiale da MIB di **microcalcificazioni tipicamente benigne** dal punto di vista radiologico, rappresenta un evento eccezionale in quanto le alterazioni benigne associate a tali alterazioni non costituiscono generalmente oggetto di indagine senologica. Il più delle volte si riscontrano in vecchi fibroadenomi a forma di popcorn, con il caratteristico aspetto a guscio d'uovo nelle aree pseudocistiche legate a fenomeni di liponecrosi, di forma bastoncellare nelle ectasie duttali o più frequentemente di aspetto puntiforme a sede lobulare.

Le **microcalcificazioni tipicamente maligne** sono generalmente più piccole di 0.5 mm e vengono descritte in tre tipologie:

1. Lineari, tipicamente associate a necrosi di tipo comedonico nel DCIS di alto grado
2. Pleiomorfe, variabili in forma e dimensione e associate a necrosi di tipo comedonico nel DCIS di alto grado o intermedio; meno frequentemente nei fibroadenomi e nelle aree di liponecrosi
3. Granulari, seppur meno specifiche delle precedenti, sono associate a necrosi di tipo comedonico nel DCIS di alto grado o intermedio e, per quanto riguarda le alterazioni non neoplastiche, alle ectasie duttulari nella mastopatia fibrocistica e a certe lesioni a cellule colonnari

Le **microcalcificazioni amorfe o di tipo intermedio** sono generalmente di forma variabile dal rotondo al flocculare sono le meno specifiche. Tendono ad associarsi a forme di DCIS di grado intermedio/basso di malignità o a lesioni adenosiche (adenosi sclerosante), a cellule colonnari (con o senza atipia) e meno frequentemente alle forme di iperplasia duttale.

Le microcalcificazioni descritte spesso sono presenti in cluster o si intendono come apposizioni calcifiche parenchimali che sottendono lesioni con caratteri morfologici non sempre univoci. Un ulteriore elemento di giudizio risulta costituito dalla sede delle calcificazioni rispetto all'albero dotto-duttulo-lobulare:

1. Microcalcificazioni lobulari di frequente riscontro nelle lesioni mammarie di natura benigna di tipo adenosico (microcistica, blunt duct, sclerosante), nel fibroadenoma e nei processi di involuzione lobulare. In tutti questi casi le microcalcificazioni sono rappresentate da particelle lamellate di fosfato di calcio su base secretoria la cui forma dipende dalla lesione lobulare interessata. Piccole e puntiformi, regolari nell'involuzione lobulare; a virgola o lineari nell'adenosi sclerosante. Una seconda tipologia di calcificazione lobulare è definita impropriamente di tipo ossificante perché richiama morfologicamente la matrice di un nodulo ossificante. Di forma irregolare, basofila, spesso lamellare e circondata da una matrice eosinofila. Si associano a lesioni colonnari di varia natura fino al carcinoma clinging. Spesso in seguito a fenomeni di atrofia vengono estruse nel circostante stroma e divengono interstiziali

2. Microcalcificazioni duttali tendono a formarsi nelle diramazioni dell'albero duttale mammario con un

pattern irregolare, lineare tubuliforme o granulare e ad associarsi a forme di DCIS. Una ulteriore tipologia di calcificazioni si colloca centralmente nei grossi dotti sede di ectasia duttale e spesso di mastite periduttale. Le lesioni papillari infine si associano spesso a microcalcificazioni duttali sia nei papillomi, sia nelle forme di carcinoma papillare.

3. Microcalcificazioni duttulo-lobulari

4. Microcalcificazioni interstiziali. Escluse le forme cutanee, da corpo estraneo, vascolari non oggetto di MIB le forme interstiziali sono correlate a fenomeni di tipo liponecrotico/lipogranulomatoso o a lesioni mucocele-like/carcinoma mucinoso.

L'agobiopsia, soprattutto in caso di VAB, induce delle alterazioni parenchimali in grado di creare problemi interpretativi nell'esame istologico del pezzo operatorio conseguente alla diagnosi microistologica. L'asportazione dell'intera area lesionale in corso di MIB, la comparsa di sclerosi cicatriziale o di un'ampia area emorragico-lipogranulomatosa conseguente alla agobiopsia, l'infarto della lesione e la possibile disseminazione di elementi epiteliali lungo il tragitto della sonda biottica sono fra gli eventi più comunemente descritti. Inoltre la stima delle dimensioni di un tumore, soprattutto nei casi sottoposti a VAB, può sottostimarne il reale valore se valutato solo sulla neoplasia residua dopo la procedura agobiottica. In questi casi è consigliata una valutazione comparativa fra le dimensioni tumorali nell'imaging diagnostico, nel campione operatorio all'esame macroscopico nella sezione istologica (64).

L'esame istologico dei campioni ottenuti con metodiche di MIB deve portare ad una accurata diagnosi in cui accanto alla descrizione morfologica, eventualmente corredata da dati ancillari di immunoistochimica, sia presente una adeguata conclusione diagnostica con il riferimento al sistema di refertazione proposto dalle Linee Guida Europee (59, 60) e dall'AFIP (65).

Le categorie diagnostiche sono puramente morfologiche. La correlazione con il dato radiologico viene demandata ad una valutazione multidisciplinare tra radiologo e patologo.

B1 - Tessuto normale / Inadeguato

Rientrano in questa categoria frustoli di tessuto mammario normale costituito da stromi fibroadiposi, lobuli e dotti senza lesioni istologicamente apprezzabili, frustoli costituiti da tessuto mammario in cui, nonostante la seriazione del materiale, non sono presenti le microcalcificazioni che hanno costituito l'indicazione alla biopsia oppure materiale fibrino-ematico.

In ogni caso è particolarmente importante e decisiva la valutazione multidisciplinare per stabilire se il quadro istologico osservato sia realmente rappresentativo della lesione vista radiologicamente o se il prelievo sia da ritenersi non rappresentativo e quindi inadeguato.

Campionare ad esempio un amartoma od una distorsione possono dare istologicamente un tessuto mammario organoide che può essere ritenuto rappresentativo della lesione.

B2 - Lesione benigna

Questa categoria diagnostica comprende tutte le lesioni benigne della mammella, dal fibroadenoma all'adenosi sclerosante sino all'iperplasia epiteliale di tipo usuale, alle alterazioni fibrocistiche e alla steatonecrosi. Anche in questo caso la valutazione multidisciplinare risulta fondamentale per stabilire la corrispondenza dell'aspetto istologico al quadro clinico-mammografico ed/o ecografico.

B3 - Lesioni ad incerto potenziale di malignità

Rientrano in questa categoria una serie di lesioni mammarie che pur avendo il connotato morfologico della benignità, per la parzialità e la frammentazione dei campioni, la potenziale eterogeneità delle lesioni mammarie richiedono un approccio chirurgico per lo più conservativo che unisca alla valenza terapeutica quella

diagnostica. Nella categoria B3 sono comprese le lesioni papillari, la radial scar, il tumore fillode, le lesioni mucocele-like e una serie di lesioni con incrementato rischio di progressione neoplastica (proliferazione epiteliale atipica di tipo duttale, l'atipia epiteliale piatta/FEA e la neoplasia lobulare intraepiteliale/LIN1-2). Globalmente le lesioni mammarie classificate come B3 presentano un valore predittivo positivo nei confronti del carcinoma mammario intorno al 25%.

- 1. Lesioni papillari** costituiscono un gruppo eterogeneo di lesioni ad architettura papillare che nella maggioranza dei casi rientrano nella categoria B3 ad incerto potenziale di malignità. In rare occasioni se la lesione è di piccole dimensioni e si ritiene che sia stata ampiamente campionata se non addirittura completamente escissa una classificazione come lesione benigna categoria B2 può essere considerata. Viceversa, soprattutto in caso di un campionamento esiguo e in presenza di un'atipia fortemente sospetta per malignità l'attribuzione alla categoria B4 appare più opportuna. Lesioni papillari senza atipie citoarchiteturali (dopo conferma con opportuni marcatori immunoistochimici) possono, visto il basso rischio di lesione maligna all'escissione, essere candidate al VANCB come indicazione terapeutica e successivo follow-up (66).
- 2. Lesione focale scleroelastotica/radial scar** caratterizzata dal dato radiologico della distorsione parenchimale che si traduce nella maggioranza dei casi in cicatrici scleroelastotiche in cui la frammentazione dei campioni non consente una valutazione unitaria della struttura lesionale e della completezza della sua escissione. Si evidenzia il ruolo delle nuove metodiche di imaging (ad es. tomosintesi) che riuscendo ad identificare distorsioni anche di piccole dimensioni ne consentono, mediante i sistemi VAB (2D/3D) o BLES, la completa asportazione. In questi casi, se la diagnosi è di benignità, dopo valutazione multidisciplinare, è possibile l'invio della paziente a follow-up.
- 3. Neoplasia lobulare intraepiteliale (LIN).** La neoplasia lobulare intraepiteliale rappresenta un gruppo eterogeneo di lesioni lobulari che raggruppa le forme di iperplasia lobulare atipica (ALH) e le forme di carcinoma lobulare in situ (LCIS tipo A, tipo B). Costituisce spesso un reperto incidentale in corso di MIB condotto per alterazioni radiologiche varie. Quando la morfologia di una LIN si pone in diagnosi differenziale con forme solide di DCIS magari con aspetti di cancerizzazione lobulare appare utile il ricorso all'immunoistochimica con lo studio dell'espressione della E-caderina (32). Il carcinoma lobulare in situ pleomorfo, spesso associato ad aspetti di necrosi comedonica e a microcalcificazioni che simulano il quadro radiologico del DCIS va classificato come B5.
- 4. Flat epithelial atypia/atipia epiteliale piatta e proliferazione epiteliale atipica di tipo duttale.** In questo gruppo vanno incluse le forme di lesioni a cellule colonnari con atipia o FEA (Flat Epithelial Atypia; atipia epiteliale piatta) e le proliferazioni epiteliali atipiche di tipo duttale (iperplasia duttale atipica). Questo secondo termine va preferito rispetto a quello d'iperplasia duttale atipica che per la sua definizione diagnostica richiede criteri morfologici e dimensionali valutabili sul pezzo operatorio definitivo. Il ricorso all'immunoistochimica con utilizzo di marcatori quali la citocheratina 5, 14 e recettori per estrogeno può aiutare nella diagnosi differenziale con l'iperplasia duttale di tipo usuale – UDH).
- 5. Tumore Fillode.** Lesioni fibroepiteliali caratterizzate da uno stroma riccamente cellulato con aspetti di "overgrowth" rispetto alla componente epiteliale (presenza all'osservazione microscopica a 10x di uno o più campi privi di componente epiteliale) talora con un incremento dell'attività mitotica. Diagnosi differenziale con varianti di fibroadenoma. Un tentativo di migliorare l'affidabilità diagnostica nell'ambito delle lesioni fibroepiteliali ipercellulari, etichettate generalmente come B3, con l'obiettivo di ridurre un overtreatment chirurgico qualora si tratti di fibroadenomi, è quello di applicare alcuni criteri diagnostici nella valutazione delle core-biopsy di tali lesioni. Secondo i dati di recenti lavori, la presenza ed il numero di alcuni parametri morfologici, indirizza verso un tumore fillode, per il quale è corretta la categoria B3. Viceversa l'assenza di alcune caratteristiche patognomoniche può orientare verso la diagnosi di FAD, categoria B2. I parametri che sono stati considerati ed applicati su diverse casistiche anche retrospettive con una buona riproducibilità sono:
 - la frammentazione stromale

- la predominanza stromale
- l'ipercellularità stromale
- la maggior condensazione cellulare subepiteliale
- pleomorfismo cellule stromali
- il numero di mitosi delle cellule stromali (> 3/10 HF)
- la presenza di tessuto adiposo frammisto allo stroma
- l'eterogeneità stromale.

La presenza di 3 o più di questi parametri orienta verso un filloide, con la maggior predittività data dall'associazione dei seguenti parametri: eterogeneità stromale, pleomorfismo stromale e condensazione subepiteliale. La presenza del singolo parametro >3 mitosi/10 hpf è altamente predittiva di tumore filloide (70, 71, 72, 73).

6. Lesioni mucocele-like: descritte per la prima volta nel 1986 da Rosen (74) sono costituite da cisti contenenti mucina che tendono alla rottura e stravasare la mucina nello stroma adiacenti. Il termine è puramente descrittivo e fondamentale è la ricerca di atipie o menie dell'epitelio di rivestimento. Talvolta tali lesioni si presentano come nodulo palpabile ben circoscritto o con cluster di micro calcificazioni. È opportuno classificare tali lesioni come B3 perché possono essere associate a ADH, DCIS e a forme di carcinoma invasivo.

Management dei B3

Per un corretto management, i casi classificati come B3 dovrebbero essere oggetto di valutazione multidisciplinare con una stretta correlazione fra dato patologico e radiologico. La valutazione multidisciplinare dovrà anche considerare eventuali fattori di rischio individuale (ad es, pregresso intervento per carcinoma o rischio ereditario, etc). Il pattern radiologico più frequente è rappresentato dalle microcalcificazioni (80%), in una minoranza di casi si possono evidenziare opacità e/o distorsioni.

In caso di atipia epiteliale piatta/FEA o di neoplasia lobulare intraepiteliale (iperplasia lobulare atipica/LIN1 o carcinoma lobulare in situ di tipo classico/LIN2), solo se associate ad una lesione benigna che correla con il target della biopsia (ad esempio fibroadenoma) è possibile, dopo discussione multidisciplinare, evitare l'intervento chirurgico, ed instaurare un opportuno follow-up (61, 62,63).

Analogamente, come proposto dall'update alle linee guida europee (2013) e dalle linee guida NCCN (70), anche le lesioni papillari senza atipie citoarchitetture in cui la lesione sia stata totalmente escissa e le "radial scar" quale aspetto microscopico incidentale aggiuntivo ad una lesione benigna che rappresenti il target radiologico, ove non vi siano residui aspetti radiologici di distorsione architetture, possono andare a follow-up radiologico, dopo discussione multidisciplinare.

Invece nei casi B3 con proliferazione epiteliale atipica di tipo duttale o nei casi di microcalcificazioni a elevato rischio radiologico indipendentemente dal tipo di B3 è sempre indicata l'escissione chirurgica (66, 68).

Complessivamente, in un quarto circa dei casi di B3 all'escissione chirurgica si riscontrano lesioni maligne (Valore Predittivo Positivo del 25%).

L'implementazione delle biopsie vacuum assisted (VAB) aumenta la possibilità che il target radiologico sia completamente escisso, in particolare con la VAB-3D.

A tal riguardo, si ricorda la necessità di introdurre una clip amagnetica al termine della procedura bioptica, nei casi in cui il target risulti completamente escisso o di difficile visualizzazione. E' inoltre opportuno in fase preoperatoria, che vengano eseguiti i radiogrammi ortogonali della mammella, onde valutare eventuali microcalcificazioni residue, ed il corretto posizionamento della clip o eventuali sue dislocazioni che dovranno essere opportunamente evidenziate e discusse in fase preoperatoria.

La completa escissione della lesione mediante VAB-3D richiederà meno biopsie chirurgiche per lesioni B3 e, conseguentemente, il valore predittivo positivo per malignità su escissioni chirurgiche tenderà ad aumentare (67): in particolare, dopo diagnosi di B3 su materiale ottenuto mediante ago 14 G o 11 G, l'introduzione di

una VAB di seconda linea (con ago 8-7 gauge) di tipo “escissionale” consente di giungere ad una definizione diagnostica di B2 o B5 in una buona percentuale di casi, riducendo quindi il numero di B3 da portare ad intervento chirurgico (67,69).

Potrà essere utile anche l'integrazione diagnostica mediante esame di Risonanza Magnetica della mammella con mdc, in particolare in caso di negatività dell'esame, per l'elevato Valore Predittivo Negativo di tale presidio diagnostico.

Comunicazione della diagnosi

Il risultato diagnostico B3, potendo fornire solo un dato preliminare rispetto ad ulteriori indagini o in previsione di una biopsia chirurgica, richiede una idonea formulazione dal punto di vista comunicativo. Si rende infatti necessaria una adeguata espressione del grado di sospetto, dato il giudizio attribuito alla lesione su base radio- morfologica ed in considerazione della storia familiare.

B4 - Lesione sospetta per malignità

La categoria comprende casi in cui, seppure sia presente un forte sospetto di malignità (Valore Predittivo Positivo superiore all'80%), la diagnosi di neoplasia non può essere fatta o per l'esiguità del campione biptico o per la presenza di alterazioni o artefatti che ne limitino e impediscano l'interpretazione morfologica (distorsione meccanica, crush, elevata componente emorragica).

Le lesioni diagnosticate nelle categorie B3 e B4 non devono essere avviate alla soluzione chirurgica con valenza terapeutica se non, nel caso delle lesioni B3 dopo una valutazione multidisciplinare e nel caso delle lesioni B4 dopo una rivalutazione istologica dell'area lesionale con biopsia escissionale.

B5 - Lesione neoplastica maligna

Rientrano in questa categoria le diverse forme di carcinoma duttale in situ, di carcinoma invasivo e il carcinoma lobulare in situ pleomorfo (LIN 3). Altre neoplasie di meno frequente riscontro (linfomi, sarcomi, etc) possono rientrare nella categoria.

È consigliabile classificare il carcinoma duttale in situ in tre gradi di differenziazione, specificando nella diagnosi il numero di frustoli o la percentuale in cui la lesione neoplastica è presente. In circa il 20% dei casi classificati come carcinomi intraduttali nei campioni da MIB si riscontra all'esame del campione operatorio una componente infiltrante contigua a quella in situ (21).

Nel caso di neoplasie infiltranti è consigliato indicare l'istotipo prevalente.

Il riscontro di focolai di microinfiltrazione stromale, eventualmente corredata dai dati dello studio immunostochimico, è opportuno da riportare in diagnosi.

Il materiale biptico da MIB risulta infine idoneo allo studio immunostochimico dell'espressione recettoriale, della cinetica proliferativa e dello status di HER2 tenendo conto di una possibile sottostima dei dati ottenuti.

4.2 Problemi e limiti diagnostici

Pur con meno frequenza rispetto alla citologia agoaspirativa, alcune lesioni mammarie possono presentare anche all'esame istologico dei campioni da MIB alcune difficoltà interpretative.

Alterazioni minori

Minime distorsioni architettrali viste mammograficamente possono derivare da fenomeni di fibrosi stromale o di involuzione asimmetrica del tessuto ghiandolare mammario e possono rientrare nella categoria B1.

Amartoma e lipoma

Il riscontro di parenchima ghiandolare normale e di tessuto adiposo possono essere indice di errato campionamento (campione inadeguato) o di lesione amartomatosa o lipomatosa. In questi casi la diagnosi patologica deve essere supportata dal dato clinico radiologico.

Iperplasia pseudoangiomatosa stromale (PASH)

Lesione caratterizzata da spazi e fessure pseudovascolari positive all'immunoreazione per CD34; clinicamente può presentarsi come alterazione diffusa (reperto incidentale) o come nodulo indistinguibile radiologicamente da un fibroadenoma.

Iperplasia duttale usuale (UDH)

Nel materiale da MIB è di comune riscontro l'iperplasia duttale tipica o usuale (UDH) ed altre forme di iperplasia benigna come la forma ginecomastoide che può presentare un'architettura micropapillare che talora mimica il DCIS. In questi casi utile il ricorso all'immunoreazione con citocheratina 5 o 14 (37). L'iperplasia duttale tipica o usuale costituisce generalmente un riscontro incidentale, non si associa quasi mai a microcalcificazioni.

Atipia epiteliale nell'unità terminale duttulo-lobulare (TDLU)

L'atipia lieve dell'epitelio dell'unità terminale duttulo-lobulare è uno dei problemi più comuni riscontrati nei campioni agobiopici. Bisogna porre molta attenzione nel non enfatizzare minimi gradi di atipia che possono rappresentare UDH o metaplasia apocrina da classificare nella categoria B2. Gradi severi di atipia possono rappresentare la cancerizzazione del lobulo da parte di un DCIS di alto grado.

Alterazioni a cellule colonnari senza atipia epiteliale piana

Alterazioni a cellule colonnari rappresentano uno spettro di lesioni che hanno in comune la presenza di cellule epiteliali colonnari che bordano unità terminali duttulo-lobulari dilatate (38, 39). Tali alterazioni sono state chiamate "lobuli cistici atipici", "metaplasia a cellule colonnari", "iperplasia a cellule colonnari", "alterazioni a cellule colonnari con prominenti snouts apicali e secrezioni (CAPSS)". Nell'edizione del 2012 della classificazione del WHO esse sono state definite come "lesioni epiteliali piane con atipia di basso grado" (40)

Atipia apocrina e DCIS apocrino

L'atipia apocrina soprattutto se associata a lesione sclerosante può essere di difficile interpretazione su materiale agobiopico: nuclei larghi con nucleoli vistosi possono essere interpretati come DCIS soprattutto se associati anche a pleomorfismo. Il DCIS apocrino puro è relativamente raro: in questi casi aspetti quali la fibrosi periduttale, l'infiltrato linfocitario, le mitosi e la necrosi comedonica possono essere di supporto nella diagnosi (41).

Proliferazioni apocrine con aspetti atipici in un dotto dovrebbero essere classificati come B3. La metaplasia apocrina papillare va invece considerata un B2.

Alterazioni tipo allattamento

Tali alterazioni possono essere presenti nell'intero arco della vita di una donna anche in donne non allattanti né in gravidanza e perfino in postmenopausa. Il riconoscimento del pattern lobulare, dei vacuoli citoplasmatici e l'architettura tipicamente hobnail aiutano nel corretto inquadramento nosografico.

Lesioni sclerosanti / carcinoma tubulare

È la lesione più insidiosa su materiale agobiotico. Vi è un rischio di fare diagnosi di carcinoma invasivo soprattutto se il frammento agobiotico cade al centro della lesione sclero-elastotica. L'immunoistochimica per marcatori di cellule mioepiteliali (p63, calponina, citocheratina 14) può essere di aiuto nel dirimere il dubbio. Bisogna tuttavia sottolineare come talora i tubuli all'interno del centro elastotico di una radial scar possono non esprimere mioepitelio perché in atrofia: quindi nei casi dubbi è consigliabile una classificazione B3.

Adenosi microghiandolare

Nell'adenosi microghiandolare, lo strato di cellule mioepiteliali è assente; i tubuli appaiono regolari, rotondi con lume aperto ma il citoplasma è chiaro ed esprimono S100, mentre sono negativi sia EMA sia i recettori ormonali (42).

Proliferazioni stromali e lesioni a cellule fusate

Talora uno stroma fibroblastico può essere presente in pazienti che abbiano subito una precedente FNA o agobiopsia ed appare difficilmente distinguibile da una fibromatosi o un miofibroblastoma. In questi casi è preferibile classificare come B3.

Tumori fibroepiteliali

Come già discusso la diagnosi differenziale tra un tumore filloide benigno o di basso grado ed un fibroadenoma può essere complessa: nei casi dubbi è corretta una diagnosi di B3.

Modificazioni da radiazioni

La radioterapia può indurre modificazioni di difficile interpretazione. Anche in questi casi si suggerisce una diagnosi di B3 (43, 44).

Carcinoma lobulare infiltrante

Piccoli foci di carcinoma lobulare invasivo possono essere confusi con un infiltrato linfocitario perilobulare (45) comune, spesso associato a sclerosi nella mastopatia diabetica. L'immunoistochimica con citocheratina aiuta a distinguere l'infiltrato linfocitario dalla componente carcinomatosa a cellule disperse del carcinoma lobulare. Nelle forme tubulo-lobulari (variante tubulare del carcinoma lobulare) può risultare utile l'associazione con un marcatore di mioepitelio.

4.3 Lesioni rare

Linfoma

Il linfoma NH di basso grado può essere di difficile inquadramento su materiale agobiotico. In questi casi si suggerisce di classificare come B4 la lesione. I linfomi ad alto grado vanno classificati come B5.

Metastasi

Vanno classificate come B5.

Sarcomi

Sono lesioni rare. Particolare attenzione per lesioni mesenchimali di basso grado che possono essere difficilmente differenziate su agobiopsia. In tali casi si suggerisce di inquadrarle come B3 o B4.

4.4 Fattori prognostici

Il grading (35,36) e i marcatori immunoistochimici prognostici (ER, PgR, Ki-67, HER2)(46,47) possono essere eseguiti su materiale agobiotico. A causa della possibile eterogeneità del carcinoma mammario, i marcatori immunoistochimici hanno maggior significatività quanto più la neoplasia è rappresentata nel materiale ago-

biptico; è pertanto consigliabile rieseguire, in tutto o in parte, i test sul pezzo operatorio, qualora il tumore sia scarsamente rappresentato nel materiale biptico e/o sussistano aspetti istopatologici suggestivi di possibile discordanza; in particolare per il test HER2 andrebbero applicati i criteri esplicitati nelle Raccomandazioni ASCO/CAP del 2013 e lettera JCO 2015 (76, 77, 78).

Per quanto riguarda la determinazione di Ki-67, sebbene esistano abbondanti studi che ne supportano il valore prognostico, la validazione clinica si è dimostrata difficile, in special modo per la definizione di un utile cut-point, a causa della distribuzione di tipo continuo e alle barriere analitiche e pre-analitiche che ne impediscono la standardizzazione; cionondimeno alti e bassi valori di questo marcatore sono riproducibili e clinicamente utili (79)(vedi anche pag. 88).

5. Diagnostica citologica

A cura di:

Licia Laurino (U.O. Anatomia Patologica, Azienda ULSS n° 9 Treviso)

5.1 Uso dell'esame citologico (FNA)

Lo scopo di questa metodica è quello di ottenere un campione rappresentativo di lesioni palpabili e non palpabili della mammella identificate con la mammografia o con l'ecografia.

L'uso dell'FNA contribuisce a ridurre le biopsie mammarie benigne, ovvero è capace di selezionare il 50% dei dubbi radiologici (Quality Assurance Guidelines for Radiologists del NSH Breast Screening Programme). L'approccio clinico-mammografico e citologico può raggiungere un'accuratezza diagnostica del 99% su lesioni palpabili; ma anche per lesioni non palpabili la sensibilità della metodica è più che accettabile.

È importante ricordare che il dato citologico delle lesioni non palpabili non deve essere mai preso in considerazione da solo: l'esperienza ha confermato che i migliori risultati si hanno quando radiologia e citologia si sovrappongono. È inevitabile che inadeguati e falsi negativi siano più frequenti per le lesioni non palpabili. In questi casi se il sospetto radiologico permane è consigliato affidarsi ad altre metodiche biotipiche (core biopsy, core biopsy vacuum assisted, escissione chirurgica). Ed è altrettanto vero il contrario e cioè che reperti citologici sospetti per malignità con radiologia negativa necessitano di altre metodiche per definire la lesione.

Vantaggi:

- test semplice e sicuro che permette sovente di pianificare l'intervento chirurgico
- poco costoso e rapido rispetto alla biopsia.
- può essere utilizzato anche per valutare lo stato dei linfonodi ascellari.

Svantaggi:

- la scarsa cellularità di alcune lesioni comporta un elevato tasso di inadeguati.
- la diagnosi si basa sulla valutazione delle caratteristiche morfologiche degli elementi cellulari e della modalità di aggregazione, in assenza di un dato architeturale delle lesioni. Con questo presupposto è spesso difficile distinguere tra lesioni maligne ben differenziate e lesioni benigne.
- La correlazione del dato citologico con quello radiografico è spesso impossibile (tranne che per cisti, linfonodi intramammary e fibroadenomi tipici).
- necessità di personale addestrato e qualificato.

5.2 Modalità di prelievo

Lesioni palpabili: il nodulo da aspirare va immobilizzato tra le dita per evitarne lo scivolamento e per ridurre l'afflusso ematico. Non è necessaria l'anestesia.

Si utilizzano aghi da 22 o 23 Gauge con o senza aspirazione.

Con aspirazione: si usa una siringa da 20 ml che può essere collegata all'ago direttamente o tramite una cannula. Nel primo caso è utile utilizzare un portasiringhe. All'introduzione dell'ago il pistone della siringa deve essere abbassato e quindi senza aria. Una volta centrato il nodulo si dà inizio alla manovra di aspirazione avendo cura di muovere l'ago avanti e indietro con varie inclinazioni in modo da passare più volte attraverso la lesione. L'aspirazione può terminare quando si ha la sensazione di una risalita di materiale nel cono dell'ago. In ogni caso la manovra non deve durare più di 10-12 secondi. A questo punto si rilascia il pistone e si estrae l'ago dal nodulo. La manovra va ripetuta se si ritiene che il materiale ricavato non sia idoneo.

Senza aspirazione: è possibile eseguire il prelievo senza aspirazione (sfruttando il principio della risalita del materiale nell'ago per capillarità) con le stesse modalità sopradescritte avendo cura di imprimere all'ago oltre

che il movimento avanti indietro anche quello di rotazione.

Lesioni non palpabili: il campione viene prelevato sotto guida ecografia o stereotassica. Le modalità aspirative sono quelle summenzionate mediante siringa e portasiringa utilizzando aghi della lunghezza necessaria a coprire la distanza tra guida ecografica o stereotassica e lesione.

È utile effettuare 2 o 3 volte la manovra aspirativa per essere certi di ottenere materiale diagnostico.

Per verificare l'adeguatezza dei preparati si può procedere con una colorazione rapida del preparato citologico con il Diff-Quik (colorazione modificata di Wright) o più semplicemente con il blu di metilene.

Complicanze: ematomi nel caso si punge un piccolo vaso; pneumotorace in pazienti con seno piccolo o in caso di lesioni mediali o ascellari.

5.3 Allestimento

Preparazione degli strisci: preparare prima dell'inizio della manovra dei vetrini portaoggetti con il nome e cognome della paziente sulla banda smerigliata. Il materiale agoaspirato va deposto nella parte alta del vetrino e strisciato con la parte molata di un altro vetrino premendo delicatamente verso il basso con un'inclinazione di 25-30°. La tecnica di striscio mediante apposizione dei vetrini è sconsigliata perché da numerosi artefatti da schiacciamento.

Fissazione: I metodi di fissazione sono in relazione al tipo di colorazione che si vorrà effettuare sul preparato.

- fissazione all'aria: lo striscio deve essere particolarmente sottile e poco ematico per consentire una rapida asciugatura al fine di non creare artefatti cellulari. A questo tipo di fissazione segue la colorazione MGG.

fissazione umida: si può fare utilizzando alcool o metanolo (per immersione) o il classico spray. A questo tipo di fissazione può seguire la colorazione di Papanicolau o ematossilina-eosina.

Colorazione: non ci sono particolari colorazioni consigliate.

5.4 Informazioni cliniche

Una buona qualità del preparato va correlata ad adeguate notizie cliniche:

- centro di prelievo, specificando il medico che ha eseguito l'indagine
- sede della lesione
- tipo di lesione : nodulo solido, cisti
- tecnica di localizzazione e di agoaspirazione: lesione palpabile o non palpabile
- caratteristiche radiografiche ed ecografiche della lesione (vedi allegato 2).

5.5 Criteri citologici generali di benignità e malignità

CRITERIO	BENIGNITÀ	MALIGNITÀ
cellularità	scarsa o moderata	di solito elevata
coesione cellulare	buona, con lembi digitiformi a margini netti e disposizione ordinata delle cellule in monostrato	scarsa, con perdita della coesione, piccoli gruppi cellulari, disposizione disordinata delle cellule, in aggregato
cellule isolate	rarissime	Frequenti
tipi cellulari	elementi epiteliali, mioepiteliali e altre cellule frammiste a stroma	popolazione cellulare solitamente uniforme
nuclei nudi bipolari	presenti, spesso numerosi	rari o assenti
sfondo	pulito, tranne in presenza di flogosi	sporco, per la presenza di detriti cellulari e calcificazioni, linfociti e macrofagi

Caratteristiche nucleari

taglia (in relazione alle emazie)	piccola	variabile, spesso grossa, dipende dal tipo di tumore
pleomorfismo	raro	Frequente
membrana nucleare (colorazione PAP)	liscia	irregolare, indentata
nucleoli (colorazione PAP)	indistinti o piccoli e singoli	variabili ma possono essere prominenti, grossi e multipli
cromatina (colorazione PAP)	fine e omogenea	addensata, a zolle
altre caratteristiche	metaplasia apocrina, istiociti schiumosi	mucina, lumi intracitoplasmatici, calcificazioni

5.6 Refertazione

Il ruolo della diagnosi citologica è quello di distinguere tra processo benigno e maligno con la finalità di:

- ridurre le procedure chirurgiche sulle lesioni benigne
- ridurre le procedure chirurgiche diagnostiche e programmare una unica sessione di chirurgia terapeutica e di stadiazione.

Categorie diagnostiche

Non sempre è possibile differenziare lesioni benigne da quelle maligne. Oltre alla qualità dei preparati e alla rappresentatività della lesione, un indubbio ruolo è giocato dall'esperienza del citopatologo. Si ritiene che il laboratorio di Citodiagnostica debba confrontarsi con almeno 200 agoaspirati/anno per migliorare l'efficienza delle diagnosi e/o partecipare attivamente e continuativamente a programmi di controllo di qualità.

C1 - Inadeguato / non rappresentativo

La designazione di inadeguato è sicuramente in certa misura soggettiva e può dipendere dall'esperienza dell'aspiratore e del citopatologo. Il giudizio finale sulla rappresentatività del materiale deve comunque derivare dal confronto e dalla coerenza con il dato radiografico e citologico.

Esistono tuttavia delle condizioni oggettive di inadeguatezza/non rappresentatività che sono date da:

- campione privo di elementi cellulari organo-specifici o acellulare
- campione paucicellulare (parametro quantitativo suggerito: meno di 5 gruppi di cellule epiteliali non atipiche)
- allestimento non ottimale per artefatti da schiacciamento
- essiccamento per ritardata fissazione
- essiccamento troppo lento (se fissazione all'aria)
- eccessivo spessore dello striscio
- eccesso di sangue
- eccesso di fluido edematoso

In questi casi è opportuno descrivere le caratteristiche del campione, commentare sulle cause di inadeguatezza/non rappresentatività e registrare e monitorare le cause di tale inadeguatezza al fine di poter programmare manovre correttive.

Aspirati da lesioni particolari quali cisti, processi infiammatori, liponecrosi e campioni di secreto del capezzolo possono non contenere elementi epiteliali ma non devono essere classificati come inadeguati.

C2 - Benigno

- Indica un campione adeguato senza evidenza di atipia o malignità
- L'aspirato in questa situazione è da poco a moderatamente cellulato e costituito prevalentemente da cellule epiteliali duttali regolari organizzate in lembi monostrato con caratteristiche citonucleari di benignità. Lo sfondo di solito presenta nuclei nudi bipolari mioepiteliali dispersi in quantità variabile. Nel caso di una componente cistica della lesione si possono osservare istiociti schiumosi e elementi duttali apocrini. Frammenti di tessuto fibroso o fibroadiposo sono frequenti.
- In particolari condizioni è possibile una diagnosi specifica. Il fibroadenoma, la liponecrosi, la mastite granulomatosa, l'ascesso mammario, un linfonodo intramammario sono condizioni per le quali le caratteristiche citologiche sono sufficientemente specifiche per formularne la diagnosi congiuntamente al dato radiografico e ecografico e alla clinica.

C3 - Atipia in lesione probabilmente benigna

L'aspirato è adeguato con le caratteristiche descritte per C2 ma sono presenti una o più delle seguenti caratteristiche:

- pleomorfismo dei nuclei
- tendenza alla perdita di coesione
- caratteristiche nucleari e citoplasmatiche dovute a modificazioni proliferative, a fenomeni di involuzione, a modificazioni cellulari in corso di gravidanza (vedi pitfalls).
- elevata cellularità accompagnata dalle caratteristiche summenzionate (12).

Il parametro di ipercellularità non è di per sé sufficiente a collocare una lesione in C3. Le lesioni benigne più frequentemente collocate in C3 sono: fibroadenoma, mastopatia fibrocistica, lesione scleroelastotica, papilloma. Le lesioni maligne più frequentemente collocate in C3 sono: carcinoma duttale grado 1, carcinoma tubulare, carcinoma cribriforme, carcinoma lobulare, carcinoma misto (duttale e lobulare) e CDIS di basso grado.

C4 - Sospetto per malignità o carcinoma probabile

Designa un aspirato con caratteristiche altamente atipiche suggestive ma non diagnostiche di malignità.

Ci sono almeno tre condizioni che motivano questa collocazione:

- il campione è ipocellulato o con artefatti da fissazione/ allestimento
- il campione presenta caratteristiche di malignità non inequivocabili
- cellule con caratteristiche di malignità coesistono con una componente benigna costituita da lembi coesivi e nuclei nudi nello sfondo.

Alcune lesioni benigne possono presentare caratteristiche suggestive ma non diagnostiche di malignità. Si raccomanda cautela quando, oltre alle anomalie cellulari, si riconoscono caratteristiche riferibili a fibroadenoma, mastopatia fibrocistica, lesione scleroelastotica, papilloma, mastite, liponecrosi e adenosi sclerosante. Le lesioni maligne più frequentemente collocate in C4 sono il carcinoma duttale G1-G2, il carcinoma tubulare, il carcinoma lobulare, il carcinoma misto (duttale e lobulare), il carcinoma cribriforme e il CDIS G1-G2.

C5 - Maligno o carcinoma o altre neoplasie

Designa un agoaspirato adeguato comprendente cellule con caratteristiche inequivocabili di malignità (carcinoma o altre neoplasie).

- la diagnosi deve essere effettuata non su un singolo criterio di malignità ma sulla combinazione di più criteri citologici
- in un contesto multidisciplinare, la concordanza tra diagnosi citologica e quadro mammografico può essere sufficientemente indicativa di una lesione infiltrante.

5.7 Limiti

5.7.1 Falsi positivi

- **Fibroadenoma:** negli strisci da fibroadenoma ci possono essere aspetti di marcata anisonucleosi e perdita della coesione, soprattutto in lesioni in fase di crescita attiva. Il clue per la corretta diagnosi è dato dalla presenza di nuclei nudi bipolari in uno sfondo pulito. Anche strisci da lesioni maligne possono dar luogo a nuclei nudi ma questi ultimi hanno le medesime caratteristiche delle cellule maligne degli aggregati.
- **Papilloma:** gli agoaspirati da lesioni papillomatose danno luogo a aggregati cellulari “a corna di cervo” simili a quelli del fibroadenoma a piccolo ingrandimento; tuttavia con una più attenta osservazione si nota una certa tridimensionalità dei gruppi cellulari e talora la presenza di uno stroma connettivale centrale. Lo sfondo può essere cistico con presenza di macrofagi e i nuclei bipolari sono meno frequenti rispetto al fibroadenoma. Variazioni della morfologia cellulare sono dovute alla presenza di cellule colonnari, cuboidali o piatte e alle modificazioni apocrine associate. Il carcinoma papillare intracistico è caratterizzato da monomorfismo cellulare con elementi colonnari o plasmocitoidi ipercromici organizzati in cluster ben definiti o filiere.
- **Cellule apocrine:** le cellule apocrine si presentano come elementi pleomorfi frequentemente dissociati e degenerati. È importante riconoscere le caratteristiche cistiche della lesione. Il carcinoma apocrino è una lesione solida e ha caratteristiche radiologiche di malignità.
- **Liponecrosi:** lo striscio può essere ipercellulato e i gruppi di istiociti con attività lipofagocitaria possono essere scambiati per cellule neoplastiche.
- **Linfonodo intramammario:** non causa problemi diagnostici qualora si riconosca la natura linfocitaria degli elementi esaminati.
- **Modificazioni postradioterapia:** possono causare erronee diagnosi di malignità per le alterazioni morfologiche causate dalla radioterapia, quali pleomorfismo e perdita della coesione; solitamente gli strisci sono ipocellulati.

- **Artefatti da striscio e fissazione:** un eccesso di pressione applicata durante la manovra di striscio può determinare una dissociazione forzata degli elementi cellulari che simulano discoesione.
- **Mastite granulomatosa:** gli istiociti epitelioidi possono mimare le cellule maligne; lo striscio è generalmente ipercellulato e il riconoscimento di macrofagi multinucleati e lo sfondo infiammatorio aiutano a porre la diagnosi corretta.
- **Tumore a cellule granulose (mioblastoma):** lo striscio è costituito da elementi altamente dissociati anche con pleomorfismo cellulare; caratteristico è l'ampio citoplasma eosinofilo e granuloso con il PAP o in EE.
- **Lesioni adenomioepiteliali:** possono mostrare caratteristiche di malignità per l'elevata dissociazione di elementi pleomorfi; la commistione di elementi chiaramente duttali, cellule apocrine e differenziazione squamosa orientano per una diagnosi corretta.
- **Sferulosi collagena:** nello striscio si repertano globuli debolmente eosinofili circondati da cellule fuse; la diagnosi differenziale si pone con il carcinoma adenoide cistico (48, 49). È opportuno in questa rara condizione consigliare la biopsia.
- **Adenosi microghiandolare:** non si repertano nuclei nudi nello sfondo e la diagnosi differenziale è con il carcinoma tubulare (42). Anche per questa lesione è consigliata la biopsia.
- **Modificazioni legate all'allattamento:** si osserva la presenza di una discreta perdita della coesione in uno striscio peraltro composto da elementi cellulari con caratteristiche di benignità. Le cellule dissociate solitamente hanno un citoplasma ampio con presenza di piccoli vacuoli lipidici.
- **Lesioni similmucocele (MML):** la presenza di mucina extracellulare in lesioni benigne non è un reperto frequente. Oltre che nella lesione descritta Rosen (MML) (50) si osserva talora in associazione con modificazioni fibrocistiche, iperplasia duttale, adenosi, papilloma intraduttale e fibroadenoma. Il riconoscimento di una citologia francamente benigna e scarsa orienta per la corretta diagnosi. I carcinomi muco cellulari si distinguono per una cellularità francamente atipica. In considerazione dell'associazione frequente di MML con ADH e DCIS è utile consigliare la biopsia in questi casi ponendo la diagnosi nella categoria C3 o C4 (51, 52, 53).

5.7.2 Falsi negativi

La maggior parte dei falsi negativi è dovuta ad un agoaspirato non rappresentativo della lesione. Tuttavia ci sono dei carcinomi che per loro natura possono produrre una diagnosi di falsa negatività (11).

- **Carcinoma tubulare/carcinoma duttale G1 (54):** si tratta di strisci solitamente poco cellulati, con buona coesione cellulare, monomorfismo cellulare e assenza di atipie. Il dato radiografico, unitamente all'assenza di nuclei nudi, alla presenza di piccoli cluster in atteggiamento microacinare e alle irregolarità della membrana nucleare, sono punti a favore di una diagnosi di neoplasia. La presenza di materiale calcifico proveniente da una associata componente di DCIS contribuisce a formularne la diagnosi.
- **Carcinoma lobulare invasivo (11, 55):** gli aspirati da questa lesione sono di difficile interpretazione; i pattern osservabili sono diversi e vanno da uno striscio poco cellulato con caratteri di benignità per l'uniformità delle cellule a strisci ipercellulati non dissimili a quelli del carcinoma duttale. La marcata dissociazione cellulare e la presenza di cellule ad anello con castone con lumi intracitoplasmatici sono indicativi di carcinoma lobulare ma non specifici. Anche la presenza di irregolarità del contorno nucleare è a favore di un carcinoma lobulare.
- **Carcinoma con estesa fibroelastosi:** da luogo ad uno striscio poco cellulato che rende difficile, se non impossibile, la diagnosi.

5.7.3 Diagnosi di carcinoma duttale in situ (DCIS)

Il carcinoma duttale in situ e il carcinoma duttale invasivo non possono essere distinti con la sola citologia. Alcune caratteristiche citologiche possono suggerire un DCIS e possono essere utilmente segnalate nel

referto citologico come indicazione della presenza di una componente DCIS. Le caratteristiche variano a seconda dei diversi tipi di DCIS.

- **DCIS ad alto grado (comedonico):** la necrosi è l'aspetto più peculiare dello striscio con presenza di materiale granulare e di lembi coesivi di elementi con pleomorfismo nucleare e caratteristiche simil-apocrine.
- **DCIS di grado intermedio e basso (cribriforme/micropapillare):** aggregati coesi di cellule ipercromiche con calcificazioni in uno sfondo pulito con rari o assenti nuclei nudi.
- **Carcinoma papillare intracistico:** striscio ipercellulato con aggregati, lembi e filiere di elementi ipercromici, relativamente monomorfi, in uno sfondo pulito con rari macrofagi

5.7.4 Lesioni rare

- **Granulomi da silicone, da olio di soia o paraffina:** lo striscio è caratterizzato da elementi scarsamente coesivi ma il riconoscimento di cellule multinucleate e di gocce di olio o silicone intracitoplasmatiche orientano la diagnosi. Le notizie cliniche sono di aiuto.
- **Lesioni stromali:** vengono sottoposte ad agoaspirato sulla base del riscontro mammografico o palpatorio di lesione sospetta. La fibromatosi e la fascite nodulare sono le lesioni più frequenti e citologicamente caratterizzate da scarsi lembi di elementi fusati con nuclei regolari.
- **Carcinoma apocrino:** lo striscio è solitamente ipercellulato e la difficoltà diagnostica nasce dalle caratteristiche delle cellule neoplastiche che assomigliano alle cellule apocrine benigne. Si osservano aggregati e formazioni papillari come nei casi benigni. L'uniformità della popolazione cellulare maligna e le atipie nucleari congiuntamente alla necrosi sono criteri per la diagnosi. Va ricordato che il carcinoma apocrino si presenta come una lesione solida.
- **Tumore fillode:** le varianti benigne sono molto simili al fibroadenoma. La presenza di cellule stromali con atipie nucleari e la presenza di frammenti di connettivo mucoso possono indirizzare la diagnosi. I fillodi maligni mostrano un pattern di aggregati epiteliali benigni frammentati a elementi fusati con caratteristiche nucleari di malignità.
- **Tumori metastatici (56):** vanno presi in considerazione quando si osserva un pattern non usuale per il carcinoma mammario. Il melanoma e il carcinoma indifferenziato a piccole cellule sono i più frequenti. Nel melanoma sono di aiuto la presenza di pigmento e la presenza di grossolane inclusioni nucleari. Le metastasi di carcinoma ovarico hanno le caratteristiche di una lesione papillare: la presenza di corpi psammomatosi può aiutare a diagnosi. Cellule con ampio citoplasma chiaro possono suggerire la possibilità di un carcinoma renale. Il carcinoma squamoso è facilmente diagnosticabile e può essere sia primitivo che metastatico.
- **Linfoma:** la diagnosi si pone sulla base dello spettro di elementi linfoidi presenti. Qualora si sospetti tale possibilità è utile effettuare la biopsia per tipizzare la lesione.
- **Tumori stromali maligni:** il più comune è l'angiosarcoma, soprattutto se in un contesto di pregressa terapia radiante. Qualora si sospetti un sarcoma, sulla base delle atipie citonucleari degli elementi fusati e/o pleomorfi, è necessario effettuare la biopsia al fine di porre diagnosi tra sarcoma, carcinoma metastatico e fillode maligno.

6. Bibliografia

1. Wilson ARM, Asbury D, Cooke J, Michell M and Patnick J, Clinical Guidelines For Breast Cancer Screening Assessment Sheffield NHS Breast Screening Programme April 2001 ISBN 1 871997 39 9 (NHSBSP Publication No 49)
2. Cytology Sub-group of the National Coordinating Group for Breast Screening Pathology. Guidelines for Non-operative Diagnostic Procedures and Reporting in Breast Cancer Screening. Sheffield, NHS Cancer Screening Programmes 2001 (NHSBSP Publication No 50)
3. Britton P. Fine needle aspiration or core biopsy. *The Breast* 1999, 8: 1–4.
4. Britton PD, McCann J. Needle biopsy in the NHS Breast Screening Programme 1996/1997: How much and how accurate? *The Breast* 1999, 8: 5–11.
5. Berg WA, Hruban RH, Kumar D, Singh HR, Brem RF, Gatewood OM. Lessons from mammographic-histopathologic correlation of large-core needle breast biopsy. *Radiographics* 1996, 16: 1111–1130.
- 5a Sapino A, Cassoni P, Zanon E, Fraire F, Croce S, Coluccia C, Donadio M, Bussolati G. Ultrasonographically-guided fine-needle aspiration of axillary lymph nodes: role in breast cancer management. *Br J Cancer* 2003 Mar 10;88(5):702-6.
- 5b Deurloo EE, Tanis PJ, Gilhuijs KG, Muller SH, Kroger R, Peterse JL, Rutgers EJ, Valdes Olmos R, SchultzeKool LJ. Reduction in the number of sentinel lymph node procedures by preoperative ultrasonography of the axilla in breast cancer. *Eur J Cancer* 2003 May;39(8):1068-73.
6. Wells CA. Quality assurance in breast cancer screening cytology: A review of the literature and a report on the UK National Cytology Scheme. *European Journal of Cancer* 1995, 31A: 273–280.
7. Löfgren M, Andersson I, Lindholm K. Stereotactic fine needle aspiration for cytologic diagnosis of non-palpable breast lesions. *Am. J. Radiol* 1990; 154 1191-5
8. Ciatto S, Rosseli del Turco M, Bravetti P. Stereotaxic cytology of non-palpable breast lesions. *Radiology* 1989; 173:57-9
9. Dowlatshahi K, Gent HJ, Schmidt R, Jokich PM, Bibbo M, Sprenger E. Non-palpable breast tumours: diagnosis with stereotaxic localisation and fine needle aspiration. *Radiology* 1989;170:427-33
10. Sarfati MR, Fox KA, Warneke JA, Fajardo LL, Hunter GC, Rappaport WD. Stereotactic fine-needle aspiration cytology of nonpalpable breast lesions: an analysis of 258 consecutive aspirates. *Am J Surg* 1994;168(6):529-31; discussion 531-2.
11. Lamb J, Anderson TJ. Influence of cancer histology on the success of fine needle aspiration of the breast. *Journal of Clinical Pathology* 1989, 42: 733–735.
12. Peterse JL, Koolman-Schellekens MA, van de Peppel-van de Ham T, van Heerde P. Atypia in fine-needle aspiration cytology of the breast: a histologic follow-up study of 301 cases. *Semin Diagn Pathol* 1989 May;6(2):126-34.
13. Gupta RK, Dowle CS. Fine needle aspiration cytology of tubular carcinoma of the breast. *ActaCytol* 1997 Jul-Aug;41(4):1139-43.
14. Gangopadhyay M, Nijhawan R, Joshi K, Gupta S. Cytology of “significant” breast ductal proliferations. *ActaCytol* 1997 Jul-Aug;41(4):1112-20.
15. Pijnappel RM, van den Donk M, Holland R, Mali WP, Peterse JL, Hendriks JH, Peeters PH. Diagnostic accuracy for different strategies of image-guided breast intervention in cases of nonpalpable breast le-

- sions. *Br J Cancer* 2004 Feb 9;90(3):595-600.
16. S H Parker, F Burbank, R J Jackman, C J Aucreman, G Cardenosa, T M Cink, J L Coscia, Jr, G W Eklund, W P Evans, 3rd, and P R Garver. Percutaneous large-core breast biopsy: a multi-institutional study. *Radiology* 1994; 193(2):359-64.
 - 16a. Brenner RJ, Fajardo L, Fisher PR, Dershaw DD, Evans WP, Bassett L, Feig S, Mendelson E, Jackson V, Margolin FR. Percutaneous core biopsy of the breast: Effect of operator experience and number of samples on diagnostic accuracy. *AJR Am J Roentgenol* 1996;166:341-346
 17. Liberman L, Dershaw DD, Rosen PP, Abramson AF, Deutch BM, Hann LE. Stereotactic 14-gauge breast biopsy: how many core biopsy specimens are needed? *Radiology* 1994;192(3):793-5.
 18. Verkooijen HM. Diagnostic accuracy of stereotactic large-core needle biopsy for nonpalpable breast disease: results of a multicenter prospective study with 95% surgical confirmation. *Int J Cancer* 2002, 99: 853-859.
 19. Lee CH, Egglin TK, Philpotts L, Mainiero MB, Tocino I. Cost-effectiveness of stereotactic core needle biopsy: analysis by means of mammographic findings. *Radiology* 1997; 202(3): 849-54.
 20. Liberman L, Sama MP. Cost-effectiveness of stereotactic 11-gauge directional vacuum-assisted breast biopsy. *Am J Roentgenol* 2000; 175(1):53-8.
 21. Lee CH, Carter D, Philpotts LE, Couce ME, Horvath LJ, Lange RC, Tocino I. Ductal carcinoma in situ diagnosed with stereotactic core needle biopsy: can invasion be predicted? *Radiology* 2000; 217(2): 466-70.
 - 21a. American College of Radiology (ACR) Breast Imaging Reporting and Data System Atlas (BIRADS® Atlas). Reston, Va: © American College of Radiology; 2003 www.acr.org/cgi-bin/fr?mast:masthead-products;text:/departments/stand_accred/birads-a.html
 22. Harvey SC, Denison CM, Lester SC, DiPiro PJ, Smith DN, Meyer JE. Fibrous nodules found at large-core needle biopsy of the breast: imaging features. *Radiology* 1999;211(2):535-40.
 23. Israel PZ. The revolution in breast biopsy: where is the surgeon? *Am Surg* 1996;62(2): 93-5.
 24. Youngson BJ, Liberman L, Rosen PP. Displacement of carcinomatous epithelium in surgical breast specimens following stereotactic core biopsy. *Am J ClinPathol* 1995 May;103(5):598-602.
 25. Preece PE, Hunter SM, Duguid HL, Wood RA. Cytodiagnosis and other methods of biopsy in the modern management of breast cancer. *SeminSurgOncol* 1989;5(2):69-81.
 26. Youngson BJ, Cranor M, Rosen PP. Epithelial displacement in surgical breast specimens following needling procedures. *Am J Surg Pathol* 1994 Sep;18(9):896-903.
 27. Lee KC, Chan JK, Ho LC. Histologic changes in the breast after fine-needle aspiration. *Am J Surg Pathol* 1994 Oct;18(10):1039-47.
 28. Carter BA, Jensen RA, Simpson JF, Page DL. Benign transport of breast epithelium into axillary lymph nodes after biopsy. *Anatomic Pathology* 2000;113:259-265.
 29. Tavassoli FA, Pestaner JP. Pseudoinvasion in intraductal carcinoma. *Mod Pathol*. 1995;8(4):380-3.
 30. Pinto RG, Couto F, Mandreker S. Infarction after fine needle aspiration. A report of four cases. *ActaCytol* 1996 Jul-Aug;40(4):739-41.
 - 30a. Jacobs TW, Byrne C, Colditz G, Connolly JL, Schnitt SJ. Radial scars in benign breast-biopsy specimens and the risk of breast cancer. *The New England Journal of Medicine* 1999;340:430-
 31. Crisi GM, Mandavilli S, Cronin E, Ricci A Jr. Invasive mammary carcinoma after immediate and short-

- term follow-up for lobular neoplasia on core biopsy. *Am J SurgPathol* 2003; 27(3):325-33.
32. Bratthauer GL, Moinfar F, Stamatakos MD, Mezzetti TP, Shekitka KM, Man YG, Tavassoli FA. Combined E-cadherin and high molecular weight cytokeratin immunoprofile differentiates lobular, ductal, and hybrid mammary intraepithelial neoplasias. *Hum Pathol* 2002 ; 33(6):620-7.
 33. Zhao L, Freimanis R, Bergman S, Shen P, Perrier ND, Lesko N, Pulaski T, Pulaski S, Carr JJ, Levine EA. Biopsy needle technique and the accuracy of diagnosis of atypical ductal hyperplasia for mammographic abnormalities. *Am Surg* 2003 Sep;69(9):757-62; discussion 762.
 34. Liberman L, Dershaw DD, Rosen PP, Giess CS, Cohen MA, Abramson AF, Hann LE. Stereotaxic core biopsy of breast carcinoma: accuracy at predicting invasion. *Radiology* 1995, 194: 379-381.
 35. O'Leary R, Hawkins K, Beazley JC, Lansdown MR, Hanby AM. Agreement between preoperative core needle biopsy and postoperative invasive breast cancer histopathology is not dependent on the amount of clinical material obtained. *J ClinPathol* 2004 Feb;57(2):193-5.
 36. Harris GC, Denley HE, Pinder SE, Lee AH, Ellis IO, Elston CW, Evans A. Correlation of histologic prognostic factors in core biopsies and therapeutic excisions of invasive breast carcinoma. *Am J SurgPathol* 2003 Jan;27(1):11-5.
 37. Boecker W, Moll R, Poremba C, Holland R, Van Diest PJ, Dervan P, Burger H, Wai D, Ina Diallo R, Brandt B, Herbst H, Schmidt A, Lerch MM, Buchwallow IB. Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept. *Lab Invest* 2002 Jun;82(6):737-46.
 38. Schnitt SJ, Vincent-Salomon A. Columnar cell lesions of the breast. *AdvAnatPathol* 2003; 10(3):113-24.
 39. Fraser JL, Raza S, Chorny K, Connolly JL, Schnitt SJ. Columnar alteration with prominent apical snouts and secretions: a spectrum of changes frequently present in breast biopsies performed for microcalcifications. *Am J SurgPathol* 1998; 22(12):1521-7.
 40. WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Edited by F.A. Tavassoli and P Devilee. IARC Press, Lyon, 2003.
 41. Leal C, Henrique R, Monteiro P, Lopes C, Bento MJ, De Sousa CP, Lopes P, Olson S, Silva MD, Page DL. Apocrine ductal carcinoma in situ of the breast: histologic classification and expression of biologic markers. *Hum Pathol* 2001 May;32(5):487-93.
 42. Evans AT, Hussein KA. A microglandularadenosis-like lesion simulating tubular adenocarcinoma of the breast. A case report with cytological and histological appearances. *Cytopathology* 1990; 1(5):311-6.
 43. Girling AC, HanbyAM, Millis RR. Radiation and other pathological changes in breast tissue after conservation treatment for carcinoma. *J ClinPathol* 1990 Feb;43(2):152-6.
 44. Aktepe F, Kapucuoglu N, Pak I. The effects of chemotherapy on breast cancer tissue in locally advanced breast cancer. *Histopathology* 1996 Jul;29(1):63-7.
 45. Taniere P, Poulard G, Frappart L, Berger G, Goncalves M, Vauzelle JL, Delecluse DJ, Bailly C, Boucheron S, Berger F. Diabetic mastopathy with epithelioidfibroblasts: differential diagnosis from an infiltrating lobular carcinoma of the breast. *Ann Pathol* 1996; 16(1):33-6. French.
 46. H Goulding, S Pinder, P Cannon, D Pearson, R Nicholson, D Snead, J Bell, C.W.E Elston, J.F Robertson, R.W Blamey, I.O Ellis. A new immunohistochemical antibody for the assessment of estrogen receptor status on routine formalin-fixed tissue samples. *Human Pathology* 1995, 26: 291-294.
 47. Zidan A, Brown JSC, Peston D, Shousha S. Oestrogen and progesterone receptor assessment in core biopsy specimens of breast carcinoma. *Journal of Clinical Pathology* 1997, 50: 27-29.
 48. C A Wells, C W Wells, P Yeomans, M Viña, S Jordan, and A J d'Ardenne. Spherical connective tissue

- inclusions in epithelial hyperplasia of the breast ('collagenous spherulosis'). *Journal of Clinical Pathology* 1990, 43: 905-908.
49. Tyler X, Coghill SB. Fine needle aspiration cytology of collagenous spherulosis of the breast. *Cytopathology* 1991, 2: 159-162.
 50. Rosen PP. Mucocoele-like tumors of the breast. *American Journal of Surgical Pathology* 1986; 10,464-469
 51. Weaver MG, Abdul-Karim FW, al-Kaisi N. Mucinous lesions of the breast. A pathological continuum. *Pathol. Res Pract* 1993; 189, 873-876
 52. Hamele-Bena D, Cranor ML, Rosen PP. Mammary mucocele-like lesions. Benign and malignant. *American Journal of Surgical Pathology* 1996; 20, 1081-1085
 53. Jacobs TW, Connolly JL, Schnitt SJ. Nonmalignant lesions in breast core needle biopsies. *American Journal of Surgical Pathology* 2002; 26, 1095-1110
 54. Bondesan L, Lindholm K. Aspiration cytology of tubular breast carcinoma. *ActaCytologica* 1990, 34: 15-20.
 55. Salhany KE, Page DL. Fine needle aspiration of mammary lobular carcinoma in situ and atypical lobular hyperplasia. *American Journal of Clinical Pathology* 1989, 92: 22-26.
 56. Sneige N, Zachariah S, Fanning TV, Dekmezian RH, Ordóñez NG. Fine needle aspiration cytology of metastatic neoplasms in the breast. *American Journal of Clinical Pathology* 1989, 92: 27-35.
 57. Robinson IA, McKee G, Nicholson A, D'Arcy J, Jackson PA, Cook MG, Kissin MW. Prognostic value of cytological grading of fine-needle aspirates from breast carcinomas. *Lancet* 1994, 343:947-949.
 58. Redard M, Vassilakos P, Weintraub J. A simple method for oestrogen receptor antigen preservation in cytologic specimens containing breast carcinoma cells. *Cytopathology* 1989, 5: 188-193
 59. Wells C.A. Quality assurance guidelines for pathology. In: *European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis, Fourth Edition*. 2006; 221-311
 60. Pathology reporting of breast disease. NHSBSP Pub. N° 58. January 2005
 61. Senetta R, Campanino PP, Mariscotti G, Garberoglio S, Daniele L, Pennecci F, Macrì L, Bosco M, Gandini G, Sapino A. Columnar cell lesions associated with breast calcifications on vacuum assisted core biopsies: clinical, radiographic and histological correlations. *Mod Pathol*, 2009, 22: 762-769
 62. Piubello Q, Parisi A, Eccher A, Barbazeni G, Franchini Z, Iannucci A. Flat epithelial atypia on core needle biopsy. Which is the right management? *Am J Surg Pathol* 2009, 33: 1078-1084.
 63. Emad A, Rakha, Andrew H.S. Lee, Jacquie A. Jenkins, Alison E. Murphy, Lisa J. Hamilton and Ian O. Ellis. Characterization and outcome of breast needle core biopsy diagnoses of lesions of uncertain malignant potential (B3) in abnormalities detected by mammographic screening. *International J Cancer*, 2011, 129: 1417-1424
 64. Sobin L, Gospodarowicz M, Wittekind Ch (eds). *UICC TNM classification of malignant tumours, 7th edition*. John Wiley and Sons Inc., New York, 2010
 65. *AFIP Atlas of Tumor Pathology Series 4, Fascicle 10: Tumors of the Mammary Gland*. Tavassoli, F, Eusebi V: ARP Press, Silver Spring, Maryland, May 2009, 418 pp
 66. Wells CA, Amendoeira I, Bellocq JP, Bianchi S, Boecker W, Borisch B, Bruun Rasmussen B, Callagy GM, Chmielik E, Cordoba A, Cserni G, Decker T, DeGaetano J, Drijkoningen M, Ellis IO, Faverly DR, -Grazio S, Grabau D, Heikkilä P, Iacovou E, Jacquemier J, Kaya H, Kulka J, Lacerda M, Liepniece-Karele

- I, Martinez-Penuela J, Quinn CM, Rank F, Regitnig P, Reiner A, Sapino A, Tot T, Van Diest PJ, Varga Z, Wesseling J, Zolota V, Zozaya-Alvarez E (2013). S2: Pathology update. Quality assurance guidelines for pathology. In: European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis. Fourth edition, Supplements. Perry N, Broeders M, de Wolf C, Törnberg S, Holland R, von Karsa L (eds.). European Commission, Office for Official Publications of the European Union, Luxembourg, pp. 73–120
67. Strachan C1, Horgan K1, Millican-Slater RA2, Shaaban AM3, Sharma N4. Outcome of a new patient pathway for managing B3 breast lesions by vacuum-assisted biopsy: time to change current UK practice? *J clin path* 2015 sept 14
 68. NCCN clinical practice guidelines in oncology. Breast cancer screening and diagnosis. Versione I 2015, pag 48
 69. Clinical Guidelines for Breast Cancer Screening Assessment Third edition NHSBSP Publication No 49 June 2010 NHS Cancer Screening Programmes Fulwood House Old Fulwood Road Sheffield S10 3TH
 70. Saba Yasir, MBBS, Roberto Gamez, MD, Sarah Jenkins, MS, Daniel W. Visscher, MD, and Aziza Nassar, MD Significant Histologic Features Differentiating Cellular Fibroadenoma From Phyllodes Tumor on Core Needle Biopsy Specimens. *Am J Clin Pathol* 2014;142:362-369
 71. A H S Lee, Z Hodi, I O Ellis & C W Elston Histological features useful in the distinction of phyllodes tumour and fibroadenoma on needle core biopsy of the breast *Histopathology* 2007, 51, 336–344
 72. D. Abdulcadir, J. Nori, I. Meattini, E. Giannotti, C. Boeri E. Vanzi, V. Vezzosi, S. Bianchi Phyllodes tumours of the breast diagnosed as B3 category on image-guided 14-gauge core biopsy: Analysis of 51 cases from a single institution and review of the literature. *EJSO* 40 (2014) 859-864.
 73. Daniel J. Gould, Jessica A. Salmans, Brian K. Lassinger, Alejandro Contreras, Carolina Gutierrez, Elizabeth Bonefas, Kathleen R. Liscum, and Eric J. Silberfein. Factors associated with phyllodes tumor of the breast after core needle biopsy identifies fibroepithelial neoplasm. *J surgical research* 2012. 299-303
 74. Rosen PP. Mucocele-like tumours of the breast. *Am J Surg Pathol*, 1986; 10: 464-469.
 75. K Tamaki, Sasano, T Ishida, M Miyashita, M Takeda, M Amari, N Tamaki and N Ohuchi Comparison of core needle biopsy (CNB) and surgical specimens for accurate preoperative evaluation of ER, PgR and HER2 status of breast cancer patients. *Cancer Sci* 2010; 101: 2074–2079
 76. Antonio C. Wolff, M. Elizabeth H. Hammond, David G Hicks, et al. Recommendations for Human epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/ College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update *JCO* 2013;31:3997-4013
 77. Rakha EA, Pigera M, Shaaban A, Shin SJ, D'Alfonso T, Ellis IO, Lee AHS. National Guidelines and Level of Evidence: Comments on some of the New Recommendations in the American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologist Human Receptor Epidermal Growth Factor Receptor 2 Guidelines for Breast Cancer (correspondence) *JCO* 2015; 33:1301-1302
 78. Replay to Rakha et al. *JCO* 2015; 33:1302-1303
 79. A. S. Coates, E. P. Winer, A. Goldhirsch, R. D. Gelber, M. Gnant, M. Piccart-Gebhart, B. Thürlimann, H.-J. Senn and Panel members Tailoring therapies - improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Annals of Oncology* 26: 1533–1546, 2015

7. Controllo di qualità

Definizione

I controlli di qualità, come di seguito illustrati, sono da intendersi non come una valutazione della qualità del laboratorio ma come valutazione clinica dell'efficacia della FNA o della core biopsy.

FNA inadeguate (C1) e biopsie normali (B1) vengono pertanto conteggiate negli standard di qualità.

Sensibilità assoluta	Numero di carcinomi (C5 o B5) espresso come % del totale dei carcinomi verificati
Sensibilità completa	Numero di carcinomi non C1, C2 e B1,B2 espresso come % del totale dei carcinomi verificati
Specificità	Numero di lesioni benigne correttamente identificate (numero di C2 o B2 meno i falsi negativi) espresso come % del totale delle lesioni benigne campionate
Valore predittivo positivo di C5/B5	Numero di carcinomi correttamente identificati (numero di C5 o B5 meno i falsi positivi) espresso come % del totale dei C5 o B5
Valore predittivo positivo di C4/B4	Numero di carcinomi identificati come sospetti (numero di C4 o B4 meno i falsi sospetti) espresso come % del totale dei C4 o B4
Valore predittivo positivo di C3/B3	Numero di carcinomi identificati come C3 o B3 meno il numero di C3 o B3 benigni espresso come % del totale dei C3 o B3
Falsi negativi	Caso diagnosticato C2 o B2 che nell'arco di 3 anni si dimostra essere un carcinoma (qs parametro include necessariamente alcuni casi dove è stata campionata un'area diversa da quella che svilupperà in seguito il cancro che in questo caso può essere definito "cancro intervallo")
Falsi positivi	Caso diagnosticato come positivo (C5 o B5) che alla chirurgia risulta una lesione benigna (compresa l'iperplasia atipica)
Tasso di falsi negativi	Numero di falsi negativi espresso come % del totale dei carcinomi campionati
Tasso di falsi positivi	Numero di falsi positivi espresso come % del totale dei carcinomi campionati
Tasso di inadeguati	Numero di inadeguati (C1 o B1) espresso come % del totale dei casi campionati

Modalità di calcolo dei parametri di Qualità

Il calcolo dei dati può essere fatto sia per l'agoaspirato che per la biopsia (CQA e BQA).

Esiste inoltre un ulteriore calcolo che combina i due parametri dando la sensibilità e la specificità non-opera-

torie. Si considera la diagnosi peggiore (il numero più elevato di C o B) delle due metodiche quando entrambe sono state effettuate sulla medesima paziente e si vanno a calcolare gli stessi parametri che si utilizzano per il CQA e il CQB.

Ciascuna cella deve contenere il numero delle diagnosi citologiche (o biotipiche) per categoria C (o B) abbinato alla peggiore diagnosi istopatologica corrispondente.

ISTOLOGIA	C5/B5	C4/B4	C3/B3	C2/B2	C1/B1	Totale
Tot. maligni	Cella1	Cella2	Cella3	Cella4	Cella5	Cella6
Infiltranti	Cella7	Cella8	Cella9	Cella10	Cella11	Cella12
Non inf.	Cella13	Cella14	Cella15	Cella16	Cella17	Cella18
Tot. benigni	Cella 19	Cella20	Cella21	Cella22	Cella23	Cella24
No istologia	Cella25	Cella26	Cella27	Cella28	Cella29	Cella30
Totale	Cella31	Cella32	Cella33	Cella34	Cella35	Cella36

Dalla tavola citata nella pagina precedente si procede al calcolo della sensibilità e specificità in % utilizzando le formule seguenti in cui i numeri corrispondono al **numero della cella**

SENSIBILITA' ASSOLUTA	$\frac{(1+25)}{(6+25)} \times 100$
SENSIBILITA' COMPLETA	$\frac{(1+2+3+25)}{6+25} \times 100$
SPECIFICITA' (solo biopsie)	$\frac{22}{24} \times 100$
SPECIFICITA' COMPLETA	$\frac{(22+28)}{24+27+28+29} \times 100$
VALORE POSITIVO PREDITTIVO (C5/B5)	$\frac{(31-19)}{31} \times 100$
VALORE PREDITTIVO POSITIVO (C4/B4)	$\frac{2}{(32-26)} \times 100$
VALORE PREDITTIVO POSITIVO (C3/B3)	$\frac{3}{33} \times 100$
VALORE PREDITTIVO NEGATIVO (C2/B2)	$\frac{(34-4)}{34} \times 100$
TASSO DI FALSI NEGATIVI (escluso inadeguati)	$\frac{4}{(6+25)} \times 100$
TASSO DI FALSI POSITIVI	$\frac{19}{(6+25)} \times 100$
TASSO DI INADEGUATI	$\frac{35}{36} \times 100$

TASSO DI INADEGUATI con diagnosi di carcinoma	$\frac{5}{(6+25)} \times 100$
TASSO DI C3/B3	$\frac{33}{36} \times 100$
TASSO DI C4/B4	$\frac{32}{36} \times 100$
TASSO DI SOSPETTI (C3+C4)/(B3+B4)	$\frac{(32+33)}{36} \times 100$

Indicatori e minimi standard suggeriti per la citologia

	Minimo	Desiderato	Media (NHSBSP-UK)
SENSIBILITA' ASSOLUTA	>60%	>70%	57.1%
SENSIBILITA' COMPLETA	>80%	>90%	81.1%
SPECIFICITA' (inclusi casi non biopsiati)	>55%	>65%	58.4%
VALORE PREDITTIVO POSITIVO	>98%	>99.5	99.6%
TASSO DI FALSI NEGATIVI	<6%	<4%	6,3%
TASSI DI FALSI POSITIVI	<1%	<0.5%	0.2%
TASSO DI INADEGUATI	<25%	<15%	23.4%
TASSO DI INADEGUATI con diagnosi di ca	<10%	<5%	9.8%
TASSO DI SOSPETTI	<20%	<15%	15.8%

Indicatori e minimi standard suggeriti per le biopsie

	Minimo	Desiderato	Media (NHSBSP-UK)
SENSIBILITA' ASSOLUTA	>70%	>80%	76.4%
SENSIBILITA' COMPLETA	>80%	>90%	84.5%
SPECIFICITA' (inclusi casi non biopsiati)	>75%	>85%	81.2%
VALORE PREDITTIVO POSITIVO	>99%	>99.5%	100%
TASSO DI FALSI POSITIVI	<0.5%	<0.1%	0%
TASSO DI PERDITA DI ca (B1+B2)	<15%	<10%	15.1%
TASSO DI SOSPETTI	<10%	<5%	4.8%

Tutti questi dati dipendono in larga parte dalla tecnica utilizzata per il campionamento, dall'esperienza e dalla perizia dell'aspiratore e dall'esperienza di lettura del patologo (quando le due figure sono diverse).

8. Bibliografia controllo di qualità

1. Barrows GH, Anderson TJ, Lamb JL, Dixon JM. Fine needle aspiration of breast cancer – relationship of clinical factors to cytology results in 689 primary malignancies. *Cancer* 1986, 58: 1493–1498.
2. Wells CA. Quality assurance in breast cancer screening cytology: A review of the literature and a report on the UK National Cytology Scheme. *European Journal of Cancer* 1995, 31A: 273–280.
3. Wells CA, Perera R, White FE, Domizio P. Fine needle aspiration cytology in the UK Breast Screening Programme – a national audit of results. *The Breast* 1999, 8: 261–266.
4. Britton P. Fine needle aspiration or core biopsy. *The Breast* 1999, 8: 1–4.
5. Britton P, McCann J. Needle biopsy in the NHS Breast Screening Programme 1996/97: how much and how accurate? *The Breast* 1999, 8: 5–11.
6. Crotch-Harvey MA, Loughran CV. Combined stereotactic wide core needle biopsy and fine needle aspiration cytology in the assessment of impalpable mammographic abnormalities detected in a breast screening programme. *The Breast* 1996, 5: 48–49.
7. Meyer JE. Value of large core biopsy of occult breast lesions. *American Journal of Roentgenology* 1992, 158: 991–992.
8. L.J Yeoman, M.J Michell, S Humphreys, D.M Thomas, S Henderson, H.B Nunnerley. Radiographically guided fine needle aspiration cytology and core biopsy in the assessment of impalpable breast lesions. *The Breast* 1996, 5: 41–47.
9. G. P. Sadler, S. McGee, N. S. Dallimore, I. J. Monypenny, A. G. Douglas-Jones, Mr K. Lyons, K. Horgan. Role of fine needle aspiration cytology and needle core biopsy in the diagnosis of lobular carcinoma of the breast. *British Journal of Surgery* 1994, 81: 1315–1317.
10. Bondesan L, Lindholm K. Aspiration cytology of tubular breast carcinoma. *Acta Cytologica* 1990, 34: 15–20.

9. Ruolo della citologia agoaspirativa nella stadiazione del carcinoma della mammella

A cura di:

Luca Anselmi (U.O. Anatomia Patologica, Genova)

Giovanni Capitanio (U.O. Anatomia Patologica, Venezia)

Maria Sironi (U.O. Anatomia Patologica, Chiavari - Genova)

Premessa:

L'introduzione della biopsia del linfonodo sentinella ha modificato la gestione del carcinoma mammario (1), limitando alla malattia metastatica estesa la dissezione linfonodale ascellare completa ed omettendola in presenza di micrometastasi o di malattia metastatica limitata ad 1-3 linfonodi sentinella, in base ai recenti dati del trial Z0011 (2, 3).

Le linee guida della NCCN suggeriscono che l'ecografia con agoaspirato è un fattibile strumento per la stadiazione linfonodale preoperatoria (<http://www.nccn.org>).

Con la partenza del trial SOUND, l'ecografia ascellare rappresenta una tappa fondamentale per la selezione ed il follow-up delle pazienti, riconsiderando il ruolo della biopsia del linfonodo sentinella come metodica stadiativa (4).

Indicazioni:

L'ultima decade ha visto l'introduzione dell'ecografia preoperatoria dell'ascella, associata alla valutazione morfologica citologica tramite agoaspirazione con ago sottile od istologica con agobiopsia, con scopi stadiativi e prognostici:

- per la selezione delle pazienti che devono essere sottoposte direttamente alla dissezione ascellare, in un unico step, evitando la biopsia del linfonodo sentinella (5-12)
- per la corretta impostazione terapeutica con chemioterapia neoadiuvante preoperatoria (6, 13-16).

La positività dell'ecografia e della FNA si correla con il pT (17-18) e si associa ad una malattia metastatica più estesa, con il 50-59% di casi pN2-3, rispetto al 18-25% dei casi trattati con biopsia del linfonodo sentinella (7, 8, 17-21). L'ecografia con valutazione morfologica preoperatoria riconosce il 50% delle metastasi ascellari, con un valore predittivo positivo del 100%, evitando biopsie del linfonodo sentinella inutili: la percentuale di LS evitati è compresa tra 8% e 26% (8, 16, 22, 23). Inoltre riduce i falsi negativi attraverso una maggior percentuale di identificazione del linfonodo sentinella (22).

La valutazione ascellare preoperatoria si associa ad un maggior uso della chemioterapia neoadiuvante (49% contro il 21%)(16).

Utilità clinica della ecografia con valutazione morfologica:

I dati di sensibilità e specificità dell'ecografia con valutazione morfologica dei linfonodi ascellari in letteratura variano molto, sia per la differente incidenza della malattia metastatica locoregionale nelle casistiche studiate (21) e per i criteri di selezione delle pazienti (7), sia per il differente approccio all'ecografia ascellare, che viene effettuata solo con linfonodi palpatoriamente negativi (24) o indipendentemente dalla clinica linfonodale e quindi su tutti i linfonodi ascellari (25-27), compresi quelli palpabili (5), che per l'utilizzo associato di agoaspirato con ago sottile, o di agobiopsia (28), effettuata solo sul linfonodo ecograficamente sospetto (7), o sui linfonodi ecovisibili (29, 30).

Le caratteristiche ecografiche che determinano un sospetto sono (31-33):

l'ispessimento della corticale oltre i 2 mm, diffuso o focale

l'arrotondamento della normale forma ellittica (rapporto tra diametro longitudinale e trasverso)

la forma della corticale, eccentrica, asimmetrica o lobulata

l'assenza o la riduzione dell'ilo centrale (criterio poco sensibile)

l'obliterazione della corticale linfonodale normalmente ipoecogena

l'irregolarità dei contorni della corticale o della midollare

la compressione eccentrica della midollare linfonodale ipoecogena con o senza perdita della capsula

incremento della vascolarizzazione con eco-color-doppler.

Queste caratteristiche ecografiche hanno un differente valore predittivo positivo (32), pur tenendo conto che l'ecografia è operatore dipendente: la sola ecografia ascellare mostra una percentuale pari al 90% di falsi-negativi per depositi metastatici inferiori a 5 mm, il 59% per metastasi comprese tra 5 e 10 mm, il 28% per quelle maggiori di 10 mm; la percentuale di ecografie false negative varia tra il 68% dei casi pN1 al 25% nei casi pN3 (34).

L'agoaspirato ecoguidato, tecnica veloce, ben tollerata e senza controindicazioni (35), aggiunge sensibilità alla metodica radiologica (8, 36, 37). L'agoaspirato è preferibile alla core biopsy per i maggiori costi di quest'ultima (38).

Nella meta-analisi condotta su 11.000 pazienti in 35 studi dal gruppo di Houssami (37), l'ecografia associata alla citologia da agoaspirato dimostra una sensibilità del 79,6% ed una specificità del 98,3%, con una percentuale del 19,8% di casi inviati direttamente alla dissezione ascellare. E' sottolineata comunque una variabilità di accuratezza che dipende in parte anche dalla eterogeneità degli studi inclusi nelle meta-analisi: ad esempio lo studio di Diepstraten (38) dimostra che la sensibilità aumenta con l'incremento della prevalenza di malattia metastatica.

La percentuale di diagnosi falso-negative è compresa tra il 9% e il 41% (36, 40) per depositi metastatici perlopiù inferiori a 5 mm. La sensibilità varia tra 52-60% per le macrometastasi e il 22-30% per le micrometastasi (7, 32, 34).

Swinson (41) e Britton (32) nel loro studio dimostrano che ecografia + FNA non sono in grado di identificare micrometastasi (inferiori a 2 mm). La riduzione dei casi falsi negativi potrebbe essere ottenuta con il campionamento di diverse regioni dei linfonodi sospetti o con ulteriori passaggi, anche se non è possibile confermare che il linfonodo sentinella dimostratosi positivo corrisponde a quello agoaspirato in guida ecografica, a meno di effettuarne il marcaggio (42).

Considerazioni finali:

I Chirurghi che hanno modificato la loro pratica sulla base delle conclusioni del trial Z0011 hanno scarsa fiducia che la valutazione ecografica ascellare possa differenziare una malattia minima da una avanzata, anche se la proporzione di pazienti con malattia metastatica avanzata rappresenti il 58,9% dei linfonodi ecograficamente positivi, e il 24,6% di quelli negativi (21).

Inoltre l'ecografia pre-operatoria con agoaspirato potrebbe avere una sensibilità eccessiva con possibilità di identificare piccoli depositi (ITC, micrometastasi o piccole macrometastasi), che alla luce del trial Z011 non sono da considerare indicazione alla linfadenectomia d'amblé: tale situazione si verificherebbe solo nel 6% delle pazienti (18).

Lo studio in corso in Europa chiamato SOUND che prevede che tutte le pazienti con carcinoma mammario iniziale, candidate ad una terapia chirurgica conservativa, abbiano una valutazione ecografica dell'ascella e che, se negativa, vadano randomizzate tra effettuare la biopsia del linfonodo sentinella e non (4), dovrebbe estendere il ruolo dell'ecografia ascellare nella gestione meno interventistica dell'ascella.

Costi:

Valutando i costi dell'ecografia preoperatoria con agoaspirato, rispetto alla biopsia del linfonodo sentinella, Turaga et al. (16) calcola che lo studio preoperatorio è favorevole nel rapporto costo/efficacia rispetto alla biopsia del linfonodo sentinella, soprattutto quando la probabilità di metastasi ascellari è maggiore del 18%. Il tradizionale linfonodo sentinella costa invece meno dell'ecografia con agoaspirato nelle pz a basso rischio metastatico (16). Il maggior contributo al risparmio dei costi è legato al basso costo della procedura agoaspirativa in guida ecografica e ai benefici dell'unico intervento chirurgico nei pz con linfonodi positivi (22, 23).

Bibliografia:

1. Veronesi U, Paganelli G, Viale G, Galimberti V, Luini A, et al. Sentinel lymph node biopsy and axillary dissection in breast cancer: results in a large series. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 368–373.
2. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, Beitsch PD, Whitworth PW, et al. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial. *JAMA* 2011; 305: 569–575.
3. Giuliano AE, Morrow M, Duggal S, and Julian TB. Should ACOSOG Z0011 change practice with respect to axillary lymph node dissection for a positive sentinel lymph node biopsy in breast cancer? *Clin Exp Metastasis* 2012; 29:687–692
4. Gentilini O, Veronesi U. Abandoning sentinel lymph node biopsy in early breast cancer? A new trial in progress at the European Institute of Oncology of Milan (SOUND: Sentinel node vs Observation after axillary UltraSOUND). *Breast* 2012; 21: 678–681.
5. Sapino A, Cassoni P, Zanon E, Fraire F, Croce S, Coluccia C, Donadio M, Bussolati G. Ultrasonographically-guided fine-needle aspiration of axillary lymph nodes: role in breast cancer management. *Br J Cancer* 2003; 88(5):702–706
6. Chang MC, Crystal P, Colgan TJ. The evolving role of axillary lymph node fine-needle aspiration in the management of carcinoma of the breast. *Cancer Cytopathol* 2011;119:328-334
7. Leenders MWH, Broeders M, Croese C, Richir MC, Go HLS, Langenhorst BLAM, Meijer S, Schreurs WH. Ultrasound and fine needle aspiration cytology of axillary lymph nodes in breast cancer. To do or not to do? *The Breast* 2012; 21: 578-583
8. Cools-Lartigue J, Sinclair A, Trabulsi N, Meguerditchian A, Mesurolle B, Fuhrer R and Meterissian S. Preoperative axillary ultrasound and fine-needle aspiration biopsy in the diagnosis of axillary metastases in patients with breast cancer: predictors of accuracy and future implications. *Ann Surg Oncol* 2013; 20(3):819–827
9. Abe H, Schacht D, Sennett CA, Newstead GM, Schmidt RA. Utility of preoperative ultrasound for predicting pN2 or higher stage axillary lymph node involvement in patients with newly diagnosed breast cancer. *AJR Am J Roentgenol* 2013; 200: 696–702.
10. Lee B, Lim AK, Krell J, Satchithananda K, Coombes RC, et al. The efficacy of axillary ultrasound in the detection of nodal metastasis in breast cancer. *AJR Am J Roentgenol* 2013; 200: 314–320.
11. van Wely BJ, de Wilt JH, Schout PJ, Kooistra B, Wauters CA, et al. Ultrasound-guided fine-needle aspiration of suspicious nodes in breast cancer patients; selecting patients with extensive nodal involvement. *Breast Cancer Res Treat* 2013; 140: 113–118.
12. Houssami N, Diepstraten SCE, Hiram S, Cody HS, Turner RM and Sever AR Clinical Utility of Ultrasound-Needle Biopsy for Preoperative Staging of the Axilla in Invasive Breast Cancer. *Anticancer Research* 2014; 34: 1087-1098
13. Batsis C, Ziogas D, Fatouros M. Neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: Does pretreatment axillary nodal staging improve decision making? *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 1063-1066
14. Joh JE, Han G, Kiluk JV, Laronga C, Khakpour N, Lee MC. Indications for axillary ultrasound use in breast cancer patients. *Clin Breast Cancer* 2012;12:433-437.
15. Garcia-Ortega MJ, Benito MA, Vahamonde EF, Torres PR, Velasco AB, Paredes MM. Pretreatment axillary ultrasonography and core biopsy in patients with suspected breast cancer: diagnostic accuracy and

- impact on management. *Eur J Radiol* 2011;79:64-72.
16. Turaga KK; Chau A, Eatrides JM, Kiluk JV, Khakpour N, Iaronga C, Lee C. Selective application of routine preoperative axillary ultrasonography reduces costs for invasive breast cancer. *The Oncologist* 2011; 16: 942-948.
 17. Castellano I, Deambrogio C, Muscara` F, Chiusa L, Mariscotti G, Bussone R, Gazzetta G, Macri` L, Cassoni P, Sapino A. Efficiency of a Preoperative Axillary Ultrasound and Fine-Needle Aspiration Cytology to Detect Patients with Extensive Axillary Lymph Node Involvement. *PLoS ONE* 2014; 9(9): e106640.
 18. Boland MR, Prichard RS, Daskalova I, Lowery AJ, Evoy D, Geraghty J, Rothwell J, Quinn CM, O'Doherty A, McDermott EW. Axillary nodal burden in primary breast cancer patients with positive pre-operative ultrasound guided fine needle aspiration cytology: Management in the era of ACOSOG Z011 In press *EJSO* 2015; xx 1-7.
 19. Bortolini M, Genta F, Biacchiardi CP, Zanon E, Camanni M, Deltetto F. Axillary dissection in breast cancer patients with metastatic sentinel node: to do or not to do? Suggestions from our series. *ISRN Oncology* 2011;ID 527904.
 20. Verheuveel NC, van den Hoven I, Ooms HW, Voogd AC, Roumen RM. The role of ultrasound-guided lymph node biopsy in axillary staging of invasive breast cancer in the post- ACOSOG Z0011 trial era. *Ann Surg Oncol* 2014; 10; 22(2):409-15.
 21. Houssami N, Turner RM. Staging the axilla in women with breast cancer: the utility of preoperative ultrasound-guided needle biopsy. *Cancer Biol Med* 2014;11:69-77.
 22. Boughey JC, Moriarty JP, Degnim AC, Gregg MS, Egginton JS, Long KH. Cost modeling of preoperative axillary ultrasound and fine-needle aspiration to guide surgery for invasive breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2010; 17 (4): 953-958.
 23. Genta F, Zanon E, Camanni M, Deltetto F, Drogo M, Gallo R, Gilardi C. Cost/accuracy ratio analysis in breast cancer patients undergoing ultrasound-guided fine-needle aspiration cytology, sentinel node biopsy, and frozen section of node. *World J Surg* 2007; 31(6):1155-1163.
 24. Bedrosian I, Bedi D, Kuerer HM, Fornage BD, Harker L, Ross MI, Ames FC, Krishnamurthy S, Edeiken-Monroe BS, Meric F et al. Impact of clinicopathological factors on sensitivity of axillary ultrasonography in the detection of axillary nodal metastases in patients with breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2003; 10(9):1025-1030
 25. Kuenen-Boumeester V, Menke-Pluymers M, de Kanter AY, Obdeijn IM, Urich D, Van Der Kwast TH. Ultrasound-guided fine needle aspiration cytology of axillary lymph nodes in breast cancer patients. A preoperative staging procedure. *Eur J Cancer* 2003;39:170-174.
 26. Altomare V, Guerriero G, Carino R, Battista C, Primavera A, Altomare A, et al. Axillary lymph node echo-guided fine-needle aspiration cytology enables breast cancer patients to avoid a sentinel lymph node biopsy. Preliminary experience and a review of the literature. *Surg Today* 2007;37:735-739.
 27. Mainiero MB. Regional lymph node staging in breast cancer: the increasing role of imaging and ultrasound-guided axillary lymph node fine needle aspiration. *Radiol Clin North Am* 2010;48(5):989-997.
 28. Rautiainen S, Masarwah A, Sudah M, Sutela A, Pelkonen O, Joukainen S, et al. Axillary lymph node biopsy in newly diagnosed invasive breast cancer: comparative accuracy of fine needle aspiration biopsy versus core-needle biopsy. *Radiology* 2013;269:54-60.
 29. Bonnema J, van Geel AN, van Ooijen B, Mali SP, Tjiam SL, Henzen-Logmans SC, et al. Ultrasound-guided aspiration biopsy for detection of nonpalpable axillary node metastases in breast cancer patients: new diagnostic method. *World J Surg* 1997;21(3):270-274.

30. de Kanter AY, van Eijck CH, van Geel AN, Kruijt RH, Henzen SC, Paul MA, et al. Multicentre study of ultrasonographically guided axillary node biopsy in patients with breast cancer. *Br J Surg* 1999;86:1459-1462.
31. Bedi D, Krishnamurthy R, Krishnamurthy S, et al. Cortical morphologic features of axillary lymph nodes as a predictor of metastasis in breast cancer: in vitro sonographic study. *AJR* 2008; 191:646-652
32. Britton PD, Goud A, Godward S, et al. Use of ultrasound-guided axillary node core biopsy in staging of early breast cancer. *Eur Radiol* 2009;19(3) :561-569.
33. Rahbar H, Partridge SC, Javid SH and Lehman CD. Imaging Axillary Lymph Nodes in Patients with newly diagnosed breast cancer. *Curr Probl Diagn Radiol* 2012;41:149-158.
34. Stachs A, Gode K, Hartmann S, Stengel B, Nierling U, Dieterich M, Reimer T, Gerber B. Accuracy of axillary ultrasound in preoperative nodal staging of breast cancer-size of metastases as limiting factor. *SpringerPlus* 2013; 2: 350.
35. Sauer T, Karesen R. The value of preoperative ultrasound guided fine-needle aspiration cytology of radiologically suspicious axillary lymph nodes in breast cancer. *Cytojournal* 2014; 11: 26-30.
36. Feng Y, Huang R, He Y, Lu A, Fan Z, Fan T, Qi M, Wang X, Cao W, Wang X, Xie Y, Wang T, Li J, Ouyang T. Efficacy of physical examination, ultrasound, and ultrasound combined with fine-needle aspiration for axilla staging of primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2015; 149: 761-765
37. Houssami N, Ciatto S, Turner RM, Cody HS 3rd, Macaskill P. Preoperative ultrasound-guided needle biopsy of axillary nodes in invasive breast cancer: meta-analysis of its accuracy and utility in staging the axilla. *Ann Surg* 2011;254:243-251.
38. Rao R, Lilley L, Andrew V, Radford L, Ulissey M. Axillary staging by percutaneous biopsy: sensitivity of fine-needle aspiration versus core needle biopsy. *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 1170-1175.
39. Diepstraten SC, Sever AR, Buckens CF, Veldhuis WB, van Dalen T, van den Bosch MA, et al. Value of preoperative ultrasound-guided axillary lymph node biopsy for preventing completion axillary lymph node dissection in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Surg Oncol* 2014;21:51-59.
40. Cheng YS, Kuo SJ, Chen DR. Sparing sentinel node biopsy through axillary lymph node fine needle aspiration in primary breast cancer. *J Surg Oncol* 2013; 11: 296.
41. Swinson C, Ravichandran D, Nayagam M, Allen S. Ultrasound and fine needle aspiration cytology of the axilla in the pre-operative identification of axillary nodal involvement in breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 2009; 35(11):1152-1157.
42. Fung AD, Collins JA, Campassi C, Ioffe OB, Staats PN. Performance characteristics of ultrasound-guided fine-needle aspiration of axillary lymph nodes for metastatic breast cancer employing rapid on site evaluation of adequacy. *Cancer (Cancer Cytopathology)* 2014; 212: 282-291.

Allegato 1

Richiesta di esame agobiottico della mammella (NCB)

Esame n. _____

Cognome _____ Nome _____

Data di nascita _____

Indirizzo: Via _____ n. _____ Città _____

ULSS N. _____

T.S. Provenienza della richiesta _____SEDE Destra Sinistra

Quadrante _____

TIPOLOGIA DEL CAMPIONE Agobiopsia (n° _____, dimensioni _____)**TECNICA DI LOCALIZZAZIONE** Palpazione RX Guidata Ecografia Stereotassi**ASPETTO RADIOLOGICO** Microcalcificazioni Distorsione/Addensamento Opacità/Nodulo**CLASSIFICAZIONE MAMMOGRAFICA – ECOGRAFICA** R1 R2 R3 R4 R5 U1 U2 U3 U4 U5

NOTIZIE CLINICHE E STRUMENTALI: _____

Radiografia del campione allegata

DATA _____

MEDICO _____

Allegato 2

Richiesta di esame citologico della mammella (FNA)

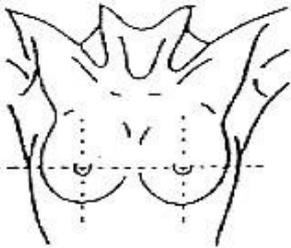
 PERCORSO CLINICO SCREENING MAMMOGRAFICO

Data _____

Cognome e nome _____

Data di nascita _____

Sede del Prelievo _____

Tecnica di localizzazione Palpatoria Guida ecografica Guida stereotassica**Tipologia del campione** Lesione solida Lesione cistica secreto scraping**Dati clinici** Lesione palpabile Lesione non palpabile sospetta non sospetta**Immagine radiologica** Opacità nodulare Microcalcificazioni Distorsione limiti netti aspecifiche limiti sfumati sospette spiculata**Immagine ecografica** Ipoecogena Anecogena Isoecogena limiti definiti limiti definiti limiti sfumati limiti sfumati cono d'ombra eco interne rinforzo di parete vegetazioni interne



Procedure diagnostiche del campione operatorio



Revisione a cura di:

- Giovanni Capitanio (U.O. Anatomia Patologica, Venezia)
- Quirino Piubello (U.O.C. Anatomia Patologica, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata Verona)
- Antonio Rizzo (U.O. Anatomia Patologica, Azienda ULSS n° 8 Asolo, coordinatore Gruppo regionale patologi screening mammografico)

1. Esame macroscopico e campionamento del materiale chirurgico della mammella

In questa sezione verranno descritte sinteticamente le procedure consigliate da protocolli nazionali e internazionali per l'esame macroscopico e il campionamento del materiale chirurgico.

Come premessa, va notato che il tipo di procedura chirurgica è ovviamente influenzato dalla diagnosi pre-operatoria su biopsia o esame citologico ovvero dalla diagnosi estemporanea condotta durante l'intervento stesso (esame estemporaneo intraoperatorio al congelatore). Se una diagnosi anatomopatologica non è ancora stata effettuata, l'intervento ha il significato di una "biopsia diagnostica a cielo aperto" e quindi la lesione dovrebbe essere rimossa con un minimo di tessuto sano circostante, per evitare inutili danni cosmetici in caso di benignità del processo patologico. Le Linee Guida Europee (LGE, 2006) in questi casi consigliano di pesare il tessuto inviato per esame istologico.

In caso di **lesioni non palpabili (microcalcificazioni) e su lesioni papillari l'esame estemporaneo al congelatore è sconsigliato**, in quanto nella maggior parte dei casi produrrà diagnosi non conclusive, pregiudicando la valutazione definitiva del pezzo. In sostituzione dell'esame al congelatore, è consigliata la radiografia del pezzo ancora integro, per documentare l'avvenuta exeresi del target radiologico ed eventualmente effettuare un immediato allargamento dell'intervento se la lesione si trova in prossimità dei margini.

Analogamente, l'esame intraoperatorio non deve essere effettuato, se non eccezionalmente, su lesioni inferiori a cm 1 e sui margini chirurgici; in quest'ultimo caso, la valutazione macroscopica da parte del patologo – associata alla radiografia del pezzo operatorio – può fornire indicazioni di massima al chirurgo sulla distanza del nodulo dai margini di escissione.

L'indagine estemporanea può essere effettuata nel caso di mastectomia nipple sparing per lo studio del margine retroareolare (vedi successivo paragrafo 3.8.1)

2. Invio del materiale chirurgico

Per garantire una corretta valutazione dei parametri morfologici, immunofenotipici e molecolari (indispensabili ai fini prognostici e terapeutici) e per eventuali prelievi di tessuto fresco (tissue banking) **è altamente raccomandabile che i campioni chirurgici giungano nel più breve tempo possibile (massimo 20-30 minuti) al Laboratorio di Anatomia Patologica (3).**

Per questo motivo diventa raccomandabile l'indicazione, da riportare nella richiesta per esame istologico e nel referto, del tempo di intervento chirurgico noto come "**tempo di ischemia calda**" perché i processi di acidosi e di degradazione enzimatica influiscono sulla preservazione dell'integrità delle molecole tessutali e sul profilo metabolico.

2.1 Fissazione in formalina

Qualora non sia possibile inviare rapidamente il materiale chirurgico presso l'Anatomia Patologica, esso va posto nel più breve tempo possibile (tassativamente **entro 30 minuti dall'asportazione**) in adeguato contenitore con quantità sufficiente di formalina tamponata al 10% (il campione chirurgico deve essere completamente immerso in una quantità di fissativo idoneo al volume del pezzo stesso). In questi casi, al fine di ottenere una idonea fissazione del tessuto tumorale, è auspicabile che il chirurgo, d'accordo con l'anatomopatologo, effettui una o più sezioni parallele, dello spessore massimo di 0,5 cm, dalla fascia al versante cutaneo e passanti per la lesione in modo da permettere una idonea fissazione della neoplasia, mantenendo comunque l'integrità del pezzo operatorio al fine di consentire un corretto orientamento ed una accurata valutazione dei margini di exeresi.

La corretta fissazione è un momento cruciale del percorso di processazione istologica: i diversi ope-

ratori coinvolti devono pertanto concordare tutti gli accorgimenti atti a garantire che essa risulti immediata, adeguata e completa, anche attraverso variazioni degli orari in cui vengono effettuati i prelievi e/o gli interventi chirurgici (3).

In alternativa alla formalina, il campione chirurgico può essere messo in un contenitore idoneo per il sottovuoto. La conservazione **sottovuoto** non deve durare più di 24-48 ore e il campione sottovuoto va mantenuto rigorosamente ad una temperatura di 4°C anche durante il trasporto.

2.2 Richiesta di esame istologico

Il pezzo operatorio deve giungere al Patologo con la relativa richiesta di esame istologico, se possibile specifica per la mammella e di facile compilazione per il Chirurgo, debitamente compilata in tutte le sue parti (vedi a titolo esemplificativo allegato 1).

In particolare, si raccomanda che alla richiesta risultino allegati o dettagliati:

- **precedenti referti radiologici (mammografia, ecografia, RMN)**
- **precedenti referti citologici o istologici**
- **eventuale radiogramma di controllo del pezzo asportato** (se possibile, con referto/giudizio del Radiologo circa la distanza del target dai margini)
- **tempo di intervento chirurgico**, noto come **“tempo di ischemia calda”** (orario di somministrazione dell’anestesia, di legatura dei vasi maggiori, di rimozione del pezzo chirurgico dal paziente). Analogamente è raccomandato indicare l’orario dell’effettuazione dei prelievi bioptici.
- **“tempo di ischemia fredda”** o tempo che intercorre tra l’escissione e la fissazione del tessuto

2.3 Integrità/Orientamento del campione

Per una completa valutazione dell’estensione della lesione e dello stato dei margini di resezione, è necessario che il Chirurgo invii un campione **unico, integro (non tagliato) e ben orientato mediante reperi (fili di sutura, clips, ecc)**.

In particolare, in assenza di cute, è fondamentale che i reperi vengano posizionati secondo i 3 piani spaziali, uno dei quali - se possibile - comprensivo della direzione capezzolo.

Soprattutto nelle escissioni terapeutiche, la procedura chirurgica standard prevede l’asportazione di tessuto mammario “a tutto spessore”, cioè dal sottocute alla fascia profonda: qualora ciò non avvenga, è indispensabile che tale informazione sia trasmessa al Patologo.

Nel caso siano stati asportati più frammenti di tessuto mammario, andranno specificati i rapporti topografici reciproci e l’orientamento dei diversi campioni nel tentativo di ricostruire le superfici “finali” di sezione. È evidente che in presenza di campioni multipli o di campione singolo giunto già sezionato, lo studio dei margini potrà risultare inaccurato o anche impossibile; allo stesso modo le dimensioni (T) e la uni o plurifocalità ad es. di un carcinoma invasivo non potranno essere definite qualora lo stesso compaia in più di un campione.

3. Esame macroscopico del campione chirurgico

Lo scopo fondamentale dell’esame macroscopico e del campionamento dei campioni chirurgici è l’identificazione e il conseguente esame istologico della lesione clinica o radiologica per la quale si è giunti a intervento. Entrambi costituiscono una tappa essenziale del referto istopatologico: un’analisi macroscopica non corretta e un campionamento errato o deficitario possono condizionare in modo cruciale la diagnosi finale, con inevitabili e potenzialmente gravi ripercussioni di ordine prognostico e terapeutico, oltre che medico-legale. L’esame macroscopico si compone di varie fasi:

3.1 Esame “esterno” del campione

Il Patologo dovrà descrivere le seguenti caratteristiche:

- le tre dimensioni del campione
- le due dimensioni della cute
- il peso (opzionale)
- la presenza di reperi chirurgici per l'orientamento
- la consistenza, ovvero la presenza di lesioni palpabili

3.2 Marcatura dei margini chirurgici con inchiostro di china o tempere acriliche

I campioni – in particolare quelli da chirurgia conservativa (biopsie diagnostiche, nodulectomie, ampie escisioni, ecc) – **andranno marcati con inchiostro di china o tempere di diversi colori per la successiva corretta identificazione e valutazione dei margini di exeresi** (vedi Allegato 2); per i campioni da mastectomia, la marcatura del pezzo operatorio può essere utile in caso di vicinanza macroscopica della lesione a uno dei margini (ad es. fascia profonda, muscolo pettorale adeso) o nel caso di forme radiologicamente estese di DCIS.

3.3 Sezionamento del campione e suo esame “interno”

I campioni di grandi dimensioni (orientativamente di asse principale maggiore di 5 cm) **andranno sezionati per consentire un'adeguata penetrazione del fissativo**, senza alterarne la forma o pregiudicarne l'orientamento (vedi Allegato 3).

Il Patologo esaminerà poi ogni sezione per valutare la presenza di lesioni e le caratteristiche del tessuto. In particolare, andranno annotate nella descrizione:

- numero, dimensioni e posizione (in relazione ai margini, se indicati da reperi) delle lesioni individuate. Opzionale: descrivere la distanza della lesione dalla cute e dal margine profondo/fascia o muscolo pettorale (in caso di mastectomia) o dal margine di exeresi più vicino (in caso di chirurgia conservativa).
- aspetto della/e lesione/i: consistenza, colore, margini arrotondati/sfrangiati, eventuale riscontro macroscopico di necrosi, emorragia, calcificazioni
- Nel caso di pregressa procedura agobiottica va possibilmente identificato e descritto il sito biottico
- Utile, quando possibile, fotografare ogni sezione e le relative lesioni

3.4 Esame radiologico del materiale chirurgico

Qualora il campione sia di dimensioni tali da non poter essere incluso in toto, è altamente raccomandabile (in particolare, per lesioni non palpabili/calcificazioni) eseguire o avere a disposizione i radiogrammi delle singole fette macro ottenute dopo sezionamento, onde poter campionare selettivamente le aree corrispondenti alle anomalie radiologiche. Alternativamente, per lesioni non palpabili/calcificazioni, è raccomandabile che il pezzo giunga posizionato su griglia radiologica, con radiogramma accluso, per poter effettuare i prelievi in corrispondenza delle aree di interesse radiologico.

3.5 Campionamento

La tecnica di campionamento e il numero di prelievi/inclusioni necessari nel singolo caso varieranno necessariamente in funzione di:

- dimensioni del campione chirurgico
- estensione e caratteristiche clinico-radiologiche del target: lesione palpabile (opacità, addensamento, distorsione) vs lesione non palpabile/calcificazioni

- modalità di organizzazione e disponibilità di risorse dei diversi laboratori.

È indispensabile che, a prescindere dalle variabili intrinseche in ogni procedura di campionamento, vengano raggiunti - come obiettivi minimi assoluti - **una accurata misura del diametro massimo della lesione e un dettagliato esame dello stato e - quando possibile - della distanza della lesione dai margini chirurgici.**

3.6 Considerazioni generali

Per campioni di dimensioni contenute (indicativamente fino a 5-7 cm di asse maggiore) o in presenza di lesioni non palpabili/non visibili macroscopicamente (ad es. calcificazioni) è sempre preferibile **l'inclusione totale in blocchi ordinari** mediante prelievi sequenziali/seriati **o, alternativamente, in "large blocks" (macrosezioni)** (vedi allegato 3)

Per campioni di maggiori dimensioni, vedi paragrafo successivo (raccomandazioni specifiche)

I margini chirurgici possono essere campionati e valutati con varie modalità (vedi allegato 3):

- Prelievi perpendicolari in blocchi ordinari
- Prelievi perpendicolari in "large blocks" (macrosezioni)
- Prelievi "shaved" (peeling)
- Biopsie separate della cavità/letto chirurgico

In caso di lesioni multiple macroscopicamente sospette, ciascuna di esse andrà campionata; è buona norma campionare anche il tessuto apparentemente sano interposto per verificare istologicamente che le lesioni siano effettivamente separate.

Quando presente, il capezzolo deve essere incluso in toto mediante taglio/i longitudinale/i perpendicolare/i alla cute, più il prelievo del tessuto alla base del capezzolo, mediante sezione parallela al piano cutaneo, per valutare la regione dei dotti galattofori.

Campionamento dei linfonodi ascellari: tutti i linfonodi devono essere prelevati e inclusi in toto per esame istologico. Il loro campionamento ottimale è descritto nell'allegato 4.

3.7 Raccomandazioni specifiche in relazione ai differenti tipi di campione chirurgico

3.7.1 Nodulectomie o Biopsie chirurgiche "diagnostiche" o ampie Escissioni Terapeutiche/Quadrantectomie (chirurgia mammaria conservativa)

3.7.1.1 Come già indicato (vedi sopra), quando le dimensioni del pezzo asportato lo consentono o in presenza di lesioni non palpabili/non visibili macroscopicamente (ad es. calcificazioni) la procedura ottimale è **l'inclusione in toto** in blocchi ordinari sequenziali o in "large blocks" (macrosezioni). Qualora ciò non sia possibile, è altamente raccomandabile eseguire una **radiografia del pezzo** e/o delle fette macro ottenute dopo sezionamento ed effettuare un **campionamento selettivo delle aree corrispondenti alle anomalie mammografiche**. Per una corretta ricostruzione spaziale della lesione e valutazione della sua estensione, il campionamento delle aree selezionate dovrà comunque essere condotto con tecnica in blocchi ordinari sequenziali/seriati consecutivi o in large blocks (macrosezioni). Soprattutto nei casi con diagnosi preoperatoria di DCIS o con sospetto di DCIS (calcificazioni) – in cui le dimensioni radiologiche spesso "sottostimano" la reale estensione della lesione – è opportuno che il campionamento comprenda le estremità (ad es. prossimale e distale) del target radiologico ma anche il tessuto apparentemente sano circostante; per un'utile correlazione radiologia-istologia i siti di campionamento potranno essere riportati sulla lastra mediante pennarello o altri marker. Per quanto concerne la valutazione dei margini di exeresi nei casi sottoposti a procedura selettiva, il campionamento dovrà comprendere – come requisito minimo assoluto – il punto di minor distanza tra anomalia mammografica e margine di resezione. Ulteriori campionamenti delle superfici di exeresi – **in particolare del margine areolare/direzione capezzolo**, anche quando non in vicinanza con l'anomalia mammografica - sono fortemente raccomandabili. In caso di mancato riscontro delle microcalcificazioni al momento dell'esame microscopico, i blocchi paraffinati potranno essere radio-

grafati per accertarsi che microcalcificazioni non siano presenti nello spessore di tessuto incluso, non raggiunto dalla sezione esaminata microscopicamente. In caso di lesioni non palpabili/non visibili macroscopicamente (in particolare DCIS) qualora il campionamento sia effettuato con tecnica non sequenziale o senza macrosezioni, la valutazione dell'estensione tumorale potrà essere solo approssimativa, tenendo conto del numero di blocchi/inclusioni coinvolti.

- 3.7.1.2 In caso di lesioni palpabili o visibili macroscopicamente, il campionamento potrà essere mirato ed effettuato mediante prelievi in blocchi radiali ("radial block") secondo i piani ortogonali dello spazio (superiore-inferiore, mediale-laterale, superficiale-profondo). In caso di piccole escissioni sarà possibile comprendere la lesione e i margini di resezione in un'unica inclusione; per exeresi più ampie sarà necessario utilizzare più inclusioni. Per ogni neoplasia mammaria, quando le dimensioni lo consentono, vanno ottenute almeno 3 inclusioni.
- 3.7.1.3 Come già specificato (paragrafo 2.3), se vengono inviati più campioni chirurgici separati, le dimensioni reali della/e lesione/i potranno essere ricostruite solo se i pezzi sono tra loro orientati reciprocamente. In ogni caso, è buona norma misurare la/e lesione/i in ogni pezzo giunto separato.
- 3.7.1.4 In caso di interventi conservativi post-agobiopsia o post-biopsia chirurgica diagnostica, qualora non si proceda all'inclusione totale, **è indispensabile campionare in modo mirato (preferibilmente sempre con tecnica in blocchi ordinari sequenziali o macrosezioni) la zona del pregresso sito bioptico ed il tessuto circostante**. Ulteriori prelievi andranno effettuati sul parenchima a distanza e sui margini di escissione.

3.7.2 Allargamenti (Ri-Escissioni)

- 3.7.2.1 Il pezzo chirurgico di un allargamento o riescissione per margini positivi, deve essere orientato per permettere la campionatura mirata in relazione al/i margine/i riscontrato/i precedentemente positivo/i.
- 3.7.2.2 Nel caso si rilevi ancora tumore nel tessuto dell'allargamento la ricostruzione delle reali dimensioni della lesione è difficile. Tuttavia, a tal fine è buona norma campionare separatamente il tessuto adiacente alla cavità chirurgica dell'escissione precedente e quello a distanza dalla cavità. In tal modo sarà possibile almeno una ricostruzione parziale delle dimensioni e si potrà valutare se si tratta di lesione singola o multifocale.

3.8 Mastectomia

- A. Se la mammella giunge separata dal cavo ascellare deve essere orientata dal chirurgo, per esempio ponendo un reperi sul versante ascellare.
- B. Come già specificato (paragrafo 3.3), i pezzi chirurgici di mastectomia non devono essere posti a fissare interi, poiché la scarsa penetrazione della formalina pregiudicherà la valutazione dell'istotipo tumorale e, soprattutto, il ritardo di fissazione influirà sull'indice mitotico (che andrà valutato istologicamente) e sullo smascheramento antigenico in relazione alle indagini immunoistochimiche. La procedura per il sezionamento dei campioni da mastectomia è descritta nell'allegato 3.
- C. Campionamento. Ogni lesione neoplastica, quando le dimensioni lo consentono, va campionata con almeno 3 inclusioni, badando a comprendere almeno in alcuni prelievi la parte periferica del tumore (ove andrà valutato l'indice mitotico) e il tessuto sano limitrofo. Il parenchima circostante il tumore e quello degli altri quadranti vanno sezionati, esaminati e descritti, campionando ogni lesione macroscopicamente sospetta. Buona norma effettuare alcuni prelievi random, su ogni quadrante, anche in caso di tessuto apparentemente indenne. Il capezzolo deve essere incluso in toto.
- D. Come per gli interventi conservativi di grandi dimensioni (vedi sopra), in caso di mastectomie effettuate

per lesioni non palpabili/non visibili (per lo più DCIS) si raccomanda il campionamento selettivo delle aree corrispondenti alle anomalie mammografiche (in genere calcificazioni) rilevate ai radiogrammi delle fette da sezionamento macro. Qualora ciò non sia possibile, è indispensabile avere a disposizione almeno i referti delle precedenti indagini radiologiche, sulla scorta dei quali potranno essere selezionate le zone topografiche su cui concentrare il campionamento.

- E. In caso di vicinanza macroscopica della lesione a uno dei margini (ad es. fascia profonda/muscolo pettorale adeso), è consigliabile marcare e campionare tale margine.

3.8.1 Mastectomia “Nipple Sparing”

- A. Per l'esame istologico del parenchima retroareolare (intraoperatorio e/o definitivo), è necessario che il chirurgo invii separatamente il frammento discoidale prelevato direttamente dal pezzo operatorio, con diametro corrispondente al diametro dell'areola. Il chirurgo deve inviare il frammento discoidale (di spessore 0,5 - 1 cm) marcandolo sul versante verso il capezzolo (vero margine) con filo-repere o con clip metallica. L'esame del parenchima retroareolare può essere eseguito durante l'intervento chirurgico come esame intraoperatorio (esame estemporaneo al congelatore) oppure successivamente all'intervento chirurgico come esame definitivo.
- B. Modalità di valutazione del frammento di parenchima retroareolare. Il frammento discoidale, in genere unico, viene misurato (diametro massimo e spessore) e il versante verso il capezzolo (“vero margine”) **deve essere** chinato. La valutazione può essere eseguita mediante:
- l'esame di sezioni coronali (perpendicolari all'asse del capezzolo) ottenute sezionando il versante verso la mammella del frammento discoidale “a piatto” (con recupero del vero margine mediante ulteriori sezioni sino quasi ad esaurimento del frammento);
 - l'esame di sezioni sagittali ottenute dopo aver sezionato sagittalmente (dal versante verso il capezzolo a quello mammario, parallelamente all'asse del capezzolo) l'intero frammento discoidale in fette di 3-5 mm di spessore, interamente incluse. Si possono prevedere 3 sezioni al congelatore a livelli di 200-300 micron e una ulteriore sezione al definitivo del frammento/i precedentemente valutato/i oppure 4 sezioni ogni 200-300 micron per l'esame definitivo.

4. Esame microscopico e diagnosi finale

Nell'esecuzione dell'esame istologico che conduce alla diagnosi finale si suggerisce di seguire la classificazione delle lesioni mammarie fornita dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (2012).

Check lists per diagnosi di routine

Al fine di standardizzare il più possibile il referto anatomopatologico di lesioni mammarie è altamente consigliabile l'uso di check lists, che aiutano a non tralasciare la trascrizione nel referto di qualche dato utile alla stadiazione, alla terapia o anche solo interessante ai fini di un futuro studio.

In particolare, si raccomanda di fare riferimento alla “reporting form” e relative note esplicative delle Linee Guida Europee (allegati 5 e 6)

Il referto microscopico

In sintesi il referto microscopico dovrà contenere:

- Diagnosi della patologia principale, comprensiva di:
 - istotipo tumorale sec. WHO 2012
 - grado di differenziazione (sec. Elston-Ellis per forme invasive, sec. WHO 2012 per forme duttali in situ)

- valutazione dimensione/estensione della neoplasia e eventuale estensione tumorale alla cute o altri organi vicini
- valutazione invasione vascolare
- Presenza di microcalcificazioni e conformità delle stesse (numero, distribuzione) con quanto descritto nell'eventuale mammografia o radiografia del pezzo chirurgico
- Descrizione delle patologie benigne associate
- Valutazione immunoistochimica dei recettori ormonali, indice replicativo e stato di HER2 in ogni carcinoma invasivo, specificando il clone utilizzato (per le forme duttali situ necessaria e sufficiente la sola determinazione dei recettori ormonali)
- Valutazione dei margini di resezione (in escissioni terapeutiche) con misurazione - quando possibile - della distanza della lesione dai margini, sia per la componente in situ che per quella invasiva.
- Valutazione dei linfonodi, se presenti, compreso il numero totale di linfonodi esaminati.

Parametro opzionale di refertazione è da considerarsi allo stato attuale la valutazione dell'Infiltrato Linfocitario Tumorale (TIL).

Studi retrospettivi e prospettici hanno dimostrato come la presenza di TIL nel carcinoma della mammella abbia un importante valore prognostico e predittivo in modo particolare nei carcinomi "tripoli-negativi" (TNBC) e "HER2-positivi" e come nelle biopsie, prima della terapia neoadiuvante, la presenza di TIL indichi una maggiore probabilità di risposta patologica completa (pCR) e di sopravvivenza libera da malattia (DFS).

Per questo motivo nel 2014 un gruppo multidisciplinare hanno costituito il "TIL working group 2014", stabilendo di valutare nei carcinomi della mammella il TIL stromale (infiltrato linfocitario non a contatto delle cellule neoplastiche) perché meglio riproducibile e più informativo rispetto al TIL intratumorale (a contatto)(13). Secondo la definizione di Denkert et al. (12) il TIL stromale corrisponde alla percentuale di area stromale con infiltrato linfocitario sul totale dell'area stromale (es: TIL 50% = 50% di area stromale occupata da TIL).

Le raccomandazioni metodologiche per valutare il TIL prevedono l'osservazione al microscopio a 200 – 400 X di una sezione di tessuto neoplastico di 4 micron di spessore e colorata con E.E., da agobiopsia o da pezzo chirurgico, fissato in formalina ed incluso in paraffina. Si devono valutare esclusivamente i linfociti e le plasmacellule nello stroma tumorale mentre devono essere esclusi i granulociti neutrofilii, i macrofagi, le cellule dendritiche e le aree di necrosi.

La valutazione del TIL prevede uno score suddiviso in 3 gruppi: 0-10% (basso), 10-40% (intermedio), 40-90% (alto). Per definire meglio lo score intermedio (10-40%) viene suggerito di valutare più aree a più forte ingrandimento (12,13).

5. Bibliografia

1. Wells C.A. Quality assurance guidelines for pathology. In: European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis, Fourth Edition. 2006; 221-311
2. Requisiti minimi e standard di refertazione per carcinoma della mammella, SIAPEC Piemonte - Rete Oncologica, 2009
3. Ministero della Salute: Linee Guida: Tracciabilità, raccolta, trasporto, conservazione e archiviazione di cellule e tessuti per indagini diagnostiche di Anatomia Patologica. Ministero della Salute. Consiglio superiore di Sanità. Maggio 2015. http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2369_allegato.pdf
4. Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast, College of American Pathologist (CAP) 2016

5. Protocollo diagnostico terapeutico dello screening per la diagnosi precoce del tumore della mammella della regione Emilia Romagna, 4a Ed, 2012
6. Elston CW, Ellis IO Pathological prognostic factors in breast cancer: experience from a large study with a long- term follow-up. *Histopathol* 1991; 19: 403-410
7. Sobin L, Gospodarowicz M, Wittekind Ch (eds). UICC TNM classification of malignant tumours, 7th edition. John Wiley and Sons Inc., New York, 2010
8. World Health Organization. Classification of tumours of the breast (Lyon, France: IARC press) 2012.
9. Pathology reporting of breast disease. NHSBSP Pub. N° 58. January 2005.
10. West NR et al.: Tumor-Infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Research* 2011, 13: R126
11. Dieci M.V. et al: Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. *Annals of Oncology* 25: 611-618, 2014
12. Denkert C. et al: Standardized evaluation of Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TILs) in Breast Cancer for daily clinical and research practice or clinical trial setting. A tutorial prepared by the International Working Group for TILs in Breast Cancer 2014. Supplementary Material S2, *Annals of Oncology* online.
13. Salgado R. et al: The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Annals of Oncology* 26: 259-271, 2015

ALLEGATO 1

Richiesta esame istologico campione operatorio

Data, _____

RICHIESTA ESAME ISTOLOGICO MAMMELLA

NOSOGRAFICA/
Dati anagrafici

AMBULATORIALE

 DIVISIONALE L.P.

RICOVERO

 ORDINARIO D.H.

MATERIALE IN ESAME

 ESAME STANDARD ESAME ESTEMPORANEODATI ANATOMIA
PATOLOGICA

A _____
 B _____
 C _____
 D _____
 E _____

REPERI:

- Filo singolo corto (1 clip): **superiore**
 Filo doppio corto (2 clip): **inferiore**
 Filo singolo lungo (3 clip): **mediale**
 Filo doppio lungo: **superficiale**

REFERTI ALLEGATI:

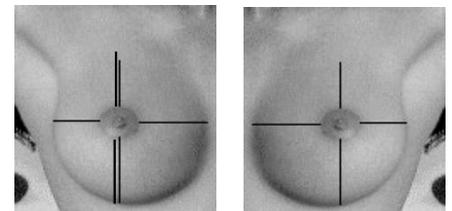
- Esame senologico
 FNAB, istologia precedente
 Mammotome

 ALLEGATO RX PEZZO OPERATORIO

TIPO INTERVENTO

L'intervento è iniziato alle ore _____ L'asportazione del pezzo operatorio (fine ischemia calda/inizio ischemia fredda) è terminata alle ore _____

- BIOPSIA INCISIONALE
 ENUCLEORESEZ./BIOPSIA ESCISSORIALE
 LUMPECTOMY
 QUADRANTECTOMIA
 QUADRANTECT. + LINFOADENECT.
 MASTECTOMIA SEMPLICE
 MASTECTOMIA RADICALE CON LINFOADENECTOMIA
 LINFOADENECT. ASCELLARE
 LINFONODO SENTINELLA



DESTRA

SINISTRA

Dopo l'asportazione, il materiale è stato posto in formalina neutra tamponata al 10% (fine ischemia fredda)/è stato inviato in Anatomia Patologica, ove è giunto alle ore _____

NOTIZIE CLINICHE AGGIUNTIVE _____

MEDICO RICHIEDENTE

FIRMA

ALLEGATO 2

Marcatura dei margini e macro predefinita

MARCATURA DEI MARGINI CHIRURGICI

Per la marcatura dei margini chirurgici è bene asciugare accuratamente il pezzo dall'eventuale fissativo in cui era posto con carta assorbente/carta bibula. Successivamente, con un pennello, si dipingono con l'inchiostro di china i margini e infine si immerge il pezzo in liquido di Bouin o acido acetico al 10% per pochi secondi, al fine di fissare definitivamente l'inchiostro. Si asciuga di nuovo con carta assorbente per verificare che l'inchiostro rimanga attaccato sulla superficie del pezzo operatorio.

Nella tecnica di marcatura dei margini con tempere acriliche si usano colori diversi per i vari margini. Utile una standardizzazione dei diversi colori in rapporto ai vari margini all'interno del singolo Laboratorio di Anatomia Patologica, come indicato nella sottostante MACRO predefinita. I colori si stendono con un pennello coprendo le superfici indicate dai reperi e avendo cura di creare margini netti tra i colori adiacenti. Si lascia asciugare all'aria per alcune ore o in stufa a 60° per 1-2 ore.

Si potrà quindi procedere al sezionamento del pezzo.

MACRO PREDEFINITA PER BIOPSIA ORIENTATA

Biopsia mammaria giunta fissata in formalina con l'indicazione di "mammella _____, Q _____" delle dimensioni di cm _____ centrata da filo di reperi metallico ed orientata da fili di reperi colorati ad indicare rispettivamente:

- il margine superiore (1 filo lungo)
- il margine inferiore (2 fili lunghi)
- il margine laterale (1 filo corto)
- il margine mediale (2 fili blu corti)

Si colorano pertanto di:

- colore blu il margine inferiore e laterale
- colore verde il margine superficiale
- colore rosso il margine superiore e mediale
- colore nero il margine profondo

In sezione

Il pezzo operatorio viene incluso in toto con n. _____ prelievi seriati in senso cranio-caudale indicando con:

A) il margine _____, da B) a _____) sezioni intere successive comprensive dei margini _____
_____) il margine _____

ALLEGATO 3

Campionamento pezzo operatorio

SEZIONAMENTO DEL PEZZO/CAMPIONAMENTO e STUDIO DEI MARGINI

I pezzi di grandi dimensioni (orientativamente di asse principale maggiore di 5 cm) vanno sezionati per consentire un'adeguata penetrazione del fissativo. Dopo adeguata permanenza (24 ore) in formalina, si procede al corretto campionamento della/e lesione/i e dei margini di exeresi.

Le modalità di sezionamento possono variare in relazione alle metodologie utilizzate nei diversi Laboratori. Per campioni da biopsia diagnostica e da chirurgia terapeutica conservativa, si effettuano **sezioni seriate/sequenziali** a intervallo di 3-5 mm circa, condotte perpendicolarmente a uno degli assi spaziali (ad es. mediale-laterale) o lungo la direzione capezzolo-periferia: questo porterà successivamente, a un campionamento completo o selettivo - a seconda delle dimensioni del pezzo e delle caratteristiche clinico-radiologiche della/e lesione/i - **in blocchi ordinari perpendicolari**, che per ciascuna sezione (livello) sequenziale potranno essere singoli o multipli in relazione alla grandezza del campione. Alternativamente, è possibile utilizzare la tecnica in **large blocks (macrosezioni)**, che consiste nell'allestire blocchi in paraffina e vetrini istologici successivi includendo grandi porzioni di tessuto mammario. Le macrosezioni consentono di esaminare ampie parti di tessuto, conservando inalterati i rapporti topografici esistenti tra le lesioni e le strutture anatomiche o tra differenti lesioni.

Per quanto concerne i margini di exeresi, entrambe le procedure permettono una loro corretta valutazione, con possibilità di misurare con precisione la distanza tra superficie di escissione e lesione. Usando la tecnica in large blocks si ha il vantaggio di indagare i margini nella loro interezza almeno per il piano preso in studio, di poter definire più agevolmente le dimensioni della lesione (in particolare, DCIS) e di allestire un minor numero di inclusioni.

Ulteriori possibili metodiche per lo studio dei margini sono date da:

- **Tecnica dei margini shaved (peeling)**: dopo aver marcato i margini con inchiostro di china, si eseguono sezioni parallele/tangenziali al margine e si includono dal lato del margine stesso (lato marcato con inchiostro di china). Questa modalità permette di esaminare tutta la superficie dei margini con un numero di inclusioni minore rispetto alla modalità in blocchi ordinari, ma presenta lo svantaggio di non permettere una reale valutazione del margine in quanto il blocco paraffinato deve comunque essere "sgrossato" prima di ottenere una sezione valutabile e quindi parte del margine viene persa. Inoltre, e soprattutto, con questo metodo non è possibile misurare la distanza tra il margine e la lesione.
- **Biopsie della cavità/letto chirurgico, inviate separatamente dal Chirurgo**

Per il sezionamento dei pezzi da mastectomia, la mammella va disposta con il piano profondo rivolto verso l'alto. Si effettuano quindi sezioni parallele in senso medio-laterale a intervallo di 5-10 mm e perpendicolari alla cute, in modo che il taglio interessi il parenchima mammario a tutto spessore, lasciando integra la cute. Con questo metodo sarà possibile fissare l'intera mammella in un unico contenitore, avendo cura di inserire nei tagli tra una fetta e l'altra pochi fogli di garza che aiuteranno la formalina a penetrare, impedendo alle fette di tessuto di collabire.

Il capezzolo deve essere incluso in toto in due o più frammenti mediante taglio/i longitudinale/i, perpendicolare/i alla cute, più il prelievo di una "rondella" del tessuto alla base del capezzolo, mediante due sezioni parallele al piano cutaneo, che consentiranno di valutare la regione dei dotti galattofori.

ALLEGATO 4

Campionamento linfonodi ascellari

CAMPIONAMENTO DEI LINFONODI ASCELLARI

Se il tessuto adiposo del cavo ascellare viene inviato con reperi per la suddivisione in livelli, questi andranno rispettati nel campionamento. È comunque buona norma che il chirurgo invii separatamente o chiaramente identificati da reperi i linfonodi dell'apice ascellare.

Al momento dell'esame macroscopico del pezzo chirurgico, andranno ricercati tutti i linfonodi. I linfonodi, per facilitare la ricerca, vanno isolati dal grasso dopo fissazione avvenuta.

È comunque importante cercare di eliminare il più possibile il grasso che circonda il linfonodo, al fine di facilitarne la processazione (disidratazione in alcool e successivamente all'inclusione, taglio della sezione).

Ogni linfonodo deve essere esaminato in toto.

Quindi, si potranno includere nel medesimo blocco linfonodi di dimensioni inferiori a 0.5 cm (da due a massimo sei linfonodi, avendo cura di mettere nello stesso blocco linfonodi di dimensioni analoghe, per facilitarne il taglio), mentre linfonodi di dimensioni superiori andranno divisi in 2 o più parti (preferibilmente con sezioni lungo l'asse minore che permettono la visualizzazione di una maggiore superficie del seno marginale, punto di arrivo delle metastasi) e inclusi separatamente. La metodica di inclusione (più linfonodi o linfonodo singolo in più parti) deve essere descritta in modo da essere ricostruibile al momento dell'esame microscopico. Dei linfonodi francamente metastatici se ne può includere anche solo una metà.

ALLEGATO 5

Check list refertazione

SCHEMA PATOLOGICA PER LO SCREENING MAMMOGRAFICO

Cognome _____ Nome _____ Data di nascita _____
 Screening n. _____ Ospedale _____ Lato DESTRO SINISTRO

PATOLOGO _____ Data del referto _____ Referto n. _____

Calcificazioni istologiche Assenti Benigne Maligne Entrambi i tipi
 Esaminata radiografia del campione? Si No
 Alterazione mammografica presente nel campione Si No Incerto

Tipo di campione Biopsia escissionale (lesione non palpabile)
 Biopsia escissionale (lesione palpabile)
 Ampia escissione/Quadrantectomia
 Mastectomia
 Escissione post-trattamento

Peso del campione _____ g
 Procedura linfonodale _____
 LN sentinella _____

Dimensioni _____ mm x mm x mm
 Non linfonodi _____
 Svuotamento ascellare _____

LESIONI BENIGNE PRESENTI

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Lesione sclerosante complessa/cicatrice sclero-elastotica | <input type="checkbox"/> Papilloma solitario |
| <input type="checkbox"/> Mastite periduttale/ectasia duttale | <input type="checkbox"/> Papillomi multipli |
| <input type="checkbox"/> Fibroadenoma | <input type="checkbox"/> Adenosi sclerosante |
| <input type="checkbox"/> Modificazioni a cellule colonnari | <input type="checkbox"/> Malattia fibrocistica |
| <input type="checkbox"/> Cisti solitaria | <input type="checkbox"/> Altro (specificare) _____ |

PROLIFERAZIONE EPITELIALE

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> Assente | <input type="checkbox"/> Presente senza atipia |
| <input type="checkbox"/> Presente con atipia duttale | <input type="checkbox"/> Presente con neoplasia lobulare |
| <input type="checkbox"/> Modificazioni a cellule colonnari con atipia (atipia piatta) | |

LESIONI MALIGNI NON INVASIVE

- | | |
|----------------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> Assente | <input type="checkbox"/> Duttale (DCIS) - Grado sec. WHO 2012: |
| <input type="checkbox"/> alto | <input type="checkbox"/> intermedio <input type="checkbox"/> basso <input type="checkbox"/> non definibile |

Modello/i di crescita _____ Tipo di cellula _____

Estensione (solo duttale) _____ mm

- Malattia di Paget
 Lobulare (LCIS)

MICROINVASIONE Assente Presente Possibile

LESIONI MALIGNHE INVASIVE Assente

ISTOTIPO:

- Duttale/non altrimenti specificato (NAS) Carcinoma tubulare
 Carcinoma mucinoso Carcinoma lobulare
 Carcinoma midollare Misto (segnalare gli istotipi presenti)
 Non classificabile
 Altro carcinoma primitivo (specificare) _____
 Altro tumore maligno (specificare) _____

DIAMETRO MASSIMO DEL TUMORE INVASIVO _____ mm

DIMENSIONE COMPLESSIVA DEL TUMORE (compreso CDIS > 1 mm oltre la componente invasiva)
 _____ mm

GRADO I II III Non classificabile

ESTENSIONE del TUMORE Forma singola/localizzata Tumori multipli Non classificabile

INVASIONE VASCOLARE (ematica o linfatica) Presente Non rilevata

LINFONODO SENTINELLA: neg _____ Macromet _____ Micromet _____
 ITC _____

PRESENZA DI LINFONODI ASCELLARI Sì No

- Positivi, numero _____ Totale, numero _____
 Metastasi
 Micrometastasi
 Cellule tumorali isolate

ALTRI LINFONODI PRESENTI Sì No

- Positivi, numero _____ Totale, numero _____
 Sede degli altri linfonodi _____

MARGINI DI ESCISSIONE

- Non definibile
 Raggiunge il margine
 non raggiunge il margine (punto più vicino _____ mm)

SCHEDA DI REFERTAZIONE

Parenchima mammario con carcinoma

- duttale in situ con microinvasione
- lobulare in situ con microinvasione
- duttale in situ esteso alla cute del capezzolo (morbo di Paget) con microinvasione
- infiltrante di tipo non speciale (duttale)
- lobulare infiltrante
- infiltrante misto, di tipo non speciale e lobulare
- mucinoso infiltrante
- infiltrante con caratteristiche midollari
- con differenziazione apocrina
- papillare infiltrante
- micropapillare infiltrante
- tubulare infiltrante
- cribriforme infiltrante
- metaplastico
- adenoidocistico
- mucoepidermoide
- * secondo WHO 2012

Caratteristiche fenotipiche ed estensione:

Dimensioni tumorali DELLA NEOPLASIA INFILTRANTE:

- microinvasivo (≤ 1 mm)
- mm

DIMENSIONI TUMORALI TOTALI (Componente invasiva + componente in situ): mm

GRADO ISTOLOGICO (SCORE DI NOTTINGHAM)

Differenziazione ghiandolare (acinare)/tubulare

- Score 1: >75% dell'area tumorale
- Score 2: dal 10% al 75% dell'area tumorale
- Score 3: < 10% dell'area tumorale
- Presente solo microinvasione (non gradata)

Pleomorfismo nucleare

- Score 1: nuclei piccoli con lieve aumento delle dimensioni rispetto alle normali cellule epiteliali della mammella
- Score 2: cellule più grandi del normale con nuclei vescicolosi, nucleoli visibili, e moderata variabilità sia in forma che dimensioni
- Score 3: nuclei vescicolosi, spesso con nucleoli prominenti, che esibiscono marcate variazioni in forma e dimensioni, occasionalmente con forme molto grandi e bizzarre
- Presente solo microinvasione (non gradato)

Indice mitotico

- Numero di mitosi per 10 HPF: (vedi pag 70-71)
- Presente solo microinvasione (non gradato)

Grado complessivo

- Grado 1: score 3,4 o 5
- Grado 2: score 6 o 7
- Grado 3: score 8 o 9
- Presente solo microinvasione (non gradato)

Score mitosi sec CAP

- Score 1 (≤ 3 mitosi per mm^2)
- Score 2 (4-7 mitosi per mm^2)
- Score 3 (≥ 8 mitosi per mm^2)
- Presente solo microinvasione (non gradato)

Focalità tumorale

- Focolaio singolo
- Focolai multipli

Carcinoma duttale in situ (CDIS) PERITUMORALE

- Assente
- Presente
- Focale, occupa meno del 25% delle dimensioni totali della lesione
- Esteso, occupa circa il 50% delle dimensioni della lesione
- Esteso, occupa più del 75% delle dimensioni della lesione
- Dimensioni in mm _____
- Numero di blocchetti di inclusione con CDIS: _____
- Numero di blocchetti di inclusione esaminati: _____

Tipo di architettura

- Comedonico
- Cribriforme
- "Clinging"
- Micropapillare
- Papillare
- Solido

Grado nucleare

- Grado 1 (basso)
- Grado 2 (intermedio)
- Grado 3 (alto)

Necrosi

- Assente
- Presente, focale (focolai piccoli o singole cellule)
- Presente, centrale (comedonica)

Carcinoma lobulare in situ (CLIS) PERITUMORALE

- Assente
- Presente

Microcalcificazioni

- Non identificate
- Presenti nel CDIS
- Presenti nel carcinoma infiltrante
- Endoluminali
- Stromali
- Presenti nel tessuto non neoplastico
- Presenti sia nel carcinoma che nel tessuto non neoplastico

Estensione della neoplasia**Cute**

- Infiltrazione del derma o dell'epidermide senza ulcerazione
- Infiltrazione del derma o dell'epidermide con ulcerazione
- Focolai satelliti
- Esente da localizzazioni neoplastiche

Capuzzolo

- CDIS coinvolge l'epidermide del capezzolo (morbo di Paget del capezzolo)
- CDIS coinvolge i dotti galattofori
- Esente da localizzazioni neoplastiche

Muscolo scheletrico

- con infiltrazione neoplastica
- esente da infiltrazione neoplastica

Invasione linfo-vascolare Peritumorale

- Non identificata
- Presente
- nel derma
- Indeterminata

INVASIONE PERINEURALE PERITUMORALE

- Non identificata
- Presente

INFILTRATO LINFOCITARIO TUMORALE STROMALE

% (% di area infiltrata da linfociti sul totale di area stromale intratumorale sec. Recommendations by an International TILs Working Group, 2014)

Margini**Carcinoma infiltrante**

- margini esenti da infiltrazioni neoplastiche (negativi)
- distanza più vicina dal margine _____: mm _____
- margine(positivo) con infiltrazione neoplastica
- focale (< 1 campo a 10x)
- estesa
- margine specifico: _____

CDIS

- assente
- margini non coinvolti da CDIS
- distanza più vicina dal margine: mm _____
- margine specifico: _____
- margine positivo per CDIS: _____
- focale (< 1 campo a 10x)
- esteso

PATOLOGIA ASSOCIATA: _____

• RISPOSTA TUMORALE DOPO CHEMIOTERAPIA NEOADIUVANTE

- Risposta patologica completa (RC)
- Assenza di carcinoma residuo
- Assenza di carcinoma infiltrante residuo ma presenza di carcinoma in situ
- Risposta patologica parziale (RP)
- Minima malattia residua inferiore al 10% della totale area neoplastica
- Presenza di residuo di neoplasia tra il 10 e il 50% della totale area neoplastica
- Residuo di neoplasia superiore al 50% della totale area neoplastica
- Nessuna evidenza di risposta alla terapia: malattia stabile (MS)

ALLEGATO 6

DIAGNOSI E REFERTAZIONE DELLE LESIONI MAMMARIE

1 - Diagnosi e refertazione delle lesioni epiteliali proliferative

Questo paragrafo è volto a chiarire ed esemplificare alcuni punti ritenuti critici nella valutazione delle lesioni proliferative intraduttali e intralobulari.

Iperplasia epiteliale senza atipie (iperplasia tipica, usuale; epiteliosi)

Questo termine descrive le proliferazioni intraluminali costituite da una stratificazione dell'epitelio che non presenta atipie.

Gli aspetti diagnostici principali sono:

- Una composizione cellulare mista (cellule epiteliali, mioepiteliali/basali e apocrine)
- Immunoreattività per antigeni delle cellule basali-intermedie (citocheratine 5/6,14)
- Positività focale ed eterogenea per ER & PR
- Bordi cellulari indistinti, aspetto "sinciziale"
- Spazi simil-ghiandolari periferici rispetto al lume del dotto, con bordi irregolari
- Cellule epiteliali che sembrano "orientate" nella stessa direzione (streaming)
- Mitosi rare e non atipiche

Iperplasia duttale atipica

Nella classificazione WHO 2012 l'iperplasia duttale atipica è caratterizzata dalla proliferazione di cellule monomorfe, regolarmente distribuite, con basso grado di atipia citologica, formanti micropapille, spazi cribriformi o strutture solide, ponti romani/arcate, ecc.: sul piano citologico è sostanzialmente identica ad un DCIS di basso grado

La diagnosi di iperplasia duttale atipica va effettuata quando tale popolazione non è omogeneamente distribuita ma coesiste con aspetti di crescita tipo iperplasia duttale usuale (criterio qualitativo) e/o determini un coinvolgimento parziale o molto piccolo delle strutture duttulo-lobulari (criterio quantitativo: 2 mm o massimo due spazi a seconda dei criteri utilizzati).

Neoplasia lobulare (iperplasia lobulare atipica e carcinoma lobulare in situ)

L'iperplasia lobulare atipica e il carcinoma lobulare in situ (CLIS) sono stati ormai raggruppati nella classificazione WHO. È talvolta difficile separare LN da CDIS solidi di basso grado. Per convenzione le lesioni che non sono immunoreattive per E-caderina vengono definite lobulari.

Spettro delle modificazioni a cellule colonnari

È uno spettro di lesioni che includono lesioni benigne da una parte ed altre maligne dall'altra. Si consiglia di usare i nomi specifici per ogni lesione e di non utilizzare questo concetto confuso che sta cercando di rinvigorire le polemiche di qualche tempo orsono connesse con l'iperplasia atipica.

- Modificazioni a cellule colonnari tipo blunt duct adenosis
- Iperplasia a cellule colonnari (senza atipie) (epiteliosi incipiente)
- Modificazioni a cellule colonnari con atipia citologica (atipia epiteliale piatta)

Tabella 1 - Diagnosi differenziale epitelioidi e CDIS (modificata dalle Linee Guida Inglesi per la Patologia Mammaria da Screening 2005)

	Epitelioidi	Iperplasia duttale atipica	Carcinoma duttale in situ a basso grado
Dimensioni	Indifferente	Piccola per definizione (inferiore a 2 mm o non più di due spazi)	Superiore a 2 mm
Composizione cellulare	Mista. Cellule epiteliali e mio epiteliali, fusate, linfociti e macrofagi	Popolazione omogenea: un unico tipo di cellule	Popolazione omogenea: un unico tipo di cellule
Architettura	Variabile, solida, cribriforme con spazi irregolari e periferici	Micropapillare, cribriforme con spazi regolari e diffusi, solida	Micropapillare, cribriforme con spazi regolari e diffusi, solida
Lumi	Irregolari, spesso periferici e mal definiti	Lumi ben definiti, regolari	Lumi ben definiti, regolari
Polarizzazione cellulare	Cellule spesso orientate parallelamente all'asse maggiore dei loro nuclei (streaming)	Strutture micro papillari prive di asse fibrovascolare, formate da cellule con nuclei orientati perpendicolari al lume. Ponti cellulari e lumi ghiandolari con cellule orientate perpendicolari al lume, nella struttura cribriforme.	Strutture micro papillari prive di asse fibrovascolare, formate da cellule con nuclei orientati perpendicolari al lume. Ponti cellulari e lumi ghiandolari con cellule orientate perpendicolari al lume, nella struttura cribriforme.
Distribuzione dei nuclei	Irregolare	I nuclei sono regolarmente distribuiti con spaziatura uniforme	I nuclei sono regolarmente distribuiti con spaziatura uniforme
Citologia delle cellule epiteliali	Piccole, ovalari, con discrete variazioni di taglia	Uniformemente piccole o di media taglia	Uniformemente piccole o di media taglia
Nucleoli	Piccoli o assenti	Piccoli	Piccoli
Mitosi	Rare	Rare	Rare
Necrosi	Rara	Assente perché la lesione è iniziale	Rara. Se presente, solo nelle forme solide
Immunoistochimica	Positiva Ker 5/6 & 14 P63 talvolta positivo. Negativi ER&PR	Positiva Ker 7 Neg. Ker 14 Negativo P63 Positivi ER&PR	Positiva Ker 7 Neg. Ker 14 Negativo P63 Positivi ER&PR

2 - Diagnosi e refertazione dei CDIS

Classificazione del carcinoma duttale in situ (CDIS)

Per la classificazione ci si deve riferire a quella della WHO 2012.

Grado di differenziazione:

si basa prevalentemente sul grado di pleomorfismo nucleare e sulla presenza o meno di polarizzazione delle cellule, costituendo così 3 gradi: differenziazione buona, intermedia e scarsa.

È importante sottolineare che la definizione di necrosi non comprende le singole cellule apoptotiche e richiede invece la presenza di materiale eosinofilo amorfo contenente ombre cellulari e detriti nucleari. La necrosi può essere presente in tutti e tre i gradi.

Il tipo di crescita è variabile:

Spesso la crescita è solida, con focolai centrali di necrosi tipo comedocarcinoma, contenente calcificazioni granulari. Altri tipi di crescita sono quella micropapillare, simil-cribriforme o clinging (piatto).

CDIS “misto”

Una piccola quota di casi di CDIS presenta un grado di differenziazione variabile da area ad area. In questi casi il CDIS deve essere classificato secondo il grado maggiore.

Sottotipi rari di CDIS

Vi sono vari sottotipi morfologici di CDIS distinti da quello classico. Tuttavia non vi sono evidenze che la distinzione di questi sottotipi abbia impatto clinico. Di seguito descriveremo solo alcuni tipi speciali che ci sembrano degni di nota per le loro caratteristiche anatomico-cliniche.

Carcinoma papillare intracistico

Questa forma di carcinoma è rara ed è tipica di donne anziane. Il carcinoma intracistico è un carcinoma papillare che cresce completamente contenuto all'interno di una cisti bordata da una parete fibrosa. Le fronde papillari appaiono costituite da un solo tipo di cellule, senza lo strato mioepiteliale tipico dei papillomi.

Questo tipo di tumore può o meno rientrare nella diagnosi di carcinoma papillare in situ: in particolare, nei casi in cui le cellule mioepiteliali che dovrebbero circondare la cisti siano assenti è possibile che trattasi di neoplasia maligna invasiva a pattern di accrescimento di tipo espansivo. Tuttavia, la completa circoscrizione entro la cisti rende la prognosi di questa forma eccellente.

Molto importante è accertarsi che non vi siano focolai di invasione stromale o di CDIS usuale fuori della capsula, perché i primi farebbero rientrare il tumore nei carcinomi invasivi, e i secondi comporterebbero un maggiore rischio di recidiva locale.

3 - Carcinoma microinvasivo

Deve essere refertata come carcinoma microinvasivo (CM) una lesione composta in gran parte da carcinoma in situ, con focolai/o di infiltrazione nello stroma, ognuno dei quali di dimensioni non superiori a 1 mm (vedi TNM).

4 - Diagnosi e refertazione del carcinoma invasivo

La tipizzazione del carcinoma invasivo (CI) ha valore prognostico e fornisce informazioni prognostiche. Tut-

tavia si raccomanda cautela nella tipizzazione di casi con scarsa fissazione o in pazienti già sottoposti a chemioterapia neoadiuvante.

Il carcinoma invasivo può essere di tipo:

- speciale puro
- misto
- non altrimenti specificato (non speciale)

Diagnosi di tipo speciale “puro” e misto:

I tipi speciali di CI possono presentarsi in forma pura o come parte minore di un CI duttale non altrimenti specificato. Si raccomanda di diagnosticare il tumore come forma pura solo quando il tipo speciale rappresenta non meno del 90% della lesione. Se il tumore presenta aree di tipo speciale tra il 90% e il 50% della sua totale estensione, potrà essere definito “misto”; sotto al 50% rientrerà nel tipo non altrimenti specificato.

Carcinoma infiltrante di tipo non speciale (duttale)(CI)

Questo gruppo, che rappresenta la maggior parte dei CI, comprende tutti i carcinoma invasivi che non rientrano nei tipi speciali. Tuttavia in questo gruppo rientrano anche i casi con aree speciali inferiori al 50% (vedi sopra) e quindi il CI presenta in realtà una grande variabilità di aspetti morfologici.

5 - Valutazione e refertazione dei dati prognostici /predittivi

Dimensioni del tumore

Carcinoma invasivo

Le dimensioni massime di ogni nodulo devono essere misurate macroscopicamente.

Nel caso di tumori a crescita diffusa, soprattutto CLI, frequentemente le dimensioni vengono sottostimate macroscopicamente. In questi casi il tumore andrà misurato su preparati istologici e nel referto dovrà comparire la nuova misurazione. Le macrosezioni sono ottimali.

Nelle lesioni di piccole dimensioni precedentemente sottoposte a diagnosi pre-operatoria mediante VAB (mammotome, vacora, ect) è opportuno che la valutazione finale integri i dati pre-operatori con quelli dell'esame istologico definitivo.

Le dimensioni devono essere refertate in millimetri, come “asse maggiore”. Ogni focolaio separato deve essere misurato indipendentemente. Invasioni vascolari o nervose non devono essere incluse nella misurazione.

Talora può essere difficile capire se due focolai vicini fanno parte di un'unica massa o sono realmente separati: in questo caso la presenza di strutture ghiandolari normali interposte tra i due foci può aiutare a considerare i due foci come distinti. Anche la distanza tra le lesioni può essere utile nel prendere una simile decisione: è praticamente impossibile fornire criteri oggettivi in questo tipo di valutazione, tuttavia, indicativamente si possono considerare foci indipendenti con ragionevole sicurezza quelli separati da 5 mm o più di tessuto sano.

Carcinoma in situ

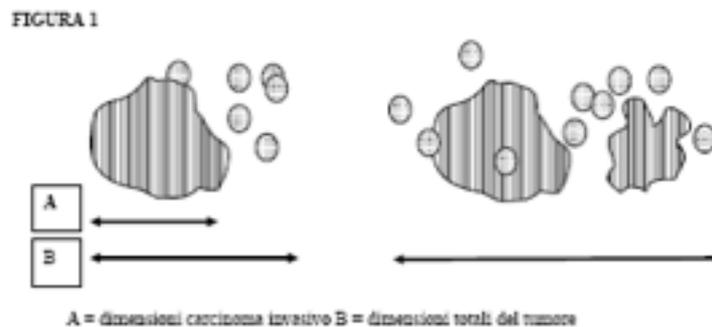
LN è spesso multifocale e la misurazione della sua estensione è poco realistica, nonché poco utile ai fini prognostici. **Solo il CDIS deve essere misurato.**

Tuttavia la misurazione del CDIS in due dimensioni induce quantomeno ad una sottostima della sua reale estensione. Infatti la struttura arborescente dell'albero duttale mammario determina il fatto che il CDIS non formi una struttura rotondeggiante, ma crescendo lungo i dotti formi invece una struttura ramificata, il cui reale volume richiederebbe un calcolo complesso.

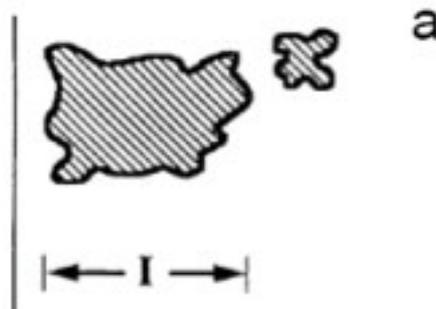
In caso di CDIS esteso, le macrosezioni aiutano al meglio nella ricostruzione dell'estensione poichè, anche in casi in cui macroscopicamente la reale estensione non è apprezzabile, si hanno maggiori possibilità di comprendere tutta la lesione in un unico vetro istologico.

Carcinoma invasivo e circostante carcinoma in situ

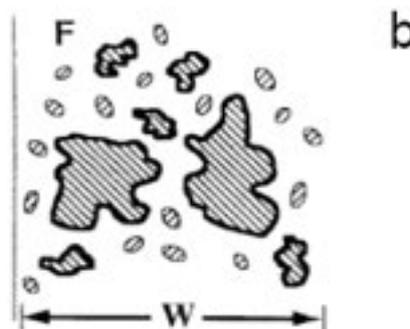
Il CI deve essere misurato come indicato sopra. Tuttavia se il CI è associato a CDIS e quest'ultimo si estende a oltre 1 mm dalla periferia della componente invasiva, occorrerà indicare sia le dimensioni del CDIS che quelle del nodulo tumorale complessivo di tutte e due le componenti (vedi fig.1)



Il termine “multicentrico” o “multifocale” deve essere sostituito con il termine “multiplo” (fig. a)



Focolai multipli di invasione insorti su un carcinoma duttale in situ di alto grado vanno considerati come lesione singola (sec. Linee Guida Europee 2006) (fig. b).



GRADO DI DIFFERENZIAMENTO

Il grado istologico fornisce importanti informazioni prognostiche. La sua valutazione richiede però criteri stringenti. Il metodo più seguito è quello descritto da Elston e Ellis (6) e comprende la valutazione di 3 parametri: formazione di tubuli/acini, aspetti nucleari, e mitosi. Ogni parametro riceve un punteggio da 1 a 3 e la somma finale dei punteggi corrisponde al grado (vedi schema sotto).

La formazione di tubuli deve essere valutata su tutto il tumore. La conta delle mitosi è preferibilmente effettuata alla periferia del nodulo.

Schema per la valutazione del grado istologico

Formazione di Tubuli

Punteggio

7. 1. >75% del tumore forma tubuli

8. 2. 10-75% “ “ “ “

9. 3. <10% “ “ “ “

Vengono definiti “tubuli” solo le strutture ghiandolari con un lume ben definito circondato da cellule polarizzate.

Caratteristiche Nucleari (Pleomorfismo)

Punteggio

1. 1. Nuclei piccoli, di poco maggiori ai nuclei normali, con contorni regolari, cromatina fine.

2. 2. Nuclei più grandi di quelli delle normali cellule epiteliali mammarie, con cromatina vescicolosa, nucleoli ben visibili e variabilità di dimensioni e forma moderata.

3. 3. Nuclei vescicolosi, ampi con nucleoli prominenti, con forme occasionalmente bizzarre.

Mitosi

Una conta mitotica accurata richiede una buona fissazione (vedi esame macroscopico). Le mitosi si contano in 10 campi ad alto ingrandimento. Le dimensioni dei campi ad alto ingrandimento sono in realtà variabili, quindi per standardizzare la procedura occorre misurare il campo microscopico con una griglia millimetrata e riportarlo alla scala nella tabella seguente.

Dieci campi rappresentano il minimo di campi da valutare. Se la conta totale risulta in un numero “borderline” tra due categorie, è buona norma contare altri 10 campi e fare la media. **La conta va effettuata alla periferia del tumore.** Tuttavia, in casi con evidente variabilità mitotica, andrà valutata l’area con maggiore attività.

Conteggio finale del grado

Grado 1 = punti 3 - 5

Grado 2 = punti 6 o 7

Grado 3 = punti 8 o 9

Si vuole sottolineare che questo sistema di valutazione non deve essere riservato al CI Nas, ma esteso a tutte le forme di CI, tranne il midollare (Tabella 2).

Tabella 2 – Valutazione numero di mitosi in rapporto alle dimensioni del campo microscopico

Dimensioni del campo in mm	Numero di mitosi che corrispondono a		
	Punti 1	Punti 2	Punti 3
0.40	Fino a 4	5-8	9 o più
0.41	Fino a 4	5-9	10 o più
0.42	Fino a 4	5-9	10 o più
0.43	Fino a 4	5-10	11 o più
0.44	Fino a 5	6-10	11 o più
0.45	Fino a 5	6-11	12 o più
0.46	Fino a 5	6-11	12 o più
0.47	Fino a 5	6-12	13 o più
0.48	Fino a 6	7-12	13 o più
0.49	Fino a 6	7-13	14 o più
0.50	Fino a 6	7-13	14 o più
0.51	Fino a 6	7-14	15 o più
0.52	Fino a 7	8-14	15 o più
0.53	Fino a 7	8-15	16 o più
0.54	Fino a 7	8-16	17 o più
0.55	Fino a 8	9-16	17 o più
0.56	Fino a 8	9-17	18 o più
0.57	Fino a 8	9-17	18 o più
0.58	Fino a 9	10-18	19 o più
0.59	Fino a 9	10-19	20 o più
0.60	Fino a 9	10-19	20 o più
0.61	Fino a 9	10-20	21 o più
0.62	Fino a 10	11-21	22 o più
0.63	Fino a 10	11-21	22 o più
0.64	Fino a 11	12-22	23 o più
0.65	Fino a 11	12-23	24 o più
0.66	Fino a 11	12-24	25 o più
0.67	Fino a 12	13-25	26 o più
0.68	Fino a 12	13-25	26 o più
0.69	Fino a 12	13-26	27 o più
0.70	Fino a 13	14-27	28 o più

Conteggio finale del grado

Grado 1 = punti 3-5

Grado 2 = punti 6 o 7

Grado 3 = punti 8 o 9

Si vuole sottolineare che questo sistema di valutazione non deve essere riservato al CI Nas, ma esteso a tutte le forme di CI.

Invasione Vascolare

La presenza di invasione vascolare è un fattore prognostico sfavorevole, in quanto fornisce indicazioni riguardo la possibilità di recidive e sopravvivenza. Poiché è difficile distinguere tra capillari ematici e vasi linfatici, si suggerisce di riferirsi genericamente a “spazi vascolari”, marcatori come CD 31 (endoteli ematici) e D2 40 (endoteli linfatici) sono utili. È anche difficile distinguere se le cellule tumorali sono effettivamente dentro spazi vascolari o all'interno di spazi artefattuali. A questo proposito si suggerisce di verificare la presenza della rima endoteliale con immunocitochimica e di eritrociti o materiale trombotico all'interno dello spazio. Infine si sottolinea che negli spazi artefattuali di solito i gruppi di cellule neoplastiche assumono la stessa forma dello spazio in cui sono contenute.

ALLEGATO 7

STADIAZIONE ANATOMO-PATOLOGICA (TNM)

Viene rappresentata con il prefisso “p”

Tumore primitivo (pT)

La stadiazione ricalca quella del T clinico preoperatorio.

N.B. In caso di diagnosi clinica di carcinoma infiammatorio (cT4d), se la biopsia della cute è negativa per carcinoma e non vi è cancro primitivo localizzato misurabile, nello staging patologico la categoria T va indicata come pTX.

Linfonodi regionali (pN)

Nel caso in cui la valutazione patologica interessi solo da 1 a 6 linfonodi sentinella, viene utilizzato il suffisso (SN).

- **pNX** I linfonodi regionali non possono venire valutati (non sono stati esaminati o sono stati rimossi in precedenza)
- **pN0** Non metastasi nei linfonodi regionali:
- **pN0(i-)** Non metastasi nei linfonodi regionali, negativi per ITC all'analisi morfologica
- **pN0(i+)** Non metastasi nei linfonodi regionali, rilevazione di ITC (cellule tumorali isolate o formanti aggregati non più grandi di 0.2 mm o non più di 200 cellule) all'analisi morfologica.
- **pN0(mol-)** Non metastasi nei linfonodi regionali, negative per ITC rilevabili con tecniche di biologia molecolare (RT-PCR)
- **pN0(mol+)** Non metastasi nei linfonodi regionali, rilevazione di ITC con tecniche di biologia molecolare (RT-PCR)
- **pN1** Micrometastasi (aggregati di cellule tumorali >0.2 mm e/o >200 cellule, ma < o uguali a 2 mm) o metastasi a 1-3 linfonodi ascellari omolaterali, e/o linfonodi mammari interni omolaterali con metastasi microscopica rilevata valutando il linfonodo sentinella ma non clinicamente rilevabile, così suddivisi:
 - **pNmi** Micrometastasi (aggregati di cellule tumorali >0.2 mm e/o >200 cellule, ma < o uguali a 2 mm)
 - **pN1a** Metastasi in 1-3 linfonodi ascellari con almeno una più grande di 2 mm in diametro
 - **pN1b** Metastasi in linfonodi mammari interni con metastasi microscopica o macroscopica rilevata valutando il linfonodo sentinella ma non clinicamente rilevabile
 - **pN1c pN1a + pN1b**
- **pN2** Metastasi in 4-9 linfonodi ascellari omolaterali, o in linfonodi mammari interni omolaterali clinicamente rilevabili in assenza di metastasi in linfonodi ascellari:
 - **pN2a** Metastasi in 4-9 linfonodi ascellari con almeno una più grande di 2 mm in diametro
 - **pN2b** Metastasi clinicamente rilevabile in linfonodi mammari interni omolaterali, in assenza di metastasi in linfonodi ascellari
- **pN3** Metastasi in 10 o più linfonodi ascellari omolaterali; o in linfonodi sottoclaveari o metastasi clinicamente rilevabili in linfonodi mammari interni omolaterali in presenza di metastasi in uno o più linfonodi ascellari; o in >3 linfonodi ascellari con metastasi microscopiche, clinicamente negative, in linfonodi mammari interni; o in linfonodi sovraclaveari omolaterali:
 - **pN3a** Metastasi in 10 o più linfonodi ascellari o metastasi in linfonodi sottoclaveari con almeno una più grande di 2 mm in diametro

- **pN3b** Metastasi clinicamente rilevabili in linfonodi mammari interni in presenza di metastasi in linfonodi ascellari; o metastasi in >3 linfonodi ascellari e linfonodi mammari interni con metastasi microscopiche rilevate valutando il linfonodo sentinella ma non clinicamente rilevabili
- **pN3c** Metastasi in linfonodi sovraclaveari omolaterali

Metastasi a distanza (pM)

pM1 metastasi a distanza confermata microscopicamente

pM0 e pMx sono categorie non previste

Classificazione dei residui tumorali

Presenza o assenza di residui tumorali dopo il trattamento chirurgico vengono indicate con la lettera R.

- **RX** non può essere accertata la presenza di residui tumorali
- **R0** non vi sono residui tumorali
- **R1** residui tumorali microscopici
- **R2** residui tumorali macroscopici

Stadiazione dei residui tumorali post-terapia neoadiuvante

Viene rappresentata con il prefisso “y”, cui segue “p”. Per il T, si misura il più grande focus di tumore invasivo residuo, utilizzando “m” se multipli foci sono residui; per N e per M si segue quanto precedentemente scritto.

ALLEGATO 8

Protocollo di campionamento della tuba, dell'ovaio e della mammella in pazienti BRCA mutate/alto rischio

Le tube e le ovaie dovrebbero essere incluse ed esaminate in toto nelle pazienti con mutazioni BRCA o con aumentato rischio di tumore al seno / ovaio ereditario, anche se appaiono macroscopicamente normali. Tale modalità determina un aumento di circa 4 volte nella rilevazione di lesioni precursori o di carcinomi (1): una gestione appropriata microscopica implica che tutto il tessuto ovarico e delle tube dovrebbe essere sezionato serialmente (2, 3). Per la tuba di Falloppio, tagliare le fimbrie a sezione parallela all'asse longitudinale del tuba per massimizzare la quantità di epitelio tubarico disponibile per l'esame istologico (protocollo SEE- FIM) (4) (Figura 1). Il resto della tuba di Falloppio viene incluso come sezioni seriali. E' consigliabile fissare i tessuti per 1 a 2 ore prima del sezionamento e / o manipolazione per prevenire la desquamazione dell'epitelio (5).

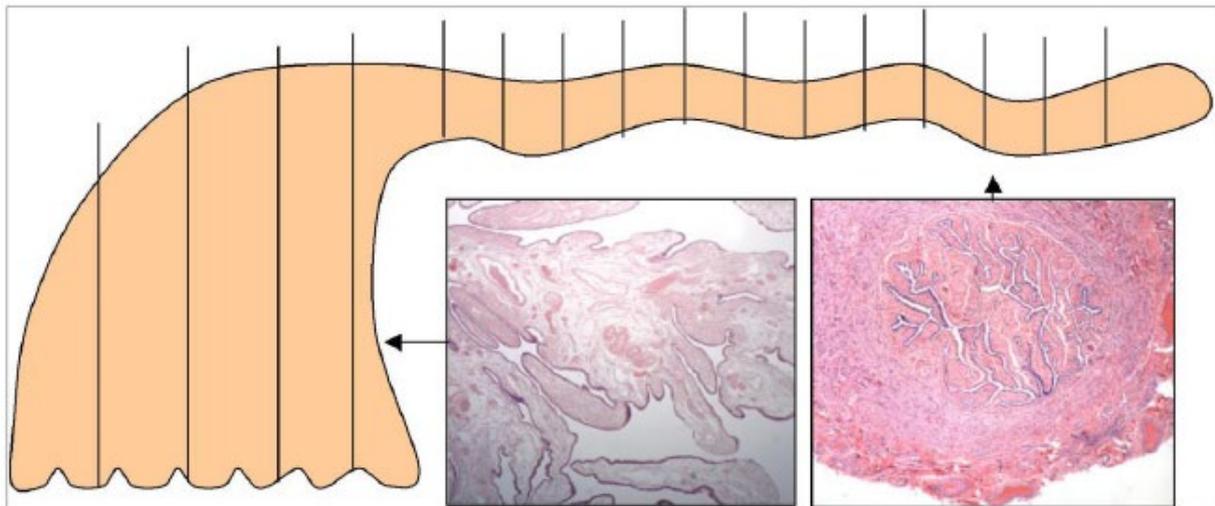
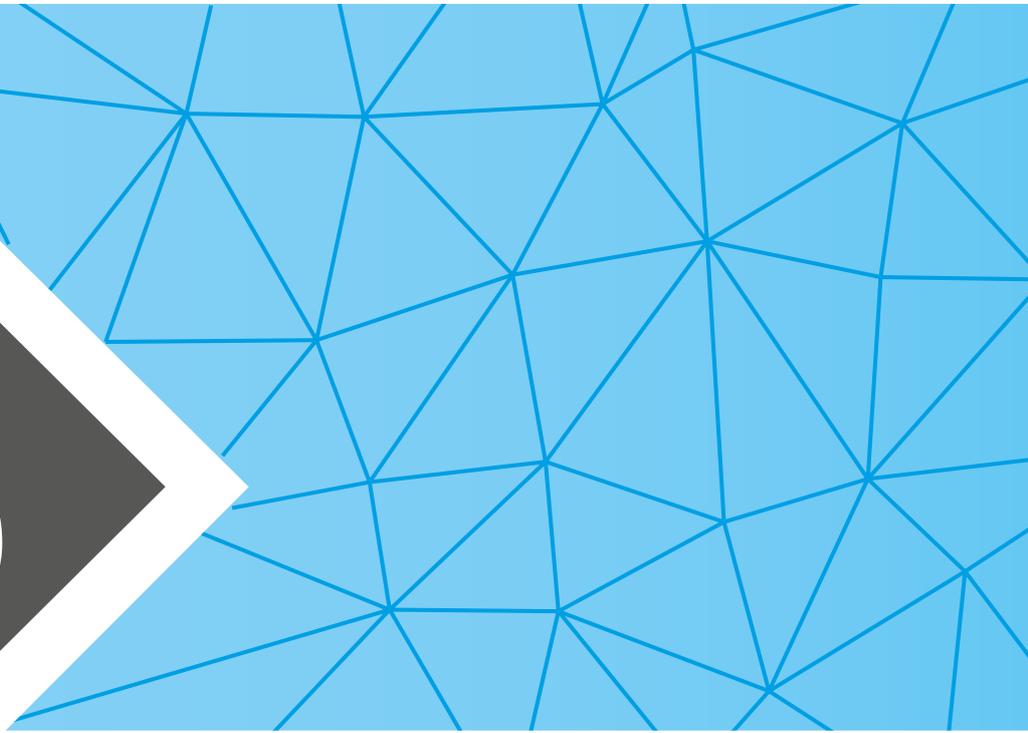


Figura 1. Protocollo per il campionamento della tuba di Falloppio. Questo protocollo comporta taglio e sezionamento longitudinale dell'infundibulum e del segmento fimbriale (distale 2 cm) per consentire la massima valutazione delle pliche tubariche. L'istmo e ampolla sono tagliati trasversalmente a intervalli di 3 mm. Da Crum et al. (4)

Nelle pazienti con mutazioni BRCA o con aumentato rischio di tumore al seno/ovaio ereditario, il campionamento della mammella non richiede raccomandazioni particolari: è consigliabile campionare generosamente tutti i quadranti, il capezzolo ed i dotti retroareolari, anche se macroscopicamente normali. E' auspicabile eseguire prima dell'intervento chirurgico una risonanza magnetica, onde effettuare prelievi mirati di aree che dovessero presentare enhancement all'imaging. Nel caso di microcalcificazioni o di aree di distorsione/nodulazioni di dimensioni inferiori ad 1 cm o in pazienti già sottoposte a procedure biottiche (anche con esito negativo), è necessario eseguire la radiografia del pezzo operatorio, prima del campionamento.

Bibliografia

1. Lamb JD, Garcia RL, Goff BA, Paley PJ, Swisher EM. Predictors of occult neoplasia in women undergoing risk-reducing salpingo-oophorectomy. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;194(6):1702-1709.
2. Kindelberger DW, Lee Y, Miron A, et al. Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: evidence for a causal relationship. *Am J Surg Pathol.* 2007;31(2):161-169.
3. Medeiros F, Muto MG, Lee Y, et al. The tubal fimbria is a preferred site for early adenocarcinoma in women with familial ovarian cancer syndrome. *Am J Surg Pathol.* 2006;30(2):230-236.
4. Crum CP, Drapkin R, Miron A, et al. The distal fallopian tube: a new model for pelvic serous carcinogenesis. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2007;19(1):3-9.
5. College of American Pathologists: Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Primary Tumors of the Ovary or Fallopian Tube. Protocol web posting date: January 2016. Available at: http://www.cap.org/ShowProperty?nodePath=/UCMCon/Contribution_Folders/WebContent/pdf/cp-ovary-fallopian-16protocol-1000.pdf



Linfonodo sentinella



Revisione a cura di:

- Stefania Dante (U.O. Anatomia Patologica, ULSS 6 Vicenza)
- Enrico Orvieto (U.O. Anatomia Patologica, Azienda Ospedaliera Padova)
- Ida Pavon (U.O. Anatomia Patologica, ULSS 13 Dolo (Ve))

Questo protocollo adotta quanto sviluppato dal “Protocollo diagnostico terapeutico dello screening per la diagnosi precoce dei tumori della mammella della Regione Emilia-Romagna”, 2012 (curato dalla prof.ssa Foschini e dal Gruppo Patologi Regione Emilia Romagna dello Screening Mammografico in collaborazione con il prof G Cserni), con minime modifiche di carattere descrittivo e dai documenti GIPAM 2015

Raccomandazioni per il management e la diagnosi anatomico-patologica

Lo stato dei linfonodi ascella è il fattore prognostico più importante e la stadiazione preoperatoria del cavo ascellare deve essere eseguita per ogni carcinoma infiltrante.

I linfonodi sentinella (LS) sono la sede più probabile di metastasi da tumore della mammella. Pertanto occorre individuare eventuali foci metastatici, se presenti, per consentire una corretta stadiazione che consenta di intraprendere i più appropriati interventi terapeutici e di follow-up. Lo scopo della stadiazione patologica dei linfonodi è di definire lo stato linfonodale, positivo o negativo che sia. I linfonodi sentinella (LS) sono più frequentemente ascellari e solo occasionalmente appartengono ad altri distretti. La definizione del linfonodo sentinella (LS) presuppone che i linfonodi sentinella siano le prime stazioni di drenaggio della linfa proveniente dal tumore e, in quanto tali, rappresentano la sede più probabile di diffusione metastatica per via linfatica. La rimozione selettiva di questi linfonodi costituisce un'opportunità per studiarli dettagliatamente sul piano anatomopatologico.

Pertanto i sn sono sottoposti a indagini diagnostiche più approfondite rispetto agli altri linfonodi (1, 2).

Scopo della ricerca del LS è, in caso di sua negatività, l'omissione della chirurgia sul cavo ascellare

La rimozione selettiva di LS comporta per il patologo uno studio dettagliato consistente in multistep sectioning ed immunohistochimica.

I requisiti richiesti al patologo sono sec. Linee Guida Europee IV ed:

- livello di minima: individuazione del 100% delle macrometastasi (>mm.2)
- livello ottimale: individuazione del 100% delle micrometastasi (<mm.2)

1. Modalità di esecuzione

I LS individualmente definiti come tali, devono essere identificati separatamente e chiaramente etichettati.

Ogni LS va valutato macroscopicamente e palpatoriamente. (aree di fibrosi, linfomi, metastasi da altre neoplasie, lesioni benigne ecc.).

I LS maggiori di 5mm vanno tagliati lungo l'asse minore con sezioni di 2mm, con particolare riguardo all'integrità della capsula e del seno marginale, ed inclusi in toto, mantenendo lo stesso orientamento delle sezioni.

I LS inferiori a mm 5 vanno tagliati lungo l'asse longitudinale ed inclusi in toto.

Il tessuto adiposo eccedente va rimosso con attenzione, salvaguardando la capsula del linfonodo.

Tre modalità di esame morfologico di linfonodi sono previste:

- Esame esclusivamente criostatico: tutto il LS viene esaurito durante l'esame intraoperatorio su sezioni criostatiche.
- Esame esclusivamente in paraffina: il sn viene fissato in formalina ed incluso in paraffina, secondo il protocollo descritto in seguito.
- Esame ibrido: in parte criostatico ed in parte su tessuto in paraffina: il LS giunge al laboratorio di Anatomia Patologica non fissato, viene sezionato e congelato in toto. Al termine dell'esame intraoperatorio il tessuto linfonodale rimanente viene fissato in formalina, incluso in paraffina ed esaminato secondo le modalità descritte in seguito.

Se viene richiesto l'esame estemporaneo al criostato i LS vanno inviati privi di fissativo, immediatamente dopo l'asportazione, al laboratorio di Anatomia Patologica.

Se non viene richiesto l'esame estemporaneo al criostato i LS vanno fissati in formalina in contenitori idonei e quindi inviati al laboratorio di Anatomia Patologica.

Raccomandazione:

La scelta del metodo da utilizzare per l'esame del LS sarà basata sulle risorse disponibili e sugli orientamenti assunti dall'Unità Operativa operante nelle singole Aziende Sanitarie. L'esame intraoperatorio non dovrebbe essere richiesto nel caso in cui sia stato previsto il trattamento chirurgico in due tempi.

1.1 Esame intraoperatorio

È necessario valutare sempre il LS macroscopicamente in prima istanza (esame macroscopico ad occhio nudo e valutazione della consistenza alla palpazione). Occorre tenere presente che consistenza sostenuta e modificazione di colore della superficie possono essere conseguenza di processi non metastatici, come ad esempio fibrosi o linfomi. Il tessuto adiposo eccedente va rimosso con attenzione, salvaguardando la capsula del linfonodo.

L'esame microscopico del LS durante l'esame intraoperatorio può essere eseguito con sezioni criostatiche (FS) ed anche talvolta con citologia da apposizione (IC).

1. Il criostato nei LS più piccoli di 3 mm è sconsigliato, ma occorre includerli in toto in paraffina.
2. Quando si utilizza la tecnica aggiuntiva IC, si raccomanda di eseguire un'apposizione di tutta la superficie di sezione (una sola apposizione è sufficiente).

La sensibilità e il valore predittivo positivo dell'esame intraoperatorio del LS possono essere migliorati da tecniche specifiche come l'immunoistochimica rapida (max 10 minuti) o l'indagine molecolare dei linfonodi. L'immunoistochimica rapida (3) è la tecnica più utile nei carcinomi lobulari invasivi e in particolare consente una migliore e più esatta valutazione delle dimensioni del deposito metastatico e quindi della classificazione in cellule tumorali isolate, micro o macrometastasi (4).

Le valutazioni intraoperatorie con tecniche molecolari quantitative di ultima generazione sono validate per identificare il coinvolgimento linfonodale metastatico di dimensioni superiori alle ITC (diametro superiore a 0,2 mm).

La valutazione con tecniche molecolari non consente attualmente di dare una correlazione precisa con le dimensioni della metastasi (prevista invece dall'attuale TNM: ciò non consente una distinzione tra pN1mi e pN1a). Si propone quindi di refertare i linfonodi positivi come pN1 o pN0 seguito dalla dicitura della metodica molecolare adottata.

La valutazione del tessuto linfonodale con metodica molecolare esclude la valutazione istologica comparativa. Non vi è uno standard riguardo la scelta di quanta parte del linfonodo destinare a valutazione istologica rispetto a quella da sottoporre a valutazione molecolare. Si raccomanda di effettuare almeno una sezione criostatica o una apposizione citologica al fine di escludere altre patologie linfonodali non metastatiche.

1.2 Esame esclusivo in paraffina

Ciascun sn deve essere prelevato in maniera indipendente per l'esame microscopico.

Una sezione rappresentativa di ogni sn macroscopicamente metastatico è adeguata per diagnosi di metastasi senza ulteriormente ricorrere alla immunocitochimica.

1. Se le dimensioni lo permettono, il sn va sezionato in campioni di 2 mm, perpendicolarmente all'asse longitudinale del linfonodo.
2. Tutti i LS negativi all'esame macroscopico devono essere inclusi ed esaminati istologicamente.

1.3 Esame ibrido (Criostato, Immunocitochimica e Paraffina)

Il sn giunge al laboratorio di Anatomia Patologica non fissato, viene sezionato e congelato in toto. Si ese-

guono due sezioni seriate, un viene colorata con ematossilina-eosina e la seconda con metodica immunocitochimica rapida.

Al termine dell'esame intraoperatorio il tessuto linfonodale rimanente viene fissato in formalina ed incluso in paraffina ed esaminato secondo le modalità descritte nella sezione seguente.

Sezioni in paraffina (tronco comune a 1.2 & 1.3)

- Attualmente, per raggiungere il risultato minimo, nei LS negativi macroscopicamente o al criostato, tenendo comunque presente che l'obiettivo dovrebbe essere quello di tendere ad identificare le micrometastasi, le sezioni tissutali dovrebbero essere eseguite in modo da identificare al meglio le metastasi di dimensioni comprese tra 0.2 mm e 2 mm di asse maggiore (micrometastasi).
- L'immunocitochimica con citocheratina è opzionale, secondo quanto indicato dalle linee guida Europee. Il Philadelphia consensus statement sui sn suggerisce l'uso della citocheratina per casi speciali come incertezza diagnostica sul preparato Ematossilina Eosina (EE) o come il carcinoma lobulare invasivo come tumore primario.
- La raccomandazione ottimale per ottenere la massima sensibilità prevede livelli a distanza di 200 micron sino all'esaurimento di ogni blocchetto, con sezioni colorate con EE, riservando una delle sezioni (nei casi negativi) per eventuale immunocitochimica oppure, in alternativa, come intervento essenziale, 4 sezioni, sempre a distanza di 200 micron, colorate con EE, ed in aggiunta un'ulteriore sezione (nei casi negativi) per eventuale immunocitochimica. In questo secondo caso, se vi è interessamento del livello più profondo, il LS deve essere esaminato in toto (**Protocollo Regione Emilia Romagna 2008: allegato 1**).
- In alternativa si può effettuare la seriazione a livelli di 200 micron da apporre su vetri trattati per immunocitochimica, quindi colorarli con E&E. Questo consente in casi di dubbi diagnostici di decolorare la sezione e ricolorarla con citocheratina.
- Poiché l'esaurimento completo del blocchetto in paraffina non lascia ulteriore materiale, si raccomanda di iniziare ed esaminare inizialmente un limitato numero di sezioni, in modo da avere materiale residuo qualora vi siano possibili indicazioni di patologia di altra natura (es. linfoma, il linfonodo esce dal protocollo).

2. Refertazione

In tutte e tre le metodiche descritte il referto istologico deve includere:

- il numero totale dei LS ricevuti
- l'interessamento macroscopico se presente
- il numero di linfonodi con malattia metastatica
- l'entità dell'interessamento metastatico (categorie pN della 7th edition of the TNM classification of malignant tumours)(5)
- Usando le categorie TNM deve essere usato il suffisso (sn) nel caso che lo stato linfonodale sia stato determinato unicamente sulla base della biopsia del sn (cioè senza dissezione ascellare)

In pratica il deposito metastatico va classificato come segue (5):

1. macrometastasi = metastasi con asse maggiore >2 mm [pN1(sn)].
2. micrometastasi = metastasi con asse maggiore compreso tra 0,2 e 2 mm, in qualsiasi delle tre dimensioni [pN1 mi(sn)]
3. cellule tumorali isolate (ITC) = singole cellule tumorali o metastasi con asse maggiore <0,2 mm, oppure aggregati che contengano meno di 200 cellule [pN0 i+ (sn)].

La valutazione istologica del LS può essere di difficile interpretazione (6-8), soprattutto in caso di diagnosi differenziale tra ITC e micrometastasi. A tale proposito sono state formulate indicazioni sia da parte dello European Working Group on Breast Screening Pathology (EWGBSP) (6) sia parte di un gruppo statunitense (9). I due metodi pur avendo alcune differenze, danno risultati sostanzialmente sovrapponibili nella classificazione delle metastasi da carcinoma duttale (10).

Il metodo proposto dallo EWGBSP si è dimostrato più accurato nella classificazione delle metastasi da carcinoma lobulare (11) e pertanto viene qui suggerito.

Suggerimenti per la diagnosi differenziale tra micrometastasi e ITC in casi dubbi (5, 12):

- La dimensione di un deposito metastatico di più cellule neoplastiche va misurata considerando qualsiasi aggregato di cellule in contatto tra loro.
- Se la metastasi induce reazione stromale desmoplastica, va misurata l'intera area che comprende cellule neoplastiche e reazione stromale.
- Il deposito metastatico va misurato indipendentemente dalla posizione, intra o extralinfonodale.
- In caso di depositi metastatici multipli nell'ambito di un linfonodo, solo il maggiore va misurato e considerato per la stadiazione.
- In caso di depositi metastatici multipli in linfonodi diversi di una singola paziente, va riportato numero dei linfonodi interessati da ogni categoria (macrometastasi, micrometastasi o ITC).

Si raccomanda di esplicitare il protocollo usato e se la positività è stata verificata solo sulla base della EE o dell'immunocitochimica.

3. Commenti aggiuntivi

È importante eseguire una corretta valutazione del LS in quanto essa riflette lo stato dei restanti linfonodi ascellari. In questi ultimi anni sta emergendo anche l'importanza prognostica delle ITC (13, 14).

La sezione criostatica (FS) e la citologia da apposizione (IC) comportano il rischio di fornire falsi negativi o, più raramente, falsi positivi. Ciascuno di questi metodi è utile per valutazione intraoperatoria di LS, ma persiste il rischio, per ognuna di esse, di mancata identificazione di alcune metastasi del linfonodo.

4. Linfonodo sentinella in tumore recidivo sulla stessa mammella

Recidive dopo 10 anni sulla stessa mammella devono essere trattate come nuova neoplasia.

Attualmente non esistono linee guida validate sul trattamento dell'ascella in queste pazienti.

Gli studi in corso sottolineano come vi sia una minore percentuale di identificazione del LS (esiti di chirurgia sul cavo e di RT), che questa aumenti con il doppio contrasto (radionuclide e colorante vitale).

Per la processazione e la refertazione anatomopatologica di questi LS si usano le stesse linee guida precedentemente descritte.

LINFONODO SENTINELLA E TERAPIA NEOADIUVANTE

Due gruppi:

1° pazienti con ascella negativa(cN0),

II° pazienti con ascella positiva (cN+) e risposta clinica completa

A. Pazienti candidate a terapia neoadiuvante con ascella negativa

• Il prelievo del LS viene effettuato prima del trattamento:

- vantaggi: - alta percentuale di identificazione (>90%)
- efficace come stadiazione patologica
- La metodica consigliata è quella esclusiva in paraffina con immunohistochimica.

• Il prelievo del LS viene effettuato dopo del trattamento:

- criticità: -tasso di identificazione inferiore
- aumento della percentuale di falsi negativi
- La metodica consigliata è quella esclusiva in paraffina con immunohistochimica.

Se p/yN0 non viene eseguito lo svuotamento del cavo.

B. Pazienti candidate a terapia neoadiuvante con ascella positiva e risposta clinica completa

Premessa:

la risposta patologica completa su N è un fattore prognostico favorevole, la risposta patologica parziale su N è un indice prognostico, la valutazione della malattia residua su N ha effetto sul successivo trattamento chemio e radioterapico.

Necessario nelle notizie cliniche sapere il numero di linfonodi interessati ed il diametro delle metastasi all'esordio, che devono essere state documentate con FNAB e/o CB (down staging).

Criticità:

Alterato drenaggio linfatico

- Basso tasso di identificazione (doppio tracciante lo aumenta)
- Risposta non omogenea sulle metastasi linfonodali
- Alta percentuale di falsi negativi (più di 2 LS la riduce).

La metodica consigliata è quella esclusiva in paraffina con immunohistochimica.

VALUTAZIONE DEL TIPO DI RISPOSTA: vedi capitolo 5

OGNI TIPO DI LOCALIZZAZIONE LINFONODALE E' DA CONSIDERARSI METASTASI

5. Bibliografia

1. Benson JR, Della Rovere GQ. Management of the axilla in women with breast cancer. *Lancet Oncol* 2007; 8:331-348.
2. Amendoeira I, Apostolikas N, Bellocq JP, et al. (European Working Group on Breast Screening Pathology), Wells CA (ed). Quality assurance guidelines for pathology. In: Perry N, Broeders M, de Wolf C, Törnberg S, Holland R, von Karsa L (eds.). *European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis*, 4th edition. European Commission, Luxemburg, 2006; 219-311
3. Choi YJ, Yun HR, Yoo KE, et al. Intraoperative Examination of Sentinel Lymph Nodes by Ultrarapid Immunohistochemistry in Breast Cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2006;36(8)489-493
4. Leikola JP, Toivonen TS, Krogerus LA, et al. Rapid Immunohistochemistry Enhances the Intraoperative Diagnosis of Sentinel Lymph Node Metastases in Invasive Lobular Breast Carcinoma. *Cancer* 2005;104:14-9
5. Sobin L, Gospodarowicz M, Wittekind Ch (eds). UICC TNM classification of malignant tumours, 7th edition. John Wiley and Sons Inc., New York, 2010
6. Cserni G, Bianchi S, Boecker W, et al. Improving the reproducibility of diagnosing micrometastases and isolated tumor cells. *Cancer* 2005;103:358-367
7. Cserni G, Sapino A, Decker T. Discriminating between micrometastases and isolated tumor cells in a regional and institutional setting. *Breast* 2006;15:347-54
8. De Mascarel I, MacGrogan G, Debled M, et al. Distinction between isolated tumor cells and micrometastases in breast cancer: is it reliable and useful? *Cancer* 2008;112:1672-8
9. Turner RR, Weaver DL, Cserni G, et al. Nodal stage classification for breast carcinoma: improving interobserver reproducibility through standardized histologic criteria and image-based training. *J Clin Oncol* 2008;26:258-263
10. Cserni G, Bianchi S, Vezzosi V, et al. Variations in sentinel node isolated tumour cells / micrometastasis and non-sentinel node involvement rates according to different interpretations of the TNM definitions. *Eur J Cancer* 2008;44:2185-91
11. van Deurzen CHM, Cserni G, Bianchi S, et al. Nodal stage classification in invasive lobular breast carcinoma: influence of different interpretations of the pTNM classification. *J Clin Oncol* 2010;28(6):999-1004
12. Cserni G, Amendoeira I, Bianchi S, et al. Distinction of isolated tumour cells and micrometastasis in lymph nodes of breast cancer patients according to the new Tumor Node Metastases (TNM) definitions. *Eur J Cancer* 2011;47:887-894
13. de Boer M, van Deurzen CH, van Dijck JA, et al. Micrometastases or isolated tumor cells and the outcome of breast cancer. *N Engl J Med* 2009; 361:653-63
14. Patani N, Mokbel K. Clinical significance of sentinel lymph node isolated tumour cells in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 127:325-334
15. Cserni G: Intraoperative analysis of sentinel lymph nodes in breast cancer by one-step nucleic acid amplification. *J Clin Pathol.* 65(3):193-9, 2012.

ALLEGATO 1

PROCEDURA ESAME DEL LINFONODO SENTINELLA

I linfonodi sentinella (LS) sono la sede più probabile di metastasi da tumore della mammella, pertanto occorre adoperarsi per individuare tali foci metastatici, se presenti, per consentire una corretta stadiazione del caso che consenta di intraprendere i più appropriati interventi terapeutici e di follow-up successivi.

- Campioni

Sono individualmente definiti come tali, devono essere identificati separatamente e chiaramente etichettati. I campioni dovrebbero essere inviati freschi, immediatamente dopo l'asportazione, al laboratorio di Anatomia Patologica o fissati in formalina in contenitori idonei nel caso non possa essere o non venga richiesto l'esame in estemporanea.

Raccomandazione: La scelta del metodo da utilizzare per l'esame del sn sarà basata sulle risorse disponibili e sugli orientamenti assunti dall'Unità Operativa operante nelle singole Aziende Sanitarie. L'esame intraoperatorio non dovrebbe essere richiesto nel caso in cui sia stato previsto il trattamento chirurgico in due tempi.

- Esame intraoperatorio

È necessario valutare sempre il LS macroscopicamente in prima istanza (esame macro ad occhio e valutazione della consistenza alla palpazione). Occorre tenere presente che consistenza sostenuta e modificazione di colore della superficie possono essere conseguenza di processi non metastatici, come ad esempio fibrosi o linfomi. Il tessuto adiposo eccedente va rimosso con attenzione, salvaguardando la capsula del linfonodo.

La sezione criostatica (FS) e la citologia da apposizione (IC) comportano il rischio di fornire falsi negativi o, più raramente, falsi positivi. Ciascuno di questi metodi è utile per valutazione intraoperatoria di sn, ma persiste il rischio, per ognuna di esse, di mancata identificazione di alcune metastasi del linfonodo.

È raccomandato di eseguire sezioni del linfonodo sentinella perpendicolari all'asse longitudinale. Il criostato nei sn più piccoli di 3 mm è sconsigliato, ma occorre includerli in toto in paraffina. Qualsiasi metodo si voglia seguire si raccomanda comunque di esaminare una parte del tessuto incluso in paraffina.

Se viene preferita la tecnica IC, si raccomanda di eseguire un'apposizione di tutta la superficie di sezione (una sola apposizione e sufficiente).

- Tessuto incluso in paraffina

Ciascun sn deve essere prelevato in maniera indipendente per l'esame microscopico.

La metodologia seguita dovrebbe fornire le più ampie possibilità di rinvenire la malattia metastatica (macro/micrometastasi) per mezzo della colorazione con Ematossilina-Eosina (EE).

Una sezione rappresentativa di ogni sn positivo (esame macro o intraoperatorio) e adeguata per diagnosi di metastasi senza ulteriormente ricorrere alla immunocitochimica.

Se le dimensioni lo permettono, il LS dovrebbe essere sezionato in campioni di 2 mm, lungo l'asse perpendicolare.

Tutti i LS negativi (esame macro o criostato) dovrebbero essere inclusi ed esaminati istologicamente.

- Sezioni di tessuto in paraffina

Attualmente, per raggiungere il risultato minimo, nei LS negativi, macro o FS tenendo comunque presente che l'obiettivo dovrebbe essere quello di tendere ad identificare le micrometastasi, le sezioni tissutali dovrebbero essere eseguite in modo da identificare al meglio le metastasi > 0.2 mm (micrometastasi).

L'immunocitochimica con citocheratina è opzionale, secondo quanto indicato dalle linee guida Europee. Il Philadelphia consensus statement sui LS suggerisce l'uso della citocheratina per casi speciali come incertezza diagnostica sul preparato Ematossilina Eosina (EE) o come il carcinoma lobulare invasivo come tumore primario.

La raccomandazione ottimale per ottenere la massima sensibilità prevede livelli a distanza di 200 micron

sino all'esaurimento di ogni blocchetto, con sezioni colorate con EE, riservando una delle sezioni (nei casi negativi) per eventuale immunocitochimica oppure, in alternativa, come intervento essenziale, 4 sezioni, sempre a distanza di 200 micron, colorate con EE, ed in aggiunta un'ulteriore sezione (nei casi negativi) per eventuale immunocitochimica. In questo secondo caso, se vi è interessamento del livello più profondo, il LS deve essere esaminato in toto.

Poiché l'esaurimento completo del blocchetto in paraffina non lascia ulteriore materiale, si raccomanda di iniziare ed esaminare inizialmente un limitato numero di sezioni.

Qualora vi siano possibili indicazioni di patologia di altra natura (es. linfoma, il linfonodo esce dal protocollo.

- Referto

Dovrebbe includere:

- il numero totale dei LS ricevuti,
- l'interessamento macroscopico se presente,
- il numero di linfonodi con malattia metastatica,
- l'entità dell'interessamento metastatico (categorie pN della 7th edition of the TNM classification of malignant tumours). Se si osservano diversi foci metastatici all'interno di un linfonodo, dovrebbe essere preso in considerazione il più ampio. Usando le categorie TNM deve essere usato il suffisso (sn) nel caso che lo stato linfonodale sia stato determinato unicamente sulla base della biopsia del sn (cioè senza dissezione ascellare).

Si raccomanda di esplicitare il protocollo usato e se la positività è stata verificata solo sulla base della EE o dell'immunocitochimica.

- Commenti aggiuntivi

Le cellule isolate tumorali, se riscontrate, vanno incluse nel referto, ma non è raccomandata la loro ricerca sistematica.



04

TECNICHE SPECIALI

Determinazione

immunoistochimica dei

fattori prognostici

Ibridazione in situ



Revisione a cura di:

- Licia Laurino (U.O. Anatomia Patologica, Azienda ULSS n° 9 Treviso)

1. Introduzione (1-4, 6-7,10,14, 20, 29,33-36,40)

Lo stato dei recettori steroidei (ER e PR), lo stato di HER2 e la determinazione dell'indice di proliferazione (ki-67) devono essere valutati su tutti i tumori invasivi della mammella e nelle recidive e/o metastasi, avendo questi marcatori un significato *prognostico* di outcome della malattia e *predittivo* di risposta alla terapia

La positività per i recettori steroidei è considerata un forte marcatore *predittivo* di risposta alla terapia endocrina, oltre che *prognostico*. Il recettore estrogeno (ER) è espresso in circa il 70% delle neoplasie ed è fortemente influenzato dal grado tumorale e dall'istotipo; virtualmente tutti i tumori G1 sono ER positivi. L'espressione del recettore progestinico (PR) va generalmente di pari passo con quella del ER; pazienti con ER+/PR- hanno una prognosi meno favorevole rispetto a pazienti ER+/PR+.

Il ki-67 è una proteina nucleare presente nelle cellule in ciclo che indica l'attività proliferativa della lesione. La metodica di elezione per determinare l'indice di proliferazione (ki-67) è quella immunohistochimica. È ritenuta essere un marcatore *prognostico* e *predittivo* di risposta o resistenza alla chemioterapia o alla terapia endocrina. Elevati livelli di ki-67 sono predittivi di risposta alla chemioterapia neoadiuvante; bassi livelli di ki-67 in corso di terapia endocrina preoperatoria sono associati a risposta patologica tumorale, mentre elevati livelli di ki-67 predicono una riduzione della DFS; il ki-67 ha significato prognostico in donne pre e postmenopausa con ER/PR+ e N0; può avere valore predittivo nella scelta di un inibitore dell'aromatasi (Letrozole) piuttosto che del Tamoxifene come terapia endocrina neoadiuvante in donne ER/PR+; il Letrozole sembra dare più benefici a pazienti con elevati livelli di ki-67. Il ki67 è un marcatore a distribuzione continua e, in accordo con St. Gallen 2011 (ribadito da St. Gallen 2013), un valore al di sotto della soglia del 14% associato alla positività per ER/PR e alla negatività per HER2-, era stato proposto come surrogato dei test di gene profiling nell'identificare il sottotipo *Luminal A*. Sebbene score elevati e score bassi di ki67 si siano dimostrati riproducibili e clinicamente validi in termini di predizione della pCR, la distribuzione continua di questa variabile non permette di definire un cut-off univoco e ottimale. Secondo St. Gallen 2015, lo score del ki67 deve essere interpretato alla luce dei valori medi del Laboratorio. Ad esempio, se un laboratorio riporta, in malattia recettore positiva, un valore medio di ki67 pari al 20%, valori al di sopra del 30% sono ritenuti alti, al di sotto del 10% bassi. L'utilizzo di sistemi di analisi di immagine per la conta potrebbe facilitare la riproducibilità dello score di questo marcatore a distribuzione continua (40).

HER2 è un proto oncogene membro della famiglia dell'Epidermal Growth Factor (EGF) localizzato su cromosoma 17 e codifica per un recettore tirosinchinasico, privo di un ligando specifico, che viene attivato in seguito alla interazione con gli altri membri della famiglia (HER1, HER3 e HER4). La positività per HER2 (overespressione e/o amplificazione genica) ha un forte significato *prognostico* e *predittivo*. L'HER2 risulta essere iperespresso nel 15-20% dei carcinomi della mammella e correla con una prognosi sfavorevole di malattia; ha valore predittivo negativo per la risposta alla chemioterapia (CMF) e per la risposta al Tamoxifene mentre predice una risposta positiva alle antracicline e ai taxani e al Trastuzumab.

Nell'ultimo decennio abbiamo assistito ad un sempre più frequente utilizzo della target therapy in pazienti HER2 positivi. Il Trastuzumab (anticorpo monoclonale umanizzato che si lega al recettore dell'HER2 sulla cellula tumorale) è ormai utilizzato di routine in adiuvante e in neoadiuvante. Combinato con la chemioterapia nelle pazienti metastatiche, migliora la progression-free survival (PFS) e la overall survival (OS). (DJ Slamon, New Engl J Med 2001; Dowsett et al, JCO 2009). Grazie al Trastuzumab, si calcola che la sopravvivenza mediana delle pazienti con malattia metastatica si colloca intorno ai 4 anni.

Oltre al Trastuzumab, sono attualmente utilizzabili altri 2 farmaci a bersaglio molecolare, il Lapatinib, inibitore della tirosin-chinasi, l'anticorpo Pertuzumab. Il blocco di HER2 infatti può essere ottenuto grazie a farmaci

con diverso meccanismo d'azione eventualmente somministrati in associazione (doppio blocco recettoriale) come trastuzumab + pertuzuman (intervengono entrambi a livello di HER2) o trastuzumab+ lapatinib (quest'ultimo interviene a livello citoplasmatico).

Sta anche emergendo la possibilità di utilizzare il trastuzumab per veicolare farmaci con elevata tossicità (e quindi non veicolati per via sistemica) come i derivati della famiglia delle maitansine, in una nuova molecola (il T-DM1). Il legame tra i 2 agenti è stabile durante il passaggio nell'organismo e si scinde una volta raggiunta la cellula bersaglio. In assenza del recettore dell' HER2, il coniugato, che è privo di tossicità, viene eliminato; in presenza del recettore dell' HER2, il coniugato viene internalizzato dalla cellula neoplastica, viene scisso il legame e il chemioterapico esercita il suo effetto citotossico.

Le metodiche di elezione per determinare lo stato di HER2 possono essere indifferentemente quella immunohistochimica, che valuta l'iperespressione della proteina, e quella di ibridazione in situ (FISH/SISH/CISH,) che valuta l'amplificazione genica.

Questi marcatori (ER, PR, HER2 e ki-67) possono essere considerati l'analogo immunohistochimico di metodiche di *gene profiling* contribuendo ad identificare sottotipi tumorali nell'ambito del carcinoma della mammella (tumori luminal A, luminal B, HER2+, basal- like) (St. Gallen 2013).

In considerazione della rilevanza di questi marcatori nel definire la prognosi e la risposta alla terapia, la loro determinazione deve essere accurata e riproducibile.

Per una corretta determinazione di recettori ormonali, ki67 e HER2 vanno tenuti sotto controllo le seguenti fasi:

- Fase preanalitica (fissazione e smascheramento antigenico)
- Fase analitica (anticorpo utilizzato)
- Fase postanalitica (interpretazione dei risultati)

2. Fase preanalitica (comune a tutte le determinazioni di immunohistochimica e di ibridazione in situ) (5,16-18,31)

2.1 Tissue handling

Una variabile importante nel determinare un'alterata antigenicità dei tessuti è il tempo di *ischemia fredda*, ovvero quello che intercorre dall'escissione del tessuto al suo collocamento nel liquido di fissazione. La standardizzazione di questo tempo sembra essere uno step molto importante al fine di garantire la conservazione dei livelli di espressione proteica finalizzati alla determinazione di target quali ER e PR, ma anche degli altri marcatori (Ki-67 e HER2). Ne deriva che l'immediata fissazione del campione è fortemente raccomandata. In ogni caso il ritardo di fissazione non deve superare i 30 min. (Raccomandazioni GIPaM 2015) E' auspicabile che il campione giunga al Laboratorio di Anatomia Patologica a fresco o posto in formalina entro 30 minuti dall'asportazione. Qualora ciò non sia possibile, il chirurgo è invitato a porre il campione in un'adeguata quantità di formalina e, previo accordo con il patologo, a condurre una o più sezioni parallele dello spessore massimo di 0,5 cm, dalla fascia al versante cutaneo e passanti per la lesione, in modo tale da favorire una corretta fissazione della neoplasia mantenendo comunque l'integrità del pezzo operatorio al fine di consentire un corretto orientamento e un'accurata valutazione dei margini chirurgici.

In alternativa alla formalina, il campione chirurgico può essere messo in un contenitore idoneo per il sottovuoto. La conservazione sottovuoto non deve durare più di 24-48h e il campione sottovuoto va mantenuto a una temperatura di 4°.

2.2 Tipo di fissazione

Il fissativo per eccellenza è la formalina neutra tamponata al 10% (pH circa 7); altri fissativi sono scoraggiati e in ogni caso necessitano una validazione al fine di assicurare una corretta riuscita delle reazioni

2.3 Durata della fissazione

Per il pezzo operatorio il tempo di fissazione ottimale è tra le 6 e le 72 ore; al ricevimento lo specimen va inchiostrato e sezionato ad intervalli di 0,5-1 cm per permettere una adeguata penetrazione della formalina nei tessuti; durante questa fase, ogniqualvolta si riconosca macroscopicamente la neoplasia, è utile prelevarne direttamente un frammento circondato da tessuto sano da collocare in biocassetta e da utilizzare per gli assay di immunohistochimica; in questo modo si può garantire un'ottima fissazione del tessuto e quindi una conservata antigenicità del tumore.

Per le piccole biopsie (core biopsy, VAB) è consigliabile una fissazione tra le 6 e le 36 ore.

2.4 Antigen retrieval

Lo smascheramento antigenico serve a ripristinare le caratteristiche antigeniche di un tessuto, alterate dalla fissazione e dalla processazione. Ci sono due tipologie di smascheramento antigenico: la digestione enzimatica (tripsina, pepsina) e lo smascheramento in mezzo liquido (calore/pH variabile). Uno smascheramento inadeguato può causare falsi negativi e/o positivi.

3. Recettori steroidei (ER-PR) (21-24,31)

3.1 FASE ANALITICA

3.1.1. Scelta del clone

La scelta dell'anticorpo dovrebbe ricadere su anticorpi con riconosciuta sensibilità e specificità e clinicamente validati. Una diluizione non ottimale e/o un tempo di incubazione non sufficiente possono condizionare i risultati della reazione

3.1.2. Controlli di reazione

In ogni sessione andrebbero inclusi dei controlli esterni positivi (sensibilità) e negativi (specificità) al fine di monitorare la performance dell'assay. La negatività in controlli positivi noti e la positività in controlli negativi invalidano l'esito dell'intera seduta.

I controlli interni positivi (dotti normali) garantiscono l'avvenuta corretta dispensazione dei reagenti e la performance globale della seduta. Il controllo interno deve dimostrare una colorazione eterogenea dei nuclei delle cellule luminali normali, con cellule non colorate accanto a cellule debolmente colorate e a cellule intensamente colorate; una colorazione limitata a poche cellule e di uguale intensità può essere dovuta a scarsa sensibilità della reazione. I nuclei delle cellule mioepiteliali e dei fibroblasti rappresentano un utile controllo negativo interno: una loro colorazione per quanto debole è segno di aspecificità della reazione.

Alcuni tipi istologici di carcinoma della mammella (tubulare, mucinoso, lobulare classico) sono noti per essere diffusamente positivi per ER e PGR; la negatività di questi istotipi deve far mettere in dubbio la bontà della reazione ottenuta.

3.2.FASE POSTANALITICA

3.2.1 Interpretazione dei risultati

L'interpretazione del risultato è di tipo semiquantitativo e deve tener conto della percentuale (%) dei nuclei

tumoralmente positivi nell'intera sezione.

Il test è ritenuto positivo se contiene almeno 1% di cellule tumorali positive con qualsiasi intensità.

3.2.2 Refertazione

Nel referto devono essere riportati:

- il metodo utilizzato per la reazione e l'anticorpo
- la % di cellule positive
- positività del controllo interno (se recettori negativi)

La valutazione dei recettori ormonali nel carcinoma duttale in situ è opzionale

4. Marcatore di proliferazione ki-67 (25,29,33,36)

4.1. FASE ANALITICA

4.1.1. Scelta del clone

La scelta dell'anticorpo dovrebbe ricadere su anticorpi con riconosciuta sensibilità e specificità e clinicamente validati

Una diluizione non ottimale e/o un tempo di incubazione non sufficiente possono condizionare i risultati della reazione.

4.1.2. Controlli di reazione

In ogni corsa andrebbero inclusi dei controlli esterni positivi (sensibilità) e negativi (specificità) al fine di monitorare globalmente la performance dell'assay. La negatività in controlli positivi noti o la positività in controlli negativi, inficiano l'esito dell'intera seduta.

I controlli interni positivi (positività per ki-67 in elementi linfoidi, in rare cellule duttali benigne, nello strato basale cutaneo qualora incluso), garantiscono l'avvenuta corretta dispensazione dei reagenti e la performance globale della seduta. Il controllo interno deve dimostrare una colorazione nucleare, anche eterogenea.

4.2. FASE POSTANALITICA

4.2.1 Interpretazione dei risultati

La valutazione della frazione di cellule proliferanti deve essere espressa come percentuale di cellule positive per ki-67 indipendentemente dall'intensità della colorazione e deve essere effettuata alla periferia della neoplasia su più campi non selezionati

4.2.2 Refertazione

Nel referto vanno riportati:

- il metodo utilizzato per la reazione
- l'anticorpo utilizzato
- la % di cellule positive

5. HER2 (5,8,9,13,15,17,18,23,26,30-32,37-39)

5.1. FASE ANALITICA

5.1.1 Scelta del clone

È preferibile utilizzare kit standardizzati di anticorpi anti-HER2 poli o monoclonali referenziati per aumentare la riproducibilità del test.

5.1.2 Controlli di reazione

In ogni sessione andrebbero incluse sezioni e/o linee cellulari di controllo positivo (3+) e negativo (0 e 1+) al fine di monitorare globalmente la performance dell'assay.

La negatività delle cellule duttali normali garantisce l'avvenuta corretta performance della reazione. L'eventuale moderata o marcata positività di elementi duttali non neoplastici deve indurre a rivedere la metodica.

5.2. FASE POSTANALITICA

5.2.1 Interpretazione dei risultati

Per ovviare alla variazione di immunoreattività in distinte aree neoplastiche, va esaminata l'intera neoplasia in tutta la sezione, escludendo solo le aree con artefatti morfologici o periferiche.

Criteri di valutazione: la positività di HER2 deve essere espressa mediante lo scoring system descritto in tabella 2 (ASCO-CAP 2013/GIPaM 2015, Consensus AIOM/SIAPEC 2014) (34)

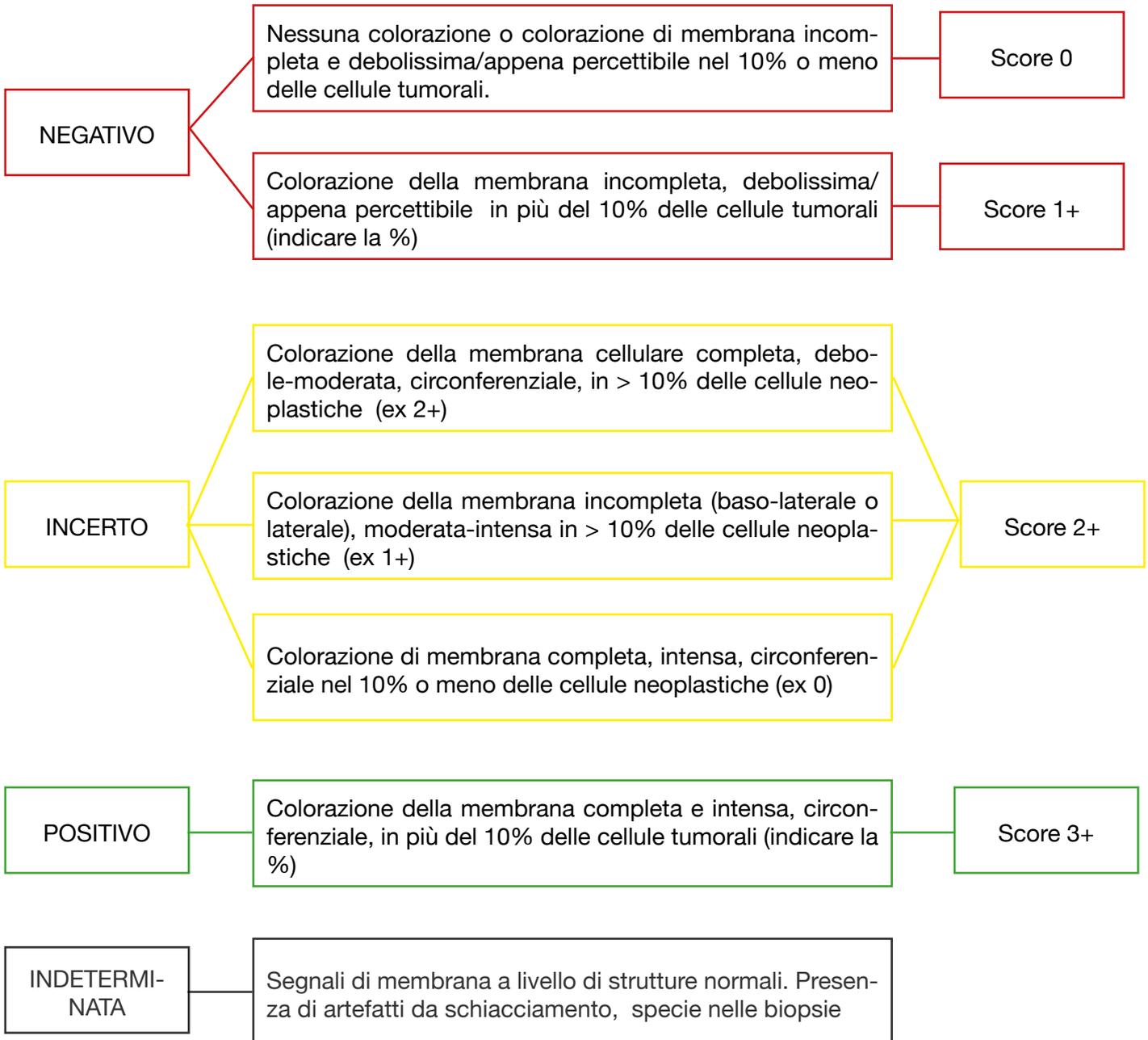
In accordo con le Raccomandazioni ASCO/CAP 2013, tutti i tumori mammari primitivi e le metastasi/recidive devono avere almeno una determinazione per HER2.

Rispetto alle raccomandazioni del 2007, sono state apportate delle modifiche relativamente alla soglia per la definizione della positività (da 30% a 10%), ma questo non ha impattato sulla nostra pratica quotidiana dal momento che in Italia abbiamo sempre utilizzato il cut-off del 10%.

Apparentemente più complessa è la definizione dei casi 2+, che nelle nuove raccomandazioni ASCO/CAP viene estesa anche a casi con colorazione di membrana incompleta (ex 1+) e completa, ma al di sotto del 10% (ex 0).

La filosofia alla base delle nuove raccomandazioni ASCO/CAP è quella di non negare alle donne l'accesso a una terapia appropriata con il Trastuzumab, ovvero limitare i falsi negativi.

Scoring system sec ASCO/CAP 2013, GiPaM 2015, Consensus AIOM/SIAPEC 2014 (BICE)



Nella Lettura dei preparati, la valutazione dell'immunoreattività dei controlli deve precedere quella dei campioni

5.2.2 Refertazione

Nel referto vanno riportati:

- la metodica standardizzata utilizzata (es. Herceptest)
- l'esito della reazione: positivo (3+), dubbio (2+) negativo (1+ o 0) o indeterminato
- le linee guida di riferimento

6. Tecniche di ibridazione in situ: fish, cish, sish

(8,9,13,15,19,26-28,30-32,38)

Le tecniche di ibridazione in situ sono analisi di citogenetica molecolare in grado di rilevare di specifiche anomalie cromosomiche.

Le metodiche ISH attualmente accreditate sono: FISH, CISH e SISH con sonda doppia (gene HER2 e CEP17) o con sonda singola (solo gene HER2)

La FISH è la tecnica di elezione per la ricerca di aberrazioni cromosomiche e/o alterazione geniche in diverse neoplasie e sono note numerose applicazioni diagnostiche.

Nel carcinoma della mammella, le metodiche di ibridazione in situ sono applicate come test di II livello, da utilizzare dopo l'immunoistochimica, per dirimere quei casi in cui la determinazione IHC abbia fornito risultato equivoco (2+) o per contribuire a risolvere quesiti specifici; tuttavia l'impiego di tecniche di ibridazione in situ per la valutazione dello stato di HER2 è consentita anche come test di I livello.

FISH/CISH/SISH possono essere impiegati su preparati istologici fissati in formalina neutra tamponata; tessuti fissati in Bouin o decalcificati non sono adeguati; l'impiego di altri fissativi richiede una adeguata validazione dei risultati. FISH e CISH rappresentano la metodica di elezione per preparati citologici convenzionali o in monostrato di lesioni metastatiche.

È necessario acquisire competenze che consentano di adattare alle variabili preanalitiche i reattivi e i protocolli dei kit commerciali per FISH/CISH/SISH; eventuali modifiche vanno validate su casi con stato di HER2 noto.

Il DNA dell'HER2 è meno sensibile della proteina, pertanto i falsi negativi sono minori con metodica FISH rispetto all'IHC; quest'ultima infatti risente maggiormente dell'ischemia fredda, della durata di fissazione, delle tecniche di processazione del tessuto e della temperatura della paraffina

6.1 ISH: interpretazione dei risultati

- esaminare accuratamente tutto il preparato per valutare l'eventuale presenza di popolazioni cellulari con diverso numero di segnali HER2/nucleo oppure, selezionare le aree potenzialmente positive tramite visione del preparato di immunoistochimica
- in caso di omogeneità si raccomanda di valutare non meno di 20 cellule/campo in almeno 2 campi della componente invasiva identificata sulla sezione in EE
- se vengono identificate due popolazioni cellulari di cui una presenta un incremento dei segnali HER2/nucleo e se tale popolazione rappresenta più del 10% dell'intero campione in esame, si deve procedere alla valutazione separata con conteggio di almeno 20 cellule della popolazione con aumento di segnali. In caso di popolazione neoplastica eterogenea, se la percentuale delle cellule amplificate è >10% sul totale delle cellule neoplastiche infiltranti presenti nel vetrino in esame, l'ISH test di HER2 è da considerarsi positivo.

I dati di entrambe le popolazioni cellulari con le rispettive percentuali, devono essere riportati nel referto.

NB: quando si sia evidenziata iperespressione/amplificazione nel 10% o meno di cellule neoplastiche in una inclusione, è raccomandabile testare ulteriori inclusioni della neoplasia primaria e/o delle eventuali metastasi linfonodali

6.1.1 ISH DOPPIA SONDA

In prima battuta si valuta la ratio.

positività: ratio ≥ 2 indipendentemente dal numero di copie del gene (anche se < 4)

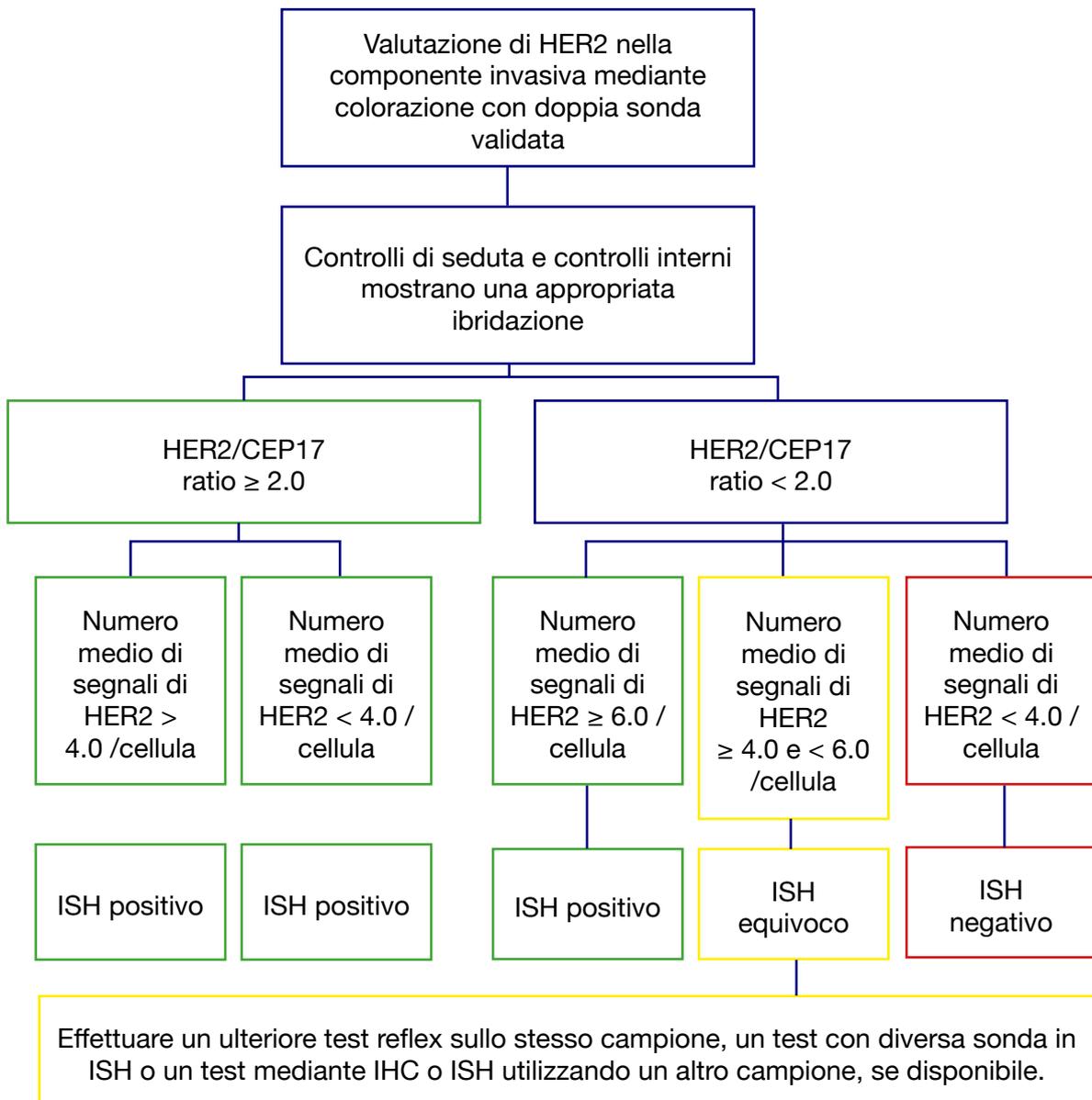
positività: ratio < 2 e numero copie del gene ≥ 6

positività: caso eterogeneo in cui la popolazione amplificata (nuclei con numero di segnali HER2 ≥ 6) è $> 10\%$ sul totale delle cellule neoplastiche

equivoco: ratio < 2 e numero di copie gene ≥ 4 e < 6 (ripetere test su altre inclusioni di tumore primitivo o metastatico)

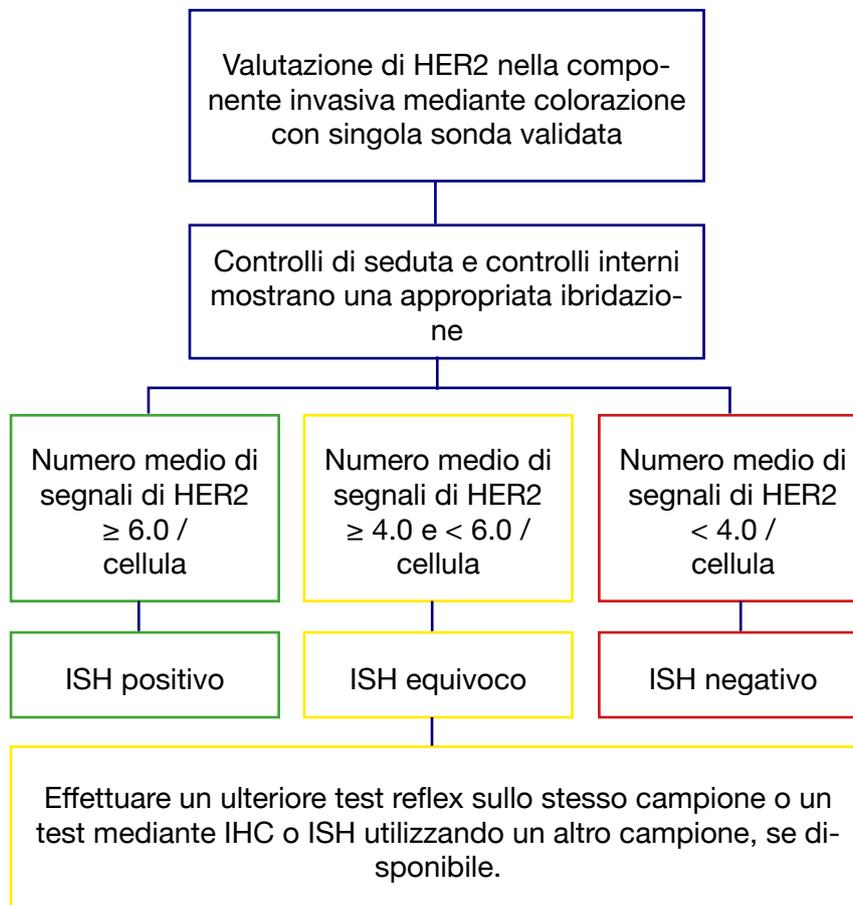
negativo: ratio < 2 e numero di copie del gene < 4

indeterminato: depositi eccessivi di formalina, eccesso di digestione dei nuclei, ibridazione parziale, precipitati che impediscono la lettura



6.1.2 ISH SINGOLA SONDA

- utilizza criteri simili ma non si può calcolare la ratio
 - positività: numero di copie del gene ≥ 6
 - positività: caso eterogeneo in cui la popolazione amplificata (nuclei con numero di segnali HER2 ≥ 6) è $>10\%$ sul totale delle cellule neoplastiche
 - risultato equivoco: numero di copie del gene ≥ 4 e < 6
 - negatività: numero di copie del gene < 4
- indeterminato: depositi eccessivi di formalina, eccesso di digestione dei nuclei, ibridazione parziale,
- precipitati che impediscono la lettura



6.2 POLISOMIA DEL CROMOSOMA 17 (28,31,32)

In accordo con le linee guida FDA e con le raccomandazioni ASCO/CAP, l'amplificazione del gene HER2, quando si utilizzano tecniche *dual color*, viene indicata dal rapporto ≥ 2 o tra numero di copie del gene HER2 e i segnali del centromero del cromosoma 17 (CEP17); i tumori con un aumento del numero di segnali sia per il gene HER2 sia per il CEP17, ma con ratio < 2 sono considerati polisomici.

La polisomia 17, definita come presenza di 3 o più copie del centromero 17, in assenza di amplificazione genica può essere associata ad una intensità di colorazione 2+ all'IHC e, più raramente, a 3+. Solo i casi polisomici con iperespressione della proteina (IHC3+) sono eleggibili al trattamento.

La reale incidenza dei casi polisomici è dibattuta, con dati della Letteratura che oscillano tra il 4 e il 30% in funzione dei criteri utilizzati per la diagnosi. Marchiò et al (31), utilizzando la tecnica *microarray-comparative genomic hybridization* (aCGH) hanno dimostrato che la polisomia vera è un evento piuttosto raro; dallo studio è emerso che quanto definito inizialmente polisomico con la FISH *dual color* ha corrisposto a un aumento (*gain*) o a un'amplificazione della sola zona del centromero e non ad un vero aumento del numero dei cromosomi 17. Il 20% delle pazienti di questo studio con carcinoma considerato polisomico alla FISH con ratio HER2/CEP17 < 2 mostravano in realtà amplificazione del gene HER2 alla aCGH ed erano quindi eleggibili al trattamento.

È pertanto verosimile che i casi di carcinoma della mammella con vera polisomia del cromosoma 17 siano rari e sia pertanto opportuno considerare amplificati i casi con > 6 segnali HER2 per cellula indipendentemente dal numero dei segnali CEP17.

Il referto deve includere la dizione "non amplificato" o "amplificato" e la giustificazione (ratio ≥ 2 per i casi

disomici o >6 copie del gene o cluster di HER2 nei casi apparentemente polisomici).

7. Controllo di qualità (3, 5, 11, 12, 24,26,30-33)

7.1 Controlli positivi di reazione, interni

Per ER, PR e ki-67 valutare la coerenza della positività dei controlli interni come già precedentemente definito

7.2 Controlli positivi e negativi di reazione, esterni (on slide)

Utilizzare sezioni tissutali ad immunoreattività nota per ciascuna sessione di immunohistochimica (ER, PR, HER2).

È consigliabile utilizzare controlli positivi esterni di reazione periodicamente e, comunque, a ogni cambio del kit per FISH/CISH/SISH.

Il panel ASCO/CAP 2013, il GiPaM e l'AIOM/SIAPEC hanno ribadito l'importanza della partecipazione ai controlli di qualità (VEQ) per ER, PgR, Ki67, HER2 e ISH. E' pertanto mandatorio aderire ai controlli di qualità che attualmente sono aperti sia su base regionale (gruppo Patologi dello Screening mammografico del Veneto), che nazionale (GiPaM, SIAPEC). Auspicabile adesione volontaria dei Centri a CQ sovranazionali (es. QC-Nordic).

8. Bibliografia

1. Plunkett TA, Miles DW. New biological therapies for breast cancer. *Int J Clin Pract* 2002 May; 56:261-6.
2. National Institute for Clinical Excellence. Technology Appraisal No. 34. Guidance on the use of trastuzumab for the treatment of advanced breast cancer 2002.
3. Yaziji H and Gown AM. Accuracy and precision in HER2/neu testing in breast cancer: are we there yet? *Hum Pathol* 2004; 35: 143-146.
4. Fournier M, Risio M, Van Poznak C, Seidman A. HER2 testing and correlation with efficacy of trastuzumab therapy. *Oncology* 2003; 16: 1340-1358.
5. Press MF, Hung G, Godolphin W, Slamon DJ. Sensitivity of HER2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of errors in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res* 1994;54: 2771-7.
6. Walker R. The significance of histological determination of HER-2 status in breast cancer. *The Breast* 2000;9: 130-3.
7. Schnitt SJ. Breast cancer in the 21st century: New opportunities and new challenges. *Modern Pathology* 2001;14:213-8.
8. Wang S, Saboorian MH, Frenkel E, et al. Laboratory assessment of the status of Her-2/neu protein and oncogene in breast cancer specimens: Comparison of immunohistochemistry assay with fluorescence in situ hybridisation assays. *J Clin Pathol* 2000;53:374-81.
9. Lehr H-A, Jacobs TW, Yaziji H, et al. Quantitative evaluation of HER-2/neu status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization and by immunohistochemistry with image analysis. *Am J Clin Pathol* 2001;115:814-22.
10. Rampaul RS, Pinder SE, Gullick WJ et al. HER-2 in breast cancer - Methods of detection, clinical significance and future prospects for treatment. *Crit Rev Oncol-Hematol* 2002;43:231-44
11. Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E et al. Real-world performance of HER2 testing-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:852-4.
12. Patrick C. Roche, Vera J. Suman, Robert B. Jenkins et al. Concordance between local and central laboratory HER2 testing in the breast intergroup trial N9831. *JN C I* 2002;94:855-7.
13. Bartlett J, Mallon E and Cooke T. The clinical evaluation of HER-2 status: which test to use? *J Pathol* 2003; 199: 411-417
14. Zarbo RJ, Hammond EH. Conference summary, strategic science symposium. Her-2/neu testing of breast cancer patients in clinical practice. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: 549-553.
15. Dowsett M, Bartlett J, Ellis IO, et al. Correlation between immunohistochemistry (HercepTest) and fluorescence in situ Hybridization (FISH) for HER-2 in 426 breast carcinomas from 37 centres. *J Pathol* 2003; 199: 419-423.
16. Rhodes A, Jasani B, Couturier J, et al. A formalin-fixed, paraffin-processed cell line standard for quality control of immunohistochemical assay of HER-2/neu expression in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 2002;117:81-9.
17. Vincent-Salomon A, MacGrogan G, Couturier J, et al. Calibration of immunohistochemistry for assessment of HER2 in breast cancer: results of the French Multicentre GEPFICS Study. *Histopa-*

- thology 2003; 42(4): 337-347.
18. Rhodes A, Jasani B, Anderson E, et al. AJ. Evaluation of HER-2/neu immunohistochemical assay sensitivity and scoring on formalin fixed and paraffin processed cell lines and breast carcinomas: A comparative study involving results from laboratories in 21 countries. *Am J Clin Pathol* 2002; 118: 408-417
 19. Watters AD, Bartlett JM. Fluorescence in situ hybridization in paraffin tissue sections: pretreatment protocol. *Mol Biotechnol.* 2002;21:217-20.
 20. Ross JS, Fletcher JA, Bloom KJ, et al. Targeted therapy in breast cancer. *Molecular and cellular proteomics* 2004, 3, 379-398
 21. Nadji M, Gomez-Fernandez C, Ganjei-Azar P, Morales AR. Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered. *Am J Clin Pathol* 2005, 123(1), 21-27.
 22. Collins LC, Botero ML, Schnitt SJ. Bimodal frequency distribution of estrogen receptor immunohistochemical staining results in breast cancer: an analysis of 825 cases. *Am J Clin Pathol* 2005, 123, 16-20.
 23. Gown AM. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. *Mod Pathol* 2008; 21:S8-S15
 24. MEH. Hammond, DF Hayes, M Dowsett, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologist. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2010;134:907-922
 25. Dowsett M et al. Assessment of ki-67 in breast cancer; Recommendations from the International ki-67 in Breast Cancer Working Group. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103; 1-9
 26. Antonio C. Wolff, M. Elizabeth H. Hammond, Jared N. Schwartz et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 18-43
 27. Penault-Llorca F, Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Osamura RY, Rüschoff J, van de Vijver M. Emerging Technologies for Assessing HER2 Amplification. *Am J Clin Pathol* 2009; 132: 539-548
 28. Marchiò C, Lambros MB, Gugliotta P, Verdun Di Cantogno L, Botta C, Pasini B, Tan D SP, Mackay A, Fenwick K, Tamber N, Bussolati G, Ashworth A, Reis-Filho JS and Sapino A. Does chromosome 17 centromere copy number predict polysomy in breast cancer? A fluorescence in situ hybridization and microarray- based CGH analysis. *J Patho* 2009; 219 (1): 16-24.
 29. A. Goldhirsch, W. C. Wood, A. S. Coates, R. D. Gelber, B. Thürlimann, H.-J. Senn and Panel members. Strategies for subtyping-dealing with diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol* 2011;22:1736-1747
 30. Antonio C. Wolff, M. Elizabeth H. Hammond, David G Hicks, et al. Recommendations for Human epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update
 31. *JCO* 2013;31:3997-4013
 32. 2015 GIPaM Recommendations. *Pathologica* 2016; 108: 1-19.
 33. Consensus AIOM/SIAPEC – BICE (Best Possible Care in Breast Cancer), 2014
 34. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS et al. Personalizing the treatment of women with early breast

- cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol* 24:2206-2223
35. Prat A, Cheang MC, Martin M, Parker JS, Carrasco E, Caballero R, Tyldesley S, Gelmon K, Bernard PS, Nielsen TO, Perou CM. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer.
 36. *JCO* 2013; 31:203-209
 37. Maisonneuve P, Disalvatore D, Rotmensz N et al. Proposed new clinicopathological surrogate definitions of luminal A and luminal B (HER2 negative) intrinsic breast cancer subtypes. *Breast Canc Res* 2014;16R65
 38. A. S. Coates , E. P. Winer , A. Goldhirsch , R. D. Gelber , M. Gnant , M. Piccart-Gebhart , B. Thürlimann , H.-J. Senn and Panel members Tailoring therapies - improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Annals of Oncology* 26: 1533–1546, 2015
 39. Rakha EA, Starczynski J, Lee AHS, Ellis IO. The Updated ASCO/CAP guideline recommendations for HER2 testing in the management of invasive breast cancer: a critical review of their implications for routine practice. *Histopathology* 2014;64:609-615
 40. Rakha EA, Pigera M, Shaaban A, Shin SJ, D'Alfonso T, Ellis IO, Lee AHS. National Guidelines and Level of Evidence: Comments on some of the New Recommendations in the American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologist Human Receptor Epidermal Growth Factor Receptor 2 Guidelines for Breast Cancer (correspondence)
 41. *JCO* 2015; 33:1301-1302
 42. Replay to Rakha et al. *JCO* 2015; 33:1302-1303
 43. Klauschen F, Wienert S, Schmitt W et al. Standardized Ki67 diagnostics using automated scoring - clinical validation in the GeparTrio breast cancer study. *Clin Cancer Res* 2014;



05

Procedure diagnostiche
del campione
operatorio dopo
chemioterapia
neoadiuvante



Revisione a cura di:

- Stefania Dante (U.O. Anatomia Patologica, ULSS 6 Vicenza)
- Ida Pavon (U.O. Anatomia Patologica, ULSS 13 Mirano)

La terapia neoadiuvante o primaria, intesa come somministrazione sistemica di farmaci che precede l'atto chirurgico ha assunto un ruolo sempre più importante nella cura della paziente con carcinoma della mammella che presenta, alla diagnosi, una malattia localmente avanzata o una malattia di dimensioni ridotte ma con fattori prognostici negativi.

Gli scopi principali sono la riduzione del volume tumorale al fine di poter eseguire una chirurgia conservativa, la regressione delle metastasi linfonodali e la prevenzione di eventuali localizzazioni a distanza.

I regimi più usati prevedono l'uso di antracicline e taxani (in genere per 4-6 cicli), in associazione o meno con trastuzumab anti-HER 2.

I dati della letteratura indicano che tali regimi sono risultati efficaci sulla riduzione della massa neoplastica e che la risposta patologica alla chemioterapia neoadiuvante, sia sul tumore sia sui linfonodi, è correlata con una prognosi migliore sia in termini di sopravvivenza globale sia di intervallo libero da malattia.

Dai dati della letteratura i carcinomi più responsivi e con maggior numero di risposte patologiche complete risultano essere: G3 ER- HER2+, triplo negativi e tumori ER+ HER2+.

Nei carcinomi ER+ HER2- luminal B non si ha una risposta soddisfacente.

I carcinomi luminal A e lobulari non rispondono.

In pazienti anziane con ER+, si propone talora chemioterapia ormonale per controllo di malattia.

Queste pazienti possono successivamente essere sottoposte a chirurgia per mancata risposta o per progressione della malattia nel tempo.

La valutazione della risposta patologica è analoga.

Il patologo deve quindi definire caratteri istologici e biologici del carcinoma eligibile a NAT e, successivamente alla terapia, ne valuta la risposta patologica.

1. Diagnostica pretrattamento chemioterapico primario

Lo studio del tumore prima del trattamento primario deve essere estremamente accurato sia nella clinica (cT e cN) e dell'imaging (plurifocalità, micro calcificazioni, stato degli N), sia nella parte patologica.

1.1 Valutazione del tumore

1.1.1 Modalità di Prelievo

Trucut multipli (almeno 5) con ago da 14-16 gauge su ogni focolaio sospetto. Devono essere il più rappresentativi possibile della lesione, quindi i prelievi con abbondante necrosi e/o sclerosi dovrebbero essere ripetuti.

Biopsia a cielo aperto: tale opzione è da prendere in considerazione come seconda istanza, in quanto a rischio di complicanze, che potrebbero procrastinare l'inizio della terapia, o influire sulla valutazione della risposta alla terapia, se la biopsia chirurgica asporta una abbondante porzione della malattia.

1.1.2 Valutazione della cute

La biopsia della cute dovrebbe essere obbligatoria in presenza di aspetti di edema e/o peau d'orange, (cT4 = pT4b), in quanto la presenza o meno di infiltrazione carcinomatosa dei vasi linfatici e/o del derma influenza i successivi trattamenti chirurgico e radioterapico.

Se si è in presenza di ulcerazione cutanea e/o satellitosi è sufficiente una documentazione fotografica da parte del clinico da allegare alla cartella della paziente.

1.2 Valutazione dello stato dei linfonodi

La stadiazione linfonodale si avvale, a seconda dei centri, dell'esame obiettivo, dell'ecografia,

dell'RMN, della TAC e della PET-TAC.

- In caso di linfonodi clinicamente positivi indicata FNAB o CB di conferma.
- In caso di linfonodi clinicamente dubbi FNAB o CB possono essere dirimenti, tenendo conto dei limiti delle metodiche
- La ricerca del linfonodo sentinella in caso di cN0 prima della terapia neoadiuvante è un metodo diagnostico affidabile e stadiante.

1.3 Marcatura del tumore

In caso di regressione completa della neoplasia può essere difficoltoso individuarne macroscopicamente l'area nel pezzo operatorio, si rende quindi necessario il posizionamento di un repere (clip, tracciante ecc) nel tumore al momento della biopsia.

In alcuni centri è in uso anche il tatuaggio sulla proiezione cutanea della neoplasia per l'individuazione al momento della chirurgia.

1.4 Valutazione istologica del campione bioptico

La **richiesta di esame istologico** deve essere corredata da:

1. dati della paziente
2. sede e dimensioni della lesione
3. N° di linfonodi positivi e loro dimensioni
4. stato della cute (nei cT4b utile biopsia)
5. presenza di microcalcificazioni e di plurifocalità
6. tecnica del prelievo (guida strumentale o manuale)
7. richiesta di esecuzione dei recettori ormonali, Ki-67 ed HER2

Nel **referto** devono essere riportati i seguenti parametri secondo i protocolli adottati dal laboratorio afferente tenendo presente che l'agobiopsia pre NAT può essere l'unica documentazione della neoplasia in caso di risposta patologica completa.

1. presenza di carcinoma infiltrante, istotipo e eventuale % sul totale dell'agobiosia
2. grado istologico (se non è possibile, valutare il grado nucleare)
3. presenza di carcinoma in situ, istotipo, grading e eventuale percentuale
4. presenza di microcalcificazioni
5. presenza di invasione vascolare
6. espressione di recettori ormonali, HER 2 e indice proliferativo

In presenza di biopsia cutanea o di cute nella CB

- A. dimensioni
- B. presenza di infiltrazione del derma e di eventuale ulcerazione dell'epidermide
- C. presenza di infiltrazione vascolare.

L'eventuale biopsia linfonodale sarà processata secondo il protocollo del laboratorio afferente.

2. Diagnostica dopo chemioterapia primaria

In base alla risposta valutata con metodiche clinico-strumentali, le pazienti dopo chemioterapia neoadiuvante vengono sottoposte a chirurgia della mammella (demolitiva o conservativa), associata o meno a chirurgia sul cavo ascellare.

Scopo della chemioterapia primaria è ottenere una risposta patologica completa della malattia sia sul tumore che sui linfonodi metastatici; questo avviene, a seconda delle casistiche, nel 15-40% dei casi. In caso contrario vi può essere una risposta patologica parziale, con riduzione in percentuali variabili della malattia, o nessuna risposta.

La risposta patologica del tumore primitivo e quella delle metastasi linfonodali non sempre sono simili, e neanche tra le stesse metastasi linfonodali.

È dimostrato che le dimensioni e le caratteristiche del tumore residuo e lo stato dei linfonodi dopo terapia neoadiuvante sono un fattore prognostico di intervallo libero da malattia.

Dati ormai consolidati hanno dimostrato che

1. una risposta patologica completa (Pcr) sul tumore e sui linfonodi ha prognosi migliore
2. una risposta patologica completa con Tis residuo non modifica la prognosi
3. una risposta patologica parziale sul T con minima malattia residua (< al 10%) è assimilabile alla risposta patologica completa
4. ypN0i+ o minima malattia residua sui linfonodi non è dissimile da una risposta patologica completa linfonodale
5. Una risposta patologica parziale sul T e completa su N ha prognosi più favorevole rispetto a una risposta patologica completa su T e parziale su N
6. La persistenza di trombi neoplastici angiolinfatici è un fattore prognostico peggiorativo

La valutazione patologica di risposta deve quindi riportare la quantità di tumore residuo, le sue caratteristiche morfologiche e biologiche e lo stato dei linfonodi.

La gradazione di risposta va eseguita esclusivamente sulla componente infiltrante del T e

2.1 Notizie cliniche

La richiesta di esame istologico deve riportare:

1. dati identificativi della paziente
2. tipo di chemioterapia
3. stadiazione prima del trattamento su T ed N
4. tipo di procedura diagnostica precedente
5. presenza di reperi nel T
6. presenza di plurifocalità
7. presenza di microcalcificazioni
8. risposta clinico/radiologica alla terapia (completa, parziale, minima)
9. tipo di chirurgia ed indicazione dei vari reperi di orientamento del pezzo operatorio

2.2 Esame Macroscopico

Il materiale inviato, orientato, deve essere adeguatamente fissato e processato secondo i protocolli in uso. L'esame macroscopico dei campioni di escissione o di mastectomia post-chemioterapia deve essere ese-

guito secondo le linee guida correnti e i margini inchiostrati secondo protocollo. Vi sono però alcune indicazioni specifiche riguardanti i casi sottoposti a trattamento neoadiuvante.

2.3 Campionamento del pezzo operatorio

Valutazione macroscopica del tumore residuo

- A. Nei casi con **risposta patologica completa** l'identificazione del letto tumorale può essere difficoltosa, di solito non si riconoscono noduli, ma piuttosto un'area a contorni mal definiti centralmente di aspetto edematoso e/o fibroso. È quindi necessario il campionamento di tutta l'area individuata, con sezioni contigue di 3-5 mm. In caso di posizionamento del repere va analogamente prelevata tutta l'area adiacente a esso. Utile ricordare che le microcalcificazioni associate alla neoplasia non scompaiono dopo chemioterapia, pertanto anche la radiografia del pezzo operatorio può facilitare il riconoscimento dell'area da campionare. È sempre consigliabile effettuare la valutazione con l'ausilio di radiogrammi e/o dati RNM pre-post-terapia.
- B. Nei casi con risposta patologica parziale il residuo di malattia può apparire nodulare, parzialmente sclerotico, o a focolai multipli che contornano un'area edematosa e/o sclerotica. Vanno descritte, misurate e campionate tutte le lesioni evidenti, se il residuo è inferiore a cm 3 va incluso in toto, se superiore a cm 3 viene consigliato ampio campionamento (possibilmente con l'inclusione in toto dell'area sospetta).

Per **lesioni multifocali** la procedura del campionamento deve essere eseguita su tutte le aree individuate. In ogni caso vanno prelevati i margini tra lesione residua ed il parenchima adiacente ad essa.

Vanno inoltre campionati:

1. I margini di exeresi orientati del pezzo operatorio
2. Il piano cutaneo, con prelievi multipli per i cT4b
3. il capezzolo e l'areola
4. Il parenchima a distanza

2.4 Campionamento del cavo ascellare

I linfonodi del cavo ascellare vanno prelevati e inclusi in toto in maniera analoga a quanto eseguito nei casi non preceduti da chemioterapia, insieme alle aree di addensamento fibroso presenti.

È stata segnalata una possibile riduzione del numero dei linfonodi isolati post chemio-terapia, rispetto a quanto si rinviene normalmente.

L'eventuale ricerca del linfonodo sentinella in fase di stadiazione pre-trattamento, creando una fibrosi cicatriziale, può rendere più difficile la ricerca linfonodale.

Lo stato linfonodale rimane un fattore prognostico dopo NAT

2.5 Esame microscopico

2.5.1 Valutazione istologica della mammella

Nella valutazione istologica bisogna tenere conto, che indipendentemente dal tipo di chemioterapico usato:

1. il tumore presenta nella maggioranza dei casi riduzione di volume di grado variabile, con fibrosi sostitutiva delle aree regredite. Il letto tumorale si presenta istologicamente come un'area di stroma vascolare jalino, con depositi di macrofagi schiumosi, linfociti ed emosiderofagi e assenza delle normali strutture duttali e lobulari. Possono essere presenti edema e necrosi; le calcificazioni persistono.
2. Dopo CT possono residuare sparsi foci di malattia nel letto tumorale; dopo terapia endocrina si osserva più spesso un'area centrale di fibrosi
3. per lo più la cellularità e l'indice mitotico appaiono ridotti a seconda dell'entità della risposta. La cellularità della neoplasia è valutata comparando il campione chirurgico con la biopsia pre -NAT quando possibile

ed è espressa come % di cellularità neoplastica rispetto al tessuto fibroso.

4. Per un calcolo della cellularità residua si può fare riferimento al sito web www.mdanderson.org/breast_cancer_RCB
5. la chemioterapia può indurre delle alterazioni regressive citologiche nelle cellule neoplastiche della componente infiltrante quali: - anisocitosi-vacuolizzazione citoplasmatica e nucleare - necrobiosi del citoplasma che assume aspetto “laccato”- aumento di volume dei nuclei con addensamento della cromatina e scomparsa dei nucleoli- picnosi nucleare. Le cellule neoplastiche residue conservano in ogni caso l'immunoreattività per le citocheratine (AE1-3, MNF116). Tali alterazioni possono inficiare la valutazione del grading, l'espressione dei recettori ormonali, del Ki-67 e di HER2.
6. Fenomeni di atrofia e di sclerosi possono essere presenti anche nelle unità duto-lobulari normali nel parenchima adiacente, più raramente queste presentano atipie cito-nucleari, che devono essere poste in diagnosi differenziale con il carcinoma in situ.
7. La componente di carcinoma in situ dimostra nella maggioranza dei casi scarsa risposta alla chemioterapia. Si possono notare atipie cito-nucleari chemioindotte da tener in considerazione specie nella diagnosi differenziale tra LCIS e DCIS
8. gli emboli neoplastici endovascolari sembrano rispondere poco alla chemioterapia e possono andare incontro alle modificazioni cito-nucleari su descritte.

2.5.2 Valutazione istologica dei linfonodi

Analogamente al tumore primitivo le metastasi linfonodali possono regredire parzialmente o totalmente. Le aree regredite si presentano con fibrosi, con depositi di macrofagi schiumosi e o emosiderofagi. Il residuo di malattia può presentare alterazioni morfologiche analoghe a quanto sopra descritto.

In alcuni casi può essere necessaria la valutazione immunohistochimica con citocheratine per residui minimi di malattia metastatica.

2.5.3 Valutazione dei fattori prognostici predittivi

Il grading rimane un fattore prognostico e deve essere confrontato con la core biopsy

Esistono discrepanze sul significato della rivalutazione dei fattori predittivi della malattia residua, quali positività per recettori estrogenici (ER), progestinici (PR) ed HER2. Infatti la loro espressione è notevolmente variabile a seconda delle casistiche. Inoltre gli stessi parametri possono essere di difficile valutazione sulla biopsia pre-chemioterapia.

In ogni caso è importante ripetere sempre la valutazione sulla malattia residua e confrontare i risultati con quanto rilevato nella biopsia pre-terapia neoadiuvante.

2.5.4 Recettori ormonali

La componente neoplastica residua mostra per lo più assetto recettoriale analogo a quello della neoplasia iniziale. Discrepanze possono essere ricondotte a deficit di campionamento dell'agobiopsia (eterogeneità della neoplasia) o a modificazioni chemioindotte con selezione di cloni con espressione diversa.

2.5.5 Espressione della proteina HER2

Vi sono discrepanze in letteratura; in alcuni studi è stata confermata, in altri ridotta l'espressione di HER 2 dopo NAT.

Modificazioni dell'espressione possono essere dovute a deficit del campionamento biotico, a eterogeneità del tumore, ma anche ad una down regolazione o selezione di cellule che non l'esprimono dopo trattamento con trastuzumab.

2.5.6 Espressione di Mib1/Ki-67

Viene modificato in modo statisticamente significativo dopo chemioterapia neoadiuvante. Di solito si assiste ad un marcato decremento della sua espressione. È stato proposto che tale parametro possa essere indicatore di risposta alla terapia ma non c'è accordo sul significato prognostico di tale decremento. Anche per la valutazione dell'indice proliferativo è utile il confronto con la core biopsy.

2.5.7 Quantificazione della regressione tumorale

Molteplici sono le proposte in letteratura per graduare il residuo neoplastico dopo chemioterapia, ma nessuna di esse sembra accogliere un consenso unanime.

I sistemi che quantificano la risposta sia sul tumore primitivo che sui linfonodi sembrano essere più attendibili nel predire l'outcome.

In ogni caso la valutazione del grado di risposta alla terapia deve essere sempre riportata nella diagnosi.

Il sistema elaborato da Pinder e ripreso dalle Linee Guida Europee IV Ed appare oggi quello più facilmente riproducibile e di maggior consenso nella comunità scientifica:

3. Risposta tumorale

1. risposta patologica completa (PCR): suddivisa in:

- (i) assenza di carcinoma residuo
- (ii) assenza di carcinoma infiltrante residuo ma presenza di carcinoma in situ

2. risposta patologica parziale (PPR): presenza di risposta parziale alla terapia suddivisa in:

- (i) minima malattia residua (inferiore del 10% della totale area neoplastica)
- (ii) presenza di residuo di neoplasia tra 10-50%
- (iii) residuo di malattia superiore al 50%

3. nessuna evidenza di risposta alla terapia: malattia stabile (**PSD**)

4. Risposta linfonodale

1. Non evidenza di metastasi né di modificazioni a carico del parenchima linfonodale
2. Non evidenza di metastasi con presenza di segni di risposta (fibrosi, etc) che indicano un down-staging legato alla chemioterapia neoadiuvante
3. Presenza di metastasi associate a segni di risposta
4. Presenza di metastasi senza segni di risposta

5. Stadiazione ypTnm

La misurazione del tumore infiltrante residuo è molto discussa, anche perché i parametri prognostici più importanti sono il grado di regressione e l'indice proliferativo della malattia residua.

- A. Se presente un'unica localizzazione residua vanno misurate le dimensioni ed il grado di regressione.
- B. in presenza di focolai multipli attorno o nel contesto dell'area di regressione, misurare il focolaio maggiore di cellule tumorali contigue segnalando la presenza di focolai multipli (possono essere classificati ypTx?)
- C. In caso di presenza di malattia residua costituita da isolate cellule tumorali nell'area di sclerosi o da residua angioinvasione con regressione completa del carcinoma infiltrante potrebbe essere utilizzato ypTX, associando il grado di regressione tumorale.

All'indicazione ypT deve essere sempre associato il grado di regressione.

Analoga valutazione andrebbe fatta sui linfonodi classificando come ypN0 linfonodi esenti da metastasi e assenti segni di risposta; ypN0 (PCR) linfonodi esenti da metastasi ma con segni di risposta; ypN (1, 2, 3) (PPR) linfonodi con metastasi e segni di risposta e come ypN (1, 2, 3) (PSD) linfonodi con metastasi senza segni di risposta.

REFERTAZIONE

1. presenza di carcinoma infiltrante/in situ con dimensioni, modificazioni morfologiche, istotipo e grading
2. multifocalità
3. immunofenotipo della neoplasia
4. presenza/assenza di angioinvasione
5. presenza di fibrosi e sue dimensioni ove possibile
6. presenza di necrosi e di infiltrato infiammatorio
7. stato dei margini
8. stato della cute
9. numero dei linfonodi repertati, numero dei linfonodi metastatici con/senza segni di regressione
10. ypTNM
11. grado di regressione del tumore e dei linfonodi

6. BIBLIOGRAFIA

1. AJCC Cancer Staging Manual, 7th Ed. 2010
2. European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis, Fourth Edition. Editors: Perry N, Broeders M, de Wolf C, Törnberg S, Holland R, von Karsa L, Puthaar E. 2006 – XVI, 416 pp.
3. Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast, College of American Pathologist (CAP); 2009
4. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. Goldhirsch A, Jngle G N, Gelber R D, Coates A S, Thurlimann B, Senn H-J, Panel Members. *Annals of Oncology* 2009; 20: 1319-1329
5. Pinder S E, Provenzano E, Earl H, Ellis I O. Laboratory handling and histology reporting of breast specimens from patients who have received neoadjuvant chemotherapy. *Histopathology* 2007; 50: 409-417
6. Sunati S., Lester S. Pathology of Breast Carcinomas after Neoadjuvant Chemotherapy: an overview with Recommendations on Specimen Processing and Reporting. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 2008; 133(4): 633-642
7. Rakha E A, Ellis I O. An overview of assessment of prognostic and predictive factors in breast cancer needle core biopsy specimens. *J Clin. Pathol* 2007; 60: 1300-1306
8. Yeh E, Slanetz P, Kopans DB, Rafferty E, Georgian-Smith D, Moy L, Halpern E, Moore R, Kuter I, Taghian A. Prospective comparison of mammography, sonography, and MRI in patients undergoing neoadjuvant chemotherapy for palpable breast cancer. *Am J Roentgenol* 2005; 184(3):868-877
9. Muna M Baslaim, Osama A Al Malik, Saif S Al-Sobhi, Ezzeldin Ibrahim, Adnan Ezzatc, Dahish Ajarim, Asma Tulbah, Mohammad A Chaudhary, Ralph A Sorbris. Decreased axillary lymphonode retrieval in patients after neoadjuvant chemotherapy. *Am, J Surg* 2002; 184, 299-301
10. Kaufmann M., Minckwitz G, Bear HD, Budzar A. Recommendations from an International expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: new perspective 2006. *Annals of Oncology* 2007; 18(12): 1927-1934
11. Gralow JR, Burstein HJ, Wood W, Hortobagyi GN, Gianni L, von Minckwitz G, Buzdar AU, Smith IE, Symmans WF, Singh B, Winer EP. Preoperative Therapy in invasive breast cancer: pathologic assessment and systemic therapy issues in operable disease. *Journal of Clinical Oncology* 2007; 26(5): 814-819
12. Newman LA, Pernik NL, Adsay v, Carolin KA. Histopathology evidence of tumour regression in the axillary lymphonodes of patients treated with chemotherapy correlates with breast cancer outcome. *Ann Surg Oncol* 2004; 10(7): 713-715
13. 2015 GIPAM recommendations *Pathologica* 2016;108:1-19
14. Pinder et al., Macroscopic handling and reporting of breast cancer specimens pre- and post-neoadjuvant chemotherapy treatment: review of pathological issues and suggested approaches *Histopathology* 2015; DOI: 10.1111/his.12649: 1-15.

