REPUBBLICA ITALIANA

# BOLLETTINO UFFICIALE
## REGIONE DEL VENETO

**Venezia, venerdì 8 luglio 2016** **Anno XLVII - N. 66**

**PARTE SECONDA**

**CIRCOLARI, DECRETI, ORDINANZE E DELIBERAZIONI**

*Sezione seconda*

**DELIBERAZIONI DELLA GIUNTA REGIONALE**

**DELIBERAZIONE DELLA GIUNTA REGIONALE n. 926 del 22 giugno 2016**

Formalizzazione ed implementazione dei Gruppi Regionali di Lavoro specialistici all'interno dei programmi di screening oncologici e recepimento dei documenti da essi prodotti..... 1

***[Sanità e igiene pubblica]***

**DELIBERAZIONI DELLA GIUNTA REGIONALE n. 1058 del 29 giugno 2016**

POR FESR 2014-2020. Asse 3 Azione 3.5.1 "Interventi di supporto alla nascita di nuove imprese sia attraverso incentivi diretti, sia attraverso l'offerta di servizi, sia attraverso interventi di micro finanza, sub-azione D "Imprese naturalistiche". Approvazione "Bando per l'erogazione di contributi alle nuove imprese naturalistiche"..... 211

***[Programmi e progetti (comunitari, nazionali e regionali)]***

**Direzione - Redazione**
Dorsoduro 3901, 30123 Venezia - Tel. 041 279 2862 - 2900 - Fax. 041 279 2905

Sito internet: http://bur.regione.veneto.it e-mail: uff.bur@regione.veneto.it

Direttore Responsabile avv. Mario Caramel

**PARTE SECONDA**

**CIRCOLARI, DECRETI, ORDINANZE, DELIBERAZIONI**

*Sezione seconda*

**DELIBERAZIONI DELLA GIUNTA REGIONALE**

(Codice interno: 325527)

DELIBERAZIONE DELLA GIUNTA REGIONALE n. 926 del 22 giugno 2016

**Formalizzazione ed implementazione dei Gruppi Regionali di Lavoro specialistici all'interno dei programmi di screening oncologici e recepimento dei documenti da essi prodotti.**

*[Sanità e igiene pubblica]*

| Note per la trasparenza: |
| --- |
| con il presente provvedimento si provvede a formalizzare i Gruppi di Lavoro degli specialisti già all'interno del percorso dei programmi di screening oncologici, ad implementare nuovi Gruppi di Lavoro e a recepire i documenti prodotti da tali gruppi. Il presente provvedimento non comporta spesa per il bilancio regionale. |

L'Assessore Luca Coletto riferisce quanto segue.

La Regione del Veneto, con DGR n. 2284 del 21.6.1996, ha disposto l'attivazione a favore della popolazione residente di progetti di screening per il tumore della cervice uterina e della mammella, in conformità alle indicazioni della Commissione Oncologica Nazionale. I programmi di screening oncologici sono interventi di sanità pubblica che consistono in un'attività sistematica di diagnosi precoce di una malattia o dei suoi precursori, basata su evidenze scientifiche, rivolta alla generalità della popolazione o a suoi sottogruppi e su percorsi di qualità.

Negli anni seguenti la Regione ha promosso l'attivazione di altri programmi di screening aziendali. Attualmente in tutte le Aziende Ulss sono attivi programmi di screening del tumore della cervice uterina, del tumore della mammella e del tumore del colon retto.

Con DPCM del 29.11.2001 i programmi organizzati di screening mammografico, cervicale e colo rettale sono stati inseriti tra i Livelli Essenziali di Assistenza (LEA) dell'area Prevenzione.

Con DGR n. 4538 del 28.12.2007 recante "L.R. 16 agosto 2002, n. 22 - D.G.R. n. 2501 del 6.08.2004: Approvazione del Manuale per l'accreditamento istituzionale dei programmi di screening oncologici delle strutture del Servizio Sanitario Regionale" la Regione ha definito e approvato i requisiti specifici che i programmi di screening del carcinoma della cervice uterina, della mammella e del colon retto necessari per conseguire l'accreditamento istituzionale. Tra il 2010 ed il 2013 sono stati accreditati tutti i programmi di screening delle Aziende Ulss del Veneto.

Con successiva deliberazione n. 2356 del 16 dicembre 2013, la Regione del Veneto ha affidato al Settore Promozione e Sviluppo Igiene e Sanità Pubblica il Coordinamento Regionale dei programmi di Screening Oncologici (CRSO), ivi compresa l'attività di controllo di qualità degli screening e la formazione degli operatori.

Con DGR n. 772 del 27.5.2014 la Regione ha introdotto l'utilizzo del test HPV a parziale sostituzione del pap test per il primo livello dello screening del tumore della cervice uterina, in tutte le Aziende Ulss del Veneto. L'attivazione dello screening con test HPV sta avvenendo in maniera graduale e sarà a regime dal 2018.

Attualmente in tutte le Aziende Ulss del Veneto sono attivi i seguenti programmi di screening oncologici organizzati:

a) Screening del tumore della cervice uterina: esecuzione di un pap test con cadenza triennale nei confronti delle donne di età compresa tra i 25 e i 29 anni; esecuzione di un test HPV-DNA nei confronti delle donne di età compresa tra i 30 e i 64 anni (il programma sarà a regime nel 2018);

b) Screening del tumore della mammella: esecuzione di una mammografia con cadenza biennale nei confronti di donne di età compresa tra i 50 e i 69 anni;

c) Screening del tumore del colon retto: esecuzione del test per la ricerca del sangue occulto nelle feci con cadenza biennale nei confronti delle persone di ambo i sessi di età compresa tra i 50 e i 69 anni.

In linea con le Raccomandazioni Ministeriali, alcuni programmi di screening aziendali hanno esteso l'esecuzione della mammografia alle donne di età compresa tra i 70 ed i 74 anni e l'esecuzione del test per la ricerca del sangue occulto nelle feci alle persone di 70 anni di età.

Nella legge regionale 29.6.2012, n. 23 recante "Norme in materia di programmazione socio sanitaria e approvazione del Piano socio-sanitario regionale 2012-2016"la riduzione della mortalità per carcinoma della mammella, della cervice uterina e del colon-retto tramite i programmi di screeningdi massa rappresenta un obiettivo della politica sanitaria regionale.

Con DGR n. 749 del 14.05.2015 è stato approvato il Piano Regionale della Prevenzione (PRP) per la realizzazione del Piano nazionale prevenzione (PNP) 2014-2018 che individua i Programmi e i Macroobiettivi di Sanità Pubblica che dovranno essere realizzati sul territorio regionale. Tra i programmi approvati per la realizzazione di quanto previsto dal Macroobiettivo 2.1, riguardante la riduzione delle malattie croniche degenerative, è previsto il seguente programma: "Consolidamento dell'adesione ed estensione dei programmi di screening per la prevenzione del carcinoma della mammella, del colon retto e della cervice uterina" (Progetto n. S.1); tale programma prevede tra le azioni da intraprendere anche il mantenimento delle attività di formazione e delle attività dei Gruppi di Lavoro degli screening coordinate dal CRSO.

L'attivazione e il potenziamento degli screening regionali si sono rivelati un indubbio fattore di miglioramento della salute pubblica e un efficace strumento di contenimento della spesa sanitaria. Nel Piano Nazionale della Prevenzione 2014-2018 gli interventi di diagnosi precoce di tumori e/o delle lesioni pretumorali mediante programmi di screening oncologico rientrano tra le linee strategiche da adottare per la prevenzione dell'incidenza e della mortalità delle malattie non trasmissibili.

Con DGR n. 1167 del 8.9.2015 sono state fornite alle Aziende Ulss della Regione, in particolare ai Dipartimenti di Prevenzione, le indicazioni per la predisposizione, entro il 31.12.2015, del Piano di Prevenzione a livello aziendale da sviluppare in attuazione del PRP 2014-2018. In riferimento al programma del PRP: "Consolidamento dell'adesione ed estensione dei programmi di screening per la prevenzione del carcinoma della mammella, del colon retto e della cervice uterina" (Progetto n. S.1), ogni Azienda Ulss deve garantire la partecipazione dei propri operatori sanitari alle attività di formazione e confronto promosse dai Gruppi di Lavoro."

Da alcuni anni sono attivi, all'interno dei percorsi dei programmi di screening cervicale, mammografico e colo rettale, Gruppi Regionali di Lavoro per la promozione della qualità degli screening, composti dagli specialistici dei rispettivi settori ed in particolare:

- nello screening cervicale:

  - Gruppo dei patologi per la qualità diagnostica in citologia e istologia, Referente in carica dr. Romano Colombari (UOC Anatomia Patologica Azienda Ulss 20 Verona);

  - Gruppo dei ginecologi per la qualità della colposcopia e del trattamento, Referente in carica dr. Gianpiero Fantin (UO Ginecologia Azienda Ulss 7 Pieve di Soligo);

- nello screening mammografico:

  - Gruppo dei patologi per la qualità diagnostica in citologia e istologia, Referente in carica dr. Antonio Rizzo (UO Anatomia Patologica Azienda Ulss 8 Asolo);

  - Gruppo dei radiologi per la qualità della diagnosi, Referente in carica dr.ssa Elisabetta Tosi (UO Radiologia Azienda Ulss 16 Padova);

  - Gruppo dei chirurghi senologi, Referente in carica dr. Nicola Balestrieri (UO Chirurgia Senologica Azienda Ulss 9 Treviso);

- nello screening colo rettale:

  - Gruppo dei patologi per la qualità diagnostica istologica, Referente in carica dr. Antonio Scapinello (UO Anatomia Patologica Azienda Ulss 8 Asolo);

  - Gruppo degli endoscopisti e gastroenterologi per la qualità della diagnosi e del trattamento endoscopico, Referente in carica dr. Erik Rosa Rizzotto (UOC Gastroenterologia Azienda Ulss 16 Padova).

Oltre alla formalizzazione dei Gruppi sopra elencati, si rende opportuna l'implementazione di nuovi Gruppi di Lavoro ed in particolare:

- Gruppo dei Laboratoristi;
- Gruppo dei chirurghi colorettali;
- Gruppo degli specialisti per la gestione dei soggetti ad alto rischio di tumore.

I Gruppi Regionali di Lavoro, con il Coordinamento Regionale Screening Oncologici, si propongono di mantenere e migliorare lo standard qualitativo dei programmi di screening all'interno delle Aziende Ulss della Regione ed hanno lo scopo di:

. promuovere l'attività di presa in carico del paziente individuando un referente che lo accompagni in tutto il percorso di cura;

. promuovere l'ottimizzazione e l'omogeneizzazione delle procedure clinico-diagnostiche;

. promuovere e favorire attività di formazione ed aggiornamento continuo degli operatori;

. promuovere, mantenere ed integrare la rete che si è già venuta a creare nel corso degli anni tra le Anatomie Patologiche, le Ginecologie, le Radiologie, le Endoscopie e i Laboratori delle Aziende Ulss della Regione;

. favorire il confronto interdisciplinare fra le diverse esperienze anche attraverso il supporto alla divulgazione dei risultati;

. promuovere la qualità dei programmi anche mediante programmi/progetti ad hoc;

. promuovere ogni altra iniziativa tendente alla qualificazione dell'attività di screening;

. promuovere e stabilire contatti e confronto con esperienze di altre Regioni.

Ogni Azienda Ulss deve fornire al Coordinamento Regionale l'adesione di almeno uno specialista per settore specialistico, fatta salva la libera partecipazione di tutti coloro che operano a vario titolo all'interno o in collaborazione con programmi di screening oncologici a seconda delle tematiche trattate.

I Referenti dei Gruppi vengono eletti dai rispettivi componenti dei Gruppi e rimangono in carica per tre anni. La partecipazione alle attività dei Gruppi di Lavoro, rientra tra le attività da svolgere all'interno dell'attività istituzionale, in quanto attività propedeutica all'ottimizzazione e omogeneizzazione delle procedure e al miglioramento continuo della qualità.

Alcuni Gruppi di Lavoro specialistici hanno già sviluppato, nel corso degli ultimi anni, documenti di consenso, protocolli operativi e altra tipologia di documenti ed attualmente è in itinere da parte di alcuni Gruppi la stesura e l'aggiornamento di altri protocolli. Le Linee di Indirizzo che sono state fino ad ora redatte allo scopo di mantenere e migliorare lo standard qualitativo dei programmi di screening all'interno delle Aziende Ulss della Regione e che diventano documenti di riferimento per le attività regionali di screening sono:

. Linee di Indirizzo del Gruppo Regionale dei Patologi dei programmi di Screening Mammografico di cui all'**Allegato "A"** al presente provvedimento di cui costituisce parte integrante;

. Linee di Indirizzo del Gruppo Regionale dei Patologi dei programmi di Screening Cervicale contenuto nell'**Allegato "B"** al presente provvedimento di cui costituisce parte integrante;

. Linee di Indirizzo del Gruppo Regionale dei Patologi dei programmi di Screening Colorettale di cui all'**Allegato "C"** al presente provvedimento di cui costituisce parte integrante;

. Linee di Indirizzo del Gruppo Regionale dei Ginecologi dei programmi di Screening Cervicale contenute nell'**Allegato "D"** al presente provvedimento di cui costituisce parte integrante;

. Linee di Indirizzo del Gruppo Regionale degli Endoscopisti e Gastroenterologi di cui all'**Allegato "E"** al presente provvedimento di cui costituisce parte integrante.

Alla luce di queste considerazioni, si ritiene di sottoporre all'approvazione della Giunta Regionale il presente provvedimento con il quale si provvede a formalizzare i Gruppi di Lavoro degli specialisti già precostituiti o da costituirsi ex-novo all'interno

del percorso dei programmi di screening oncologici, e a recepirne i documenti prodotti.

Si stabilisce altresì che gli aggiornamenti delle nomine dei Referenti dei Gruppi di Lavoro, il recepimento dei documenti da essi prodotti, nonché che gli eventuali aggiornamenti, siano demandati al Dirigente del Settore Promozione e Sviluppo Igiene e Sanità Pubblica, cui afferisce il Coordinamento Regionale degli Screening Oncologici.

Il relatore conclude la propria relazione e propone all'Approvazione della Giunta Regionale il seguente provvedimento

LA GIUNTA REGIONALE

Udito il relatore, il quale dà atto che la struttura proponente ha attestato l'avvenuta regolare istruttoria della pratica anche in ordine alla compatibilità con la vigente legislazione statale e regionale, e che successivamente alla definizione di detta istruttoria non sono pervenute osservazioni in grado di pregiudicare l'approvazione del presente atto.

Visto l'art. 2, comma 2, lett. o) della legge regionale n. 54 del 31 dicembre 2012";

Visto il DPCM del 29/11/2001;

Vista la L.R. n. 23 del 29.6.2012;

Viste le D.G.R. n. 2284 del 21.06.1996, n. 2605 del 07.0.2007, n. 2356 del 16.12.2013, n. 772 del 27.5.2014, n. 749 del 14.05.2015 e n. 1167 del 8.9.2015.

delibera

1. di prendere atto di quanto espresso in premessa, che costituisce parte integrante e sostanziale del presente provvedimento;

2. di approvare i seguenti Gruppi Regionali di Lavoro per la promozione della qualità degli screening, composti dagli specialistici dei rispettivi settori:

a. nello screening cervicale:

. Gruppo dei patologi per la qualità diagnostica in citologia e istologia della patologia relativa alla cervice uterina, Referente in carica dr. Romano Colombari (UOC Anatomia Patologica Azienda Ulss 20 Verona);

. Gruppo dei ginecologi per la qualità della colposcopia e del trattamento, Referente in carica dr. Gianpiero Fantin (UO Ginecologia Azienda Ulss 7 Pieve di Soligo);

- nello screening mammografico

. Gruppo dei patologi per la qualità diagnostica in citologia e istologia della patologia mammaria, Referente in carica dr. Antonio Rizzo (UO Anatomia Patologica Azienda Ulss 8 Asolo);

. Gruppo dei radiologi per la qualità della diagnosi, Referente in carica dr.ssa Elisabetta Tosi (UO Radiologia Azienda Ulss 16 Padova);

. Gruppo dei chirurghi senologi, Referente in carica dr. Nicola Balestrieri (UO Chirurgia Senologica Azienda Ulss 9 Treviso);

- nello screening colo rettale:

. Gruppo dei patologi per la qualità diagnostica istologica della patologia colorettale, Referente in carica dr. Antonio Scapinello (UO Anatomia Patologica Azienda Ulss 8 Asolo);

. Gruppo degli endoscopisti e gastroenterologi per la qualità della diagnosi e del trattamento endoscopico, Referente in carica dr. Erik Rosa Rizzotto (UOC Gastroenterologia Ulss 16 Padova);

- Di nuova costituzione:

. Gruppo dei laboratoristi (Referente da nominare);

. Gruppo dei chirurghi colorettali (Referente da nominare);

. Gruppo degli specialisti per la gestione dei soggetti ad alto rischio di tumore (Referente da nominare).

3. di ribadire che i Gruppi non hanno funzione operativa di diagnosi e cura ma funzione scientifica e di studio e si propongono di mantenere e migliorare lo standard qualitativo degli attuali programmi di screening oncologici all'interno delle Aziende Ulss della Regione ed hanno in particolare il mandato di:

. promuovere l'attività di presa in carico del paziente individuando un referente che lo accompagni in tutto il percorso di cura;

. promuovere l'ottimizzazione e l'omogeneizzazione delle procedure clinico-diagnostiche.

. promuovere e favorire attività di formazione ed aggiornamento continuo degli operatori;

. promuovere, mantenere ed integrare la rete che si è già venuta a creare nel corso degli anni tra le Anatomie Patologiche, le Ginecologie, le Radiologie, le Endoscopie e i Laboratori delle Aziende Ulss della Regione;

. favorire il confronto interdisciplinare fra le diverse esperienze anche attraverso il supporto alla divulgazione dei risultati;

. promuovere la qualità dei programmi anche mediante programmi/progetti ad hoc;

. promuovere ogni altra iniziativa tendente alla qualificazione dell'attività di screening;

. promuovere e stabilire contatti e confronto con esperienze di altre Regioni;

4. di approvare le seguenti Linee di Indirizzo, che diventano documenti di riferimento per le attività regionali di screening:

Linee di Indirizzo del Gruppo Regionale dei Patologi dei programmi di Screening Mammografico di cui all'**Allegato "A"** al presente provvedimento di cui costituisce parte integrante;

Linee di Indirizzo del Gruppo Regionale dei Patologi dei programmi di Screening Cervicale contenuto nell'**Allegato "B"** al presente provvedimento di cui costituisce parte integrante;

Linee di Indirizzo del Gruppo Regionale dei Patologi dei programmi di Screening Colorettale di cui all'**Allegato "C"** al presente provvedimento di cui costituisce parte integrante;

Linee di Indirizzo del Gruppo Regionale dei Ginecologi dei programmi di Screening Cervicale contenute nell'**Allegato "D"** al presente provvedimento di cui costituisce parte integrante;

Linee di Indirizzo del Gruppo Regionale degli Endoscopisti e Gastroenterologi di cui all'**Allegato "E"** al presente provvedimento di cui costituisce parte integrante;

5. di stabilire che gli aggiornamenti delle nomine dei Referenti dei Gruppi Regionali di Lavoro, dei Documenti da esse prodotti, nonché eventuali aggiornamenti di quanto riportato nel presente provvedimento siano demandati al Dirigente del Settore Promozione e Sviluppo Igiene e Sanità Pubblica, cui afferisce il Coordinamento Regionale degli Screening Oncologici;

6. di dare atto che la presente deliberazione non comporta spesa a carico del bilancio regionale;

7. di incaricare il Settore Promozione e Sviluppo Igiene e Sanità Pubblica afferente alla Sezione Attuazione Programmazione Sanitaria dell'attuazione del presente provvedimento;

8. di pubblicare il presente provvedimento nel Bollettino Ufficiale della Regione.

ALLEGATO A Dgr n. del pag. 1 /

REGIONE DEL VENETO giunta regionale

Registro Tumori del Veneto

# DOCUMENTO DI CONSENSO DEL GRUPPO REGIONALE PATOLOGI SCREENING MAMMOGRAFICO

Versione marzo 2012

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

**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

ALLEGATO A Dgr n. del pag. 3/196



## 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

ALLEGATO A Dgr n. del pag. 4/194


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 – Nodulectomie 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 retrival 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

ALLEGATO A Dgr n. del pag. 6/94


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

ALLEGATO A Dgr n. del pag. 7/96

## 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 (1ª 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:

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

- 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

ALLEGATO A Dgr n. del pag. 9/94




# 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)

ALLEGATO A Dgr n. del pag. 10/94

## 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.

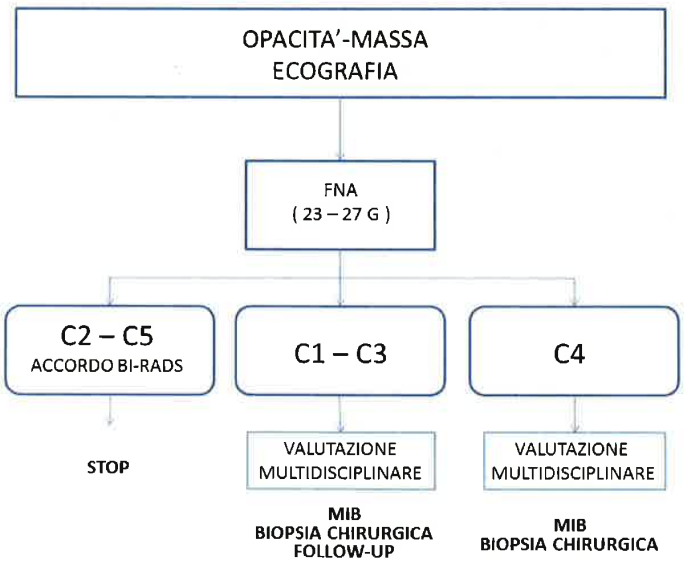
Ogni campione ottenuto con metodiche cito-istologiche dovrebbe essere corredato dai dati clinico-strumentali, anamnesi personale, dati radiologici ed ecotomografici compreso il tipo della lesione (massa, addensamento parenchimale, distorsione parenchimale, microcalcificazioni), inquadramento topografia 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

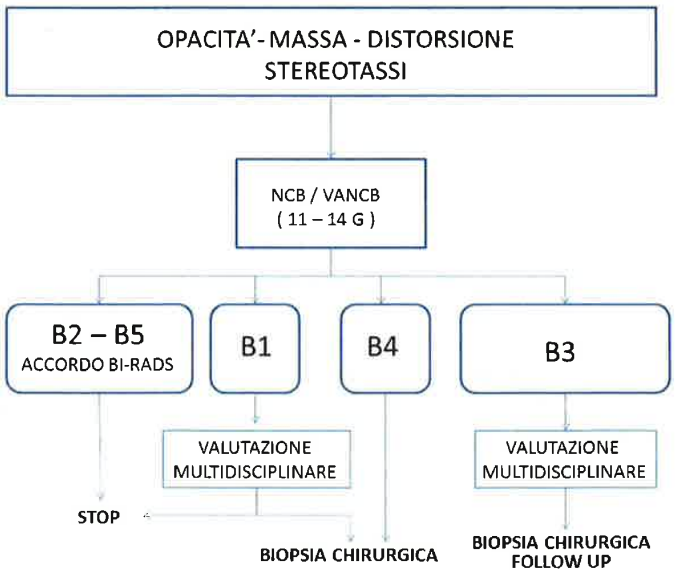



In generale l'accuratezza del prelievo con ago sottile dipende dalla adeguatezza e rappresentatività della lesione indagata, da un adeguato allestimento (striscio, fissazione e colorazione) e da una corretta interpretazione diagnostica. In caso di preparati a bassa cellularità per sclerosi (fibroadenoma 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).

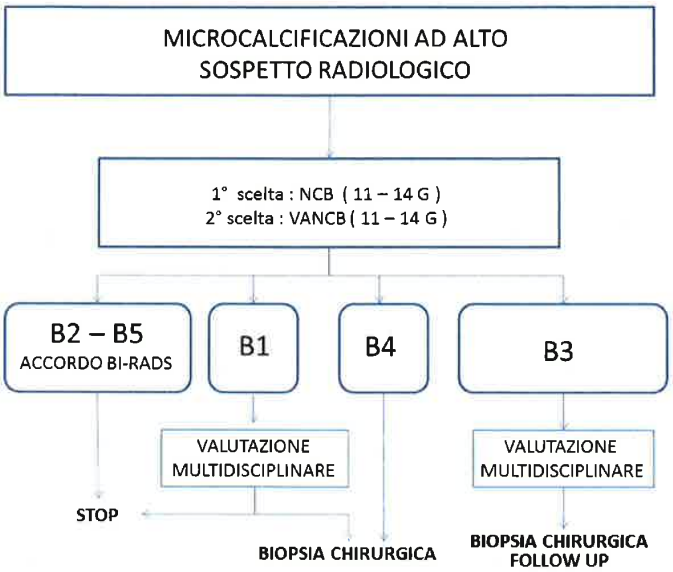
Figura 2: Flow chart percorso diagnostico preoperatorio per lesioni formanti massa/opacità/distorsione



ALLEGATO A Dgr n. del pag. 13/96

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.

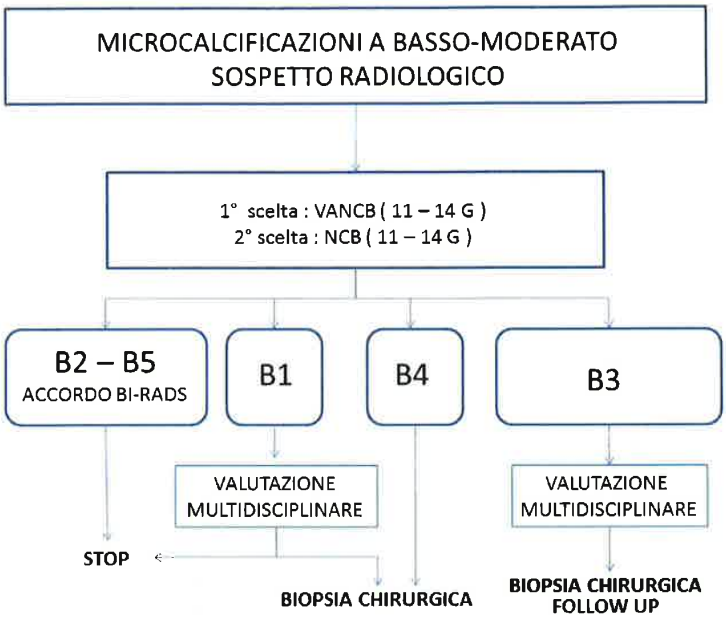
Figura 3: Flow chart percorso diagnostico preoperatorio per micro calcificazioni ad alto sospetto radiologico




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.

ALLEGATO A Dgr n. del pag. 14/94

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 bioptica (probe), posizionata e centrata con controllo mammografico stereotassico sull'area lesionale. La guida bioptica 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.

ALLEGATO A Dgr n. del pag. 15/19

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

**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 bioptici. 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 agobioptici 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'artifizio 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

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

Le **microcalcificazioni amorfe o di tipo intermedio** sono generalmente di forma variabile dal rotondo al flocculare sono le meno specifiche. Tendono ad associarsi a forme di DCIS di grado intermedio/basso di malignità o 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 liponercrotico/lipogranulomatoso o a lesioni mucocele-like/carcinoma mucinoso.

L'intervento agobioptico 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 bioptica 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 immunoistochimica, sia presente una adeguata conclusione diagnostica con il riferimento al sistema

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

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).

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

2. **Lesione focale scleroelastotica/epiteliosi infiltrativa** caratterizzata dal dato radiologico della 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 agobioptici 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 atipia o FEA (Flat Epithelial Atypia; atipia 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 Fillode**. Lesioni fibroepiteliali caratterizzate da uno stroma riccamente cellulato con aspetti di "overgrowth" rispetto alla componente epiteliale (presenza all'osservazione microscopica a 10x di uno o più campi privi di componente epiteliale) talora con un incremento dell'attività mitotica. Diagnosi differenziale con varianti di fibroadenoma.

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 bioptico 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 bioptico 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 agobioptici. 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 agobioptico: 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.

ALLEGATO A Dgr n. del pag. 22/84

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

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

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

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

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

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

**Carcinoma lobulare infiltrante**
Piccoli foci di carcinoma lobulare invasivo possono essere confusi con un infiltrato linfocitario perilobulare (45) comune, spesso 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 agobioptico. 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 agobioptico 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 bioptiche (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 m 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 continuativamente a programmi di controllo di qualità.

**C1 - Inadeguato / non rappresentativo**

La designazione di inadeguato è sicuramente in certa misura soggettiva e può dipendere dall'esperienza dell'aspiratore e del citopatologo. Il giudizio finale sulla rappresentatività del materiale deve comunque derivare dal confronto e dalla coerenza con il dato radiografico e citologico.
Esistono tuttavia delle condizioni oggettive di inadeguatezza/non rappresentatività che sono date da:

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

In questi casi è opportuno descrivere le caratteristiche del campione, commentare sulle cause di inadeguatezza/non rappresentatività e registrare e monitorare le cause di tale inadeguatezza al fine di poter programmare manovre correttive.
Aspirati da lesioni particolari quali cisti, processi infiammatori, liponecrosi e campioni di secreto del capezzolo possono non contenere elementi epiteliali ma non devono essere classificati come inadeguati.

**C2 - Benigno**

- Indica un campione adeguato senza evidenza di atipia o malignità
- L'aspirato in questa situazione è da poco a moderatamente cellulato e costituito prevalentemente da cellule epiteliali duttali regolari organizzate in lembi monostrato con caratteristiche citonucleari di benignità. Lo sfondo di solito presenta nuclei nudi bipolari mioepiteliali dispersi in quantità variabile. Nel caso di una componente cistica della lesione si possono osservare istiociti schiumosi e elementi duttali apocrini. Frammenti di tessuto fibroso o fibroadiposo sono frequenti.

ALLEGATO A Dgr n. del pag. 27/96

- 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 cellulare, 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.

ALLEGATO A Dgr n. del pag. 28/94




**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 simulanodiscoesione.
- **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 adenomioepitelali:** 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 fusate; 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. I 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 stremali 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 frammisti 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. Dowlatshahi K, Gent HJ, Schmidt R, Jokich PM, Bibbo M, Sprenger E. Non-palpable breast tumours: diagnosis with stereotaxic localisation and fine needle aspiration. Radiology 1989;170:427-33
10. Sarfati MR, Fox KA, Warneke JA, Fajardo LL, Hunter GC, Rappaport WD. Stereotactic fine-needle aspiration cytology of nonpalpable breast lesions: an analysis of 258 consecutive aspirates. Am J Surg 1994;168(6):529-31; discussion 531-2.
11. Lamb J, Anderson TJ. Influence of cancer histology on the success of fine needle aspiration of the breast. Journal of Clinical Pathology 1989, 42: 733–735.
12. Peterse JL, Koolman-Schellekens MA, van de Peppel-van de Ham T, van Heerde P. Atypia in fine-needle aspiration cytology of the breast: a histologic follow-up study of 301 cases. Semin Diagn Pathol 1989 May;6(2):126-34.
13. Gupta RK, Dowle CS. Fine needle aspiration cytology of tubular carcinoma of the breast. ActaCytol 1997 Jul-Aug;41(4):1139-43.
14. Gangopadhyay M, Nijhawan R, Joshi K, Gupta S. Cytology of "significant" breast ductal proliferations. ActaCytol 1997 Jul-Aug;41(4):1112-20.
15. Pijnappel RM, van den Donk M, Holland R, Mali WP, Peterse JL, Hendriks JH, Peeters PH. Diagnostic accuracy for different strategies of image-guided breast intervention in cases of nonpalpable breast lesions. Br J Cancer 2004 Feb 9;90(3):595-600.

ALLEGATO A Dgr n. del pag. 32/94

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/cgibin/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, PestanerJP.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, Stamatakos MD, Mezzetti TP, Shekitka KM, Man YG, Tavassoli FA.Combined E-cadherin and high molecular weight cytokeratin immunoprofile differentiates lobular, ductal, and hybrid mammary intraepithelial neoplasias. Hum Pathol 2002 ; 33(6):620-7.

33. Zhao L, Freimanis R, Bergman S, Shen P, Perrier ND, Lesko N, Pulaski T, Pulaski S, Carr JJ, Levine EA. Biopsy needle technique and the accuracy of diagnosis of atypical ductal hyperplasia for mammographic abnormalities. Am Surg 2003 Sep;69(9):757-62; discussion 762.
34. Liberman L, Dershaw DD, Rosen PP, Giess CS, Cohen MA, Abramson AF, Hann LE. Stereotaxic core biopsy of breast carcinoma: accuracy at predicting invasion. Radiology 1995, 194: 379–381.
35. O'Leary R, Hawkins K, Beazley JC, Lansdown MR, Hanby AM. Agreement between preoperative core needle biopsy and postoperative invasive breast cancer histopathology is not dependent on the amount of clinical material obtained. J ClinPathol 2004 Feb;57(2):193-5.
36. Harris GC, Denley HE, Pinder SE, Lee AH, Ellis IO, Elston CW, Evans A. Correlation of histologic prognostic factors in core biopsies and therapeutic excisions of invasive breast carcinoma. Am J SurgPathol 2003 Jan;27(1):11-5.
37. Boecker W, Moll R, Poremba C, Holland R, Van Diest PJ, Dervan P, Burger H, Wai D, Ina Diallo R, Brandt B, Herbst H, Schmidt A, Lerch MM, Buchwallow IB. Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept. Lab Invest 2002 Jun;82(6):737-46.
38. Schnitt SJ, Vincent-Salomon A. Columnar cell lesions of the breast. AdvAnatPathol 2003; 10(3):113-24.
39. Fraser JL, Raza S, Chorny K, Connolly JL, Schnitt SJ. Columnar alteration with prominent apical snouts and secretions: a spectrum of changes frequently present in breast biopsies performed for microcalcifications. Am J SurgPathol 1998; 22(12):1521-7.
40. WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs.Edited by F.A. Tavassoli and P Devilee. IARC Press, Lyon, 2003.
41. Leal C, Henrique R, Monteiro P, Lopes C, Bento MJ, De Sousa CP, Lopes P, Olson S, Silva MD, Page DL. Apocrine ductal carcinoma in situ of the breast: histologic classification and expression of biologic markers. Hum Pathol 2001 May;32(5):487-93.
42. Evans AT, Hussein KA. A microglandularadenosis-like lesion simulating tubular adenocarcinoma of the breast. A case report with cytological and histological appearances. Cytopathology 1990; 1(5):311-6.
43. Girling AC, HanbyAM, Millis RR. Radiation and other pathological changes in breast tissue after conservation treatment for carcinoma. J ClinPathol 1990 Feb;43(2):152-6.
44. Aktepe F, Kapucuoglu N, Pak I. The effects of chemotherapy on breast cancer tissue in locally advanced breast cancer. Histopathology 1996 Jul;29(1):63-7.
45. Taniere P, Poulard G, Frappart L, Berger G, Goncalves M, Vauzelle JL, Delecluse DJ, Bailly C, Boucheron S, Berger F. Diabetic mastopathy with epithelioidfibroblasts: differential diagnosis from an infiltrating lobular carcinoma of the breast. Ann Pathol 1996; 16(1):33-6. French.
46. H Goulding, S Pinder, P Cannon, D Pearson, R Nicholson, D Snead, J Bell, C.W.E Elston, J.F Robertson, R.W Blamey, I.O Ellis. A new immunohistochemical antibody for the assessment of estrogen receptor status on routine formalin-fixed tissue samples. Human Pathology 1995, 26: 291–294.
47. Zidan A, Brown JSC, Peston D, Shousha S. Oestrogen and progesterone receptor assessment in core biopsy specimens of breast carcinoma. Journal of Clinical Pathology 1997, 50: 27–29.
48. C A Wells, C W Wells, P Yeomans, M Viña, S Jordan, and A J d'Ardenne. Spherical connective tissue inclusions in epithelial hyperplasia of the breast ('collagenous spherulosis'). Journal of Clinical Pathology 1990, 43: 905–908.

49. Tyler X, Coghill SB. Fine needle aspiration cytology of collagenous spherulosis of the breast. Cytopathology 1991, 2: 159–162.
50. Rosen PP. Mucocoele-like tumors of the breast. American Journal of Surgical Pathology 1986; 10,464-469
51. Weaver MG, Abdul-Karim FW, al-Kaisi N. Mucinous lesions of the breast. A pathological continuum. Pathol. Res Pract 1993; 189, 873-876
52. Hamele-Bena D, Cranor ML, Rosen PP. Mammary mucocele-like lesions. Benign and malignant. American Journal of Surgical Pathology 1996; 20, 1081-1085
53. Jacobs TW, Connolly JL, Schnitt SJ. Nonmalignant lesions in breast core needle biopsies. American Journal of Surgical Pathology 2002; 26, 1095-1110
54. Bondesan L, Lindholm K. Aspiration cytology of tubular breast carcinoma. ActaCytologica 1990, 34: 15–20.
55. Salhany KE, Page DL. Fine needle aspiration of mammary lobular carcinoma in situ and atypical lobular hyperplasia. American Journal of Clinical Pathology 1989, 92: 22–26.
56. Sneige N, Zachariah S, Fanning TV, Dekmezian RH, Ordóñez NG. Fine needle aspiration cytology of metastatic neoplasms in the breast. American Journal of Clinical Pathology 1989, 92: 27–35.
57. Robinson IA, McKee G, Nicholson A, D'Arcy J, Jackson PA, Cook MG, Kissin MW. Prognostic value of cytological grading of fine-needle aspirates from breast carcinomas. Lancet 1994, 343:947–949.
58. Redard M, Vassilakos P, Weintraub J. A simple method for oestrogen receptor antigen preservation in cytologic specimens containing breast carcinoma cells. Cytopathology 1989, 5: 188–193.
59. Wells C.A. Quality assurance guidelines for pathology. In: European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis, Fourth Edition. 2006; 221-311
60. Pathology reporting of breast disease. NHSBSP Pub. N° 58. January 2005.
61. Senetta R, Campanino PP, Mariscotti G, Garberoglio S, Daniele L, Pennecchi 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 atipia 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

ALLEGATO A Dgr n. del pag. 35/96




## 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 oB5 |
| **Valore predittivo positivo di C4/B4** | Numero di carcinomi identificati come sospetti (numero di C4 o B4 meno i falsi sospetti) espresso come %ale del totale dei C4 oB4 |
| **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 fasi 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 |

ALLEGATO A Dgr n. del pag. 36/94




**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 bioptiche) 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 |

ALLEGATO A Dgr n. del pag. 37/84

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

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** | (1+25) x 100<br>(6+25) |
| **SENSIBILITA' COMPLETA** | (1+2+3+25) x 100<br>6+25 |
| **SPECIFICITA' (solo biopsie)** | 22 x 100<br>24 |
| **SPECIFICITA'COMPLETA** | (22+28) x 100<br>24+27+28+29 |
| **VALORE POSITIVO PREDITTIVO (C5/B5)** | (31-19) x 100<br>31 |
| **VALORE PREDITTIVO POSITIVO (C4/B4)** | 2 x 100<br>(32-26) |
| **VALORE PREDITTIVO POSITIVO (C3/B3)** | 3 x100<br>33 |
| **VALORE PREDITTIVO NEGATIVO (C2/B2)** | (34-4) x 100<br>34 |
| **TASSO DI FALSI NEGATIVI (escluso inadeguati)** | 4 x 100<br>(6+25) |
| **TASSO DI FALSI POSITIVI** | 19 x 100<br>(6+25) |
| **TASSO DI INADEGUATI** | 35 x 100<br>36 |
| **TASSO DI INADEGUATI con diagnosi di carcinoma** | 5 x 100<br>(6+25) |
| **TASSO DI C3/B3** | 33 x 100<br>36 |
| **TASSO DI C4/B4** | 32 x 100<br>36 |
| **TASSO DI SOSPETTI (C3+C4)(B3+B4)** | (32+33) x 100<br>36 |

ALLEGATO A Dgr n. del pag. 38/94

**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% | >995 | 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 A Dgr n. del pag. 40/96




**ALLEGATO 1**
**RICHIESTA DI ESAME AGOBIOPTICO DELLA MAMMELLA (NCB)**

Esame n .....

Cognome..... Nome..... Data di nascita .....

Indirizzo: via ..... n. ..... Città ..... ULSS N. .....

T.S. ☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐ Provenienza della richiesta .....

**SEDE** ☐ **Destra** ☐ **Sinistra**

**Quadrante** .....

TIPOLOGIA DEL CAMPIONE

☐ Agobiopsia (n° ....., dimensioni .....)

TECNICA DI LOCALIZZAZIONE

☐ Palpazione ☐ RX Guidata ☐ Ecografia ☐ Stereotassi

ASPETTO RADIOLOGICO

☐ Microcalcificazioni ☐ Distorsione/Addensamento ☐ Opacità/Nodulo

**CLASSIFICAZIONE MAMMOGRAFICA – ECOGRAFICA**

☐ **R1** ☐ **R2** ☐ **R3** ☐ **R4** ☐ **R5**

☐ **U1** ☐ **U2** ☐ **U3** ☐ **U4** ☐ **U5**

NOTIZIE CLINICHE E STRUMENTALI:

.....

.....

☐ Radiografia del campione allegata

DATA..... MEDICO.....

ALLEGATO A Dgr n. del pag. 41/94

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

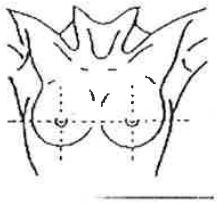
**ALLEGATO 2**

**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** .....

.....

ALLEGATO A Dgr n. del pag. 42/94




# 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 reperti 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 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.

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

**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 A Dgr n. del pag. 50/94

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

**ALLEGATO 1**
**Richiesta esame istologico campione operatorio**

Data, _____

## RICHIESTA ESAME ISTOLOGICO MAMMELLA

| NOSOGRAFICA/ Dati anagrafici | AMBULATORIALE<br>DIVISIONALE ☐<br>L.P. ☐<br>RICOVERO<br>ORDINARIO ☐<br>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**

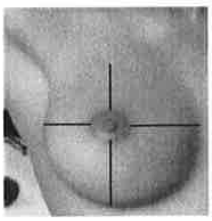
_____

**REFERTI ALLEGATI:**
- ☐ Esame senologico
- ☐ FNAB, istologia precedente
- ☐ Mammotome
- ☐

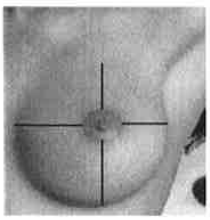
☐ **ALLEGATO RX PEZZO OPERATORIO**

---------- **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 A Dgr n. del pag. 51/84




**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 repere metallico ed orientata da fili di repere 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 A Dgr n. del pag. 52 /94

**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 A Dgr n. del pag. 54/84

**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
☐ Mastite periduttale/ectasia duttale
☐ Fibroadenoma
☐ Modificazioni a cellule colonnari
☐ Cisti solitaria
☐ Papilloma solitario
☐ Papillomi multipli
☐ Adenosi sclerosante
☐ Malattia fibrocistica
☐ Altro (specificare) _____

**PROLIFERAZIONE EPITELIALE**

☐ Assente
☐ Presente con atipia duttale
☐ Modificazioni a cellule colonnari con atipia (atipia piatta)
☐ Presente senza atipia
☐ Presente con neoplasia lobulare

**LESIONI MALIGNE 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

ALLEGATO A Dgr n. del pag. 55/94

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

**MICROINVASIONE** ☐ Assente ☐ Presente ☐ Possibile

**LESIONI MALIGNE INVASIVE** ☐ Assente

ISTOTIPO:

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

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 A Dgr n. del pag. 56/84




**ALLEGATO 6**
**DIAGNOSI E REFERTAZIONE DELLE LESIONI MAMMARIE**

**1 - DIAGNOSI E REFERTAZIONE DELLE LESIONI EPITELIALI PROLIFERATIVE**

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

**Iperplasia epiteliale senza atipie (iperplasia tipica, usuale; epiteliosi)**
Questo termine descrive le proliferazioni intraluminali costituite da una stratificazione dell'epitelio che non presenta atipie.
Gli aspetti diagnostici principali sono:

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

**Iperplasia duttale atipica /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/lin (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) (epiteliosi incipiente)
- Modificazioni a cellule colonnari con atipia citologica (atipia epiteliale piatta/DIN 1A)

ALLEGATO A Dgr n. del pag. 57/96

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

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<br>P63 talvolta positivo.<br>Negativi ER&PR | Positiva Ker 7<br>Neg. Ker 14<br>Negativo P63<br>Positivi ER&PR | Positiva Ker 7<br>Neg. Ker 14<br>Negativo P63<br>Positivi ER&PR |

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

**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 mio epiteliale 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.

ALLEGATO A Dgr n. del pag. 60 /84

**Carcinoma in situ**

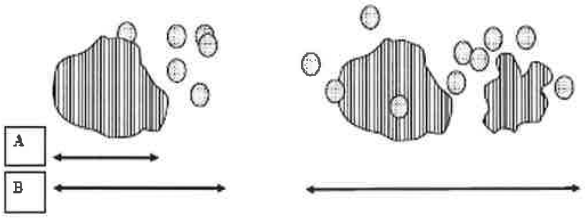
LN è spesso multifocale e la misurazione della sua estensione è poco realistica, nonchè poco utile ai fini prognostici. **Solo il CDIS/DIN deve essere misurato.**

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**

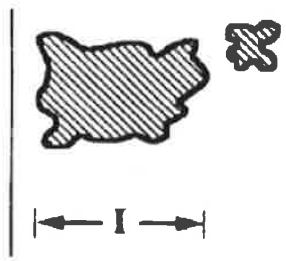
Il CI deve essere misurato come indicato sopra. Tuttavia se il CI è associato a CDIS e quest'ultimo si estende a oltre 1 mm dalla periferia della componente invasiva, occorrerà indicare sia le dimensioni del CDIS che quelle del nodulo tumorale complessivo di tutte e due le componenti (vedi fig.1)

FIGURA 1

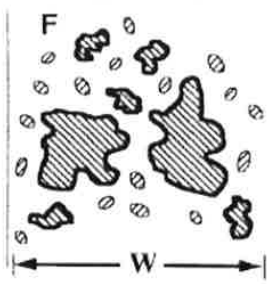



A = dimensioni carcinoma invasivo B = dimensioni totali del tumore

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




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



**GRADO DI DIFFERENZIAZIONE**

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).

ALLEGATO A Dgr n. del pag. 62/84

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. Poichè 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 A Dgr n. del pag. 64/94

**ALLEGATO 7**
**STADIAZIONE ANATOMO-PATOLOGICA (TNM)**

Viene rappresentata con il prefisso "p"

**Tumore primitivo (pT)**
La stadiazione ricalca quella del T clinico preoperatorio.
N.B. In caso di diagnosi clinica di carcinoma infiammatorio (cT4d), se la biopsia della cute è negativa per carcinoma e non vi è cancro primitivo localizzato misurabile, nello staging patologico la categoria T va indicata come pTX.

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

- **pNX** I linfonodi regionali non possono venire valutati (non sono stati esaminati o sono stati rimossi in precedenza)
- **pN0** Non metastasi nei linfonodi regionali:
- **pN0(i-)** Non metastasi nei linfonodi regionali, negativi per ITC all'analisi morfologica
- **pN0(i+)** Non metastasi nei linfonodi regionali, rilevazione di ITC (cellule tumorali isolate o formanti aggregati non più grandi di 0.2 mm o non più di 200 cellule) all'analisi morfologica.
- **pN0(mol-)** Non metastasi nei linfonodi regionali, negative per ITC rilevabili con tecniche di biologia molecolare (RT-PCR)
- **pN0(mol+)** Non metastasi nei linfonodi regionali, rilevazione di ITC con tecniche di biologia molecolare (RT-PCR)

- **pN1** Micrometastasi (aggregati di cellule tumorali >0.2 mm e/o >200 cellule, ma <o uguali a 2 mm) o metastasi a 1-3 linfonodi ascellari omolaterali, e/o linfonodi mammari interni omolaterali con metastasi microscopica rilevata valutando il linfonodo sentinella ma non clinicamente rilevabile, così suddivisi:
  - **pNmi** Micrometastasi (aggregati di cellule tumorali >0.2 mm e/o >200 cellule, ma <o uguali a 2 mm)
  - **pN1a** Metastasi in 1-3 linfonodi ascellari con almeno una più grande di 2 mm in diametro
  - **pN1b** Metastasi in linfonodi mammari interni con metastasi microscopica o macroscopica rilevata valutando il linfonodo sentinella ma non clinicamente rilevabile
  - **pN1c** pN1a + pN1b

- **pN2** Metastasi in 4-9 linfonodi ascellari omolaterali, o in linfonodi mammari interni omolaterali clinicamente rilevabili in assenza di metastasi in linfonodi ascellari:
  - **pN2a** Metastasi in 4-9 linfonodi ascellari con almeno una più grande di 2 mm in diametro
  - **pN2b** Metastasi clinicamente rilevabile in linfonodi mammari interni omolaterali, in assenza di metastasi in linfonodi ascellari

- **pN3** Metastasi in 10 o più linfonodi ascellari omolaterali; o in linfonodi sottoclaveari o metastasi clinicamente rilevabili in linfonodi mammari interni omolaterali in presenza di metastasi in uno o più linfonodi ascellari; o in >3 linfonodi ascellari con metastasi microscopiche, clinicamente negative, in linfonodi mammari interni; o in linfonodi sovraclaveari omolaterali:
  - **pN3a** Metastasi in 10 o più linfonodi ascellari o metastasi in linfonodi sottoclaveari con almeno una più grande di 2 mm in diametro
  - **pN3b** Metastasi clinicamente rilevabili in linfonodi mammari interni in presenza di metastasi in linfonodi ascellari; o metastasi in >3 linfonodi ascellari e linfonodi mammari interni con metastasi microscopiche rilevate valutando il linfonodo sentinella ma non clinicamente rilevabili
  - **pN3c** Metastasi in linfonodi sovraclaveari omolaterali

**Metastasi a distanza (pM)**
pM1 metastasi a distanza confermata microscopicamente
pM0 e pMx sono categorie non previste

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

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

**Stadiazione dei residui tumorali post-terapia neoadiuvante**
Viene rappresentata con il prefisso "y", cui segue "p". Per il T, si misura il più grande focus di tumore invasivo residuo, utilizzando "m" se multipli foci sono residui; per N e per M si segue quanto precedentemente scritto.

ALLEGATO A Dgr n. del pag. 60/194

# 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 anatomo-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).

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

- 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 Comission, 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 A Dgr n. del pag. 72/94




**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'Unita 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 e 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 e 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.

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

# 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)

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

## 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 progestinico (PR) va generalmente di pari passo con quella del ER; pazienti con ER+/PR- hanno una prognosi meno favorevole rispetto a pazienti ER+/PR+. 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 N0; 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 tirosinchinasico, privo di un ligando specifico, che viene attivato in seguito alla interazione con gli altri membri della famiglia (HER1, HER3 e HER4). La positività per HER2 (overespressione e/o amplificazione genica) ha un forte significato 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 immunoistichimica 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.

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

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 inchiostrato 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 retrival

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.

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

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.

ALLEGATO A Dgr n. del pag. 72/94



## 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.

REGIONE DEL VENETO Giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

**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 >/= 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 63Xo 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. Fornier 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 RevOncol-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 polisomy 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

ALLEGATO A Dgr n. del pag. 86/94




# 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 obbiettivo, 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

REGIONE DEL VENETO Giunta Regionale PROGRAMMAZIONE SANITARIA SEZIONE ATTUAZIONE

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 inchiostrati secondo protocollo. Vi sono però alcune indicazioni specifiche riguardanti i casi sottoposti a trattamento neoadiuvante.

**2.3 Campionamento del pezzo operatorio**
Valutazione macroscopica del tumore residuo
A. Nei casi con **risposta patologica completa** l'identificazione del letto tumorale può essere difficoltosa, di solito non si riconoscono noduli, ma piuttosto un'area a contorni mal definiti centralmente di aspetto edematoso e/o fibroso. È quindi necessario il campionamento di tutta l'area individuata, con sezioni contigue di 3-5 mm. In caso di posizionamento del repere va analogamente prelevata tutta l'area adiacente a esso. Utile ricordare che le microcalcificazioni associate alla neoplasia non scompaiono dopo chemioterapia, pertanto anche la radiografia del pezzo operatorio può facilitare il riconoscimento dell'area da campionare. È sempre consigliabile effettuare la valutazione con l'ausilio di radiogrammi e/o dati RNM pre-post-terapia.

B. Nei casi con **risposta patologica parziale** il residuo di malattia può apparire nodulare, parzialmente sclerotico, o a focolai multipli che contornano un'area edematosa e/o sclerotica. Vanno descritte, misurate e campionate tutte le lesioni evidenti, se il residuo è inferiore a cm 3 va incluso in toto, se superiore a cm 3 viene consigliato ampio campionamento (possibilmente con l'inclusione in toto dell'area sospetta).

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

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

**2.4 Campionamento del cavo ascellare**

I linfonodi del cavo ascellare vanno prelevati e inclusi in toto in maniera analoga a quanto eseguito nei casi non preceduti da chemioterapia, insieme alle aree di addensamento fibroso presenti.
È stata segnalata una possibile riduzione del numero dei linfonodi isolati post chemio-terapia, rispetto a quanto si rinviene normalmente.
L'eventuale ricerca del linfonodo sentinella in fase di stadiazione pre-trattamento, creando una fibrosi cicatriziale, può rendere più difficile la ricerca linfonodale.

**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 immunoistochimica 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), progestinici (PR) ed HER2. Infatti la loro espressione è notevolmente variabile a seconda delle casistiche. Inoltre gli stessi parametri possono essere di difficile valutazione sulla biopsia pre-chemioterapia.

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

**2.5.4 Recettori ormonali**

La componente neoplastica residua 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 bioptico, 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:

ALLEGATO A Dgr n. del pag. 92/94

### 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

ALLEGATO A Dgr n. del pag. 93/94




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

ALLEGATO A Dgr n. del pag. 94/94



**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

ALLEGATO B Dgr n. del pag. 1/43

**Regione del Veneto**
**Istituto Oncologico Veneto**
**Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico**

## Gruppo Regionale Patologi

# PROTOCOLLO PER LO SCREENING CITOLOGICO DEL CERVICOCARCINOMA

**Padova, ottobre 2009**

ALLEGATO B Dgr n. del pag. 2/143

REGIONE DEL VENETO Giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

**INDICE**

Introduzione

Parte Prima: **CITOLOGIA**
- A. Indicazioni al prelievo citologico cervico-vaginale
- B. Modalità di esecuzione del prelievo citologico cervico-vaginale e dell'allestimento del Pap test
  - Il prelievo citologico cervico-vaginale
  - L'allestimento del Pap test convenzionale
  - L'allestimento del Pap test su "strato sottile"
  - Il prelievo cervico-vaginale per il test molecolare
- C. Scheda di identificazione e dati anamnestici
- D. Accettazione – Refertazione – Archiviazione
- E. Quadri citologici: criteri morfologici
- F. Procedure di assicurazione della qualità

Parte Prima - Allegato 1: Lettura computer-assistita del Pap test

Parte Seconda: **ISTOLOGIA**
Introduzione
- A. Modalità di prelievo e campionamento del materiale bioptico-operatorio cervicale
- B. Diagnosi istologica con valutazione dei parametri stadiativi

Parte Seconda - Allegato 1: Classificazione Istologica dei tumori della cervice uterina
Parte Seconda - Allegato 2: Guida per la diagnosi istologica delle principali lesioni cervicali
Parte Seconda - Allegato 3: Protocollo di stadiazione dei carcinomi infiltranti della cervice uterina

ALLEGATO B Dgr n. del pag. 3/43




**Regione del Veneto**
**Istituto Oncologico Veneto - IRCCS**
**Registro Tumori del Veneto**

**Gruppo Regionale Patologi**

**Protocollo per lo Screening Citologico del Cervicocarcinoma**

**Padova, Ottobre 2009**

PRESENTAZIONE

In vista dell'accreditamento dello screening del cervico-carcinoma nel Veneto, i Patologi di questa Regione hanno affidato ad un gruppo di Colleghi, che da anni operano attivamente nel settore dello screening del cervico-carcinoma, il compito di raccogliere le linee guida utili a standardizzare le varie fasi del processo produttivo di pertinenza anatomo-patologica per l'allestimento e la diagnosi sia del Pap test sia del materiale istologico (biopsie e pezzi operatori) nell'ambito dello screening del cervico-carcinoma, così come esse risultano dai documenti attualmente presenti nella Letteratura.
Si tratta della prima revisione delle linee guida presentate nel dicembre 2006, curate dai Dottori Duilio Della Libera, Renzo Giordano, Daria Minucci e Antonella Pinarello, con il coordinamento del Dr. Enzo Venza.
Questa revisione si è resa necessaria a seguito di cambiamenti metodologici occorsi in questi ultimi anni.
Le linee guida rimangono distinte in due parti, la prima dedicata al primo livello diagnostico, quello citologico, la seconda alla diagnosi istologica. Siamo ben consci che per il successo dello screening del cervicocarcinoma non si può prescindere da un terzo indispensabile capitolo, quello cioè del trattamento e del corretto follow-up delle lesioni cervicali significative individuate con l'esame citologico e con l'esame istologico. Tutto ciò non è però responsabilità dei soli Patologi e costituirà pertanto un importante lavoro comune con i Colleghi Ginecologi-Colposcopisti.
Un sincero ringraziamento va agli amici del Registro Tumori del Veneto che con tanto entusiasmo hanno voluto supportare questo lavoro.

**Il Coordinatore**
**Dott. Romano Colombari**

**Componenti del gruppo di lavoro Patologi del cervico-carcinoma nel Veneto**
Dott.ssa Loredana Bozzola
Dott. Enzo Bianchini
Dott.ssa Concetta Chiarelli
Dott. Romano Colombari
Dott. Duilio Della Libera
Dott.ssa Licia Laurino
Dott.ssa Lorella Marchioro
Dott.ssa Antonella Pinarello

ALLEGATO B Dgr n. del pag. 4/43

REGIONE DEL VENETO Giunta regionale SEZIONE ATTIVITÀ SANITARIA PROGRAMMAZIONE

# PARTE PRIMA

# CITOLOGIA

ALLEGATO B Dgr n. del pag. 5/43

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

## A - INDICAZIONI AL PRELIEVO CITOLOGICO CERVICO-VAGINALE

In questa sezione sono riassunte le indicazioni al prelievo citologico cervico-vaginale del Documento operativo Gisci "Indicazioni per il prelievo citologico nello screening per il carcinoma cervicale" approvato al Convegno Nazionale Gisci 2006 (ultimo aggiornamento: settembre 2008) reperibile nel sito www.gisci.it.

Al fine di favorire l'ottimale interpretazione del Pap test:

- Il prelievo va effettuato preferenzialmente nella prima metà del ciclo, comunque in assenza di perdite ematiche ed a distanza di almeno tre giorni dalla fine delle mestruazioni, dall'uso di ovuli, creme o lavande vaginali e ad almeno due giorni di distanza dai rapporti sessuali anche se protetti.
- Il prelievo può essere eseguito anche durante la gravidanza (entro l'ottavo mese), l'allattamento e nel puerperio dopo 3 mesi dal parto, purché il dato sia segnalato sulla scheda anamnestica. Non devono essere effettuate visite ginecologiche o ecografie trans-vaginali nei due giorni precedenti l'esecuzione del prelievo.
- Il prelievo non deve essere effettuato in presenza di terapie con farmaci a somministrazione intravaginale.
- Il Pap test non dovrebbe essere effettuato in presenza di perdita ematica.
- Nel caso di perdita ematica intermestruale o in post menopausa dare il consiglio motivato di fare una visita ginecologica fornendo ogni supporto possibile, onde evitare che una patologia importante non venga diagnosticata.
- Se la donna presenta leucorrea intensa, tale da impedire all'esame speculare la completa visione del collo uterino, non effettuare il Pap test e consigliare visita ginecologica per opportuna diagnosi e terapia.
- L'uso di contraccettivi deve essere segnalato sulla scheda anamnestica; nel caso la donna utilizzi l'anello contraccettivo va segnalato sulla scheda. Non e' necessario che il dispositivo venga rimosso.
- Non esistono controindicazioni all'effettuazione del Pap test in caso di assunzione di farmaci per via orale o per via intramuscolare e neanche nel caso di pazienti sottoposte a chemioterapia. Se la chemioterapia è in corso o è recente va segnalato sulla scheda anamnestica.
- Nelle donne che siano state sottoposte a isterectomia totale per patologie benigne, documentate da referto anatomopatologico, il Pap test è inutile.
- In caso di isterectomia subtotale, o di mancanza di documentazione clinica, il Pap test va eseguito.

ALLEGATO B Dgr n. del pag. 6/43

REGIONE DEL VENETO Giunta Regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

**B - MODALITA' DI ESECUZIONE DEL PRELIEVO CITOLOGICO CERVICO-VAGINALE E DELL'ALLESTIMENTO DEL PAP TEST**

Vengono qui di seguito riportate in modo pressoché integrale le modalità per l'esecuzione del prelievo citologico cervico-vaginale del Documento operativo Gisci "Indicazioni per il prelievo citologico nello screening per il carcinoma cervicale" approvato al Convegno Nazionale Gisci 2006 (ultimo aggiornamento: settembre 2008) reperibile in originale nel sito www.gisci.it. Nel documento originale è possibile reperire i riscontri bibliografici di riferimento.

***1. IL PRELIEVO CITOLOGICO CERVICO-VAGINALE***

- Procedere all'identificazione del vetrino come da consuetudine del Centro di Screening, apponendo sulla parte smerigliata del vetrino la numerazione progressiva e/o i dati anagrafici (nome, cognome e data di nascita della donna facendo uso di una matita o di una penna vetrografica: infatti l'inchiostro, a contatto con il fissativo o con l'alcool della colorazione, si scioglie (Figura 1).

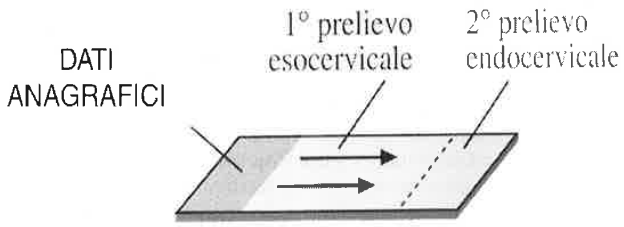



*Figura 1: Il Vetrino*

- Per facilitare l'introduzione dello speculum utilizzare l'acqua. E' sconsigliato l'uso del lubrificante perché, specialmente se usato in eccesso, può contaminare e alterare il preparato.
- In caso di abbondante muco o essudato sulla cervice, detergere delicatamente con un tampone di garza, eventualmente bagnato con soluzione fisiologica, per garantire che il prelievo sia effettuato direttamente sull'epitelio. La manovra eviterà che il preparato contenga solo muco o cellule degenerate in quanto staccate dall'epitelio già da tempo.
- Nel caso si sospetti una vaginite per la presenza di un essudato molto abbondante o in caso di perdita ematica è consigliabile rimandare il prelievo, spiegando che va eseguito dopo opportuna terapia.
- Effettuare in sequenza un prelievo esocervicale ed uno endocervicale.
- Il prelievo esocervicale viene effettuato per primo per evitare che venga contaminato dal sanguinamento che può seguire il prelievo endocervicale (Figura 2).

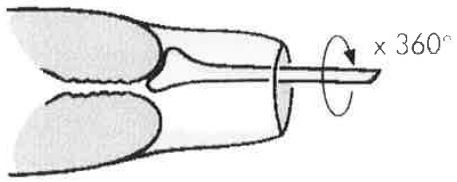



*Figura 2 : Prelievo esocervicale*

REGIONE DEL VENETO Giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

- Per il prelievo dall'esocervice utilizzare la spatola di Ayre (Figura 3), inserendo la parte più allungata all'inizio dell'orifizio cervicale e ruotando la spatola in senso orario per 360 gradi (Figura 5).




*Figura 3: Spatola di Ayre e Cytobrush*

- Per il prelievo endocervicale (Figura 4) utilizzare una spazzolina montata su uno stelo rigido (cytobrush) (Figura 3), che viene inserita nel canale cervicale e ruotata per 180/360° (Figura 4).

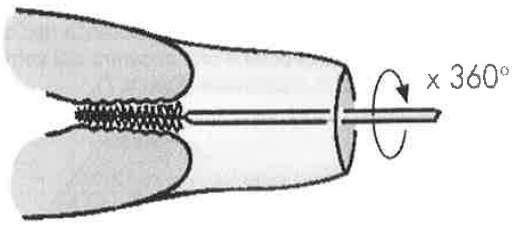



*Figura 4: Prelievo endocervicale*

## 2. L'ALLESTIMENTO DEL PAP TEST CONVENZIONALE

- Porre il materiale prelevato dall'esocervice e quello prelevato dall'endocervice in zone distinte del vetrino, definite per convenzione, in modo che il lettore sia informato sulla sede da cui proviene il materiale in esame.

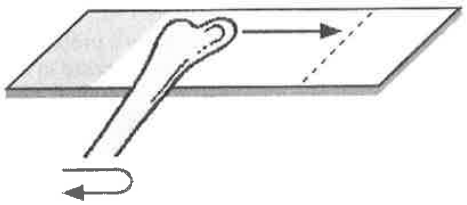


*Figura 5: Lo striscio esocervicale*

ALLEGATO B Dgr n. del pag. 8/143



*Figura 6: Lo striscio endocervicale*

- **Striscio esocervicale**: strisciare entrambi i lati della spatola su una parte del vetrino avendo cura di non sovrapporre il materiale, effettuando una pressione leggera per mantenere l'integrità delle cellule ed evitare processi di degenerazione. Il materiale strisciato deve essere sottile perché la presenza di strati sovrapposti impedisce un'adeguata lettura del preparato (Figura 5).
- **Striscio endocervicale**: il cytobrush va strisciato mediante un movimento rotatorio antiorario (Figura 6).
- Fissaggio: fissare immediatamente il preparato per evitare fenomeni di degenerazione cellulare conseguenti all'essiccazione: anche una breve attesa può danneggiare le cellule.
- Nel caso si utilizzi un fissativo sotto forma di spray, il dispositivo deve essere tenuto a distanza di 15/20 cm dal vetrino: infatti se effettuata a minor distanza, la potenza dell'erogazione sposterà le cellule alla periferia e indurrà la formazione di bolle d'aria al centro del vetrino stesso.
- Lasciare il vetrino ad asciugare in posizione orizzontale (Figura 7).

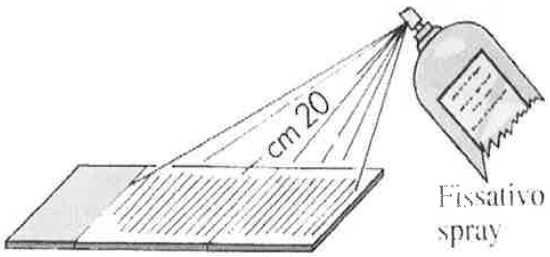



*Figura 7 : Fissaggio*

### *3. L'ALLESTIMENTO DEL PAP TEST SU "STRATO SOTTILE"*

- Il materiale prelevato dall'esocervice e dall'endocervice, viene immerso e rilasciato in liquido di conservazione contenuto in appositi barattoli.
- I barattoli devono essere aperti e identificati prima di iniziare il prelievo.
- Per l'effettuazione del prelievo esocervicale è necessario utilizzare la spatola di Ayre in plastica (non in legno per evitare il rilascio di frammenti che interferiscono in fase di allestimento) che garantisce un rilascio ottimale di cellule nel mezzo di conservazione. Per il prelievo endocervicale si utilizza il cytobrush (Figura 8).

ALLEGATO B Dgr n. del pag. 9/43

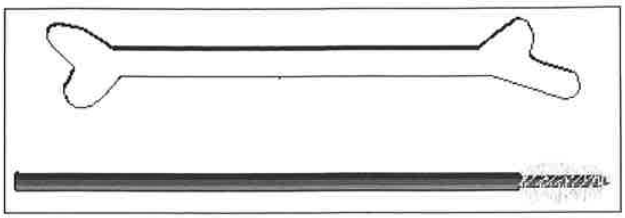


*Figura 8: Spatola di plastica e cytobrush per doppio campionamento*

- Alcuni centri utilizzano uno strumento di prelievo unico a forma di spazzola (Figura 9) che presenta una parte più lunga per il prelievo endocervicale e una parte più corta per quello esocervicale. Lo spazzolino una volta introdotto nel canale cervicale viene fatto ruotare per 360° e successivamente va risciacquato energicamente più volte, premendolo sul fondo e sulle pareti del barattolo (Figura 10).

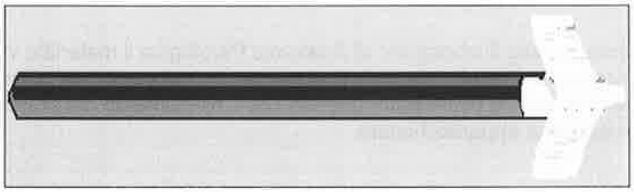


*Figura 9: Spazzolina per prelievo unico*

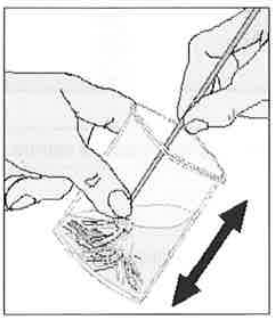


*Figura 10: Spazzolina per prelievo unico e rilascio del materiale nel barattolino*

- In caso di doppio campionamento, per permettere un maggiore rilascio di cellule nel liquido di conservazione, la spatola di Ayre ed il cytobrush una volta immersi nel barattolo vanno sfregati l'uno contro l'altro (Figura 11).



*Figura 11: Spatola di plastica e cytobrush per doppio campionamento*

- Successivamente, presso il laboratorio di Anatomia Patologica il materiale viene depositato in un unico strato di cellule in una piccola zona posta al centro del vetrino per processo di filtrazione (Thin prep) o per sedimentazione (Sure path) (Figura 12). L'allestimento del preparato non è manuale ma viene fatto con apposita apparecchiatura.

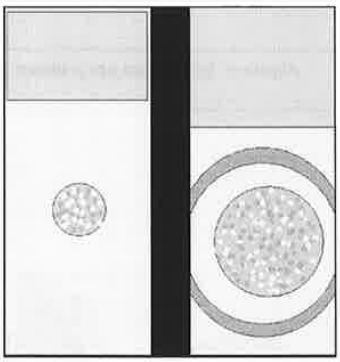


*Figura 12: Vetrino per Surepath e vetrino per Thin Prep*

La metodica di allestimento su strato sottile consente, oltre all'esame citologico, anche la ricerca del DNA virale del Papilloma virus (test HPV).

ALLEGATO B Dgr n. del pag. 11/43




### 4. *IL PRELIEVO CERVICO-VAGINALE PER IL TEST MOLECOLARE*

- Esistono sistemi di prelievo per la tipizzazione dell'HPV (mezzo di trasporto standard per la conservazione del DNA virale) che invece non consentono l'esame citologico in contemporanea. In questo caso, per avere la possibilità di effettuare il test molecolare in contemporanea al test citologico, è necessario effettuare un doppio prelievo: quello per il Pap test che sarà allestito con tecnica convenzionale e successivamente quello per il test HPV secondo le modalità concordate con il laboratorio di riferimento.
- In quest'ultimo caso il materiale per la ricerca del DNA virale viene prelevato utilizzando uno spazzolino a forma di cono, che, introdotto per due terzi nel canale cervicale, deve essere ruotato per tre volte in senso antiorario e successivamente immerso nel liquido di conservazione.
- Immergere lo spazzolino nel barattolo e una volta arrivato sul fondo, con una lieve pressione delle dita, spezzare il bastoncino in un punto prestabilito per lasciare la parte terminale dello spazzolino all'interno del barattolo. Subito dopo il prelievo chiudere accuratamente il flacone onde evitare perdite di liquido durante il trasporto.

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

## C. SCHEDA DI IDENTIFICAZIONE E DATI ANAMNESTICI

Le seguenti raccomandazioni sono state adattate dal Documento operativo Gisci "Indicazioni per il prelievo citologico nello screening per il carcinoma cervicale" approvato al Convegno Nazionale Gisci 2006 (ultimo aggiornamento: settembre 2008) reperibile nel sito www.gisci.it.

Identificazione della donna
La scheda-paziente va compilata con i dati anagrafici della donna, il codice fiscale e l'indirizzo. Il numero di telefono della donna riportato sulla scheda rappresenta il consenso ad essere contattata per telefono nel caso di richiamo per approfondimenti.

Identificazione del vetrino o contenitore per citologia in fase liquida
Al fine di garantire la corrispondenza tra vetrino e la scheda-paziente, il vetrino, oppure il contenitore per citologia in fase liquida, deve giungere in Anatomia Patologica identificato con Nome-Cognome e Data di nascita della donna. Per riportare i dati identificativi va usata una matita o una penna vetrografica (non si possono utilizzare pennarelli perché l'inchiostro a contatto con il fissativo o con l'alcool della colorazione si scioglie).

Identificazione del prelevatore
La scheda deve contenere una sigla che identifichi l'operatore che ha effettuato il prelievo al fine di consentire il controllo di qualità del prelievo per prelevatore che ogni centro di screening deve effettuare periodicamente.

## *D. ACCETTAZIONE – REFERTAZIONE – ARCHIVIAZIONE*

Le operazioni di accettazione, refertazione e archiviazione dei preparati devono essere automatizzate, utilizzando software e classificazione compatibili e interfacciabili con i dati delle anagrafi sanitarie (1).

I preparati non identificabili non vanno processati e quindi non conteggiati tra gli inadeguati.

E' fortemente raccomandata la refertazione citologica secondo il *Sistema Bethesda 2001*.

Per quanto riguarda l'archiviazione dei dati, devono essere garantite procedure che permettano di effettuare valutazioni comparate tra le diagnosi citologiche-istologiche e il calcolo della predittività delle diverse diagnosi citologiche.

I preparati citologici devono essere conservati per almeno 5 anni; i preparati istologici e le relative inclusioni in paraffina devono essere conservati per almeno 20 anni (2). Tale indicazione si riferisce al periodo minimo di conservazione, essendo consentito, agli Enti che lo ritengano necessario, un tempo di conservazione più lungo.

I flaconi contenenti il liquido residuo dopo allestimento dei preparati su strato sottile devono essere conservati, fino a smaltimento, all'interno di armadi ignifughi, rispondenti alla normativa UNI EN 14470-1 (3).

## BIBLIOGRAFIA

1. Dgr. n. 4538 del 28 dicembre 2007 della Regione Veneto "Manuale per l'accreditamento istituzionale dei programmi di screening oncologici".
2. Dgr. n. 3673 del 25 novembre 2008 della Regione Veneto "Manuale per l'accreditamento istituzionale dei laboratori di Anatomia Patologica ed Istocitopatologia", Allegato B "Lista di verifica dei requisiti minimi specifici e di qualità per l'autorizzazione".
3. D.Lgs. 81/08 "Testo Unico sulla sicurezza", art. 46 sulla Prevenzione Incendi e Titolo IX sulle Sostanze Pericolose.

ALLEGATO B Dgr n. del pag. 13/43




**E - QUADRI CITOLOGICI: CRITERI MORFOLOGICI**

In questa sezione sono riassunti i criteri diagnostici descritti in Solomon D, Nayar R, Ed. Il Sistema Bethesda per refertare la citologia cervicale: definizioni, criteri morfologici e note esplicative. Ed italiana a cura di Beccati MD, Rossi S. CIC Ediz. Internaz. 2004.

**VALUTAZIONE MORFOLOGICA - 1**

ADEGUATEZZA DEL CAMPIONE
I preparati vengono classificati in: Soddisfacenti (Adeguati) e Non Soddisfacenti (Inadeguati) per la valutazione, secondo i criteri del Sistema Bethesda 2001 (TBS 2001).

Il campione e' considerato **soddisfacente** quando:

1. paziente e campione sono univocamente identificabili
2. il campione e' accompagnato dalle pertinenti notizie cliniche (All. Scheda Informativa Personale)
3. il campione e' correttamente strisciato e fissato e colorato
4. l'interpretazione del preparato non e' inficiata da fattori oscuranti (flogosi, emazie, citolisi, materiale contaminante, ammassamenti cellulari) per almeno il 25% della componente squamosa dello striscio
5. è presente una adeguata componente squamosa (8000 – 12000 cellule squamose) e della zona di trasformazione.
6. il numero minimo di cellule squamose va stimato facendo riferimento ad immagini standard di campi microscopici con cellularità squamosa nota, valutata a 4X ingr. (All. Immagine di riferimento). E' necessario leggere, con obiettivo 4X, un numero di campi microscopici in relazione all'immagine presa come riferimento (8 campi da 1000 cellule - 6 campi da 1400 cellule ecc...).

Il campione allestito in ***strato sottile*** è soddisfacente quando sono rispettati naturalmente i primi 3 criteri sopracitati. Inoltre: il rispetto del criterio 4 è garantito dalla metodica di allestimento.
Il criterio 5 va aggiustato alle dimensioni, ridotte rispetto al preparato tradizionale, dell'area da esaminare. Il cerchio di mm. 20 di diametro del vetrino dello strato sottile rappresenta circa un quarto dell'area di un vetrini standard da mm. 25x50. Pertanto il criterio di copertura cellulare di più del 10% del Pap test tradizionale con cellule epiteliali squamose ben conservate e ben visualizzate, diventa nel vetrino in strato sottile, più del 40%. Il campione adeguato in strato sottile comprende almeno 5.000 cellule epiteliali squamose ben conservate e ben visualizzate. La stima va fatta su un minimo di 10 campi microscopici, abitualmente a 40X, lungo il diametro maggiore del preparato stimando il numero medio delle cellule dei campi valutati. Nel caso in cui i preparato presenti aree vuote, deve essere stimata la percentuale delle aree ipocellulari ed i campi contati devono rispecchiare tale proporzione. In pratica nei preparati in strato sottile la cellularità è stimata rapidamente ed in modo riproducibile. La metodologia delle immagini di riferimento è di facile apprendimento ed ha migliore riproducibilità inter-osservatore rispetto al criterio della percentuale di copertura del vetrino.

Il campione e' considerato **non soddisfacente** (inadeguato) se:

il 75% delle cellule squamose è non interpretabile per la presenza di fattori oscuranti, fatti salvi i criteri minimi di cellularità del preparato.

Per consentire la valutazione della qualità del prelievo gli inadeguati sono suddivisi in: inadeguati di tipo tecnico e inadeguati di tipo non-tecnico.

Gli inadeguati di tipo tecnico comprendono i preparati valutati non soddisfacenti per assenza o scarsità di cellule squamose, per fissazione impropria, per striscio ematico o eccessivamente spesso.

Il tasso accettabile di inadeguati totale (tecnici+non-tecnici) non deve comunque superare il 5% (desiderabile <3%) secondo Linee Guida Europee e Gisci.

Tutti i test inadeguati per motivi tecnici vengono ripetuti subito; quelli per motivi non tecnici, dopo eventuale terapia medica.

Un campione che presenta anomalie citologiche, va comunque valutato anche se nel complesso il preparato viene giudicato inadeguato.

Preparati per i quali non si procede a processazione (campioni non identificabili, vetrino rotto / smarrito ecc..) non vanno conteggiati tra gli inadeguati e si segnala la non conformità.

Nella valutazione dell'adeguatezza del preparato cervico-vaginale importante la ricerca di fattori oscuranti a lettura e/o alterazioni artefattuali o tecniche che interferiscano con la lettura citologica.

Nel caso di fattori oscuranti la lettura (ammassamenti cellulari, citolisi, sangue, flogosi, essiccamento) il preparato va considerato inadeguato qualora l'alterazione interessi globalmente più del 75% della superficie del preparato stesso. Se nonostante la presenza di artefatti, è possibile interpretare come atipiche le cellule presenti, il preparato può essere considerato come interpretabile.

Le alterazioni artefattuali tecniche (essiccamento del preparato, inadeguata o intempestiva fissazione) rendono non interpretabile il preparato alterando l'integrità cellulare, la conservazione nucleare e la struttura cromatinica (riferimento morfologico alla morfologia nucleare della cellula squamosa intermedia).

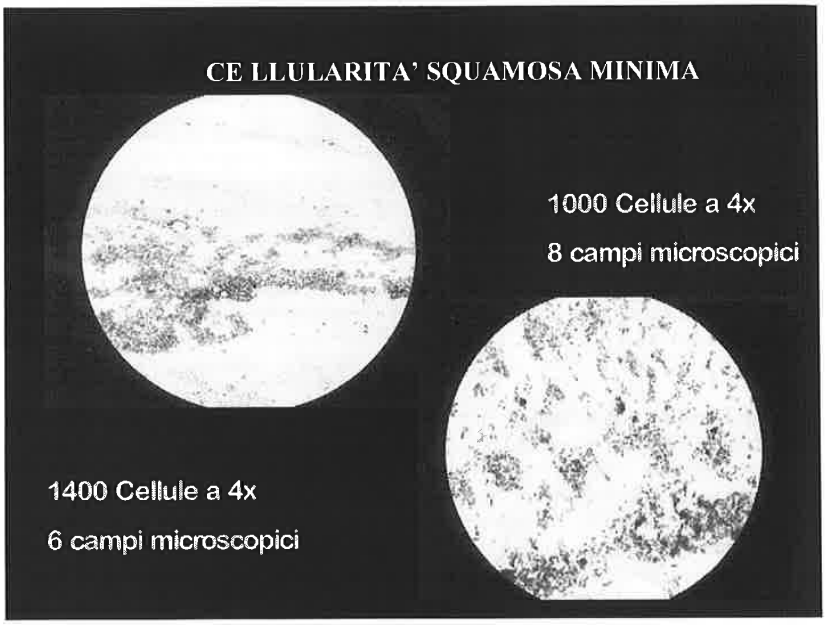



Immagine di riferimento per la valutazione della cellularità squamosa (da: Solomon D, Nayar R, Ed. Il Sistema Bethesda per refertare la citologia cervicale: definizioni, criteri morfologici e note esplicative. Ed italiana a cura di Beccati MD, Rossi S. CIC Ediz. Internaz. 2004).

| **Tabella 1 - ADEGUATEZZA DEL CAMPIONE** | | |
|---|---|---|
| **Soddisfacente** per la valutazione (annotare presenza/assenza di componente endocervicale/zona di trasformazione e altri indicatori di qualità, ad es. sangue parzialmente oscurante, infiammazione) | **Non soddisfacente** per la valutazione (specificare motivo) | |
| | Preparato rifiutato/ non processato (specificare motivo) | Preparato processato ed esaminato, ma non soddisfacente per la valutazione di anormalità epiteliali a causa di (specificare motivo) |

ALLEGATO B Dgr n. del pag. 13/43




**VALUTAZIONE MORFOLOGICA - 2**

IL PAP TEST NEGATIVO E FLOGISTICO

**PREPARATO NEGATIVO PER LESIONI INTRAEPITELIALI**

1) Presenza di organismi
2) Alterazioni cellulari reattive associate a flogosi
3) Alterazioni cellulari reattive associate a riparazione
4) Alterazioni cellulari reattive associate a IUD
5) Alterazioni cellulari reattive associate a atrofia
6) Alterazioni cellulari reattive post terapia radiante
7) Cellule ghiandolari in post isterectomia
8) Cellule endometriali in donne di età > 40 anni

**ALTERAZIONI FLOGISTICHE GENERALI DELLE CELLULE SQUAMOSE**

ALTERAZIONI CITOPLASMATICHE

1) Vacuolizzazione
2) Citolisi
3) Alone perinucleare
4) Alterazioni della colorazione/pseudoeosinofilia

ALTERAZIONI NUCLEARI

1) Ingrandimento nucleare, anisonucleosi, anisocariosi
2) Multinucleazione
3) Increspatura della membrana nucleare con addossamento della cromatina lungo il bordo nucleare e scolorimento dell'area centrale
4) Picnosi, cariolisi, carioressi

**ALTERAZIONI FLOGISTICHE SPECIFICHE DELLE CELLULE SQUAMOSE**

INFEZIONE DA TRICHOMONAS

1) Identificazione del parassita
2) Reazione infiammatoria evidente
3) Ammassi di PMN attorno al parassita
4) Nuclei aumentati di volume e ipercromatici
5) Alone perinucleare
6) Orangiofilia delle cellule basali e intermedie

INFEZIONE DA CANDIDA

1) Identificazione del parassita (spore/ife)
2) Reazione infiammatoria evidente
3) Ammassi di PMN attorno al parassita
4) Nuclei aumentati di volume e ipercromatici

VAGINOSI BATTERICA

1) Reazione infiammatoria evidente
2) Fondo nebuloso
3) Ammassi cellulari di cellule squamose e di PMN
4) Nuclei aumentati di volume e ipercromatici

INFEZIONE DA HSV (Herpes Simplex Virus)

1) Nuclei a vetro smerigliato
2) Inclusioni nucleari eosinofile
3) Grandi celle multinucleate/sincizi

INFEZIONE DA ACTINOMICES

1) Grovigli di microrganismi filamentosi
2) Granuli sulfurei
3) Reazione infiammatoria

ALLEGATO B Dgr n. del pag. 16 /43




**ALTERAZIONI CELLULARI REATTIVE BENIGNE/METAPLASIA PAVIMENTOSA**

1) Ingrandimento nucleare
2) Alone perinucleare/Pseudocoilocitosi
3) Fondo flogistico
4) Assenti microrganismi
5) Reperto spot

**ALTERAZIONI CELLULARI REATTIVE BENIGNE/RIPARAZIONE TIPICA**

1) Ingrandimento nucleare
2) Nucleoli
3) Lembi monostratificati con nuclei orientati
4) Assenti cellule isolate con grossolane alterazioni nucleari

**ATROFIA CON FLOGOSI**

1) Ingrandimento nucleare senza ipercromia
1) Autolisi
2) Presenza di cellule parabasali degenerate
3) Essudato infiammatorio basofilo/blue blobs

**ALTERAZIONI POST RADIOTERAPIA/CHEMIOTERAPIA**

1) Ingrandimento cellulare con normale rapporto N/C
2) Ingrandimento nucleare con anisonucleosi/anisocariosi
3) Vacuolizzazione
4) Aspetti riparativi associati

**ALTERAZIONI DA IUD**

1) Cellule ghiandolari in gruppi
2) Nuclei ingranditi con anisonucleosi/anisocariosi
3) Aspetti di degenerazione nucleare

**PARACHERATOSI TIPICA**

1) Cellule squamose in miniatura con citoplasma orangiofilo o intensamente eosinofilo
2) Nuclei di aspetto normale

**PARACHERATOSI ATIPICA**

1) Cellule squamose in miniatura con citoplasma orangiofilo o intensamente eosinofilo
2) Nuclei ingranditi, ipercromatici, irregolari.

| **Tabella 2 - NEGATIVO PER LESIONI INTRAEPITELIALI O MALIGNITÀ'** | | |
|---|---|---|
| Organismi:<br>• Trichomonas vaginalis<br>• Funghi del tipo Candida<br>• Variazione della flora suggestiva di vaginosi batterica<br>• Batteri morfologicamente del tipo Actinomyces<br>• Modificazioni cellulari suggestive di Herpes Simplex Virus | Altri reperti non-neoplastici:<br>alterazioni cellulari reattive associate con:<br>• Infiammazione (compreso riparazione atipica)<br>• Radiazione<br>• IUD<br>• Cellule ghiandolari in post-isterectomia<br>• atrofia | Altro:<br>cellule endometriali (in donne di 40 anni o > (specificare se negativo per lesione squamosa) |

ALLEGATO B Dgr n. del pag. 47/143

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

**VALUTAZIONE MORFOLOGICA - 3**

**A - ATIPIE CITOLOGICHE DELLE CELLULE SQUAMOSE**

CELLULE SQUAMOSE ATIPICHE (ASC): di significato indeterminato ( ASC-US)
non e' possibile escludere HSIL (ASC-H)

Presenza di alterazioni citologiche suggestive per lesione intraepiteliale squamosa, qualitativamente o quantitativamente insufficienti per una definitiva interpretazione.

Tre aspetti essenziali:

- Differenziazione squamosa
- Aumento rapporto nucleo/citoplasma (N\C)
- Minima ipercromasia e rare multinucleazioni

CRITERI DIAGNOSTICI ASC-US

- Diametro del nucleo maggiore 2,5 - 3 volte rispetto al nucleo di una cellula squamosa intermedia
- Rapporto N\C lievemente aumentato
- Minima ipercromasia nucleare, minima irregolarità della distribuzione della cromatina
- Minima irregolarità della forma del nucleo, rare inucleazioni
- Anomalie nucleari associate a citoplasma denso e orangiofilo (paracheratosi atipica).

Vari tipi di ASC-US:
- su cellule metaplastiche
- In paracheratosi atipica (cellule paracheratosiche con nuclei allargati ed irregolare
- membrana nucleare)
- In atrofia (cellule immature in ammassi; Aloni perinucleari; cellule paracheratosiche con nuclei picnotici)

N.B. Il 3,5% degli ASC-US nasconde lesioni di alto grado

CRITERI DIAGNOSTICI ASC – H

- Cellule piccole con alto rapporto N\C metaplasia atipica immatura.
- Cellule isolate, scoese, allineate o in piccoli gruppi
- Dimensione di una cellula metaplastica con nuclei più grandi del normale di una volta e mezzo o due volte e mezzo
- Nuclei lievemente ipercromici con contorni lisci, talora un pò irregolari e polimorfi

N.B. Il 17% degli ASC-H nasconde lesioni di alto grado

LESIONE SQUAMOSA INTRAEPITELIALE A BASSO GRADO (L – SIL)

CRITERI DIAGNOSTICI:

- Cellule "mature" isolate o in lamine
- I nuclei hanno diametro tre volte maggiore a quello di una cellula intermedia
- Rapporto N/C lievemente aumentato
- Ipercromasia nucleare variabile, con cromatina spesso uniformemente a fini granuli
- Variazione di dimensione,forma e numero dei nuclei
- Spesso binucleazione e multinucleazione
- Nucleoli assenti (o se presenti, non cospicui)
- Membrana nucleare lievemente irregolare (può essere liscia)
- Citoplasma con contorni netti, con alone chiaro perinucleare e anello periferico di citoplasma addensato e intensamente colorato (coilocitosi) questo aspetto può mancare e il citoplasma essere compatto ed orangiofilo (L-SIL senza effetto citopatico virale)

In assenza di alterazioni nucleari, le modificazioni citoplasmatiche non sono parametri sufficienti per la definizione di L-SIL (definirlo ASC-US).




LESIONE SQUAMOSA INTRAEPITELIALE DI ALTO GRADO (H – SIL)

CRITERI DIAGNOSTICI:

- Cellule più piccole e meno "mature" del L-SIL, tipo cellula basale
- Cellule singole, in lamine o aggregati simil sinciziali
- I nuclei sono ipercromici, polimorfi con rapporto N\C elevato
- La cromatina finemente o grossolanamente granulare, distribuita omogeneamente
- Membrana nucleare irregolare e con incisure
- Nucleoli assenti (possono essere presenti se l'H-SIL si estende alle ghiandole endocervicali)
- Il citoplasma può essere delicato e (merletto), metaplastico compatto, talora cheratinizzato (H-SIL cheratinizzante)

LESIONE SQUAMOSA INTRAEPITELIALE ESTESA ALLE GHIANDOLE

Quando H-SIL si estende alle ghiandole endocervicali si osservano dei lembi di cellule che possono far sorgere il dubbio sull'origine squamosa o ghiandolare. L'aggregato di natura squamosa presenta: Cellule interne fusate e a vortice; Cellule periferiche appiattite (raramente a palizzata);Contorno del gruppo liscio-rotondeggiante;Talora necrosi (diatesi);Talora micronucleoli; Presenza di cellule squamose displastiche sul fondo.

Può coesistere con l'AIS

N.B. Aspetti che possono sfuggire : Rare e piccole cellule H-SIL (può definito ASC-H); Cellule HSIL in filiera in un contesto di muco (possono simulare istiociti, cellule endocervicali in regressione, cellule endometriali)

CARCINOMA SQUAMOSO INVASIVO

CHERATINIZZANTE

CRITERI DIAGNOSTICI: Relativamente poche cellule cheratinizzate, con marcata anisocitosi, più spesso isolate ma talora in aggregati irregolari. Marcata variabilità della dimensione dei nuclei con cromatina in cromocentri grossolani e talora evidenti macronucleoli.Diatesi tumorale sullo sfondo

NON CHERATINIZZANTE

CRITERI DIAGNOSTICI: Cellule polimorfe isolate o in aggregati similsinciziali a bordi mal definiti e con citoplasma basofilo. Nuclei ipercromici con cromocentri grossolani e macronucleoli prominenti. Diatesi tumorale sullo sfondo

N.B: spesso aspetti cheratinizzanti e non cheratinizzanti coesistono nello stesso vetrino.

ALLEGATO B Dgr n. del pag. 18/43




**B - ATIPIE CITOLOGICHE DELLE CELLULE GHIANDOLARI**

CELLULE GHIANDOLARI ATIPICHE (AGC)
Le AGC sono una entita' che sottende un aumentato rischio per lesioni di alto grado, anche di tipo squamoso

Le AGC sono di diverso citotipo morfologico: Endocervicali
Endometriali
Ghiandolari NOS

CELLULE GHIANDOLARI ENDOCERVICALI ATIPICHE (AGC)

Non sottendono la categoria"più probabilmente reattiva" perchè fuorviante per il clinico.
Le AGC presentano atipie nucleari tuttavia senza i caratteri inequivocabili dell'adenocarcinoma.

CRITERI DIAGNOSTICI:
- A lembo o a nastro
- Affollamento e sovrapposizione nucleare
- Ingrandimento nucleare
- Talora variazione della forma e dimensione dei nuclei;
- Frequente modesta ipercromasia
- Possono essere presenti nucleoli
- Rare le mitosi
- Il citoplasma può essere abbondante ma il rapporto N\C è elevato
- Bordi cellulari spesso distinti

Più probabilmente neoplastiche:

CRITERI DIAGNOSTICI:
- Affollamento e sovrapposizione nucleare aumentata
- Nuclei maggiormente ingranditi
- Maggiore ipercromasia
- Disposizione a rosetta o a piume d'uccello delle cellule
- Rapporto N\C aumentato
- Poco citoplasma e bordi maldefiniti

N.B. Alcuni processi non neoplastici possono mostrare AGC:prelievo sull'istmo, metaplasma tubarica, processi riparativi, polipi endocervicali, iperplasia microghiandolare, Arias-Stella, terapia radiante.

CELLULE GHIANDOLARI ENDOMETRIALI ATIPICHE

CRITERI DIAGNOSTICI:
- Le cellule si presentano in piccoli gruppi, tridimensionali
- Con bordi cellulari maldefiniti
- Citoplasma scarso e finemente vacuolato
- Nuclei ingranditi con lieve ipercromasia
- Possono essere presenti piccoli nucleoli

NOTA: Le cellule endometriali atipiche non sono ulteriormente caratterizzate come probabile neoplasia, poichè questa distinzione è difficile e scarsamente riproducibile.

ADENOCARCINOMA ENDOCERVICALE IN SITU (AIS)

CRITERI DIAGNOSTICI:
- Il fondo è pulito senza diatesi o detriti infiammatori
- Cellule in lembi, aggregati, nastri o rosette, affollate, pseudostratificate
- Non c'è nido d'ape
- Negli aggregati i nuclei si dispongono a palizzata con aspetto piumoso in periferia
- Nuclei ingranditi, anisocariosi o monotonia, ovali, allungati, sovrapposti
- Ipercromia nucleare, cromatina diffusamente dispersa, cromocentri grossolani

ALLEGATO B Dgr n. del pag. 20143




- Nucleoli incospicui, piccoli (+ evidenti nell'adenocarcinoma infiltrante)
- Mitosi comuni
- Apoptosi comune
- Rapporto N\C aumentato
- Quantità di citoplasma e mucina ridotti

ADENOCARCINOMA ENDOCERVICALE INFILTRANTE

CRITERI DIAGNOSTICI:

- Numerose cellule singole colonnari, lembi bidimensionali, aggregati tridimensionali, o sinciziali
- Nuclei grandi, pleomorfi
- Cromatina a distribuzione irregolare, con aree chiare
- Membrana nucleare irregolare
- Macronucleoli
- Citoplasma finemente vacuolato
- Talora è presente diatesi tumorale
- Può essere presente coesistente lesione squamosa di alto grado (circa 50% dei casi)
- Nei casi di adenocarcinoma endocervicale ben differenziato, diatesi e macronucleoli possono mancare

ADENOCARCINOMA ENDOMETRIALE
Gli aspetti citologici dipendono dal grado del tumore: nel grado1 l'esfoliazione è scarsa, le cellule hanno minima atipia citologica (sono interpretate come "cellule endometriali atipiche"), le cellule numericamente sono inferiori rispetto agli adenocarcinomi della cervice (nei prelievi cervicali), inoltre hanno dimensione cellulare e nucleare inferiore, e nucleoli meno prominenti.

CRITERI DIAGNOSTICI:

- Cellule isolate o in piccoli spessi aggregati
- Nuclei da poco a molto ingranditi (più grandi all'aumentare del grado del tumore)
- Anisocariosi e perdita della polarità nucleare
- Ipercromasia nucleare moderata, cromatina a distribuzione irregolare ed aree chiare, specie negli alti gradi
- I nucleoli aumentano di dimensioni con il grado del tumore

| ANORMALITÀ' DELLE CELLULE EPITELIALI | | |
|---|---|---|
| <u>Cellule Squamose</u><br>• cellule squamose atipiche (ASC)<br>- di significato indeterminato (ASC-US)<br>- non è possibile escludere HSIL (ASC-H)<br>• lesione intraepiteliale di basso grado (LSIL) comprendente HPV, displasia lieve, CIN1<br>• lesione intraepiteliale di alto grado (LSIL) comprendente displasia moderata e severa, carcinoma in situ, CIS/CIN2/CIN3<br>• con quadri sospetti per invasione<br>• carcinoma squamoso | <u>Cellule Ghiandolari</u><br>• cellule ghiandolari atipiche (AGC)<br>• endocervicali, endometriali, ghiandolari NOS<br>• cellule ghiandolari atipiche vs neoplastiche (specificare: endocervicali o NOS)<br>• adenocarcinoma endocervicale in situ (AIS) o adenocarcinoma<br>- endocervicale<br>- endometriale<br>- extrauterino<br>- NOS | altre neoplasie maligne: specificare |

ALLEGATO B Dgr n. del pag. 29/43

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

**BIBLIOGRAFIA**


1. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. Second edition. International Agency for Research on cancer.
2. Solomon D, Davey D, Kurman R, et al. . Il Sistema Bethesda 2001. Terminologia per la refertazione della citologia cervicale. JAMA 2002;287:2114-2119 Traduzione: Stefano Ciatto www. gisci. It
3. Solomon D, Nayar R, Ed. Il Sistema Bethesda per refertare la citologia cervicale: definizioni, criteri morfologici e note esplicative. Ed italiana a cura di Beccati MD, Rossi S. CIC Ediz. Internaz. 2004.
4. Bos AB, van Ballegooijen M, van den Akker-van Marle E, et al. Endocervical status is not predictive of the incidence of cervical cancer in the years after negative smears. Am J Clin Pathol 2001; 115: 851-855.
5. Siebers AG, de Leew H, Verbeek AL, Hanselaar AG. Prevalence of squamous abnormalities in women with a recent smear without endocervical cells is lower as compared to women with smears with endocervical cells. Cytopathology 2003 Aug; 14(4): 225.
6. Sharpless KE,Schnatz T,et alt. Dysplasia associated wiyh atypical glandular cells on cervical cytology. Obstet Gynecol 2005;105:494-500.
7. Krane JF, Granter SR, Trask RE, Hogan CL, Lee KR. Papanicolaou smear sensitivity for the adenocarcinoma of the cervix: a study of 49 cases. Cancer 2001;93:8-15
8. Documento operativo Gisci per l'applicazione nei programmi di screening del sistema Bethesda 2001. Documento Gisci 2006, www.gisci.it.
9. Protocollo diagnostico-terapeutico dello screening per la prevenzione dei tumori del collo dell'utero nella regione Emilia-Romagna. 3° edizione Anno 2008
10. Modifica a documento operativo Gisci per l'applicazione nei programmi di screening del sistema Bethesda 2001. Documento Gisci 2009, www.gisci.it.

ALLEGATO B Dgr n. del pag. 22/43

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

## F - PROCEDURE DI ASSICURAZIONE DELLA QUALITA'

Il programma di screening del carcinoma della cervice uterina ha come obiettivo la riduzione della mortalità e dell'incidenza di patologia neoplastica. Per tale programma esiste una efficacia documentata, a patto che vengano predisposte misure di controllo del programma di screening che consentano di mantenere le condizioni ottimali in cui questa efficacia è stata dimostrata.

Nella pianificazione delle attività di screening, deve perciò essere data particolare rilevanza ad un progetto di verifica della qualità (VQ), che ne garantisca l'efficacia e ne contenga i possibili effetti negativi. Alla base della promozione della qualità di un programma di screening cervicale, ci deve essere la consapevolezza che si tratta di processi organizzativi complessi (profili di assistenza) e che pertanto deve riguardare la qualità tecnico-professionale, organizzativa e percepita. La VQ deve quindi essere applicata a tutte le varie fasi operative che hanno un impatto diretto sul risultato del programma di screening valutato

***Verifica interna di qualità (VQI)***

Le VQI devono essere inserite nella normale routine diagnostica divenendo così strumento di crescita professionale e di miglioramento della qualità e dell'appropriatezza delle prestazioni. In particolare, nel servizio di Anatomia Patologica, si dovranno adottare procedure di VQI sia della fase preanalitica, sia analitica e postanalitica, in grado di monitorare e migliorare la riproducibilità ed il livello di accuratezza.

FASE PREANALITICA

- Verifica della congruità della richiesta, dei prelievi e della corrispondenza foglio di lavoro-vetrini
- Valutazione della fissazione e colorazione dei preparati

FASE ANALITICA

Questa sezione è stata adattata dal documento GISCi "raccomandazioni per il controllo di qualità in citologia cervico vaginale".

Le VQI della fase di lettura citologica devono prevedere uno standard di accettabilità, inteso come livello minimo di procedure di qualità alle quali un laboratorio dedicato allo screening deve attenersi. Devono pertanto essere monitorati:

- Numero totale Pap test/all'anno
- Monitoraggio statistico delle risposte citologiche (negativi-positivi-inadeguati) per centro e per singolo lettore
- Monitoraggio statistico delle classi diagnostiche all'interno dei positivi (da ASC-US a carcinoma)
- Correlazione cito-istologica
- Calcolo della predittività diagnostica positiva e per singole classi diagnostiche
- Revisione falsi negativi/falsi positivi

Controlli aggiuntivi sono previsti (standard desiderabile) sulla base del volume di attività e delle caratteristiche organizzative del laboratorio (Pap test/anno: <15000, 15000 – 25000, >25000):

- Rescreening di parte (10%) dei Pap test negativi
- Rescreening rapido
- Rescreening con l'ausilio di sistemi di lettura automatici
- Lettura collegiale

FASE POSTANALITICA

- Verifica della concordanza foglio di lavoro-referto

ALLEGATO B Dgr n. del pag. 23/43




***Verifica esterna di qualità (VQE)***

E' importante anche l'adozione di VQE.

A tale proposito è consigliabile aderire alla iniziativa di VQE regionale attualmente in atto, basata sull'utilizzo di immagini digitali o telepatologia (Online Telepathology Service. Azienda ULSS18, Rovigo. https://servizi.azisanrovigo.it/).

Tutte le procedure di VQ devono essere documentate

**TABELLA 1: Indicatori e parametri di qualità**

| INDICATORE/PARAMETRO DI QUALITA' | | VALORI DI RIFERIMENTO |
|---|---|---|
| NUMERO TEST LETTI PER ANNO | **LABORATORIO: Numero test-anno > 15.000**<br>**LETTORE: Numero test-anno < 7.500** | LABORATORIO > 15000<br>LETTORE<br><br>7500 massimo compreso controllo di qualità |
| INADEGUATI | **Numero test di screening con esito inadeguato x 100**<br>**Numero test di screening** | < 7% accettabile<br>< 5% desiderabile<br><br>3.1% Survey GISCi 2006 |
| REFERRAL RATE ALLA COLPOSCOPIA (proporzione di casi inviati in colposcopia per qualsiasi motivo) | **Numero di donne screenate inviate in colposcopia x 100**<br>**numero di donne screenate** | Accet. ≤ 5%<br>Desid< 3.5%<br><br>2.4% Survey GISCi 2006 |
| VALORE PREDITTIVO POSITIVO (proporzione dei casi con conferma istologica di CIN2+) | **Veri positivi (n° donne con biopsia CIN2+) x 100**<br>**numero di donne screenate inviate in colposcopia**<br><br>Per il primo esame positivo che ha fatto inviare la donna in colposcopia | 16.1% Survey GISCi 2006 |
| DETECTION RATE (tasso di identificazione di CIN2+ con conferma istologica) | **Numero di donne screenate con CIN2+ istologico x 100**<br>**Numero di donne screenate**<br><br>per donne al primo screening e ai successivi | 2.8‰ grezza<br><br>Survey GISCi 2005 |
| INDICAZIONE A RIPETERE LA CITOLOGIA (per qualsiasi motivo) | **Numero di donne screenate con indicazione a ripetere a periodo < 3 anni**<br>**Numero di donne screenate** | 5,9% Survey GISCi 2006 |
| TEMPO DI RISPOSTA | **Donne con l'invio dell'esito negativo entro 30gg x 100**<br>**Totale donne con test di screening negativo** | > 80% delle risposte entro 30 giorni |

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

**BIBLIOGRAFIA**


1. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. Second edition. International Agency for Research on cancer.
2. Documento Gisci: "Raccomandazioni per il controllo di qualità in citologia cervico-vaginale". www.gisci.it.
3. Documento Gisci: "Indicatori" a cura di G. Ronco e altri. www.gisci.it
4. Survey Gisci 2005-2006: Osservatorio nazionale screening quinto rapporto: Livello di attivazione e indicatori di processo dei programmi organizzati di screening dei tumori del collo dell'utero in Italia. http://www.osservatorionazionalescreening.it/ons/pubblicazioni/rapporto 6/indicatori_cervice.pdf.
5. Ronco G et Al - Indicatori e Standard per la Valutazione di Processo dei Programmi di Screening del Cancro del Collo dell'Utero. Epidemiologia e prevenzione 1999; 23
6. Confortini M. et al, "Raccomandazioni per il controllo di qualità in citologia cervico-vaginale". Epidemiologia & Prevenzione, 2004; 28(1) suppl: 1-16.
7. Dgr. n. 4538 del 28 dicembre 2007 della Regione Veneto "Manuale per l'accreditamento istituzionale dei programmi di screening oncologici".

ALLEGATO B Dgr n. del pag. 25/43




**Parte Prima - Allegato 1 - LETTURA COMPUTER-ASSISTITA DEL PAP TEST**

La lettura computer-assistita, intesa come l'analisi comparativa delle immagini digitali di un preparato citologico con quelle di un archivio noto, è divenuta realtà grazie agli studi iniziati circa 20 anni fa negli Stati Uniti ed ai progressi tecnologici.

Le tecniche messe a punto non si spingono all'interpretazione completa del Pap test, ma sono di ausilio al citologo mediante: parziale selezione dei negativi, individuazione di campi, marcatura di cellule sospette.

I sistemi più comunemente utilizzati presenti oggi sul mercato sono due: il Thinprep Imaging System ed il Focal Point System (FPS-GS, già AUTOPAP). Entrambi sono applicati allo screening del cervico-carcinoma (1) e sono utilizzati da alcuni Centri di Lettura della Regione Veneto, applicati allo screening organizzato.

***Thinprep IMAGING SYSTEM***

I dettagli operativi di questo sistema sono stati pubblicati (2), così come l'applicazione allo screening del cervico-carcinoma è stata ampiamente testata (2, 3, 4, 5, 6, 7).
Si tratta di un sistema di valutazione in doppio (dual-review), in quanto ogni Pap test viene sottoposto prima a valutazione da parte di un lettore computerizzato (Imager) che scansiona l'intero vetrino e seleziona 22 campi di visione scelti fra quelli che possono contenere cellule anormali e viene sottoposto poi alla valutazione umana, da parte del Cito-tecnico, che esamina ed interpreta i 22 campi selezionati.
Nel dettaglio:

- l'Imager scansiona vetrini allestiti con metodica in strato sottile Thin-prep ed individua i 22 campi sulla base di un algoritmo comprendente l'aumento delle dimensioni, dell'irregolarità e della densità di colorazione dei nuclei: queste caratteristiche corrispondono infatti ad un maggior contenuto in DNA, il quale spesso, ma non sempre, è correlato con la trasformazione neoplastica delle cellule
- il Cito-tecnico esamina i 22 campi individuati da Imager con l'aiuto di un microscopio automatizzato, collegato ad un software (Review Scope) che ottimizza i tempi per passare da un campo all'altro
- quando il Cito-tecnico ritiene che le cellule segnalate siano normali, referta il caso secondo il sistema Bethesda come "negativo per lesione neoplastica intraepiteliale o malignità"
- quando invece il Cito-tecnico ritiene che nei 22 campi siano contenuti elementi cellulari sospetti di lesione neoplastica o preneoplastica, rivede l'intero preparato e poi sottopone il caso al Patologo per il riesame, secondo i protocolli di qualità stabiliti.

Il metodo è stato riconosciuto dall'FDA nel 2003 e dal GISCI.

Poiché l'interpretazione delle immagini e l'individuazione dei 22 campi dei vetrini si basa sia sulla cromasia che sui caratteri dell'area nucleare, la standardizzazione della colorazione rappresenta un passaggio critico e va perciò costantemente monitorata per assicurare la linearità stechiometrica fra intensità di colorazione e contenuto in DNA.

Il corretto impiego del sistema prevede tassativamente che tutti i vetrini vengano sottoposti alla valutazione umana, da parte del Cito-tecnico o del Patologo.

In ambito di Area Vasta Vicentina (ULSS 3, 4, 5 e 6) è attivo dalla fine del 2007 un progetto che ne prevede l'utilizzo in comune da parte delle Anatomie Patologiche dell'Area.
Il programma prevede la centralizzazione in un unico laboratorio (Anatomia Patologica di Thiene) per tutta la provincia di Vicenza delle fasi tecniche di allestimento dei preparati e di analisi con Imager. I campioni dei vari Centri dell'Area Vasta vengono raccolti e trasportati al laboratorio "centralizzato" attraverso un sistema di trasporto organizzato e coordinato in base ai rispettivi carichi di lavoro. I campioni prelevati dai Centri afferenti vengono identificati in modo uniforme mantenendo tuttavia inalterate le numerazioni specifiche di ogni Centro di provenienza. Gli elementi identificativi (dati anagrafici, ULSS, anno di accettazione del campione) vengono trasformati in un codice a barre che garantisce la tracciabilità dei percorsi di ogni singolo campione attraverso ciascuna fase lavorativa.
L'allestimento su strato sottile dei campioni citologici provenienti dalle quattro ULSS vicentine si avvale di due processatori automatizzati (TP 3000 Cytyc) e di un coloritore automatico completamente dedicato ed interfacciato con un analogo montavetrini robotizzato (Leica). Ogni vetrino viene sottoposto a pre-lettura computerizzata (Imager) nel laboratorio centralizzato dove le coordinate dei 22 campi microscopici per ciascun Pap test vengono memorizzati e trasferiti su CD.
La valutazione al microscopio robotizzato (Review Scope) avviene quindi nelle diverse Sedi di provenienza, dove i 22 campi microscopici per ogni Pap test vengono valutati dal Cito-tecnico esaminatore. Il materiale residuo dopo l'allestimento ed il vetrino originale vengono riconsegnati al Centro di provenienza. Ogni Centro

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

afferente mantiene inalterata l'organizzazione interna pre-esistente per quanto riguarda l'esecuzione dei prelievi, la raccolta dei campioni e la definizione diagnostica degli esami.
La fase sperimentale di utilizzo del sistema si è conclusa alla fine del 2008, cosicché questo sistema di lettura è entrato nell'uso ufficiale da gennaio 2009.
I referti riportano la frase concordata tra le Anatomie Patologiche dell'Area Vasta: <<Pap test in fase liquida allestito su strato sottile (Thin-prep) e processato con tecnologia computer-assistita (Imager System)>>.

***FOCALPOINT GS***

Il FocalPoint GS (già AUTOPAP) è uno strumento di lettura automatizzata dei Pap test concepito per l'uso nello Screening (8, 9) e nel Controllo di Qualità dei Pap test (10, 11). Lo strumento è in uso presso l'Anatomia e Istologia Patologica dell'ULSS 9 di Treviso dal 2000.

Lo strumento si compone di:
- un'unità centrale per la scansione dei preparati dotata di meccanismi di mobilizzazione dei preparati, di messa a fuoco e di acquisizione di immagini microscopiche automatici
- un computer che controlla le operazioni meccaniche ed elettroniche dell'unità centrale ed elabora le immagini processandole con appositi algoritmi ed integrazioni statistiche
- un monitor per verificare la funzionalità dello strumento
- un microscopio motorizzato per la valutazione dei preparati da parte di un Cito-tecnico

L'uso dello strumento non è sottoposto a specifiche misure di sicurezza oltre a quelle generiche riferibili alle apparecchiature sotto tensione. Un collegamento tramite indirizzo ip in remoto consente al servizio di assistenza della Ditta distributrice, che ha sede in Belgio, il controllo 24 ore su 24 dello strumento.

Il sistema è in grado di processare sia preparati allestiti in modo convenzionale che in strato sottile.

Il riconoscimento dei singoli campioni da parte dello strumento avviene grazie ad un'etichetta con codice a barre. Non sono idonei alla lettura i vetrini con grossolani artefatti di tipo tecnico (scheggiature dei margini del portaoggetto o del coprioggetto, bolle d'aria e anomalo posizionamento del coprioggetto) e, se comunque introdotti nello strumento, non verranno da questo classificati.

La classificazione dei vetrini a seguito dell'interpretazione delle immagini si basa su algoritmi che tengono conto sia della cromasia che dell'area nucleare. La colorazione è pertanto un parametro critico che va standardizzato. A tal fine, lo strumento stesso è in grado di monitorare lo scostamento della colorazione dai valori suggeriti.

Il metodo è riconosciuto dall'FDA dal dicembre 2008 e dal GISCI.

Il FocalPoint GS é in grado di valutare circa 230 Pap test in 24 ore. Una volta caricato, lo strumento provvede automaticamente a: spostare i vassoi con i Pap test dall'alloggiamento di carico alla postazione del microscopio; riconoscere il singolo Pap test mediante lettura del codice a barre; verificare l'orientamento della superficie di ciascun preparato; scansionare ciascun campione e costruirne una mappa tridimensionale; selezionare i campi da sottoporre a scansione con laser ad alta potenza; inviare le immagini digitali raccolte alla unità di elaborazione dove il software, basato su opportuni algoritmi, determina il risultato finale.

Il risultato della elaborazione consiste in un report contenente la valutazione dell'adeguatezza del Pap test secondo i criteri del sistema Bethesda; la valutazione sull'adeguatezza della colorazione; la suddivisione in 4 classi dei Pap test valutati:
- *no further review:* 23-25% di casi sicuramente negativi da inviare alla firma senza ulteriore valutazione da parte del cito-tecnico
- *review*: 65-70% di casi da inviare alla rilettura del cito-tecnico. I vetrini "*review*" sono distribuiti secondo una curva gaussiana che viene a sua volta suddivisa in quintili. Ogni quintile indica un grado di probabilità di riscontrare una lesione, con grado decrescente dal 1° al 5° quintile
- *process review*: 3-10% di casi che il sistema giudica non idonei alla lettura per densità di colorazione e artefatti del preparato. Tali artefatti sono spesso imputabili a un irregolare spessore dei preparati per accumulo di cellule in alcune aree del vetrino, per presenza di bolle del mezzo montante o per irregolarità del coprioggetto e/o del vetrino (*slide "tilted", unable to focus, coverslip tilted, nuclear staining)*

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

- *rerun*: talora lo strumento "salta" completamente la lettura di uno o più vassoi per problemi di riconoscimento degli stessi; è sufficiente reintrodurre questi casi nello strumento per una rivalutazione automatica.

Le alterazioni citologiche rilevate dallo strumento sui vetrini della classe *review* sono definite FOV; tali aree sono fisicamente evidenziate come spot di 4 mm di diametro sulla mappa del vetrino (PapMap) che viene stampata in dimensione reale. Ogni vetrino *review* può contenere fino a 15 spot, cioè aree dove è più probabile che siano contenute anomalie citologiche. Il cito-tecnico sovrappone il vetrino sulla relativa mappa e ne disegna con un pennarello tutti gli spot che rappresentano le aree FOV da rivedere al microscopio; in alternativa, è disponibile l'integrazione con una **stazione di revisione (SlideWizard)** che consiste in un microscopio motorizzato connesso allo strumento e ad un computer in grado di presentare automaticamente i campi da rivedere. Il microscopio motorizzato consente naturalmente anche una visione delle aree al di fuori degli spot qualora il Cito-tecnico ne ravveda l'opportunità. La valutazione da parte del Cito-tecnico di questi preparati viene pertanto effettuata per campi (spot).
I referti riportano la frase: **Preparato esaminato con sistema per lo Screening Primario Automatizzato Focal Point GS (Tripath Imaging, ® Inc. Redmont. USA) e riletto manualmente**

L'utilizzo del solo Focal Point consente la valutazione di circa 7.000 Pap test/anno per Cito-tecnico a tempo pieno; l'implementazione con la stazione di revisione permette di arrivare a circa 8.500 Pap test/anno per Cito-tecnico a tempo pieno. Un tecnico non-lettore con PT di 30 ore gestisce la colorazione, l'etichettatura, il carico-scarico dello strumento, la stampa dei report, la suddivisione dei vetrini della classe *no further review* e della classe *process review* da quelli *review* e l'abbinamento delle mappe a questi ultimi. Il carico di lavoro è di circa 31.000 PT/anno per 5 citotecnici lettori (4 TP e 1 PT a 30 ore)

Lo strumento effettua la principale verifica interna di qualità (VQI). Inoltre, i Pap test valutati dallo strumento come *no further review*, cioè negativi, vengono sottoposti a revisione rapida del preparato (meno di 1 minuto) prestando attenzione alle notizie cliniche della scheda di accompagnamento.

**BIBLIOGRAFIA**


1. Wright TC Jr, Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D, *et al* . 2006 Consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening tests. Am J Obstet Gynecol 2007;197:346-55.
2. Dawson AE: Can we change the way we screen?: the ThinPrep Imaging System® clinical trial data and early experience. Cancer Cytopathol 2004;102: 340-344.
3. Biscotti CV, Dawson AE, Dziura B, Galup L, Darragh T, Rahemtulla A, Wills-Frank L: Assisted primary screening using the automated ThinPrep Imaging System. Am J Clin Pathol 2005;123: 281-287.
4. Zhang FF, Banks HW, Langford SM, Davey DD: Accuracy of ThinPrep Imaging System in detecting low-grade squamous intraepithelial lesions. Arch Pathol Lab Med 2007;13: 773-776.
5. Davey E, d'Assuncao J, Irwig L, Macaskill P, Chan SF, Richards A, Farnsworth A: Accuracy of reading liquid based cytology slides using the ThinPrep Imager compared with conventional cytology: prospective study. BMJ 2007;335: 31-38.
6. Dziura B, Quinn S, Richard K: Performance of an imaging system vs. manual screening in the detection of squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. Acta Cytol 2007;50: 309-311.
7. Lozano R: Comparison of computer-assisted and manual screening of cervical cytology. Gynecol Oncol 2007;104: 134-138.
8. Wilbur DC, Prey MU, Miller WM, et al. Detection of high grade squamous intraepithelial lesions and tumors using the AutoPap system: results of a primary screening clinical trial. *Cancer* (Cancer Cytopathol). 1999;87:354–358.
9. Wilbur DC, Black-Schaffer WS, Luff RD, et al. Clinical trials of the FocalPoint GS System show significant improvements in sensitivity for the detection of squamous intraepithelial lesions when compared to manual screening. *Mod Pathol.* 2009;22(suppl 1):97A.
10. Patten SF, Lee JSJ, Wilbur DC, et al. The AutoPap 300 QC System multicenter clinical trials for use in quality control rescreening of cervical smears. I: prospective intended use study. *Cancer* (Cancer Cytopathol). 1997;81:343–347.
11. Patten SF, Lee JSJ, Wilbur DC, et al. The AutoPap 300 QC System multicenter clinical trials for use in quality control rescreening of cervical smears. II: prospective and archival sensitivity studies. Cancer (Cancer Cytopathol). 1997;81:337–342.

ALLEGATO B Dgr n. del pag. 28/43

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

## PARTE SECONDA

## ISTOLOGIA

ALLEGATO B Dgr n. del pag. 29 di 43




**INTRODUZIONE**

Il referto istopatologico dei campioni bioptici e operatori nel campo della patologia della cervice uterina costituisce il punto essenziale delle procedure diagnostiche e terapeutiche di secondo livello. Deve confermare la diagnosi presunta dalle procedure di primo livello (Pap test, colposcopia) e fornire tutti gli elementi utili alla stadiazione patologica delle neoplasie (biopsia, conizzazione, isterectomia).

Il referto istopatologico rappresenta l'atto medico conclusivo di una complessa procedura e deve comprendere:

1) le modalità di esame macroscopico e campionamento del materiale bioptico/operatorio cervicale
2) la formulazione della diagnosi finale, tenendo conto di tutti gli elementi necessari alla stadiazione patologica, alla luce delle indicazioni e raccomandazioni attuali del College of American Pathologist, del Royal College of Pathologist, del WHO e delle Linee Guida Europee (ALLEGATI 1-3)

ALLEGATO B Dgr n. del pag. 30/63

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

## A - MODALITÀ DI PRELIEVO E CAMPIONAMENTO DEL MATERIALE BIOPTICO-OPERATORIO CERVICALE

Vengono forniti i requisiti minimi per i rilievi macroscopici e il campionamento dei pezzi chirurgici in patologia cervicale, con l'intendimento di uniformare i protocolli operativi e di garantire la qualità dell'intera procedura diagnostica.

***BIOPSIA CERVICALE (sinonimo: biopsia con pinza)***
***BIOPSIA ENDOCERVICALE (sinonimo: curettage del canale endocervicale)***

1) Identificazione dei campioni (anagrafica, topografia del prelievo)
2) Descrizione macroscopica (numero frammenti, dimensioni)
3) Inclusione in toto di frammenti fino a 4 mm. di dimensione massima
4) Inclusione di tutti i frammenti inviati
5) Mantenere la suddivisione del materiale inviato
6) In caso di prelievi endocervicali utile il recupero e l'inclusione del materiale mucoide presente

***AMPIA BIOPSIA ESCISSIONALE (sinonimo: biopsia con ansa o con ago)***

1) Identificazione dei campioni (anagrafica, topografia del prelievo)
2) Descrizione macroscopica. Dimensioni
3) Orientamento. Punti di repere
4) Inchiostratura dei margini
5) Inclusione in toto con sezioni seriate e numerate

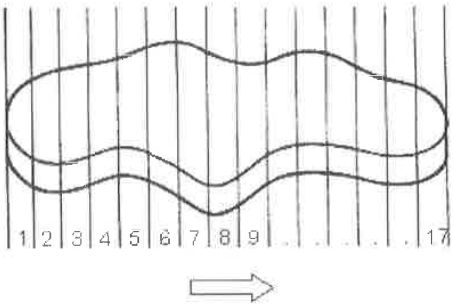



Immagine tratta da: Histopathology specimens. Clinical, pathological and laboratory aspects. D.C. AllenR.I Cameron Spinger 2004

ALLEGATO B Dgr n. del pag. 31 / 43

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

***LEEP***
***Sinonimi:*** ***Amputazione di collo***
***Biopsia ad anello***
***Cono a lama fredda***
***Cono a laser CO2***

1) Campione conoide identificato con punto di repere (punto chirurgico, ink dot) preferibilmente ad ore 12
2) Descrizione macroscopica: riportare le dimensioni del cono espresse in mm. corrispondenti alla misura della base del cono (asse circonferenziale) più la misura dell'altezza del cono (asse longitudinale) più lo spessore (mm...x mm...x mm...)
3) Inchiostratura dei margini
4) Se inviato a fresco, il cono va aperto (ore 12 o ore 3), spillato su un supporto rigido e posto a fissare in formalina per 12-24 ore
5) Evitare di creare distacchi mucosi con pinze o specilli per la particolare fragilità degli epiteli cervicali spesso termo-traumatizzati dalle procedura di escissione (ansa termica, laser CO2)
6) Fissato il cono, viene campionato in modo seriato con sezioni condotte nel senso del canale cervicale, con sezioni di 2-3 mm seriate numerate e identificate per labbro (anteriore/posteriore) o per quadrante (A1-A2-A3-A4).
7) Se inviato fissato il cono non viene aperto e viene tagliato integralmente con sezioni longitudinali nel senso del canale cervicale numerate e identificate

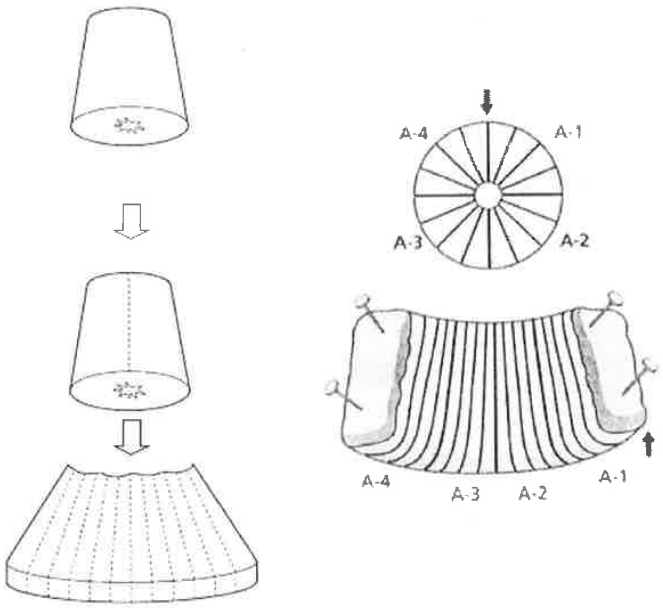



Immagine tratta da: Histopathology specimens. Clinical, pathological and laboratory aspects. D.C. AllenR.I Cameron Spinger 2004

ALLEGATO B Dgr n. del pag. 32/63

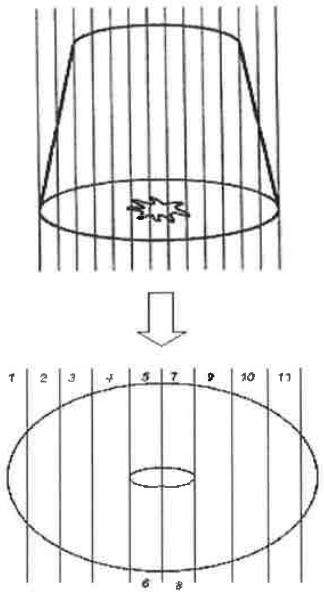


Immagine tratta da: Histopathology specimens. Clinical, pathological and laboratory aspects. D.C. AllenR.I Cameron Spinger 2004

È evento sempre più frequente l'invio, assieme a LEEP, di un secondo campione, definito come:

**ENDOCOLLO (sinonimo: ampliamento di conizzazione)**

- rappresenta il vero margine di resezione endocervicale
- riportare nella descrizione macroscopica:
  - la presenza o meno di repere chirurgico;
  - le 3 dimensioni del campione espresse in mm. (mm…x mm…x mm…)
- provvedere alla inchiostratura dei margini
- campionare in modo seriato con sezioni condotte nel senso del canale cervicale, di 2-3 mm di spessore, seriate ed identificate
- assicurare in fase di taglio l'esecuzione di sezioni seriate e numerate

**ISTERECTOMIA PER CA IN SITU/INVASIVO DELLA CERVICE UTERINA**

1) Descrizione macroscopica dell'utero. Dimensioni e peso
2) Separare gli annessi e la cervice
3) Aprire il corpo uterino sui margini laterali fino ai recessi tubarici
4) Separare le due emiparti differenziando le pareti anteriore e posteriore (l'orientamento dell'utero è facilitato dal rivestimento peritoneale del corpo che è più esteso e completo sulla faccia posteriore)
5) Aspetto della cervice, della cavità endometriale, della parete uterina, del perimetrio.
6) Presenza di colletto vaginale. Inchiostrare il margine di resezione chirurgico.
7) Fissare in formalina tamponata per 12 ore
8) Prelievi della cervice in senso radiale (come nel caso della conizzazione)
9) Prelievo dell'istmo e del corpo uterino in senso trasversale sulle due pareti del corpo
10) Prelievo degli annessi e se presenti dei tessuti del paracolpo, del parametrio e del colletto vaginale

ALLEGATO B Dgr n. del pag. 33/63

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

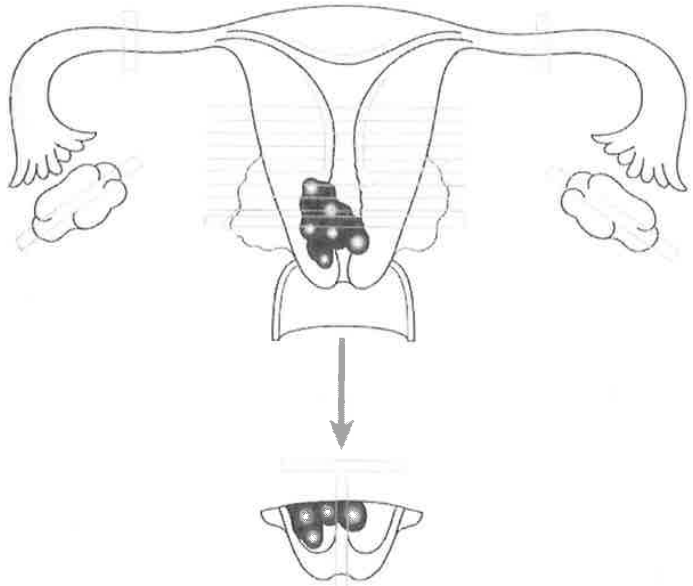


Immagine tratta da : Histopathology specimens. Clinical, pathological and laboratory aspects. D.C. AllenR.I Cameron Spinger 2004

ALLEGATO B Dgr n. del pag. 34/63

## B - DIAGNOSI ISTOLOGICA CON VALUTAZIONE DEI PARAMETRI STADIATIVI

Il referto istopatologico deve contenere un giudizio diagnostico possibilmente univoco, semplice e completo, standardizzato secondo la terminologia WHO/AJCC/UICC TNM. Può essere utile un breve commento esplicativo in caso di possibile equivocità. Per ogni diagnosi va indicata la relativa sede di provenienza anatomica.

### ISTOTIPO (SEC. WHO)

**Neoplasia intraepiteliale squamosa** (alto grado/CIN2-CIN 3) (basso grado/CIN1)
**Carcinoma squamoso infiltrante** (specificare variante)

### Grado Istologico

**G1** Ben differenziato
**G2** Moderatamente differenziato
**G3** Scarsamente differenziato
**G4** Indifferenziato

### Invasione Stromale

**Assente** (neoplasia intra epiteliale)

**Presente**
La microinfiltrazione stromale va sospettata nelle aree di CIN3 con un ampia componente superficiale ed estensione alle cripte ghiandolari che presentano segni di necrosi associata ad aspetti di cheratinizzazione intraepiteliale con perdita della polarità, aspetti di chiarificazione nucleare e presenza di reazione desmoplastica stromale associata ad un fitto infiltrato infiammatorio linfo-plasmocitario.

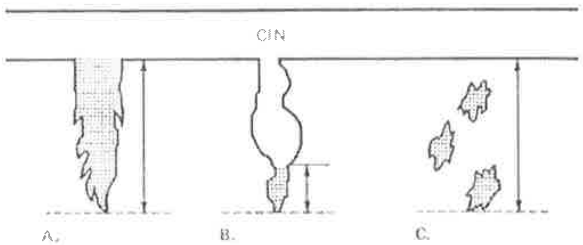



Immagine tratta da :Pathology and genetics of tumors of the breast and female genital organs. F.A Tavassoli, P. Devilee WHO IARC Press 2003

**Profondità di infiltrazione massima**
Nella valutazione della profondità di infiltrazione si misura la distanza della componente invasiva dalla membrana basale, nel caso in cui la neoplasia origini dall'epitelio superficiale (A), dalla membrana basale della ghiandola se la neoplasia origina in profondità da uno sfondato ghiandolare (B). Se non risulta possibile rintracciare microscopicamente l'origine della componente infiltrante della neoplasia si misura la distanza della componente invasiva più profonda dalla membrana basale dell'epitelio superficiale (C).

**Estensione lineare massima della neoplasia lungo il canale endocervicale**

**Localizzazione della neoplasia rispetto alla circonferenza della portio** (riferimento orario o ai quadranti)

**Valutazione dei margini chirurgici di resezione**

**Indenni.** Distanza della neoplasia dal margine esocervicale e endocervicale (apice del cono)
**Interessati dalla neoplasia intraepiteliale** (specificare)
**Infiltrati dalla neoplasia** (specificare)

**Lesioni pre-neoplastiche associate**

**Assenti**
**Coilocitosi**
**Lesione intraepiteliale squamosa**
**Displasia ghiandolare/AIS endocervicale**

**In caso di neoplasia infiltrante, specificare se possibile:**

**Presenza di angioinvasione linfatica e/o venosa**
**Presenza di infiltrazione perineurale**
**Estensione al corpo uterino (endometrio, miometrio)**
**Estensione ai tessuti del paracolpo, parametrio**
**Estensione alla vagina (tessuti paravaginale, margine chirurgico distale)**
**Stato degli annessi uterini**
**Peritoneo di rivestimento**

**Dati immunostochimica / patologia molecolare**

**Espressione p16**
**Cinetica proliferativa Ki67**
**Determinazione qualitativa HPV con PCR**
**Viral load HPV (PCR quantitativa)**

ALLEGATO B Dgr n. del pag. 36/143




**PARTE SECONDA - ALLEGATO 1**

**CLASSIFICAZIONE ISTOLOGICA DEI TUMORI DELLA CERVICE UTERINA**

| | | |
|---|---|---|
| **Tumori a cellule squamose e lesioni preneoplastiche** | | |
| | | Codice ICD-O |
| **Carcinoma a cellule squamose NAS** | | 8070/3 |
| Cheratinizzante | | 8071/3 |
| Non cheratinizzante | | 8072/3 |
| Basaloide | | 8083/3 |
| Verrucoso | | 8051/3 |
| Verruciforme | | 8051/3 |
| Papillare | | 8052/3 |
| Linfoepitelioma-like | | 8082/3 |
| Transizionale squamoso | | 8120/3 |
| **Microinvasivo** | | 8076/3 |
| **Neoplasia intraepiteliale squamosa** | | |
| Neoplasia intraepiteliale cervicale CIN3 | | 8077/2 |
| Carcinoma squamoso in situ /CIS | | 8070/2 |
| **Lesioni benigne a cellule squamose** | | |
| Condiloma acuminato | | 7670/0 |
| Papilloma squamoso | | 8052/0 |
| Polipo fibroepiteliale | | 7681/0 |
| **Tumori dell'epitelio ghiandolare e lesioni preneoplastiche** | | |
| **Adenocarcinoma** | | 8140/3 |
| Adenocarcinoma | Mucinoso | 8480/3 |
| | Endocervicale | 8482/3 |
| | Intestinale | 8144/3 |
| | A cellule ad anello con castone | 8490/3 |
| | Minimal deviation | 8480/3 |
| | Villo ghiandolare | 8262/3 |
| Adenocarcinoma endometrioide | | 8380/3 |
| Adenocarcinoma a cellule chiare | | 8310/3 |
| Adenocarcinoma sieroso | | 8441/3 |
| Adenocarcinoma mesonefrico | | 9110/3 |
| **Adenocarcinoma microinvasivo** | | 8140/3 |
| **Adenocarcinoma in situ** | | 8140/2 |
| **Displasia dell'epitelio ghiandolare** | | **67020** |
| **Lesioni ghiandolari benigne** | | |
| Papilloma mulleriano | | 80500 |
| Polipo endocervicale | | D7-75780 |
| **Altri tumori ghiandolari** | | |
| **Carcinoma adenosquamoso** | | 8560/3 |
| Variante a cellule "glassy" | | 8015/3 |
| **Carcinoma Adenoido-cistico** | | 8200/3 |
| **Carcinoma Adenoideo -basale** | | 8098/3 |

ALLEGATO B Dgr n. del pag. 37/43




| | | |
|---|---|---|
| **Tumori neuroendocrini** | | |
| **Carcinoide** | | 8240/3 |
| **Carcinoide atipico** | | 8249/3 |
| **Carcinoma a piccole cellule** | | 8041/3 |
| **Carcinoma neuroendocrino a grandi cellule** | | 8013/3 |
| **Carcinoma indifferenziato** | | 8020/3 |
| **Tumori mesenchimali e lesioni simil tumorali** | | |
| **Leiomiosarcoma** | | 8890/3 |
| **Sarcoma dello stroma endometriale (basso grado)** | | 8931/3 |
| **Sarcoma endocervicale indifferenziato** | | 8805/3 |
| **Sarcoma botrioide** | | 8910/3 |
| **Sarcoma alveolare delle parti molli** | | 9581/3 |
| **Angiosarcoma** | | 9120/3 |
| **Tumore maligno delle guaine nervose periferiche** | | 9540/3 |
| **Leiomioma** | | 8890/0 |
| **Rabdomioma genitale** | | 8905/3 |
| **Nodulo post operatorio a cellule fusate** | | |
| **Tumori mesenchimali e misti (epitelio-stromali)** | | |
| **Carcinosarcoma (tumore misto maligno mulleriano)** | 8980/3 | |
| **Adenosarcoma** | | 8933/3 |
| **Tumore di Wilms** | | 8960/3 |
| **Adenofibroma** | | 9013/3 |
| **Adenomioma** | | 8932/0 |
| **Tumori melanocitari** | | |
| **Melanoma maligno** | | 8720/3 |
| **Nevo Blue** | | 8780/0 |
| **Tumori vari** | | |
| **Tumore a cellule germinali** | | |
| Tumore del sacco vitellino | | 9071/3 |
| Cisti dermoide | | 9084/0 |
| Teratoma cistico maturo | | 9080/0 |
| **Tumori linfoidi e del sistema emopoietico** | | |
| **Linfoma maligno** (specificare) | | 95903 |
| **Leucemia** (specificare) | | 98003 |
| **Tumori secondari (metastasi)** | | |

ALLEGATO B Dgr n. del pag. 38/63

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

**PARTE SECONDA - ALLEGATO 2**

**GUIDA PER LA DIAGNOSI ISTOLOGICA DELLE PRINCIPALI LESIONI CERVICALI**

**Lesioni benigne a cellule squamose**

**Condiloma acuminato**: rappresenta la manifestazione clinica dell'infezione da HPV spesso di basso grado (6-11). Costituito da fronde papillari con asse fibrovascolare rivestito da cellule epiteliali con evidenti alterazioni citopatiche da HPV (coilocitosi).

**Papilloma squamoso**: neoformazione esofitica costituita da esili assi fibrovascolari rivestite da elementi squamosi privi di atipia e alterazioni citopatiche virali.

*Polipo fibroepiteliale o stromale*: ***neoformazione polipoide rivestita da epitelio squamoso con un core fibrovascolare ricco di vasi a parete sottile e di elementi stromali a fisionomia bizzarra fibrobastica-miofibroblastica.***

**Tumori a cellule squamose (80% dei casi)**

*I criteri diagnostici nella diagnosi del carcinoma a cellule squamose della cervice uterina sono i medesimi dello stesso tumore in altri organi e apparati. Utile la valutazione del pattern di crescita, del tipo cellulare prevalente e del grado di differenziazione. Si associa spesso a focolai di CIN soprattutto di alto grado e ad estensione nei colletti ghiandolari della portio.*

Fra le **varianti morfologiche** dei tumori a cellule squamose della portio, utile la loro descrizione per una possibile correlazione cito-istologica e per l'identificazione di forme a andamento prognostico definito.

1) Le neoplasie **cheratinizzanti** presentano generalmente segni marcati di cheratinizzazione delle cellule tumorali con formazione di perle cornee, accentuazione della cheratinizzazione citoplasmatica con presenza di granuli di cheratoialina. Voluminosi nuclei ipercromici con cromatina grossolana e rare mitosi per lo più localizzate alla periferia degli aggregati neoplastici.

2) Le neoplasie **non cheratinizzanti-large cell/small cell** a differenza delle precedenti sono formate da cellule poligonali con isolati segni di differenziazione citoplasmatica senza formazione di perle cornee, con un più accentuato pleiomorfismo cellulare e nucleare e un incremento generalizzato dell'attività cariocinetica.

3) **Carcinoma squamoso basaloide:** è caratterizzato da nidi di cellule squamose immature di aspetto "basaloide" simile a quello della maggior parte dei carcinomi in situ della portio, ma con tendenza alla necrosi. Rari gli aspetti di cheratinizzazione per lo più confinati al centro dei nidi neoplastici. Rappresenta una forma tumorale aggressiva di cui si sconsiglia il termine di carcinoma basaloide per evitare fraintendimenti con forme tumorali a basso grado di malignità.

4) **Carcinoma verrucoso:** rappresenta una forma di carcinoma squamoso altamente differenziato a basso grado di malignità che si presenta con un aspetto ipercheratotico verrucoso superficiale e un fronte di infiltrazione a grossolane estroflessioni tumorali nello stroma, a margini pulsanti. Le cellule tumorali hanno un citoplasma abbondante con minima atipia nucleare. Sono assenti segni di infezione virale da HPV. Può recidivare dopo escissione o radioterapia.

5) Al contrario il **carcinoma squamoso verruciforme:** presenta, oltre all'aspetto verrucoso in superficie, un aspetto marcatamente condilomatoso con presenza nella totalità dei casi di un papillomavirus di alto grado. Il margine profondo presenta aspetti infiltranti.

6) **Carcinoma squamoso papillare:** presenta una componente superficiale di aspetto francamente papillare con esili papille rivestite da cellule squamose con segni di CIN e in profondità nello stroma un aspetto francamente infiltrante (rischio di sottostimare la lesione in caso di biopsie superficiali). Le metastasi e le recidive sono tardive.

7) **Carcinoma squamoso linfoepitelioma-like:** assomiglia istologicamente alla medesima forma di carcinoma indifferenziato a stroma linfoide del nasofaringe. E' composto da nidi di cellule indifferenziate di aspetto sinciziale, circondate da uno stroma ricco in elementi linfoplasmocitoidi. Le

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

cellule tumorali hanno un voluminoso nucleo di aspetto vescicoloso con voluminoso nucleolo. Utile talora la conferma immunoistochimica con ricerca della positività alla citocheratina delle cellule tumorali. L'infiltrato linfocitario si caratterizza dalla ricchezza in piccoli linfociti T. La ricerca dell'EBV è positivo in queste forme tumorali solo nel continente asiatico e si dimostra negativo alle nostre latitudini. La neoplasia ha prognosi buona ed è radiosensibile.

8) **Carcinoma squamoso transizionale / spindle cell:** è morfologicamente indistinguibile dalla forma uroteliale vescicale con un pattern solido-papillare di elementi di aspetto transizionale con possibili segni di differenziazione squamosa e presenza frequente di HPV16. A differenza dei veri carcinomi uroteliali è positivo all'immunoreazione per la citocheratina 7 e negativo per l'isoforma 20. La neoplasia ha in genere malignità di basso grado e presenta note di fibroplasia.

**Tumori ghiandolari e lesioni preneoplastiche**

**Displasia delle ghiandole endocervicali.** Presenza di aspetti di atipia delle cellule endocervicali che presentano ipercromasia, ingrandimento nucleare con accentuata pseudostratificazione. Generalmente assente un pattern papillare o cribriforme. Le alterazioni possono interessare gli sfondati ghiandolari in modo discontinuo e compaiono bruscamente in ghiandole altrove normali.

**Adenocarcinoma endocervicale in situ.** Interessa per definizione sfondati ghiandolari endocervicali senza alterarne la forma e la disposizione e senza evocare una reazione stromale desmoplastica. Le cripte neoplastiche non si spingono generalmente in profondità oltre la più profonda cripta non trasformata. Le cellule neoplastiche possono morfologicamente richiamare le cellule endocervicali, endometriali e meno frequentemente l'epitelio intestinale con presenza di cellule goblet, e neuroendocrine. Sono disposte stratificate o a pattern cribriforme perpendicolarmente alla membrana basale. Frequenti aspetti di pleiomorfismo con mitosi e necrosi apoptotiche. Lo stroma circostante pur sede spesso di un fitto infiltrato infiammatorio, non mostra mai segni di desmoplasia.

**Adenocarcinoma endocervicale microinvasivo.** Entità di non facile diagnosi. Condizionata dalla presenza di infiltrazione stromale che compare generalmente in un focolaio con tutte le caratteristiche morfologiche dell'adenocarcinoma che presenta un pattern ghiandolare complesso, spesso solido-cribriforme, a contorno irregolare, che si associa, oltre all'edema stromale e ad un infiltrato infiammatorio anche alla presenza di una risposta desmoplastica stromale. Possono essere presenti focali aspetti di differenziazione squamosa. Utili in questi casi la valutazione non della profondità di infiltrazione bensì dello spessore della neoplasia.

**Adenocarcinoma (10-15% dei casi)**

1) **Adenocarcinoma endocervicale usuale infiltrante** nelle sue varianti morfologiche: **mucinoso** e **ghiandolare.** L'**adenocarcinoma mucinoso** si caratterizza per la presenza intracitoplasmatica di mucina. La variante **endocervicale ghiandolare** rappresenta la forma più comune **(70%)**, si associa a CIN in oltre il 40% dei casi e presenta pattern papillare, cribriforme e microghiandolare.

2) **Adenocarcinoma intestinale (non Mulleriano-mucinoso):** ricalca morfologicamente l'adenocarcinoma colico e nella sua forma meno differenziata la **variante a cellule ad anello con castone** che pone problemi di diagnostica differenziale nei confronti di una possibile lesione metastatica.

3) **Adenoma maligno** o **minimal deviation adenocarcinomi:** rappresenta una forma di adenocarcinoma mucinoso ad elevata differenziazione. Si caratterizza per la proliferazione irregolare e disordinata di ghiandole endocervicali rivestite da cellule con nulla o blanda atipia, spesso a contorno irregolare o angolato, con mitosi e che si spinge oltre le più profonde ghiandole endocervicali con una modesta o nulla risposta desmoplastica dello stroma. La neoplasia è scoperta tardivamente e la prognosi è scarsa. Si può osservare nella sindrome di Peutz-Jeghers.

4) **Adenocarcinoma villoghiandolare:** interessa soprattutto le giovani donne e richiama morfologicamente gli adenomi tubulo-villosi del colon, benché alla base si osserva una non eclatante invasione. La prognosi è generalmente buona, anche se vengono descritte varianti moderatamente differenziate più aggressive.

5) **Adenocarcinoma endometrioide:** rappresenta la seconda neoplasia ghiandolare maligna dell'endocervice e morfologicamente ricalca strettamente gli aspetti morfologici della forma del




corpo uterino. Tipicamente insorge a livello della zona giunzionale da focolai di endometriosi/metaplasma endometriale e può coesistere con l'adenocarcinoma usuale di tipo endocervicale; ne è descritta una variante a deviazione minima.

6) **Adenocarcinoma a cellule chiare:** si caratterizza per cellule a citoplasma chiaro o con aspetto a "hobnail", ricche in glicogeno (PAS+) arrangiate in un pattern solido, tubulo-cistico o papillare. Nel 50% dei casi c'è esposizione a dietil-stibelstrolo.

7) **Adenocarcinoma sieroso:** presenta un pattern papillare complesso spesso associato alla presenza di corpi psammomatosi. Le atipie citologiche sono rilevanti. Può essere multifocale ed interessare contemporaneamente l'endometrio e l'ovaio. La prognosi è scarsa e va in diagnosi differenziale con la variante villo-ghiandolare.

8) **Adenocarcinoma mesonefrico:** deriva dalla cancerizzazione degli omonimi residui posti profondamente nelle pareti laterali cervicali. Si presenta con aggregati di piccole ghiandole rivestite da cellule cuboidali prive di mucina che delimitano un lume contenente una secrezione ialina eosinofila. Spesso varianti tubulo papillari e retiformi. La neoplasia è positiva per le citocheratine AE1AE3, Cam5. 2, EMA, calretinina e vimentina (70%).

***Numerose lesioni cervicali possono mimare le neoplasie ghiandolari endocervicali nelle forme in situ e infiltranti (Metaplasma endometriale, endometriosi, iperplasia microghiandolare, residui mesonefrici, iperplasia ghiandolare endocervicale globulare e diffusa, tunnel cluster, endocervicosi, metaplasma ossifila atipica, adenomiosi, alterazioni di Arias Stella, endosalpingiosi). In alcuni casi oltre alla morfologia può risultare utile una caratterizzazione immunostochimica della lesione.***
La cinetica proliferativa valutata con **Ki67** può indirizzare la diagnosi verso forme neoplastiche adenocarcinomatose quando superiore al 30% e verso forme benigne quando inferiore al 10%.
La positività per la proteina **bcl2** codificata dal medesimo proto-oncogene localizzato sul cromosoma 18 può essere utile nel differenziare neoplasie ghiandolari endocervicali, sempre negative alla reazione, da forme di metaplasia tubo-endometriale e endometriosi cervicale sempre positive all'immunoreazione per bcl2.
L'espressione immunoistochimica della chinasi ciclinodipendente **p16** è spesso presente nelle forme adenocarcinomatose endocervicali in relazione alla frequente presenza dell'HPV e delle sue alterazioni genetiche nella cancerogenesi endocervicale.
L'immunoreazione per **CD10** può essere utile nel differenziare focolai di iperplasia dei residui mesonefrici, sempre positivi (positività luminale) alla reazione da focolai di sospetta neoplasia ghiandolare cervicale.
Nel caso degli adenocarcinomi infiltranti l'immunoistochimica può aiutare nella diagnosi differenziale fra forme endometriali e endocervicali, essendo i primi spesso positivi all'immunoreazione per i **recettori estrogenici**, la **vimentina** e negativi per l'antigene carcinoembrionario **CEA** a differenza delle neoplasie endocervicali spesso negative a recettori estrogenici e vimentina e positive al CEA.

ALLEGATO B Dgr n. del pag. 41/63

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

**ALLEGATO 3**

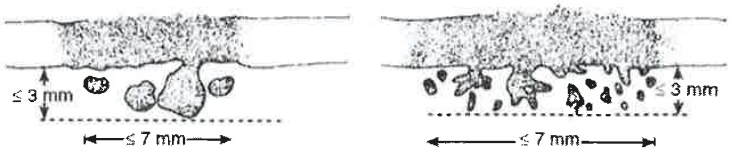
**PROTOCOLLO DI STADIAZIONE DEI CARCINOMI INFILTRANTI DELLA CERVICE UTERINA**

**pT0** Nessuna evidenza della neoplasia
**pTis** Carcinoma in situ

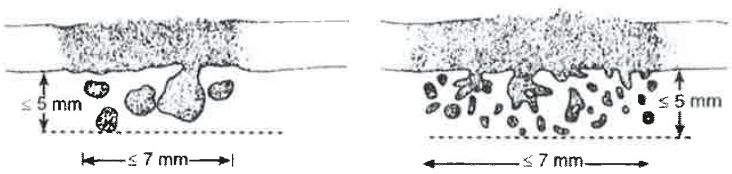
**pT1 – I A FIGO**

**pT1a** Carcinoma infiltrante con diagnosi microscopica. Le neoplasie microinfiltranti con evidenza clinica rientrano nel gruppo pT1b / IB FIGO

**pT1a1** Carcinomi microinvasivi con infiltrazione stromale inferiore a 3 mm in profondità e estensione superficiale inferiore a 7 mm

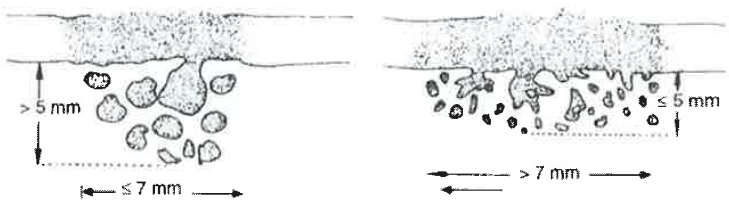



**pT1a2** Carcinomi microinvasivi con infiltrazione stromale compresa fra 3 e 5 mm in profondità e estensione superficiale inferiore a 7 mm




**pT1b – I B FIGO** Neoplasia clinicamente evidente o di estensione superiore a pT1a2

**pT1b1** Neoplasia di dimensioni comprese entro i 4 cm




**pT1b2** Neoplasia di dimensioni superiore a 4 cm

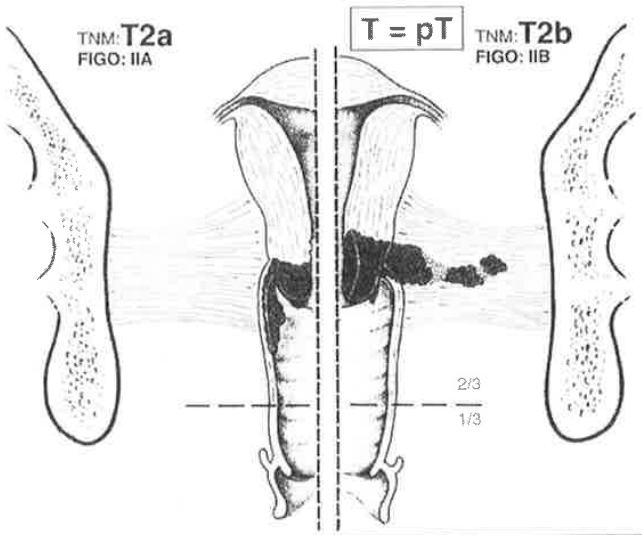
ALLEGATO B Dgr n. del pag. 42 / 43

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

**pT2 – II FIGO** Neoplasia extrauterina che risparmia il 3° inferiore della vagina e la parete pelvica

**pT2a** Neoplasia extrauterina che risparmia il 3° inferiore della vagina e la parete pelvica senza infiltrazione parametriale (distinta in **pT2a1** per lesione visibile clinicamente di cm 4 o meno nel maggiore asse; e **pT2a2** per lesione visibile clinicamente di più di cm 4 nel maggiore asse)

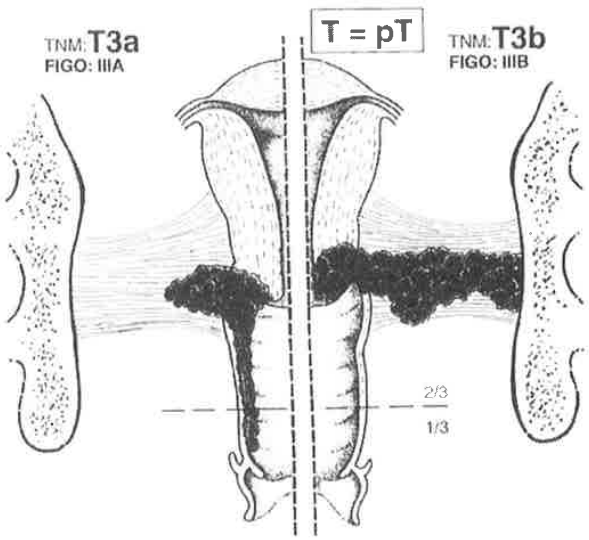
**pT2b** Neoplasia extrauterina che risparmia il 3° inferiore della vagina e la parete pelvica con infiltrazione parametriale




**pT3 – III FIGO** Neoplasia extrauterina che infiltra il 3° inferiore della vagina

**pT3a** Neoplasia extrauterina che infiltra il 3° inferiore della vagina senza estensione alla parete pelvica

**pT3b** Neoplasia extrauterina che infiltra la parete pelvica ed è causa di idronefrosi o di esclusione funzionale del rene

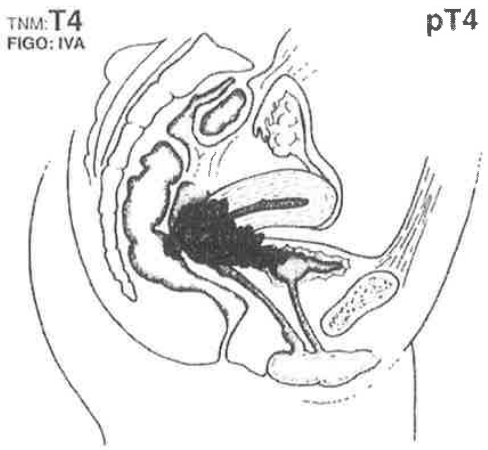


ALLEGATO B Dgr n. del pag. 43/43

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

**pT4 – IV FIGO**

| | |
|---|---|
| **pT4** | Neoplasia extrauterina che infiltra la mucosa vescicale, il retto o si estende oltre la piccola pelvi |




| | |
|---|---|
| **Nx** | Linfonodi regionali assenti |
| **N0** | Linfonodi regionali esenti da metastasi (almeno 10 linfonodi) |
| **N1** | Linfonodi regionali metastatici |

| | |
|---|---|
| **Mx** | |
| **M0** | Assenti metastasi |
| **M1** | Metastasi a distanza |

**BIBLIOGRAFIA**


1. College of American Pathologist 2005
2. Standards and minimum dataset for reporting cancers. Minimum dataset for the histopathological reporting of cervical neoplasia. The Royal College of Pathologist. 2001 London
3. Robboy SJ, Fraus FT, Kurman RJ. Gross description, processing and reporting of gynaecologic and obstetric specimens. In Kurman RJ (ed) Blaustein's Pathology of the female genital tract. 4th Edn. New York 2002 Springer Verlag
4. Derek C. Allen, R. Lain Cameron. Histopathology specimens. Clinical, pathological and laboratory aspects. 2004 Springer Verlag
5. Juan Rosai. Guidelines for handling of common and important surgical specimens. In Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 9° Edn. 2004 Mosby
6. Fattaneh A. Tavassoli, P. Devilee. Pathology & Genetics. Tumors of the breast and female genital organs. IARC Press Lyon 2003
7. Dissection and reporting of the organs of the female genital tract. M K Heatley. J Clin Pathol 2008;61:241–257.
8. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. Second Edition. IARC 2008
9. American Joint Committee on Cancer. Cancer Staging Manual. 7th Edn. Chicago, IL. 2009 Springer

ALLEGATO C Dgr n. del pag. 1/81

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

# Documento di consenso dei patologi dello screening per il tumore del colon retto della Regione Veneto

**Venezia, 11 aprile 2016**

ALLEGATO C Dgr n. del pag. 2151




**INTRODUZIONE**

Il contenuto delle informazioni che la diagnosi istologica delle lesioni polipoidi del tratto colo-rettale fornisce è essenziale nella pianificazione del successivo programma di sorveglianza e nella scelta dell'opzione terapeutica più opportuna.
Nell'ambito delle iniziative tese al miglioramento dei Programmi di Screening oncologici che l'assessorato regionale della sanità ha promosso, al fine di favorire il processo di standardizzazione e riproducibilità diagnostica delle lesioni colo-rettali il Gruppo dei Patologi dello Screening Colorettale della Regione Veneto propone un Documento di Consenso elaborato sulla scorta delle linee guida nazionali e internazionali.
Il lavoro compiuto con umiltà ma con la consapevolezza della sua importanza è stato quello di concordare tra le varie proposte esistenti in letteratura (non sempre coincidenti e soprattutto in continua evoluzione) quelle che a nostro giudizio possano fungere da riferimento attuale per i patologi della Regione Veneto.

Accanto a questo obiettivo ci si è proposti di elaborare un documento che dia alcune informazioni di carattere più generale e che possa essere utile durante il lavoro diagnostico quotidiano.

Il documento prende in esame le principali aree della diagnostica delle lesioni polipoidi del colo-retto ed è stato suddiviso nelle seguenti parti:

1) Trattamento macroscopico delle lesioni polipoidi asportate endoscopicamente. (referenti Cristina Antonini e Roberta Boschetto)
2) Le lesioni adenomatose convenzionali (referente Marcello Lomele)
3) Le lesioni serrate (referente Antonio Scapinello)
4) L'adenoma cancerizzato (referente Sara Pecori)
5) Il campione operatorio (referenti Romano Colombari e Maria Lunardi)
6) Le indagini immunoistochimiche e molecolari finalizzate sia alla caratterizzazione prognostica e predittiva che alla ricerca delle forme ereditarie (referente Duilio Della Libera)

Per quanto attiene ai criteri di qualità più generali che dovrebbero essere soddisfatti si fa riferimento a quelli proposti nelle linee guida europee (Quality assurance in pathology in colorectal cancer screening and diagnosis - European recommendations. Virchows arch 2010 DOI 10.1007/s00428-010-0977-6). Le modalità per la loro applicazione e verifica dovranno essere affrontate in ambito tecnico-politico.

Il Gruppo dei Patologi dello Screening Colorettale
Cristina Antonini, Laura Borghi, Roberta Boschetto, Romano Colombari, Paola Cusatelli, Emanuele D'amore, Duilio Della Libera, Marcello Lo Mele, Maria Lunardi, Sara Pecori, Claudia Roldo, Anna Tomezzoli.

Il Coordinatore del Gruppo Regionale
dei Patologi dello Screening colo-rettale

Antonio Scapinello

ALLEGATO C Dgr n. del pag. 3/51

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

**PARTE PRIMA**
(Referenti: Cristina Antonini e Roberta Boschetto)

## MODALITA' DI INVIO E TRATTAMENTO MACROSCOPICO DELLE LESIONI POLIPOIDI ASPORTATE ENDOSCOPICAMENTE.

### a. RICHIESTA ISTOPATOLOGICA

La richiesta di esame istopatologico inviata dal servizio di endoscopia deve contenere le seguenti informazioni.

- **Dati clinico-anamnestici paziente** nome, cognome, sesso, data di nascita, CF;
- **Sede della lesione** distanza dalla linea muco cutanea.
- **Dimensione valutata in corso di endoscopia.**
  E' opportuno che l'endoscopista selezioni le lesioni polipoidi >0,5 cm e ne identifichi la base d'impianto con eventuale marcatura della stessa con inchiostro di china o con repere idoneo.
- **Modalita' di asportazione.**
  Qualora l'asportazione sia avvenuta in frammenti, l'endoscopista deve specificare se tutti i frammenti siano stati recuperati per l'esame istologico.
- **Morfologia** sessile/polipoide/piatta.
- **Patologie associate** (es. IBD).

### b. INVIO DEI CAMPIONI

- Il materiale deve essere inviato in liquido fissativo rappresentato da Formalina tamponata al 10%. (sono sconsigliati altri tipi di fissativo).
- E' necessario che venga inviato 1 contenitore per ogni campione di polipectomia con misura endoscopica > di mm 5 ed è inderogabile comunque l'invio in contenitori separati in caso di sedi multiple anche per dimensioni < a mm 5.
- Può essere accettato che lesioni polipoidi diminutive (< di mm 5) molto ravvicinate (comprese in un tratto di grosso intestino non superiore a 1-2 cm) possano essere poste in un unico contenitore.
- E' raccomandato che l'endoscopista apponga le lesioni polipoidi diminutive su carta bibula e per le lesioni polipoidi sessili di diametro superiore a 10 millimetri provveda a fissarle su supporto rigido in modo da favorire il riconoscimento della base d'impianto.

### c. RIFERIMENTI NECESSARI NEL REPORT ISTOPATOLOGICO:

E' fortemente raccomandato che dall'endoscopia giunga il report dell'esame endoscopico e che questo sia visionato dal medico sia in fase di riduzione macroscopica che di refertazione.
Per il corretto abbinamento del referto istopatologico con i campioni inviati, in caso di lesioni multiple, si raccomanda di mantenere la distinzione fra queste, identificandole con lettere o numeri progressivi, mantenendo la sequenza indicata dall'endoscopista individualmente sia in fase di descrizione del materiale inviato sia in fase di descrizione macroscopica che della diagnosi istologica.

- **Descrizione del tipo di prelievo (materiale inviato):** biopsia/polipectomia/mucosectomia.
- **Sede del prelievo**, come da specifiche del referto endoscopico riportando (opzionale) le dimensioni della lesione indicata dall'endoscopista. La dimensione indicata dall'endoscopista va riportata in caso di lesione polipoide asportata in più frammenti.

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

**d. DESCRIZIONE MACROSCOPICA**

Vanno riferiti la conformazione della/e lesioni polipoidi, le modalità di invio del campione, le dimensioni.

- **conformazione** (sessile/peduncolato)
- **descrizione del materiale** se pervenuto orientato su supporto e/o con margine di resezione marcato dall'endoscopista; se giunto in frammenti, riportare il numero dei frammenti. Nel caso di biopsie descrivere il numero dei frammenti.
- **dimensioni** espresse in millimetri o centimetri. **La dimensione dei polipi adenomatosi è fattore critico nel definire il timing della sorveglianza endoscopica.**

- Nei polipi peduncolati giunti integri di almeno 5 mm deve essere misurata separatamente la testa (almeno il diametro maggiore) dal peduncolo (lunghezza).
- Nei polipi sessili giunti integri > 5 mm va riferito almeno l'asse maggiore.
- Nei polipi di diametro inferiore ai 5 mm va riportata solo la dimensione.
- Nel caso di lesione giunta frammentata viene descritto il numero complessivo dei frammenti e viene misurato il diametro del frammento maggiore. In questi casi, come dimensione per le strategie di sorveglianza endoscopica fa riferimento quella endoscopica anche se ritenuta meno accurata.

NB: Secondo le linee guida europee è la dimensione istologica misurata su vetrino quella da utilizzare per le strategie di sorveglianza endoscopica perché consente di valutare precisamente solo la parte neoplastica della lesione.
In considerazione del fatto che appare ancora poco praticabile in modo sistematico questo tipo di misurazione si consiglia di eseguire la valutazione istologica della dimensione quando il patologo osservi una sostanziale discrepanza tra tessuto adenomatoso e tessuto non adenomatoso.
E' evidente che se nel campionamento sono state eseguite sezioni trasversali all'asse maggiore della testa, deve fare riferimento la misura eseguita in fase macroscopica dopo fissazione.

- **Identificazione del margine di resezione endoscopica**
  Agevole nelle lesioni peduncolate appena resecate, può diventare problematica dopo fissazione in formalina. E' auspicabile che la marcatura (con colorante vitale o idoneo repere) venga effettuata dall'endoscopista prima della fissazione.
  Nel caso ciò non sia avvenuto, se il patologo individua chiaramente il margine, lo marca con inchiostro di china e lo annota nella descrizione macroscopica.

**e. CAMPIONAMENTO**

- Va effettuato preferibilmente su lesione fissata, con lama nuova di taglio e senza esercitare eccessiva pressione, per preservare al massimo il tessuto ed evitare artefatti da stiramento.
- È molto utile la marcatura con china della base di impianto.
- Lesioni sessili >1cm: devono essere tagliate con sezioni seriate perpendicolarmente all'asse maggiore della base, dopo marcatura con china.
- Lesioni sessili tra 0,6 e 1 cm: vengono incluse, se orientabili, con sezioni seriate perpendicolari alla base, dopo marcatura con china.
- Per le lesioni peduncolate si consiglia di separare, con tagli perpendicolari alla base, le due calotte laterali dall'asse stromale centrale, comprendente il peduncolo. Se di dimensioni particolarmente rilevanti, l'asse stromale può essere ulteriormente sezionato con tagli paralleli al primo.

Suddetti prelievi devono garantire la valutazione del margine di resezione e rapporti tra epitelio e asse stromale. I prelievi delle calotte e dell'asse stromale vanno inclusi in biocassette separate.
**In ogni caso il materiale pervenuto va incluso in toto.**

**f. SEZIONI E LIVELLI**

E' consigliabile eseguire più livelli di sezione nelle lesioni polipoidi superiori a cm. 1 per ogni blocchetto da colorare con E&E. Appare più diffuso il metodo di eseguire 3 livelli, ma non è codificato l'intervallo tra i livelli.

ALLEGATO C Dgr n. del pag. 51/51

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

BIBLIOGRAFIA


1. Quality assurance in pathology in colorectal cancer screening and diagnosis-European recommandatios. Virchows Arch 2011; 458: 1-19.
2. Programma di screening regionale per la diagnosi precoce e la prevenzione dei tumori del colon-retto. Documento di consenso per la diagnosi istopatologia delle lesioni tumorali e pre-tumorali del colon-retto. Gruppo di lavoro 2012
3. European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis, 2010
4. Diagnosi anatomo-patologica negli screenin del carcinoma colo-rettale: indicazioni. Gruppo Italiano Tumori ColoRettali (GISCoR). Pathologica 2006; 98:171-174
5. Linee guida e criteri diagnostici minimi. *G.I.P.A.D. Pathologica 1999; 91: 286-294*
6. Polyp Guideline: Diagnosis, Treatment, and Surveillance for Patients With Colorectal Polyps. Am Jour Gastroenterol 2000; 95,11:3054-3063
7. Colorectal Tumors: the histology report. Digestive and Liver Disease 2011;43S S344-S355
8. Regione Emilia-Romagna: Il protocollo diagnostico-terapeutico dello screening per la diagnosi precoce del tumore del colon retto. II edizione 2012

ALLEGATO C Dgr n. del pag. 6 / 81

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

**PARTE SECONDA**
(referente dott. Marcello Lo Mele)

## ADENOMI CONVENZIONALI

### DEFINIZIONE

Gli adenomi convenzionali sono lesioni (neoformazioni) polipoidi della mucosa del grosso intestino rilevate (peduncolate/sessili), piane ("*flat*"), a morfologia tubulare, tubulovillosa o villosa, con displasia epiteliale di basso/di alto grado delle ghiandole.

### DIAGNOSI

Le lesioni campionate vanno valutate su vetrino allestito con colorazione Ematossilina-Eosina. L'interpretazione diagnostica si fonda sul riconoscimento dei seguenti parametri:
**architettura**, **grado di displasia**, **dimensioni**, tutti parametri condizionanti il successivo follow-up del paziente, e **stato del margine** (quando valutabile) in particolare per le lesioni con displasia di alto grado.

**a. I pattern architetturali definiti sono i seguenti:**
- **tubulare** (AT) (tubuli superiori al 75%),
- **villoso** (AV) (villi superiori al 75%),
- **tubulovilloso** (ATV) (entrambe le componenti inferiori al 75% *ovvero* almeno il 20-25% di componente villosa).

Architettura villosa: è particolarmente importante il suo riconoscimento in quanto nelle lesioni inferiori ad 1 cm condiziona il passaggio al rischio intermedio per il follow-up endoscopico (vedi oltre). I villi possono essere:
- classici (lunghi sottili, con scarso stroma e scarse ramificazioni; disposti parallelamente tra loro con base che giunge fino alla *muscularis mucosae*);
- palmati (più ampi, ramificati, fogliacei, spesso con strutture tubulari alla base o anche nello stroma);
- *"foreshortened"* (non ramificati, sottili, che protrudono nettamente dal contorno della lesione tubulare).

**b. Displasia**
Valutata la morfologia si deve valutare il grado di displasia, di basso o alto grado, degli epiteli ghiandolari.
- ***Displasia di basso grado***: architettura generale relativamente conservata, tubuli ghiandolari lievemente allungati o tortuosi; displasia estesa sino all'epitelio di superficie; nuclei sigariformi, allungati, ingranditi (fino ai 2/3 dello spessore dell'epitelio), assenza di evidenti nucleoli.
- ***Displasia di alto grado***: *caratterizzata da alterazioni architetturali* - architettura delle ghiandole ramificata, cribriforme, irregolare, solida, ghiandole disposte *back-to-back*, crescita intraghiandolare dell'epitelio (*papillary tufting*) - *e citologiche* - la displasia è estesa sino all'epitelio di superficie; perdita di polarità cellulare; riduzione sino alla assenza delle *goblet cells* e della muciparità (atipica, retronucleare); stratificazione nucleare; nuclei di dimensioni notevolmente aumentati, con evidenti nucleoli; cromatina notevolmente dispersa; mitosi talora atipiche; prominente apoptosi.

*Sono sufficienti 1-2 ghiandole (WHO) con le caratteristiche sopra riportate per classificare la lesione come displastica di alto grado o eventualmente, in relazione alle alterazioni architetturali,*

ALLEGATO C Dgr n. del pag. 7 | 51

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

*un numero di ghiandole sufficiente da essere identificato a basso ingrandimento.*
*Alcune delle caratteristiche precedentemente descritte come alterazioni citologiche compatibili con displasia di alto grado possono essere presenti singolarmente anche in lesioni con displasia di basso grado. E non devono essere interpretate come alto grado.*
*La presenza di atipie citologiche associate ad aspetti morfologici suggestivi di trauma, prolasso, erosione, spesso con evidenza morfologica di sanguinamento deve essere valutata con attenzione per non sopravvalutare il grado di displasia.*
*E' necessario quindi che la determinazione della displasia di alto grado sia basata sulla presenza del maggior numero se non di tutti gli aspetti sopra citati.*

*Grading della displasia*

| | *Normale* | *Displasia di basso grado* | *Displasia di alto grado* |
|---|---|---|---|
| Architettura generale | Ghiandole non ramificate | Relativamente conservata con tubuli ghiandolari lievemente allungati o tortuosi (profilo villoso) | Architettura delle ghiandole ramificata, cribriforme, irregolare, solida, con ghiandole disposte *back-to-back*, con crescita intraghiandolare dell'epitelio (*papillary tufting*) |
| Estensione della displasia | | Sino all'epitelio di superficie | Sino all'epitelio di superficie |
| Polarità cellulare | Conservata | Parzialmente conservata | Assente |
| *Goblet cells* | ++ | + | -/+ retronucleari, atipiche |
| Filiere nucleari | 1 | 2-3 | 2-5 |
| Nuclei e dimensioni Nucleoli | Piccoli, basali Nessun nucleolo o non evidenti nucleoli | Sigariformi, allungati, ingranditi (fino ai 2/3 dello spessore dell'epitelio), a palizzata Nessun nucleolo o non evidenti nucleoli | Dimensioni notevolmente aumentate, allargati, con evidenti nucleoli, anche se pochi |
| Cromatina | Scarsa | + | ++, notevolmente dispersa; mitosi talora atipiche; prominente apoptosi |

**c. Dimensioni**

Secondo le linee guida europee è la dimensione istologica misurata su vetrino quella da utilizzare per le strategie di sorveglianza endoscopica perché consente di valutare precisamente solo la parte neoplastica della lesione. Si consiglia comunque di verificare la dimensione istologica quando sia discordante significativamente da quella macroscopica.
E' evidente che se nel campionamento sono state eseguite sezioni trasversali all'asse maggiore della testa del polipo, deve fare riferimento la misura eseguita in fase macroscopica dopo fissazione.
Nel caso di lesioni frammentate va misurato il frammento maggiore, ma per le strategie di sorveglianza endoscopica la dimensione riferimento è quella endoscopica anche se ritenuta meno accurata.

ALLEGATO C Dgr n. del pag. 8 / 51

**d. Margine**

Valutare sempre il margine se indenne o meno, e se la retrazione della base d'impianto, o le caratteristiche del materiale in esame non consentono adeguate precisazioni in merito alla radicalità della exeresi.

Lo stato del margine va riferito in particolar modo per le lesioni adenomatose di alto grado, specificando, se il tessuto adenomatoso presente in corrispondenza del margine presenti displasia di basso o alto grado.

Nel caso in cui la lesione sia frammentata non è possibile pronunciarsi correttamente circa i margini e le dimensioni, se non riportando il frammento con diametro maggiore.

**e. Terminologia consigliata in fase di refertazione**

Adenoma Tubulare/Villoso/Tubulovilloso con displasia epiteliale di basso/alto grado *(con asse maggiore dell'area adenomatosa misurato su vetrino di mmo cm* solo se vi è significativa disparità di dimensioni rispetto a quanto rilevato in macro).

La lesione adenomatosa è risultata istologicamente compresa nei margini della escissione.

La retrazione della base d'impianto/Le caratteristiche del materiale in esame non consentono adeguate precisazioni in merito alla radicalità della exeresi.

Displasia di...grado è stata istologicamente documentata in corrispondenza del margine della escissione.

Sono state proposte altre terminologie classificative delle lesioni adenomatose.

La lesione adenomatosa (in particolar modo la lesione piana "*flat*") può anche essere refertata utilizzando la classificazione WHO 2010:

a. neoplasia intraepiteliale di basso grado (adenoma con displasia di basso grado);
- neoplasia intraepiteliale di alto grado (adenoma con displasia di alto grado); carcinoma intramucoso (limitato alla lamina propria);

oppure la classificazione di Vienna modificata adattata per lo screening del carcinoma CR

a. neoplasia mucosa di basso grado (categoria 3) (adenoma con displasia di basso grado);
- neoplasia mucosa di alto grado (categoria 4) (cat. 4.1: adenoma con displasia di alto grado; 4.2: carcinoma non-invasivo, *in situ*; 4.3: sospetto per carcinoma invasivo; 4.4: carcinoma intramucoso).

Tali modalità sono sconsigliate dalle linee guida europee. Dal punto di vista istologico le definizioni sono corrette ma poichè il carcinoma in situ e il carcinoma intramucoso del grosso intestino sono privi di potenzialità metastatica se ne sconsiglia l'uso nel referto finale, comprendendo entrambe le lesioni nella dizione di displasia grave. Qualora utilizzate devono essere aggiunte tra parentesi dopo diagnosi convenzionale e concordate con i propri endoscopisti.

*Grading della neoplasia colorettale superficiale*

| European Guidelines 2010 | WHO 2010 | Revised Vienna Classification |
|---|---|---|
| | | Category 1: negativo per neoplasia |
| | | Category 2: indefinito per neoplasia |
| Adenoma tubulare/tubulovilloso/villoso con displasia di basso grado | Neoplasia intraepiteliale di basso grado | Categoria 3: neoplasia mucosa di basso grado |
| Adenoma tubulare/tubulovilloso/villoso con displasia di alto grado | Neoplasia intraepiteliale di alto grado | Categoria 4: neoplasia mucosa di alto grado<br>-4.1: displasia di alto grado<br>-4.2: carcinoma non-invasivo |

| | | |
|---|---|---|
| | Carcinoma intramucoso | (in situ)<br>-4.3: sospetto per carcinoma invasivo<br>-4.4: carcinoma intramucoso |
| | Carcinoma infiltrante (la sottomucosa) | Categoria 5: Carcinoma infiltrante la sottomucosa |

Per il **TNM** l'adenoma con displasia di alto grado equivale ad un carcinoma *in situ* e quindi è classificato come **pTis.**

***Esempi di refertazione:***

1) Adenoma Tubulare/Villoso/Tubulovilloso con displasia epiteliale di basso/alto grado - *con asse maggiore dell'area adenomatosa misurato su vetrino di mm o cm* solo se vi è significativa disparità di dimensioni rispetto a quanto rilevato in macro -
(neoplasia intraepiteliale di ..... grado secondo WHO 2010 *o eventualmente* carcinoma intramucoso secondo WHO 2010 *o* neoplasia mucosa di .... grado categoria .. secondo la classificazione di Vienna riadattata dalle linee guida europee).
La lesione adenomatosa è risultata istologicamente compresa nei margini della escissione.
La retrazione della base d'impianto/Le caratteristiche del materiale in esame non consentono adeguate precisazioni in merito alla radicalità della exeresi.
Displasia di...grado è stata istologicamente documentata in corrispondenza del margine della escissione.
*pTis (per la displasia di alto grado e il carcinoma intramucoso)*

In caso di lesioni frammentate:
2) Frammenti di Adenoma Tubulare/Villoso/Tubulovilloso con displasia epiteliale di basso/alto grado (opzionale la dizione: margine di escissione non valutabile).

In caso di lesioni adenomatose frammentate in cui sia sospettata, ma non inequivocabilmente documentata, l'invasione della sottomucosa è consigliabile rimettere alla discussione multidisciplinare le decisioni riguardo al successivo trattamento.

**FOLLOW-UP**

Le dimensioni, la morfologia ed il grado di displasia della lesione sono di fondamentale importanza per il follow-up del paziente.
Nei programmi di *screening* è utilizzato il termine ***adenoma avanzato*** quando è presente **almeno uno** dei seguenti aspetti: dimensioni uguali o superiori a 1 cm; componente villosa (uguale o maggiore del 20%-25%) (adenoma tubulovilloso/villoso); displasia di alto grado.
L'altro parametro condizionante il follow-up e, quindi, la definizione di adenoma avanzato è il numero di lesioni adenomatose identificate in corso di endoscopia.
Considerando la soggettività operatore-dipendente circa la morfologia ed il grado di displasia, le dimensioni della lesione diventano ancora più importanti, in quanto queste sono oggettive e non operatore-dipendente.
Secondo le linee guida europee circa la sorveglianza in colonscopia a seguito di rimozione di adenoma/i, il paziente è:
*a)* a basso rischio: se sono stati rimossi 1 o 2 adenomi di dimensioni inferiori a 1 cm, tubulari, con displasia di basso grado;
*b)* a rischio intermedio: se sono stati rimossi 3 o 4 adenomi con le stesse caratteristiche già descritte

in *a*), oppure almeno 1 di dimensioni uguali o superiori al cm (comunque inferiori a 2 cm) oppure almeno 1 adenoma con componente villosa *o* con displasia di alto grado;

*c)* ad alto rischio: se sono stati rimossi 5 o più adenomi (con le stesse caratteristiche descritte in *a*) oppure almeno 1 di dimensioni uguali o superiori a 2 cm.

**CODICI SNOMED USATI**

da applicare per ogni adenoma refertato:
M-82110: Adenoma Tubulare
M-82630: Adenoma Tubulo-Villoso
M-82611: Adenoma Villoso
M-74000: Displasia
M-74006: Displasia di basso grado o, in alternativa GA001: basso grado
M-74008: Displasia di alto grado o, in alternativa GA003: alto grado

Per l'inserimento delle codifiche SNOMED si rimanda al NAP

BIBLIOGRAFIA


1. Quirke P, Risio M, Lambert R, von Karsa L, Vieth M. (2011). Quality assurance in pathology in colorectal cancer screening and diagnosis-European reccomendations. Virchows Arch 458(1): 1-19
2. Vieth M, Quirke P, Lambert R, von Karsa L, Risio M (2011). Annex to Quirke et al. Quality assurance in pathology in colorectal cancer screening and diagnosis : annotations of colorectal lesions. Virchows Arch 458(1):21-30
3. Lanza G, Messerini L, Gadà R, Risio M. (2011). Colorectal tumors: the histology report. Digestive and Liver Disease 43S: S344-S355
4. Cooper H. S. (2007). Pathology of the endoscopically removed colorectal polyp. Current disgnostic pathology 13:423-437
5. Dixon MF (2002). Gastrointestinal epithelial neoplasia: Vienna revisited. Gut 51:130-131
6. Fenger C, Bak M, Kronborg O, Svanholm H. (1990). Obseerver reproducibility in grading dysplasia in colorectal adenomas: comparisons between two different grading systems. J Clin Pathol 43:320-324
7. Kudo S *et al*. (2008). Nonpolypoid neoplastic lesions of the colorectal mucosa. Gastrointestinal endoscopy 68, n. 4 S3-S47
8. Suzuki N, Price AB, Talbot IC, Wakasa K, Arakawa T, Ishiguro S, Fraser C, Saunders BP. (2006). Flat colorectal neoplasia and the impact of the revised Vienna classification on their reporting: a case controlstudy in UK and Japanese patients. Scandinavian Journal of Gastroenterology. 41:812-819
9. Schoen RE, Gerber LD, Margulies C. (1997). The pathologic measurement of polyp size is preferable to the endoscopic estimate. Gastrointest Endosc 46:492-496
10. The Paris endoscopic classification of superficial neoplastic lesions: esophagus, stomach and colon (2002). Gastrointest Endosc S6: S3-S43
11. Soetikno *et al* (2008). Prevalence of nonpolypoid (flat and depressed) colorectal neoplasms in asymptomatic and symptomatic adults. JAMA 299 (9): 1027-1035
12. Risio M. (2010). The natural history of adenomas. Best Practice and Research Clinical Gastroenterology 24: 397-406
13. Protocollo diagnostico terapeutico dello screening per la diagnosi precoce del tumore del colon-retto. Emilia Romagna. II edizione – Anno 2012
14. Mahajan D, Goldblum JR *et al* (2013). Am J Surg Pathol 37:427-433
15. Lieberman D, Moravec M, Holub J, Michaels L, Eisen G (2008). Polyp size and advanced histology in patients undergoing colonoscopy screening: implications for CT colonography. Gastroenterology 135:1100-1105
16. Shapiro R, Ben-Horin S, Bar-Meir S, Avidan B. (2012) The risk of advanced histologyin small-sized colonic polyps: are non-invasive colonic imaging modalities good enough? Int J Colorectal Dis 27: 1071-1075
17. Hassan C, Gimeno-García A, Kalager M, Spada C, Zullo A, Costamagna G, Senore C, Rex DK, Quintero E. Systematic review with meta-analysis: the incidence of advanced neoplasia after polypectomy in patients with and without low-risk adenomas. Aliment Pharmacol Ther. 2014 May;39(9):905-12
18. Mahajan D, Downs-Kelly E, Liu X, Pai RK, Patil DT, Rybicki L, Bennett AE, Plesec T, Cummings O, Rex D, Goldblum JR. Reproducibility of the villous component and high-grade dysplasia in colorectal adenomas <1 cm: implications for endoscopic surveillance. Am J Surg Pathol. 2013 Mar;37(3):427-33
19. Mahajan D, Downs-Kelly E, Liu X, Pai RK, Patil DT, Rybicki L, Bennett AE, Plesec T, Cummings O, Rex D, Goldblum JR. Reproducibility of the villous component and high-grade dysplasia in colorectal adenomas <1 cm: implications for endoscopic surveillance. Am J Surg Pathol. 2013 Mar;37(3):427-33.

ALLEGATO C Dgr n. del pag. 12/51




**PARTE TERZA**
(referente dott. Antonio Scapinello)

## LESIONI SERRATE

Le lesioni serrate comprendono uno spettro di lesioni polipoidi perlopiù sessili, caratterizzate dall'accumulo delle cellule epiteliali che rivestono le cripte le quali tendono a crescere all'interno del lume determinano da un lato la configurazione serrata e dall'altro la dilatazione delle cripte stesse. Se il compartimento proliferativo rimane come di norma confinato all'1/3 inferiore delle cripte prende origine il polipo iperplastico. Se si determinano delle alterazioni nella dislocazione del compartimento proliferativo si producono alterazioni architetturali e citologiche via via più complesse che daranno origine all'adenoma/polipo serrato sessile senza o con displasia citologica e all'adenoma serrato tradizionale.

Questa è l'attuale classificazione WHO delle lesioni serrate:

**Table 1. Pathological classification of serrated colorectal lesions recommended by the World Health Organization**

| |
|---|
| Hyperplastic polyp |
| Sessile serrated adenoma/polyp[a] |
| With or without cytological dysplasia |
| Traditional serrated adenoma |

[a] The terms "sessile serrated adenoma" and "sessile serrated polyp" are considered synonymous.

Snover D, Ahnen DJ, Burt RW *et al*. Serrated polyps of the colon and rectum and serrated polyposis. In: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND (eds) WHO Classification of Tumours of the Digestive System.
LYON: IARC, 2010, 160-5.

Queste le principali caratteristiche cliniche:

**Table 2. Clinical features of serrated lesions**

| | Shape | Mean Size | Prevalence | Location | Pre-cancerous |
|---|---|---|---|---|---|
| HP | Flat, sessile | Small, often ≤ 5mm | Very common | Left colon | No |
| SSA/P | Flat, sessile | Larger than HP[a] | Common[b] | Right colon | Yes |
| TSA | Sessile, pedunculated | Larger than HP | Rare | Left colon | Yes |

HP, hyperplastic polyp; SSA/P, sessile serrated adenoma/polyp; TSA, traditional serrated andenoma.
[a] SSA/P may be < 1 cm in size, but the mean size of SSA/P is larger than the mean

size of HP. Most serrated lesions ≥ 1 cm in size are SSA/P.
[b] Mean detected prevalence rates ≤ 2%

Pertanto le entità nosograficamente distinte sono le seguenti:
b. Polipo iperplastico (HP)
c. Adenoma/polipo serrato sessile (SSA/P)
d. SSA con displasia citologica (SSAD)
e. Adenoma serrato tradizionale (TSA)

**a. POLIPI IPERPLASTICI**

*Caratteri generali:* sono sicuramente la lesione serrata più frequente (75%) caratterizzata da dimensioni piccole (< a 5 mm), prevalenti nel sigma distale e nel retto dove spesso sono multipli. *Istologicamente* sono caratterizzati da cripte allungate, rettilinee, che si assottigliano alla base. Mostrano iperdifferenziazione/ipermaturazione citopolasmatica, nuclei monostratificati ovali, senza evidente displasia cariologica. Il compartimento proliferativo è limitato alla base (1/3 inferiore) delle cripte. La presenza di atipia citologica basale senza significative modificazioni architetturali può essere dovuta a modificazioni rigenerative in un HP infiammato.
Si distinguono i seguenti 3 citotipi di polipo iperplastico la cui specifica non è raccomandata in fase di refertazione

1. *micro vacuolare*: dimensioni inferiori a 5 mm, sede sigma distale-retto (74%) e colon trasverso/destro (15%), piatti, bruno chiaro; mutazione prevalente BRAF V600E.
2. *a cellule mucipare*: dimensioni inferiori a 5 mm, di solito non più di 2 o 3 mm; nel 90 % in sede sigma distale/retto, sessili, pallidi; mutazione prevalente KRAS
3. *a deplezione mucipara*: forma rara, può presentare atipia dei nuclei che appaiono talora grandi, rotondi, ipercromici, ma senza pseudo stratificazione. La teoria prevalente è che rappresenti un HP micro vescicolare sottoposto a stress infiammatorio con modificazioni epiteliali reattive.

*Significato clinico*: 17 volte più frequenti nei segmenti colici con cancro, spesso multicentrici specialmente nei tratti distali, aumentano progressivamente con l'età. Possono essere numerosi e associarsi ad altre lesioni polipoidi serrate e/o adenomatose nel configurare la cosiddetta poliposi serrata.

***Dal polipo iperplastico al polipo/adenoma serrato sessile:*** nel polipo iperplastico il comparto proliferativo rimane limitato alla base. Quando si determinano alterazioni della proliferazione con spostamento del comparto proliferativo verso la porzione superiore delle cripte, si creano alterazioni architetturali e citologiche che segnano il passaggio alle lesioni che vengono definite come adenomi/polipi serrati sessili (SSA/P).

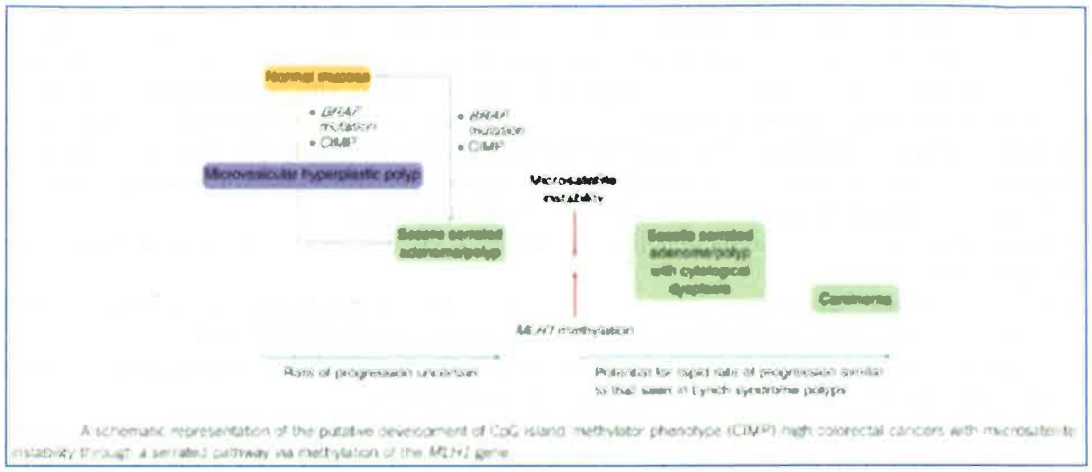
Modificazione citoarchitetturali indotte dall'alterazione del comparto proliferativo

| | Proliferazione normale | Proliferazione anomala |
|---|---|---|
| Serrazione | lieve | marcata |
| Cripte orizzontali (a L, a T, a Scarpa) | assente | presente |
| Dilatazione delle cripte basali | assente | presente |
| Mucina luminale | Normale | Spesso aumentata |
| Asimmetria della zona proliferativa | Assente | Presente |
| Cellule globet distrofiche | Assenti o rare | Spesso prominenti |
| Atipia citologica | Assente | Da lieve a moderata |
| Mitosi nella parte superficiale delle cripte | Assenti | Possono essere presenti |

ALLEGATO C Dgr n. del pag. 14 | 51

**b. ADENOMA/POLIPO SERRATO SESSILE (SSA/P):**

*Caratteri generali*: rappresenta il 9% dei polipi rimossi endoscopicamente, il 20% dei polipi serrati, sessili o piatti, prevalentemente localizzati al colon destro (75%), di dimensioni comprese tra 2-5 mm nel 36%, tra 6-10 mm nel 47% e > di 11 mm nel 17%. E' considerato la lesione preneoplastica degli adenocarcinomi che seguono la via epigenetica di silenziamento genico per ipermetilazione, cosiddetto fenotipo "CIMP-high". Infatti la maggior parte dei SSA/P è CIMPhigh, BRAF mutata e negli SSA/P con displasia frequentemente si osserva ipermetilazione di MLH1.

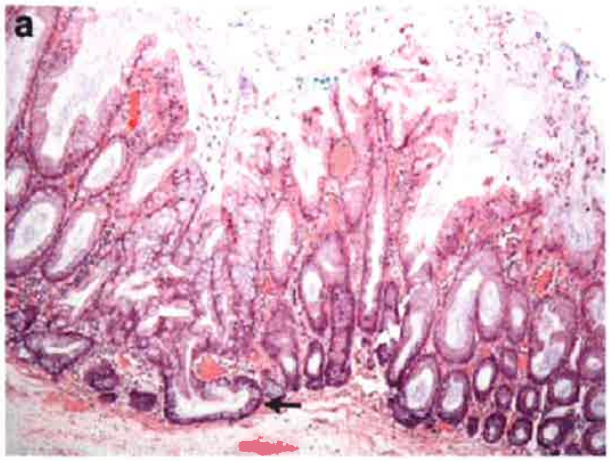



A schematic representation of the putative development of CpG island methylator phenotype (CIMP) high colorectal cancers with microsatellite instability through a serrated pathway via methylation of the *MLH1* gene

*Caratteri istologici distintivi*:

- Displasia architetturale: presenza di disordine architetturale dovuto a innalzamento della zona proliferativa con maturazione sia in senso luminale che basale (maturazione inversa) che determina la formazione di cripte basali orizzontali con forma a T rovesciata, a L. Tale aspetto è ritenuto diagnostico di adenoma/polipo serrato sessile. A ciò si associa la ramificazione delle cripte, la dilatazione delle cripte in sede profonda (con dilatazione più marcata rispetto all'apertura luminale) e la marcata serrazione (maggiore che nel polipo iperplastico). Talora si osserva erniazione delle cripte attraverso la muscularis mucosa dando origine a un pattern di crescita pseudo invasivo o inverso.
- citologicamente si possono osservare cellule globet distrofiche (libere nell'epitelio, non comunicanti con il lume, invertite), talora la presenza di mitosi nella parte superficiale delle cripte. I nuclei possono presentare modesta atipia, risultando vescicolari e con nucleolo evidente.

ALLEGATO C Dgr n. del pag. 15151




*Bettington et al* *Am J Surg Pathol* • Volume 38, Number 2, February 2014

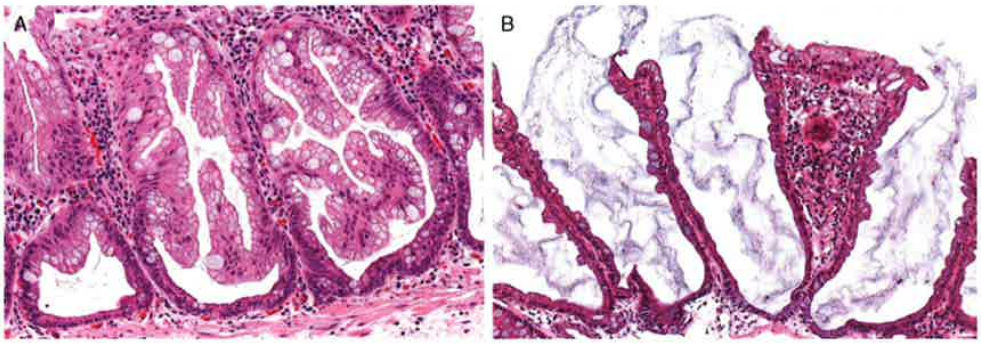



FIGURE 1. Features of an SSA-type crypt. Horizontal growth along the muscularis mucosa, deep serration and asymmetric proliferation (A), dilation of the crypt bases (B) (hematoxylin and eosin stain).

Nelle lesioni serrate sessili con caratteristiche dell'adenoma serrato sessile si possono osservare aree indistinguibili dal polipo iperplastico micro vescicolare che talora costituisce la maggior parte della lesione. Secondo WHO sono sufficienti due o tre cripte contigue con le caratteristiche tipiche per classificare la lesione come SSA/P. Secondo le raccomandazioni di Rex et al (Am J Gastroenterol 2012; 107:1315-29) per la diagnosi di SSA/P è sufficiente una singola cripta con distorsione architetturale inequivocabile, dilatata e/o orizzontalmente ramificata in particolare se associata a maturazione inversa in una lesione del colon prossimale.

**Il gruppo ritiene preferibile adottare i criteri di Rex.**

**Criteri per la diagnosi differenziale tra polipo iperplastico e SSA/P**

| | Polipo iperplastico | Adenoma/Polipo serrato sessile |
|---|---|---|
| sede | Colon distale - retto | Colon prossimale |
| dimensione | < 5 mm | >5 mm |
| Displasia architetturale e/o citologica | no | si |
| differenziazione | Iperdifferenziazione, ipermaturazione superficiale | Alterazione della differenziazione. Maturazione inversa. |

ALLEGATO C Dgr n. del pag. 16/51

| | | |
|---|---|---|
| nuclei | Monostratificati ovali | Vescicolosi, nucleo lati pluristratificati |
| Compartimento proliferativo | Alla base | Tende a dislocarsi più in alto e in punti diversi. Anomalie apoptosi e proliferazione |

**Diagnosi differenziale con le lesioni da prolasso**
Poiché le lesioni da prolasso possono produrre alterazioni delle cripte molto simili a quelle dell'SSA, l'evidenza di significativo effetto da prolasso - proliferazione miocellulare nella lamina propria, cripte a forma di diamante (Huang) - preclude la diagnosi di SSA.

- **SSA borderline (BSSA)**

Esistono comunque polipi serrati con caratteristiche intermedie tra HP e SSA/P ovvero nei quali sono presenti alcune ma non tutte le caratteristiche richieste per la diagnosi di SSA.
Recentemente per queste lesioni è stata proposta la denominazione di polipi serrati sessili borderline (BSSA). Mohammadi (2011) ha stabilito i seguenti criteri:
SSA: presenza di almeno due inequivocabili carratteristiche tra dilatazione delle cripte basali, serrazione delle cripte basali, ramificazione e crescita orizzontale (lateralizzata) delle cripte.
BSSA: presenza di uno solo di questi criteri o aspetti equivoci per due di essi
MVHP: nessuno dei su citati criteri o aspetti equivoci per solo uno di essi
*Significato clinico:* Apparentemente simile a quello del SSA/P con rischio di CRC sincrono leggermente inferiore e distribuzione prevalente a sinistra.
La diagnosi di BSSA non è raccomandata dal gruppo Americano (Rex 2012) che però sembra ampliare i criteri diagnostici rispetto al WHO (2-3 cripte contigue con le alterazioni tipiche) raccomandando che ne basta una. Il gruppo australiano (Bettigton, 2014) in sostanza pur distinguendo i SSA in tipici (WHO criteria, Snover) e probabili (con caratteristiche diminutive per numero di cripte tipiche) tende alla luce dei dati di distribuzione e follow-up a inquadrarli nei SSA.
**Si propone che sia preferibile diagnosticare come SSA lesioni sessili a destra, soprattutto se maggiori di 5 mm, che mostrano parziali alterazioni architetturali.**

**c. POLIPO ADENOMA SERRATO SESSILE CON DISPLASIA**
*Caratteristiche generali*: sovrapponibili al SSA senza displasia, dimensioni medie comprese tra 8,5 e 11,3 mm (leggermente maggiori rispetto al SSA senza displasia);
*Caratteri istologici distintivi*: presenza di displasia citologica di cui sono descritti due tipi:
*a) displasia serrata:* cellule cubiche con citoplasma eosinofilo e nuclei ampi, vescicolosi con nucleolo evidente. I nuclei appaiono oligostratificati o monostratificati alla base. Sebbene il pattern architetturale di crescita non sia particolarmente serrato, l'emergenza della prominente eosinofilia citoplasmatica fa ritenere ad alcuni esperti che la displasia serrata sia un biomarker istologico di progressione neoplastica. (Snover, WHO, 2010). Tale tipo di displasia non viene contemplato nella definizione di SSAD nel più recente lavoro del gruppo Australiano (Bettington 2014)
*b) displasia convenzionale:* mitosi talora atipiche, ipercromia nucleare, pseudo stratificazione citoplasma anfofilo/basofilo (vedi definizione nella sezione degli adenomi convenzionali).

La comparsa di displasia citologica si associa spesso a metilazione e conseguente perdita di espressione del gene MLH1 e comparsa di instabilità dei microsatelliti.

NB:.La presenza di displasia va sempre riportata specificandone il grado. Non sono stati fatti studi di riproducibilità sulla displasia serrata.

*Significato clinico*: E' una lesione più avanzata nella progressione verso il carcinoma rispetto al SSA/P senza displasia citologica. (Rex et al. Am J Gastroenterol 2012; 107:1315-29).

Sebbene le aree di displasia adenomatosa possano essere di basso o alto grado, il significato del grado di displasia non è stato valutato negli SSA/P. Viene raccomandato che tutti i SSA/P con qualsiasi tipo di displasia citologica convenzionale debbano essere considerati come polipi "avanzati" con il significato clinico analogo alla displasia di alto grado degli adenomi convenzionali.

**d. ADENOMA SERRATO TRADIZIONALE (TSA)**

*Caratteristiche generali*: rappresenta l'1% dei polipi colo-rettali, più frequente nel colon distale, dimensioni generalmente > 5mm, nei tratti distali (67%) aspetto endoscopico polipoide, peduncolato, spesso con aspetto a pigna, oppure sessile (33%) nei tratti prossimali.
Gli adenomi serrati tradizionali non sembrano essere correlati allo sviluppo dei carcinomi con instabilità dei microsatelliti.
*Caratteri istologici distintivi*: struttura complessa, spesso villosa con villi bulbosi e/o interconnessi. Gli adenomi serrati tradizionali mostrano una configurazione serrata diffusa e sono costituiti da epitelio colonnare alto con citoplasma eosinofilo con, spesso, aree di differenziazione a cellule caliciformi. I nuclei sono allungati, penicillati, posti centralmente e pseudo stratificati. Spesso si associa displasia citologica di tipo convenzionale o serrata. Aspetto distintivo dei TSA è la formazione di cripte ectopiche (ECF) che appaiono come protrusioni, tasche laterali, dovute allo sbilanciamento proliferativo della cripta.
Talora (4% dei TSA) si osservano villi molto lunghi (filiformi) cui spesso si associa edema della lamina propria ed erosione dell'epitelio superficiale, displasia di alto grado (22%) e talora adenocarcinoma (6%). Tale lesione è stata etichettata come Adenoma Serrato Filiforme (Yantiss et al. AJSP 2007).
*Significato clinico*: E' una lesione più avanzata nella progressione verso il carcinoma rispetto al SSA/P senza displasia citologica. (Rex et al. Am J Gastroenterol 2012; 107:1315-29). Il TSA appare più eterogeneo come profilo molecolare potendo essere sia KRAS che BRAF mutato ed avere bassi o alti livelli di CIMP. Di solito non mostra ipermetilazione di MLH1 né sviluppa MSI, ma presenta comunemente ipermetilazione del gene MGMT.

Diagnosi differenziale tra adenoma serrato sessile e adenoma serrato tradizionale

| Aspetti morfologici | Adenoma serrato sessile | Adenoma serrato tradizionale |
|---|---|---|
| Serrazione esagerata | Spesso presente | Spesso presente |
| Cripte orizzontali | Spesso presenti | Usualmente assenti |
| Dilatazione delle cripte basali | Spesso presente | Usualmente assenti |
| Architettura villosa | Assente | Spesso presente |
| Eosinofilia citoplasmatica | Focale o assente | Prominente |
| Cripte ectopiche | Assenti | Spesso presenti |

**e. POLIPI SERRATI INCLASSIFICABILI E VARIANTI PARTICOLARI**

Alcune lesioni serrate possono risultare di difficile inquadramento classificativo a causa della mancata orientazione, scarsa qualità della colorazione e/o processazione, marcati artefatti da cauterio o scarsa quantità di tessuto. In questi casi appare accettabile rendere una diagnosi di "**polipo serrato inclassificabile**". Comunque il patologo deve mettere la massima attenzione nel determinare la presenza di displasia anche se la diagnosi è difficile.
Adenomi convenzionali possono mostrare occasionalmente aree con pattern di crescita serrato. Essi vengono generalmente distinti da altri tipi di polipi serrati per l'assenza di aree con la morfologia del SSA/P o TSA. In alcuni casi il termine "adenoma convenzionale con pattern di crescita serrato" o "**adenoma tubulo villoso serrato**" di Bettington (Histophatology 2015 DOI: 10.111/his12788) è accettabile per queste lesioni che sembrano rappresentare uno dei precursori del carcinoma colorettale KRAS mutato , microsatellite stabile. Un altro studio ha identificato un gruppo di adenomi convenzionali che mostrano i criteri sopra descritti e in più presentano dilatazione cistica

delle ghiandole e brillante eosinofilia citoplasmatica (Pai et al. Am J Surg Pathol 2010; 34:355-63). Gli autori riportano che queste lesioni sono KRAS e BRAF wild e CIMP-low. In questo studio i polipi provenivano da pazienti con almeno un polipo sincrono SSA/P.
Altre varianti recentemente identificate che possono presentare un pattern serrato:
**polipo fibroblastico** del colon (Groisman et al Histopathology 48, 431-437)
**polipo fibroblastico benigno del colon** (Huber et al, Arch Pathol Lab Med. 2009;133:1872-1876).
**adenoma serrato sessile con proliferazione simil perineuriale** (Pai et al Am J Surg. Pathol 2011)

Per quanto riguarda il gruppo dei cosiddetti **polipi misti (da collisione) -** polipo iperplastico e adenoma convenzionale (TA, TVA, VA); adenoma /polipo serrato sessile (SSA/SSP) e adenoma convenzionale (TA, TVA, VA); adenoma serrato tradizionale (TSA) e adenoma convenzionale (TA, TVA, VA) - secondo WHO questa è una categoria **preferibilmente da non utilizzare** in quanto questi polipi rientrerebbero prevalentemente nella categoria delle lesioni serrate con displasia.

Talora alcune lesioni serrate, soprattutto a destra, possono presentare accanto ad aspetti tipo SSA/D aspetti tipo TSA. In questi casi appare ragionevole refertare come lesione serrata con aspetti tipo SSA/D e associata componente (%) di TSA.

## f. LA SINDROME DELLA POLIPOSI SERRATA

E' una condizione, i cui criteri di riconoscimento sono qui sotto riportati, che si associa ad un aumento significativo di prevalenza di CRC (30%), è localizzata prevalentemente nel colon prossimale (>50%) e colpisce soggetti in età inferiore rispetto al CRC sporadico (età media 48 anni).
Criteri per la diagnosi di poliposi serrata secondo WHO 2010:

- più di 5 polipi serrati prossimali al colon sigmoideo almeno due dei quali di dimensioni superiori a 10 mm
- qualsiasi numero di lesioni polipoidi serrate prossimali al sigma in soggetto con familiarità di primo grado per poliposi serrata
- più di 20 polipi serrati di qualsiasi dimensione distribuiti su tutto il tratto colico

Il suo riconoscimento è pertanto importante e il patologo deve, qualora si trovi nelle condizioni di poterlo fare, suggerirne l'ipotesi nel referto.

## RACCOMANDAZIONI PER I PATOLOGI PER LA DIAGNOSI DI SSA

- Valutare molto bene prima di fare una diagnosi di HP nel colon destro specialmente se di dimensioni maggiori di 5 mm.
- Devono essere presenti modificazioni dalle cripte basali con dilatazione, serrazione, ramificazione e/o cripte orizzontali (L, T rovesciata)
- Polipi del colon sinistro con dilatazione basilare ma senza chiara distorsione delle cripte è poco probabile siano dei SSA/P
- Le lesioni serrate del colon retto devono essere classificate istologicamente come HP, SSA/P con o senza displasia o come TSA. Clinici e patologi devono collaborare per ottenere un comune uso e comprensione della terminologia delle lesioni serrate.
- SSA/P e TSA sono lesioni precancerose. SSA/P è il principale precursore del carcinoma colorettale ipermetilato. Questo pathway occorre primariamente nel colon prossimale.
- Il SSA/P si distingue dall'HP per la presenza di distorsione delle cripte, particolarmente alla base. - **Si raccomanda che una singola cripta con inequivocabile architetturalmente distorta, dilatata e/o orizzontalmente ramificata, particolarmente se associata a maturazione inversa sia sufficiente per la diagnosi di SSA/P. La maggior parte delle lesioni serrate di dimensioni superiori a 5 mm nel colon prossimale sono SSA/P.**
- SSA/P con displasia citologica (SSAD) è una lesione più avanzata nella progressione verso

ALLEGATO C Dgr n. del pag. 19/51

il carcinoma rispetto al SSA/P senza displasia citologica.

**TERMINOLOGIA PROPOSTA IN FASE DI REFERTAZIONE E VALUTAZIONE DEI MARGINI**

**Polipo iperplastico** (opzionale la sua subcategorizzazione).
Non necessaria la valutazione del margine.

**Polipo/adenoma serrato sessile** (opzionale la dizione "senza evidente displasia citologica")
Specificare se il margine mucoso di exeresi sia sede di lesione serrata.

**Adenoma serrato sessile con displasia**.
Opzionale se specificare il tipo di displasia (serrata o convenzionale).
In caso di displasia convenzionale è raccomandata la gradazione.
Specificare se il margine mucoso di exeresi sia sede di lesione adenomatosa e l'eventuale grado di displasia sul margine.

**Adenoma serrato tradizionale.**
Valutare il grado di displasia convenzionale eventualmente presente.
Valutare lo stato del margine di exeresi mucoso.

**IMMUNOISTOCHIMICA:**
Colorazioni immunoistochimiche possono essere utili in casi selezionati nella diagnosi differenziale tra polipo iperplastico e SSA/P ma non sono ritenute raccomandabili.
Tra queste segnaliamo **Ki67** e **MUC5.**

**CODICI SNOMED SEDI TOPOGRAFICHE USATE**
cieco T-59200 T-67100 C18.0
appendice T-59200 T-66000 C18.1
colon ascendente T-59420 T-67200 C18.2
flessura epatica T-59400 T-67300 C18.3
colon trasverso T-59440 T-67400 C18.4
flessura splenica T-59450 T-67500 C18.5
colon discendente T-59450 T-67600 C18.6
colon sigmoideo T-59470 T-67700 C18.7
giunzione sigma-retto T-59670 T-68200 C19.9
retto T-59600 T-68000 C20.9
canale anale T-59900 T-69010 C21.1

**CODICE SNOMED II EDIZIONE CODICE ICD-O USATE**
Adenoma serrato tradizionale M-82130 8213/0
Adenoma serrato sessile M-82140 8213/0
Polipo giovanile M-75640
Polipo infiammatorio M-76820
Displasia di basso grado M-74006
Displasia di alto grado M-74008

Per l'inserimento delle codifiche SNOMED si rimanda al NAP

ALLEGATO C Dgr n. del pag. 20/51



BIBLIOGRAFIA


1. Bettington M. et al: Critical apparisal of the diagnosis of the sessile serrated adenoma. Am J Surg Pathol 2014;38:158-166
2. Snover DC. Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma. *Hum Pathol.* 2011; 42:1-10.
3. Rosty C. et al. Serrated polyps of the large intestine: current understanding of diagnosis, pathogenesis, and clinical management. *J Gastroenterol.* 2013; 48:287-302.
4. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology.* 2013; 50:113-130.
5. Bettington M. et al. The serrated pathway to colorectal carcinoma; current concepts and challenges. *Histopathology.* 2013; 62:367-386.
6. Leggett B., Whitehall V. Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroeneterology.* 2010; 138:2088-2100.
7. Spring KJ. et al. High prevalence of sessile serrated adenomas with BRAF mutations: a prospective study of patients undergoing colonscopy. *Gastroeneterology.* 2006; 131:1400-1407.
8. Lash RH. et al. Sessile serrated adenomas: prevalence of dysplasia and carcinoma in 2139 patients. *J Clin Pathol.* 2010; 63:681-686.
9. Carr NJ. et al. Serrated and non-serrated polyps of the colorectum: their prevalence in an unselected case series and correlation of BRAF mutation analysis with the diagnosis of sessile serrated adenoma. *J Clin Pathol.* 2009; 62:516-518.
10. Gurudu SR. et al. Sessile serrated adenomas: demographic, endoscopic and pathological characteristics. *World J Gastroenterol.* 2010; 16:3402-3405.
11. Hetzel JT. et al. Variation in the detection of serrated polyps in an average risk colorectal cancer creening cohort. *Am J Gastroenterol* 2010; 105:2656-2664.
12. Higuchi T. et al. Demographic and pathological characteristics of serrated polyps of colorectum. *Histopathology.* 2005; 47:32-40.
13. Lu FI. et al. Longitudinal outcome study of sessile serrated adenomas of the colorectum: an increased risk for subsequent right-sided colorectal carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2010; 34:927-934.
14. Mohammadi M. et al. Sessile serrated lesion and its borderline variant-variables with impact on recorded data. *Pathol Res Pract.* 2011; 207:410-416.
15. Pai RK. et al. Sessile serrated adenomas strongly predispose to synchronous serrated polyps in non-syndromic patients. *Histopathology.* 2010; 56:581-588.
16. Bosman FT, World Health Organization. *International Agency for Research on Cancer. WHO Classification of Tumors of the Digestive System.* 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2010.
17. Rex DK et al. Serrated lesions of the colorectum: review and recommendations from an expert panel. *Am J Gastroenterol.* 2012; 107:1315-1329.
18. Huang CC. et al. Prolapse-related changes are a confounding factor in misdiagnosis of sessile serrated adenomas in the rectum. *Hum Pathol.* 2013; 44:480-486.
19. Torlakovic E. et al. Morphologic reappraisal of serrated colorectal polyps. *Am J Surg Pathol.* 2003; 27:65-81.
20. Snover DC. et al. Serrated polyps of the large intestine: a morphologic and molecular review of an evolving concept. *Am J Clin Pathol.* 2005; 124:380-391.
21. Chung SM et al. Serrated polyps with "intermediate features" of sessile serrated polyp and microvesicular hyperplastic polyp: a practical approach to the classification of nondysplastic serrated polyps. *Am J Surg Pathol.* 2008; 32:407-412.
22. Aust DE, Baretton GB. Serrated polyps of the colon an rectum (hyperplastic polyps, sessile serrated adenomas, traditional serrated adenomas and mixed polyps)-proposal for diagnostic criteria. *Virchows Arch.* 2010; 457:291-297.
23. Glatz K et al. A multinational, internet-based assessment of observer varibility in the diagnosis of serrated colorectal polyps. *Am J Clin Pathol.* 2007; 127:938-945.

24. Farris AB et al. Sessile serrated adenoma: challenging discrimination from other serrated colonic polyps. *Am J Surg Pathol.* 2008; 32:30-35.
25. Lieberman DA et al. Guidelines for colonscopy surveillance after screening and polypectomy: a consensus update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 201; 43:844-857.
26. Arain MA et al. CIMP status of interval colon cancers: another piece to the puzzle. *Am J Gastroenterol.* 2010;105:1189-1195.
27. Bettington et al. Histopathology 2015 DOI: 10.111/his12788.

ALLEGATO C Dgr n. del pag. 72151

**PARTE QUARTA**
(referente dott.ssa Sara Pecori)

## ADENOMA CANCERIZZATO

Il termine di adenoma cancerizzato è riservato a quelle lesioni adenomatose in cui può essere inequivocabilmente accertata l'infiltrazione della sottomucosa attraverso il superamento completo della muscolaris mucosae da parte di tessuto neoplastico.
Quando non sia possibile dimostrare il completo superamento della muscolaris mucosae la lesione deve essere diagnosticata come adenoma.
E' la forma più precoce di carcinoma colorettale (pT1 sec. TNM), dotata di potenziale metastatico linfonodale, potenziale metastatico ematogeno, ricorrenza loco-regionale e mortalità. Questi sono variamente associati in letteratura a 5 parametri istologici classicamente riconosciuti la cui valutazione è determinante nella definizione del rischio di progressione:

a. Grado di differenziazione
b. Invasione linfo-vascolare
c. Budding tumorale
d. Infiltrazione del margine di resezione
e. Microstadiazione

L'evidenza di una lesione con grado di differenziazione scarso e/o con invasione linfovascolare e/o con budding tumorale di alto grado e/o con infiltrazione del margine di resezione e/o con parametri svaforevoli di microstadiazione (spessore di infiltrazione maggiore di 2 mm, livello IV di infiltrazione del peduncolo secondo Haggitt e livello II e III di infiltrazione della sottomucosa secondo Kikuchi) identificano una neoplasia con maggior rischio di metastasi linfonodale e/o ricorrenza locale.
Il peso relativo di ciascuno di questi parametri nella definizione del rischio varia a seconda degli studi. Proponiamo una breve disamina per la loro definizione

**a. Grado istologico di differenziazione del carcinoma (G1 e G2 –basso grado vs G3 e G4 - alto grado).**

Il grado istologico deve essere valutato in accordo con il sistema utilizzato nel carcinoma avanzato (WHO 2010) del colon-retto che distingue due gruppi: Basso Grado (bene-moderatamente differenziato) e Alto Grado (scarsamente differenziato, anaplastico)

Il *carcinoma scarsamente differenziato* viene definito dalla presenza di tubuli affollati distorti e spesso piccoli, fino dall'assenza di formazione di ghiandole, che mostrano marcato pleomorfismo citologico. Il pattern cribriforme viene in genere associato alle forme di alto grado.
L'attuale classificazione WHO (2010) stratifica solo in base alla percentuale di differenziazione ghiandolare (componente ghiandolare > 50% basso grado, < 50% o meno alto grado) oppure in G1, G2, G3 e G4 che mostrano strutture ghiandolari in più del >95% (G1), comprese tra 50% a 95% (G2), comprese tra 5% a 50% (G3), in meno del <5% (G4) del tumore, rispettivamente dove G1/G2 equivalgono a basso grado e G3/G4 ad alto grado.

➢ ***Indicazioni utili nella valutazione del grading***

- La valutazione del grado si basa sul corretto riconoscimento della zona peggiore, indipendentemente dalla sua estensione.
- La presenza di componente anaplastica, anche minima, deve essere identificata in quanto la sua presenza è strettamente correlata con il rischio di metastasi linfonodali.
- Il carcinoma con cellule ad anello con castone deve essere classificato come scarsamente differenziato.

ALLEGATO C Dgr n. del pag. 23/81

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

- Il budding tumorale al fronte di invasione non deve influenzare il grading e deve essere valutato separatamente.

**b. Embolizzazione neoplastica (linfatica o venosa)**
**Presente**
**Non evidente** (quando non identificabile con ragionevole sicurezza).

Può essere utile ricorrere all'utilizzo di metodiche immunoistochimiche (CD31, CD34, D2-40) per discriminare taluni aspetti artefattuali che talora simulano l'invasione vascolare vera. Ciò appare particolarmente indicato nei casi in cui questo parametro rappresenti l'unico criterio negativo nella determinazione del rischio.

**c. Stato del margine di resezione**
***Infiltrato*** (positivo) quando si identifichino cellule di carcinoma a 1 mm o meno dal margine, o entro la banda di diatermocoagulazione (anche nel caso che il suo spessore sia superiore ad 1 mm).
***Indenne*** (negativo) quando la distanza dal margine sia superiore a 1 mm.

E' preferibile indicare la distanza precisa misurata su sezione istologica della distanza della neoplasia dal margine.

In caso di mucosectomia o TEM deve essere riportato anche lo stato del margine di resezione laterale indicando se libero o interessato da infiltrazione adenocarcinomatosa o tessuto adenomatoso

**d. Budding tumorale**
Descrive la presenza di cellule di carcinoma isolate o disposte in gruppi di meno di 5 elementi nello stroma del margine di avanzamento tumorale:
Dopo aver selezionato il campo dove il budding è maggiore va eseguita una conta in un campo che misuri 0,785 $mm^2$ a 20X. In base al numero di focolai il budding viene definito:
- Budding peritumorale assente (< 5 focolai) *
- Budding peritumorale presente di basso grado (< 9 focolai)
- Budding tumorale presente di alto grado (≥10 focolai) **

* Score di riferimento: < 5 foci = negativo ≥5 foci = positivo (Ueno, 2004)
** Score di riferimento: 0-9 foci = basso grado; ≥10 foci = alto grado (Ueno, 2002)

Altra modalità contemplata per la gradazione del Budding secondo "Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) 2015" è la seguente:
- Grado 1: da 0 a 4 focolai
- Grado 2: da 5 a 9 focolai
- Grado 3: 10 o più focolai

Il significato è analogo a quello precedente ritenendosi positivo ai fini della determinazione del rischio solo il grado 2 e 3 (5 o più focolai).

Nella determinazione del Budding può essere di ausilio una colorazione imunoistochimica per citocheratine ad ampio spettro, ma non è raccomandata.
Si ritiene che debba essere valutato solo il budding cosidetto desmoplastico e non quello cosidetto infiammatorio.

**La presenza di almeno uno dei parametri istologici 1-4 caratterizza l'adenoma cancerizzato ad ALTO RISCHIO di progressione neoplastica.**
Questa affermazione è ripresa anche nel documento delle linee guida AIOM 2015 che recita: La presenza di anche uno solo dei parametri di rischio indica un alto potenziale metastatico della lesione e costituisce indicazione al trattamento chirurgico." (AIOM 2015)

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

**e. Microstadiazione**

La microstadiazione rappresenta la valutazione dell'estensione dell'infiltrazione della componente neoplastica nella sottomucosa. E' importante perché consente di evidenziare, nell'ambito delle lesioni a basso rischio (assenza di tutti i parametri istologici 1-4), un sottogruppo di adenomi cancerizzati (profondità inferiore ai 500 µm, ampiezza inferiore ai 4000 µm) in cui il potenziale metastatico linfonodale è prossimo allo zero (rischio bassissimo) e a stratificare per livelli successivi (fino a 1000 µm, tra 1000 e 2000 µm, oltre 2000 µm) gradi di rischio di metastasi linfonodale progressivamente maggiori. L'integrazione del dato della Microstadiazione (profondità di infiltrazione o livelli di infiltrazione secondo Haggitt e Kikuchi) con i parametri di rischio precedentemente elencati determina una stratificazione del rischio in più gradi (da 4 a 5) come riportato negli schemi successivi.

*I. Livello di infiltrazione della sottomucosa*

- per le **lesioni peduncolate**, quando possibile - cioè in presenza di peduncolo completo -, vanno utilizzati i **livelli di Haggitt** (il livello IV di infiltrazione secondo Haggitt si associa ad alto rischio)
- per le **lesioni sessili**, quando possibile, cioè in presenza dei fasci superficiali della muscolare propria (evento raro in corso di polipectomia endoscopica) vanno utilizzati i **livelli di Kikuchi** (i livelli II e III si associano ad alto rischio).

*II. Misura della profondità e dell'ampiezza di infiltrazione*

In aggiunta o in alternativa, quando questi due metodi non possono realisticamente essere applicati, la lesione deve essere misurata secondo l'asse verticale (profondità) e quello orizzontale (ampiezza).

➢ Metodo di misura

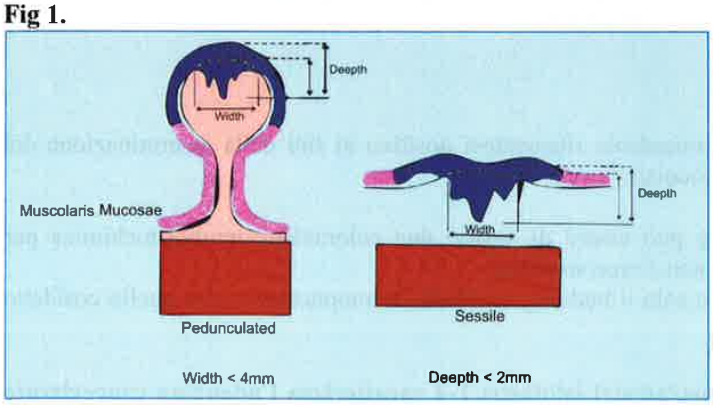
- l'ampiezza massima va misurata nella componente infiltrante;
- la profondità di invasione va misurata a partire dalla muscolaris mucosae.

  Quando è possibile identificare la localizzazione della muscolaris mucosae la profondità di invasione va misurata dal bordo inferiore della stessa.

  Quando la muscolaris mucosae non è completamente visibile, può essere effettuata la sua stima tracciando una linea virtuale da dove si interrompe a dove diventa nuovamente identificabile.

  Nel caso la lesione sia centralmente depressa ed ulcerata, la misura va effettuata a partire dalla superficie.

**Fig 1.**




*III. Rapporto percentuale tessuto adenomatoso/adenocarcinoma:*

Valutazione quantitativa del rapporto percentuale tra tessuto adenomatoso e carcinomatoso.

Si ritiene che le lesioni in cui la componente adenocarcinomatosa rappresenti più dell'80% del

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

volume del polipo abbiano un potenziale di rischio maggiore, ma tale dato non ha valore indipendente in analisi multivariata.

Nel caso in cui la lesione sia pressoché completamente costituita da tessuto adenocarcinomatoso si può usare la dizione di "adenocarcinoma polipoide".

**Per la valutazione dei vari parametri si raccomanda l'esecuzione di sezioni istologiche a differenti livelli.**

## IL REPORT DIAGNOSTICO

La finalità del report istologico nell'adenoma cancerizzato è pertanto quella di fornire gli elementi che ne possano consentire la determinazione del rischio di progressione locale e metastatica, dato fondamentale nella programmazione delle successive scelte terapeutiche (resezione chirurgica versus follow-up clinico-endoscopico). Pur consapevoli dell'oggettiva difficoltà della loro precisa identificazione e del fatto che il peso relativo di ciascuno di essi e gli intervalli di significatività variano a seconda degli studi, gli autori del presente documento hanno convenuto che **sia fortemente raccomandata l'esplicitazione dei seguenti dati**:

- grado di differenziazione del carcinoma (G1-G2 vs G3-G4)
- presenza o assenza di invasione linfovascolare
- alutazione del "budding" tumorale (assente o presente; basso vs alto grado)
- livelli di Haggitt o Kikuchi (quando possibile)
- spessore massimo di infiltrazione
- ampiezza del fronte invasivo
- rapporto tra componente adenomatosa e adenocarcinomatosa
- stato del margine di resezione endoscopica (cellule carcinomatose a meno di 1 mm e/o comprese nella banda di diatermocoagulazione)

Non è stato ritenuto di raccomandare l'esplicitazione diretta della valutazione del rischio di progressione locale e/o metastatica, essendo questa ricavabile dai dati forniti nel report.

In accordo con le linee guida europee, inoltre, **il gruppo di lavoro ritiene che**:

- per la valutazione dei vari parametri è raccomandata l'esecuzione di sezioni istologiche a differenti livelli.
- la diagnosi di adenoma cancerizzato deve essere condivisa con un secondo patologo, preferibilmente di altra sede, con esperienza in patologia gastrointestinale
- è fortemente raccomandato che i casi di adenoma cancerizzato vengano discussi in gruppi multidisciplinari.
- è appropriato predisporre audit periodici all'interno dei gruppi multidisciplinari

ALLEGATO C Dgr n. del pag. 26 | 51

REGIONE DEL VENETO Giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE SANITARIA PROGRAMMAZIONE

## TABELLE PER LA DEFINIZIONE DEL RISCHIO TRATTE DALLA LETTERATURA

**Percentuale (valutazione) di rischio di diffusione metastatica linfonodale:**
Minimo rischio: assenza di parametri istologici qualitativi di alto rischio e la minima (< 500 µm Ueno 2004; < 1000 µm Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum -JSCCR- 2015) profondità di infiltrazione neoplastica della sottomucosa definiscono la lesione come adenoma cancerizzato a minimo rischio (0,7-5%).
Rischio basso di diffusione metastatica: >500 µm ma < 2000 µm di profondità di infiltrazione in assenza parametri qualitativi (8-10%)
Rischio intermedio: >500 µm ma < 2000 µm di profondità di infiltrazione con uno o più parametri qualitativi (10%-20%)
Alto rischio > 2000 µm di profondità di infiltrazione con uno o più parametri qualitativi (20-40%)

Le linee guida giapponesi 2015 (JSCCR) indicano come parametro per la sola resezione endoscopica 1000 µm ma non tutti sono concordi.

La consensus conference della Società Europea di Colo Proctologia indica che al momento attuale un range di infiltrazione della sottomucosa confinato tra 500 e 1000 µm sia legato ad un minimo o nullo rischio di metastasi linfonodali.
Va ribadito, peraltro, che il livello di infiltrazione preciso corrispondente alla "soglia N0" per "Early Rectal Cancer" non è ancora stato stabilito.

**2013 The Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland. 15 (Suppl. 2), 1–38**

ACPGBI Position Statement — *J. G. Williams* et al.

**Table 17** (a) Scoring the risk of residual disease following resection of a malignant polyp. (b) Risk stratification based on sum of risk factors.

| (a) Criteria | Degree of Risk |
|---|---|
| Resection Margin < 1 mm | ++++ |
| Resection Margin 1–2 mm | + |
| Pedunculated Haggitt level 4 | ++++ |
| Sessile: Kukuchi 2 | ++ |
| Sessile: Kukuchi 3 | ++++ |
| Poor differentiation | +++ |
| Mucinous tumour | + |
| Tumour budding | + |
| Lympho-vascular invasion | ++ |

| (b) Total score | Grade of Risk | Current estimate of potential % risk of residual cancer | Recommended course of action to be discussed with patient |
|---|---|---|---|
| 0 | Very Low | < 3% | Routine Follow up |
| + | Low | < 5% | Assess other factors<br>Careful follow up |
| ++ | Medium | 5–10% | Discussion of risks/benefit of surgery<br>or follow up with patient |
| +++ | High | 8–15% | Discuss risks with patient – err towards surgery |
| ++++ (or more) | Very high | > 20% | Recommend surgery unless patient unfit |

Criteria are based on histological description of endoscopically resected malignant polyp weighted for prognostic significance of each risk factor. Where more than one risk factor is present, the degree of risk is added together to give a total risk score.

ALLEGATO C Dgr n. del pag. 27 / 51

REGIONE DEL VENETO Giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

**Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) Guidelines 2014 for treatment of colorectal cancer. Int J Clin Oncol 2015**

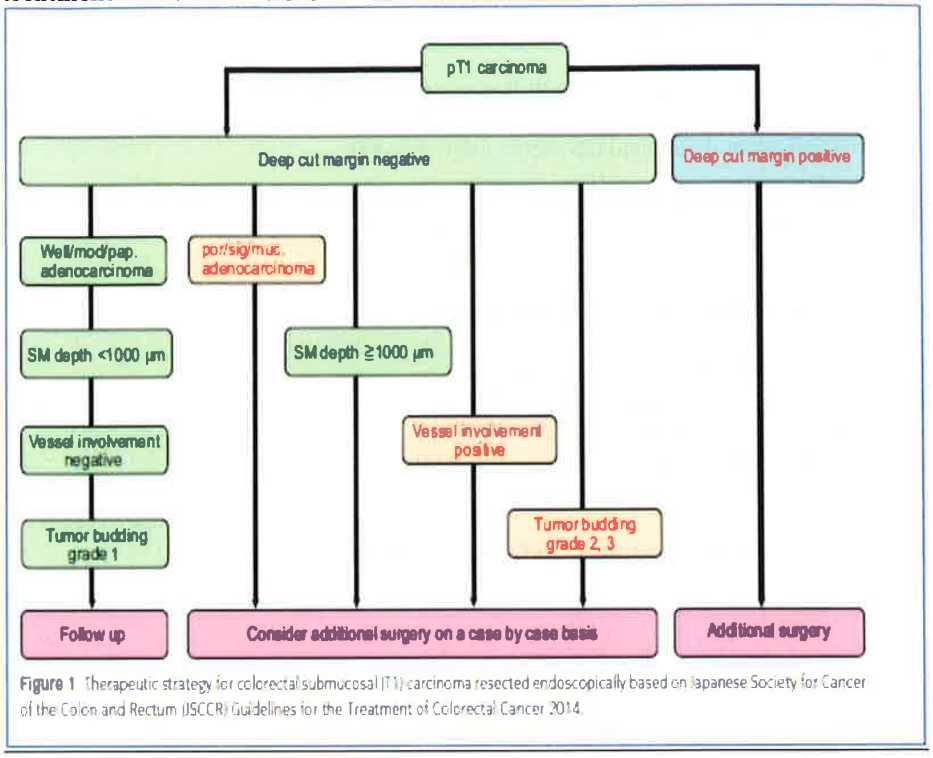



Figure 1 Therapeutic strategy for colorectal submucosal (T1) carcinoma resected endoscopically based on Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) Guidelines for the Treatment of Colorectal Cancer 2014.

**ADENOMA CANCERIZZATO: SCHEMA DI REFERTAZIONE**

- Adenocarcinoma in adenoma (adenoma cancerizzato) (pT1)
- Componente adenomatosa tubulare /tubulo-villosa/villosa con displasia di alto grado dell'epitelio
  - Componente adenocarcinomatosa:
  - Grado di differenziazione bene/moderatamente (basso grado) / scarsamente (alto grado) differenziata (sec. WHO 2010)
  - Embolizzazione neoplastica (linfatica/venosa) presente/assente
  - Budding peritumorale assente (< 5 focolai a 20x) */ presente, basso grado (<9 focolai a 20x)/alto grado(≥10 focolai a 20x) **
- Microstadiazione (rapporto quantitativo tessuto adenomatoso/adenocarcinoma):
  - Livello di infiltrazione del peduncolo sec. **Haggitt** (peduncolati):
    - non valutabile
    - infiltrazione limitata alla testa del polipo (livello 1)
    - infiltrazione al passaggio testa-peduncolo (livello 2)
    - infiltrazione del peduncolo (livello 3)
    - infiltrazione della sottomucosa sotto il peduncolo (livello 4)
  - Livello di infiltrazione della sottomucosa sec. **Kikuchi** (sessili):
    - non valutabile
    - lieve infiltrazione della sottomucosa (200-300 μm) sm1
    - infiltrazione della sottomucosa intermedio sm2
    - infiltrazione della sottomucosa sino in prossimità della tonaca muscolare propria

(sm3)

- Misurazione micrometrica
  - diametro massimo trasversale (ampiezza) della componente adenocarcinomatosa: mm o µm
  - diametro massimo verticale (profondità) della componente adenocarcinomatosa: mm o µm
- Stato del margine di resezione:
  - indenne
  - la neoplasia coinvolge il margine di resezione endoscopico: (ghiandole adenocarcinomatose sono presenti in corrispondenza del margine di resezione/ < mm 1 dal margine di resezione/ in corrispondenza della banda di elettrofolgorazione)

*Score di riferimento: < 5 foci = negativo ≥5 foci = positivo (Ueno, 2004)
**Score di riferimento: 0-9 foci = basso grado; ≥10 foci = alto grado (Ueno, 2002)

**Il caso verrà discusso in riunione multidisciplinare**

CODICE SNOMED UTILIZZATI FINORA

| | |
|---|---|
| adenocarcinoma in adenoma tubulo villoso | M82633 |
| adenocarcinoma in adenoma tubulo villoso | M82613 |
| adenocarcinoma in adenomatous polyp | ICD8210/3 |

Per l'inserimento delle codifiche SNOMED si rimanda al NAP

ALLEGATO C Dgr n. del pag. 29/51

BIBLIOGRAFIA:


1. Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P. Carcinoma of the colon and rectum. In: Bosman T, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, editors. WHO classification of tumors of the digestive system. Lyon: IARC Press; 2010. p. 138-9.
2. Quirke P, Risio M, Lambert R, et al. Quality assurance in pathology in colorectal cancer screening and diagnosis-European reccomendations. Virchows Arch 2011; 458 (1): 1–19
3. Vieth M, Quirke P, Lambert R, et al. Annex to Quirke et al. Quality assurance in pathology in colorectal cancer screening and diagnosis: annotations of colorectal lesions. Virchows Arch 2011; 458 (1):21-30
4. Watananbe T Michio Itabashi · Yasuhiro Shimada et al. Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) Guidelines 2014 for treatment of colorectal cancer. Int J Clin Oncol 2015; 20:207–239
5. Protocollo diagnostico terapeutico dello screening per la diagnosi precoce del tumore del colon-retto. Emilia Romagna. II edizione – Anno 2012
6. Hassan C, Zullo A, Risio M et al. Histologic Risk Factors and Clinical
7. Outcome in Colorectal Malignant Polyp:A Pooled-Data Analysis. Dis Colon Rectum 2005; 48: 1588–96.
8. Williams JG, Pullan RD, Hill J et al. Management of the malignant colorectal polyps: ACPGBI position statement.
9. Colorectal Dis 2013; 15 (Suppl 2): 1–38.
10. Ueno H, Mochizuki H, Hashiguchi Y et al. Risk factors for an adverse outcome in early invasive colorectal carcinoma.
11. Gastroenterology 2004; 127: 385–94.
12. Ueno H, Murphy J, Jass JR, Mochizuki H, Talbot I. Tumor budding as index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. Histopathol 2002; 40:127–32.
13. Linee Guida AIOM edizione 2015: Tumori del colon retto
14. Morino M • Risio M • Bach S et al. Early rectal cancer: the European Association for Endoscopic
15. Surgery (EAES) clinical consensus conference. Surg Endosc 2015; 29:755–773

ALLEGATO C Dgr n. del pag. 30/51




**PARTE QUINTA**
(referenti dott. Romano Colombari e dott.ssa Maria Lunardi)

# IL CAMPIONE OPERATORIO DI RESEZIONE COLORETTALE

La completezza e l'accuratezza del referto relativo alle resezioni chirurgiche del carcinoma del colon-retto (CCR) sono i requisiti basilari per determinare la prognosi e per pianificare il trattamento individuale dei pazienti.
Vi è la forte evidenza che l'utilizzo di check-list, sia per la descrizione macroscopica dei campioni pervenuti che per la refertazione, favorisca la standardizzazione del processo diagnostico.
Ad oggi l'utilizzo di check-list strutturate come tali non può essere considerato come un passaggio assolutamente indispensabile in virtù della diversità dei vari sistemi gestionali informatici; ciò che importa, tuttavia, è che, soprattutto all'interno di un programma di screening, i referti diagnostici prodotti nelle varie sedi siano quanto più possibile uniformi e contengano tutte le informazioni ritenute necessarie, indipendentemente dalla formattazione delle stesse.
Sono riportate di seguito le indicazioni generali per l'invio, la descrizione macroscopica e il campionamento dei pezzi operatori e successivamente per la valutazione dei parametri patologici minimi che devono essere specificati nel referto.

## a. Richiesta di esame istologico

La richiesta di esame istologico deve contenere, oltre ai dati identificativi del paziente e della Struttura inviante, la data e l'ora del prelievo, la sede della neoplasia, il tipo di intervento effettuato e la modalità di invio del campione.
Il medico richiedente dovrebbe, inoltre, allegare la precedente diagnosi su materiale bioptico (se effettuata in altra Sede), specificare se la neoplasia sia screening-detected e/o se il paziente abbia storia di malattie infiammatorie croniche intestinali o di carcinoma familiare.
Il patologo dovrebbe essere messo a conoscenza della stadiazione pre-operatoria (cTNM).
Nella richiesta deve essere indicato necessariamente se sia stata effettuata o meno terapia neoadiuvante (eventuale tipo di trattamento e durata).

## b. Descrizione Macroscopica

La descrizione macroscopica dovrebbe comprendere: la modalità di invio del campione, il tipo di intervento effettuato, la descrizione e misurazione del pezzo operatorio, la descrizione del tumore e dei linfonodi regionali e la descrizione del colon non neoplastico.

ALLEGATO C Dgr n. del pag. 31/51




| | | | |
|---|---|---|---|
| Modalità di invio | a fresco/ in liquido fissativo (formalina tamponata 10%) | | |
| | pervenuto chiuso/aperto | | |
| | presenza di eventuali reperi posti dal chirurgo | | |
| | *Il pezzo operatorio a fresco dovrà pervenire in Anatomia Patologica entro un'ora (tempo di ischemia fredda); il tempo di ischemia fredda può essere molto più lungo, senza conseguenze, qualora vengano utilizzati sistemi di conservazione sotto-vuoto; si consiglia di non campionare il pezzo operatorio prima che non siano trascorse almeno 24-48 ore di fissazione in adeguato volume di formalina.* | | |
| Tipo di intervento | emicolectomia destra | | |
| | resezione del colon trasverso/emicolectomia destra allargata | | |
| | emicolectomia sinistra | | |
| | sigmoidectomia | | |
| | Resezione anteriore del sigma-retto (RA)* | | |
| | Resezione addomino-perineale (APE)* | | |
| | colectomia totale o subtotale | | |
| | altro (specificare) | | |
| Descrizione Campione | identificazione e misurazione del tratto di colon inviato e di altre strutture /organi presenti (ileo, appendice ciecale, canale anale e cute, omento, tuba uterina, ovaio, utero-vescica..). | | |
| | Sierosa: liscia e lucente, retratta, infiltrata dalla neoplasia | | |
| Descrizione del tumore | Sede del tumore | è generalmente indicata dal clinico nella richiesta; il patologo deve specificare la distanza rispetto ai reperi anatomici identificabili (valvola ileo-ciecale, riflessione peritoneale in RA, linea dentata in APE). *La riflessione peritoneale costituisce il repere macroscopico cruciale per la classificazione dei carcinomi rettali. Questa viene identificata sulla superficie esterna della porzione anteriore del campione. I carcinomi rettali posti interamente al di sotto della riflessione peritoneale presentano la più alta percentuale di recidiva locale* (ALLEGATO 1). | |
| | Caratteri macroscopici | polipoide | |
| | | vegetante | |
| | | a placca | |
| | | stenosante (anulare) | |
| | | ulcerato | |
| | | diffusamente infiltrativo (tipo linite plastica) | |
| | Dimensioni del Tumore | Diametro maggiore | |
| | Livello macroscopico di infiltrazione della parete e delle strutture eventualmente asportate | | |
| | Perforazione tumorale | SI/NO *Fattore prognostico sfavorevole* | |
| | Distanza dal margine | Distale/prossimale (dal più vicino) | |
| | | circonferenziale (radiale) non peritonealizzato | |
| | | mesocolico (distanza dalla radice vascolare del meso) *facoltativo* | |
| Piano di escissione meso-rettale (in RA) | Se ne consiglia la valutazione a fresco con eventuale documentazione fotografica secondo la seguente classificazione: fascia mesorettale, piano intramesorettale, piano della tonaca muscolare propria (sec. Nagtegaal 2002 e 2014). *Trials clinici hanno dimostrato come la valutazione macroscopica del piano di escissione meso-rettale possa essere predittiva di positività del margine circonferenziale e di recidiva locale (indicatore di qualità).* (ALLEGATO 2) | | |
| Piano di escissione sfinteriale (in APE) | *Tale area intorno al canale anale necessita di essere valutata separatamente* (sec. Nagtegaal 2002 e 2014). | | |
| Linfonodi | numero | | |
| | dimensioni *(facoltativo)* | | |
| | aspetto *(facoltativo)* | | |
| Colon non neoplastico | presenza di polipi | sede | |
| | | numero | |
| | | dimensioni | |
| | Presenza di altri processi patologici | ulcera, diverticoli, IBD, … | |

| | | |
|---|---|---|
| Omento | Noduli metastatici | numero |
| | | dimensioni |

** Le diverse tipologie di intervento per i carcinomi rettali dipendono dalla localizzazione del tumore e dalla profondità di invasione. In casi selezionati la TEM (Transanal Endoscopic Microsurgery) è una possibile opzione terapeutica per tumori in fase iniziale in assenza di metastasi linfonodali.*

**c. Procedura di campionamento**

Il pezzo operatorio va aperto e lavato evitando se possibile di sezionare la neoplasia, identificandola palpatoriamente. Può essere utile la marcatura dei margini di resezione con inchiostro di china. Si raccomanda di eseguire sempre la procedura di marcatura per la valutazione del margine circonferenziale nei carcinomi rettali.

I prelievi elencati rappresentano il campionamento minimo raccomandato.

| | |
|---|---|
| Neoplasia | Devono essere effettuati almeno 4-5 prelievi di tumore rappresentativi del punto di massima infiltrazione, della sierosa, dell'invasione delle vene extramurali (estensione neoplastica ad angolo retto rispetto alla tonaca muscolare), il coinvolgimento di organi adiacenti (se presenti) e la transizione tumore/mucosa (per documentare il possibile residuo adenomatoso).<br>Per permettere ciò, la neoplasia dovrà essere interamente sezionata con sezioni trasversali a intervalli di 3-4 mm.<br>Alcuni carcinomi rettali sottoposti a terapia pre-operatoria neoadiuvante vanno incontro a regressione e non presentano residuo tumorale macroscopicamente evidente; in tali casi tutta l'area cicatriziale dovrà essere esaminata istologicamente e in assenza di residuo microscopico dovranno essere effettuati almeno 3 livelli per blocchetto. |
| Mucosa normale | Effettuare un prelievo di mucosa apparentemente indenne |
| Margini | **Margine circonferenziale**: nel retto è necessario effettuare almeno un prelievo che comprenda la zona in cui il tumore (massa/noduli) giunga vicino a tale margine, prestando particolare attenzione al margine anteriore.<br>Non c'e uniformità per quanto riguarda la valutazione e l'inserimento nel report del margine circonferenziale nei segmenti colici non completamente peritonealizzati (colon ascendente e discendente); in tali segmenti si raccomanda comunque di eseguire almeno un prelievo quando il tumore sia vicino a tale margine. |
| | **Margini prossimale e distale**: da campionare se la distanza macroscopica del tumore da uno dei margini sia inferiore a 30 mm. |
| Altre lesioni | Polipi, diverticoli ed eventuali anomalie mucose macroscopicamente apprezzabili |
| | nel colon destro si consiglia di effettuare un prelievo di appendice se presente |
| Linfonodi | Tutti i linfonodi identificati dovranno essere esaminati in toto, sezionando lungo l'asse maggiore i linfonodi delle dimensioni $\geq$ 4 mm. Se possibile sarebbe opportuno tenere separato il linfonodo apicale. |

**d. Diagnosi Isto-patologica**

Il referto anatomo-patologico definitivo deve contenere tutte le informazioni diagnostiche e prognostico predittive necessarie per l'impostazione dei più adeguati protocolli terapeutici.

| | |
|---|---|
| Istotipo (WHO 2010) | Adenocarcinoma, NOS<br>Adenocarcinoma mucinoso: componente mucoide >50%<br>Carcinoma a cellule ad anello con castone: componente a cellule a anello con castone >50%<br>Carcinoma midollare<br>Adenocarcinoma serrato<br>Adenocarcinoma cribriforme tipo comedo-like<br>Adenocarcinoma micropapillare |

ALLEGATO C Dgr n. del pag. 33/51

| | |
|---|---|
| | Carcinoma adenosquamoso<br>Carcinoma squamoso<br>Carcinoma neuroendocrino di alto grado<br>Altro<br>*La grande maggioranza dei carcinomi colo-rettali sono adenocarcinomi NOS (85%), il 10% sono adenocarcinomi mucinosi; altri istotipi sono rari.*<br>*Sebbene la definizione dell'istotipo non abbia in generale una grande valenza prognostica, alcuni istotipi presentano peculiari caratteristiche clinico patologiche e molecolari, che ne rendono importante la corretta identificazione. Il carcinoma midollare, ad esempio, è associato a instabilità microsatellitare con prognosi relativamente favorevole; il carcinoma a cellule ad anello con castone, al contrario, ha una prognosi sfavorevole indipendente dallo stadio.*<br>*La prognosi dell'adenocarcinoma mucinoso rimane controversa, almeno in parte legata al pathway molecolare (in particolare status MSI). Bisogna ricordare come la terapia pre-operatoria neoadiuvante possa indurre un fenotipo mucinoso.*<br>*Recentemente è stato descritto anche nel colon, in analogia con altri organi, il raro istotipo micropapillare: si tratta di una variante aggressiva di adenocarcinoma, che si associa a un'alta incidenza di invasione linfovascolare, di metastasi linfonodali e ad una ridotta sopravvivenza. Alcuni Autori evidenziano l'importanza di segnalare nel referto anche la presenza di una componente micropapillare all'interno di un adenocarcinoma NOS, perché quest'ultima potrebbe avere impatto prognostico.* |
| Grado di differenziazione | Adenocarcinoma NOS è tradizionalmente graduato in base all'architettura e specificatamente in base alla formazione di ghiandole/tubuli.<br>Per favorire una migliore riproducibilità è preferibile utilizzare la suddivisione in due sole classi (WHO 2010):<br>• basso grado (bene/moderatamente differenziato, G1-G2)<br>• alto grado (scarsamente differenziato/indifferenziato, G3-G4)<br>I carcinomi di alto grado mostrano formazione ghiandolare <50% (assenza di formazione ghiandolare/formazione di piccoli tubuli distorti e irregolari).<br>I carcinomi del CCR sono talora eterogenei; il tumore deve essere classificato in base alle caratteristiche dell'area peggiore, cioè con il minor grado di differenziazione se questa è la predominante, escludendo le aree di dedifferenziazione presenti sul margine di infiltrazione (tumor budding).<br>*Il grado di differenziazione è una variabile prognostica indipendente dallo stadio, con una prognosi significativamente peggiore per i tumori alto grado, in particolare dopo stratificazione delle neoplasie in base allo status MSI (instabilità microsatellitare).* |
| Caratteristiche suggestive di MSI (facoltativo) | • infiltrato linfocitario intratumorale (assente/lieve-moderato/marcato)<br>• infiltrato linfocitario peritumorale Crohn-like (assente/lieve moderato/marcato) |
| Livello di infiltrazione | Valutato secondo la classificazione TNM (VII edizione, 2009):<br>• non evidenza di tumore primario<br>• infiltrazione della sottomucosa (pT1)<br>• infiltrazione della tonaca muscolare (pT2)<br>• infiltrazione a tutto spessore della tonaca muscolare ed invasione della sottosierosa o del tessuto adiposo pericolico o perirettale non rivestito da sierosa (pT3)<br>• infiltrazione della sierosa (pT4a)<br>• infiltrazione di altri organi o strutture (pT4b)<br>La misurazione microscopica dell'estensione dell'infiltrazione del tessuto adiposo (pT3a<1mm, pT3b:1-5 mm, pT3c: 5-15 mm, pT3d: >15mm) viene considerata facoltativa.<br>*Il patologo deve valutare con attenzione l'infiltrazione della sierosa peritoneale (indicatore di qualità); l'utilizzo di colorazioni speciali per fibre elastiche rimane controverso.*<br>*La presenza di fattori prognostici sfavorevoli (infiltrazione della sierosa, alto grado, chirurgia d'urgenza, perforazione tumorale, invasione delle vene extramurali, <10 linfonodi esaminati) costituisce indicazione alla terapia adiuvante in pazienti in stadio II (stadio II high risk).* |
| Fronte di avanzamento (facoltativo) | • espansivo<br>• infiltrativo |
| Tumor budding | Gli score di riferimento sono due: |

| | | |
|---|---|---|
| (facoltativo) | a) <5 foci = negativo; ≥ 5 foci = positivo (Ueno 2004) valutati su n. 1 campo a 200X<br>b) 0-9 foci = basso grado; ; ≥ 10 foci = alto grado (Ueno 2002) valutati su n. 1 campo a 250X | |
| Invasione delle vene extramurali | presente<br>assente/indeterminata<br>*Fattore prognostico sfavorevole (indicatore di qualità); si sottolinea come l'utilizzo di colorazioni speciali per fibre elastiche sia di ausilio nell'identificazione di tale parametro* | |
| Invasione endolinfatica | presente<br>assente/indeterminata | |
| Invasione perineurale | presente<br>assente/indeterminata | |
| Margini prossimale/ distale | Se non esaminati perché il tumore è distante >30 mm, si assume che questi siano negativi. *In RA la distanza minima proposta dal margine distale non dovrebbe essere inferiore a cm 1; un recente lavoro suggerisce tuttavia come in tale situazione si potrebbe verificare una sottostadiazione linfonodale* | non valutabile<br>indenne (specificare distanza)<br>coinvolto da carcinoma<br>asivo<br>displasia presente (basso o alto<br>do) |
| Margine Circonferenziale/ Margine mesenteriale *(facolt.)* | Tale margine è considerato positivo per valori inferiori a 1 mm<br>*Il patologo dovrà considerate il margine positivo sia per la diretta infiltrazione tumorale sia per la presenza di noduli metastatici. Tale dato deve essere specificato nel referto. (indicatore di qualità)* (ALLEGATO 3) | non valutabile<br>indenne (nel retto la distanza<br>sempre riportata nel referto)<br>coinvolto da carcinoma<br>asivo |
| Risposta alla terapia neoadiuvante | La terapia pre-operatoria induce nel carcinoma rettale una serie di alterazioni, tra cui la regressione tumorale ed il downstaging.<br>Si propone che la valutazione del grado di regressione sul tumore primitivo venga effettuata secondo il sistema di Ryan et al. (2005):<br>assenza di cellule tumorali vitali (grado 0, risposta completa);<br>presenza di cellule tumorali singole o in piccoli gruppi (grado 1, risposta moderata)<br>prevalenza di fibrosi sulla neoplasia residua (grado 2, risposta minima)<br>regressione tumorale minima o assente (grado 3, risposta assente).<br>Dopo terapia pre-operatoria solo la presenza di cellule tumorali deve essere valutata dal patologo per determinare lo stadio senza considerare fibrosi, necrosi e laghi di muco acellulari.<br>*I carcinomi rettali con regressione tumorale completa o quasi completa hanno una prognosi più favorevole.* | |
| Linfonodi regionali | Valutato secondo la classificazione TNM (VII edizione, 2009):<br>pN0 assenza di metastasi linfonodali<br>pN1 metastasi in 1-3 linfonodi regionali<br>- pN1a metastasi in 1 linfonodo<br>- pN1b metastasi in 2-3 linfonodi<br>- pN1c presenza di depositi tumorali (noduli satelliti) nel tessuto adiposo pericolico o perirettale in assenza di metastasi linfonodali.<br>pN2 metastasi in 4 o più linfonodi regionali<br>1. pN2a metastasi in 4-6 linfonodi<br>2. pN2b metastasi in 7 o più linfonodi<br>Il numero dei linfonodi metastatici e il numero dei linfonodi totali esaminati devono sempre essere riportati nel referto.<br>*Lo stato linfonodale è un fattore prognostico fondamentale; la presenza di metastasi linfonodali costituisce l'indicazione principale alla terapia adiuvante. Nel pezzo operatorio devono essere valutati almeno 12 linfonodi locoregionali. Il numero medio dei linfonodi esaminati non dovrebbe essere inferiore a 12-15 (indicatore di qualità).*<br>*Attualmente non si raccomanda di eseguire di routine più livelli sui blocchetti di linfonodi né di utilizzare di routine determinazioni immunoistochimiche per citocheratine, in quanto non c'è sufficiente evidenza circa il significato prognostico delle cellule tumorali isolate, evidenziabili con tale metodica.* | |
| Depositi tumorali (noduli satelliti) | assenti<br>presenti (indicare numero, diametro del nodulo maggiore ed eventuale associazione a<br>suto linfatico extra-nodale, strutture venose e nervose). | |
| Processi patologici | polipi | |

| | |
|---|---|
| associati | malattia diverticolare<br>IBD<br>Perforazione non tumorale, etc. |

Deve essere riportata nel referto la presenza di malattia metastatica a distanza (pM1) confermata istologicamente (noduli sierosi, mesenteriali, omentali e linfonodi metastatici non loco-regionali).

**e. Stadiazione**

Si raccomanda di effettuare la stadiazione secondo AICC/UICC TNM (VII edition 2009) (ALLEGATO 4)

**f. Indicatori di qualità**

- Confronto in audit multidisciplinari periodici riguardo il margine circonferenziale (positivo in meno del 15% dei casi), numero medio dei linfonodi repertati, invasione delle vene extramurali (>25% dei casi) e coinvolgimento della sierosa peritoneale (>20% dei casi).
- Partecipazione a controlli di qualità (CDQ)

ALLEGATO C Dgr n. del pag. 36/51

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

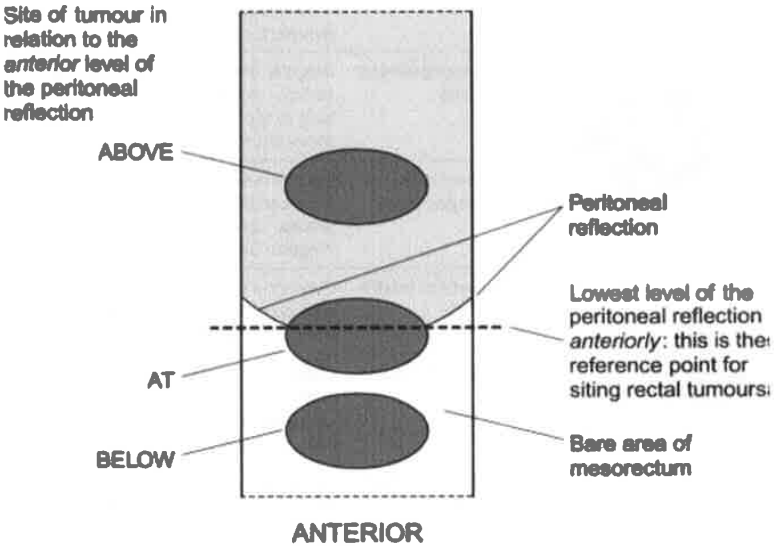
**BIBLIOGRAFIA**


1. AICC/UICC TNM, 7th edition, 2009
2. Buiko K, Rutkowski A. Is the 1-cm rule of distal bowel resection margin in rectal cancer based on clinical evidence? A systemic review. Annals of surgical oncology 2012; 19;801-808.
3. CAP protocol for the examination of specimens from patients with primary carcinoma of colon and rectum. October 2013.
4. Lanza G, Messerini L, Gafà R, Risio M. Colorectal tumors: the histology report. Dig Liv Dis 2011, 43S; S344-S355.
5. Lee HJ. Colorectal micropapillary carcinomas are associated with poor prognosis and enriched in markers of stem cells. Mod Path 2013 Aug 26 (8): 1123-31.
6. Loughray MB, Quirke P, Shepherd NA. Dataset for colorectal cancer histopathology reports. July 2014. http://www.rcpath.org .
7. National Comprehensive Cancer Network, Guidelines Version 2014. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site.
8. Nagtegaal ID. Macroscopic evaluation of rectal cancer resection specimen: clinical significance of the pathologist in quality control. Journal of clinica oncology 2002; 20, 1729-1734.
9. Nagtegaal ID. Current concepts of colorectal cancer resection pathology. Histopathology 2015; 6681; 102-11.
10. Nassar H. Carcinoma with micropapillary morphology: clinical significance e current concepts. Adv Anat path 2004 Nov; 11 (6): 297-303.
11. Pryczynicz A. Invasive micropapillary carcinoma: a distinct type of adenocarcinomas in the gastrointestinal tract. World J Gastroenterol 2014 April 28; 20 (16): 4597-606.
12. Quirke p, Cuvelier C, Ensari A. Evidence-based medicine: The time has come to set standards for staging. J Pathol 2010; 221; 357-360.
13. Quirke P, Risio M, Lambert R, von Karsa L and Vieth M. European guidelines for QA in colorectal cancer screening and diagnosis. 1st edition. Endoscopy 2012; 44: SE116-SE130.
14. Ryan R, Gibbons D, Hyland JM. Pathologic response following long-course neoadjuvant chemotherapy for locally advanced rectal cancer. Histopathology 2005; 47:141-146.
15. Rorvig S, Schlesinger N. Is the longitudinal margin of carcinoma-bearing colon resections a neglected parameter? Clinical colorectal cancer 2014; 13; 68-72.
16. Schneider NI, Langner C. Prognostic stratification of colorectal cancer patients: current perspectives. Cancer Menagement and Research 2014:6 291-300.
17. WHO classification of tumors of the digestive system. Lyon. IARC Press, 2010.

ALLEGATO C Dgr n. del pag. 37/51

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

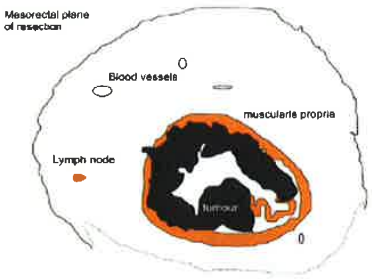
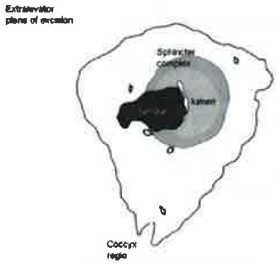
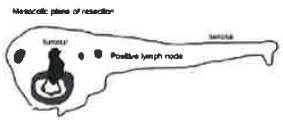
**ALLEGATO 1**



ALLEGATO C Dgr n. del pag. 38/51

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

**ALLEGATO 2**

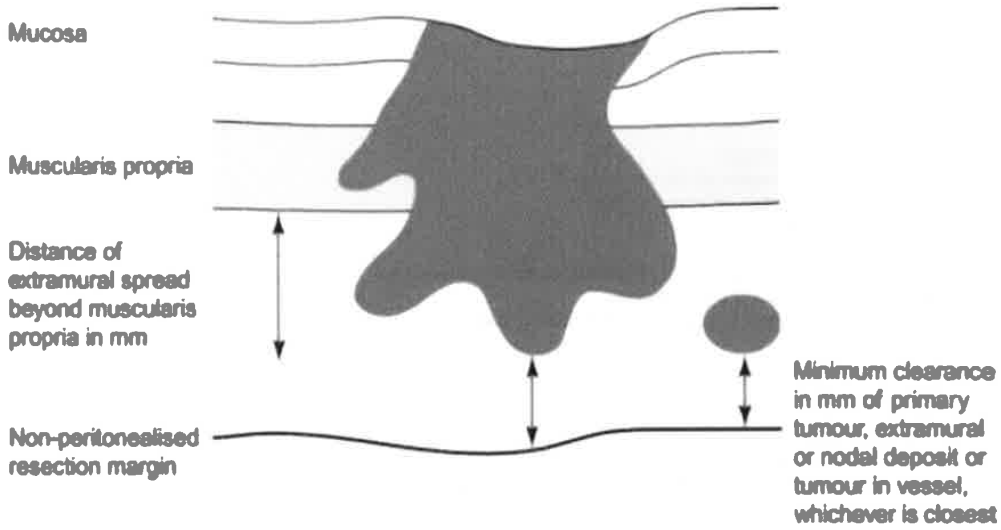
| | | Plane of resection | Definition | Implication |
|---|---|---|---|---|
| Total mesorectal excision (anterior resection or abdomino-perineal resection) |  | Mesorectal fascia | Smooth CRM, no defects deeper than 5 mm, intact mesorectum | Good prognosis |
| | | Intramesorectal plane | Irregular mesorectal surface, moderate bulk to the mesorectum | Intermediate prognosis |
| | | Muscularis propria plane | Defects down onto the muscularis propria, very irregular CRM | Poor prognosis |
| Sphincter evaluation (abdomino-perineal resection) |  | Outside levator plane | Cylindrical specimen, with *en bloc* resection of levators | Good prognosis |
| | | Sphincter plane | CRM on the surface of the intact sphincteric muscular tube | Intermediate prognosis |
| | | Intramuscular/ submucosa plane | Perforation or missing areas of muscle | Poor prognosis |
| Colon resections |  | Mesocolic plane | Intact mesocolon | Good prognosis |
| | | Intramesocolic plane | Significant mesocolic defects that do not reveal the muscularis propria | Intermediate prognosis |
| | | Muscularis propria plane | Significant and extensive defects that expose areas of the muscularis propria | Poor prognosis |

CRM, Circumferential resection margin.

ALLEGATO C Dgr n. del pag. 39/51

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

**ALLEGATO 3**



ALLEGATO C Dgr n. del pag. 40/51

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

**ALLEGATO 4**

**Pathologic Staging (pTNM) (Note M)**

TNM Descriptors (required only if applicable) (select all that apply)
___ m (multiple primary tumors)
___ r (recurrent)
___ y (post-treatment)

Primary Tumor (pT)
___ pTX: Cannot be assessed
___ pT0: No evidence of primary tumor
___ pTis: Carcinoma in situ, intraepithelial (no invasion)
___ pTis: Carcinoma in situ, invasion of lamina propria
___ pT1: Tumor invades submucosa
___ pT2: Tumor invades muscularis propria
___ pT3: Tumor invades through the muscularis propria into pericolorectal tissues
___ pT4a: Tumor penetrates the visceral peritoneum
___ pT4b: Tumor directly invades or is adherent to other organs or structures

Regional Lymph Nodes (pN)
___ pNX: Cannot be assessed
___ pN0: No regional lymph node metastasis
___ pN1a: Metastasis in 1 regional lymph node
___ pN1b: Metastasis in 2 to 3 regional lymph nodes
___ pN1c: Tumor deposit(s) in the subserosa, or non-peritonealized pericolic or perirectal tissues without regional lymph node metastasis
___ pN2a: Metastasis in 4 to 6 regional lymph nodes
___ pN2b: Metastasis in 7 or more regional lymph nodes
___ No nodes submitted or found

Distant Metastasis (pM)
___ Not applicable
___ pM1: Distant metastasis
*Specify site(s): _____
___ pM1a: Metastasis to single organ or site (eg, liver, lung, ovary, nonregional lymph node)
___ pM1b: Metastasis to more than one organ/site or to the peritoneum

TNM Stage Groupings

| | | | |
|---|---|---|---|
| Stage 0 | Tis N0 M0# | | |
| Stage I | T1 N0 M0 | | |
| | T2 N0 M0 | | |
| Stage IIA | T3 N0 M0 | | |
| Stage IIB | T4a N0 M0 | | |
| Stage IIC | T4b N0 M0 | | |
| Stage IIIA | T1-T2 N1 M0 | | |
| | T1 N2a M0 | | |
| Stage IIIB | T3-T4a N1 M0 | | |
| | T2-T3 N2a M0 | | |
| | | | T1-T2 N2b M0 |
| | | Stage IIIC | T4a N2a M0 |
| | | | T3-T4a N2b M0 |
| | | | T4b N1-N2 M0 |
| | | Stage IVA | Any T Any N M1a |
| | | Stage IVB | Any T Any N M1b |

Per l'inserimento delle codifiche SNOMED si rimanda al NAP

ALLEGATO C Dgr n. del pag. 41/51

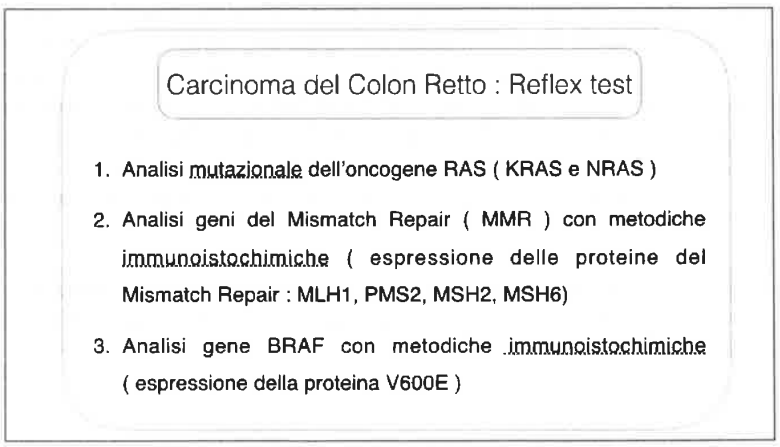
REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ... PROGR... AZIONE SANITARIA

**PARTE SESTA**
(referente dott. Duilio Della Libera)

## ANALISI IMMUNOISTOCHIMICHE E MOLECOLARI FINALIZZATE ALLA CARATTERIZZAZIONE PROGNOSTICO-PREDITTIVA E ALLA RICERCA DELLE FORME EREDITARIE DEL CARCINOMA DEL COLON RETTO (CCR)

Nella comune pratica clinica le indagini molecolari ritenute al momento fondamentali nella scelta del trattamento medico del CCR in quanto test predittivi di risposta ai farmaci a bersaglio molecolare con valenza prognostica utile nella pianificazione della strategia terapeutica individuale sono costituite dall'analisi mutazionale dell'oncogene RAS (KRAS e NRAS). Tale analisi, in accordo con le raccomandazioni AIOM, trova attualmente indicazione nei soggetti con carcinoma del colon-retto candidati a trattamento in I° linea o in linee successive con farmaci anti-EGFR. Nelle prime fasi diagnostiche può risultare utile la valutazione molecolare a scopo prognostico dello stato di BRAF e dei geni del Mismatch Repair (MMR) con metodiche immunoistochimiche (espressione immunoisochimica delle proteine V600E e del Mismatch Repair) riservando le analisi mutazionali molecolari a un livello successivo.

**Fig.1**




In generale il profiling molecolare del CCR dovrebbe costituire una parte integrante della procedura diagnostica anatomo-patologica e comprendere le seguenti informazioni:

- L'identificazione del paziente e del medico/struttura che ha richiesto l'analisi.
- L'identificazione del campione utilizzato per l'analisi.
- La descrizione macroscopica inclusa la definizione della percentuale di cellule tumorali presenti nel campione, l'eventuale dissezione eseguita, con riferimento dell'anatomo-patologo responsabile.
- La metodica impiegata per l'esecuzione dell'analisi molecolare con riferimento alla sensibilità del metodo, agli esoni/codoni o le specifiche mutazioni sottoposte ad analisi.
- I risultati del test, con specificazione del tipo di mutazione eventualmente rilevata con l'indicazione del responsabile della esecuzione del test molecolare.

Per quanto attiene alla preparazione dei campioni biologici da esaminare, le metodiche di estrazione e di analisi mutazionale del DNA si rinvia alle "Raccomandazioni AIOM e SIAPEC-IAP per la valutazione delle mutazioni di Ras nel carcinoma del colon-retto (2015)".
E' auspicabile e raccomandato l'adesione ai programmi di controllo della qualità patrocinati dall'AIOM-SIAPEC per certificare i laboratori che effettuano analisi mutazionale del gene RAS.
Per contrarre i tempi di refertazione molecolare (a garanzia di una rapida inclusione dei pazienti in adeguati percorsi terapeutici) può essere opportuno iniziare la caratterizzazione mutazionale per i geni KRAS e NRAS, la determinazione immunoistochimica per il gene BRAF e le proteine del MMR parallelamente alla valutazione isto-morfologica come reflex test (Fig 1).

**Mutazioni di ras nel carcinoma del colon retto (ccr)**
Mutazioni dei gene KRAS e NRAS sono in genere riscontrate in circa il 40-50% dei carcinomi del colon retto e sono predittive di una resistenza al trattamento con farmaci anti-EGFR. Sulla base di questi risultati, AIFA ha ristretto l'impiego di Panitumumab e di Cetuximab ai soli pazienti RAS wild type (assenza di mutazioni nei codoni 12, 13 dell'esone 2, dei codoni 59, 61 dell'esone 3, e dei codoni 117,146 dell'esone 4 di KRAS e NRAS). L'analisi mutazionale dei geni KRAS ed NRAS dovrebbe essere eseguita su richiesta dell'oncologo medico in base delle indicazioni dell'AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco) per l'utilizzo nel CRC metastatico degli anticorpi monoclonali anti-EGFR. L'analisi dei geni RAS trova attualmente indicazione nei pazienti con carcinoma del colon-retto metastatico per i quali è indicato un trattamento in I linea o in linee successive con un regime di terapia contenente un anticorpo monoclonale anti-EGFR. L'analisi mutazionale di KRAS ed NRAS può essere condotta con diverse metodiche e deve riguardare almeno i codoni 12, 13, 59, 61, 117 e 146 di entrambi i geni. In considerazione dell'alta concordanza fra le mutazioni riscontrate nei carcinomi primitivi e nelle corrispondenti metastasi epatiche, la determinazione dello stato mutazionale di RAS può essere effettuata indifferentemente su tessuto tumorale primitivo o metastatico. Per quanto attiene invece le metastasi linfonodali, visto il riscontro di un tasso di discordanza di circa il 25% tra stato mutazionale di RAS del tumore primitivo e delle metastasi linfonodali, queste ultime non dovrebbero pertanto essere utilizzate in prima istanza se il tessuto del tumore primitivo è disponibile.

Non vi sono controindicazionii di eseguire contestualmente all'esame istopatologico le analisi mutazionali dei geni KRAS ed NRAS (reflex test) al fine di ridurre e ottimizzare i tempi di refertazione e definizione terapeutica.

**Studio del mismatch repair del DNA**
Il 15% circa dei carcinomi colo-rettali (CCR) si caratterizzano per una particolare alterazione genetica denominata instabilità dei microsatelliti (elevata MSI-H), causata da un'anomala funzione del sistema di riparazione del DNA mismatch repair (MMR). I due terzi dei CCR con MSI-H sono sporadici, presentano la metilazione somatica biallelica del promoter di MLH1, e si sviluppano secondo la VIA CpG island methylator (CIMP). I rimanenti CCR con elevata instabilità microsatellitare (MSI-H ) sono ereditari ( Sindrome di Linch ) e derivano da mutazioni germline di uno dei geni del MMR (MLH1, MSH2, e più raramente MSH6 e PMS2) con inattivazione somatica del secondo allele. L'inattivazione genetica germline o epigenetica dei geni del MMR si associa generalmente a perdita di espressione della corrispondente proteina e del corrispondente partner eterodimerico (MLH1 con PMS2 e MSH2 con MSH6).

Le proteine del mismatch repair (MMR) sono un gruppo di enzimi nucleari preposti alla correzione e riparazione degli errori (base-base mismatch) che si verificano durante la replicazione del DNA. Le proteine tendono a formare dei complessi di eterodimeri che legandosi alle aree di DNA alterato ne provocano la rimozione. La perdita delle proteine del MMR comporta un accumulo di errori re-

ALLEGATO C Dgr n. del pag. 43/51

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

plicativi nel DNA delle cellule proliferanti, fenomeno piu' evidente in quelle aree genomiche caratterizzate da brevi e ripetitive sequenze nucleotidiche (instabilita' microsatellitare / MSI). La perdita delle funzione delle proteine del MMR si correla generalmente ad un alto grado di instabilita' microsatellitare (MSI-H). La stessa funzione viene generalmente mantenuta in caso di bassa (MSI-L) o nulla (MSS) instabilità microsatellitare. Sono stati identificati nove geni con funzioni correlate al MMR, cinque dei quali con particolare interesse clinico in quanto correlati allo sviluppo della Sindrome di Linch (Carcinoma Colo-rettale ereditario non polifonico / HNPCC): MLH1 (49%), PMS1 (0.3%), PMS2 (2%), MSH2 (38%), and MSH6 (9%). Nella formazione degli eterodimeri, MLH1 tende a legarsi con PMS2, PMS1 o MLH3 e MSH2 con MSH6.

Lo studio immunoistochimico delle proteine del MMR costituisce un metodo rapido e affidabile di screening della funzionalita' del sistema del mismatch repair con una sensibilita' pari al 90% e una specificita' vicina al 100% (valori inferiori in caso di mutazioni del gene MLH1). Perdita dell'espressione delle proteine MLH1 e MSH2 si verifica in oltre il 90% di neoplasie con elevata instabilita' microsatellitare (MSI-H). Lo studio immunoistochimico dell'espressione delle proteine del MMR deve comprendere un adeguato controllo interno (tessuto non neoplastico/mucosa colica normale).

Le alterazioni dei partner obbligatori (MSH2 e MLH1) comportano degradazione e quindi perdita di espressione anche del corrispettivo partner secondario, mentre le mutazioni dei partner secondari ( MSH6 e PMS2 ) sono caratterizzate da perdita selettiva della sola espressione di MSH6 o PMS2. Pertanto, l'analisi immunoistochimica dell'espressione delle proteine del MMR consente di identificare il gene che con ogni probabilità è inattivato, secondo il seguente schema:

| ICC | Interpretazione | Commenti | Approfondimenti |
|---|---|---|---|
| **Assente espressione di MLH1** | Mutazione germline MLH1<br>Ipermetilazione promoter MLH1 | Silenziamento epiqgenetico del gene MLH1 per ipermetilazione del suo promoter | Analisi mutazionale gene MLH1<br>Analisi mediazione promoter MLH1<br>Analisi BRAF V600E |
| **Assente espressione di MLH1 e PMS2** | Mutazione germline MLH1<br>Ipermetilazione promoter MLH1 | Espressione ICC di PMS2 assente in caso di mutazione di MLH1 (dimero MLH1/PMS2 )<br>Mutazione germline di PMS2 rara | Analisi mutazionale gene MLH1<br>Analisi mediazione promoter MLH1<br>Analisi BRAF V600E |
| **Assente espressione di PMS2** | Mutazione germline PMS2<br>Mutazione germline MLH1 | Mutazioni germline di PMS2 possono non associarsi a mancata espressione ICC di MLH1<br>L'assente espressione ICC della sola proteina PMS2 puo' essere espressione di mutazione germline di MLH1 | Analisi mutazionale gene PMS2<br>Analisi mutazionale gene MLH1 se il gene PMS2 non e' mutato |
| **Assente espressione di MSH2** | Mutazione germline MSH2<br>Mutazione germline EPCAM | Forte probabilita' di mutazione dei geni MSH2 o EPCAM<br>Silenziamento epiqgenetico gene MSH2 | Analisi mutazionale gene MSH2<br>Analisi mutazionale gene EPCAM se il gene MSH2 non e' mutato |

| ICC | Interpretazione | Commenti | Approfondimenti |
|---|---|---|---|
| **Assente espressione di MSH2 e MSH6** | Mutazione germline MSH2<br>Mutazione germline EPCAM<br>Mutazione germline MSH6 | Le proteine MSH2 e MSH6 formano un dimero e spesso MSH6 non e' espressa a seguito di una mutazione di PMS2 | Analisi mutazionale gene MSH2<br>Analisi mutazionale gene EPCAM / MSH6 se il gene MSH2 non e' mutato |
| **Assente espressione di MSH6** | Mutazione germline MSH2<br>Mutazione germline MSH6 | La proteina MSH2 puo dimerizzarsi con altri partner oltre a MSH6. La mutazione di MSH6 provoca la mancata espressione ICC solo di MSH6 | Analisi mutazionale gene MSH6<br>Analisi mutazionale gene MSH2 se il gene MSH6 non e' mutato |
| **Normale espressione ICC di tutte le proteine del MMR** | Non Sindrome di Linch<br>Possibile mutazione germline non senso in uno dei geni del MMR | La normale espressione ICC delle proteine del MMR non esclude la S.di Linch. Mutazioni non senso possono esitare in proteine intatte ma non funzionanti | Correlazione con l'instabilita' microsatellitare econ criteri clinico-anamnestici |

Lo status del sistema MMR sembra costituire un fattore prognostico indipendente nel carcinoma colo-rettale. Forme di CCR in stadio II e III con instabilita' microsatellitare (MSI) sembrano avere tassi di sopravvivenza maggiori rispetto a forme analoghe MSS e una minor responsivita' a trattamenti chemioterapici adiuvanti con composti a base di 5 fluoro-uracile. Inoltre lo stato del MMR è essenziale nell'iter diagnostico per l'identificazione delle forme ereditarie associate alla sindrome di Lynch. **Per tale motivo se ne consiglia la valutazione quanto più estesa possibile.**

**Mutazioni di BRAF nel carcinoma del colon retto**

L'oncogene BRAF codifica una serina/treonina chinasi che agisce a valle del KRAS nella via MAPK. L'azione del BRAF si esplica attivando una chinasi (mitogen activated protein kinase kinase / MAPKK o MEK) che porta alla proliferazione cellulare. In oltre il 90% dei casi la mutazione dell'oncogene riguarda lo scambio Timidina/Adenina al nucleotide 1799 nel domain della chinasi (mutazione V600E) con sostituzione valina/glutammina, attivazione di MEK e una incontrollata proliferazione cellulare EGFR indipendente. Nel CRC le mutazioni KRAS/NRAS e BRAF sono mutuamente esclusive.

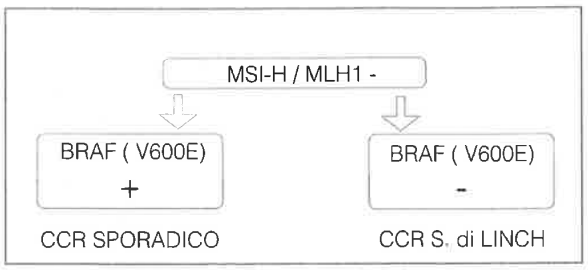
Mutazioni di BRAF sono presenti in circa il 10% dei pazienti con carcinoma del colon retto (CCR), sono correlate ad una prognosi sfavorevole della malattia e sembrano rispondere in misura minore a terapie con farmaci anti-EGFR associandosi spesso a condizioni di instabilità microsatellitare (MSI). Le mutazioni di BRAF, al pari delle neoplasie con MSI, prevalgono nei soggetti di età avanzata, di sesso femminile localizzandosi preferibilmente nel colon prossimale. Tali forme inoltre presentano una certa predilezione a metastatizzare in sedi non tipiche, peritoneo e linfonodi a distanza, con un minor numero di metastasi polmonari.

Forme sporadiche di CCR con elevata instabilità microsatellitare (MSI-H) e assente espressione immunoistochimica per la proteina MLH1 del MMR presentano frequentemente una mutazione V600E del gene BRAF (reazione ICC positiva per V600E) a differenza delle forme di CCR correlate alla Sindrome di Linch wild type per BRAF (Fig.2 reazione ICC negativa per V600E).

ALLEGATO C Dgr n. del pag. 45/51

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

**Fig. 2**




Un ulteriore utilizzo della reazione ICC per la ricerca della proteina V600E risiede nello screening delle lesioni serrate. La mutazione V600E del gene BRAF costituisce infatti un marcatore specifico della via serrata nella carcinogenesi del CCR. Non e' presente nei convenzionali adenomi, ne' nei polipi iperplastici tipici e compare nelle lesioni serrate a partire dalla forma microvescicolare del polipo iperplastico connotando un particolare rischio di progressione maligna lungo la via serrata.

**Farmacogenomica**

L'utilizzo chemioterapico di farmaci citotossici nella terapia medica del CCR comporta talora problemi legati all'efficacia terapeutica del composto utilizzato e alla sua tossicità. Tali farmaci infatti sono caratterizzati da un complesso metabolismo che prevede attività enzimatiche specifiche il cui deficit si traduce generalmente in una riduzione della compliance terapeutica con conseguente accumulo della sostanza attiva o dei suoi metaboliti con comparsa di una indesiderata tossicita'.
Le maggiori problematiche sono connesse alla terapia con fluoropirimidine e irinotecano. Può essere indicato in casi selezionati (valutazione preterapeutica di casi con elevato il rapporto rischio/beneficio in base alle particolari carattestiche cliniche o in corso di terapia cola comparsa di fenomeni inattesi di tossicita' o tossicità gastrointestinale di grado ≥3 o ematologica di grado 4) lo studio della diidropirimidina deidrogenasi (DPD), enzima del metabolismo delle fluoropirimidine, e l'uridina-glucuronosil-transferasi (UGT) del metabolismo epatico dell'irinotecano.

**Classificazione molecolare del carcinoma del colon-retto**

Il carcinoma del colon-retto (CCR) è contraddistinto da specifiche alterazioni molecolari a carico di numerosi geni oncosoppressori e oncogeni che complessivamente determinano la trasformazione neoplastica da un normale epitelio colico all'adenocarcinoma invasivo con il tramite di lesioni intermedie (precursori).
Circa il 70-80% dei casi di CRC sono di tipo sporadico e si caratterizzano per un lungo processo di trasformazione multifattoriale con il graduale accumulo di mutazioni somatiche multiple (instabilità cromosomica - CIN) che si associa a gravi anomalie geniche (delezioni ed inserzioni, attivazione di proto-oncogeni, inattivazione di geni tumore soppressore) precocemente a carico del gene APC e tardivamente del gene P53. I rimanenti casi di CRC sono correlati ad una predisposizione famigliare o ereditaria ad ammalare di neoplasia colica con riferimento a particolari sindromi genetiche, come la poliposi adenomatosa familiare, associata (FAP) a mutazioni del gene APC (adenomatous polyposis coli), ed il carcinoma del colon-retto ereditario non-poliposico nella sindrome di Linch, caratterizzato da mutazioni germinali dei geni mismatch repair (MMR
Nel processo della cancerogenesi del CCR sono note almeno tre vie molecolari (Fig 3):

1. Via dell'instabilità cromosomica (CIN) o "APC pathway" caratterizzata dall'attivazione di oncogeni e inattivazione di geni tumore soppressore con forme sporadiche di CCR o ereditarie (FAP). Le forme sporadiche di CCR presentano precoci mutazioni somatiche bialleliche del gene tumore soppressore APC in oltre l'80% dei casi e le forme ereditarie FAP mutazioni geminali

dello stesso gene. I casi di CCR sporadico prive di mutazioni somatiche del gene APC si caratterizzano per mutazioni del gene codificante la beta-catenina, proteina coinvolta nella stessa cascata di segnali la via Wnt (Wingless type) APC correlata. In oltre il 50% dei casi le forme sporadiche di CCR presentano una mutazione dell'oncogene RAS (generalmente KRAS e meno frequentemente NRAS) che compare precocemente nel processo della cancerogenesi dell'adenocarcinoma colico (presente in oltre la meta' degli adenomi colici di dimensioni superiori a 1 cm).

2. Via della disfunzione del sistema del mismatch repair del DNA caratterizzata da due fenomeni principali. Il primo correlato alle forme ereditarie di CCR nell'ambito della Sindrome di Linch, prevede una o piu' mutazioni germline a carico dei geni del mismatch repair del DNA che si associa in modo caratteristico all'accumulo ripetuto di brevi sequenze nucleotidiche, i microsatelliti, definendo il fenomeno dell'instabilità microsatellitare (MSI). L'instabilità microsatellitare non e' presente in modo esclusivo nella Sindrome di Linch essendo presente anche nel 15% delle forme sporadiche di CCR. In questi casi l'instabilità microsatellitare non deriva da una mutazione dei geni del MMR ma rappresenta un fenomeno epigenetico con l'ipermetilazione del promoter di un gene del MMR, generalmente MLH1, che comporta il silenziamento trascrizionale dell'espressione del gene ipermetilato.
3. Via dell'ipermetilazione o metilazione aberrante del DNA (CIMP). La trascrizione dei geni è regolata da cosiddette sequenze promotrici che regolano il legame dei fattori di trascrizione al gene di interesse. La metilazione delle sequenze promotrici è un fine meccanismo di regolazione della trascrizione genica, in quanto altera la capacità dei fattori di trascrizione di legarsi ad esse e promuovere la trascrizione. Questa via di cancerogenesi prevede l'ipermetilazione di particolari sequenze nucleotidiche, le cd isole CpG (CIMP) dei promotori di molti geni coinvolti nella genesi del CRC. Le isole di CpG sono segmenti di DNA (di almeno 0.5 kb) con un alto rapporto G:C e elevato contenuto CpG, spesso localizzate nelle regioni promoter o nelle sequenze terminali-5' dei geni. Il 90% delle isole CpG delle regioni promoter sono in condizioni normali non metilate. Il verificarsi di una condizione di ipermetilazione altera il legame fra il DNA e le proteine istoniche con il concorso di un enzima, la istone-deacitelasi e trasforma la struttura cromatinica delle regioni del promoter in una struttura chiusa, inaccessibile ai fattori di trascrizione con il risultato dell'inattivazione genica. In queste condizioni l'ipermetilazione delle isole CpG del promoter rappresenta un meccanismo alternativo alla mutazione genica per l'inattivazione di geni tumore soppressore nei tumori umani. Nel caso del CCR sono coinvolti i geni del MMR con una instabilità microsatellitare (MSI) su base epigenetica. Le forme sporadiche di CCR CIMP+ con instabilità microsatellitare (MSI-H) generalmente non presentano mutazione a carico dei geni RAS ma mutazioni del gene BRAF e costituiscono un sottogruppo di neoplasie correlate alla cancerogenesi lungo la via delle lesioni serrate.

ALLEGATO C Dgr n. del pag. 47/51

REGIONE DEL VENETO Giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

**Fig 3**

| | PATWWAY INSTABILITA' CROMOSOMICA | PATWWAY IBRIDA | PATWWAY MISMATCH REPAIR | PATWWAY | CIMP / SERRATA |
|---|---|---|---|---|---|
| | EREDITARIA E SPORADICA | SPORADICA | EREDITARIA ( S. DI LINCH ) | EREDITARIA | E SPORADICA |
| Instabilita' cromosomica ( CIN ) | PRESENTE | PRESENTE | ASSENTE | ASSENTE | ASSENTE |
| CIMP status | NEGATIVO | BASSO | NEGATIVO | ALTO | ALTO |
| MSI status | MSS | MSI-L o MSS | MSI-H | MSI-H | MSI-L |
| Mutazione KRAS | +++ | +++ | + / - | - | - |
| Mutazione BRAF | - | - | - | +++ | +++ |
| MLH1 status | NORMALE | NORMALE | MUTATO | METILATO | METILATO (PARZIALE) |
| Metilazione MGMT | - | +++ | - | + / - | +++ |

I geni del Mismatch Repair (MMR) sono preposti al controllo e alla riparazione degli errori che si verificano durante il processo di replicazione del DNA (MLH1, MSH2, PMS2 e MSH6). In circa il 15 dei casi di CCR si verifica la perdita di espressione del prodotto genico del sistema MMR dovuto generalmente ad alterazioni epigenetiche che silenziano l'espressione genica (generalmente ipermetilazione del promoter di entrambi gli alleni del gene MLH1) e in minor misura da mutazioni germline a carico di uno o piu' di questi geni sono alla base della Sindrome di Linch (SL). Esistono due possibili varianti legate la prima, Sindrome Linch like, alla presenza di instabilità microsatellitare (MSI) con anomala espressione di una proteina del MMR dovuta nè a mutazione germline, nè a ipermetilazione del promoter ma a una mutazione somatica acquisita bilancia di un gene del sistema MMR. La seconda variante, Sindrome famigliare del carcinoma colo-rettale Tipo X (FCCTX) pur soddisfando i criteri di Amsterdam, si differenzia dalla SL per l'assenza di anomalie o mutazioni del sistema MMR e dall'assenza di rischio di sviluppare neoplasie extracoliche. Un'ultima variante riguarda la Sindrome di Linch soprattutto nelle forme con tumori extracolici in generale e endometriali in particolare. In questi casi il gene MSH2 del MMR viene silenziato in maniera epigenetica da una ampia delezione che interessa il gene contiguo EpCAM. La conseguenza del funzionamento anomalo del sistema del Mismatch Repair (MMR) oltre al verificarsi di ripetuti errori replicativi del DNA è data dall'accumulo di corte sequenze anomale di nucleotidi chiamate microsatelliti che tendono ad accumularsi nelle regioni promoter dei geni che controllano la crescita cellulare, rendendoli vulnerabili a mutazioni. Questo fenomeno prende il nome di Instabilità Microsatellitare (MSI) e costituisce la "footprint" biologica del funzionamento anomalo del MMR.

L'Instabilità Microsatellitare (MS) viene valutata testando i loci specifici con un panel di sequenze mono-dinucleotidiche; l'instabilità microsatellitare viene definita alta (MSI-H) quando presente in oltre il 40% dei loci e bassa (MSI-L) quando inferiore al 40%. Se assente si parla di Instabilità Microsatellitare assente (MSS).
Le neoplasie correlate alla Sindrome di Linch e al 15% delle forme sporadiche di CCR presentano un condizione di elevata instabilità microsatellitare (MSI-H). Queste varianti di adenocarcinoma tendono ad avere caratteristiche anatomo-cliniche particolari: prevalenza nel colon destro, grading elevato, prevalente componente mucinosa, ricco infiltrato linfocitaria intratumorale e lunga sopravvivenza.
Per quanto riguarda le neoplasie con bassa instabilità microsatellitare (MSI-L), a differenza delle forme MSI-H, non sono generalmente associate a difetti del sistema MMR (mutazione germline o ipermetilazione promoter gene MLH1). In una bassa percentuale di casi si associano a perdita di espressione del gene MSH3 del sistema MMR che costituisce un elemento prognostico negativo. In una buona percentuale di casi si associa a metilazione del promoter del gene O-6 Metilguanina DNA metiltransferasi (MGMT) con instabilità del MMR di tipo MSI-L. La metilazione di MGMT rara nella sindrome di Linch e' presente in un'elevata percentuale di casi di lesioni serrate (25% adenomi serrati sessili, 78% adenomi serrati dislessici, 50% adenocarcinomi serrati) e suggerisce un ruolo della MSI-L nella via CIMP/Serrata della cancerogenesi del CCR.

➢ **Sindromi di predisposizione ereditaria al carcinoma del colon-retto**

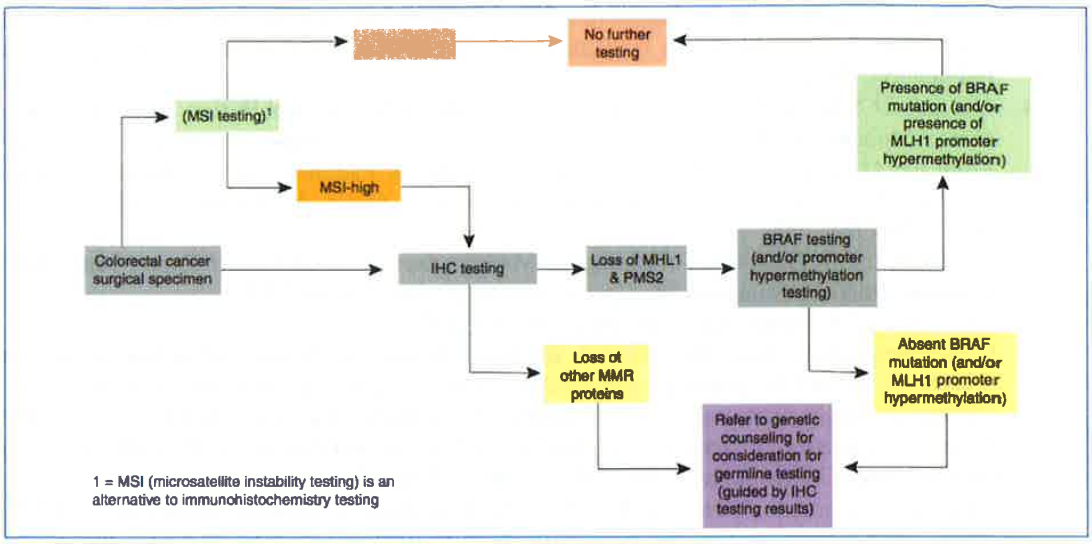
Il 5% circa dei casi di carcinoma del colon-retto è portatore di alterazioni genetiche predisponenti allo sviluppo della neoplasia. Da una parte le forme non poliposiche che si riferiscono principalmente alla sindrome di Lynch (HNPCC / Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer), dall'altra le forme poliposiche ( Adenomatosi famigliare classica/ FAP o attenuata/AFAP, poliposi associata a mutazione MutYH / MAP ).
Non esiste un accordo universale sugli elementi diagnostici minimi utili a identificare pazienti portatori di mutazioni associate a sindromi conosciute da avviare alla consulenza oncogenetica. Tuttavia sulla base delle linee guida di Amsterdam e Bethesda si suggerisce di considerare alcuni elementi clinici di sospetto sulla base delle caratteristiche della neoplasia e sull'anamnesi oncologica del paziente e della sua famiglia:

- neoplasia con elevata instabilità microsatellitare ( MSI ) ad alto grado di malignità, fenotipo mucinoso o a cellule ad anello con castone, con infiltrato linfocitario tumorale Crohn like.
- neoplasie con elevata instabilità microsatellitare ( MSI ) con mancata espressione immunoistochimica di una o più proteine del Mismatch Repair ( MMR )
- età inferiore ai 50 anni
- neoplasie del colon prossimale
- neoplasie multiple , sincrone o metacrone nello stesso paziente
- neoplasie utero-ovariche, pelvi-ureterale, del pancreas, stomaco e prostata in età inferiore ai 50 anni
- polipi/poliposi associata al carcinoma colo-rettale
- più casi di neoplasia nello stesso gruppo parentale di I/II grado ( materno e paterno )
- presenza in famiglia di almeno un caso di neoplasia in età inferiore ai 50 anni

Per quanto attiene alla sindrome di Lynch i dati della letteratura consigliano di eseguire un test di screening con la valutazione immunoistochimica delle proteine del MMR eventualmente seguita dalla valutazione della instabilità microsatellitare su tutti i campioni di tumore (Fig.4). In caso di instabilità dei microsatelliti (MSI) o immunoistochinica con mancata espressione delle proteine codificate dai geni del Mismatch Repair (MMR) vi è indicazione della ricerca della mutazione ereditaria su campione di sangue dei geni del MMR (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6). In caso di riscontro di mutazione, è in carico al genetista l'inquadramento clinico del paziente e, sulla base della storia famigliare, della componene parentale del paziente.

ALLEGATO C Dgr n. del pag. 49/51

**Fig 4**




Per I casi di poliposi deve essere ricercata una mutazione ereditaria su campione di sangue dei geni APC, MutYH.

ALLEGATO C Dgr n. del pag. 50/51



BIBLIOGRAFIA


1. Raccomandazioni AIOM e SIAPEC-IAP per la valutazione delle mutazioni di RAS nel carcinoma del colon retto. Gruppo di lavoro AIOM e SIAPEC-IAP 2015
2. Giardiello F.M., Allen JI, Jennifer E. Axilbund, Boland C.R., Burke C.A et al Guidelines on Genetic Evaluation and Management of Lynch Syndrome: A Consensus Statement by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. Am J Gastroenterol advance online publication, 29 July 2014; doi: 10.1038/ajg.2014.186
3. Newton ACS Wong; David Gonzalez; Manuel Salto-Tellez; Rachel Butler; Salvador J Diaz-Cano; Mohammad IlyasRAS Testing of Colorectal Carcinoma—A Guidance Document From the Association of Clinical Pathologists Molecular Pathology and Diagnostics Group.; William Newman; Emily Shaw; Philippe Taniere; Shaun V Walsh . J Clin Pathol. 2014;67(9):751-757
4. Guideline on the Evaluation of Molecular Markers for Colorectal Cancer Expert Panel Draft Recommendations Summary for Open Comment Period. ASCO 2015
5. Linee guida dei Tumori del colon retto. AIOOM 2015
6. Recommendations from the eGAPP Working Group: can testing of tumor tissue for mutations in eGFR pathway downstream effector genes in patients with metastatic colorectal cancer improve health outcomes by guiding decisions regarding anti-eGFR therapy? Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) Working GroupGenetics in medicine. Volume 15. Number 7 July 2013
7. Kuan SF, Navina S, Cressman KL, Pai RK. Immunohistochemical detection of BRAF V600E mutant protein using the VE1 antibody in colorectal carcinoma is highly concordant with molecular testing but requires rigorous antibody optimization. Hum Pathol. 2014 Mar; 45(3):464-72. Epub 2013 Nov 4.
8. Capper D, Voigt A, Bozukova G, Ahadova A, Kickingereder P, von Deimling A, von Knebel Doeberitz M, Kloor M. BRAF V600E-specific immunohistochemistry for the exclusion of Lynch syndrome in MSI-H colorectal cancer. Int J Cancer. 2013 Oct 1; 133(7):1624-30. Epub 2013 Apr 25.
9. DNA mismatch repair and BRAF status in colorectal cancer: Interest for the therapeutic management?. Bull Cancer. 2015 Jun ;102(6 Suppl 1):S72-81
10. Lipsyc M, Yaeger R. Impact of somatic mutations on patterns of metastasis in colorectal cancer. J Gastrointest Oncol 2015;6 (6):645-649. doi: 10.3978/ j.issn.2078-6891.2015.045
11. Ben Tran, MBBS, FRACP,Scott Kopetz, MD,Jeanne Tie, MBBS, MD, FRACP,Peter Gibbs, MBBS, MD, FRACP,Zhi-Qin Jiang, MD,Christopher H Lieu, MD,Atin Agarwal, MD,Dipen M Maru, MD,Oliver Sieber, PhD, andMayesh Desai, MBBS, FRACP .Impact of BRAF Mutation and Microsatellite Instability on the Pattern of Metastatic Spread and Prognosis in Metastatic Colorectal Cancer . Cancer. 2011 October 15; 117(20): 4623–4632
12. Callisia N. Clarke, E. Scott Kopetz. BRAF mutant colorectal cancer as a distinct subset of colorectal cancer: clinical characteristics, clinical behavior, and response to targeted therapies. J Gastrointest Oncol 2015;6(6):660-667
13. Gyeong Hoon Kang. Four Molecular Subtypes of Colorectal Cancer and Their Precursor Lesions. Arch Pathol Lab Med—Vol 135, June 2011
14. Jung Ho Kim, Gyeong Hoon Kang. Molecular and prognostic heterogeneity of microsatellite-unstable colorectal cancer .World J Gastroenterol 2014 April 21; 20(15): 4230-4243
15. Giovanni Lanza, Luca Messerini, Roberta Gafà, Mauro Risio. Colorectal tumors: The histology report. Digestive and Liver Disease 43S (2011) S344–S355
16. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. Cancer Res. 1998; 58 (22):5248-5257.

ALLEGATO C Dgr n. del pag. 51/51

17. Bellizzi AM, Crowder CD, Marsh WL, Hampel H, Frankel WL. Mismatch repair status in a cohort of rectal adenocarcinomas before and after chemoradiation. Mod Pathol. 2010;23:137A.
18. Radu OM, Nikiforova MN, Farkas LM, Krasinskas AM. Challenging cases encountered in colorectal cancer screening for Lynch syndrome reveal novel findings: nucleolar MSH6 staining and impact of prior chemoradiation therapy. Hum Pathol. 2011; 42(9):1247-1258.
19. Shia J, Zhang L, Shike M, et al. Secondary mutation in a coding mononucleotide tract in MSH6 causes loss of immunoexpression of MSH6 in colorectal carcinomas with MLH1/PMS2 deficiency. Mod Pathol. 2013;26(1):131-138.
20. Domingo E, Niessen RC, Oliveira C, et al. BRAF-V600E is not involved in the colorectal tumorigenesis of HNPCC in patients with functional MLH1 and MSH2 genes. Oncogene. 2005; 24 (24):3995-3998.
21. Senter, L, Clendenning, M, Sotamaa, K, et al. The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germline PMS2 mutations. Gastroenterology. 2008; 135 (2):419-428.
22. Bessa X, Balleste B, Andreu M, et al. A prospective, multicenter, population-based study of BRAF mutational analysis for Lynch syndrome screening. Clin Gastroenterol Hepatol. 2008; 6 (2):206-214.
23. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology Provisional Clinical Opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. J Clin Oncol. 2009;27(12):2091-2096.
24. De Roock, Claes B, Bernasconi D, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. Lancet Oncol. 2010;11(8):753-762.
25. De Roock, De Vriendt V, Normanno N, Ciardiello F, Tejpar S. KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. Lancet Oncol. 2011;12(6):594-603.
26. Prenen H, De Schutter J, Jacobs B, et al. PIK3CA mutations are not a major determinant of resistance to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab in metastatic colorectal cancer. Clin Cancer Res. 2009;15(9):3184-3188.
27. Laurent-Puig P, Cayre A, Manceau G, et al. Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. J Clin Oncol. 2009;27(35):5924-5930.

ALLEGATO D Dgr n. del pag. 1/5

REGIONE DEL VENETO PROGRAMMAZIONE SANITARIA SEZIONE ATTUAZIONE giunta regionale

## Gestione dei follow up di 2° livello nello screening cervicale

Documento di indirizzo del Gruppo regionale ginecologi dello screening cervicale
Versione del 22 gennaio 2014

**Premesse**

Nei programmi di screening del Veneto il 60% delle colposcopie è costituito da colposcopie di follow up: questo è valido per tutti i programmi, sia per quelli che utilizzano come test primario la citologia sia per quelli che utilizzano il test HPV, e rappresenta indubbiamente un aggravamento del carico di lavoro dei programmi[1].

In tale scenario un utile strumento può essere rappresentato dal documento Gisci "Utilizzo del test HPV-hr nel triage delle ASC-US, delle L-SIL in donne con più di 35 anni, nel follow-up delle donne con citologia ASC-US+ dopo un approfondimento di secondo livello negativo per CIN2+ e nel follow-up dopo trattamento delle lesioni CIN2-3: aggiornamento 2012 "[2]. Il documento si basa sul fatto che il test HPV-hr ha un alto valore predittivo negativo e questo rende possibile ridurre e uniformare i controlli di follow-up.

Il lavoro del Gisci è il risultato di un'analisi della letteratura, delle linee guida europee, statunitensi e inglesi, e delle raccomandazioni delle società scientifiche e agenzie governative più influenti, e fornisce indicazioni su come gestire le donne in follow up e su quando è possibile inserire il test HPV-hr nel follow-up post colposcopia delle ASC-US, delle L-SIL, delle ASC-H e delle H-SIL.

Le indicazioni si differenziano a seconda del rischio di CIN2 o lesioni più gravi (CIN2+) attribuibile alla donna sulla base della citologia di primo livello.
Ciò porta a considerare due gruppi di donne: quelle con ASC-US e L-SIL e quelle con ASC-H, AGC e H-SIL. Tale divisione è in accordo con il valore predittivo positivo (VPP) per CIN 2+ di queste categorie citologiche nei programmi di screening italiani.

È importante sottolineare che nel documento:

- per "approfondimento di 2°livello negativo per CIN2+", si intende un esame colposcopico negativo o una colposcopia con prelievo bioptico e risultato istologico negativo per CIN2 +
- per "test HPV" si intendono test clinicamente validati per specificità e sensibilità; inoltre nel contesto dello screening del carcinoma della cervice uterina (test primario, test di triage e test nel follow-up) è sufficiente testare il gruppo HPV ad alto rischio in toto (HPV 16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59).

**Recepimento del documento Gisci 2012**

Il Gruppo regionale dei ginecologi dello screening cervicale del Veneto ha discusso il documento Gisci in una riunione tenutasi a Padova il 3 luglio 2013 e ha ritenuto di recepire il documento con due modifiche e alcuni commenti. Tali modifiche e commenti sono stati illustrati e discussi nella Riunione annuale dello screening cervicale tenutasi a Padova il 19 novembre 2013.
Si propone che queste raccomandazioni vengano introdotte nell'uso corrente dal gennaio 2014 in tutti i programmi di screening cervicale del Veneto.

[1] Survey GISCi sulle attività di follow up dei programmi di screening cervicale.
http://www.gisci.it/documenti/documenti_gisci/rapporto-survey-follow-up-2013.pdf
[2] http://www.gisci.it/documenti/documenti_gisci/Aggiornamento_documento_GISCI_2012_HPV-hr.pdf

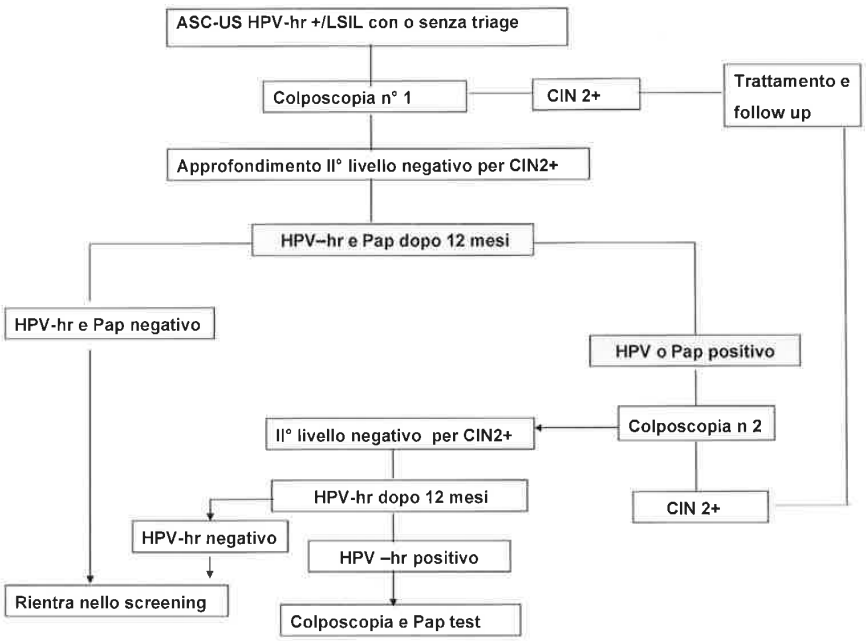
ALLEGATO D Dgr n. del pag. 2/5

Gli esiti delle raccomandazioni saranno oggetto di monitoraggio. Le raccomansazioni potranno essere riviste sulla base di nuovi dati della letteratura, nuove linee guida nazionali o internazionali o proposte del Gruppo regionale ginecologi

**Modifiche e commenti al documento Gisci 2012**

1. **Gestione delle donne con citologia ASC-US o LSIL (con o senza triage HPV)**

Figura 3 del documento Gisci modificata (in giallo): Algoritmo di gestione delle donne con citologia ASC-US e e test HPV-hr positivo e delle L-SIL con o senza triage



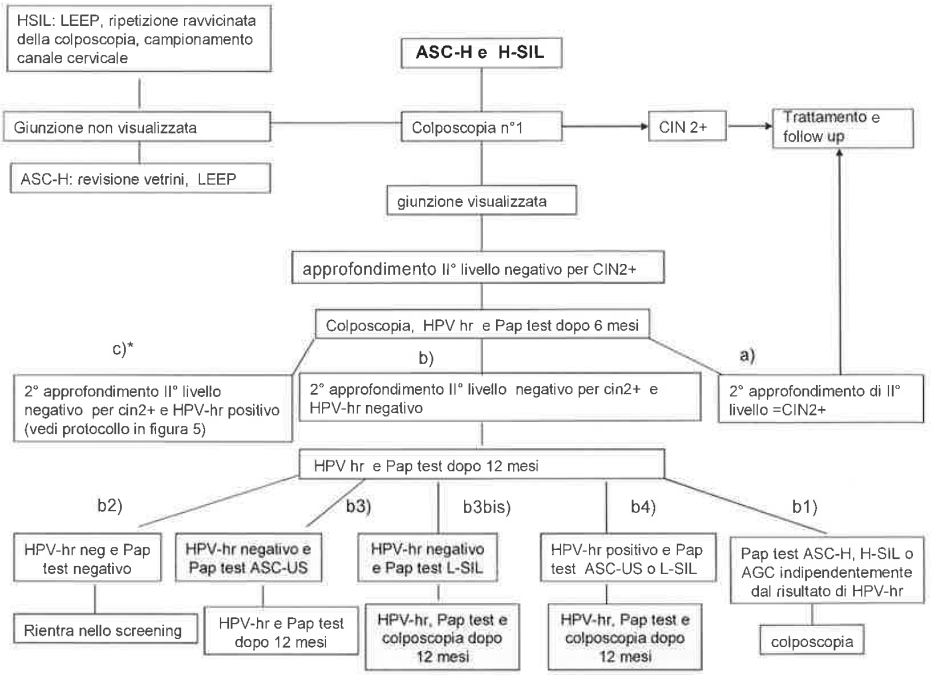

Modifica: viene modificata la Figura 3 del documento Gisci, alla luce delle Linee Guida ASCCP 2012[3]: nella gestione delle donne con citologia ASC-US o LSIL, per le quali il GISCi propone l'esecuzione del solo test HPV a 12 mesi, si propone il co-testing (HPV e PAP) a 12 mesi in caso di approfondimento negativo per CIN2+. È sufficiente che uno dei due test sia positivo per rimandarla nuovamente in colposcopia.

[3] American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology Screening Guidelines for the Prevention and Early Detection of Cervical Cancer. Journal of Lower Genital Tract Disease, Volume 16, Number 3, 2012, 00Y00
http://journals.lww.com/jlgtd/PublishingImages/ASCCP%20Guidelines.pdf#zoom=80

ALLEGATO B Dgr n. del pag. 3/5

## 2. Gestione delle donne con citologia ASC-H o H-SIL

Figura 4 del documento Gisci modificata (in giallo): Algoritmo di gestione delle donne con citologia ASC-H e H-SIL



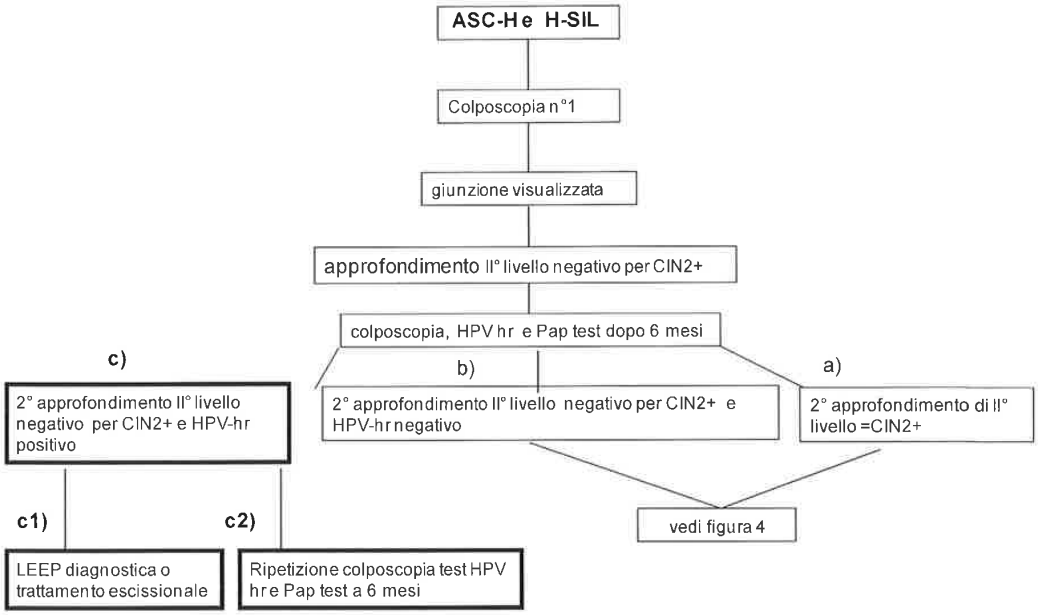

Modifiche:
Esse riguardano gli snodi b3 e b4 del documento Gisci.

- b3) HPV-hr negativo e Pap test (SOLO) ASC-US: HPV-hr e Pap test a 12 mesi come nel documento Gisci
- b3bis)(aggiuntivo rispetto al documento Gisci): HPV-hr negativo e Pap test (SOLO) L-SIL: HPV-hr e Pap test a 12 mesi cui si aggiunge colposcopia sempre a 12 mesi
- b4) HPV-hr positivo e Pap test ASC-US o L-SIL: anche qui a HPV-hr e Pap test a 12 mesi si aggiunge colposcopia visto che compare una positività citologica che associata ad un test HPV positivo suggerisce rivalutazione clinica.

Commento: si raccomanda nel caso della giunzione non visualizzata, di preferire la biopsia escissionale al curettage endocervicale, a causa dei limiti della metodica (prelievo superficiale che non consente di evidenziare eventuali lesioni presenti nelle cripte ghiandolari e spesso produce materiale inadeuato).

ALLEGATO D Dgr n. del pag. 415

Figura 5 del documento Gisci: Algoritmo di gestione delle donne con citologia ASC-H e H-SIL a completamento del **punto C** della figura 4




Commento: si raccomanda infine una attenta esplorazione della vagina nel corso dei follow up, per individuare eventuali lesioni VAIN.

3. **Gestione delle donne con citologia AGC**

Commenti:

- l'AGC non è una citologia molto frequente e, inoltre, è spesso associata a situazioni benigne, come alterazioni cellulari reattive o polipi endocervicali. Tuttavia, a volte è associata a CIN e lesioni ghiandolari endocervicali o endometriali di alto grado. Nelle donne con citologia AGC si sottolinea l'importanza di effettuare un test HPV al momento della colposcopia. Un test HPV negativo aiuterà ad escludere l'origine cervicale delle eventuali lesioni. In caso di negatività della colposcopia deve essere eseguito un prelievo endocervicale e nelle donne oltre i 35 anni negli Stati Uniti è raccomandata la biopsia endometriale.

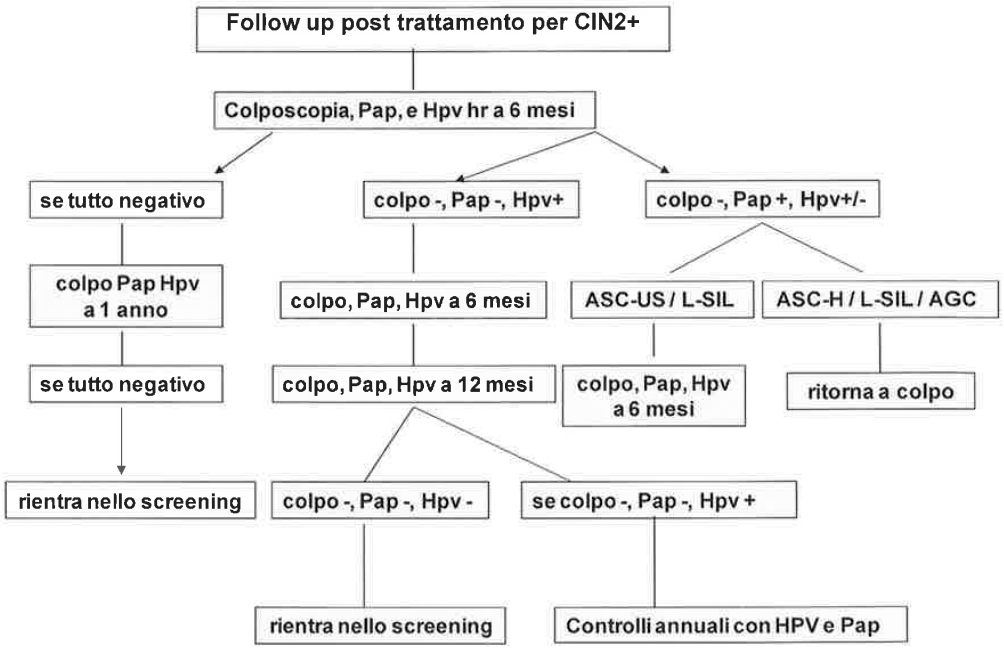
ALLEGATO D Dgr n. del pag. 5/5

4. **Gestione delle donne post trattamento**

Modifica: rispetto al documento GISCi (Sezione 5 Il test HPV come indicatore di recidiva), viene proposto il seguente protocollo (figura a).
Primo controllo a sei mesi (colposcopia, Pap test e HPV).
Se tutto risulta negativo: approfondimento a 1 anno (colposcopia, Pap test e HPV)
Se tutto nuovamente negativo, rientra in screening;

- se permane ancora qualcosa di positivo: approfondimento a 6 mesi (colposcopia e/o Pap test e/o HPV e/o biopsia) e via di seguito.

Figura a. Algoritmo di gestione delle donne post trattamento per CIN2+




Commenti:

- L'uso dell'HPV in sede post-trattamento è fortemente raccomandato
- Il rischio di carcinoma invasivo dopo trattamento per CIN2+ rimane più elevato per 20 anni. Perciò le pazienti trattate che hanno compiuto più di 65 anni, andrebbero mantenute in follow up di screening con le stesse modalità di quelle di età inferiore (linee guida ASCCP 2012, vedi nota 3).
- Per il follow up post trattamento vanno adottate le indicazioni delle nuove linee guida SICPCV, in avanzata fase di preparazione, anche tenendo conto che il braccio "tutto negativo" è pressochè identico a quanto previsto dal documento GISCi 2012 mentre il braccio "qualcosa di positivo" presenta una maggiore articolazione che riflette le necessità di gestione clinica di tali pazienti.

ALLEGATO E Dgr n. del pag. 1/12

# Documento di recepimento delle Linee Guida Europee

**Redatto dal Gruppo Endoscopisti dello screening colorettale della Regione Veneto.**
Versione del 22 gennaio 2014

Con la pubblicazione delle "European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis" (LGE) all'inizio del 2011, il gruppo endoscopisti dello screening colorettale della Regione Veneto ha ritenuto essenziale procedere ad una analisi delle parti riguardanti l'endoscopia (cap 5, 8 e 9) al fine di:

- diffonderne la conoscenza tra gli operatori;
- valutarne la applicabilità nel contesto regionale
- revisionare le eventuali difformità rispetto alla normativa nazionale e regionale
- adottare modalità comportamentali comuni nel rispetto delle indicazioni contenute
- evitare difformità di interpretazione

Nello spirito del gruppo, si è adottata la metodologia di incontri aperti ai referenti di tutti i programmi di screening, seguita da un forum di discussione via mail. In aprile e maggio 2011 si sono tenuti due incontri, cui ha partecipato anche il coordinatore del gruppo patologi, dove sono stati presentati le diverse raccomandazioni e i diversi capitoli, per ognuno dei quali è stato dato ampio spazio alla discussione. I verbali delle riunioni sono stati inviati a tutti i componenti del gruppo, e le ultime indicazioni sono state raccolte in una terza riunione tenutasi il 30 Novembre 2011.
Questo documento costituisce la sintesi finale delle conclusioni emerse nelle diverse riunioni. Al fine di favorirne la diffusione, le raccomandazioni delle LGE sono state tradotte in italiano. Gli adattamenti alla realtà del Veneto, proposti e accettati dal gruppo, sono espressi in corsivo.
Per ulteriori approfondimenti e per le parti non inserite in questo documento si rinvia al testo originale (*http://screening.iarc.fr/doc/ND3210390ENC.pdf*).
Sebbene l'organizzazione dello screening nella nostra Regione sia ben consolidata da anni, si è ritenuto importante inserire la parte iniziale sull'organizzazione al fine mantenere elevati gli standard attuali e fornire un utile strumento di confronto con le amministrazioni.
Rimane intesa la validità dell'attuale normativa vigente, sia nazionale che regionale (accreditamento istituzionale) e degli indicatori di monitoraggio della qualità previsti sia dalla normativa nazionale che dal GISCoR.

Il coordinatore Fabio Monica

Hanno partecipato alla presentazione delle linee guida europee e alla revisione della letteratura:
Sofia Bencivenni, Enrico Bottona, Erica Cervellin, Alberto Fantin, Bastianello Germanà, Michela Rinaldi, Flavio Valiante
Hanno contribuito alla discussione: Anna Tomezzoli, Maurizio Azzurro, Gianluca Baldassarre, Andrea Ederle, Daniele Di Piramo, Giorgio Cavallarin, Luca Benazzato, Francesco Bortoluzzi, Ennio Guido, Erik Rosa Rizzotto, Franca De Lazzari, Marco Bisello, Giuseppe Del Favero; Helena Heras Salvat, Aurelio Schiavinato, Luca Lazzaro, Valeria Turriziani, Elisabetta Patarnello, Gaetano Scuderi, Luisa Milan, Attilio Pirillo, Armando Gabbrielli, Giorgio Battaglia, Stefano Realdon, Renato Marin.

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

## Organizzazione

Lo screening va eseguito in prossimità di centri adeguati (VI - C).

La pianificazione dei servizi di screening deve prendere in considerazione la frequenza di lesioni ad alto rischio nella popolazione, le competenze e l'equipaggiamento richiesti per la loro rimozione in modo sicuro e da personale esperto (III-B).

I servizi di screening dovrebbero esser previsti in modo che gli endoscopisti ottengano un adeguato volume di procedure per mantenere una competenza adeguata (>300/anno) (III-B)

Il responsabile dello screening dovrebbe accertarsi che il suo staff abbia le competenze necessarie, l'attrezzatura adeguata e che le complicanze possano venir trattate efficacemente (VI-A).

Una revisione dell'attrezzatura e del training richiesti dovrebbe essere eseguita prima di partire con lo screening (VI-A).

## Qualità e sicurezza

5.1.2 In caso di dubbi (competenza, tempo, tipo lesione, setting) la lesione va documentata in modo appropriato e inviato altrove per rimuovere la lesione (VI- A).
Il tasso di invii in altra sede per escissione di lesioni ad alto rischio dovrebbe essere un outcome da sottoporre ad audit (VI-B).

Livelli di competenza
**Livello 0:** Solo esami diagnostici (sigmoidoscopia - FS) con eventuale biopsia
**Livello 1:** FS diagnostica e operativa per lesioni <1 cm
**Livello 2:** Colonscopia con rimozione di lesioni polipoidi e sessili <2.5 cm (di facile accesso)
**Livello 3:** Colonscopia con rimozione di lesioni piatte <2 cm, trattabili endoscopicamente e di facile accesso.
Requisito minimo per colonscopia da FOBT+.
**Livello 4:** Colonscopia con rimozione di lesioni piatte di grandi dimensioni o di lesioni anche polipoidi di difficile accesso. Casi in cui deve essere valutata insieme al paziente l'opzione chirurgica
Centri di riferimento regionale

5.1.4 Considerazione del paziente
Nell'implementazione di centri deputati allo screening devono esser tenuti presente un'adeguata locazione degli stessi per favorire l'adesione allo screening da parte degli utenti. (VI-B).

5.1.5 Impatto dello screening
Va fatta una valutazione dell'impatto dello screening sui *tempi d'attesa per pazienti sintomatici* per assicurare un'adeguata capacità di eseguire gli esami indotti dallo screening evitando di prolungare i tempi d'attesa per pazienti sintomatici (VI-B).

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

5.1.6 Infrastrutture ed efficienza

Le strutture devono essere adeguate, prevedendo la necessità di spazi adeguati per la valutazione pre-esame e ricovero e devono essere strutturate per permettere un ottimale flusso dei pazienti(VI-B). Un ambiente accogliente in grado di mantenere la privacy e la dignità degli utenti (VI-B).

5.1.7 Competenze dell'endoscopista e dello staff di supporto

È requisito fondamentale di qualità che tutti gli endoscopisti ed i centri che eseguono gli esami endoscopici partecipino a programmi di miglioramento continuo della qualità (VI-A).

5.1.8 Servizi di supporto

Si raccomanda che ogni centro di screening esegua una valutazione dei rischi e sviluppi l'abilità a rispondere ad eventuali emergenze (VI-A).

ALLEGATO E Dgr n. del pag. 4 12

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

**PRIMA DELLA COLONSCOPIA**

5.3.1. Consenso informato

La buona pratica clinica impone ad ogni servizio di endoscopia di avere procedure che guidino la raccolta del consenso, compreso la possibilità di ritirare il consenso all'esame immediatamente prima o anche durante l'esame (VI -B).
Gli elementi chiave dell'informazione al paziente sono:

- Notizie riguardanti terapie farmacologiche in corso, compreso la TAO e la terapia antiaggregante
- Notizie riguardanti precedenti patologie
- I benefici dell'esame
- Come prepararsi all'esame (compresa la pulizia intestinale)
- Come si svolge l'esame
- I possibili eventi avversi compreso il fastidio e le complicanze
- Di cosa potrà avere bisogno il paziente dopo l'esame, in particolar modo se è stata fatta la sedazione cosciente
- La assoluta necessità che il paziente si astenga dal guidare l'auto o dal prendere decisioni importanti finché è sotto effetto dei sedativi

5.3.2 Elementi che possono influenzare l'esito dell'esame e che quindi vanno valutati prima di iniziare la procedura:

- Uso di anticoagulanti orali
- Caratteristiche anatomiche (nelle donne)
- Età del paziente
- Precedenti interventi chirurgici sull'addome
- BMI
- Malattia diverticolare
- Punteggio ASA, ed informazioni che possono influenzare la scelta del tipo e del dosaggio della sedazione
- Presenza di fattori di rischio per endocardite

*La pre-valutazione delle persone da sottoporre a colonscopia non viene consigliata.*
*Nota: nel riconoscere la validità della valutazione nei soggetti positivi al SOF, si ritiene che nel Veneto la elevata adesione alla colonscopia e lo stato di avanzamento dei programmi, non rendano necessario ricorrere alla pre-valutazione. Si nutrono invece timori che l'impegno di risorse richiesto possa andare a discapito dei tempi di esecuzione della colonscopia.*

5.3.3. Pulizia intestinale

SIGMOIDOSCOPIA
La preparazione per la SIGMOIDISCOPIA di screening si dovrebbe effettuare o con il clisma oppure con la preparazione per os (II). L'opzione di scelta sembra essere il singolo clisma auto-somministrato, anche se dovrebbero essere tenuti in considerazione fattori culturali (tradizioni) così come le preferenze del paziente stesso (II-B).

REGIONE DEL VENETO giunta regionale SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

COLONSCOPIA

Allo stato attuale delle conoscenze nessuna preparazione e' risultata migliore rispetto alle altre (I), sebbene il Na fosfato sia meglio tollerato e la preparazione frazionata (una parte la sera prima dell'esame e la seconda la mattina stessa dell'esame) abbia dimostrato migliori risultati (II). E' dunque raccomandato che ogni Centro adotti un proprio protocollo di preparazione, monitorando nel tempo la sua efficacia (VI-A).

I prodotti per la preparazione intestinale dovrebbero essere distribuiti alla popolazione di screening in modo da non far spostare troppo il paziente. Le istruzioni sul modo di assumere la preparazione devono essere chiare e semplici. Per la sigmoidoscopia si potrebbe prevedere di eseguire il clisma direttamente nella Unità di endoscopia digestiva (VI-B).

5.3.4. Prenotazione dell'esame

Occorre fare il possibile per evitare cancellazioni di prenotazioni o mancata presentazione all'esame, magari inviando per tempo l'invito con la possibilità da parte del paziente di modificare la data se non gradita.

5.3.5 Tempistica

Pur non essendo essenziale da un punto di vista biologico una rapida esecuzione del test di secondo livello in un programma di screening, è evidente che un ritardo può ingenerare notevole ansia nel soggetto. Per evitare questo aumento non necessario di ansia è necessario che la colonscopia dopo un SOF positivo sia effettuata nel minor tempo ragionevolmente possibile, ma non oltre i 31 giorni dalla notifica del test di primo livello (accettabile >90%, desiderabile >95%) (VI-B).

5.3.6 Ambiente

L'ambiente dovrebbe essere confortevole, offrire la necessaria privacy e permettere conversazioni private da parte del personale con i pazienti ed i loro familiari. Le aree di accoglienza e di valutazione dovrebbero essere divise da quelle per il risveglio (VI-B).




**DURANTE LA COLONSCOPIA**

5.4.1 Pulizia e disinfezione

È raccomandabile che le procedure di disinfezione siano quelle delle linee guida europee (ESGE-ESGENA) o nazionali e che vengano periodicamente revisionate (VI-A).

5.4.2 Tecnologie per migliorare il raggiungimento del cieco

Sono raccomandati gli endoscopi a rigidità variabile (I-B) e l'uso della Magnetic Endoscopic Imaging (MEI) sarebbe utile, soprattutto per i pazienti non sedati(II-B)

*Si ritiene che queste indicazioni non siano applicabili*

*Nota: il tasso di raggiungimento del cieco è attualmente elevato e, a fronte di un minimo incremento, non sembra giustificato un importante investimento economico per l'acquisto degli endoscopi a rigidità variabile. L'uso del MEI è ritenuto importante per l'attività di formazione, ma non nella pratica clinica quotidiana.*

5.4.3 Tecniche e tecnologie per migliorare la detection

Dovrebbero essere usati video endoscopi flessibili con possibilità di applicare la cromoendoscopia (III-B) e la magnificazione associata a cromoendoscopia migliora la diagnosi (II).

*Allo stato attuale delle evidenze si ritiene applicabile la cromoendoscopia solo sulle lesioni focali.*

*Nota: la letteratura in materia non evidenzia univocamente un vantaggio nella detection rate con l'applicazione della cromo endoscopia, che allunga i tempi di esecuzione dalla colonscopia e ne aumenta i costi.*

Il volume degli accessori deve corrispondere alla domanda (VI-B) e ci dovrebbe essere una fornitura adeguata di accessori (VI-B).

L'uso di accessori riutilizzabili dovrebbe essere basato alle politiche nazionali (VI-B).

L'attrezzatura per la rianimazione dovrebbe essere presente nella sala endoscopica e nell'area di risveglio (VI-B).

La manutenzione dell'attrezzatura dovrebbe essere fatta da personale competente (V A) e dovrebbe essere fatta una revisione periodica del funzionamento di tutti gli endoscopi in accordo con le istruzioni del produttore e le linee guida europee (VI B).

I risultati delle revisioni dovrebbero essere sempre disponibili nelle UO di endoscopia (VI A).

5.4.4 Sedazione e confort

Si raccomanda che ci siano politiche locali e processi per ottimizzare la sedazione e il monitoraggio del paziente per massimizzare la sopportazione e minimizzare il rischio di complicanze (I B).

*Va continuata e rafforzata l'offerta della sedazione cosciente.*

*Nota: i dati di letteratura hanno evidenziato come la sedazione non solo migliora l'accettabilità dell'esame da parte dei pazienti, ma migliora la performance della colonscopia (es. tasso di raggiungimento del cieco). Le linee guida nazionali e le linee di indirizzo del gruppo raccomandano la sedazione cosciente.*

ALLEGATO E Dgr n. del pag. 7 / 12

L'uso del biossido di carbonio è raccomandato (I A), dovrebbe essere evitato nei pazienti con BPCO o con ridotta funzione polmonare.
*Non si ritiene raccomandabile, ma utile.*
*Nota: i lavori pubblicati, di ottimo livello, sono stati prodotti da un ristretto gruppo di autori e si ritiene prematuro, anche per le ripercussioni economiche, raccomandarne l'uso.*

5.4.5 Tecnica e performance dell'endoscopista

La qualità della colonscopia non dipende solo dalla completa intubazione del colon, ma è altrettanto importante la attenta e completa visualizzazione della mucosa durante la fase di retrazione (I - A).

Si raccomanda la registrazione del numero di CS/anno eseguite da ogni operatore al fine di garantire che il volume di attività sia sufficiente (III - A).
Ogni operatore dovrebbe eseguire almeno 300 CS/anno anche se un maggior numero sarebbe desiderabile e i servizi dovrebbero essere pianificati per garantirlo (III - B).
La completezza della CS dovrebbe essere documentata da foto (valvola ileocecale e cieco) o da videoclip (VI - A).
Il raggiungimento del cieco è l'indicatore primario: tasso grezzo accettabile >90%, desiderabile > 95% (III A).
*GISCoR: accettabile >85% desiderabile >90%*
*Nota: essendo i parametri di riferimento nazionale quelli indicati dal GISCoR, non si ritiene indicato discostarsene almeno fino a quando non saranno cambiati a livello nazionale.*
I motivi di incompleta esplorazione dovrebbero essere documentati e riesaminati (III - B).
Per valutare la qualità della colonscopia si devono adottare come minimo i seguenti esiti (VI - A):
- Tasso di invio al programma di sorveglianza
- Tempo di retrazione dell'endoscopio dal cieco all'ano

I servizi devono essere in grado di identificare e registrare gli eventi avversi dopo la dimissione (VI - B). Si raccomandano:

1. contattare il paziente entro un periodo prestabilito
2. mortalità a 30 giorni
3. ospedalizzazione a 8 giorni

Il motivo per il ricovero dovrebbe essere indicato (III - A):

- Dolore addominale
- Perforazione sospetta o confermata
- Sanguinamento
- Complicanze cardiorespiratorie
- Altro

REGIONE DEL VENETO Giunta Regionale PROGRAMMAZIONE SANITARIA SEZIONE ATTUAZIONE

### 8.3 Gestione delle lesioni pre-neoplastiche colorettali

Le lesioni pre-neoplastiche riscontrate all'endoscopia di screening devono essere asportate (III-A) e devono essere recuperate per l'esame istologico (VI-A).

Le lesioni colorettali devono essere asportate solo da endoscopisti con un adeguato training in tecniche di polipectomia (V-A).

Lesioni sessili ≥ 20 mm (large) del retto devono essere valutate per asportazione chirurgica per via transanale (II-B) e la microchirurgia endoscopica transanale è il metodo preferito per l'escissione locale (II-B).

Bisogna considerare un centro di riferimento terziario per pazienti con grandi lesioni sessili colorettali.

Pazienti con grandi lesioni pre-neoplastiche non asportabili endoscopicamente devono essere inviati alla resezione chirurgica (VI-A).

Bisogna prendere i dovuti provvedimenti prima di eseguire interventi di asportazione per via endoscopica in pazienti in terapia anticoagulante (V-A).

Nei pazienti con stent coronarici nudi, la polipectomia deve essere procrastinata almeno di un mese dal posizionamento degli stent, quando diventa sicura la sospensione temporanea del clopidogrel (V-B).

Nei pazienti con stent coronarici medicati, la polipectomia deve essere procrastinata di 12 mesi dal posizionamento degli stent, quando diventa sicura la sospensione temporanea del clopidogrel (V-B).

Nei pazienti con stent coronarici medicati, quando la polipectomia precoce è necessaria, può essere procrastinata di soli 6 mesi dal posizionamento degli stent, quando diventa probabilmente sicura la sospensione temporanea del clopidogrel (VI-C ).

La terapia con aspirina può (IV-C),e nei pazienti con stent deve, essere proseguita prima e durante la polipectomia (VI-B).

### 8.4 Gestione dei cancri pT1

Se c'è il sospetto clinico di un cancro pT1 la sede deve essere marcata con iniezione sottomucosa di inchiostro di china (VI-C).

Dove un cancro pT1 viene considerato ad alto rischio per malattia residua, bisogna considerare la resezione colica con linfoadenectomia radicale, sia per cancri del retto (II-A) che del colon (VI-A). Se è raccomandata l'escissione chirurgica, va considerato un parere da un secondo anatomopatologo poiché esistono difformità nella valutazione delle lesioni ad alto rischio (III-A).

ALLEGATO E Dgr n. del pag. 9112

Dopo l'asportazione di un cancro pT1, bisogna istituire un regime di follow-up standard (VI-A). Il programma di sorveglianza degli adenomi ad alto rischio è appropriato per il cancro pT1 a basso rischio (III-B), mentre un programma più intensivo dovrebbe essere riservato ai cancri pT1 ad alto rischio che non sono stati avviati a chirurgia.

## SORVEGLIANZA POST-POLIPECTOMIA

### 9.2 FATTORI DI RISCHIO PER NEOPLASIE AVANZATE DOPO RIMOZIONE DI ADENOMI.

9.2.1 Qualità della colonscopia e della polipectomia

La stratificazione del rischio dipende da un'accurata identificazione e rimozione degli adenomi; in caso contrario il rischio verrà sottostimato (III – A).

L'esame deve essere effettuato soltanto in presenza di una adeguata preparazione intestinale (VI – A).

L'esame deve essere completo sino al cieco e sufficientemente lento ed accurato durante la fase di retrazione dell'endoscopico (I – A).

In caso di colonscopia incompleta è necessario, se possibile, ripetere l'indagine oppure completare lo studio mediante tecniche alternative, in particolare nei soggetti ad alto rischio (VI – B)

In caso di polipectomia piecemeal ricontrollare la sede dopo 2-3 mesi ed *eventualmente eseguire biopsie**. Trattare piccole aree di tessuto residuo e ricontrollare dopo altri 3 mesi. In caso di ampie lesioni residue prendere in considerazione la resezione chirurgica.

** L'esecuzione di biopsie aumenta di poco il tempo di esame e l'aumento dei costi dovrebbe essere modesto, a fronte di un dato sicuro per il paziente.*

9.2.2 Caratteristiche degli adenomi

Il numero di adenomi è il più consistente fattore predittivo di neoplasia avanzata durante il follow-up.

Le dimensioni dell'adenoma hanno minore valore predittivo di neoplasia avanzata. Si raccomanda di riportare le dimensioni in millimetri e, quando presenti, usare le misure del patologo.

La presenza della componente villosa appare come un fattore predittivo inconsistente.

L'evidenza disponibile pare non dare alla displasia di alto grado il valore di fattore predittivo indipendente. Peraltro, la modesta numerosità di adenomi più piccoli di 10mm con displasia di alto grado deve far porre cautela in questa interpretazione. Si raccomanda di decidere individualmente se sorvegliare soggetti con adenomi < 10mm con displasia di alto grado (III – C).

9.2.3 Caratteristiche del paziente

Sebbene l'età elevata porti maggior rischio di neoplasia avanzata, essa non è un'indicazione ad una sorveglianza più stretta.

Non vi sono evidenze che suggeriscano raccomandazioni differenti per pazienti con anamnesi familiare di cancro colorettale a meno che non si sospetti una sindrome familiare ereditaria (III – B).

## 9.3 STRATIFICAZIONE DEL RISCHIO

BASSO RISCHIO: pazienti con 1 - 2 adenomi < 10mm, *tubulari e con displasia di basso grado*.

RISCHIO INTERMEDIO: pazienti con 3 – 4 adenomi o almeno 1 adenoma > 10mm e < 20mm, *o almeno 1 adenoma con componente villosa o displasia di alto grado.*

ALTO RISCHIO: pazienti con 5 o più adenomi o un adenoma > 20mm.

*Nota: sono state considerate le attuali indicazioni contenute nei documenti nazionali e nelle linee guida americane, su cui ci si basava finora per categorizzare gli adenomi ed è prevalso un atteggiamento conservativo in tal senso.*

**INTERVALLI DELLA SORVEGLIANZA**

BASSO RISCHIO:
non si raccomanda la sorveglianza. Rientra nel programma di screening. (III – A) *con SOF a 5 anni. In casi particolari è possibile rinviare a colonscopia a 5 anni.*
*Nota: questo capitolo rappresenta forse l'aspetto più innovativo ma anche il più discusso e discutibile, in quanto in contrasto con quando finora affermato in letteratura e nelle linee guida internazionali (follow up endoscopico). Nonostante le perplessità nell'accettare la raccomandazione al SOF, si è preferito dare un margine di discrezionalità al medico che ha eseguito l'esame, garantendo anche l'opzione colonscopia*

RISCHIO INTERMEDIO:
colonscopia di controllo a 3 anni (II – A). Dopo un esame negativo, la sorveglianza può essere portata a 5 anni (V – C). Dopo due esami negativi il pazienta rientra nel programma di screening.

ALTO RISCHIO:
colonscopia di controllo a 1 anno alla ricerca di lesioni non identificate (III – B). Se negativa o in presenza di adenomi a basso/intermedio rischio inizia sorveglianza con colonscopia ogni 3 anni. Dopo 2 esami negativi l'intervallo può essere esteso a 5 anni (V – C). Mancando evidenza sulla sicurezza dell'interruzione della sorveglianza essa dovrebbe continuare, considerando anche le raccomandazioni seguenti (VI – C).

*Vedi figura 1.*

## 9.4.2 INTERRUZIONE DELLA SORVEGLIANZA

La decisione di effettuare ciascuna colonscopia di sorveglianza dovrebbe dipendere non solo dalle caratteristiche dell'adenoma, ma anche dall'età, dalla sua volontà e dalla presenza di comorbilità. Pertanto, le condizioni del paziente vanno valutate di volta in volta.
Il cutt-off di età per interrompere la sorveglianza è abitualmente posto a 75 anni ma anche questo dipende dalla volontà del paziente e dalla presenza di comorbilità (VI – A).

ALLEGATO E Dgr n. del pag. 11 | 12

## 9.4.3 INSORGENZA DI NUOVI SINTOMI

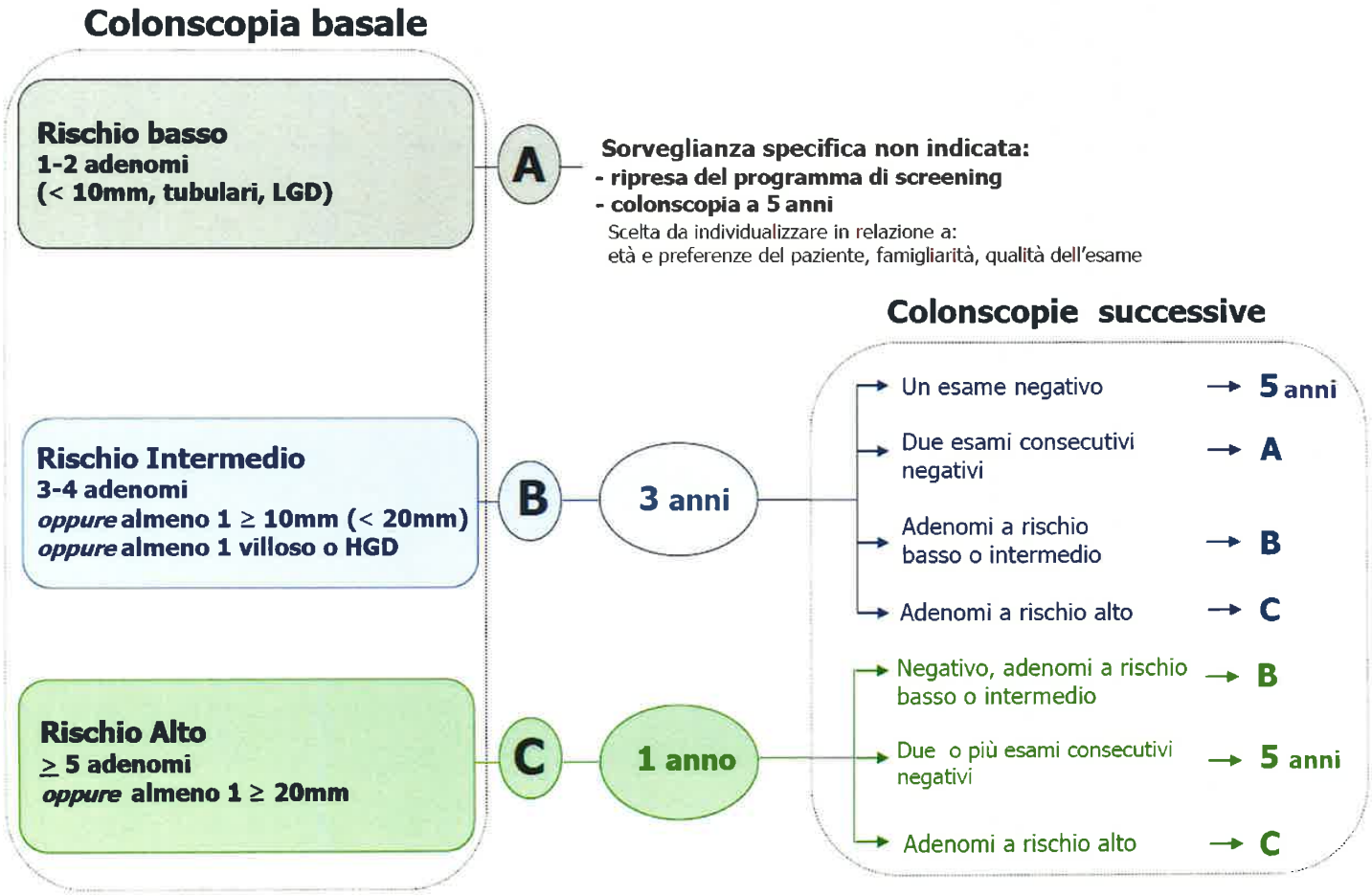
La comparsa di nuovi sintomi va sempre valutata in quanto una colonscopia recente riduce fortemente il rischio di neoplasia avanzata ma non lo esclude completamente (III – A).

## 9.5 SORVEGLIANZA DOPO RIMOZIONE DI LESIONI DI ALTRO TIPO

**Cancro pT1**: per loro natura solo lesioni ad alto rischio per cui, una volta asportati, vanno sorvegliati come gli adenomi ad alto rischio (III – B).
**Adenoma serrato**: deve essere sottoposto a programmi di sorveglianza come qualsiasi altro adenoma; non esistono evidenze che suggeriscano intervalli differenti (VI – C).
**Polipo iperplastico**: non vi sono evidenze che dimostrino un aumento del rischio per i polipi iperplastici < 10mm dei tratti colici distali; pertanto non è necessaria la sorveglianza. La presenza di uno o più polipi iperplastici > 10mm o per lesioni serrate non-neoplastiche in qualsiasi tratto colico, o la presenza di multiple lesioni di qualsiasi tipo < 10mm nel colon prossimale può implicare un aumento del rischio; peraltro, non vi sono dati disponibili per raccomandare intervalli di sorveglianza specifici (VI – B).

REGIONE DEL VENETO
Giunta regionale
SEZIONE ATTUAZIONE PROGRAMMAZIONE SANITARIA

**Figura 1: stratificazione degli adenomi per livello di rischio ed intervalli per la sorveglianza**



(Codice interno: 326321)

DELIBERAZIONE DELLA GIUNTA REGIONALE n. 1058 del 29 giugno 2016

**POR FESR 2014-2020. Asse 3 Azione 3.5.1 "Interventi di supporto alla nascita di nuove imprese sia attraverso incentivi diretti, sia attraverso l'offerta di servizi, sia attraverso interventi di micro finanza, sub-azione D "Imprese naturalistiche". Approvazione "Bando per l'erogazione di contributi alle nuove imprese naturalistiche".**

*[Programmi e progetti (comunitari, nazionali e regionali)]*

| Note per la trasparenza: |
| --- |
| Avvio di una linea di finanziamento, con fondi POR FESR 2014-2020 per incentivare gli investimenti in nuove attività imprenditoriali operanti nell'ambito della promozione, conservazione e tutela del patrimonio naturale, anche con metodi innovativi. |

Il relatore riferisce quanto segue.

Con Comunicazione COM (2010) 2020 del 03/03/2010 la Commissione Europea ha adottato il documento "Europa 2020" che prevede una strategia per una crescita intelligente, sostenibile e inclusiva. In seguito, il 17 dicembre 2013 il Parlamento Europeo e il Consiglio hanno approvato il pacchetto di Regolamenti sui Fondi strutturali e di Investimento Europei (fondi SIE) per il periodo 2014-2020.

In particolare, il Regolamento (UE) n. 1303/2013 ha definito le norme comuni ai fondi SIE e il Regolamento (UE) n. 1301/2013 ha definito le norme specifiche relative al Fondo Europeo di Sviluppo Regionale (FESR).

La Giunta Regionale del Veneto, dopo la consultazione partenariale, ha approvato con CR n. 77 del 17/06/2014 la proposta di POR FESR 2014-2020 successivamente trasmessa, conformemente a quanto stabilito dall'art. 9 della LR n. 26/2011, al Consiglio Regionale per l'esame e l'approvazione definitiva, avvenuta con Deliberazione n. 42 del 10/07/2014.

L'Autorità di Gestione del POR FESR il 21/07/2014 ha quindi formalmente inviato tale proposta alla Commissione Europea.

Conformemente a quanto indicato nell'art. 29 del Reg. 1303/2013, con nota C(2014) 7854 final del 21/10/2014, la Commissione Europea ha formulato una serie di osservazioni aprendo così ufficialmente la fase di negoziato.

A conclusione di tale fase, con Decisione C(2015) 5903 final del 17/08/2015 è stato approvato il POR FESR della Regione del Veneto e la Giunta Regionale ne ha preso atto con DGR n. 1148 del 01/09/2015.

In applicazione dell'art. 110 c. 2 del Reg 1303/2013, il Comitato di Sorveglianza del POR FESR 2014-2020, istituito con DGR n. 1500 del 29/10/2015, in data 3 febbraio 2016 ha approvato i Criteri di Selezione delle Operazioni, con i quali sono stati fissati i parametri che dovranno guidare la fase di ammissione e valutazione delle domande di sostegno.

Richiamata la Deliberazione di Giunta Regionale n. 1148 del 01/09/2015, recante la presa d'atto dell'approvazione del POR FESR da parte della Commissione Europea, e dato atto che nel POR approvato al punto 2.A.6.1 dell'azione 3.5.1 "Interventi di supporto alla nascita di nuove imprese sia attraverso incentivi diretti, sia attraverso l'offerta di servizi, sia attraverso interventi di micro finanza", sub-azione D "Imprese naturalistiche" è prevista l'emanazione di un bando regionale per la selezione dei progetti da finanziare.

Dato atto che, in tale contesto, la sfida che si intende sostenere con questa azione, consiste nella creazione di nuova imprenditorialità e nello sfruttamento economico delle nuove idee create da imprese naturalistiche (PMI che svolgono attività di valorizzazione e promozione di siti a forte valenza naturalistica, in particolare nelle aree della Rete ecologica regionale, Aree a Parco naturale e aree Natura 2000) ci si prefigge, pertanto, di raggiungere tale obbiettivo mediante il sostegno a supporto alla nascita di nuove imprese.

Con la presente deliberazione si provvede, all'approvazione di un bando di selezione dei beneficiari, rivolto alle piccole e medie imprese, le cui specifiche sono indicate in dettaglio nell'**Allegato A** "Bando per l'erogazione di contributi alle nuove imprese naturalistiche"; il presente provvedimento contiene, altresì, l'**Allegato B** "Progetto imprenditoriale"**,** l'**Allegato C** "Dichiarazione di intenti per i promotori d'impresa", l'**Allegato D** "Dichiarazione circa gli aiuti "De Minimis" (comprese le istruzioni per la corretta compilazione e il modello da utilizzare in caso di controllate/controllanti)"**,** l'**Allegato E** "Convenzione con l'Ente Gestore dell'Area Protetta", l'**Allegato F** "Modello di procura"**,** l'**Allegato G** "Dichiarazione per la regolarità contributiva"**.**

L'importo di euro 1.000.000,00 messo a bando sarà finanziato mediante l'utilizzo dei fondi stanziati nell'ambito dell'asse 3 Competitivita' dei sistemi produttivi del POR FESR 2014-2020 sui seguenti capitoli:

Capitolo 102562 "POR FESR 2014-2020 Asse 3 "Sviluppo economico e competitività" - Quota comunitaria - Contributi agli investimenti (Dec. UE 17/08/2015, N. 5903);

Capitolo 102563 "POR FESR 2014-2020 - Asse 3 "Sviluppo economico e competitività" - Quota statale - Contributi agli investimenti (Dec. UE 17/08/2015, N. 5903);

Capitolo 102564 "POR FESR 2014-2020 - Asse 3 "Sviluppo economico e competitività" - Quota regionale - Contributi agli investimenti (Dec. UE 17/08/2015, N. 5903)";

che presentano sufficiente disponibilità su bilancio di previsione 2016-2018. Tale spesa verrà impegnata con successivi provvedimenti dal Direttore della Sezione Parchi, Biodiversità, Programmazione Silvopastorale e Tutela dei Consumatori.

Nel citato **Allegato A** sono indicati, tra l'altro, i requisiti da possedere per poter presentare domanda, i criteri di priorità degli stessi, nonché le tempistiche per la presentazione delle domande.

L'attività istruttoria di selezione dei progetti sarà affidata alla Sezione Parchi, Biodiversità, Programmazione Silvopastorale e Tutela dei Consumatori.

La Sezione Programmazione e Autorità di Gestione FESR, incaricata quale Autorità di Gestione del Programma Operativo Regionale parte FESR 2014-2020 dalla DGR n. 2611 del 30 dicembre 2013, ha dato riscontro, con nota prot. n. 237057 del giorno 17 giugno 2016, della conformità del presente provvedimento con il POR FESR 2014 - 2020 della Regione del Veneto e con i Criteri di Selezione delle Operazioni.

Il relatore conclude la propria relazione e propone all'approvazione della Giunta regionale il seguente provvedimento.

LA GIUNTA REGIONALE

UDITO il relatore, il quale dà atto che la struttura proponente ha attestato l'avvenuta regolare istruttoria della pratica, anche in ordine alla compatibilità con la vigente legislazione statale e regionale, e che successivamente alla definizione di detta istruttoria non sono pervenute osservazioni in grado di pregiudicare l'approvazione del presente atto;

Vista la Comunicazione COM (2010) del 03/03/2010 della Commissione Europea;

Visto il Regolamento (UE) n. 1303/2013 del Parlamento Europeo e del Consiglio;

Visto il Regolamento (UE) n. 1301/2013 del Parlamento Europeo e del Consiglio;

Visto il Regolamento delegato (UE) n. 240/2014 della Commissione;

Vista la Decisione C(2015) 5903 final del 17/08/2015;

Vista la Legge Regionale n. 26 del 25 novembre 2011;

Vista la Deliberazione del Consiglio Regionale n. 42 del 10/07/2014;

Vista la CR n. 77 del 17/06/2014;

Vista la DGR n. 942 del 17/06/2013, integrata con DGR n. 406 del 04/04/2014;

Vista la DGR n. 1148 del 01/09/2015;

Vista la DGR n. 1500 del 29/10/2015;

Vista la nota della Sezione Programmazione e Autorità di Gestione FESR prot. n. 237057 del giorno 17 giugno 2016;

Visto l'art. 2 c. 2 della Legge Regionale n. 54 del 31 dicembre 2012;

Vista la Legge Regionale n. 8 del 24 febbraio 2016 con cui è stato approvato il bilancio regionale di previsione 2016-2018.

delibera

1. di considerare le premesse parte integrante del presente provvedimento e di approvare i criteri e le modalità di ammissione ai finanziamenti di cui all'Azione 3.5.1 del POR FESR 2014-2020 "Interventi di supporto alla nascita di nuove imprese sia attraverso incentivi diretti, sia attraverso l'offerta di servizi, sia attraverso interventi di micro finanza, Sub-Azione D "Imprese naturalistiche", secondo quanto stabilito in narrativa, e conformemente ai seguenti allegati al presente provvedimento:

- **Allegato A** "Bando per l'erogazione di contributi alle nuove imprese naturalistiche";
- **Allegato B** "Progetto imprenditoriale"**;**
- **Allegato C** "Dichiarazione di intenti per i promotori d'impresa";
- **Allegato D** "Dichiarazione circa gli aiuti "De Minimis" (comprese le istruzioni per la corretta compilazione e il modello da utilizzare in caso di controllate/controllanti)"**;**
- **Allegato E** "Convenzione con l'Ente Gestore dell'Area Protetta";
- **Allegato F** "Modello di procura"
- **Allegato G** "Dichiarazione per la regolarità contributiva"**.**

2. di incaricare il Direttore della Sezione "Parchi, Biodiversità, Programmazione Silvopastorale e Tutela dei Consumatori" dell'esecuzione del presente atto;

3. di dare atto che l'importo massimo complessivo delle obbligazioni di spesa relative al bando è determinato in 1.000.000,00, alla cui assunzione provvederà con propri atti il Direttore della "Sezione "Parchi, Biodiversità, Programmazione Silvopastorale e Tutela dei Consumatori" sui capitoli:

Capitolo 102562 "POR FESR 2014-2020 Asse 3 "Sviluppo economico e competitività" - Quota comunitaria - Contributi agli investimenti (Dec. UE 17/08/2015, N. 5903);

Capitolo 102563 "POR FESR 2014-2020 - Asse 3 "Sviluppo economico e competitività" - Quota statale - Contributi agli investimenti (Dec. UE 17/08/2015, N. 5903);

Capitolo 102564 "POR FESR 2014-2020 - Asse 3 "Sviluppo economico e competitività" - Quota regionale - Contributi agli investimenti (Dec. UE 17/08/2015, N. 5903)";

che presentano adeguata disponibilità su bilancio di previsione 2016-2018;

4. di dare atto che la somma massima assegnabile, pari ad Euro 1.000.000,00 non rientra nelle tipologie soggette a limitazioni ai sensi della LR 1/2011;

5. di dare atto che il presente provvedimento è soggetto a pubblicazione ai sensi degli articoli 26 e 27 del decreto legislativo 14 marzo 2013, n. 33;

6. di pubblicare la presente deliberazione nel Bollettino ufficiale della Regione.

REGIONE DEL VENETO

**ALLEGATO A** **DGR nr. 1058 del 29 giugno 2016** 

2014/2020 POR FESR / REGIONE DEL VENETO

UNIONE EUROPEA

REGIONE DEL VENETO

Un moltiplicatore di opportunità.
Da non lasciarsi sfuggire.

POR FESR 2014 – 2020 DEL VENETO
OBIETTIVO
"INVESTIMENTI A FAVORE DELLA CRESCITA E DELL'OCCUPAZIONE"

# Bando per l'erogazione di contributi alle nuove imprese naturalistiche

Il POR FESR 2014 – 2020 del Veneto è stato approvato con decisione della Commissione europea (CE) C (2015) 5903 final del 17 agosto 2015
Il presente Bando dà attuazione all'Asse 3 "COMPETIVITA' DEI SISTEMI PRODUTTIVI"
PRIORITA' DI INVESTIMENTO 3 (A) "PROMOZIONE DELL'IMPRENDITORIALITA', IN PARTICOLARE FACILITANDO LO SFRUTTAMENTO ECONOMICO DI NUOVE IDEE E PROMOZIONE DELLA CREAZIONE DI NUOVE AZIENDE, ANCHE ATTRAVERSO INCUBATORI DI IMPRESE"
OBIETTIVO SPECIFICO 3.5 "NASCITA E CONSOLIDAMENTO DELLE MICRO, PICCOLE E MEDIE IMPRESE"
AZIONE 3.5.1 "Interventi di supporto alla nascita di nuove imprese sia attraverso incentivi diretti, sia attraverso l'offerta di servizi, sia attraverso interventi di micro finanza […]"
Sub-Azione D "Imprese naturalistiche"

**BANDO**

Per la presentazione delle domande di sostegno secondo i criteri e le modalità di seguito riportate.

INDICE

Finalità del bando
Art. 1. Finalità e oggetto del bando
Art. 2. Dotazione finanziaria
Art. 3. Localizzazione

Soggetti potenziali beneficiari
Art. 4. Soggetti ammissibili

Tipologie di interventi ammissibili
Art. 5. Interventi ammissibili
Art. 6. Spese ammissibili
Art. 7. Spese non ammissibili
Art. 8. Forma, soglie ed intensità del sostegno
Art. 9. Divieto di cumulo

Presentazione delle domande e istruttoria
Art. 10. Termini e modalità di presentazione della domanda
Art. 11. Valutazione delle domande
Art. 12. Documentazione da presentare a corredo della domanda di partecipazione nei modi e nei termini previsti ai commi 10.2 e 10.3
Art. 13. Svolgimento delle attività, variazioni, proroghe e relativi obblighi

Sostegno
Art. 14. Modalità di erogazione del sostegno e rendicontazione

Verifiche e controlli
Art. 15. Rinuncia e decadenza del sostegno
Art. 16. Verifiche e controlli del sostegno

Pubblicità, informazioni generali e informativa sul trattamento sui dati personali
Art. 17. Obblighi di informazione e pubblicità
Art. 18. Disposizioni finali e normativa di riferimento
Art. 19. Informazioni generali
Art. 20. Informativa ai sensi dell'art. 13 del D.Lgs. n. 196/2003

**Articolo 1**
**Finalità e oggetto del bando**

1.1 Con il presente bando la Regione intende incentivare gli investimenti in nuove attività imprenditoriali operanti nell'ambito della promozione, conservazione e tutela del patrimonio naturale, anche con metodi innovativi. L'obiettivo riguarda l'incremento della fruibilità degli ambienti naturali, anche attraverso metodi innovativi di visita, mediante lo sviluppo di attività di imprese operanti all'interno di aree naturali di pregio. Le iniziative promosse consentiranno di aumentare o migliorare le opportunità e l'attrattività delle aree coinvolte, portando una ricaduta diretta sul numero di visitatori e consentendo alla popolazione, anche non direttamente beneficiaria del sostegno di usufruire di un indotto che favorirà il miglioramento del contesto sociale ed economico entro cui operano le stesse imprese finanziate. Nella regione Veneto è presente una complessa rete ecologica costituita da: parchi d'interesse locale (art. 27 LR 40/84), parchi e riserve di interesse regionale (LR 40/84 e L. 394/91), rete ecologica europea Natura 2000, aree naturali "minori" (censimento operato dall'Agenzia Regionale per la Prevenzione e la Protezione ambientale del Veneto ARPAV 2004) e aree naturali che rientrano nel patrimonio dell'Umanità e riserva di Biosphera MAB secondo le definizioni dell'UNESCO.
La conoscenza di questi ambienti da parte della collettività e quindi una maggior sensibilizzazione della stessa, contribuirà ad un uso cosciente e rispettoso delle risorse ambientali.

1.2 Il Bando è emanato nel rispetto dei principi generali di cui al decreto legislativo 31 marzo 1998 n. 123 "Disposizioni per la razionalizzazione degli interventi di sostegno pubblico alle imprese, a norma dell'articolo 4, comma 4, lettera c), della L. 15 marzo 1997, n. 59".

1.3 Il Bando garantisce il rispetto dei principi di pari opportunità e non discriminazione come sanciti dall'art. 7 del Regolamento (UE) n. 1303/2013 e di sviluppo sostenibile di cui all'art. 8 del medesimo Regolamento.

**Articolo 2**
**Dotazione finanziaria**

L'azione ha una dotazione finanziaria pari ad 1.000.000,00 di euro.

**Articolo 3**
**Localizzazione**

3.1 Gli interventi del presente bando possono essere realizzati sull'intero territorio regionale, purché abbiano come obbiettivo la promozione, la valorizzazione e la conservazione della Rete Ecologica Regionale così composta:

- il sistema delle aree naturali protette presenti nel territorio regionale del Veneto;
- le zone speciali di conservazione, i siti di importanza comunitaria proposti ed approvati e le zone di protezione speciale, facenti parte della rete Natura 2000;
- gli ambiti individuati nel Piano Territoriale Regionale di Coordinamento per le parti non regolate dalle leggi istitutive delle aree naturali protette, che restano comunque soggette alle norme di salvaguardia previste dal P.T.R.C;
- i parchi di interesse locale;
- i corridoi ecologici e le altre strutture di collegamento e funzionamento della rete, così come individuate negli strumenti di pianificazione territoriale regionale e provinciale;
- *le aree naturali che rientrano nel patrimonio dell'Umanità* e riserva di Biosphera MAB secondo *le definizioni dell'UNESCO.*

3.2 La localizzazione dell'intervento dovrà essere individuata in fase di presentazione della domanda. Nel caso in cui al momento della presentazione della domanda tale localizzazione non sia stata ancora definita, si potrà indicare una localizzazione ipotetica, fermo restando quanto stabilito dall'art. 4 comma 4.1 lett. c).

## Soggetti potenziali beneficiari

**Art. 4**

**Soggetti ammissibili**

4.1 Sono ammesse alle agevolazioni le imprese naturalistiche, ovvero micro, piccole e medie imprese (PMI), indipendentemente dalla loro forma giuridica, definite dalla Raccomandazione della Commissione 6 maggio 2003, n. 2003/361/CE (per la definizione di PMI si veda l'Allegato 1 al presente Bando), che svolgono attività di promozione e valorizzazione dei siti di importanza naturalistica, come identificati all'art 3.1 del presente bando. L'impresa o il professionista[1], al momento della presentazione della domanda, deve possedere i seguenti requisiti:

a) **in caso di PMI e loro Consorzi**, essere regolarmente iscritta al Registro delle Imprese, istituito presso la Camera di Commercio, Industria, Artigianato ed Agricoltura competente per territorio, **da non più di 12 mesi** dalla data di apertura dei termini per la presentazione della domanda. Ai fini dell'individuazione della data di iscrizione, farà fede la data risultante dalla visura camerale;

b) **in caso di professionisti non costituiti in società regolarmente iscritte al Registro Imprese**, dovranno essere iscritti negli Elenchi e/o Collegi Veneti delle Guide Naturalistiche, degli Accompagnatori di Media Montagna e delle Guide Alpine.
L'attività professionale deve essere iniziata **da non più di 12 mesi** dalla data di apertura dei termini per la presentazione della domanda. Ai fini dell'individuazione della data di avvio dell'attività professionale farà fede la data di rilascio del certificato di attribuzione del numero di partita I.V.A. da parte dell'Agenzia delle Entrate territorialmente competente relativo all'attività professionale esercitata;

c) **avere l'unità operativa in cui si realizza il progetto imprenditoriale in Veneto.** Qualora all'atto della presentazione della domanda il richiedente non abbia l'unità operativa sul territorio della Regione Veneto, l'apertura della stessa deve avvenire entro il termine perentorio del **15 ottobre 2017**, pena la decadenza dal contributo concesso con conseguente revoca totale dello stesso. Tale apertura deve essere comunicata e documentata all'amministrazione regionale al momento della presentazione della rendicontazione finale degli interventi agevolabili;

d) **avere competenze in campo naturalistico.** Le competenze dovranno essere certificate da titoli di studio o esami abilitanti che prevedano materie naturalistiche (botanica, zoologia, ecologia ecc…).

Ai fini dell'ammissibilità vengono riconosciuti automaticamente i seguenti titoli:
- Guida Naturalistica Ambientale (esame),
- Accompagnatore di Media Montagna (esame),
- Guida Alpina (esame),
- Aspirante Guida Alpina (esame),
- Agrotecnico,

[1] Per effetto di quanto previsto dall'art. 1 comma 821 della Legge 28 dicembre 2015, n. 208 (Legge di Stabilità 2016) i liberi professionisti sono equiparati alle Piccole e Medie Imprese ai fini dell'accesso alle agevolazioni previste dai Piani operativi POR e PON del Fondo Sociale Europeo (FSE) e del Fondo Europeo di Sviluppo Regionale (FESR), rientranti nella programmazione dei fondi strutturali europei 2014-2020

- Perito Agrario,

oltre alle seguenti lauree triennali e magistrali:

- Tecnologie Forestali e Ambientali,
- Scienze Forestali e Ambientali,
- Scienze e Tecnologie Agrarie,
- Scienze e Tecnologie Animali,
- Scienze e Tecnologie per l'Ambiente e la Natura,
- Scienze Naturali,
- Scienze Ambientali.

Ai fini della sola ammissibilità potranno essere valutati altri titoli di studio che prevedono materie naturalistiche purché il loro curriculum formativo preveda almeno 80 ore di approfondimento su tali materie.

Se il requisito di ammissibilità relativo alle competenze naturalistiche è a carico di un **dipendente a tempo pieno e indeterminato o di un socio lavoratore, a tempo pieno e indeterminato, di società cooperative**:

- **per le imprese già costituite:** se non già presente in azienda, devono assumere il dipendente con competenze in campo naturalistico, identificato nella domanda di sostegno, entro e non oltre 60 giorni dalla data di pubblicazione sul B.u.r.Veneto del decreto di ammissibilità e finanziabilità provvisoria. Si precisa inoltre che il dipendente con le competenze dovrà rimanere in azienda per tutto il periodo di vincolo delle operazioni (tre anni dalla liquidazione del saldo finale) a **pena di revoca e recupero del contributo concesso.**
- **per i promotori d'impresa:** devono assumere il dipendente con competenze in campo naturalistico, identificato nella domanda di sostegno, entro e non oltre 60 giorni dalla data di pubblicazione sul B.u.r.Veneto del decreto di ammissibilità e finanziabilità provvisoria. Si precisa inoltre che il dipendente con le competenze dovrà rimanere in azienda per tutto il periodo di vincolo delle operazioni (tre anni dalla liquidazione del saldo finale) **a pena di revoca e recupero del contributo concesso.**

I requisiti relativi alle competenze in campo naturalistico dovranno sussistere alla data di presentazione della domanda di sostegno, a pena di inammissibilità, e devono essere mantenuti, a pena di revoca e recupero del contributo per tutto il periodo di vincolo delle operazioni. Le citate competenze riconosciute all'impresa richiedente il beneficio possono essere in capo al titolare o al socio lavoratore a tempo pieno e indeterminato di una società cooperativa o ad un dipendente a tempo pieno e indeterminato.
**Nel caso non fosse presente la documentazione attestante le competenze naturalistiche la domanda sarà ritenuta non ammissibile**.

e) **tipologia di attività economica.** L'attività economica svolta dovrà rientrare tra quelle di promozione e valorizzazione dei siti di importanza naturalistica (**nel caso di società di persone, cooperative e società di capitali lo statuto o l'atto costitutivo devono prevedere quale oggetto sociale l'attività di promozione e valorizzazione degli ambienti naturali**). **Si precisa inoltre che gli investimenti per essere ammissibili devono essere utilizzabili e utilizzati esclusivamente per il sopracitato scopo a pena di non ammissibilità, revoca ed eventuale recupero delle somme erogate**;

4.2 Ai fini del possesso del requisito di cui al comma 4.1, lettera c), per "unità operativa" – si intende il luogo abituale di svolgimento dell'attività, per quanto riguarda le imprese iscritte al Registro Imprese, deve risultare nella visura camerale, mentre per i professionisti non costituiti in società è indicata nella dichiarazione di inizio attività ai fini IVA. Nel caso di interventi strutturali presso la "l'unità operativa" gli immobili non devono avere una destinazione d'uso residenziale.

4.3 In caso di PMI e loro Consorzi art. 4.1 lettera a), la domanda può essere presentata anche da persone fisiche che intendano costituire una nuova impresa (c.d. "promotori d'impresa"), a condizione che, a pena di decadenza della domanda, entro 60 giorni dalla pubblicazione del decreto di ammissibilità e finanziabilità provvisoria, provvedano alla regolare iscrizione al Registro Imprese. Tale impresa, a pena di decadenza dal contributo e conseguente revoca totale del contributo, deve essere costituita esclusivamente dalle persone fisiche e giuridiche indicate nella domanda di ammissione, nonché mantenere la forma giuridica (imprese singole, società di persone, società di capitali, società cooperative, consorzi, etc.) e la ripartizione delle azioni o delle quote sociali indicate nella domanda medesima.

4.4 Salvo quanto previsto ai commi 4.1, 4.2 e 4.3, ai fini dell'accesso alle agevolazioni di cui al presente Bando, i beneficiari devono inoltre possedere i seguenti requisiti di ammissibilità:

a) essere nel pieno e libero esercizio dei propri diritti, non essere in liquidazione volontaria e non essere sottoposti a procedure concorsuali in corso o antecedentemente la data di presentazione della domanda (ad eccezione del concordato preventivo con continuità aziendale);
b) non essere "in difficoltà", secondo quanto previsto dall'articolo 2, par. 1 punto 18, del Regolamento (UE) n. 651/2014;
c) osservare le norme dell'ordinamento giuridico italiano in materia previdenziale, assistenziale ed assicurativa (nei confronti di INPS, INAIL, Casse di Previdenza dei professionisti), di contratti collettivi di lavoro, di inserimento dei disabili, di pari opportunità tra uomo e donna;
d) Non essere beneficiari di altre agevolazioni previste nell'ambito delle Azioni 3.5.1 e 3.3.4 del POR FESR Veneto 2014-2020 anche se concesse sulla base del Regolamento "de minimis".
e) Non essere iscritti nella sezione speciale del Registro delle Imprese dedicata alle start-up innovative;
f) avere la capacità amministrativa, operativa e finanziaria[2], secondo quando previsto dall'art. 125 comma 125.3 lett. c) e d) del Regolamento (UE) n. 1303/2013.

4.5 Non sono, altresì, ammissibili agli aiuti di cui al presente Bando:

- le imprese controllate da soci controllanti[3] imprese che abbiano cessato, nei 12 mesi precedenti la data di presentazione della domanda, un'attività analoga a quella cui si riferisce la domanda di agevolazione;

[2] Si veda la griglia di valutazione di cui all'art. 11 comma 11.6 del presente Bando.

[3] Soci controllanti: ai fini del presente provvedimento, per "soci controllanti" si intendono le persone fisiche e/o giuridiche che, individualmente o collegialmente, possono esercitare un'influenza dominante su un'altra impresa denominata "impresa controllata". Si presume la possibilità di esercitare un'influenza dominante se uno o più soci, direttamente o indirettamente, nei confronti di un'impresa:
a) possono nominare e/o revocare più della metà dei membri del consiglio di amministrazione;
b) ovvero, dispongono della maggioranza dei voti in rapporto alle partecipazioni al capitale dell'impresa;
c) ovvero, detengono la maggioranza del capitale sottoscritto dall'impresa.

- le associazioni professionali costituite da professionisti che abbiano iniziato da più di 12 mesi precedenti alla data di presentazione della domanda, un'attività analoga a quella cui si riferisce la domanda di agevolazione.

4.6 Non sono ammessi al presente bando i settori della produzione primaria di prodotti agricoli.

4.7 La partecipazione di un soggetto sia in qualità di impresa individuale/professionista singolo che in qualità di socio/associato, a più domande di finanziamento comporterà la decadenza automatica delle domande presentate successivamente alla prima.

## Tipologie di interventi ammissibili

**Art. 5 Interventi ammissibili**

5.1 Sono ammissibili i progetti di supporto all'avvio, insediamento e sviluppo di nuove iniziative imprenditoriali naturalistiche in grado di promuovere ricambio e diversificazione nel sistema produttivo, oltre a generare nuove opportunità occupazionali.

Gli interventi per essere ritenuti ammissibili devono conservare, valorizzare, promuovere e sviluppare precisi siti naturalistici componenti la Rete Ecologica Regionale di cui all'art. 3.1.

5.2 Il progetto ammesso all'agevolazione deve essere concluso entro il termine perentorio del **15 ottobre 2017**. Il progetto si considera concluso ed operativo quando:
- le attività sono state effettivamente realizzate;
- le spese siano state sostenute e pagate[4];
- abbia realizzato l'obiettivo per cui è stato ammesso a finanziamento.

5.3 I beneficiari dell'agevolazione dovranno risultare attivi entro il termine perentorio del **15 ottobre 2017**, pena la decadenza dal contributo concesso con conseguente revoca totale dello stesso. A tal fine farà fede la data risultante:
- dalla visura camerale per le PMI e loro Consorzi;
- dalla dichiarazione di inizio attività ai fini IVA presentata all'Agenzia delle Entrate per professionisti non costituiti in società.
- autorizzazioni all'esercizio dell'attività.

5.4 Non sono ammissibili i progetti portati materialmente a termine o completamente attuati prima della presentazione della domanda di partecipazione a prescindere dal fatto che tutti i relativi pagamenti siano stati effettuati dal beneficiario (art. 65, comma 6 Regolamento (UE) n. 1303/2013).

5.5 Per gli interventi materiali all'interno dell'azione dovrà essere verificato il rispetto della procedura di valutazione di incidenza di cui al DPR 357/97 e ss.mm.ii. (direttiva 92/43/CE e ss.mm.ii. art. 6(3)) e DGR n. 2299/2014. Qualora per gli interventi si rendesse necessaria la

[4] **Spesa sostenuta**: si intende la spesa giustificata da fattura o documento contabile equivalente (titolo di spesa) emesso nei confronti del beneficiario che risulti interamente quietanzato a fronte dell'avvenuto pagamento effettuato da parte del beneficiario con le modalità indicate nel Bando.

valutazione d'incidenza, saranno ammessi a finanziamento esclusivamente gli interventi con valutazione di incidenza positiva.

5.6 Alcune tipologie di investimento o punteggi sono ammissibili o assegnabili esclusivamente in un Area Naturalistica così definita: Area circoscritta e gestita con contratto di possesso dal beneficiario e destinata all'attività abituale dell'azienda presentata nel progetto imprenditoriale, nell'area devono essere presenti Habitat e Habitat di specie come definiti dalle direttive Direttive 92/43CEE e 79/409 CEE.

**Art. 6 Spese ammissibili**

6.1 Sono ammissibili le seguenti categorie di spesa:

1) INTERVENTI ALL'INTERNO DI AREA PARCO (L. R. 40/84 E LEGGE 394/91) E/O AREE NATURA 2000 (DPR 357/97)
   a. realizzazione di opere strutturali, murarie e di impiantistica purché complementari, connesse e funzionali alla realizzazione dell'attività imprenditoriale e progettuale presentata;

2) ACQUISTI ATTREZZATURA/MEZZI PER LA VISITAZIONE DEI SITI NATURALISTICI

   Attrezzature amovibili e allestimenti:
   a. acquisto di attrezzature amovibili per la promozione di un Sito Specifico della Rete Ecologica Regionale identificato nella domanda di sostegno;
   b. acquisto di attrezzature amovibili per la fruizione di un'Area Naturalistica identificata nella domanda di sostegno e gestita con un contratto di possesso;
   c. allestimento di spazi espositivi e didattici all'interno di un'Area Naturalistica gestita con contratto di possesso, le strutture devono essere identificate nella domanda di sostegno (totem didattici, giochi naturalistici…);

   Acquisti di mezzi e attrezzature:
   d. acquisto di strumenti specialistici destinati all'implementazione della fruizione sostenibile (binocoli, racchette da neve, canoe, slitte, bici, GPS, kayak, sci, capanni mobili, mute…);
   e. acquisto di dispositivi informatici per la fruizione e la conoscenza delle aree naturalistiche;
   f. acquisto di piccoli mezzi motorizzati[5], con esclusione delle autovetture atti al trasporto dei visitatori per la fruizione anche didattica delle aree naturalistiche e per (pulmini verdi, minibus, mezzi per disabili)
   g. acquisto piccoli mezzi atti al trasporto delle attrezzature specialistiche per la fruizione, purché presenti in azienda.

3) RISTRUTTURAZIONE E RICONVERSIONE
   a. piccole imbarcazioni[6] da destinare al trasporto dei fruitori in aree lacuali e fluviali.

4) PROMOZIONALE
   a. quota di iscrizione come espositore e allestimento dell'area espositiva in fiere specialistiche di settore.

[5] Imbarcazioni, piccoli pulmini e minubus con al massimo trenta posti a sedere escluso il conducente.
[6] Imbarcazioni che prevedono al massimo trenta posti a sedere escluso il conducente.

5) PROMOZIONALE IMMATERIALE
   a. pubblicizzazione di proposte di fruizione ambientale e di promozione dell'area da valorizzare (depliant, materiale illustrativo promozionale, cartellonistica, targhe, guide, prodotti multimediali, radiotelevisivi, acquisto di spazi pubblicitari…);
   b. creazione di siti internet che valorizzino e promuovano l'attività naturalistica e il sito naturalistico stesso;
   c. software destinati alla fruizione dei siti naturalistici promossi.

6) ALTRE SPESE CONNESSE AL PROGETTO;
   a. spese di progettazione e direzione lavori relative al punto 1a);
   b. spese notarili di costituzione della società o dell'associazione di professionisti;
   c. *brevetti, licenze d'uso* e software di gestione delle attrezzature acquistate.

7) CONSULENZE

Consulenze economiche e naturalistiche per lo sviluppo del progetto, dovranno essere non a carattere continuativo e svolte da personale con certificate competente in materie economiche e/o naturalistiche.

**6.2 Con riferimento alle spese di cui al comma 6.1 si applicano inoltre i seguenti limiti, divieti e condizioni:**

1) Gli investimenti individuati alle lettere **1a), 2a) 2b) 2c),** sono ammissibili nel limite massimo di euro 100.000,00 di spesa totali, le opere al punto 1a) comprendono:

   a. le spese per gli interventi di manutenzione ordinaria e straordinaria, restauro, risanamento conservativo e ristrutturazione edilizia di cui all'articolo 3, comma 1, lettere a), b), c), e d) del DPR n. 380 del 2001 "Testo unico delle disposizioni legislative e regolamentari in materia edilizia", sono esclusi gli interventi di nuova costruzione, di demolizione e ricostruzione;

   b. le spese per impianti elettrici, idrico-sanitari, di riscaldamento e climatizzazione, nonché le spese di impiantistica occorrenti all'installazione e al collegamento delle attrezzature acquistate. Non sono ammessi interventi di sola manutenzione ordinaria, le spese per impianti e strutture sono ammesse solo se strettamente funzionali agli interventi finanziati;

2) Gli investimenti individuati alle lettere **2b)** e **2c),** sono ammessi purché vengano realizzati all'interno di un'Area Naturalistica come definita dal presente bando. L'impresa deve avere un titolo di possesso dell'Area Naturalistica e dell'edificio nel quale intende inserire gli acquisti e gli allestimenti. Le spese devono inoltre essere sostenute a partire dalla data degli atti e/o contratti (di proprietà, locazione, comodato, ecc.) aventi data certa, registrati e (nei casi previsti dalla legge) trascritti, attestanti la piena disponibilità dell'immobile. Nel caso la proprietà fosse di terzi è necessario possedere anche l'autorizzazione del proprietario per la realizzazione degli interventi. Gli investimenti individuati al punto 1a) e 2a) sono ammissibili purché l'impresa abbia un'attestazione di possesso dell'immobile in cui verranno realizzati gli investimenti o del sito nel quale verranno installate le attrezzature amovibili per la promozione. **Il titolo di possesso definitivo deve essere posseduto ed inviato al massimo con il SAL, art. 13.1, entro 60 giorni dalla pubblicazione del decreto di ammissibilità e finanziabilità provvisoria.**

3) Gli investimenti individuati alle lettere **2d), 2e), 2f), 2g),** sono ammissibili nel limite massimo di euro **50.000,00** di spesa totali Non sono ammesse le spese per tasse, costi di immatricolazione e

messa su strada: l'importo di tali spese dovrà essere evidenziato nella fattura di acquisto, i mezzi di trasporto persone potranno essere al massimo di trenta posti sono escluse le semplici autovetture (In sede di rendicontazione si dovrà allegare copia del libretto di circolazione e il relativo certificato di proprietà). Sono inoltre non ammissibili: telefoni cellulari, tablet, laptop, e altri mobile devices;

4) Gli investimenti individuati alla lettera **3a)** sono ammissibili nel limite massimo di euro **20.000,00** di spesa, le imbarcazioni dovranno essere di proprietà dell'azienda e per un massimo di 30 posti**;**

5) Gli investimenti individuati alla lettera **4a)** dovranno promuovere il sito naturalistico o l'Area Naturalistica oltre alle singole attività svolte dal beneficiario (in fase di liquidazione dovranno pertanto essere inviate foto provanti **l'effettivo svolgimento dell'attività)**, il limite massimo di spesa per questa categoria è pari ad euro **5.000,00**;

6) Gli investimenti individuati alle lettere **5a), 5b), 5c)** dovranno promuovere il sito naturalistico o l'Area Naturalistica indicandone le caratteristiche e le peculiarità degli habitat e degli habitat di specie come definiti dalle Direttive 92/43CEE e 79/409 CEE e individuati nel formulario standard, al fine dell'ammissibilità delle spese il materiale prodotto dovrà essere preventivamente approvato in bozza dalla Sezione: Parchi Biodiversità Programmazione Silvopastorale Tutela Consumatori. Il limite massimo di spesa per questa categoria è pari ad euro **20.000,00** totali;
**Si precisa inoltre che al fine dell'ammissibilità della proposta progettuale è obbligatoria la presenza di una spesa di investimento, alle lettere 5a), 5b), 5c) pari al 10% della spesa totale ammessa calcolata sommando le categorie di spesa 1) – 2) – 3) – 4), l'importo di spesa assegnato non potrà essere ridotto in fase rendicontativa, il rispetto di tale percentuale verrà calcolato al netto delle categorie *"Altre* spese connesse al progetto*"* e "Consulenze".**
Il materiale prodotto dovrà rispettare gli obblighi previsti al punto 17.2

7) Gli investimenti individuati nella categoria **6 *"A*ltre spese *connesse al progetto"*** sono ammissibili spese nel **limite massimo del 10% calcolato sulla somma delle categorie di spesa 1) – 2) – 3) – 4),** si precisa inoltre che per le spese relative al notaio si ritengono ammissibili gli importi relativi al solo compenso professionale al netto di eventuali spese anticipate;

8) Gli investimenti individuati nella categoria **7 *"Consulenze"* sono ammissibili spese per un importo pari al 10% calcolato sulla somma delle categorie di spesa 1) – 2) – 3) – 4)** si ritengono ammissibili gli importi al netto di eventuali spese anticipate. Per ogni consulenza dovrà essere stipulato apposito contratto scritto, nella forma di semplice scrittura privata, in cui vengono definiti reciprocamente il contenuto, i termini e le modalità degli impegni assunti, la connessione e la coerenza dell'attività consulenziale con il progetto imprenditoriale da realizzare, nonché il corrispettivo pattuito tra le parti per la prestazione. La natura di tali consulenze deve esulare dai normali costi di gestione del beneficiario connessi ad attività ordinarie quali ad esempio la consulenza fiscale, la consulenza legale. Non è ammissibile la cessione della consulenza. Si precisa inoltre che dovranno essere dimostrate le competenze richieste;

9) Sono ammesse le spese per il trasporto e l'installazione degli acquisti finanziati, purché direttamente collegabili all'iniziativa;

10) Tutte le operazioni per essere ammissibili dovranno essere direttamente connesse ad interventi chiaramente riferibili alla conservazione, valorizzazione, promozione della Rete Ecologica Regionale e nello specifico agli habitat, agli habitat di specie e alle specie degli habitat e degli habitat di specie come definiti dalle Direttive 92/43CEE e 79/409 CEE e individuati nel **formulario standard,** le modalità con cui si intende perseguire gli obbiettivi e le finalità del bando dovranno essere debitamente documentate e dettagliate anche nella relazione progettuale oggetto di valutazione.

**ELEGIBILITÀ DELLE SPESE**

6.3 Ai fini della relativa ammissibilità:

**a) le spese di cui al comma 6.1 devono essere:**

a.1) sostenute[7] esclusivamente dal beneficiario, pertinenti al progetto proposto e direttamente imputabili alle attività previste nel progetto medesimo, nel rispetto della normativa comunitaria. In caso di società e loro consorzi o associazioni professionali saranno riconosciute ammissibili esclusivamente le spese riferibili direttamente alla società, consorzio o associazione professionale beneficiaria, con esclusione di quelle sostenute dai singoli soci o associati;

a.2) sostenute e pagate interamente:

- dalle PMI e loro Consorzi beneficiari a partire dalla data di iscrizione al Registro delle Imprese;
- dai professionisti non costituiti in società a partire dalla data di attribuzione del numero di partita I.V.A. da parte dell'Agenzia delle Entrate territorialmente competente.

A tal fine, farà fede la data di emissione della fattura o di altro documento valido ai fini fiscali ed il relativo pagamento;

a.3) strettamente funzionali e necessarie all'attività d'impresa proposta;

a.4) sostenute e pagate interamente **entro il 15 ottobre 2017**;

a.5) riferite a beni e i servizi acquistati a condizioni di mercato da terzi.

**b) i beni devono:**

b.1) essere utilizzati nell'unità operativa e nell'Area Naturalistica destinataria dell'agevolazione. Nel caso di beni che erogano un servizio devono essere utilizzati per la valorizzazione, per la fruizione e per la promozione del sito naturalistico indicato nel progetto, pertanto direttamente collegabile ad esso;

[7] **Spesa sostenuta**: si intende la spesa giustificata da fattura o documento contabile equivalente (titolo di spesa) emesso nei confronti del beneficiario che risulti interamente quietanzato a fronte dell'avvenuto pagamento effettuato da parte del beneficiario con le modalità indicate nel Bando.

b.2) i beni che per loro natura possono essere utilizzati anche per altri scopi (pratica sportiva, turistica ecc…) non possono essere distorti dall'uso previsto dal presente bando a pena di revoca e recupero del contributo.

b.3) Tutti gli investimenti dovranno essere catalogati ed inventariati oltre ad essere presenti **nella sede indicata nella domanda di sostegno** la catalogazione dovrà essere inviata in allegato alla domanda di saldo.

**Art. 7**
**Spese non ammissibili**

7.1 I beni e i servizi devono essere acquistati a condizioni di mercato da terzi che non hanno relazioni con l'acquirente. In particolare:

a) l'impresa beneficiaria e i fornitori non devono avere alcun tipo di partecipazione reciproca a livello societario.

b)Non possono, essere agevolati beni e servizi forniti da soci, amministratori, dipendenti dell'impresa proponente o loro prossimi congiunti[8], nonché da società nella cui compagine e/o nel cui organo amministrativo siano presenti soci, amministratori, dipendenti dell'impresa proponente o loro prossimi congiunti. A tal fine, in sede domanda di sostegno e di rendicontazione della spesa, il beneficiario produce una specifica dichiarazione del legale rappresentante del beneficiario o di un suo procuratore speciale.

c) Non possono, altresì, essere agevolati i beni e i servizi oggetto di compravendita tra due imprese che siano e/o si siano trovate - nei 12 mesi precedenti la presentazione della domanda di agevolazione di cui all'articolo 11 - nelle condizioni di essere considerate tra loro "controllate" o "collegate" (art. 2359 del codice civile) o siano entrambe partecipate, anche cumulativamente o per via indiretta, per almeno il 25 per cento, da medesimi altri soggetti.

7.2 A puro titolo esemplificativo, fatto salvo quanto previsto all'articolo 6, non sono ammesse le spese:

a) inserite in fatture di importo imponibile inferiore ad euro 100,00 (duecento/00);
b) per i contributi di costruzione, ovvero per autorizzazioni/concessioni; imposte o tasse accessorie al progetto;
c) per interessi debitori ed altri oneri finanziari;
d) spese per lavori emesse da soggetti sprovvisti di Partita IVA;
e) imposte, tasse;
f) relative a scorte;
g) per gli aggi (oneri esattoriali o di riscossione);
h) per le perdite su cambio di valuta;
i) relative ad ammende, penali e controversie legali;
j) già coperte da altre agevolazioni pubbliche ai sensi dell'articolo 9;
k) per la divulgazione e pubblicizzazione discendenti da obblighi di Bando;
l) forfettarie;
m) relative all'I.V.A., salvo se indetraibile;
n) acquisti in leasing e leaseback;

[8] **Prossimi congiunti**: si intendono gli ascendenti e i discendenti entro il secondo grado (genitori-figli, nonni-nipoti), il coniuge, i fratelli, le sorelle, gli affini nello stesso grado (suoceri e cognati), gli zii e i nipoti (artt. 74-78 del Codice Civile).

o) per materiale di consumo[9]
p) di funzionamento per la gestione dell'attività (canoni, locazioni e fitti, energia, spese telefoniche, prestazioni professionali amministrativo-contabili, cassetta pronto soccorso, RaEE, etc.);
q) di avviamento;
r) per lavori realizzati in economia diretta o per conto proprio, senza l'intervento di un'impresa esecutrice;
s) relative a macchinari, impianti ed attrezzature ed in genere a beni usati;
t) correlate all'istanza di contributo ovvero di consulenza per la preparazione della rendicontazione e del progetto;
u) per il contratto di affiliazione commerciale (franchising);
v) le spese relative al personale dipendente;
w) arredi non strettamente funzionali e indispensabili all'attività di impresa presentata;
x) le spese non direttamente collegabili all'investimento finanziato;
y) spese relative alla creazione, allestimento e ristrutturazione di esercizi di alloggio e ristoro.

**Articolo 8**
**Forma, soglie ed intensità del sostegno**

8.1 L'intensità del sostegno prevista per le iniziative sarà pari al 70% della spesa ammessa, la spesa massima prevista è pari ad euro 150.000,00 (centocinquantamila/00), quella minima è invece pari ad euro 20.000,00 (ventimila/00), corrispondenti ad un contributo:

- massimo concedibile pari ad euro 105.000,00 (centocinquemila/00);
- minimo concedibile pari ad euro 14.000,00 (quattordicimila/00).

8.2 Non sono ammesse le domande di partecipazione i cui progetti comportino una spesa ammessa di importo inferiore ad euro 20.000,00 (ventimila/00).

8.3 In fase di rendicontazione, la spesa ritenuta ammissibile dovrà essere almeno pari al 70% dell'importo originariamente riconosciuto in fase di ammissione all'agevolazione e, in ogni caso, non inferiore ad euro 14.000,00 (quattordicimila/00) nel rispetto di quanto precisato all'art. 13.2.

8.4 Le agevolazioni sono concesse ai sensi e nei limiti del Regolamento "de minimis" n. 1407/2013 della Commissione del 18 dicembre 2013. L'agevolazione è subordinata, in particolare, al rispetto dei massimali previsti dal precitato Regolamento europeo, ai sensi del quale le agevolazioni possono avere un importo massimo complessivo di euro 200.000,00 (duecentomila/00) nell'arco di tre esercizi finanziari. Il periodo di tre anni da considerare deve essere valutato nel senso che, in caso di nuova concessione di aiuto "de minimis", si deve tener conto dell'importo complessivo degli aiuti "de minimis" concessi nell'esercizio finanziario in questione e nei due esercizi finanziari precedenti.

8.5 Se il budget totale previsto dalla presente azione non permette di finanziare completamente l'intero progetto può essere comunque finanziato con una percentuale inferiore, previa accettazione da parte del beneficiario.

[9] **Materiale di consumo**: materiali ed oggetti che, per l'uso continuo, sono destinati ad esaurirsi od a deteriorarsi rapidamente. oggetti di cancelleria qualunque sia il prezzo, stampati, carta bianca e da lettere, prodotti cartotecnici, scope, moci, ricambi mocio, cartucce, toner, alimenti, ecc.)

**Art. 9 Divieto di cumulo**

9.1 Le agevolazioni previste dal presente Bando **non sono cumulabili** con altri aiuti pubblici concessi per le medesime spese, incluse le agevolazioni concesse sulla base del Regolamento "de minimis" di cui all'articolo 8, comma 8.4.

## Presentazione delle domande e istruttoria

**Art. 10**
**Termini e modalità di presentazione della domanda**

10.1 Le agevolazioni di cui al presente Bando sono concesse sulla base di procedura valutativa con procedimento a graduatoria, secondo quanto stabilito dall'articolo 5, comma 2 del decreto legislativo n. 123 del 1998.

10.2 La domanda di sostegno deve essere compilata e presentata esclusivamente per via telematica, attraverso il Sistema Informativo Unificato della Programmazione Unitaria (SIU) della Regione, la cui pagina dedicata è raggiungibile al seguente link: http://www.regione.veneto.it/web/programmi-comunitari/siu.

Dalla medesima pagina è, inoltre, sempre possibile procedere al modulo di accreditamento per la richiesta delle credenziali d'accesso al Sistema".

10.3 L'apertura dei termini per la compilazione e la presentazione della domanda di sostegno è prevista alla data del 30/07/2016, e sarà attiva fino alle ore 24.00 del 04/10/2016. Al termine della corretta compilazione di tutti i quadri della domanda di sostegno, corredata in allegato di tutta la documentazione obbligatoria di cui all'art. 12 e di tutti gli eventuali ulteriori documenti che i soggetti proponenti intendono presentare, la domanda potrà essere presentata definitivamente tramite SIU.

10.4 Dal momento della conferma della domanda telematica e prima della presentazione della stessa, sarà necessario scaricare dal SIU il file della domanda di sostegno in formato pdf, firmarlo digitalmente (senza rinominarlo né sovrascriverlo) ed allegarlo tra i documenti obbligatori della domanda online.

10.5 La domanda in formato pdf dovrà essere firmata digitalmente dal legale rappresentante dell'impresa (o dal singolo professionista ovvero, nel caso previsto all'articolo 4, comma 4.3, dalla persona fisica proponente per conto dell'impresa costituenda ovvero, nel caso di associazione professionale, dal professionista formalmente designato a rappresentarla ovvero da un procuratore munito di procura speciale per la presentazione della domanda). Per ulteriori informazioni tecniche sulla firma digitale si rimanda a: http://www.agid.gov.it/agenda-digitale/infrastrutture-architetture/firme-elettroniche".

10.6 La domanda è resa nella forma di dichiarazione sostitutiva di certificazione/atto di notorietà ai sensi degli artt. 46 e 47 del D.P.R. n° 445/2000 ed è soggetta alla responsabilità anche penale di cui agli artt. 75 e 76 dello stesso in caso di dichiarazioni mendaci. La domanda è soggetta al pagamento dell'imposta di bollo. Il numero identificativo (seriale) della marca da bollo deve essere inserito nell'apposito campo della domanda on-line.

10.7 Tenuto conto della dotazione finanziaria iniziale del Bando e delle modalità di presentazione di cui ai commi 10.2, 10.3 e 10.4, la domanda è irricevibile qualora:

- non risulti firmata digitalmente ovvero con firma digitale basata su un certificato elettronico revocato, scaduto o sospeso;
- sia presentata prima del termine iniziale di cui al comma 10.3;
- non sia corredata delle informazioni/dichiarazioni richieste;
- sia priva della documentazione obbligatoria;
- sia redatta e/o sottoscritta e/o inviata secondo modalità non previste dal presente Bando.

Una volta presentata, la domanda non può essere integrata con ulteriori documenti; è consentita esclusivamente la regolarizzazione di cui all'art.71 comma 3 del DPR 445/2000.

10.8 Ai sensi dell'articolo 2, comma 3, del decreto legislativo n. 123 del 1998, i soggetti interessati hanno diritto alle agevolazioni esclusivamente nei limiti delle disponibilità finanziarie di cui all'articolo 3, pari ad euro 1.000.000,00 (unmilione/00).

**Art. 11**
**Valutazione delle domande**

11.1 La domanda, completa della documentazione richiesta, è sottoposta, da parte della Sezione Parchi - Biodiversità - Programmazione Silvopastorale - Tutela Consumatori, alla verifica della sussistenza dei requisiti per l'accesso alle agevolazioni di cui all'art. 4 al fine di accertarne l'ammissibilità. L'iter di valutazione delle domande e del progetto imprenditoriale è svolto nel rispetto della legge 7 agosto 1990, n. 241 e successive modifiche ed integrazioni. Al termine dell'attività di valutazione e selezione dei progetti, il Direttore Sezione Parchi - Biodiversità - Programmazione Silvopastorale - Tutela Consumatori approva le risultanze istruttorie.

11.2 La valutazione di merito è effettuata valutando il punteggio richiesto per ogni criterio di selezione e accertando la presenza dei requisiti previsti dal Bando per l'attribuzione delle premialità indicate dal potenziale beneficiario in sede di presentazione della domanda, mediante la valutazione di tutti gli allegati presentati. Si precisa che non possono essere assegnati punteggi maggiori rispetto a quelli richiesti con la domanda di sostegno presentata compilando i campi previsti nel SIU.

11.3 La valutazione dei progetti è effettuata sulla base dei seguenti criteri di selezione:

**VALUTAZIONE DEL SOGGETTO PROPONENTE**

| N.[10]CS | Criteri di selezione[11] | Attribuzione punteggio | Punti |
|---|---|---|---|
| 1) | Certificate conoscenze in campo ambientale e naturalistico **in capo al TITOLARE**<br><br>*(Assegnabile anche ai promotori - I punteggi non sono sommabili)* | Laurea con profilo naturalistico ambientale | 6 |
| | | Diplomi con profilo naturalistico ambientale (Perito agrario, Agrotecnico) | 5 |
| | | AMM iscritte nell'elenco del collegio guide alpine Veneto | 4 |
| | | Guida naturalistico-ambientale iscritta in un elenco provinciale Veneto | 3 |
| 2) | Capacità amministrativa | Non coerenza della formazione e delle competenze tecniche con la proposta imprenditoriale **0 punti**<br>Coerenza della formazione e delle competenze tecniche con la proposta imprenditoriale **1 punto** | 1 |
| 3) | Capacità operativa | Non fattibilità operativa del programma di investimento **0 punti**<br>Fattibilità operativa del programma di investimento **1 punto** | 1 |
| 4) | Capacità finanziaria | Prospetto fonti / impieghi e previsioni di redditività non attendibili **0 punti**<br>Prospetto fonti / impieghi e previsioni di redditività attendibili **1 punto** | 1 |
| Punteggio massimo conseguibile | | | **9** |

**VALUTAZIONE DELLA PROPOSTA PROGETTUALE**

| N.CS | Criteri di selezione | Attribuzione punteggio | | Punti |
|---|---|---|---|---|
| 5) | Coerenza degli obiettivi: appropriatezza della descrizione dello stato dell'arte relativo al problema da risolvere o all'opportunità da sviluppare | Appropriatezza e completezza della proposta progettuale | L'idea imprenditoriale non è descritta in maniera esaustiva **0 punti**<br>L'idea imprenditoriale è sufficientemente descritta/dettagliata **2 punti**<br>L'idea imprenditoriale è compiutamente descritta e accuratamente dettagliata **3 punti** | 3 |
| | | Altre attività che promuovono il sito naturalistico | Assenza di integrazione con altre attività che promuovono l'area **0 punti**<br>Integrazione con altre attività che promuovono il sito **1 punti** | 1 |
| | | Grado di innovazione del progetto | L'idea imprenditoriale non è innovativa **0 punti**<br>L'idea imprenditoriale è moderatamente innovativa **-1 punti**<br>L'idea imprenditoriale è fortemente innovativa **2 punti** | 2 |
| | | Analisi del Profilo dei clienti | Non individuati **0 punti**<br>Parzialmente individuati **1 punto**<br>Puntualmente individuati **2 punti** | 2 |
| | | Valenza Naturalistica del progetto (economica – valenza economica-grado di vicinanza al sito…) | è sufficientemente descritta/dettagliata **2 punti**<br>è mediamente descritta/dettagliata **3 punti**<br>è compiutamente descritta e accuratamente dettagliata **4 punti** | 4 |

[10] Corrisponde agli elementi del progetto imprenditoriale di cui all'allegato B al presente bando.
[11] Come definiti dal documento "Criteri per la selezione delle operazioni" approvato dal Comitato di sorveglianza del POR FESR.

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **6)** | Complementarietà/integrazione con altri fondi comunitari: collegamento con gli obbiettivi comuni di altri fondi | Indicazione precisa degli obbiettivi e del fondo | Non collegamento **0 punti**<br>Collegamento **1 punto** | 1 |
| **7)** | Attività svolte in accordo con l'ente gestore | Modello di convenzione approvato e firmato dall'ente gestore | Attività di carattere promozionale | 2 |
| **8)** | Nuova occupazione in ETP (dipendenti subordinati e soci lavoratori di cooperative presenti al momento della presentazione della domanda di sostegno calcolate in ore lavoro annue) | | < 4 occupati **0 punti** | 1 |
| | | | >= 4 occupati **1 punto** | |
| **9)** | Importo della spesa ammissibile per proposta progettuale | Spesa ammissibile superiore a 100.000 € **0,5 punti** | | 0,5 |
| Punteggio massimo conseguibile | | | | **16,5** |

**VALUTAZIONE DEGLI INVESTIMENTI**

Il punteggio attribuito agli investimenti viene calcolato come media dei punteggi nelle sole quattro tipologie di investimento 10) 11) 12) 13), la media è ponderata secondo la spesa ammissibile nelle quattro categorie individuate dai criteri di selezione (CS) sotto riportati .

Esempio di calcolo del punteggio medio

$$= \frac{(\textbf{spesa CS10)}*10)+(\textbf{spesa CS11)}*10)+(\textbf{spesa CS12)}*2)+(\textbf{spesa CS13)}*15)}{((\text{ spesa CS10+ spesa CS11)+ spesa CS12+ spesa CS13))}}$$

| N.CS | Criteri di selezione | Attribuzione punteggio | Punti |
|---|---|---|---|
| **10)** | Progetti di impresa per interventi all'interno di area Parco (L. R. 40/84 e legge 394/91) e/o aree Natura 2000 (DPR 357/97) | a) Opere strutturali murarie e di impiantistica per la fruizione purché complementari, connesse e funzionali alla realizzazione dell'attività imprenditoriale e progettuale presentata. | 10 |
| **11)** | Acquisto di attrezzature/mezzi per la visitazione dei siti naturalistici | a) acquisto di attrezzature amovibili per la promozione di un Sito Specifico della Rete Ecologica Regionale identificato nella domanda di sostegno,<br>b) acquisto di attrezzature amovibili per la fruizione di un'Area Naturalistica identificata nella domanda di sostegno e gestita con un contratto di possesso;<br>c) allestimento di spazi espositivi e didattici all'interno di un Area Naturalistica gestita con contratto di possesso, le strutture devono essere identificate nella domanda di sostegno (totem didattici, giochi naturalistici);<br>d) acquisto di strumenti specialistici destinati all'implementazione della fruizione sostenibile (binocoli, racchette da neve, canoe, slitte, bici, GPS, kayak, sci, capanni mobili, mute…);<br>e) acquisto di dispositivi informatici per la fruizione e la conoscenza | 10 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | delle aree naturalistiche;<br>f) acquisto di piccoli mezzi motorizzati[12], con esclusione delle autovetture atti al trasporto dei visitatori per la fruizione anche didattica delle aree naturalistiche e per (pulmini verdi, minibus, mezzi per disabili)<br>g) acquisto piccoli mezzi atti al trasporto delle attrezzature specialistiche per la fruizione, purché presenti in azienda. | |
| **12)** | Recupero di piccole imbarcazioni per la visitazione dei siti naturalistici | a) piccole imbarcazioni di proprietà da destinare al trasporto dei fruitori in aree lacuali e fluviali. | 2 |
| **13)** | Attività di promozione delle attività e dei siti naturalistici | a) pubblicizzazione di proposte di fruizione ambientale e di promozione dell'area e del sito da valorizzare (depliant, materiale illustrativo promozionale, cartellonistica, targhe, guide, prodotti multimediali, radiotelevisivi, acquisto di spazi pubblicitari…);<br>b) creazione di siti internet che valorizzino e promuovano l'attività naturalistica e il sito naturalistico stesso;<br>c) software destinati alla fruizione dei siti naturalistici promossi;<br>d) quota di iscrizione come espositore e allestimento dell'area espositiva in fiere specialistiche di settore. | 15 |
| Punteggio massimo conseguibile | | | **15** |

## VALUTAZIONE DELL'APPLICAZIONE DEI PRINCIPI TRASVERSALI

**Sviluppo sostenibile e promozione dell'obiettivo di preservare, tutelare e migliorare la qualità dell'ambiente**

| N. | Criteri di selezione | Attribuzione punteggio | Punti |
|---|---|---|---|
| CS | APPLICAZIONE DEI PRINCIPI TRASVERSALI | | |
| **14)** | Progetti che non prevedono ulteriore consumo di suolo | Prevedono ulteriore consumo di suolo **0 punti**<br>Non prevedono ulteriore consumo di suolo **1 punto** | 1 |
| **15)** | Riutilizzo di strutture edilizie esistenti | Non prevedono riutilizzo di strutture edilizie esistenti **0 punti**<br>Prevedono riutilizzo di strutture edilizie esistenti **1 punto** | 1 |
| Punteggio massimo conseguibile | | | **2** |

I criteri di valutazione 16) e 17) sono alternativi, verrà assegnato il punteggio alla tipologia di investimento che prevede la spesa maggiore nelle due categorie sotto indicate, purché sia pari o superiore a 20.000 euro. Dovrà inoltre essere indicata nel progetto la spesa e l'indicazione del preventivo o del computo a cui si riferisce.

| N. | Criteri di selezione | Attribuzione punteggio | Punti |
|---|---|---|---|
| CS | APPLICAZIONE DEI PRINCIPI TRASVERSALI | | |
| **16)** | Premialità ai progetti con capacità di minimizzazione dei costi ambientali | Mezzi e attrezzature | 2 |
| **17)** | Minimizzazione dei costi ambientali indotti dalla possibile pressione turistica conseguente agli interventi di valorizzazione ambientale pertanto si promuovono attività imprenditoriali e di potenziamento dei servizi di fruizione per il turismo | Perché sia assegnabile il punteggio l'investimento strutturale deve ridurre direttamente gli impatti su un Area Naturalistica circoscritta e gestita con un contratto di possesso, non deve essere | 10 |

[12] Imbarcazioni, piccoli pulmini e minubus con al massimo trenta posti a sedere escluso il conducente.

| | | | |
|---|---|---|---|
| | responsabile e sostenibile<br>dei servizi di fruizione per il turismo responsabile e sostenibile | un'azione indiretta. | |
| **18)** | Capacità di coniugare la conservazione degli spazi naturali e il ripristino degli habitat, nei casi in cui questi siano degradati | Nel caso di interventi, eseguiti a proprie spese, di miglioramento di habitat degradati (dati formulario standard)<br>Non capacità di coniugare la conservazione<br>**0 punti**<br>Capacità di coniugare la conservazione<br>**1 punto** | 1 |
| Punteggio massimo conseguibile | | | **11** |

11.5 I progetti che non raggiungeranno un punteggio minimo di 3 punti nel criterio "Capacità minime di gestione aziendale" (ovvero un punteggio minimo di 1 punto al criterio "Capacità amministrativa", un punteggio minimo di 1 punto al criterio "Capacità operativa" e un punteggio minimo di 1 punto al criterio "Capacità finanziaria") non potranno essere considerati ammissibili.

11.6 I progetti per essere considerati ammissibili dovranno inoltre ottenere un punteggio minimo di 25 punti totali.

11.7 I requisiti per l'ottenimento dei punteggi devono essere presenti al momento della presentazione della domanda di sostegno. Per essere ammissibili i punteggi relativi ai Criteri di selezione: 10), 11) lettere b), c) ed f) (nel solo caso di acquisto imbarcazioni) e 12), i richiedenti devono avere il possesso dell'Area Naturalistica (11 lettere b) e c)), dell'eventuale immobile in cui verranno realizzati gli investimenti (10)), dell'attracco per le imbarcazioni (11 lettera f) e 12). In alternativa costituiscono titolo di disponibilità provvisoria: un atto di impegno da parte del proprietario alla stipula del contratto esclusivo di uso e gestione o il preliminare registrato di acquisto o di locazione, condizionato all'ammissibilità amministrativa e/o urbanistico/ambientale della proposta imprenditoriale. In tal caso, l'atto definitivo dovrà essere prodotto alla Regione al momento della presentazione del SAL come previsto all'art. 13.1, pena la decadenza dal contributo concesso con conseguente revoca totale dello stesso. Nel caso di disponibilità del bene non a titolo di proprietà è necessaria anche l'autorizzazione del proprietario.

Elementi di priorità in caso di parità di punteggio:

- L'ordine decrescente della data di nascita del titolare o il rappresentante legale per le società (e quindi attribuendo precedenza ai richiedenti più giovani sulla base del mese, giorno ed anno di nascita).

11.3 Ai fini dell'assegnazione del punteggio non saranno valutate spese maggiori ai massimali previsti, sia nell'istruttoria iniziale di finanziabilità che in quella di rendicontazione finale.

**Art.12**

**Documentazione da presentare a corredo della domanda di partecipazione nei modi e nei termini previsti ai commi 10.2 e 10.3**

**12.1 Documentazione generale obbligatoria**

a) dichiarazione di intenti per i "promotori d'impresa" di cui all'articolo 4, comma 4.3, come previsto dall'**Allegato C** al presente Bando;
b) certificato di attribuzione del numero di partita I.V.A. per le imprese iscritte al Registro Imprese come "Inattiva";
c) dichiarazione di inizio attività ai fini I.V.A. presentata all'Agenzia delle Entrate e certificato di attribuzione del numero di partita I.V.A. per i professionisti non costituiti in società iscritte al Registro Imprese;
d) dichiarazione circa gli aiuti *"de minimis*" (**Allegato D** al presente Bando);
e) per gli Aspiranti Guide Alpine e per le Guide Alpine documentazione che attesti l'iscrizione al Collegio delle Guide Alpine;
f) per le Guide Naturalistiche Ambientali e gli Accompagnatori di Media Montagna documentazione che attesti l'iscrizione rispettivamente negli Elenchi provinciali e delle Guide Alpine;
g) atto costitutivo dell'eventuale associazione professionale tra professionisti;
h) statuto o atto costitutivo di qualunque forma associativa che presenta domanda, nel caso si presentasse come promotore di impresa lo statuto o l'atto costitutivo dovranno essere consegnati entro 60 giorni dalla pubblicazione sul B.u.r.Veneto del decreto di ammissibilità provvisoria e finanziabilità provvisoria;
i) il progetto imprenditoriale (**Allegato A** al presente Bando) dovrà contenere come si intende promuovere il sito naturalistico e le caratteristiche specifiche del sito che si intende promuovere (Habitat e habitat di specie) al fine della verifica dell'ammissibilità e dell'attribuzione del progetto richiesto;
j) eventuale procura speciale per la presentazione della domanda ai sensi dell'articolo 1392 c.c. (**Allegato F** al presente Bando);
k) dichiarazione ai fini della richiesta del D.U.R.C. / Attestazione di Regolarità Contributiva (per le professioni ordinistiche), come da modello (**Allegato G** al presente Bando);

**12.2 Documentazione obbligatoria da allegare alla domanda di sostegno provante le conoscenze e le competenza in campo naturalistiche (ammissibilità)**:

a) se il titolo di ammissibilità è compreso tra quelli elencati al comma 4.1 lettera d) copia del titolo di studio o dell'attestato di abilitazione per gli esami abilitanti
b) nel caso di valutazione di altri titoli di studio:
    - programma dei corsi svolti (rilasciato da una Scuola Secondaria Superiore o da un'Università), al fine di provare l'effettiva conoscenza delle materie di carattere naturalistico, dovranno essere evidenti le materie e le singole ore svolte per ciascuna materia;
    - attestato-superamento dell'esame finale;

**Nel caso mancasse la documentazione richiesta la domanda sarà ritenuta inammissibile.**

Nel caso il requisito 4.1 d) fosse in capo a dipendenti o soci lavoratori dipendenti di società cooperativa, dovranno essere identificati nella domanda di sostegno, in questo caso verrà approvata una finanziabilità provvisoria che verrà ufficialmente definita successivamente con lo stato di avanzamento lavori a 60 giorni dalla finanziabilità provvisoria. Si precisa tuttavia che la documentazione richiesta al punto 11.4 a) o b) deve essere allegata alla domanda di sostegno iniziale.

**12.3 Documentazione obbligatoria provante il punteggio richiesto allegata alla domanda di sostegno**

**n. 1Competenze naturalistiche in capo al titolare**

a) Copia del titolo di studio e\o copia del certificato di iscrizione negli elenchi e/o collegi.

**n. 7 Attività svolte in accordo con l'ente gestore**

b) Copia del modello di convenzione siglato con l'ente gestore del sito naturalistico **Allegato E**.

**n. 8ETP presenti al momento della presentazione della domanda di sostegno**

a) documentazione dimostrativa numero degli occupati e il tempo di lavoro dichiarato nel progetto imprenditoriale (lettere di assunzione, comunicazione obbligatoria di assunzione al competente Centro per l'impiego, estratto del libro unico del lavoro, ecc…).

**n. 10 Progetti di impresa per interventi all'interno di area Parco (L. R. 40/84 e legge 394/91) e/o aree Natura 2000 (DPR 357/97)**

a) estratto di mappa catastale, con indicazione della particella del foglio e del punto in cui si intende effettuare l'investimento, individuazione dell'area ammissibile all'interno della quale è collocato l'investimento;
b) attestazione di possesso e pertanto uso esclusivo dell'Area Naturalistica e dell'eventuale immobile in cui verranno realizzati gli investimenti;
c) individuazione su mappa, dell'eventuale Area Naturalistica e della sua collocazione.

**n. 11 Acquisto di attrezzature/mezzi per la visitazione dei siti naturalistici)**

a) individuazione su mappa, dell'eventuale Area Naturalistica o del sito naturalistico promosso;
b) in caso di investimenti amovibili e non, indicazione precisa della loro localizzazione finale;
c) per la priorità **11)** lettere **b)** e **c)** attestazione di possesso dell'Area Naturalistica e dell'eventuale immobile in cui verranno realizzati gli investimenti;
d) per la priorità **11)** lettera **f)** se vi è l'acquisto di imbarcazioni mappa con individuazione dei punti di attracco e relativa attestazione di possesso.

**n. 12 Recupero di piccole imbarcazioni per la visitazione dei siti naturalistici**

a) mappa con individuazione dei punti di attracco e relativa attestazione di possesso;
b) individuazione su mappa, dell'eventuale Area Naturalistica o del sito naturalistico promosso;
c) quadro riepilogativo della spesa.

**Nel caso mancasse la documentazione richiesta il punteggio non verrà assegnato.**

**12.4 Documentazione obbligatoria provante il punteggio richiesto allegata alla domanda di sostegno relativa alla valutazione degli investimenti (n. 10/11/12/13)**

a) 1 preventivo analitico, per ogni tipologia di spesa (caricati sul portale SIU su file PDF separati per tipologia di spesa) riportante nei dettagli l'oggetto della fornitura ;
b) computo metrico estimativo analitico, relazione tecnica e atti progettuali, nel caso di interventi strutturali e lavori;
c) quadro riepilogativo delle Comunicazioni, dei Titoli autorizzativi/abilitativi richiesti e da richiedere per l'esecuzione dei lavori e l'esercizio dell'attività, oltre all'eventuale dichiarazione che si tratta di interventi eseguibili senza Comunicazione ai sensi dell'art. 6, comma 1, lett. a) e b) del D.P.R. 380/2001

d) elaborati grafici della superficie interessata dall'intervento e mappa catastale delle particelle (per installazioni ed opere).
e) attestazione della proprietà delle barche da ristrutturare o riconvertire.

12.5 Ciascun allegato alla domanda di partecipazione, prima del caricamento definitivo nel Sistema SIU, deve essere firmato digitalmente secondo le modalità di cui al comma 10.5.

12.6 Si precisa inoltre che tutte le Dichiarazioni o attestazioni devono essere accompagnate da una copia del documento di riconoscimento, del firmatario, in corso di validità.

**Articolo 13**
**Svolgimento delle attività, variazioni, proroghe e relativi obblighi**

13.1 Stato di avanzamento a 60 giorni (SAL)

**Entro 60 giorni dalla pubblicazione del decreto di ammissibilità e finanziabilità provvisoria e dovrà pervenire la seguente documentazione obbligatoria a pena di revoca del contributo provvisoriamente assegnato:**

a) relazione e riepilogo attestante lo stato di avanzamento lavori e le relative spese sostenute;
b) copia delle richieste di autorizzazione per quanto riguarda le opere e le installazioni che ne sono soggette;
c) i titoli autorizzativi approvati (CIL, CILA, SCIA, DIA, PC…) e i loro allegati, presentati al Comune/SUAP territorialmente competente recante, ove previsto dal DPR n. 380 del 2001, l'indicazione dell'impresa esecutrice dei lavori, del progettista e del direttori lavori, si precisa che i documenti dovranno essere vidimati dall'ente autorizzatore. Dovrà inoltre essere stata espletata la procedura prevista dalla Dgr 2299/2014 relativa alla valutazione di incidenza di cui alla direttiva comunitaria 92/43 CEE e Dpr 357/1997;
d) le copie degli atti progettuali, le relazioni tecniche ed eventuali computi che mettano in evidenza le eventuali variazioni sopravvenute rispetto al progetto finanziato in fase di istruttoria di finanziabilità provvisoria;
e) dimostrazione del possesso dei requisiti di ammissibilità, competenze naturalistiche, laddove, in fase di ammissione al contributo, si sia ottenuta l'ammissibilità grazie alle competenze in capo al personale dipendente a tempo pieno e indeterminato o socio lavoratore a tempo pieno e indeterminato di società cooperativa "art. 4 *comma 1lettera d":*

   - copia della lettera di assunzione e del contratto di lavoro subordinato;
   - copia della comunicazione obbligatoria di assunzione al competente Centro per l'Impiego;
   - produzione della documentazione che dimostri gli occupati e le loro presenze (copia della parte del libro unico del lavoro che attesti ciò).

Le competenze naturalistiche (i dipendenti a tempo pieno e i soci lavoratori a tempo pieno di società cooperativa) devono essere assunti entro 60 giorni dal decreto di ammissibilità e finanziabilità provvisoria e devono rimanere in azienda per tutto il periodo di vincolo delle operazioni (tre anni dalla liquidazione del saldo finale). Nel caso il requisito non fosse soddisfatto la domanda sarà ritenuta non ammissibile e pertanto si procederà alla revoca e al recupero del contributo.

f) documentazione dimostrativa degli occupati dichiarati nel progetto imprenditoriale e le loro presenze (lettere di assunzione, comunicazione obbligatoria di assunzione al competente Centro per l'impiego, estratto del libro unico del lavoro che evidenzi le presenze e, riepilogo che attesti il numero di ore lavorative, ecc);
g) attestazione definitiva di possesso dello spazio (investimenti 6.1 n.2 lettera a)), dell'Area Naturalistica e/o dell'immobile in cui verranno installati, depositati realizzati gli investimenti e del punto di attracco;
h) dichiarazione De Minimis;
i) i promotori d'impresa dichiarazione ai fini della richiesta del D.U.R.C. / Attestazione di Regolarità Contributiva (per le professioni ordinistiche), come da modello (**Allegato 10** al presente Bando);
j) i promotori d'impresa dovranno inoltre adempiere agli obblighi previsti all'art.4.3 e inviare lo statuto o l'atto costitutivo art.12.2 lettera h.

13.2 Si precisa che non sono ammesse varianti, possono essere tuttavia ammesse modifiche non sostanziali solo se preventivamente valutate e autorizzate dall'ufficio responsabile del procedimento.

13.2 Ai fini della verifica del soddisfacimento del requisito 4.1 lettera d), acquisito grazie ai dipendenti, non si considerano i casi di perdita temporanea, i periodi di interruzione dovuti ai tempi tecnici necessari per ripristinare la situazione di conformità alla norma. In ogni caso, tale periodo di interruzione, continuativo o frazionato che sia, non può essere maggiore di tre mesi nell'ambito dell'intero periodo di sussistenza dell'obbligo. In ogni caso non sono ammesse variazioni del suddetto requisito prima della pubblicazione del decreto di ammissibilità e finanziabilità.

13.3 È fatto obbligo al titolare comunicare eventuali variazioni che incidano sull'attribuzione ed il mantenimento delle competenze in campo naturalistico di cui all'art. 4.1 d).

13.4 è fatto obbligo al titolare comunicare preventivamente, anche ai fini di eventuali autorizzazioni da parte della Regione, qualunque variazione della sede, dell'attività e della compagine sociale/associativa;

13.5 Può essere prevista una proroga purché richiesta entro 30 giorni dalla conclusione del progetto prevista per il **15 ottobre 2017**. La proroga ai lavori può essere purché siano presenti cause di forza maggiore.

## Sostegno

### Art. 14
### Modalità di erogazione del sostegno e rendicontazione

14.1 La domanda di erogazione del contributo deve essere presentata dai soggetti beneficiari entro il termine perentorio del **30 ottobre 2017,** esclusivamente tramite il Sistema SIU. La domanda è soggetta al pagamento dell'imposta di bollo. Il numero identificativo (seriale) della marca da bollo deve essere inserito nell'apposito campo della domanda on line.

14.2 La domanda di erogazione e la documentazione allegata, prima del caricamento definitivo nel Sistema SIU, devono essere firmate digitalmente dal legale rappresentante dell'impresa o dal singolo professionista ovvero, nel caso di associazione professionale, dal professionista

formalmente designato a rappresentarla ovvero da un procuratore munito di procura speciale per la presentazione della domanda di erogazione del contributo e della rendicontazione.

In particolare, il beneficiario è tenuto a trasmettere in allegato alla **domanda di saldo**:

a) relazione finale sull'attività progettuale svolta e sugli obiettivi raggiunti, contenente la descrizione delle attività svolte coerentemente con le spese sostenute e i relativi tempi di realizzazione, la descrizione dei risultati ottenuti rispetto ai risultati attesi e delle modalità adottate per garantire lo sviluppo delle attività progettuali dopo il termine del progetto. La relazione deve altresì evidenziare le ricadute sul piano occupazionale dell'attività progettuale realizzata in relazione agli obiettivi previsti nel progetto imprenditoriale ammesso a contributo;
b) documentazione attestante la disponibilità dell'unità operativa - come definita all'articolo 4, comma 4.2 - o dell'area/sito in cui è stato realizzato il progetto ammesso all'agevolazione per un periodo di almeno tre anni dalla data di erogazione del contributo. L'atto da cui risulta il titolo di disponibilità dell'immobile deve riportare gli estremi di registrazione presso l'Agenzia delle Entrate. Qualora il contratto di locazione dovesse scadere prima del decorso del triennio, il beneficiario dovrà produrre alla Regione l'atto di proroga con gli estremi di registrazione presso l'Agenzia delle Entrate;
c) per gli investimenti individuati all'art. 6.1 n 3, documentazione attestante il possesso dell'approdo e/o del pontile per tutto il periodo di vincolo delle operazioni.
d) eventuali ordini e documenti giustificativi di spesa: fatture o altri titoli idonei a giustificare la spesa del progetto che dovrà arrecare apposito annullo, mediante apposizione della seguente dicitura: "Spesa finanziata dalla Regione del Veneto nell'ambito del POR FESR 2014-2020, Azione 3.5.1";
e) documenti giustificativi di pagamento dei titoli di spesa di cui alla lettera c) predisposti secondo le modalità indicate al comma 14.3;
f) visura catastale non antecedente a tre mesi rispetto alla data di presentazione della domanda di erogazione del contributo relativa all'immobile in cui è stato realizzato il progetto imprenditoriale;
g) contabilità finale dei lavori comprensiva di computo metrico estimativo finale e la relazione tecnica, la relazione dovrà descrivere il procedimento autorizzativo, i lavori eseguiti ed eventuali varianti.
   Qualora si tratti di interventi eseguibili senza Comunicazione ai sensi dell'art. 6, comma 1, lett. a) e b) del D.P.R. 380/2001, il beneficiario dovrà produrre una dettagliata relazione dei lavori eseguiti redatta, datata e sottoscritta da ciascuna impresa esecutrice e dall'eventuale progettista e/o direttore lavori e dichiarazione del progettista che attesti la non necessità di comunicazione;
h) copia delle autorizzazioni delle conformità previste per legge (agibilità, dichiarazioni di conformità degli impianti esercizio dell'attività ecc…), in caso di opere impiantistiche: dichiarazione di conformità dell'impianto, completa di tutti gli allegati, rilasciata dall'impresa installatrice ai sensi del decreto ministeriale n. 37 del 2008 o certificato di collaudo dell'impianto installato, ove previsto dalla norme vigenti;
i) autodichiarazione attestante che è trascorso il periodo di diniego o di divieto di prosecuzione dei lavori o dell'attività e non è pervenuta alcuna forma di dissenso/divieto da parte delle autorità competente;
j) dichiarazione ai fini della richiesta del D.U.R.C. / Attestazione di Regolarità Contributiva (per le professioni ordinistiche) aggiornata, come da modello (**Allegato G** al presente Bando).

k) documentazione fotografica attestante la realizzazione del progetto e la collocazione del poster di cui all'articolo 17, comma 17.3 oltre che l'adempimento dell'obbligo informativo di cui al citato articolo, comma 17.2;
l) laddove, in fase di ammissione al contributo, si sia ottenuta l'ammissibilità grazie alle competenze in capo al personale dipendente "art. 4.1lettera *d"*,dimostrazione del mantenimento dei requisiti di ammissibilità relativamente alle competenze naturalistiche:
    - produzione della documentazione che dimostri che è ancora in azienda con contratto a tempo pieno e indeterminato (copia della parte del libro unico del lavoro ecc ….).

m) produzione della documentazione dimostrativa del numero di occupati (copia della parte del libro unico del lavoro che attesti ciò);
n) eventuale procura speciale per la presentazione della domanda di erogazione del contributo e della rendicontazione ai sensi dell'articolo 1392 c.c. (**Allegato F** al presente Bando);
o) documentazione attestante la proprietà, l'autorizzazione alla circolazione e alla navigabilità e dei beni mobili registrati (imbarcazioni e altri veicoli);
p) copia della catalogazione degli interventi e degli acquisti con conferma della loro allocazione nella sede operativa identificata nella domanda iniziale**.**

14.3 Le spese saranno riconosciute se interamente pagate e accompagnate dalla relativa attestazione di avvenuto pagamento. Sono ammissibili esclusivamente le spese effettuate mediante le seguenti modalità e giustificate dalla documentazione sottoelencata:

| Modalità di pagamento | Documentazione probatoria da allegare | Note |
|---|---|---|
| Bonifico bancario<br><br>(anche tramite *home banking*) | 1) estratto conto in cui sia visibile:<br><br>• l'intestatario del conto corrente;<br>• la causale dell'operazione con il riferimento alla fattura pagata;<br>• il numero identificativo dell'operazione (C.R.O. o T.R.N.) | Qualora l'estratto conto non riporti uno o più elementi richiesti, sarà necessario allegare anche la copia conforme all'originale della contabile bancaria |
| Ricevuta bancaria | 1) estratto conto in cui sia visibile:<br><br>• l'intestatario del conto corrente;<br>• la causale dell'operazione con il riferimento alla fattura pagata;<br>• il codice identificativo dell'operazione | Qualora l'estratto non riporti uno o più elementi richiesti, sarà necessario allegare anche la copia conforme all'originale della distinta bancaria |
| Ricevuta bancaria *cumulativa* | 1) estratto conto in cui sia visibile:<br><br>• l'intestatario del conto corrente;<br>• la causale dell'operazione con il riferimento alla fattura pagata;<br>il codice identificativo dell'operazione<br><br>2) copia conforme all'originale delle singole distinte riferite ai vari | |

| | | |
|---|---|---|
| | pagamenti compresi nella ri.ba. cumulativa, al fine di riscontrare l'addebito corretto nell'estratto conto corrente | |
| Assegno non trasferibile | 1) estratto conto in cui sia visibile:<br>• l'intestatario del conto corrente;<br>• Il numero assegno;<br>2) copia leggibile dell'assegno;<br>3) dichiarazione resa ai sensi degli artt. 46 e 47 del D.P.R. n. 445/2000 dal fornitore che attesti:<br>• numero dell'assegno;<br>• numero e data fattura;<br>• l'esito positivo dell'operazione; | • Non sarà sufficiente la sola matrice;<br>• Non saranno accettati assegni sottoscritti da soggetti diversi dal beneficiario. |
| Carta di credito<br>(intestata al beneficiario) | 1) estratto del conto corrente in cui sia visibile:<br>• l'intestatario del conto corrente;<br>• addebito delle operazioni;<br>2) estratto conto della carta di credito;<br>3) scontrino | In caso di smarrimento della ricevuta di pagamento, produrre dichiarazione resa ai sensi degli artt. 46 e 47 del D.P.R. n. 445/2000 dal fornitore che attesti l'avvenuta transazione, il n. della fattura e la modalità di pagamento della stessa. |

14.4 Non sono ammessi, in nessun caso, pagamenti per contanti, né compensazioni di debito/credito. Inoltre, non è ammessa la semplice quietanza su fattura priva del documento di addebito corrispondente.

14.5 Per le prestazioni che comportano l'applicazione della ritenuta d'acconto è necessario allegare anche copia del modello F24 utilizzato dal beneficiario per il versamento. Si fa presente che non sono ammissibili le spese per ritenute versate dopo la scadenza del 15 ottobre 2017.

14.6 La documentazione contabile e i pagamenti sostenuti devono essere intestati e direttamente riconducibili al beneficiario del contributo.

14.7 La descrizione dei beni o servizi oggetto della fattura deve essere analitica, in particolare si dovrà evincere il tipo di bene/servizio acquistato ed il relativo importo. Laddove la descrizione risulti generica deve essere prodotta una dichiarazione, resa ai sensi degli artt. 46 e 47 del D.P.R. n. 445/2000, dal fornitore con il dettaglio della spesa.

14.8 Qualora la documentazione prodotta in sede di rendicontazione risulti carente, la Regione assegna all'interessato un termine perentorio non superiore a **10 (dieci) giorni** di calendario dal ricevimento della richiesta per l'integrazione della documentazione mancante. Decorso tale termine, si concluderà l'istruttoria con la documentazione agli atti.

14.9 L'iter di esame dell'ammissibilità della spesa rendicontata è svolto nel rispetto della legge 7 agosto 1990, n. 241 e successive modifiche ed integrazioni. La procedura istruttoria, comprensiva

della fase di liquidazione del contributo, sarà completata entro 90 giorni dalla data di presentazione della domanda.

14.10 Sono ammesse compensazioni tra le tipologie di spesa (Progetti di impresa per interventi all'interno di area Parco (L. R. 40/84 e legge 394/91) e/o aree Natura 2000 (DPR 357/97 e Acquisto di attrezzature/mezzi per la visitazione dei siti naturalistici) individuate all'articolo 6, comma 6.1 fino ad un massimo del 10% del costo totale dell'investimento ammesso a contributo. Dovrà comunque essere garantita la coerenza delle attività svolte e/o della documentazione di spesa presentata rispetto a quanto dichiarato e prodotto in sede di istanza.

## Verifiche e controlli

**Art. 15**
**Rinuncia e decadenza del sostegno**

15.1 In caso di rinuncia al contributo concesso, la Regione provvede ad adottare il provvedimento di revoca ed il beneficiario deve restituire l'eventuale beneficio già erogato.

15.2 Salvo quanto previsto al comma 15.1, il contributo è dichiarato decaduto con conseguente revoca **totale** nei seguenti casi:

a) mancata conclusione del progetto ammesso a contributo e pertanto attivi entro il termine perentorio del **15 ottobre 2017** artt. 5.2 e 5.3;
b) mancata presentazione della domanda di erogazione del contributo entro il termine perentorio del **30 ottobre 2017** art. 14.1;
c) qualora, in fase di rendicontazione, la spesa ritenuta ammissibile risulti inferiore al 70% dell'importo originariamente riconosciuto in fase di ammissione all'agevolazione o, comunque, ad euro 14.000,00 (quattordicimila/00) art. 8.3;
d) se entro 60 giorni dalla pubblicazione della graduatoria ammissibilità e di finanziabilità provvisoria non sarà inviato lo Stato di avanzamento dei lavori (SAL) con i relativi allegati, art 13.1;
e) se entro 60 giorni dalla pubblicazione della graduatoria di finanziabilità provvisoria i dipendenti con competenze naturalistiche, indicati con la domanda iniziale, non risulteranno assunti per tutto il periodo di vincolo delle operazioni, fino a tre anni dalla liquidazione del saldo finale, art 4.1 lettera d);
f) mancata stipula e relativa registrazione del contratto definitivo di possesso dell'Area Naturalistica e/o dell'immobile art. 11.7;
g) mancato rispetto del requisito del mantenimento competenze naturalistiche per tutto il periodo di vincolo delle operazioni, considerato sino a tre anni dal decreto di liquidazione del saldo finale, art 4.1 lettera d);
h) mancata apertura dell'unità operativa sul territorio della Regione del Veneto entro il **15 ottobre 2017** art 4.1 lettera c)
i) qualora il beneficiario abbia reso, nel modulo di domanda e in qualunque altra fase del procedimento, dichiarazioni mendaci o esibito atti falsi o contenenti dati non rispondenti a verità, fermo restando le conseguenze previste dalle norme penali vigenti in materia;
j) per le imprese ammesse con riserva, di cui all'articolo 4, commi 4.1, lettera c) e 4.3, mancato adempimento degli obblighi, entro i limiti temporali ivi previsti;
k) qualora la realizzazione dell'intervento non sia conforme, nel contenuto e nei risultati conseguiti, all'intervento ammesso a contributo;

l) qualora, prima che siano trascorsi 3 anni dalla data di erogazione del contributo, il beneficiario risulti destinatario di altre agevolazioni previste nell'ambito delle azioni 3.5.1 e 3.3.4 del POR FESR Veneto 2014-2020 anche se concesse sulla base del Regolamento *"de minimis"* n. 1407/2013;
m) cessazione dell'attività, prima che siano trascorsi 3 anni dalla data di erogazione del contributo;
n) in tutti gli altri casi espressamente previsti dal presente Bando.

15.3 Si procede a revoca **parziale** del contributo, in proporzione al periodo per il quale i requisiti non sono stati soddisfatti, nei seguenti casi:

a) qualora la spesa rendicontata e ritenuta ammissibile sia inferiore all'importo inizialmente concesso in fase di ammissione a contributo, fermo restando il limite di cui all'articolo 8, commi 8.2 e 8.3;
b) qualora, a seguito di una variazione dell'attività intrapresa, prima che siano trascorsi 3 anni dalla data di erogazione del contributo;
c) mancato mantenimento dell'unità operativa in cui si è realizzato il progetto nel territorio della Regione Veneto per un periodo di 3 anni decorrenti dalla data di erogazione del contributo;
d) in caso di sussistenza e/o attivazione a carico del beneficiario di procedure di scioglimento volontario, liquidazione volontaria, liquidazione coatta amministrativa, fallimento, concordato preventivo, amministrazione controllata o altre procedure concorsuali, prima che siano trascorsi 3 anni dalla data di erogazione del contributo, nel rispetto della stabilità dell'operazione di cui all'art. 71 del Reg. (CE) n.1303/2013;
e) qualora il beneficiario trasferisca altrove, alieni o destini ad usi diversi da quelli previsti nel programma di investimenti i beni acquistati per la realizzazione del progetto prima che siano trascorsi 3 anni dalla data di erogazione del contributo;
f) in tutti gli altri casi espressamente previsti dal presente Bando.

15.4 Le domande di sostegno iniziali saranno ritenute non ammissibili nei seguenti casi:

a. assenza delle competenze e della documentazione dimostrante le conoscenze in campo naturalistico art.4.1 lettera d);
b. mancata dimostrazione delle competenze minime di gestione aziendale art. 4.4 lettera f);
c. in tutti gli altri casi espressamente previsti dal presente Bando.

15.5 La revoca del contributo comporta la restituzione degli importi erogati maggiorati di un interesse pari al tasso ufficiale di riferimento vigente alla data del provvedimento di revoca, aumentato di due punti percentuali ai sensi dell'art.11, comma 5 della legge regionale 28 gennaio 2000, n. 5 e sm.i..

15.6 In caso di cessione o conferimento d'azienda o di ramo d'azienda, di fusione o di scissione di impresa, non si procede alla revoca del contributo concesso ed erogato a condizione che il soggetto subentrante sia in possesso dei requisiti soggettivi ed oggettivi di cui all'art. 4, continui ad esercitare l'impresa ed assuma gli obblighi relativi previsti dal Bando. A tal fine, nell'atto di cessione/conferimento deve essere esplicitamente previsto che le agevolazioni sono cedute al soggetto subentrante. Laddove, successivamente al trasferimento delle agevolazioni, si debba procedere alla revoca totale o parziale delle medesime, il soggetto subentrante risponde delle somme erogate al precedente beneficiario. Il cedente deve comunicare alla Regione il trasferimento

dell'azienda entro 30 giorni dalla data dell'evento. Fatti salvi i casi di oggettiva impossibilità, la mancata comunicazione dell'avvenuto trasferimento entro il termine suddetto comporta a carico del cedente la revoca parziale del contributo erogato ai sensi del comma 15.3. Si precisa che la valutazione e del rispetto dei requisiti resta in carico alla Struttura regionale responsabile del procedimento amministrativo.

**Art. 16**
**Verifiche e controlli del sostegno**

16.1 La Regione si riserva la facoltà di svolgere, ai sensi degli artt. 125 "Funzioni dell'autorità di gestione" e 127 "Funzioni dell'autorità di audit" del Regolamento UE 1303/2013, anche al fine di verificare il rispetto di quanto previsto all'art. 71 "Stabilita delle operazioni" dello stesso Regolamento, tutti i controlli e sopralluoghi ispettivi, sia durante che nei tre anni successivi alla conclusione del progetto, al fine di verificare ed accertare quanto segue:

- il rispetto dei requisiti richiesti per l'ammissibilità della domanda, l'ammissione e l'erogazione del contributo e la conformità degli interventi realizzati rispetto al progetto ammesso al contributo per i 3 anni successivi all'erogazione del contributo;
- che gli interventi e le azioni realizzate siano conformi a quanto stabilito nel bando;
- che le spese dichiarate siano reali ed effettivamente sostenute e corrispondano ai documenti contabili e ai documenti giustificativi conservati dal beneficiario-la proprietà, il possesso e l'operatività dei beni e delle opere finanziati, per 3 anni dall'erogazione del contributo al beneficiario;
- che la spesa dichiarata dal beneficiario sia conforme alle norme comunitarie e nazionali.

A partire dalla data di erogazione del contributo a saldo, la documentazione amministrativa, contabile e tecnica relativa al progetto deve essere conservata per 10 (dieci) anni e resa accessibile per ogni accertamento, verifica o controllo da parte del personale della Regione Veneto o di altri soggetti aventi titolo al riguardo.

16.2 La Regione potrà effettuare, sia durante che nei 3 anni successivi alla conclusione del progetto, approfondimenti istruttori e documentali e potrà chiedere copia di documenti riguardanti l'investimento agevolato o altra documentazione necessaria a verificare il rispetto delle condizioni e dei requisiti previsti nel presente bando per l'ammissibilità della domanda e per l'ammissione/erogazione del contributo.

16.3 La Commissione europea, ai sensi dell'art. 75 del regolamento CE 1303/2013, potrà svolgere – con le modalità indicate nel medesimo articolo – controlli, anche in loco, in relazione ai progetti imprenditoriali cofinanziati.

I beneficiari del contributo sono tenuti a consentire ed agevolare le attività di controllo da parte della Regione e della Commissione Europea e a mettere a disposizione tutte le necessarie informazioni e tutti i documenti giustificativi relativi alle spese ammesse a contributo.

16.4 Nel caso in cui il beneficiario non si renda disponibile ai controlli in loco o non produca i documenti richiesti nel termine di 20 giorni dalla ricezione della comunicazione relativa alla notifica di sopralluogo si procederà alla revoca totale e relativo recupero del contributo.

16.5 Si precisa che i progetti saranno soggetti a controllo in loco prima della liquidazione finale, e pertanto si procederà all'annullamento delle fatture originali.

## Pubblicità, informazioni generali e informativa sul trattamento sui dati personali

### Art. 17
### Obblighi di informazione e pubblicità

17.1 I beneficiari del contributo sono tenuti al rispetto degli obblighi a loro carico in materia di informazione e comunicazione, previsti dal Regolamento (UE) n. 1303/2013 (Allegato XII, punto 2.2) e dal Regolamento di esecuzione (UE) n. 821/2014 (artt. 4-5, Allegato II). In particolare, ai beneficiari spetta informare il pubblico in merito al finanziamento ottenuto in base al presente bando.

17.2 Il Beneficiario pubblica nel proprio sito web, ove esistente, una descrizione del progetto, comprensiva di finalità e risultati, che evidenzi il sostegno finanziario complessivamente concesso. Il Beneficiario è tenuto a collocare un poster (formato minimo A3) in un luogo facilmente visibile dal pubblico, come l'area di ingresso di un edificio, con una descrizione del progetto. Si precisa inoltre che il materiale informativo e promozionale finanziato dal POR FESR Veneto 2014-2020 dovrà riportare in maniera visibile il logo del Programma.

17.3 Le Linee guida per i beneficiari sulle responsabilità in materia di informazione comunicazione, con l'indicazione puntuale degli obblighi e delle modalità per rispettarli, sono disponibili sul sito istituzionale:

http://www.regione.veneto.it/web/programmi-comunitari/beneficiari.

17.4 Il Beneficiario del contributo avrà inoltre l'obbligo, se richiesto, di collaborare con la Regione alla realizzazione di prodotti multimediali per informare il pubblico in merito agli interventi realizzati e finanziati nell'ambito del POR FESR.

17.5 Ai fini del rispetto del principio di trasparenza delle procedure si informano tutti i soggetti partecipanti al presente bando, che gli elenchi dei beneficiari e dei soggetti esclusi saranno diffusi tramite la loro pubblicazione nel Bollettino Ufficiale della Regione del Veneto.

Ai sensi degli art. 26 e 27 del D.lgs.n.33/2013 e dell'art.1 del DPR n.118/2000, la concessione del sostegno è quindi pubblicata sul sito istituzionale della Regione ai seguenti link:

http://www.regione.veneto.it/web/bandi-avvisi-concorsi/
http://www.regione.veneto.it/web/guest/sovvenzioni-contributi-sussidi-vantaggi-economici
http://www.regione.veneto.it/web/ragioneria/albo-Beneficiari
http://www.regione.veneto.it/web/programmi-comunitari/fesr-2014-2020

**Art. 18**
**Disposizioni finali e normativa di riferimento**

18.1 Per quanto non previsto nel presente bando, si fa riferimento alle norme comunitarie, nazionale e regionali vigenti.

L'Amministrazione regionale si riserva, ove necessario, di impartire ulteriori disposizioni e istruzioni che si rendessero necessarie a seguito dell'emanazione di normative comunitarie e/o statali e/o regionali.

18.2 Decisione (CE) C(2015) 5903 finale del 17/08/2015 con cui la Commissione Europea ha approvato il POR FESR 2014-2020, Obiettivo "Investimenti a favore della crescita e dell'occupazione" della Regione del Veneto;

Criteri per la Selezione delle Operazioni approvati dal Comitato di Sorveglianza del POR FESR 2014-2020 in data 03/02/2016;

Regolamento (UE) n. 1303/2013 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 17 dicembre 2013, recante disposizioni comuni sul Fondo europeo di sviluppo regionale, sul Fondo sociale europeo, sul Fondo di coesione, sul Fondo europeo agricolo per lo sviluppo rurale e sul Fondo europeo per gli affari marittimi e la pesca e disposizioni generali sul Fondo europeo di sviluppo regionale, sul Fondo sociale europeo, sul Fondo di coesione e sul Fondo europeo per gli affari marittimi e la pesca, e che abroga il regolamento (CE) n.1083/2006 del Consiglio e relativi Regolamenti delegati e di esecuzione;

Regolamento (UE) n. 1301/2013 relativo al Fondo europeo di sviluppo regionale e a disposizioni specifiche concernenti l'obiettivo "Investimenti a favore della crescita e dell'occupazione" e che abroga il regolamento (CE) n. 1080/2006;

Regolamento (UE) n.1407/2013 della Commissione del 18 dicembre 2013 relativo all'applicazione degli articoli 107 e 108 del trattato sul funzionamento dell'Unione europea agli aiuti «de minimis».

18.3 Per quanto non previsto nel presente Bando, si fa riferimento alle norme comunitarie, nazionali e regionali vigenti.

- Guida Naturalistico-Ambientale (GNA) come definita dalla Legge regionale del 4 novembre 2002, n. 33 e s.m.i.
- Accompagnatore di media montagna (AMM) come definita dalla Legge nazionale del 2-gennaio-1989 n. 6 e s.m.i., Legge. Regionale 3- gennaio 2005 n. .1 e s.m.i.
- Aspirante Guida come definita dalla Legge nazionale del 2-gennaio-1989 n. 6 e s.m.i. e Legge regionale 3- gennaio 2005 n. .1 e s.m.i.
- Guida Alpina – maestro di Alpinismo come definita dalla Legge nazionale del 2-gennaio-1989 n. 6 e s.m.i. e Legge regionale 3- gennaio 2005 n. .1 e s.m.i.

18.4 Formulario standard secondo quanto previsto dalla Dgr 3173/2006 e Dgr 2299/2014 e s.m.i.

**Art. 19**
**Informazioni generali**

19.1 Copia integrale del Bando e dei relativi allegati sono pubblicati nel Bollettino Ufficiale della Regione Veneto e sul sito istituzionale www.regione.veneto.it/web/bandi-avvisi-concorsi/bandi

19.2 Le comunicazioni tra Regione e beneficiario avverranno esclusivamente tramite PEC all'indirizzo dip.agricolturasvilupporurale@pec.regione.veneto.it.

19.3 Informazioni e chiarimenti potranno essere chiesti alla Regione del Veneto – Sezione Parchi Biodiversità Programmazione Silvopastorale Tutela Consumatori, telefonando al seguente numero: 041/2795467.

19.4 Responsabile del procedimento è il Direttore della Sezione Parchi Biodiversità Programmazione Silvopastorale e Tutela dei Consumatori con sede in Mestre Venezia 30172, via Torino 110.

19.5 Gli atti connessi al presente Bando sono custoditi e visionabili presso la Sezione Parchi Biodiversità Programmazione Silvopastorale Tutela Consumatori, con sede in con sede in Mestre Venezia 30172, via Torino 110. L'accesso agli atti avviene secondo le modalità previste dalla legge n. 241/90.

19.6 Informazioni e chiarimenti potranno essere chiesti alla Regione del Veneto, con esclusione di qualsiasi valutazione di ammissibilità del progetto per il quale si chiede il sostegno.

**Art. 20**
***Informativa ai sensi dell'art. 13 del D.Lgs n. 196 del* 2003**

20.1 Ai sensi del decreto legislativo n. 196/2003 i dati acquisiti in esecuzione del presente Bando sono utilizzati esclusivamente per le finalità relative al procedimento amministrativo per il quale sono comunicati, secondo le modalità previste dalle leggi e dai regolamenti vigenti. Titolare del trattamento dei dati è il Direttore della Sezione Parchi Biodiversità Programmazione Silvopastorale Tutela Consumatori.

REGIONE DEL VENETO

**ALLEGATO B DGR nr. 1058 del 29 giugno 2016** 

**Azione** ***3.5.1 –" Interventi di supporto alla nascita di nuove imprese sia attraverso incentivi diretti, sia attraverso l'offerta di servizi, sia attraverso interventi di micro finanza."*** **Sub-Azione** ***"Imprese naturalistiche".***

# BANDO PER L'EROGAZIONE DI CONTRIBUTI ALLE IMPRESE NATURALISTICHE

## PROGETTO IMPRENDITORIALE

**N.B.** ***Si precisa che il presente progetto sarà oggetto di valutazione ai fini dell'ammissibilità e dell'assegnazione del*** **punteggio, richiesto pertanto deve essere compilato con accuratezza in ogni campo.**

**NOME E COGNOME O RAGIONE SOCIALE DEL PROPONENTE:**

**C.F. E/O PARTITA IVA DEL PROPONENTE:**

**SOGGETTO PROPONENTE**

**1) Competenze in campo naturalistico**

Indicare quale soggetto possiede le competenze in campo naturalistico e compilando la relativa tabella informativa.

☐ **promotore d'impresa**

| | |
|---|---|
| Tipo di società che intende costituire | |
| Titolo di studio/ conseguito a/data rilascio | |
| Qualifica nella futura impresa | |
| Esperienze professionali passate | |
| Attività simili svolte in precedenza | |
| Allegati | ☐ Copia del titolo di studio<br>☐ Inserimento Elenco / Collegi |

☐ **titolare/legale rappresentate**

| | |
|---|---|
| Qualifica nell'impresa | |
| Titolo di studio/ conseguito a/data rilascio/esame naturalistico | |
| Esperienze professionali passate | |
| Attività simili svolte in precedenza | |
| Allegati | ☐ Copia del titolo di studio<br>☐ Inserimento Elenco / Collegi |

☐ **dipendente a tempo pieno e indeterminato**



0108068a

| Nome e cognome | | nata/o il | nel Comune di | | Prov |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | |
| Comune di residenza | CAP | Via | | n. | Prov |
| | | | | | |
| Qualifica nell'impresa | | | | | |
| Titolo di studio/ conseguito a/data rilascio | | | | | |
| Esperienze professionali passate | | | | | |
| Attività simili svolte in precedenza | | | | | |
| Allegati | | ☐ Copia del titolo di studio<br>☐ Inserimento Elenco / Collegi | | | |

☐ **socio lavoratore, a tempo pieno e indeterminato, di società cooperative**

| Nome e cognome | | nata/o il | nel Comune di | | Prov |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | |
| Comune di residenza | CAP | Via | | n. | Prov |
| | | | | | |
| Qualifica nell'impresa | | | | | |
| Titolo di studio/ conseguito a/data rilascio | | | | | |
| Esperienze professionali passate | | | | | |
| Attività simili svolte in precedenza | | | | | |
| Allegati | | ☐ Copia del titolo di studio<br>☐ Inserimento Elenco / Collegi | | | |

*ATTIVITÀ IMPRENDITORIALE*

| Tipo di attività (promozione e valorizzazione dei siti di importanza naturalistica):<br><br>1<br><br>2 | CodiceATECO: |
|---|---|
| Tipologia di titolo di possesso della sede operativa (allegare copia del titolo di possesso): | |



0108068a

*SITO O AREA NATURALE DELLA RETE ECOLOGICA REGIONALE CHE SI INTENDE PROMUOVERE, VALORIZZARE E CONSERVARE:*

| **INDIVIDUAZIONE E INDICAZIONE DEI CODICI IDENTIFICATIVI DEL SITO (ALLEGARE CARTOGRAFIA)** |
|---|
| □ IL SISTEMA DELLE AREE NATURALI PROTETTE PRESENTI NEL TERRITORIO REGIONALE DEL VENETO;<br>□ LE ZONE SPECIALI DI CONSERVAZIONE, I SITI DI IMPORTANZA COMUNITARIA PROPOSTI ED APPROVATI E LE ZONE DI PROTEZIONE SPECIALE, FACENTI PARTE DELLA RETE NATURA 2000;<br>□ GLI AMBITI INDIVIDUATI NEL PIANO TERRITORIALE REGIONALE DI COORDINAMENTO PER LE PARTI NON REGOLATE DALLE LEGGI ISTITUTIVE DELLE AREE NATURALI PROTETTE, CHE RESTANO COMUNQUE SOGGETTE ALLE NORME DI SALVAGUARDIA PREVISTE DAL P.T.R.C;<br>□ I PARCHI DI INTERESSE LOCALE;<br>□ I CORRIDOI ECOLOGICI E LE ALTRE STRUTTURE DI COLLEGAMENTO E FUNZIONAMENTO DELLA RETE, COSÌ COME INDIVIDUATE NEGLI STRUMENTI DI PIANIFICAZIONE TERRITORIALE REGIONALE E PROVINCIALE;<br>□ *LE AREE NATURALI CHE RIENTRANO NEL PATRIMONIO DELL'UMANITÀ* E RISERVA DI BIOSPHERA MAB *SECONDO LE DEFINIZIONI DELL'UNESCO.* |

| |
|---|
| *DESCRIVI LA TUA CAPACITA' AMMINISTRATIVA* |
| *DESCRIVI LA TUA CAPACITA' OPERATIVA* |
| *DESCRIVI LA TUACAPACITA' FINANZIARIA*<br>*Specificare in che modo gli investimenti (beni e/o servizi) che verranno realizzati permetteranno lo svolgimento dell'attività aziendale* |

***Appropriatezza e descrizione dello stato dell'arte relativo al problema da risolvere o all'opportunità da* sviluppare**

| |
|---|
| *Progetto e attività oggetto del finanziamento:* |
| *Modalità con cui si intende promuovere e valorizzare il sito naturalistico (deve essere coerente con gli investimenti effettuati):* |
| *Emergenze naturalistiche, punti di interesse specifici che si intendono valorizzare e come:* |
| *In che modo gli investimenti permettono di promuovere e valorizzare il sito naturalistico o l'Area Naturalistica* |

| |
|---|
| *Altre attività che promuovono il sito naturalistico (identificare le ditte, la loro tipologia di attività e alcune attività svolte,tipologia di integrazione ecc….):* |
| *Esistono altre attività simili che promuovono e valorizzano l'area naturalistica, se si quali?* |

| |
|---|
| *In che modo la tua attività può essere considerata innovativa:* |

| |
|---|
| *Quali sono i tuoi potenziali clienti:* |



0108068a

| |
|---|
| ***Descrizione delle peculiarità naturalistiche che dovranno essere riportate nel materiale promozionale:*** |
| *Descrizione del sito (corredare la descrizione con foto dell'area, dell'habitat, che si vuole promuovere, valorizzare con la propria attività economica):* |
| *Perché è importante valorizzare e promuovere il sito naturalistico scelto:* |
| *Caratteristiche naturalistiche del sito (da compilare sulla base del formulario standard natura 2000):* |
| *Habitat:* |
| *Specie animali:* |
| *Specie Vegetali:* |
| *Descrizione del materiale promozionale(tipologia e quantità che verranno prodotte):* |
| *Bozze:* |



0108068a

| **CONTO ECONOMICO PREVISIONALE** | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Conto Economico | Anno 1° | Anno 2° | Anno 3° | Totale |
| Ricavi attività 1 | | | | |
| Ricavi attività 2 | | | | |
| Costi | | | | |
| | | | | |

| | Codice ISTAT | esteso | Descrizione |
|---|---|---|---|
| attività 1 | | | |
| attività 2 | | | |

| **PROSPETTO DEGLI IMPIEGHI E FONTI DI COPERTURA** *(Nella sezione "Impieghi", inserire: Beni di investimento materiali ed immateriali da acquistare (che generano quindi il fabbisogno finanziario): specificare tutte le spese del progetto: sia quelle ammissibili che quelle non previste da bando e che, quindi, saranno a completo carico del concorrente. Sezione "Fonti", al fine di determinare/garantire l'adeguata copertura del totale degli impieghi, quindi evitare pericolose tensioni finanziarie nel periodo di avvio dell'iniziativa, è necessario individuare una o più fonti di copertura.)* | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ANNO 2015 (€) | ANNO 2016 (€) | ANNO 2017 (€) | TOTALE (€) |
| **IMPIEGHI (Fabbisogno finanziario)** | | | | |
| a) Investimenti Immateriali (IVA inclusa) | | | | |
| b) Investimenti Materiali (IVA inclusa) | | | | |
| ***Totale Impieghi*** | | | | |
| **FONTI** | | | | |
| a) Mezzi propri: | | | | |
| *a.1) Capitale Sociale* | | | | |
| *a.2) Incremento Capitale Sociale (accantonamento utili)* | | | | |
| *a.3) Finanziamento Soci* | | | | |
| b) Altri Finanziamenti: | | | | |
| *b.1) Finanziamenti bancari a breve termine* | | | | |
| *b.2) Finanziamenti bancari a medio-lungo termine* | | | | |
| *b.3) Altre disponibilità (specificare)* | | | | |
| ***Totale Fonti*** | | | | |

| **ci sono collegamenti con gli obbiettivi comuni di altri fondi** |
|---|
| DESCRIZIONE (indicare il fondo e gli obbiettivi): |

| ***svolgete o avete intenzione di svolgere attività in accordo con l'ente gestore dell'area protetta*** |
|---|
| CONVENZIONE ALLEGATA si ☐ no ☐<br>DESCRIZIONE DELLE TIPOLOGIE DI ATTIVITÀ PROMOSSE DALL'ENTE GESTORE: |

| **Occupazione in ETP (dipendenti subordinati e soci lavoratori di cooperative presenti al momento della presentazione della domanda).** | |
|---|---|
| TIPOLOGIA DI CONTRATTO (TEMPO PIENO / PART-TIME (%) ) | |
| IDENTIFICAZIONE DEL PERSONALE | |
| DOCUMENTI ALLEGATI:<br>☐……<br>☐……<br>☐……<br>☐…… | |



0108068a

| **Tipologia degli investimenti** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Criterio | Investimento | Spesa | | Preventivi /voce computo | Breve descrizione/Allegati |
| Progetti di impresa per interventi all'interno di area Parco (L. R. 40/84 e legge 394/91) e/o aree Natura 2000 (DPR 357/97) | a) Opere strutturali murarie e di impiantistica per la fruizione purché complementari, connesse e funzionali alla realizzazione dell'attività imprenditoriale e progettuale presentata. | | | | |
| Acquisto di attrezzature/mezzi per la visitazione dei siti naturalistici | b) acquisto di attrezzature amovibili per la promozione di un Sito Specifico della Rete Ecologica Regionale identificato nella domanda di sostegno, | | | | |
| | c) acquisto di attrezzature amovibili per la fruizione di un'Area Naturalistica identificata nella domanda di sostegno gestita con contratto di possesso; | | | | |
| | d) allestimento di spazi espositivi e didattici all'interno di un area naturalistica gestita con contratto di possesso, le strutture devono essere identificate nella domanda di sostegno(totem didattici, giochi naturalistici); | | | | |
| | a) acquisto di strumenti specialistici destinati all'implementazione della fruizione sostenibile (binocoli, racchette da neve, canoe, slitte, bici, GPS, kayak, sci, capanni mobili, mute…) ; | | | | |



0108068a

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | b) acquisto di dispositivi informatici per la fruizione e la conoscenza delle aree naturalistiche; | | | | |
| | c) acquisto di piccoli mezzi motorizzati[1], con esclusione delle autovetture atti al trasporto dei visitatori per la fruizione anche didattica delle aree naturalistiche e per (pulmini verdi, minibus, mezzi per disabili) | | | | |
| | d) acquisto piccoli mezzi atti al trasporto delle attrezzature specialistiche per la fruizione, purché presenti in azienda. | | | | |
| Recupero di piccole imbarcazioni per la visitazione dei siti naturalistici | a) di piccole imbarcazioni da destinare al trasporto dei fruitori in aree lacuali e fluviali, purché di proprietà; | | | | |
| Attività di promozione delle attività e dei siti naturalistici | a) pubblicizzazione e di proposte di fruizione ambientale e di promozione dell'area da valorizzare (depliant, materiale illustrativo promozionale, cartellonistica, targhe, guide, prodotti multimediali, radiotelevisivi, acquisto di spazi pubblicitari…); | | | | |
| | b) creazione di siti internet che valorizzino e promuovano l'attività | | | | |

[1] Imbarcazioni, piccoli pulmini e minubus con al massimo trenta posti a sedere escluso il conducente.

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | naturalistica e il sito naturalistico stesso; | | | | |
| | c) software destinati alla fruizione dei siti naturalistici promossi; | | | | |
| | d) quota di iscrizione come espositore e allestimento dell'area espositiva in fiere specialistiche di settore. | | | | |
| | | | | | |

| | |
|---|---|
| Progetti che non prevedono ulteriore consumo di suolo | |
| DESCRIZIONE: | si ☐ no ☐ |
| Riutilizzo di strutture edilizie esistenti | |
| DESCRIZIONE: | si ☐ no ☐ |

| |
|---|
| Premialità ai progetti con capacità di minimizzazione dei costi ambientali |
| DESCRIZIONE (eventuale documentazione dimostrante la minimizzazione dei costi ambientali): |
| Minimizzazione dei costi ambientali indotti dalla possibile pressione turistica conseguente agli interventi di valorizzazione ambientale pertanto si promuovono attività imprenditoriali e di potenziamento dei servizi di fruizione per il turismo responsabile e sostenibile |
| DESCRIZIONE(Perché sia assegnabile il punteggio l'investimento deve ridurre direttamente gli impatti su un area circoscritta e gestita con un contratto di possesso, non deve essere un'azione indiretta): |
| Capacità di coniugare la conservazione degli spazi naturali e il ripristino degli habitat, nei casi in cui questi siano degradati |

*DESCRIZIONE DETTAGLIATADELLE SPESE E DEGLI INTERVENTI (dovranno essere descritti i singoli interventi e loro realizzazione indicando i preventivi allegati e la spesa per ogni singolo intervento)*

| Investimento | Limiti di spesa |
|---|---|
| **1) OPERE STRUTTURALI MURARIE E DI IMPIANTISTICA PER LA FRUIZIONE PURCHÉ COMPLEMENTARI, CONNESSE E FUNZIONALI ALLA REALIZZAZIONE DELL'ATTIVITÀ IMPRENDITORIALE E PROGETTUALE PRESENTATA.** | Massima spesa 100.000 |
| | |
| **2) ACQUISTI** | |
| a. ACQUISTO DI ATTREZZATURE AMOVIBILI PER LA PROMOZIONE DI UN SITO SPECIFICO DELLA RETE ECOLOGICA REGIONALE IDENTIFICATO NELLA DOMANDA DI SOSTEGNO,<br><br>b. ACQUISTO DI ATTREZZATURE AMOVIBILI PER LA PROMOZIONE DI UN SITO SPECIFICO DELLA RETE ECOLOGICA REGIONALE IDENTIFICATO NELLA DOMANDA DI DI SOSTEGNO,<br><br>c. ALLESTIMENTO DI SPAZI ESPOSITIVI E DIDATTICI ALL'INTERNO DI UN AREA NATURALISTICA GESTITA CON CONTRATTO DI POSSESSO, LE STRUTTURE DEVONO ESSERE IDENTIFICATE NELLA DOMANDA DI DI SOSTEGNO (TOTEM DIDATTICI, GIOCHI NATURALISTICI); | |
| d. ACQUISTO DI STRUMENTI SPECIALISTICI DESTINATI ALL'IMPLEMENTAZIONE DELLA FRUIZIONE SOSTENIBILE (BINOCOLI, RACCHETTE DA NEVE, CANOE, SLITTE, BICI, GPS, KAYAK, SCI, CAPANNI MOBILI, MUTE…);<br><br>e. ACQUISTO DI DISPOSITIVI INFORMATICI PER LA FRUIZIONE E LA | Massima spesa 50.000 totali |

| | |
|---|---|
| CONOSCENZA DELLE AREE NATURALISTICHE;<br><br>f. ACQUISTO DI PICCOLI MEZZI MOTORIZZATI, CON ESCLUSIONE DELLE AUTOVETTURE ATTI AL TRASPORTO DEI VISITATORI PER LA FRUIZIONE ANCHE DIDATTICA DELLE AREE NATURALISTICHE E PER (PULMINI VERDI, MINIBUS, MEZZI PER DISABILI)<br><br>g. ACQUISTO PICCOLI MEZZI ATTI AL TRASPORTO DELLE ATTREZZATURE SPECIALISTICHE PER LA FRUIZIONE, PURCHÉ PRESENTI IN AZIENDA. | |
| **3) RIQUALIFICAZIONI** | |
| a. PICCOLE IMBARCAZIONI DA DESTINARE AL TRASPORTO DEI FRUITORI IN AREE LACUALI E FLUVIALI. | Massima spesa 20.000 ali |
| 4) **IMMATERIALI** | |
| b. QUOTA DI ISCRIZIONE COME ESPOSITORE E ALLESTIMENTO DELL'AREA ESPOSITIVA IN FIERE SPECIALISTICHE DI SETTORE. | Massima spesa 5.000 |
| **5) PROMOZIONALI IMMATERIALI** | |
| c. PUBBLICIZZAZIONE DI PROPOSTE DI FRUIZIONE AMBIENTALE E DI PROMOZIONE DELL'AREA DA VALORIZZARE (DEPLIANT, MATERIALE ILLUSTRATIVO PROMOZIONALE, CARTELLONISTICA, TARGHE, GUIDE, PRODOTTI MULTIMEDIALI, RADIOTELEVISIVI, ACQUISTO DI SPAZI PUBBLICITARI…);<br><br>d. CREAZIONE DI SITI INTERNET CHE VALORIZZINO E PROMUOVANO L'ATTIVITÀ NATURALISTICA E IL SITO NATURALISTICO STESSO;<br><br>e. SOFTWARE DESTINATI ALLA FRUIZIONE DEI SITI NATURALISTICI PROMOSSI. | Massima spesa 20.000<br><br>minima 10% (1-2-3-4) |
| **2) ALTRE SPESE CONNESSE AL PROGETTO** | Max 10% (1-2-3- |

| | |
|---|---|
| a. SPESE DI PROGETTAZIONE E DIREZIONE LAVORI RELATIVE AL PUNTO 1A);<br><br>b. SPESE NOTARILI DI COSTITUZIONE DELLA SOCIETÀ O DELL'ASSOCIAZIONE DI PROFESSIONISTI;<br><br>c. BREV*ETTI, LICENZE D'USO* E SOFTWARE DI GESTIONE DELLE ATTREZZATURE ACQUISTATE. | 4) |
| **3) CONSULENZE** | |
| a. CONSULENZE PER LO SVILUPPO DEL PROGETTO DOVRANNO ESSERE NON A CARATTERE CONTINUATIVO E SVOLTE DA PERSONALE CON CERTIFICATE COMPETENTE IN **MATERIE ECONOMICO E/O NATURALISTICA**;<br><br>b. | Max 10%(1-2-3-4) |

**ALLEGATO B DGR nr. 1058 del 29 giugno 2016** 

*1) QUADRO COMPUTO METRICO ESTIMATIVO*

| *Categoria di investimento* | *Computo* | *Spesa senza iva* | *Id ordine* |
|---|---|---|---|
| | | | *1* |
| | | | *2* |
| | | | *3* |

*2) QUADRO AUTORIZZAZIONI*

| *Nome* | *Autorizzazione* | *Ente rilascio* | *Rilasciata/richiesta/Da richiedere* | *Id ordine* |
|---|---|---|---|---|
| | | | | *1* |
| | | | | *2* |
| | | | | *3* |

*3) ELENCO DEGLI ALLEGATI*

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | | *1* |
| | | | *2* |
| | | | *3* |
| | | | *4* |
| | | | *5* |
| | | | *6* |
| | | | *7* |



0108068a

## Sommario

ATTIVITÀ IMPRENDITORIALE ..... 2

SITO O AREA NATURALE DELLA RETE ECOLOGICA REGIONALE CHE SI INTENDE PROMUOVERE, VALORIZZARE E CONSERVARE: ..... 3

DESCRIZIONE DETTAGLIATADELLE SPESE E DEGLI INTERVENTI (dovranno essere descritti i singoli interventi e loro realizzazione indicando i preventivi allegati e la spesa per ogni singolo intervento) ..... 11

QUADRO COMPUTO METRICO ESTIMATIVO ..... 14

QUADRO AUTORIZZAZIONI ..... 14

ELENCO DEGLI ALLEGATI ..... 14

DATA /LUOGO

FIRMA

REGIONE DEL VENETO

**ALLEGATO C** **DGR nr. 1058 del 29 giugno 2016** 

## DICHIARAZIONE DI INTENTI PER I "PROMOTORI DI IMPRESA"

Il sottoscritto:

| Nome e cognome | | nata/o il | nel Comune di | | Prov |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | |
| Comune di residenza | CAP | Via | | n. | Prov |
| | | | | | |

in qualità di **promotore d'impresa,** di cui all'art. 4 comma 4.3 del bando "per l'erogazione di contributi alle nuove imprese" - Azione 3.5.1 - "Interventi di supporto alla nascita di nuove imprese sia attraverso incentivi diretti, sia attraverso l'offerta di servizi, sia attraverso interventi di micro finanza." Sub-Azione D "Imprese naturalistiche"

## DICHIARA

a) che intende costituire una nuova impresa nella forma di:

☐ Impresa individuale

☐ Società in nome collettivo

☐ Società in Accomandita Semplice

☐ Società a Responsabilità Limitata

☐ Società Cooperativa

☐ Altro (specificare): ……..

54ef5013

**ALLEGATO C DGR nr. 1058 del 29 giugno 2016** 

b) in caso di società, questa sarà costituita dai seguenti soci:

| Nome | Cognome | Data di nascita | Codice Fiscale | Quota di capitale sociale detenuta (%) |
|---|---|---|---|---|
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

c) che la nuova società sarà amministrata da:

| Nome | Cognome | Carica amministrativa |
|---|---|---|
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |

d) che la nuova impresa, così come sopra descritta ai punti a), b) e c), sarà costituita ed iscritta al Registro delle Imprese entro e non oltre il termine di **60 giorni** dalla data di comunicazione dell'eventuale ammissione ai benefici previsti dal bando, pena la decadenza dal contributo (art. 4 comma 4.3 del Bando).

*Località* e *data* ……

In fede

_____

(apporre la firma digitale)

REGIONE DEL VENETO

**ALLEGATO D** **DGR nr. 1058 del 29 giugno 2016** 

## *Dichiarazione sostitutiva circa gli aiuti «de minimis»*

*ai sensi dell'articolo 47 del DPR 28 dicembre 2000, n. 445*

Il **sottoscritto**:

| **SEZIONE 1 – Anagrafica soggetto** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Nome e cognome | | nata/o il | nel Comune di | | Prov |
| | | | | | |
| Comune di residenza | CAP | Via | | n. | Prov |
| | | | | | |

in qualità di **titolare/legale rappresentante** dell'impresa o dell'associazione professionale:

| **Anagrafica impresa /associazione professionale** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Impresa o Associazione Professionale** | Denominazione/Ragione sociale | | | Forma giuridica | |
| | | | | | |
| **Sede legale** | Comune | CAP | Via | n. | prov |
| | | | | | |
| **Dati** | Codice fiscale | Partita IVA | | | |
| | | | | | |

**ovvero**, in qualità di **libero professionista**

| **Anagrafica libero professionista** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Sede legale** | Comune | CAP | Via | n. | prov |
| | | | | | |
| **Dati** | Codice fiscale | Partita IVA | | | |

nel rispetto di quanto previsto dal **Regolamento (UE) n. 1407/2013** per la concessione di aiuti «*de minimis*»

**PRESA VISIONE** delle **istruzioni per la predisposizione della presente dichiarazione (Allegato D1)**;

**CONSAPEVOLE delle responsabilità anche penali assunte** in caso di rilascio di dichiarazioni mendaci, formazione di atti falsi e loro uso, **e della conseguente decadenza dai benefici concessi** sulla base di una dichiarazione non veritiera, ai sensi degli articoli 75 e 76 del decreto del Presidente della Repubblica 28 dicembre 2000, n. 445 (*Testo unico delle disposizioni legislative e regolamentari in materia di documentazione amministrativa*),

## DICHIARA

**Sezione A – Natura dell'impresa**

☐ che **l'impresa non è controllata né controlla**, direttamente o indirettamente[1], altre imprese.

☐ che **l'impresa controlla**, anche indirettamente, le imprese seguenti aventi sede legale in Italia, per ciascuna delle quali presenta la dichiarazione di cui all'**allegato D2**:

(*Ragione sociale e dati anagrafici*) (*ripetere tabella se necessario*)

| **Anagrafica impresa controllata** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Impresa** | Denominazione/Ragione sociale dell'impresa | | Forma giuridica | | |
| | | | | | |
| **Sede legale** | Comune | CAP | Via | n. | prov |
| | | | | | |
| **Dati impresa** | Codice fiscale | Partita IVA | | | |
| | | | | | |

☐ che **l'impresa è controllata**, anche indirettamente, dalle imprese seguenti aventi sede legale o unità operativa in Italia, per ciascuna delle quali presenta la dichiarazione di cui all'**allegato D2:**

(*Ragione sociale e dati anagrafici*) (*ripetere tabella se necessario*)

| **Anagrafica dell'impresa che esercita il controllo sulla richiedente** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Impresa** | Denominazione/Ragione sociale dell'impresa | | Forma giuridica | | |
| | | | | | |
| **Sede legale** | Comune | CAP | Via | n. | prov |
| | | | | | |
| **Dati impresa** | Codice fiscale | Partita IVA | | | |
| | | | | | |

1 Per il concetto di controllo, ai fini della presente dichiarazione, si vedano le Istruzioni per la compilazione (allegato D1, Sez. A)

**Sezione B** - Rispetto del massimale

**1)** che l'esercizio finanziario (anno fiscale) dell'impresa rappresentata inizia il _____ e termina il _____;

**2)**

☐ **2.1** - che all'impresa rappresentata **NON E' STATO CONCESSO** nell'esercizio finanziario corrente e nei due esercizi finanziari precedenti alcun aiuto «*de minimis*», tenuto conto anche delle disposizioni relative a fusioni/acquisizioni o scissioni[2];

☐ **2.2** - che all'impresa rappresentata **SONO STATI CONCESSI** nell'esercizio finanziario corrente e nei due esercizi finanziari precedenti i seguenti aiuti «*de minimis*», tenuto conto anche delle disposizioni relative a fusioni/acquisizioni o scissioni[3]:

*(Aggiungere righe se necessario)*

| | Ente concedente | Riferimento normativo/ amministrativo che prevede l'agevolazione | Provvedimento di concessione e data | Importo dell'aiuto *de minimis* | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Concesso | Effettivo[4] |
| 1 | | | | | |
| 2 | | | | | |
| 3 | | | | | |
| | | | TOTALE | | |

**AUTORIZZA**

l'Amministrazione concedente al trattamento e all'elaborazione dei dati forniti con la presente dichiarazione, per finalità gestionali e statistiche, anche mediante l'ausilio di mezzi elettronici o automatizzati, nel rispetto della sicurezza e della riservatezza e ai sensi dell'articolo 38 del citato DPR n. 445/2000.

*Località* e *data* ……

In fede

(Il titolare/legale rappresentante/professionista)

_____

(apporre la firma digitale)

[2] In proposito si vedano le Istruzioni per la compilazione (Allegato D1, Sez. B)

[3] In caso di acquisizioni di aziende o di rami di aziende o fusioni, in tabella va inserito anche il de minimis usufruito dall'impresa o ramo d'azienda oggetto di acquisizione o fusione. In caso di scissioni, indicare solo l'ammontare attribuito o assegnato all'impresa richiedente. In proposito si vedano le Istruzioni per la compilazione (Allegato D1Sez. B)

[4] Indicare l'importo effettivamente liquidato a saldo, se inferiore a quello concesso, e/o l'importo attribuito o assegnato all'impresa richiedente in caso di scissione e/o l'importo attribuito o assegnato al ramo d'azienda ceduto. Si vedano anche le Istruzioni per la compilazione (allegato D*1*, Sez.B).

REGIONE DEL VENETO

**ALLEGATO D1 DGR nr. 1058 del 29 giugno 2016** 

**ISTRUZIONI PER LA COMPILAZIONE DEI MODULI**

**Il legale rappresentante di ogni impresa candidata** a ricevere un aiuto in regime *«de minimis»* **è tenuto a sottoscrivere una dichiarazione** – rilasciata ai sensi dell'art. 47 del DPR 445/2000 – che attesti l'ammontare degli aiuti *«de minimis»* ottenuti nell'esercizio finanziario in corso e nei due precedenti.

**Il nuovo aiuto potrà essere concesso** solo **se**, sommato a quelli già ottenuti nei tre esercizi finanziari suddetti, **non superi i massimali stabiliti** da ogni Regolamento di riferimento.

Poiché il momento rilevante per la verifica dell'ammissibilità è quello in cui avviene la concessione (il momento in cui sorge il diritto all'agevolazione), **la dichiarazione dovrà essere confermata – o aggiornata – con riferimento al momento della concessione.**

Si ricorda che **se con la concessione Y fosse superato il massimale** previsto, **l'impresa perderebbe il diritto** non all'importo in eccedenza, ma **all'intero importo dell'aiuto oggetto della concessione Y** in conseguenza del quale tale massimale è stato superato.

***Sezione A: Come individuare il beneficiario – Il concetto di "controllo" e l'impresa unica.***

Le regole europee stabiliscono che, ai fini della verifica del rispetto dei massimali, "*le entità controllate (di diritto o di fatto) dalla stessa entità debbano essere considerate come un'unica impresa beneficiaria*". Ne consegue che nel rilasciare la dichiarazione *«de minimis»* si dovrà tener conto **degli aiuti ottenuti** nel triennio di riferimento **non solo dall'impresa richiedente**, ma **anche da tutte le imprese**, a monte o a valle, **legate ad essa** da un rapporto di collegamento (controllo), nell'ambito dello stesso Stato membro. Fanno eccezione le imprese tra le quali il collegamento si realizza attraverso un Ente pubblico, che sono prese in considerazione singolarmente. Fanno eccezione anche le imprese tra quali il collegamento si realizza attraverso persone fisiche, che non dà luogo all'"impresa unica".

Il rapporto di collegamento (controllo) può essere anche **indiretto**, cioè può sussistere anche per il tramite di un'impresa terza.

**Art. 2, par. 2 Regolamento n. 1407/2013/UE**

*Ai fini del presente regolamento, s'intende per «impresa unica» l'insieme delle imprese fra le quali esiste almeno una delle relazioni seguenti:*

*a) un'impresa detiene la maggioranza dei diritti di voto degli azionisti o soci di un'altra impresa;*

*b) un'impresa ha il diritto di nominare o revocare la maggioranza dei membri del consiglio di amministrazione, direzione o sorveglianza di un'altra impresa;*

*c) un'impresa ha il diritto di esercitare un'influenza dominante su un'altra impresa in virtù di un contratto concluso con quest'ultima oppure in virtù di una clausola dello statuto di quest'ultima;*

*d) un'impresa azionista o socia di un'altra impresa controlla da sola, in virtù di un accordo stipulato con altri azionisti o soci dell'altra impresa, la maggioranza dei diritti di voto degli azionisti o soci di quest'ultima.*

*Le imprese fra le quali intercorre una delle relazioni di cui al primo comma, lettere da a) a d), per il tramite di una o più altre imprese sono anch'esse considerate un'impresa unica.*

**Pertanto, qualora l'impresa richiedente faccia parte di «un'impresa unica» così definita, ciascuna impresa ad essa collegata (controllata o controllante) dovrà fornire le informazioni relative al rispetto del massimale, facendo sottoscrivere al proprio legale rappresentante una dichiarazione sostitutiva di atto di notorietà (Allegato D2). Tali dichiarazioni dovranno essere allegate alla domanda da parte dell'impresa richiedente.**

***Sezione B: Rispetto del massimale.***

*Quali agevolazioni indicare?*






Devono essere riportate tutte le agevolazioni ottenute in *«de minimis»* ai sensi di qualsiasi regolamento europeo relativo a tale tipologia di aiuti, specificando, per ogni aiuto, a quale regolamento faccia riferimento (agricoltura, pesca, SIEG o "generale").

Nel caso di **aiuti concessi in forma diversa dalla sovvenzione** (ad esempio, come prestito agevolato o come garanzia), dovrà essere indicato **l'importo dell'equivalente sovvenzione**, come risulta dall'atto di concessione di ciascun aiuto.

In relazione a ciascun aiuto deve essere rispettato il massimale triennale stabilito dal regolamento di riferimento e nell'avviso.

Un'impresa può essere beneficiaria di aiuti ai sensi di più regolamenti *«de minimis»*; a ciascuno di tali aiuti si applicherà il massimale pertinente, con l'avvertenza che l'importo totale degli aiuti *«de minimis»* ottenuti in ciascun triennio di riferimento non potrà comunque superare il tetto massimo più elevato tra quelli cui si fa riferimento.

Inoltre, qualora l'importo concesso sia stato nel frattempo anche **liquidato a saldo**, l'impresa potrà dichiarare anche questo importo effettivamente ricevuto se di valore diverso (inferiore) da quello concesso. **Fino al momento in cui non sia intervenuta l'erogazione a saldo, dovrà essere indicato solo l'importo concesso.**

*Periodo di riferimento:*
Il massimale ammissibile stabilito nell'avviso si riferisce all'**esercizio finanziario in corso e ai due esercizi precedenti**. Per "esercizio finanziario" si intende **l'anno fiscale** dell'impresa. Qualora le imprese facenti parte dell'"impresa unica" abbiano esercizi fiscali non coincidenti, l'esercizio fiscale di riferimento ai fini del calcolo del cumulo è quello dell'impresa richiedente per tutte le imprese facenti parte dell'impresa unica.

*Il caso specifico delle fusioni, acquisizioni e trasferimenti di rami d'azienda:*
Nel caso specifico in cui l'impresa richiedente sia incorsa in vicende di **fusioni o acquisizioni** (art.3(8) del Reg 1407/2013/UE) tutti gli aiuti *«de minimis»* accordati alle imprese oggetto dell'operazione devono essere sommati.

In questo caso la tabella andrà compilata inserendo anche il *de minimis* ottenuto dall'impresa/dalle imprese oggetto acquisizione o fusione.

| |
|---|
| Ad esempio: |
| All'impresa A sono stati concessi 80.000€ in de minimis nell'anno 2010 |
| All'impresa B sono stati concessi 20.000€ in de minimis nell'anno 2010 |
| Nell'anno 2011 l'impresa A si fonde con l'impresa B e diventa un nuovo soggetto (A+B) |
| Nell'anno 2011 il soggetto (A+B) vuole fare domanda per un nuovo de minimis di 70.000€. L'impresa (A+B) dovrà dichiarare gli aiuti ricevuti anche dalle imprese A e B, che ammonteranno ad un totale di 100.000€ |
| Qualora l'impresa (A+B) voglia ottenere un nuovo de minimis nel 2012, dovrà dichiarare che gli sono stati concessi nell'anno in corso e nei due precedenti aiuti de minimis pari a 170.000€ |

Nel caso specifico in cui l'impresa richiedente origini da operazioni di **scissione** (art.3(9) del Reg 1407/2013/UE) di un'impresa in due o più imprese distinte, si segnala che l'importo degli aiuti *«de minimis»* ottenuti dall'impresa originaria deve essere **attribuito** all'impresa che acquisirà le attività che hanno beneficiato degli aiuti o, se ciò non è possibile, deve essere suddiviso proporzionalmente al valore delle nuove imprese in termini di capitale investito.

Valutazioni caso per caso dovranno essere effettuate per la fattispecie di un trasferimento di un ramo d'azienda che, configurato come operazione di acquisizione, determina il trasferimento del de minimis in capo all'impresa che ha effettuato l'acquisizione, se l'aiuto de minimis era imputato al ramo d'azienda trasferito. Viceversa, nel caso in cui un trasferimento di ramo d'azienda si configuri come una operazione di cessione, l'impresa che ha ceduto il ramo può dedurre dall'importo dichiarato l'aiuto de minimis imputato al ramo ceduto.

REGIONE DEL VENETO

**ALLEGATO D2 DGR nr. 1058 del 29 giugno 2016** 

## *Dichiarazione sostitutiva circa gli aiuti «de minimis»*

*ai sensi dell'articolo 47 del DPR 28 dicembre 2000, n. 445*

*(Modello da compilarsi da parte dell'impresa controllante o controllata)*

Il **sottoscritto**:

| **SEZIONE 1 – Anagrafica soggetto** | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Nome e cognome | | nata/o il | nel Comune di | Prov |
| | | | | |
| Comune di residenza | CAP | Via | n. | Prov |
| | | | | |

in qualità di **titolare/legale rappresentante** dell'impresa:

| **Anagrafica impresa /associazione professionale** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Impresa** | Denominazione/Ragione sociale | | | Forma giuridica | |
| | | | | | |
| **Sede legale** | Comune | CAP | Via | n. | prov |
| | | | | | |
| **Dati** | Codice fiscale | Partita IVA | | | |
| | | | | | |

**CONTROLLATA o CONTROLLANTE** dell'impresa richiedente …… (*denominazione/ragione sociale, forma giuridica*)

nel rispetto di quanto previsto dal **Regolamento (UE) n. 1407/2013** per la concessione di aiuti «*de minimis*» Regolamenti della Commissione:

**PRESA VISIONE** delle **istruzioni per la predisposizione della presente dichiarazione (Allegato D1)**;

**CONSAPEVOLE delle responsabilità anche penali assunte** in caso di rilascio di dichiarazioni mendaci, formazione di atti falsi e loro uso, **e della conseguente decadenza dai benefici concessi** sulla base di una dichiarazione non veritiera, ai sensi degli articoli 75 e 76 del decreto del Presidente della Repubblica 28 dicembre 2000, n. 445 (*Testo unico delle disposizioni legislative e regolamentari in materia di documentazione amministrativa*),

| **ALLEGATO D2 Dgr n.** | **del** | pag. 2/2 | |
|---|---|---|---|

**DICHIARA**[1]

☐ **1.1** - che all'impresa rappresentata **NON E' STATO CONCESSO** nell'esercizio finanziario corrente e nei due esercizi finanziari precedenti alcun aiuto «*de minimis*».

☐ **1.2** - che all'impresa rappresentata **SONO STATI CONCESSI** nell'esercizio finanziario corrente e nei due esercizi finanziari precedenti i seguenti aiuti «de minimis»:

*(Aggiungere righe se necessario)*

| | Ente concedente | Riferimento normativo/amministrativo che prevede l'agevolazione | Provvedimento di concessione e data | Reg. UE *de minimis*[2] | Importo dell'aiuto *de minimis* | | Di cui imputabile all'attività di trasporto merci su strada per conto terzi |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Concesso | Effettivo[3] | |
| 1 | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | |
| | | | | **TOTALE** | | | |

**Il sottoscritto**, infine, tenuto conto di quanto dichiarato, ai sensi dell'art. 13 del decreto legislativo 30 giugno 2003, n. 196 (*Codice in materia di protezione di dati personali*) e successive modifiche ed integrazioni:

**AUTORIZZA**

l'Amministrazione concedente al trattamento e all'elaborazione dei dati forniti con la presente dichiarazione, per finalità gestionali e statistiche, anche mediante l'ausilio di mezzi elettronici o automatizzati, nel rispetto della sicurezza e della riservatezza e ai sensi dell'articolo 38 del citato DPR n. 445/2000 allegando alla presente dichiarazione, copia fotostatica di un documento di identità.

*Località* e *data* ……

In fede

(Il titolare/legale rappresentante dell'impresa)

_____

(apporre la firma digitale)

[1] Il triennio fiscale di riferimento da applicare è quello dell'impresa richiedente l'agevolazione.

[2] Indicare il regolamento in base al quale è stato concesso l'aiuto "de minimis": Reg. n. 1998/2006 (generale per il periodo 2007-2013); Reg. n. 1407/2013 (generale per il periodo 2014-2020); Reg. n: 1535/2007 (agricoltura 2007-2013); Reg. n: 1408/2013 (settore agricolo 2014-2020), Reg. n. 875/2007 (pesca 2007-2013); Reg. n. 717/2014 (pesca 2014-2020); Reg. n. 360/2012 (SIEG)

[3] Indicare l'importo effettivamente liquidato a saldo, se inferiore a quello concesso, e/o l'importo attribuito o assegnato all'impresa richiedente in caso di scissione. Si vedano anche le Istruzioni per la compilazione (allegato D1, Sez.B).

REGIONE DEL VENETO

**ALLEGATO E DGR nr. 1058 del 29 giugno 2016** 

**ASSEGNAZIONE DEL CRITERIO DI VALUTAZIONE 2D DEL BANDO**
351 **"Interventi di supporto alla nascita di nuove imprese sia attraverso incentivi diretti, sia attraverso l'offerta di servizi, sia attraverso interventi di micro finanza. (sub-azione imprese naturalistiche)**"

**CONVENZIONE TRA L'IMPRESA NATURALISTICA E L'ENTE GESTORE DELL'AREA PROTETTA**

Azienda _____ con sede in _____
via _____PIVA_____,
qui rappresentata dal Titolare/Rappresentante Legale_____
nato a _____ il_____

e

l'Ente Gestore dell'Area Protetta _____
con sede in_____ _____
via _____PIVA_____,
qui rappresentata dal Presidente pro-tempore _____
nato a _____ il_____ _____.

Si conviene quanto segue:

**art. 1 Oggetto della Convenzione**
l'Ente Gestore dell'Area Protetta si impegna a promuovere gratuitamente le seguenti attività naturalistiche promosse dalla ditta sopracitata:

**art. 2 Modalità di espletamento dell'oggetto della convenzione**

**art. 3 Durata della Convenzione** – La presente Convenzione è rinnovabile e avrà la durata minima pari a tre anni dalla liquidazione del saldo dell'eventuale beneficio previsto dal bando.

Letto, firmato e sottoscritto in data
(Luogo e data)
, _____

Ditta Richiedente il Beneficio L'Ente Gestore

_____ _____

f120f3e2

REGIONE DEL VENETO

**ALLEGATO F DGR nr. 1058 del 29 giugno 2016** 

**INCARICO PER LA SOTTOSCRIZIONE DIGITALE E PRESENTAZIONE TELEMATICA DI DOCUMENTI RELATIVI AL BANDO REGIONALE POR FESR 2014-2020. AZIONE 3.5.1 Sub. D "Imprese naturalistiche".**

**PROCURA SPECIALE**
**ai sensi dell'articolo 38 comma 3 bis D.P.R. 28 dicembre 2000, n. 445**

Il sottoscritto/a *(cognome e nome*) _____

nato a _____ il _____

a) in qualità di: ❑ titolare ❑ legale rappresentante dell'impresa/società _____

_____

b) ovvero in qualità di: ❑ libero professionista ❑ associazione professionale

con sede in _____

via _____

codice fiscale _____ partita iva_____

c) ovvero in qualità di: ❑ promotore d'impresa

**DICHIARA DI CONFERIRE**

Al/Alla Sig./Sig.ra (*cognome e nome dell'intermediario*) _____

codice fiscale _____

Tel. _____ fax_____ cell. _____

Posta elettronica certificata – PEC (obbligatoria) _____

**PROCURA SPECIALE**

per la sottoscrizione digitale e presentazione telematica della pratica riferita al "Bando per l'erogazione di contributi alle nuove imprese". Azione 3.5.1 " Interventi di supporto alla nascita di nuove imprese sia attraverso incentivi diretti, sia attraverso l'offerta di servizi, sia attraverso interventi di micro finanza." Sub-Azione D "Imprese naturalistiche".

Il/I sottoscritto/i dichiara/no ai sensi dell'art. 47 DPR 445/2000, consapevole/i delle responsabilità penali di cui all'art.76 del DPR 445/2000 per le ipotesi di falsità in atti e dichiarazioni mendaci:

- che le dichiarazioni contenute nella pratica in oggetto sono così rese al procuratore speciale;
- di aver preso visione dei documenti informatici allegati alla pratica e che gli stessi sono conformi agli originali cartacei, muniti di propria firma autografa, previamente consegnati al procuratore speciale sopra identificato;
- di aver provveduto a sottoscrivere con propria firma autografa copia cartacea delle domande (di partecipazione e/o di erogazione) di cui ha ricevuto copia;

- di eleggere quale domicilio speciale per l'invio di tutti gli atti e le comunicazioni inerenti il procedimento amministrativo in oggetto il seguente indirizzo PEC:

_____

Al procuratore speciale viene conferita la facoltà di eseguire eventuali rettifiche di errori formali inerenti la modulistica elettronica.

| Nome e cognome* | Codice fiscale* | Firma autografa* |
|---|---|---|
| | | |
| | | |
| | | |

*del/i soggetto/i delegante/i

La presente procura speciale va sottoscritta digitalmente dal procuratore ed allegata alla pratica unitamente a copia informatica di un documento d'identità valido di ognuno dei sottoscrittori con firma autografa.

**Dichiarazione sostitutiva dell'atto di notorietà resa dal procuratore ai sensi art. 47 DPR 445/2000**

Il sottoscritto procuratore firmatario digitale del presente documento, consapevole delle responsabilità penali di cui all'art.76 del DPR 445/2000 per le ipotesi di falsità in atti e dichiarazioni mendaci, **dichiara**:

1. ai sensi dell'art. 46 lett. U), e art. 47 c. 3, DPR 445/2000 di agire in qualità di procuratore speciale in rappresentanza dei soggetti che hanno apposto la propria firma autografa;
2. che tutte le dichiarazioni contenute nella pratica in oggetto sono così ricevute dai dichiaranti e che i documenti informatici allegati alla pratica sono conformi agli originali cartacei consegnatigli dal/i delegante/i, muniti di firma autografa dello/gli stesso/i, che verranno custoditi in originale presso il proprio studio/ufficio nei termini previsti dalle norme vigenti, anche in caso di successiva revoca della procura, unitamente a copia cartacea delle domande (di partecipazione e/o di erogazione) munite di firma autografa del/i soggetto/i delegante/i;
3. che tutti i documenti di cui al precedente punto 2), ivi incluse le domande (di partecipazione e/o di erogazione) munite di firma autografa del/i soggetto/i delegante/i, sono stati consegnati in copia conforme all'originale allo/agli stesso/i soggetto/i delegante/i ai fini della loro conservazione.

Data: firma digitale del procuratore

REGIONE DEL VENETO

**ALLEGATO G DGR nr. 1058 del 29 giugno 2016** 

***Dichiarazione sostitutiva ai fini della verifica della regolarità contributiva***

*ai sensi dell'articolo 47 del DPR 28 dicembre 2000, n. 445*

Il sottoscritto:

| Nome e cognome | | nata/o il | nel Comune di | Prov |
|---|---|---|---|---|
| | | | | |
| Comune di residenza | CAP | Via | n. | Prov |
| | | | | |

in qualità di **titolare/legale rappresentante** dell'impresa o dell'associazione professionale[1]:

| **Anagrafica impresa** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Impresa o Associazione Professionale** | Denominazione/Ragione sociale | | | Forma giuridica | |
| | | | | | |
| **Sede legale** | Comune | CAP | Via | n. | prov |
| | | | | | |
| **Dati impresa** | Codice fiscale | Partita IVA | | | |
| | | | | | |

**ovvero**, in qualità di **libero professionista**

| **Anagrafica libero professionista** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Sede legale** | Comune | CAP | Via | n. | prov |
| | | | | | |
| **Dati** | Codice fiscale | Partita IVA | | | |
| | | | | | |

**CONSAPEVOLE delle responsabilità anche penali assunte** in caso di rilascio di dichiarazioni mendaci, formazione di atti falsi e loro uso, e della **conseguente decadenza dai benefici** concessi sulla base di una dichiarazione non veritiera, ai sensi degli articoli 75 e 76 del decreto del Presidente della Repubblica 28 dicembre 2000, n. 445 (*Testo unico delle disposizioni legislative e regolamentari in materia di documentazione amministrativa*),

[1] In caso di associazione professionale compilare il seguente riquadro laddove sia disponibile una posizione previdenziale, assistenziale e assicurativa dell'associazione stessa, altrimenti procedere all'indicazione delle posizioni dei singoli professionisti compilando l'apposito campo. Si ricorda che in tal caso, è necessario fornire le informazioni relative a tutti i singoli professionisti.






## DICHIARA

**di essere iscritto, ai fini degli adempimenti previdenziali, assistenziali e assicurativi, presso il/i seguenti istituti:**

☐ INPS: matricola azienda _____

☐ INAIL: codice ditta/PAT _____

☐ Cassa Edile: Codice impresa _____

Sezione impresa_____

☐ Altra cassa previdenziale (da specificare): _____

Numero posizione: _____

**oppure:**

☐ **di non avere una posizione previdenziale o assicurativa aperta per le seguenti motivazioni:**

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

☐ **di essere un promotore di impresa, che si impegna quindi a dare comunicazione della propria posizione previdenziale, assistenziale e assicurativa non appena disponibile.**

## AUTORIZZA

l'Amministrazione concedente al trattamento e all'elaborazione dei dati forniti con la presente dichiarazione, per finalità gestionali e statistiche, anche mediante l'ausilio di mezzi elettronici o automatizzati, nel rispetto della sicurezza e della riservatezza e ai sensi dell'articolo 38 del citato DPR n. 445/2000.

Località e data ……

In fede

_____

(apporre la firma digitale)

315e51fa