



Registro Tumori del Veneto

DOCUMENTO DI CONSENSO DEL GRUPPO REGIONALE PATOLOGI SCREENING MAMMOGRAFICO

Versione marzo 2012



A cura di:

Capitolo 1

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

Francesca Caumo (U.O. Radiologia, Centro Prevenzione Senologica – Marzana, Azienda ULSS n° 20 Verona, coordinatore Gruppo regionale radiologi screening mammografico)

Duilio Della Libera (U.O. Anatomia Patologica, Azienda ULSS n° 2 Feltre - BL)

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

Capitolo 2

Quirino Piubello (U.O.C. Anatomia Patologica d.O., Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata Verona)

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

Capitolo 3

Enrico Orvieto (U.O. Anatomia Patologica, Azienda Ospedaliera Padova)

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:

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

Coordinamento editoriale:

Carla Cogo

Alessandra Greco

Manuel Zorzi

Registro Tumori del Veneto

Registro Tumori del Veneto
Passaggio Gaudenzio, 1 – 35131 Padova
Tel. 049 8215605 Fax 049 8215983
centro.registrotumoriveneto@unipd.it
www.registrotumoriveneto.it

Documento elaborato e distribuito al Gruppo regionale patologi e radiologi screening mammografico nel novembre 2011
Revisione prevista: 2016

**INDICE**

Introduzione	1
CAPITOLO 1 - PROCEDURE DIAGNOSTICHE CITO-ISTOLOGICHE PRE-OPERATORIE	3
1 – Introduzione	4
2 – Uso delle tecniche diagnostiche preoperatorie	4
3 – Scelta della tecnica di campionamento	5
4 – Diagnostica istologica: refertazione delle agobiopsie (14 gauge) e agobiopsie vacuum-assisted	9
4.1 – Categorie diagnostiche	9
4.2 – Problemi e limiti diagnostici	14
4.3 – Lesioni rare	17
4.4 – Fattori prognostici	17
5 – Diagnostica citologica	17
5.1 – Uso dell’esame citologico (FNA)	17
5.2 – Modalità di prelievo	18
5.3 – Allestimento	18
5.4 – Informazioni cliniche	19
5.5 – Criteri citologici generali di benignità e malignità	19
5.6 – Refertazione	20
5.7 – Limiti	22
5.7.1 – Falsi positivi	22
5.7.2 – Falsi negativi	23
5.7.3 – Diagnosi di carcinoma duttale in situ (DCIS)	23
5.7.4 – Lesioni rare	24
6 – Bibliografia diagnostica cito-istologica pre-operatoria	25
7 – Controllo di qualità	29
8 – Bibliografia controllo di qualità	33
Allegato 1 – Richiesta di esame agobioptico (NCB)	34
Allegato 2 – Richiesta di esame citologico (FNA)	35
CAPITOLO 2 – PROCEDURE DIAGNOSTICHE DEL CAMPIONE OPERATORIO	36
1 – Esame macroscopico e campionamento del materiale chirurgico della mammella	37
2 – Invio del materiale chirurgico	37
2.1 – Fissazione in formalina	37
2.2 – Richiesta di esame istologico	37
2.3 – Integrità/Orientamento del campione	38
3 – Esame macroscopico del campione chirurgico	38
3.1 – Esame “esterno” del campione	38



3.2 – Marcatura dei margini chirurgici con inchiostro di china o tempere acriliche	38
3.3 – Sezionamento del pezzo e suo esame interno	39
3.4 – Esame radiologico del materiale chirurgico	39
3.5 – Campionamento	39
3.6 – Considerazioni generali	39
3.7 – Raccomandazioni specifiche in relazione ai differenti tipi di campione chirurgico	40
3.7.1 – Nodulesctomie o Biopsie chirurgiche “diagnostiche” o ampie escissioni terapeutiche/quadrantectomie (chirurgia mammaria conservativa)	40
3.7.2 – Allargamenti (Ri-Escissioni)	41
3.8 – Mastectomia	41
3.8.1 – Mastectomia “Nipple Sparing”	41
4 – Esame microscopico e diagnosi finale	42
5 – Bibliografia	43
Allegato 1 – Richiesta esame istologico campione operatorio	44
Allegato 2 - Marcatura dei margini e macro predefinita	45
Allegato 3 – Campionamento pezzo operatorio	46
Allegato 4 – Campionamento linfonodi ascellari	47
Allegato 5 – Check list refertazione	48
Allegato 6 – Diagnosi e refertazione delle lesioni mammarie	50
1 – Diagnosi e refertazione delle lesioni epiteliali proliferative	50
2 – Diagnosi e refertazione dei CDIS/DIN	52
3 – Carcinoma microinvasivo	52
4 – Diagnosi e refertazione del carcinoma invasivo	53
5 – Valutazione e refertazione dei dati prognostici/predittivi	53
Allegato 7 - Stadiazione Anatomo-patologica (TNM)	58
CAPITOLO 3 – LINFONODO SENTINELLA	60
Raccomandazioni per il management e la diagnosi anatomo-patologica	61
1 – Modalità di esecuzione	61
1.1 – Esame intraoperatorio	61
1.2 – Esame esclusivo in paraffina	62
1.3 – Esame ibrido (Criostato, Immunocitochimica e Paraffina)	62
2 – Refertazione	63
3 – Commenti aggiuntivi	64
4 - Bibliografia	65
Allegato 1 – Procedura esame del linfonodo sentinella	66
CAPITOLO 4 – TECNICHE SPECIALI	68
1 – Introduzione	69
2 – Fase preanalitica	70



2.1 – Tissue handling	70
2.2 – Tipo di fissazione	70
2.3 – Durata della fissazione	70
2.4 – Antigen retrieval	70
3 – Recettori steroidei (ER, PR)	70
3.1 – Fase analitica	70
3.1.1 – Scelta del clone	70
3.1.2 – Controlli di reazione	70
3.2 – Fase postanalitica	71
3.2.1 – Interpretazione dei risultati	71
3.2.2 – Refertazione	71
4 – Marcatore di proliferazione Ki-67	72
4.1 – Fase analitica	72
4.1.1 – Scelta del clone	72
4.1.2 – Controlli di reazione	72
4.2 – Fase postanalitica	72
4.2.1 – Interpretazione dei risultati	72
4.2.2 – Refertazione	72
5 – HER2	72
5.1 – Fase analitica	72
5.1.1 – Scelta del clone	72
5.1.2 – Controlli di reazione	72
5.2 – Fase postanalitica	72
5.2.1 – Interpretazione dei risultati	72
5.2.2 – Refertazione	73
6 – Tecniche di ibridazione in SITU: FISH, CISH, SISH	73
6.1 – FISH	74
6.2 – CISH	74
6.3 – SISH	75
6.4 – Polisomia del cromosoma 17	75
7 – Controllo di qualità	76
7.1 – Controllo positivi interni	76
7.2 – Controlli positivi esterni	76
8 – Bibliografia	77
CAPITOLO 5 – PROCEDURE DIAGNOSTICHE DEL CAMPIONE OPERATORIO DOPO CHEMIOTERAPIA NEOADIUVANTE	80
1 – Diagnostica pretrattamento chemioterapico primario	81
1.1 – Valutazione del tumore	81
1.1.1 – Modalità di prelievo	81
1.1.2 – Valutazione della cute	81
1.2 – Valutazione dello stato dei linfonodi	81
1.3 – Marcatura del tumore	82
1.4 – Valutazione istologica del campione bioptico	82



2 – Diagnostica dopo chemioterapia primaria	82
2.1 – Notizie cliniche	83
2.2 – Esame macroscopico	83
2.3 – Campionamento del pezzo operatorio	83
2.4 – Campionamento del cavo ascellare	84
2.5 – Esame microscopico	84
2.5.1 – Valutazione istologica della mammella	84
2.5.2 – Valutazione istologica dei linfonodi	85
2.5.3 – Valutazione dei fattori prognostici predittivi	85
2.5.4 – Recettori ormonali	85
2.5.5 – Espressione della proteina HER2	85
2.5.6 – Espressione di Mib1/Ki-67	85
2.5.7 – Quantificazione della regressione tumorale	85
3 – Risposta tumorale	86
4 – Risposta linfonodale	86
5 – Stadiazione ypTNM	86
6 – Bibliografia	88



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);
- 5 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.registrotumoriveneto.it/screening/gpv/home.asp?p=home>

La seconda 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 Gruppo regionale dei radiologi dello screening, 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, su cui stanno lavorando le ULSS della nostra Regione, proponendo un riferimento in termini di appropriatezza e di corretta gestione delle sempre più modeste risorse.

Inoltre, sulla scia della auspicata istituzione delle Breast Units, intese come strumento strategico finalizzato all'approccio multidisciplinare, questo documento rappresenta un possibile 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 anche gli altri 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 capitolo secondo “*Procedure diagnostiche del campione operatorio*” è stata approfondita la problematica dei margini, in particolare per alcuni tipi di intervento chirurgico (ad esempio nipple sparing mastectomy), che si sono affermati negli ultimi anni;
- il capitolo terzo “*Linfonodo Sentinella*” è stato profondamente rivisitato, prendendo come riferimento il protocollo della Regione Emilia-Romagna e precisando limiti e vantaggi delle varie opzioni disponibili (esame intraoperatorio e/o su tessuto fissato);
- 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;
- 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). Anche in questo caso, la collaborazione con le altre discipline è fondamentale per la qualità dell’output.

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



CAPITOLO 1

Procedure diagnostiche cito-istologiche pre-operatorie

Revisione a cura di:

Francesca Caumo (U.O. Radiologia, Centro Prevenzione Senologica – Marzana, Azienda ULSS n° 20 Verona, coordinatore Gruppo regionale radiologi screening mammografico)

Duilio Della Libera (U.O. Anatomia Patologica, Azienda ULSS n° 2 Feltre - BL)

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

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



1. INTRODUZIONE

In patologia mammaria la diagnosi patologica eseguita con procedure non operatorie consente in generale di pervenire ad un corretto inquadramento diagnostico necessario per programmare un adeguato 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 bioptica 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 (Vacuum Assisted Needle Core Biopsy/VANCB/VAB). L'utilizzo delle metodiche MIB ha comportato negli anni il passaggio dalla citologia alla microistologia con un incremento della specificità e 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 bioptici e operatori con l'adozione di definite checklist 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), inquadramento 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).

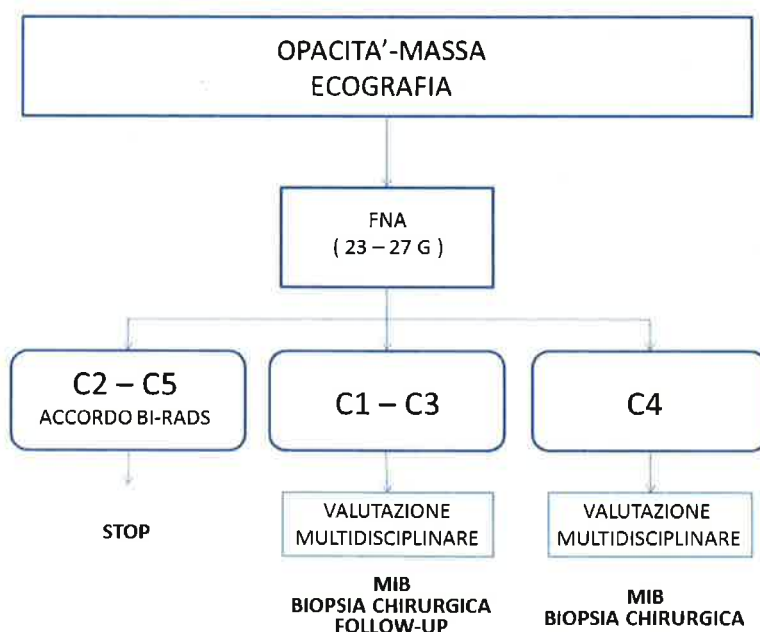


Nei casi in cui non si raggiunga un consenso unanime dopo discussione multidisciplinare, è auspicabile la ripetizione della MIB o procedere ad una biopsia chirurgica escissionale (1).

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 il ricorso alla **citologia agoaspirativa mediante ago sottile (FNA)** va riservato alle lesioni mammarie formanti massa, che siano clinicamente o ecograficamente evidenti. 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.

Figura 1: Flow chart percorso diagnostico preoperatorio per lesioni formanti massa/opacità



In generale l'accuratezza del prelievo con ago sottile 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 architetturale del tessuto e pertanto richiedono un'interpretazione che non può prescindere dalla conoscenza istologica delle lesioni mammarie e quindi di un'adeguata preparazione professionale e di conseguenti controlli di



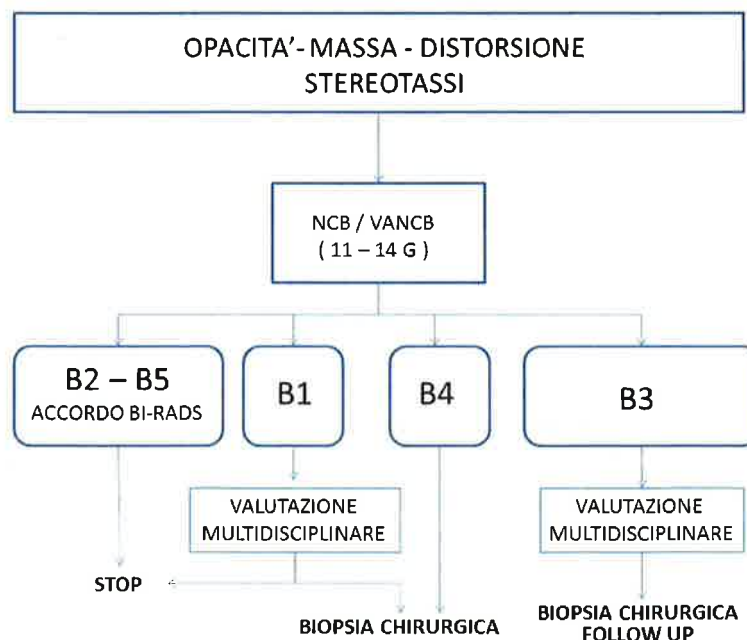
qualità. Per questo motivo presenta maggiori problemi rispetto alla microistologia a correlarsi al quadro radiologico, alla difficoltà diagnostica tra lesioni benigne proliferanti e carcinomi ben differenziati (11, 12, 13, 14) portando talora ad un certo grado di incertezza procedurale con la necessità di ulteriori richiami radiologici e conseguentemente a costi complessivamente superiori all'agobiopsia (10).

La **Biopsia percutanea preoperatoria** rappresenta la metodica diagnostica maggiormente utilizzata in campo senologico per la buona tollerabilità della metodica, l'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 immunoistochimici e molecolari. In caso di malignità consente, oltre a caratterizzare al meglio la malignità della neoplasia in termini di istotipo, grading e fattori prognostici anche biologici utili in caso di terapia adiuvante (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 (NBC) si riserva a lesioni formanti massa, aree di opacità e addensamenti parenchimali o grossi cluster di microcalcificazioni. Cluster di microcalcificazioni sospette, classificate come R4, o aree di distorsione parenchimale vengono generalmente avviate all'agobiopsia con aspirazione automatica (VANCB/VAB) che consente l'asportazione stereotassica di un'ampia area tessutale sede della lesione (15, 16).

La **Needle Core Biopsy (NBC)** 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 cinque agobiopsie per lesioni formanti massa e dieci per microcalcificazioni sono il numero che presenta la più alta concordanza con la biopsia a cielo aperto (16a, 17).

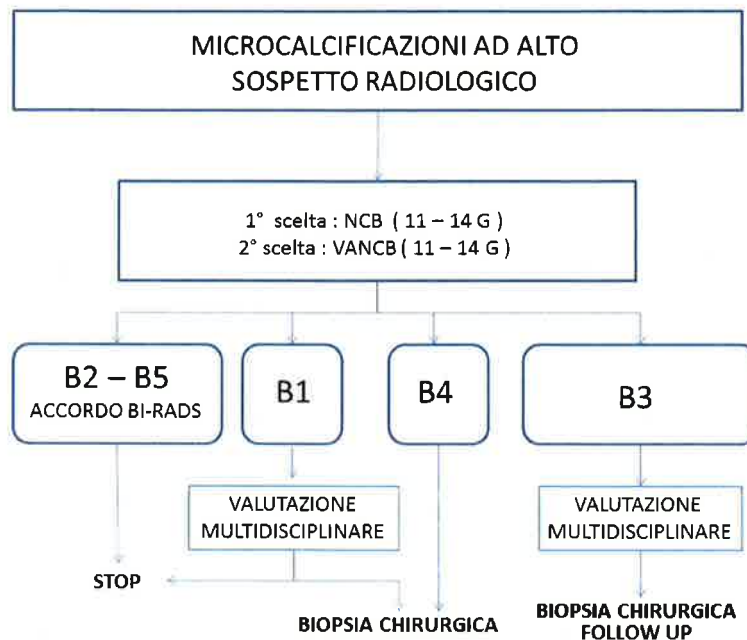
Figura 2: Flow chart percorso diagnostico preoperatorio per lesioni formanti massa/opacità/distorsione





L'interpretazione del materiale agobioptico 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.

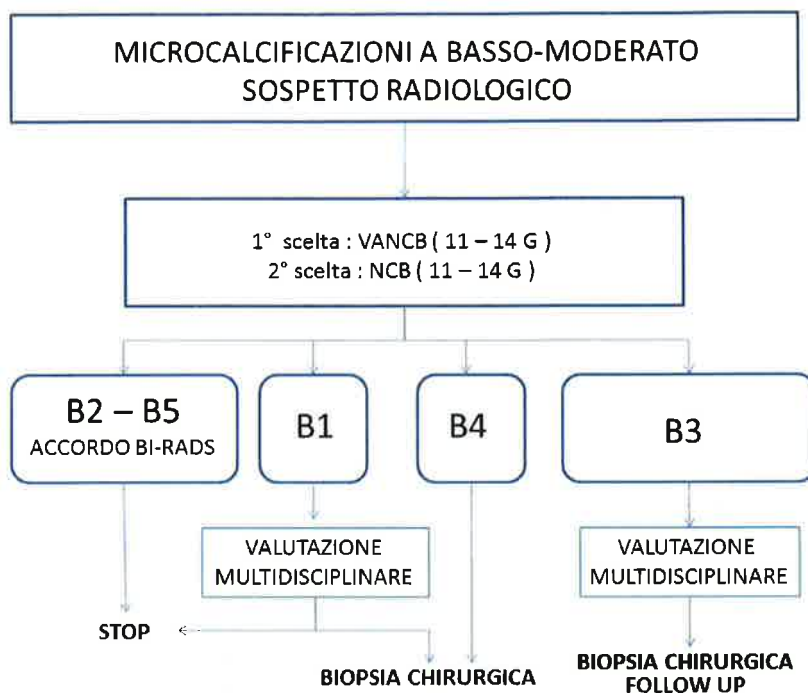
Figura 3: Flow chart percorso diagnostico preoperatorio per micro calcificazioni ad alto sospetto radiologico



La tecnica della MIB mediante **agobiopsia vacuum assisted (VANCB/VAB)** trova l'indicazione elettiva nei casi con clusters di microcalcificazioni sospette o dubbie (classificazione R4) talora di piccole dimensioni, ove è richiesta l'asportazione di una maggior quantità di tessuto mammario per una diagnosi accurata e nei casi in cui la NCB abbia fallito.



Figura 4: Flow chart percorso diagnostico preoperatorio per micro calcificazioni con sospetto radiologico basso-moderato



La metodica può essere impiegata anche per la valutazione di aree mammarie con aspetti di distorsione parenchimale. La tecnica del prelievo prevede l'utilizzo di una guida biottica (probe), posizionata e centrata con controllo mammografico stereotassico sull'area lesionale. La guida biottica 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 VANCB/VAB presenta una notevole accuratezza diagnostica, in particolare nelle lesioni 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.



4. DIAGNOSTICA ISTOLOGICA: REFERTAZIONE DELLE AGOBIOPSIE (14 GAUGE) E AGOBIOPSIE VACUUM-ASSISTED

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 delle biopsie
- La presenza di calcificazioni

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

Le biopsie vanno fissate immediatamente dopo la radiografia. Si raccomanda di mettere al massimo 4 agobiopsie da 14 gauge per cassetta e 2 da vacuum assisted per cassetta. 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 seriatura del blocchetto.

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 e 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.

Dal punto di vista radiologico le calcificazioni sono classificate in base alle loro dimensioni, forma, distribuzione, topografia e numero. Dal punto di vista patologico assume particolare interesse la loro composizione fisico-chimica e affinità tintoriale correlate alla loro eziopatogenesi, alla forma, alla dimensione e localizzazione. In generale le calcificazioni mammarie derivano dalla deposizione di sali di calcio su secreti ghiandolari o materiale cellulare necrotico. Sono descritte due tipologie di calcificazioni. Il **tipo 1**, il meno frequente, è costituito da materiale cristallino di ossalato di calcio che forma cristalli trasparenti non facilmente visibili in ematossilina eosina se non con esame in luce polarizzata o ricorrendo all'artificio di esaminare il preparato chiudendo il diaframma del microscopio senza il condensatore. Questo tipo di calcificazione non si associa generalmente al carcinoma mammario nelle sue forme intraduttali e infiltranti e tende a localizzarsi nei piccoli dotti terminali delle unità duttulo-lobulari mammarie o nelle cisti apocrine. Le calcificazioni di **tipo 2** sono costituite da cristalli di fosfato di calcio che, a differenza delle precedenti, sono facilmente visibili al microscopio ottico come depositi intensamente ematossilinofili di differente forma e dimensione e sono associate ad un'ampia gamma di lesioni mammarie benigne e maligne.

La prima distinzione fra le varie calcificazioni mammarie viene fatta in base alle dimensioni. Si definiscono infatti macrocalcificazioni sopra i 2 mm e microcalcificazioni sotto 1 mm di diametro. Per quanto riguarda la correlazione con i relativi quadri morfologici le **macrocalcificazioni** sono generalmente associate ad alterazioni benigne per lo più correlate a fenomeni di liponecrosi o a fibroadenomi di vecchia data. Per quanto riguarda le microcalcificazioni, pur associandosi ad un'ampia gamma di lesioni mammarie, in circa 1/3 dei casi sono correlate al carcinoma mammario. La classificazione BIRADS di queste **microcalcificazioni** suddivide le diverse forme in tre categorie, tipicamente benigne, tipicamente maligne e intermedie o amorfe.

Il riscontro nel materiale da MIB di **microcalcificazioni tipicamente benigne** 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 condizione fibrocistica e a certe lesioni a cellule colonnari come la blunt duct adenosis



Le **microcalcificazioni amorphe 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 in lesioni adenosiche (adenosi sclerosante), a cellule colonnari (con o senza atipia) e meno frequentemente nelle forme di iperplasia duttale.

Le microcalcificazioni descritte spesso sono presenti in cluster o ammassi 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 a cellule colonnari. 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 tubuli forme 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'intervento agobiottico soprattutto in caso di VANCB 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 biopsia, 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 VANCB, può sottostimarne il reale valore se valutato solo sulla neoplasia residua dopo la procedura agoaspirativa. In questi casi è consigliata una valutazione comparativa fra le dimensioni tumorali nell'imaging diagnostico, nel campione operatorio all'esame macroscopico e 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 immunistochimica, sia presente una adeguata conclusione diagnostica con il riferimento al sistema



di refertazione adottato è quello proposto dalle Linee Guida Europee (59, 60) e dall'AFIP (65). Tale sistema, al fine di uniformare le formulazioni diagnostiche in cinque categorie correlate in modo univoco a condotte terapeutiche standardizzate.

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 costituiti unicamente da tessuto fibroadiposo costituiti da tessuto mammario normale (lobuli ghiandolari e tessuto stromale) 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 radiologicamente sospetta o se il prelievo sia da ritenersi non rappresentativo e quindi inadeguato.

Campionare ad esempio un amartoma mammario porta ad un tessuto mammario organoide che pur rappresentativo della lesione sembra non rispondere ai requisiti dell'adeguatezza a meno di non correlare adeguatamente il dato morfologico agli aspetti radiologici e ecotomografici.

B2 - Lesione benigna

Questa categoria diagnostica comprende tutte le lesioni benigne della mammella, dal fibroadenoma all'adenosi sclerosante sino all'epiteliosi florida, alle alterazioni fibro-cistiche e alla steatonecrosi. Anche in questo caso la valutazione multidisciplinare risulta fondamentale per stabilire la corrispondenza dell'aspetto istologico al quadro clinico-mammografico.

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 lesioni proliferative epiteliali papillari, sclerosanti, il tumore fillode, le lesioni mucocele-like e una serie di lesioni con incrementato rischio di progressione neoplastica (proliferazioni intraduttali atipiche, l'atipia epiteliale piatta/DIN 1a e la neoplasia lobulare intraepiteliale/LIN). Globalmente le lesioni mammarie classificate come B3 presentano un valore predittivo positivo nei confronti del carcinoma mammario del 25%.

1. **Lesioni papillari** costituiscono un gruppo eterogeneo di lesioni a fisionomia 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 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 citoarchitetturali (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 (61, 62).

2. **Lesione focale scleroelastotica/epiteliosi infiltrativa** caratterizzata dal dato radiologico de lla distorsione parenchimale che si traduce nella maggioranza dei casi in cicatrici sclero-elastotiche o di epiteliosi infiltrativa in cui la frammentazione dei campioni non consente una valutazione unitaria della struttura lesionale e della completezza della sua escissione.
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 accidentale in corso di MIB condotto per alterazioni radiologiche di altra natura e può presentare rischi di malattia differente a seconda sia diagnosticato in frustoli agobiottici o in campioni operatori di maggiori dimensioni (31). In alcuni casi la morfologia di una LIN si pone in diagnosi differenziale con forme solide di DCIS magari con aspetti di cancerizzazione lobulare. In questi 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 atypia e proliferazione epiteliale atipica di tipo duttale**. In questo gruppo vanno incluse le forme di lesioni a cellule colonnari con atypia o FEA (Flat Epithelial Atypia; atypia epiteliale piatta) e le proliferazioni epiteliali atipiche di tipo duttale (iperplasia duttale atipica). Tale termine va preferito rispetto a quello d'iperplasia duttale atipica che, per definizione, richiede per la sua definizione diagnostica criteri morfologici e dimensionali che vanno valutati 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'epiteliosi (iperplasia duttale florida di tipo usuale – UDH). In caso di FEA dopo VABB su focolaio di micro calcificazioni di piccole dimensioni (R3) è possibile, dopo discussione multidisciplinare, evitare l'intervento chirurgico (follow-up da discutere in sede multidisciplinare) (61, 63).
5. **Tumore Filloide**. 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.

I casi classificati come B3 dovrebbero essere oggetto di valutazione multidisciplinare con una stretta correlazione fra dato patologico e radiologico. La maggior parte di questi casi in generale si associa a microcalcificazioni di aspetto benigno o comunque a basso rischio radiologico. In caso di FEA dopo VABB su focolaio di micro calcificazioni di piccole dimensioni (R3) è possibile, dopo discussione multidisciplinare, evitare l'intervento chirurgico, mentre casi B3 in pazienti con proliferazione epiteliale atipica di tipo duttale o microcalcificazioni a elevato rischio radiologico dovrebbero indurre a successivi approfondimenti diagnostici chirurgici.

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

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 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. Per la loro classificazione inoltre è consigliato di utilizzare anche la terminologia DIN (Neoplasia Intraepiteliale Duttale) come proposto dallo IARC 2003, AFIP 2009 e AJCC 2010 proponendo per ogni caso la doppia terminologia. Si raccomanda di riservare la diagnosi di DIN3 alle forme di neoplasie intraduttali comedoniche e di graduare anche le forme intraduttali papillari per la loro tendenza ad estendersi oltre il limite definito dall'estensione delle microcalcificazioni. Infine nel 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 immunoistochimico, è opportuno da riportare in diagnosi come dato accessorio. La classificazione della neoplasia come carcinoma microinvasivo per definizione necessita l'esame dell'intero campione operatorio.

Il materiale biptico da MIB risulta infine idoneo allo studio immunoistochimico 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 architetturali 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 mima 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 agobiottici. Bisogna porre molta attenzione nel non enfatizzare minimi gradi di atipia che possono rappresentare UDH o metaplasia apocrina da classificare nella categoria B1. Gradi severi di atipia possono rappresentare la cancerizzazione del lobulo da parte di un DCIS di alto grado.

Alterazioni a cellule colonnari con o senza atipia epiteliale piana (flat atipia: WHO, 2003)

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 2003 della classificazione del WHO esse sono state definite come "lesioni epiteliali piane con atipia di basso grado" (40).

L'interesse per le lesioni a cellule colonnari in patologia mammaria, strettamente correlate alla somministrazione di prodotti estrogenici, è legato alla presenza di microcalcificazioni granulari o di tipo psammomatoso entro lobuli dilatati che mammograficamente risultano come cluster di microcalcificazioni a basso rischio radiologico. Costituiscono un gruppo eterogeneo di lesioni che spaziano da forme di iperplasia a cellule colonnari senza atipia (assenza di atipie citologiche e di tufting) classificate come B2, di iperplasia a cellule colonnari con atipia (cellule atipiche con tufting focale e pluristratificazioni cellulari) classificate come B3 fino a giungere al DCIS di basso grado che comprende forme come il cribriforme ed il micropapillare classificate come B5.

Atipia apocrina e DCIS apocrino

L'atipia apocrina soprattutto se associata a lesione sclerosante può essere di difficile interpretazione su materiale agobiottico: 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 fuse

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 associata 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.

Lesioni mucocele-like

È opportuno classificarle come B3 perché possono essere associate a ADH, DCIS e a forme di carcinoma invasivo.



4.3 LESIONI RARE

Linfoma

Il linfoma N.H di basso grado può essere di difficile inquadramento su materiale agobiottico. 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) ed i marcatori immunoistochimici prognostici (ER, PgR, Ki-67, HER2) (46, 47) possono essere eseguiti su materiale agobiottico ma andrebbero limitati ai pazienti candidati a chemioterapia neoadiuvante. Infatti è preferibile eseguire tali determinazioni su materiale chirurgico.

5. DIAGNOSTICA CITOLOGICA

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 biottiche (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 architetturale delle lesione. 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 intramammari 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 punga 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 continuamente 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 fibroadeoma. Variazioni della morfologia cellulare sono dovute alla presenza di cellule colonnari, cuboidali o piatte e alle modificazioni apocrife 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 mucoide 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 metaplastico e fillode maligno.



6. BIBLIOGRAFIA DIAGNOSTICA CITO-ISTOLOGICA PRE-OPERATORIA

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. Dowlathshahi 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 lesions. *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. Stereotaxic 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 stereotaxic 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;340:430-6.
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, Stamatakis 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, Pennechi 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



7. CONTROLLO DI QUALITA'

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-operatorie. 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 QUALITA'

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.

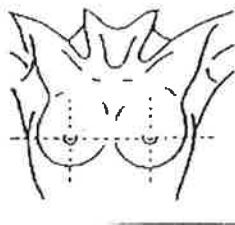


ALLEGATO 2
RICHIESTA DI ESAME CITOLOGICO DELLA MAMMELLA (FNA)

- 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

Note



CAPITOLO 2

Procedure diagnostiche del campione operatorio

Revisione a cura di:

Quirino Piubello (U.O.C. Anatomia Patologica d.O., 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 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) in questi casi raccomandano, per motivi di ordine legale, 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 istologici e immunofenotipici (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.**

2.1 Fissazione in formalina

Qualora non sia possibile inviare rapidamente il materiale chirurgico presso l'Anatomia Patologica, esso va posto subito in adeguato contenitore con quantità sufficiente di formalina tamponata (il pezzo chirurgico deve essere completamente immerso in una quantità di fissativo pari a 2 o 3 volte il volume del pezzo stesso). **La corretta fissazione è un momento cruciale del percorso di processazione istologica: i diversi operatori coinvolti devono pertanto concordare tutti gli accorgimenti atti a garantire che essa risulti immediata, adeguata e completa.**

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)

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 1 campione.

3. ESAME MACROSCOPICO DEL CAMPIONE CHIRURGICO

L'esame macroscopico ha come obiettivo finale la produzione di una descrizione macroscopica che comprenda la valutazione del campione chirurgico e la descrizione delle modalità seguite nel suo campionamento. Esso costituisce un passo importante nella diagnosi anatomopatologica: un esame macroscopico non corretto o una descrizione deficitaria porteranno necessariamente a una diagnosi errata o incompleta. L'esame macroscopico si compone di varie fasi:

3.1 Esame "esterno" del campione

Il Patologo dovrà annotarne le seguenti caratteristiche:

- le tre dimensioni
- il peso (soprattutto in caso di ampie biopsie pro diagnosi)
- la presenza di reperi chirurgici per l'orientamento
- la consistenza

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 escissioni, 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 pezzo e suo esame interno

I pezzi 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
- aspetto della/e lesione/i: consistenza, colore, margini arrotondati/sfrangiati, eventuale riscontro macroscopico di necrosi, emorragia, calcificazioni
- 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:

- dimensioni del pezzo 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) 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; buona norma campionare anche il tessuto apparentemente sano interposto per verificare istologicamente che le lesioni siano effettivamente separate.



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**. 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 radiografati per accertarsi che microcalcificazioni non siano presenti nello spessore di tessuto incluso, non raggiunto dalla sezione esaminata microscopicamente.
- 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 pezzi 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.



3.7.2 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 repere sul versante ascellare.
- B. Come già specificato (paragrafo 3.3), i pezzi chirurgici di mastectomia non devono essere posti a fissare interi, poichè 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), 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 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 (2003).

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" (pag. 267) e relative note esplicative (pagg. 268-294) delle Linee Guida Europee (1) (allegati 5 e 6)

Il referto microscopico

In sintesi il referto microscopico dovrà contenere:

- Diagnosi della patologia principale, comprensiva di:
 - istotipo tumorale sec. WHO 2003
 - grado di differenziazione (sec. Elston-Ellis per forme invasive, sec. WHO 2003 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.



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. Protocollo diagnostico-terapeutico dello screening per la diagnosi precoce del tumore della mammella nella regione Emilia Romagna 3° edizione 2008
3. Requisiti minimi e standard di refertazione per carcinoma della mammella, SIAPEC Piemonte - Rete Oncologica, 2009
4. Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast, College of American Pathologist (CAP) 2009
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. Holland R, Peterse JL, Millis RR, Eusebi V, Faverly D, van de Vijver MJ, Zafrani B. Ductal carcinoma in situ – a proposal for a new classification. Seminars in diagnostic Pathology 1994; 11: 167-80
8. Tavassoli FA. Pathology of the breast. Appleton & Lange. Stamford 1999.
9. Sobin L, Gospodarowicz M, Wittekind Ch (eds). UICC TNM classification of malignant tumours, 7th edition. John Wiley and Sons Inc., New York, 2010
10. World Health Organisation. Classification of tumours. Tumours of the breast and Female genital organs (Lyon, France: IARC press) 2003.
11. Pathology reporting of breast disease. NHSBSP Pub. N° 58. January 2005.



ALLEGATO 1

Richiesta esame istologico campione operatorio

Data, _____

RICHIESTA ESAME ISTOLOGICO MAMMELLA

NOSOGRAFICA/
Dati anagrafici

- AMBULATORIALE
- DIVISIONALE
- L.P.
- RICOVERO
- ORDINARIO
- D.H.

DATI ANATOMIA
PATOLOGICA

- MATERIALE IN ESAME ESAME STANDARD
 ESAME ESTEMPORANEO

- 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

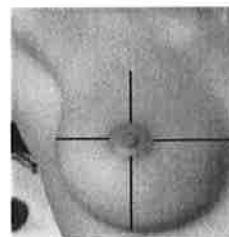
REFERTI ALLEGATI:

- Esame senologico
- FNAB, istologia precedente
- Mammotome
-

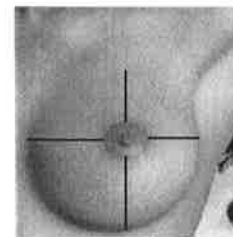
ALLEGATO RX PEZZO OPERATORIO

TIPO DI INTERVENTO

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



DESTRA



SINISTRA

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****SCHEDA 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 Dimensioni _____ mm x mm x mm

Procedura linfonodale _____ Non linfonodi _____

LN sentinella _____ Svuotamento ascellare _____

LESIONI BENIGNE PRESENTI

Lesione sclerosante complessa/cicatrice sclero-elastotica

Papilloma solitario

Mastite periduttale/ectasia duttale

Papillomi multipli

Fibroadenoma

Adenosi sclerosante

Modificazioni a cellule colonnari

Malattia fibrocistica

Cisti solitaria

Altro (specificare) _____

PROLIFERAZIONE EPITELIALE

Assente

Presente senza atipia

Presente con atipia duttale

Presente con neoplasia lobulare

Modificazioni a cellule colonnari con atipia (atipia piatta)

LESIONI MALIGNI NON INVASIVE

Assente

Duttale (DCIS) - Grado sec. WHO 2003:

alto (DIN3) intermedio (DIN2)

basso (DIN 1c) non definibile

Modello/i di crescita _____

Tipo di cellula _____

Estensione (solo duttale) _____ mm

Malattia di Paget

Lobulare (LCIS) - Grado sec. Tavassoli:

LIN1

LIN2

LIN 3



MICROINVASIONE

Assente Presente Possibile

LESIONI MALIGNE INVASIVE

Assente

ISTOTIPO:

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Duttale/non altrimenti specificato (NAS) | <input type="checkbox"/> Carcinoma tubulare |
| <input type="checkbox"/> Carcinoma mucinoso | <input type="checkbox"/> Carcinoma lobulare |
| <input type="checkbox"/> Carcinoma midollare | <input type="checkbox"/> Misto (segnalare gli istotipi presenti) |
| <input type="checkbox"/> Non classificabile | |
| <input type="checkbox"/> Altro carcinoma primitivo (specificare) _____ | |
| <input type="checkbox"/> 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

- Si No
- Positivi, numero _____ Totale, numero _____
- Metastasi
- Micrometastasi
- Cellule tumorali isolate

ALTRI LINFONODI PRESENTI

- Si 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)

**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; epiteliiosi)

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 /DIN 1B

Nella classificazione WHO 2003 l'iperplasia duttale atipica/DIN 1B 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 ben differenziato/DIN 1C.

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

L'iperplasia lobulare atipica e il carcinoma lobulare in situ (CLIS) sono stati sempre tradizionalmente tenuti separati ma purtroppo la classificazione WHO 2003 le raggruppa. Atteggiamento pratico è quello di dare un grading alla LN seguendo i criteri del gruppo della Tavassoli (LIN I, II, III) 8. È talvolta difficile separare LN da CDIS/DIN IC solidi ben differenziati. 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) (epiteliiosi incipiente)
- Modificazioni a cellule colonnari con atipia citologica (atipia epiteliale piatta/DIN 1A)

Tabella 1 - Diagnosi differenziale epiteliosi e DIN1b&c (modificata dalle Linee Guida Inglesi per la Patologia Mammaria da Screening 2005)

	Epiteliosi	Iperplasia duttale atipica /DIN IB	Carcinoma duttale in situ a basso grado/DIN IB
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/DIN

Classificazione del carcinoma duttale in situ (CDIS/DIN)

Per la classificazione ci si deve riferire a quella della WHO 2003 che segue due linee. Una è quella del DIN, l'altra è praticamente la riedizione della classificazione di Holland (7).

Grado di differenziazione: questo è comune sia al sistema DIN che DCIS, e 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/DIN presenta un grado di differenziazione variabile da area ad area. In questi casi il CDIS/DIN 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 anatomo-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. Tuttavia 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 Duttale Invasivo non Altrimenti Specificato (Non Speciale) (CI NAS)

Questo gruppo, che rappresenta la maggior parte dei CI, comprende tutti i carcinoma duttali 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 NAS 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

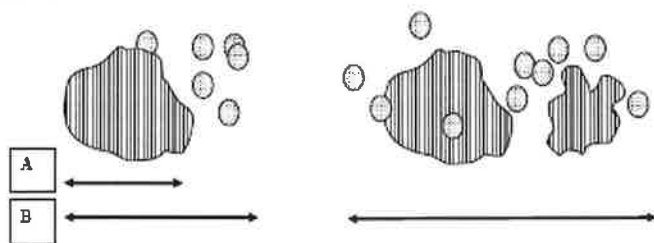
LN è spesso multifocale e la misurazione della sua estensione è poco realistica, nonchè poco utile ai fini prognostici. **Solo il CDIS/DIN deve essere misurato.**

Tuttavia la misurazione del CDIS/DIN 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/DIN 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/DIN 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

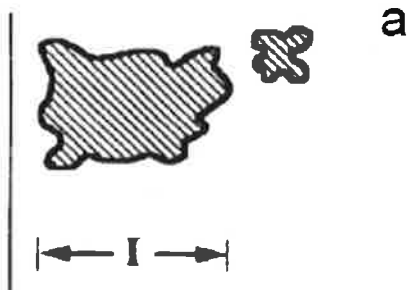
Il CI deve essere misurato come indicato sopra. Tuttavia se il CI è associato a CDIS e quest'ultimo si estende a oltre 1 mm dalla periferia della componente invasiva, occorrerà indicare sia le dimensioni del CDIS che quelle del nodulo tumorale complessivo di tutte e due le componenti (vedi fig.1)

FIGURA 1

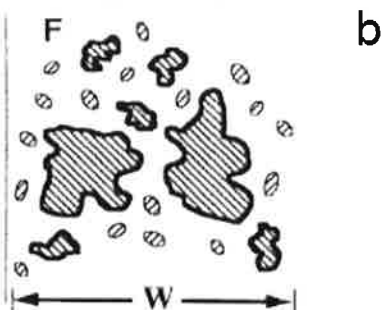


A = dimensioni carcinoma invasivo B = dimensioni totali del tumore

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



Focolai multipli di invasione inseriti 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

1. >75% del tumore forma tubuli
2. 10-75% " " " "
3. <10% " " " "

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

Caratteristiche Nucleari (Pleomorfismo)

Punteggio

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



CAPITOLO 3

LINFONODO SENTINELLA

Revisione a cura di:

Enrico Orvieto (U.O. Anatomia Patologica, Azienda Ospedaliera Padova)

Questo protocollo adotta interamente 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

http://www.saluter.it/wcm/screening_femminili/sezioni/regionale/documentazione/collane_regionali/pubblicazioni/par_01/contributi/par_1/PDTmammella_2011.pdf



Raccomandazioni per il management e la diagnosi anatomico-patologica

I linfonodi sentinella (sn) 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 (sn) sono più frequentemente ascellari e solo occasionalmente appartengono ad altri distretti. La definizione del linfonodo sentinella (sn) 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).

1. MODALITÀ DI ESECUZIONE

I sn individualmente definiti come tali, devono essere identificati separatamente e chiaramente etichettati. Tre modalità di esami di linfonodi sono previste:

1. Esame esclusivamente criostatico: tutto il sn viene esaurito durante l'esame intraoperatorio su sezioni criostatiche.
2. Esame esclusivamente in paraffina: il sn viene fissato in formalina ed incluso in paraffina, secondo il protocollo descritto in seguito.
3. Esame ibrido: in parte criostatico ed in parte su tessuto in paraffina: il sn 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 sn vanno inviati privi di fissativo, immediatamente dopo l'asportazione, al laboratorio di Anatomia Patologica.

Se non viene richiesto l'esame estemporaneo al criostato i sn 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 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.

1.1 Esame intraoperatorio

È necessario valutare sempre il sn 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 sn durante l'esame intraoperatorio può essere eseguito con sezioni criostatiche (FS) ed anche talvolta con citologia da apposizione (IC).



- 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.
- 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 sn 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 di recente introduzione 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.

- Se le dimensioni lo permettono, il sn va sezionato in campioni di 2 mm, perpendicolarmente all'asse longitudinale del linfonodo.
- Tutti i sn 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 eseguono due sezioni seriate, un viene colorata con ematossilina-eosina e la seconda con metodica immunoistochimica 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 sn 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 SN deve essere esaminato in toto (**Protocollo Regione Emilia Romagna 2008: allegato 1**).
In alternativa si può effettuare la seriatura a livelli di 200 micron da apporre su vetri trattati per immunoistochimica, 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 sn 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):

- a) macrometastasi = metastasi con asse maggiore >2 mm [pN1(sn)].
- b) micrometastasi = metastasi con asse maggiore compreso tra 0,2 e 2 mm, in qualsiasi delle tre dimensioni [pN1 mi(sn)]
- c) 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 SN 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 sn 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 sn, ma persiste il rischio, per ognuna di esse, di mancata identificazione di alcune metastasi del linfonodo.



4. 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

**ALLEGATO 1****PROCEDURA ESAME DEL LINFONODO SENTINELLA**

Estratto da "Raccomandazioni su alcuni aspetti riguardanti le procedure di Anatomia Patologica, Chirurgiche e per la Terapia Medica adiuvante nella tecnica del Linfonodo Sentinella nel carcinoma della mammella"

(http://anpat.drmm.uniud.it/it/images/pdf/linfonodo_sentinella.pdf)

I linfonodi sentinella (sn) 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.

a) Campioni

Sn 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.

b) Esame intraoperatorio

È necessario valutare sempre il sn 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).

c) 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 SN dovrebbe essere sezionato in campioni di 2 mm, lungo l'asse perpendicolare.

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

d) Sezioni di tessuto in paraffina

Attualmente, per raggiungere il risultato minimo, nei SN 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 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 sn 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).

e) Referto

Dovrebbe includere:

- il numero totale dei sn 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.

f) Commenti aggiuntivi

L'analisi molecolare al momento non viene raccomandata. Le cellule isolate tumorali, se riscontrate, vanno incluse nel referto, ma non è raccomandata la loro ricerca sistematica.



CAPITOLO 4

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

Lo stato dei recettori steroidei (ER e PR), lo stato di HER2 e la determinazione dell'indice di proliferazione (ki-67) devono essere determinati 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 del tumore e dall'istotipo; virtualmente tutti i tumori G1 sono ER positivi. L'espressione del recettore progesteronico (PR) va generalmente di pari passo con quella del ER; pazienti con ER+/PR- hanno una prognosi meno favorevole rispetto a pazienti ER+/PR+. I casi PR+/ER- rappresentano possibilmente un falso positivo.

Il **ki-67** è una proteina nucleare presente nelle cellule in ciclo che indica l'attività proliferativa della lesione. 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 NO; può avere valore predittivo nella scelta di un inibitore dell'aromatasi (Letrozole) piuttosto che il Tamoxifene come terapia endocrina neoadiuvante in donne ER/PR+; il Letrozole sembra dare più benefici in pazienti con elevati livelli di ki-67. In accordo con St. Gallen 2011, il ki-67 al di sotto della soglia del 14% e associato alla positività per ER/PR e alla negatività per HER2- è un surrogato dei test di gene profiling nell'identificare il sottotipo *Luminal A*.

La metodica di elezione per determinare lo stato dei recettori steroidei e dell'indice di proliferazione (ki-67) è quella **immunoistochimica**.

L'**HER2** è un proto oncogene membro della famiglia dell'Epidermal Growth Factor (EGF) localizzato su cromosoma 17 e codifica per un recettore tirosinchinasi, 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 sia *prognostico* che *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.

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

L'applicazione di tutti questi marcatori (ER, PR, HER2 e ki-67) può essere considerato l'analogo immunoistochimico 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 2011)

Pertanto sia la determinazione di questi marcatori prognostici e potenzialmente terapeutici sia la valutazione quantitativa dei risultati devono essere il più possibile accurate e riproducibili.



Ci sono diversi fattori che possono interferire nella corretta determinazione immunoistochimica dei recettori, del ki-67 e dell'HER2: la fissazione, lo smascheramento, il tipo di anticorpo utilizzato, l'interpretazione dei risultati.

2. FASE PREANALITICA (comune a tutte le determinazioni immunoistochimiche e di ibridazione in situ)

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.

2.2 Tipo di fissazione

Il fissativo per eccellenza è la formalina neutra tamponata al 10%; 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 48 ore; al ricevimento lo specimen va inchiostro e sezionato ad intervalli di 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 immunoistochimica; 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 etc) e lo smascheramento in mezzo liquido (calore/pH variabile). Uno smascheramento inadeguato può causare falsi negativi e/o positivi.

3. RECETTORI STEROIDEI (ER-PR)

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 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 (dotti di parenchima normale) 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.

3.2 FASE POSTANALITICA

3.2.1 Interpretazione dei risultati

L'interpretazione del risultato è di tipo semiquantitativo e deve tener conto sia della percentuale media (%) dei nuclei tumorali positivi nell'intera sezione sia dell'intensità della reazione (score 0-3).

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

Al fine di uniformare l'interpretazione dei preparati viene suggerito l'utilizzo del quick (Allred) score (Tabella 1), sistema semiquantitativo che tiene conto della percentuale di positività e della media di intensità della reazione.

Tabella 1 - Quick (Allred) score

Score di proporzione	Score di intensità
0 = assenza di reazione	0 = assenza di reazione
1 = <1% di reazione nucleare	1 = debole reazione
2 = 1-10% di reazione nucleare	2 = reazione moderata
3 = 11-33% di reazione nucleare	3 = reazione intensa
4 = 34-66% di reazione nucleare	
5 = 67-100% di reazione nucleare	

3.2.2 Refertazione

Nel referto devono essere riportati:

- il metodo utilizzato per la reazione e l'anticorpo
- la % di cellule positive
- l'intensità della positività (forte, moderata, debole o score 0-3)
- positività del controllo interno

Nel carcinoma duttale in situ è suggerito di eseguire la determinazione dei recettori ormonali, limitando la valutazione alla percentuale di cellule positive.



4. MARCATORE DI PROLIFERAZIONE Ki-67

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 e l'anticorpo
- la % di cellule positive

5. HER2

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 (Consensus AIOM-SIAPEC-IAP) (32)

Tabella 2 - Scoring system

Score	Marcatura di membrana	Valutazione espressione HER2
0	Nessuna colorazione o colorazione in meno del 10% delle cellule.	Negativo
1+	Incompleta/debole marcatura di membrana in più del 10% delle cellule tumorali. Le cellule marcate solo in parte della membrana.	Negativo
2+	Marcatura completa della membrana da lieve a moderata in più del 10% delle cellule tumorali.	Dubbio (FISH/SISH)
3+	Marcatura completa ed intensa della membrana in più del 10% delle cellule tumorali.	Positivo

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)
- le linee guida di riferimento (32)

6. TECNICHE DI IBRIDAZIONE IN SITU: FISH, CISH, SISH

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

Al momento 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 IIC 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.



6.1 FISH

Per una corretta riuscita della metodica, va privilegiata l'adozione di tecniche *dual color* che utilizzano due fluorocromi o due cromogeni diversi in modo tale da visualizzare sullo stesso preparato istologico o citologico la regione centromerica del cromosoma 17 (*sonda CEP17*) e il gene HER2 (*sonda locus-specifica*).

La valutazione deve essere fatta su almeno 20 cellule neoplastiche della componente invasiva e in almeno 2 campi diversi della componente invasiva identificata sulla sezione in EE. I preparati citologici vanno esaminati interamente. È opportuno valutare il preparato della FISH sulla base della reattività dell'IIC.

In caso di popolazione neoplastica eterogenea è opportuno riportare la percentuale di cellule in cui il gene risulta amplificato.

Tumori testati in prima istanza con metodica ISH e con quota di cellule neoplastiche amplificate pari o inferiore al 10% devono essere ritestati con metodica IIC.

Un rapporto ≥ 2 maggiore di 2 tra la somma dei segnali del gene HER2/segnale centromerico definisce l'amplificazione del gene.

Un rapporto tra 1,8 e 2,2 è considerato equivoco dalle linee guida ASCO/CAP e consiglia la ripetizione della lettura da parte dello stesso o di un altro osservatore o la ripetizione della reazione su altre sezioni o, se disponibile, su altra inclusione.

È opportuno segnalare nel referto la percentuale di cellule neoplastiche con amplificazione del gene (ratio ≥ 2 o numero di copie HER2 > 6 o cluster) anche se inferiore al 10%.

La FISH, pur restando la tecnica di riferimento per la predittività di risposta al trattamento con trastuzumab, presenta alcune criticità, quali la necessità di attrezzature costose, specifiche e dedicate e di personale esperto e dedicato. Ulteriori svantaggi sono rappresentati dal fatto che i preparati non possono essere conservati per lungo tempo, pena il decadimento del fluorocromo e pertanto, ove possibile, è consigliato acquisire immagini digitalizzate dei preparati; infine, la mancanza di dettaglio morfologico non consente una correlazione con il dato dell'immunoistochimica.

Per ovviare ad alcune di queste problematiche, sono state introdotte la CISH e la SISH, metodiche di ibridazione in situ in campo chiaro, che consentono l'utilizzo del comune microscopio ottico garantendo una migliore correlazione tra aspetti morfologici e risultato della reazione.

6.2 CISH

L'ibridazione in situ cromogenica (CISH) è la metodica di elezione per preparati citologici o in monostrato di lesioni metastatiche. Rappresenta una valida alternativa alla FISH con livelli di concordanza riportati in letteratura superiori al 95%.

Il segnale è sotto forma di precipitati puntiformi o aggregati di cromogeno. La sezione va inizialmente esaminata a basso ingrandimento per valutare la omogeneità o meno della distribuzione del segnale. Nel caso in cui si rilevi omogeneità di segnale, vanno selezionati almeno 2 campi sui quali valutare ad alto ingrandimento il segnale. I preparati citologici vanno esaminati interamente. È opportuno valutare il preparato della CISH sulla base della reattività dell'IIC.

Nel caso di tecniche con una sola sonda specifica per il gene HER2, il campione si definisce amplificato quando si contano >6 segnali/nucleo o grandi cluster, mentre non è amplificato quando i segnali sono <4/nucleo.

Nei casi dubbi (da 4 a 6 segnali/ nucleo) si raccomanda di verificare anche il numero dei centromeri del cromosoma 17, per escludere casi di polisomia.

In casi sicuramente amplificati (segnali > di 10 o cluster) o non amplificati (segnali < 4) l'analisi può essere effettuata a 40X. In presenza di un numero di segnali compreso tra 5 e 10 è opportuno proseguire l'analisi a 63X o 100X contando almeno 40 cellule.



In caso di eterogeneità il risultato va espresso come percentuale di cellule amplificate. Nel caso di tecniche *dual color*, con una sonda specifica per il gene HER e una per il centromero del cromosoma 17, la valutazione dell'eventuale amplificazione segue i criteri utilizzati per la FISH.

6.3 SISH

È una tecnica metallografica – metallografia enzimatica a base di argento. Il precipitato puntiforme di argento -a bordo uniforme e arrotondato- identifica ogni copia del gene HER2 o del centromero del cromosoma 17; il precipitato nero contrasta nettamente con la colorazione standard con ematossilina.

Copie multiple vengono evidenziate come punti multipli o cluster (gruppi di segnali di forma irregolare). La concordanza riportata con FISH *dual color* è nell'ordine del 96%, con discrepanze legate all'eterogeneità tumorale. Analogamente alla CISH, il calcolo del rapporto tra copie di gene HER2 e cromosoma 17 è possibile solo se vengono utilizzate tecniche *dual color*.

Nel caso di tecniche *dual color*, con una sonda specifica per il gene HER e una per il centromero del cromosoma 17, la valutazione dell'eventuale amplificazione va effettuata su sezioni consecutive e segue i criteri utilizzati per la FISH.

6.4 POLISOMIA DEL CROMOSOMA 17

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 $> 2,2$ 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 (1,8 per ASCO/CAP) 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'IIC e, più raramente, a 3+. Solo i casi polisomici con iperespressione della proteina (IIC3+) 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 per la diagnosi criteri utilizzati. Le linee guida ASCO/CAP definiscono la polisomia come la presenza di 3 segnali CEP17 per cellula, mentre l'NCCTG definisce polisomici i casi con almeno 3 copie CEP17 per cellula in $> 0,30$ dei nuclei contati. Recentemente Marchiò et al (31), utilizzando la tecnica *microarray-comparative genomic hybridization (aCGH)* ha suggerito che la polisomia vera potrebbe essere un evento molto raro; dallo studio è emerso che quanto definito inizialmente polisemico 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 QUALITA'

7.1 Controlli positivi interni

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

7.2 Controlli positivi esterni

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

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

È opportuna l'implementazione di **programmi VEQ** per ER, PR, ki-67 e FISH/CISH/SISH su base regionale, nazionale e sovranazionale



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. Ellis IO, Dowsett M, Bartlett J, Walker R, Cooke T, Gullick W, Gusterson B, Mallon E, Lee PB. Recommendations for HER2 testing in the UK. *J Clin Pathol.* 2000 ;53:890
6. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, Moreno A, Penault-Llorca F, Rüschoff J, Tomasic G, van de Vijver M. Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines. *Mod Pathol* 2003; 16: 173-182
7. 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.
8. Walker R. The significance of histological determination of HER-2 status in breast cancer. *The Breast* 2000;9: 130-3.
9. Schnitt SJ. Breast cancer in the 21st century: Neu opportunities and neu challenges. *Modern Pathology* 2001;14:213-8.
10. Wang S, Saboorian MH, Frenkel E, Hynan L, Gokaslan ST, Ashfaq R. 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.
11. Lehr H-A, Jacobs TW, Yaziji H, Schnitt SJ, Gown AM. 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.
12. Rampaul RS, Pinder SE, Gullick WJ, Robertson JFR, Ellis IO. HER-2 in breast cancer - Methods of detection, clinical significance and future prospects for treatment. *Crit Rev Oncol-Hematol* 2002;43:231-44
13. Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, Romond E, Hiller W, Park K, Brown A, Yothers G, Anderson S, Smith R, Wickerham DL, Wolmark N. Real-world performance of HER2 testing--National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:852-4.
14. Patrick C. Roche, Vera J. Suman, Robert B. Jenkins, Nancy E. Davidson, Silvana Martino, Peter A. Kaufman, Ferdinand K. Addo, Bronagh Murphy, James N. Ingle and Edith A. Perez. Concordance between local and central laboratory HER2 testing in the breast intergroup trial N9831. *JN C I* 2002;94:855-7.
15. Bartlett J, Mallon E and Cooke T. The clinical evaluation of HER-2 status: which test to use? *J Pathol* 2003; 199: 411-417
16. 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.
17. Dowsett M, Bartlett J, Ellis IO, Salter J, Hills M, Mallon E, Watters AD, Cooke T, Paish C, Wencyk PM, Pinder SE. 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.



18. Rhodes A, Jasani B, Couturier J, McKinley MJ, Morgan JM, Dodson AR, Navabi H, Miller KD, Balaton AJ. 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.
19. Vincent-Salomon A, MacGrogan G, Couturier J, Arnould L, Denoux Y, Fiche M, Jacquemier J, Mathieu MC, Penault-Llorca F, Rigaud C, Roger P, Treilleux I, Vilain MO, Mathoulin-Pélissier S, Le Doussal V. Calibration of immunohistochemistry for assessment of HER2 in breast cancer: results of the French Multicentre GEFPICS Study. *Histopathology* 2003; 42(4): 337-347.
20. Rhodes A, Jasani B, Anderson E, Dodson AR, Balaton 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
21. Watters AD, Bartlett JM. Fluorescence in situ hybridization in paraffin tissue sections: pretreatment protocol. *Mol Biotechnol.* 2002;21:217-20.
22. Ross JS, Fletcher JA, Bloom KJ, Linette GP, Stec J, Symmans WF, Pusztai L, Hortobagyi GN. Targeted therapy in breast cancer. *Molecular and cellular proteomics* 2004, 3, 379-398
23. 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.
24. Watters AD, Bartlett JM. Fluorescence in situ hybridization in paraffin tissue sections: pretreatment protocol. *Mol Biotechnol.* 2002;21:217-20.
25. 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.
26. Gown AM. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. *Mod Pathol* 2008; 21:S8-S15
27. M. Elizabeth H. Hammond, Daniel F. Hayes, Mitch Dowsett, D. Craig Allred, Karen L. Hagerty, Sunil Badve, Patrick L. Fitzgibbons, Glenn Francis, Neil S. Goldstein, Malcolm Hayes, David G. Hicks, Susan Lester, Richard Love, Pamela B. Mangu, Lisa McShane, Keith Miller, C. Kent Osborne, Soonmyung Paik, Jane Perlmutter, Anthony Rhodes, Hironobu Sasano, Jared N. Schwartz, Fred C. G. Sweep, Sheila Taube, Emina Emilia Torlakovic, Paul Valenstein, Giuseppe Viale, Daniel Visscher, Thomas Wheeler, R. Bruce Williams, James L. Wittliff, and Antonio C. Wolff. 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
28. 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
29. Antonio C. Wolff, M. Elizabeth H. Hammond, Jared N. Schwartz, Karen L. Hagerty, D. Craig Allred, Richard J. Cote, Mitchell Dowsett, Patrick L. Fitzgibbons, Wedad M. Hanna, Amy Langer, Lisa M. McShane, Soonmyung Paik, Mark D. Pegram, Edith A. Perez, Michael F. Press, Anthony Rhodes, Catharine Sturgeon, Sheila E. Taube, Raymond Tubbs, Gail H. Vance, Marc van de Vijver, Thomas M. Wheeler, and Daniel F. Hayes. 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
30. 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
31. 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.

32. Raccomandazioni sui requisiti minimi e gli standard di refertazione e sull'utilizzo di metodiche per la determinazione dello stato di HER2 nel carcinoma mammario. AIOM-SIAPEC-IAP; 2010
33. 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



CAPITOLO 5

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, sta assumendo un ruolo sempre più importante nella cura della paziente con carcinoma della mammella.

Negli ultimi anni sono apparsi molteplici studi che utilizzano più cicli di polichemioterapia neoadiuvante (in genere 4-6), più frequentemente con antracicline e taxani, in associazione o meno con trastuzumab, in pazienti, con marker predittivi di risposta, che presentano, al momento della 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, la valutazione in vivo della chemiosensibilità della neoplasia e la prevenzione di eventuali localizzazioni a distanza.

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.

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 dissezione linfonodale del cavo ascellare deve essere sempre eseguita indipendentemente dal T clinico post-terapia, contemporaneamente alla terapia chirurgica conservativa o alla mastectomia. Sono in corso studi clinici di fattibilità e adeguatezza del linfonodo sentinella sia in fase diagnostica che in fase di trattamento definitivo per pazienti con T candidabile a tale metodica.

La stadiazione linfonodale si avvale, a seconda dei centri, dell'esame obiettivo, dell'ecografia, dell'RMN, della TAC e della PET-TAC.



Utile per una più accurata stadiazione eseguire:

- A. Per pazienti con linfonodi clinicamente/radiologicamente positivi: agoaspirato con citologia per conferma di metastasi
- B. Per pazienti con linfonodi clinicamente/radiologicamente dubbi: agoaspirato con ampio campionamento del linfonodo, per conferma di eventuale metastasi.
- C. Per pazienti con linfonodi clinicamente/radiologicamente negativi o dubbi con citologia negativa: si potrebbe ipotizzare lo studio del linfonodo sentinella

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. dati clinico-strumentali (stato della cute e dei linfonodi, presenza di microcalcificazioni e plurifocalità)
4. tecnica del prelievo (guida strumentale o manuale)
5. 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:

- A. presenza di carcinoma infiltrante, istotipo, grading e eventuale percentuale sul totale dell'agobiopsia
- B. presenza di componente carcinomatosa in situ (in percentuale), suo istotipo e grading
- C. presenza di microcalcificazioni
- D. presenza di invasione vascolare
- E. espressione dei recettori ormonali, dell'indice proliferativo e dell'HER2

In presenza di biopsia cutanea:

- 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 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.

Non sempre ad una completa risposta patologica del tumore primitivo si associa una risposta patologica completa sulle 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.

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 presenza di componente carcinomatosa in situ residua non sembra influenzare la sopravvivenza libera da malattia e la sopravvivenza globale, pertanto deve essere descritta ma non deve essere considerata nella valutazione del grado di risposta alla terapia.

La gradazione di risposta va eseguita esclusivamente sulla componente infiltrante.

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 eseguito secondo le linee guida correnti e i margini inchiostriati 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 reperi 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.

2.5 Esame microscopico

2.5.1 Valutazione istologica della mammella

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

- a. 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.
- b. per lo più la cellularità e l'indice mitotico appaiono ridotti.
- c. 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.
- d. Fenomeni di atrofia e di sclerosi possono essere presenti anche nelle unità dutto-lobulari normali nel parenchima adiacente, più raramente queste presentano atipie cito-nucleari, che devono essere poste in diagnosi differenziale con il carcinoma in situ.
- e. 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
- f. 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

Esistono discrepanze sul significato della rivalutazione dei fattori predittivi della malattia residua, quali positività per recettori estrogenici (ER), progesteronici (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 può mostrare 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

In alcuni studi non sono stati segnalati rilevanti cambiamenti di espressione di HER2. Modificazioni dell'espressione possono essere dovute a deficit del campionamento biotipico, 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.

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 sembra quello più facilmente riproducibile e che suscita maggior consenso nella comunità scientifica:



3. RISPOSTA TUMORALE

1. **risposta patologica completa (CR):** suddivisa in:
 - A. assenza di carcinoma residuo
 - B. assenza di carcinoma infiltrante residuo ma presenza di carcinoma in situ
2. **risposta patologica parziale (PR):** presenza di risposta parziale alla terapia suddivisa in:
 - A. minima malattia residua (inferiore del 10% della totale area neoplastica)
 - B. presenza di residuo di neoplasia tra 10-50%
 - C. residuo di malattia superiore al 50%
3. **nessuna evidenza di risposta alla terapia: malattia stabile (SD)**

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, specie se presenti focolai multipli attorno o nel contesto dell'area di regressione. Secondo la stadiazione ypT in presenza di focolai multipli residui di carcinoma infiltrante viene misurato il focolaio tumorale maggiore, escludendo circostanti aree di fibrosi e indicando la presenza di focolai multipli. La definizione ypT rimane comunque controversa.

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

La misurazione del T residuo è discussa, oltre che nei casi in cui residuano focolai multipli, in presenza di malattia residua costituita da isolate cellule tumorali nell'area di sclerosi o in presenza di aspetti di angioinvasione con regressione completa del carcinoma infiltrante.

È stato proposto di classificare questi casi come ypTX, associando il grado di regressione tumorale.

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

In conclusione nella diagnosi istologica devono essere riportati i seguenti parametri:

1. presenza di carcinoma infiltrante, con dimensioni, modificazioni morfologiche, istotipo e grading
2. presenza di carcinoma in situ con dimensioni, modificazioni morfologiche istotipo e grading
3. presenza di regressione tumorale (fibrosi) e sue dimensioni
4. presenza di multifocalità
5. presenza di angioinvasione
6. presenza di necrosi, infiltrato infiammatorio
7. grado di regressione del tumore



8. numero di linfonodi repertati, numero dei linfonodi metastatici con/senza segni di regressione
9. stato dei margini
10. stato della cute
11. ypTNM



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