



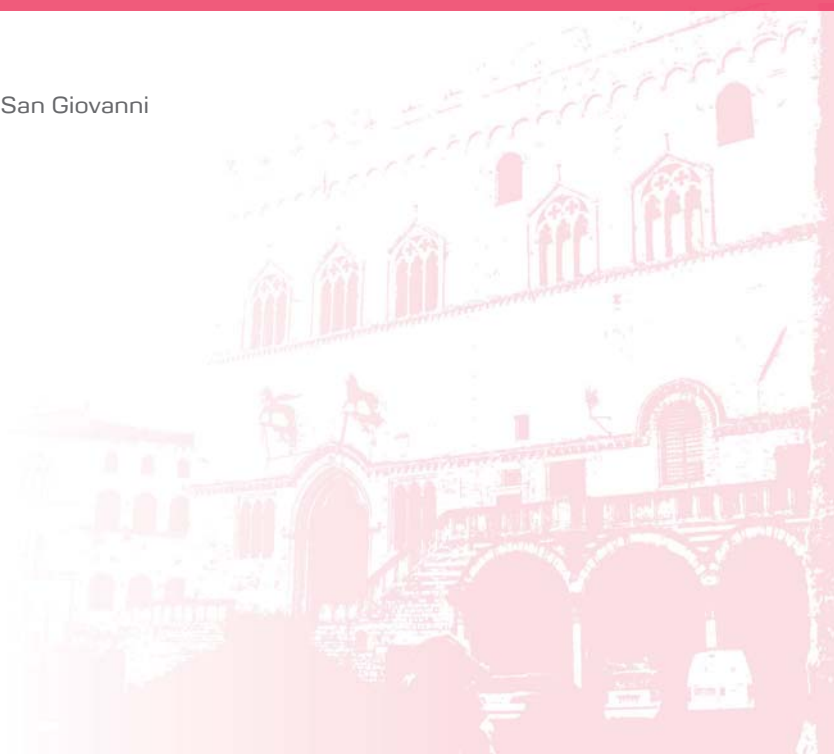
Responsabile Scientifico **Prof. Angelo Sidoni**

# **Consensus conference**

## **Ottimizzazione della conservazione dei tessuti neoplastici mammari da destinare a indagini biomolecolari**

**6 giugno 2008**

Park Hotel • Via Alessandro Volta, 1 - Perugia - Ponte San Giovanni



Questa pubblicazione è stata realizzata grazie ad un educational grant di **ROCHE**

*Editree*

Copyright © 2008 Editree S.r.l  
C.so Milano, 46 - 20052 Monza, Italia  
tel. 039.39.00.728 - fax 039.23.16.261  
[info@editree.it](mailto:info@editree.it)  
[www.editree.it](http://www.editree.it)

# Introduzione e obiettivi del Consensus

Angelo Sidoni

Anatomia Patologica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Perugia

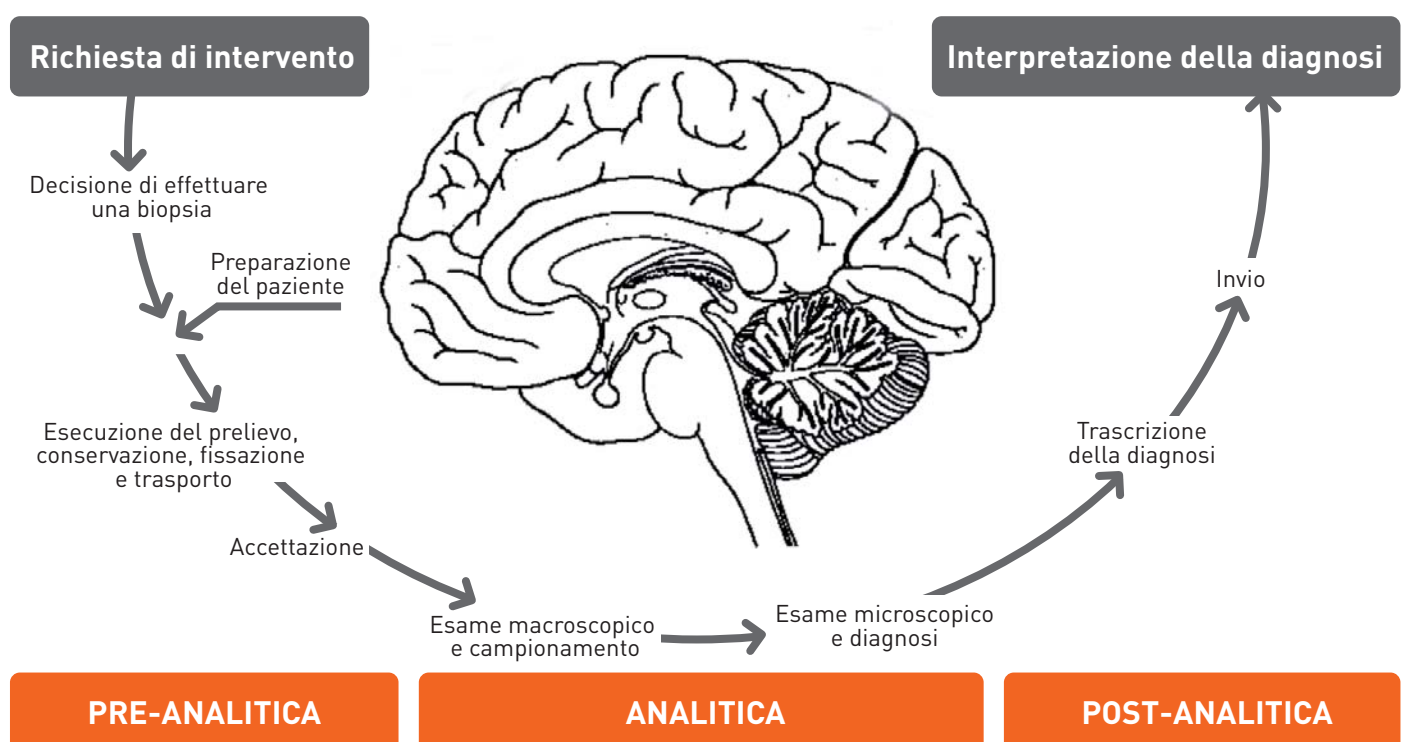
Attualmente il carcinoma della mammella ricomprende una vasta gamma di entità i cui aspetti clinici, morfologici, biologici, molecolari e prognostici sono estremamente eterogenei <sup>(1,2)</sup>. Il processo diagnostico-terapeutico di una neoplasia della mammella è divenuto, pertanto, molto articolato e prevede, necessariamente, l'analisi di una serie di fattori clinici, patologici e biomolecolari in grado di contribuire ad un'accurata valutazione del rischio di progressione della malattia e, contestualmente, all'individualizzazione, razionalizzazione ed appropriatezza delle scelte terapeutiche adiuvanti o neoadiuvanti.

L'avvento delle "target therapies" ha reso ancora più cogenti queste esigenze, imponendo nel contempo al laboratorio di Anatomia Patologica sia la necessità di adottare tecnologie innovative sia l'obbligo di determinare i parametri prognostici e predittivi sui tessuti neoplastici con la massima accuratezza possibile, viste le ricadute di ordine etico, deontologico e farmaco-economico.

Di fronte di questo scenario bisogna ammettere che siamo ben lontani dal raggiungimento di standard qualitativi accettabili. A testimonianza di questa affermazione basti ricordare i numerosi segnali di allarme relativi alla scarsa riproducibilità delle analisi dei recettori estrogenici (ER) e progestinici (PR) <sup>(3,4,5)</sup> e di HER2/*neu* <sup>(6,7,8)</sup>, che hanno condizionato l'elaborazione di varie raccomandazioni <sup>(9,10)</sup> e linee guida <sup>(11,12)</sup>, approdando anche nelle pagine di giornali non scientifici <sup>(13)</sup>.

Appare pertanto doveroso affrontare questo problema chiedendoci in che modo possiamo contribuire al miglioramento della situazione attuale. Un approccio razionale può essere quello di iniziare analizzando tutta la "filiera" percorsa da cellule e tessuti dal momento in cui vengono prelevati dal corpo della paziente al momento in cui inizia il loro processamento nel Laboratorio di Anatomia Patologica. L'esperienza quotidiana ci dimostra infatti che la cosiddetta fase pre-analitica (figura 1) viene troppo spesso trascurata <sup>(8)</sup>, facilitando così il verificarsi di danni irreversibili sia alla morfologia che alla struttura molecolare delle cellule.

Figura 1. Il ciclo diagnostico in istopatologia



Tra i fattori critici che possono condizionare eventi avversi in fase pre-analitica meritano particolare attenzione i tempi e le condizioni in cui vengono conservati i tessuti prima della fissazione, nonché le caratteristiche chimico-fisiche dei fissativi e la durata della fissazione<sup>(8)</sup>. Limitandoci ai soli esempi di ER, PR e HER2, paradigmatici in quanto irrinunciabili per qualsiasi impostazione terapeutica, la fissazione ottimale compare al primo posto tra le raccomandazioni per la corretta analisi di questi parametri<sup>(11,12,14)</sup>.

Sulla base di queste motivazioni, è sembrato opportuno realizzare un progetto editoriale-educazionale, rivolto ad Anatomopatologi, Chirurghi senologi e Radiologi interventisti, con gli intenti di analizzare le conoscenze sul tema, valutare il grado di sensibilizzazione verso il problema e rilevare le attuali modalità di gestione dei tessuti neoplastici mammari nelle strutture sanitarie della Regione Umbria, identificandone e correggendone le più comuni anomalie.

L'odierna *Consensus Regionale* si svolge in seduta plenaria e rappresenta la tappa finale di una serie di attività preparatorie svolte per via telematica e così articolate:

- 21 febbraio - sondaggio di fattibilità/condivisione
- 20 marzo - sondaggio sulla scelta della data della *Consensus*
- 26 marzo - scelta della data
- 23 aprile - illustrazione della metodologia di lavoro
- 9 maggio - spedizione del questionario "conoscitivo"
- 22 maggio - spedizione degli "*statements*".

Il progetto ha l'obiettivo finale di uniformare le procedure di conservazione e di fissazione dei tessuti nella nostra Regione attraverso l'elaborazione e la pubblicazione, nel prossimo autunno, di un protocollo operativo standardizzato approvato e condiviso dai rappresentanti delle diverse Specialità Medico-Chirurgiche interessate.

# Le caratterizzazioni biologiche ed il loro ruolo nel determinismo delle scelte terapeutiche. Il punto di vista dell'oncologo

Stefania Gori

Oncologia Medica, Azienda Ospedaliera di Perugia

Attualmente, nell'ambito del carcinoma mammario, possono essere identificati, in base alle caratteristiche biopatologiche, tre distinti sottogruppi fenotipici:

- Il sottogruppo di tumori ER+ (recettori estrogenici positivi), pari al 65-75% dei casi;
- Il sottogruppo di tumori HER2+ (15%-20%);
- Il sottogruppo di tumori "triple negative" (15%).

Questi tre fenotipi tumorali hanno rilevanza clinica ed importanti implicazioni terapeutiche: abbiamo infatti a nostra disposizione terapie mirate che determinano vantaggi significativi, anche in termini di sopravvivenza globale, per le pazienti con neoplasie ER+ e per le pazienti con neoplasie HER2+.

**È fondamentale quindi avere una corretta ed affidabile caratterizzazione biopatologica di ogni neoplasia mammaria per poter adeguatamente trattare ogni paziente.**

Nel setting metastatico, ove lo scopo della terapia è quello di aumentare la sopravvivenza globale e la qualità di vita, la pianificazione terapeutica viene fatta in base alle caratteristiche cliniche della malattia ed in base alla presenza o meno dei recettori ormonali e di HER2 <sup>(15)</sup> (tabella 1).

Tabella 1. Opzioni di terapia di prima linea per il carcinoma metastatico della mammella			
	Terapia endocrina	Chemioterapia	Chemioterapia + Trastuzumab
Stato recettoriale: ER, PgR HER2	ER e/o PgR positivi	ER e PgR negativi or hormone-refractory disease	HER2 positivi
Intervallo libero da malattia	Lungo	Breve	Breve
Malattia viscerale	No (o asintomatica)	Si	Si

*Mod. da Verma S et al <sup>(15)</sup>*

Le pazienti con recettori estrogenici positivi beneficiano infatti di un adeguato trattamento ormonale. In postmenopausa, ad esempio, oggi gli anti-aromatasi di terza generazione (anastrozolo, letrozolo, exemestane) determinano un vantaggio significativo rispetto al tamoxifene in termini di risposte obiettive, clinical benefit e tempo alla progressione <sup>(16-18)</sup>, un miglior profilo di tossicità ed un vantaggio anche in sopravvivenza globale, come evidenziato da una recente metanalisi <sup>(19)</sup>.

Le pazienti con tumori HER2-positivi possono essere trattate con farmaci anti-HER2 (trastuzumab, lapatinib, pertuzumab). In Italia è al momento disponibile solo il trastuzumab, un anticorpo anti-dominio extracellulare del recettore HER2, che blocca le vie del segnale di proliferazione e di sopravvivenza e quindi la crescita tumorale. Dagli studi clinici finora condotti e pubblicati, le pazienti candidate ad un trattamento con trastuzumab sono le pazienti HER2+, cioè con tumori 3+ all'immunoistochimica e/o FISH amplificati. Gli studi randomizzati di fase III <sup>(20)</sup> e di fase II <sup>(21)</sup> hanno evidenziato che l'aggiunta del trastuzumab alla chemioterapia determina, rispetto alla sola chemioterapia, un vantaggio significativo in termini di risposte obiettive, di tempo alla progressione e di sopravvivenza globale (Figure 2 e 3).

Figura 2. Trastuzumab + chemioterapia come terapia di prima linea nel carcinoma metastatico della mammella

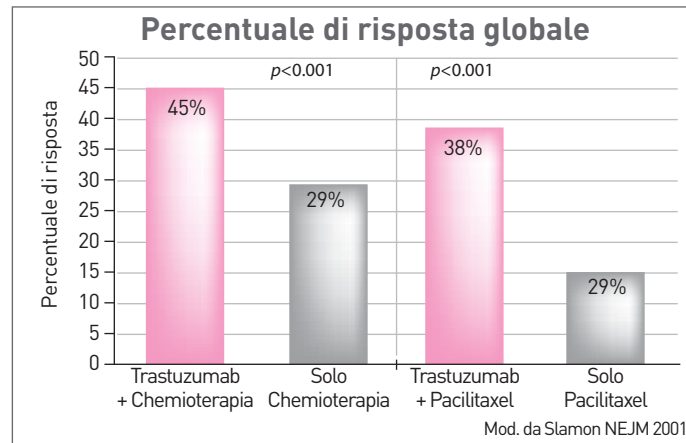
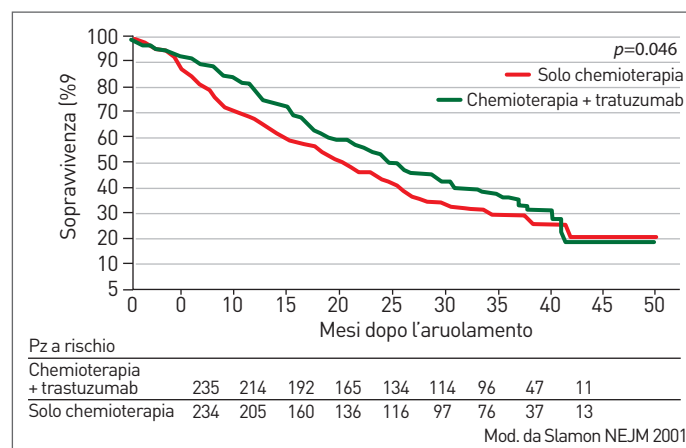


Figura 3. Stime di Kaplan-Meier sulla sopravvivenza globale nel carcinoma metastatico della mammella



Quindi una corretta determinazione dello stato dei recettori ormonali e di HER2 da parte del patologo è fondamentale per una corretta pianificazione terapeutica delle pazienti con carcinoma mammario metastatico. Ancora maggiore risulta essere l'importanza dell'anatomo-patologo per la pianificazione terapeutica in ambito adiuvante, importanza che è ulteriormente aumentata negli ultimi anni.

Oltre all'istologia, necessaria per pianificare il trattamento chirurgico, il patologo deve infatti fornire all'oncologo una serie di fattori prognostici e predittivi necessari per impostare il trattamento post-chirurgico.

Il patologo deve oggi indicare per ogni neoplasia mammaria i seguenti fattori prognostici: stato linfonodale ascellare, dimensioni del tumore, tipo istologico, età della paziente, stato recettoriale ormonale, grading, invasione vascolare, stato di HER2. In base a questi fattori prognostici, le pazienti con carcinoma mammario in fase iniziale vengono suddivise, secondo la Conference di St Gallen 2007, in tre distinte categorie di rischio di ripresa: basso rischio, rischio intermedio, alto rischio <sup>(22)</sup>.

- **Basso rischio:**

**Linfonodi negativi e presenza di tutte** le seguenti caratteristiche:

pT ≤ 2 cm, G1, estesa invasione vascolare peritumorale assente, ER e/o PgR espressi, HER2-negativo, età ≥ 35 anni.

- **Rischio intermedio:**

- **Linfonodi negativi e presenza di almeno una** delle seguenti caratteristiche:

pT > 2 cm, G 2-3, invasione vascolare peritumorale presente, ER e PgR assenti, HER2-positivo, età < 35 anni.

- **Linfonodi positivi (1-3 linfonodi coinvolti)** e ER e/o PgR espressi e HER2-negativo.

- **Alto rischio:**

- **Linfonodi positivi (1-3 linfonodi coinvolti)** e ER/PgR assenti oppure HER2-positivo.

- **Linfonodi positivi (≥ 4 coinvolti).**

Ma soprattutto, il patologo dà all'oncologo informazioni relative a due fattori predittivi che sono fondamentali per la scelta terapeutica: lo stato dei recettori ormonali e lo stato di HER2 (tabella 2).

<b>Tabella 2. Opzioni di trattamento adiuvante per il carcinoma metastatico della mammella</b>		
	<b>Recettori ormonali positivi</b>	<b>Recettori ormonali negativi</b>
HER2-negativo	Ormonoterapia ± Chemioterapia (in rapporto alla categoria di rischio)	Chemioterapia
HER2-positivo	Chemioterapia + Ormonoterapia + Trastuzumab	Chemioterapia + Trastuzumab
<i>Mod. da St Gallen Consensus Conference 2007 <sup>[22]</sup></i>		

Ad esempio, sapere che un tumore è sicuramente estrogeno-positivo permette di decidere di somministrare ormonoterapia adiuvante. Dalla metanalisi di Oxford 2000 <sup>[23]</sup>, è stato evidenziato come una ormonoterapia adiuvante con 5 anni di tamoxifene in pazienti in pre- o post-menopausa con tumori estrogeno-positivi determini una riduzione significativa (che si mantiene a 15 anni di follow-up) in termini di recidive e di mortalità per carcinoma mammario. Ulteriori vantaggi rispetto al tamoxifene possono oggi essere ottenuti in termini di sopravvivenza libera da malattia nelle donne in post-menopausa con l'utilizzo di farmaci anti-aromatasi di terza generazione <sup>[24-26]</sup>.

D'altra parte, sapere che un tumore è sicuramente HER2-positivo permette di iniziare un trattamento adiuvante con trastuzumab con un vantaggio significativo in termini di riduzione di mortalità e di recidive, confermato anche da una recente metanalisi <sup>[27]</sup>.

Inoltre, una corretta determinazione dello stato di HER2 permette di evitare a pazienti con tumori HER2-negativi un trattamento potenzialmente cardiotossico: l'incidenza di cardiotossicità è infatti pari al 4% negli studi nord-americani che hanno utilizzato trastuzumab in associazione con chemioterapia e dello 0,4% nello studio europeo HERA, che prevedeva l'utilizzo di trastuzumab dopo il trattamento chemioterapico adiuvante.

**Da tutto ciò emerge quanto sia importante per l'oncologo medico avere a disposizione dati relativi alla caratterizzazione biopatologica di ogni neoplasia mammaria estremamente attendibili. Negli anni è infatti emerso come esista una discordanza tra la determinazione dei recettori eseguita in laboratori periferici e quella effettuata in laboratori centralizzati.**

Una revisione dello stato dei recettori ormonali eseguita nello studio adiuvante BIG 1-98 (che ha confrontato letrozolo rispetto a tamoxifene nelle donne in postmenopausa con tumori mammari con recettori ormonali positivi) <sup>[26]</sup>, ha evidenziato come dei 105 tumori risultati estrogeno-negativi alla determinazione eseguita in laboratori periferici, il 69% siano risultati positivi (cut off di positività ≥ 10%) alla revisione centralizzata, mentre dei 1.223 tumori risultati progestinici-negativi alla determinazione eseguita in laboratori periferici, il 44% siano risultati positivi (cut off di positività ≥ 10%) alla revisione centralizzata <sup>[5]</sup>.

Nel 2002 è inoltre emersa, alla revisione dei primi casi inseriti in due protocolli nordamericani (NSABP B-31 e N9831) che valutavano il trastuzumab in terapia adiuvante, una discordanza elevata tra le determinazioni dello stato di HER2 effettuate in laboratori periferici e quelle condotte in laboratori centralizzati. Nello studio NSABP B-31, tra i primi 104 casi randomizzati risultati HER2-positivi in laboratori periferici, il 21% sono risultati HER2-negativi alla revisione effettuata in laboratori centralizzati <sup>[28]</sup> e nello studio N9831 la discordanza era pari al 25% per l'immunoistochimica e al 33% per la FISH <sup>[29]</sup> (tabella 3).

I motivi di bassa concordanza tra laboratori periferici e centralizzati nella determinazione dello stato di HER2 ipotizzati sono stati: il tempo di fissazione, la durata della fissazione, la processazione del preparato, le procedure di colorazione, l'interpretazione del preparato ed il modesto volume di attività e quindi di esperienza dei laboratori periferici.

<b>Tabella 3. Concordanza tra analisi locale e centralizzata di HER2 negli studi su trastuzumab in terapia adiuvante</b>		
	<b>Tumori analizzati</b>	<b>Revisione centrale</b>
NSABP B-31 <sup>a</sup>	<b>104</b> IHC 3+ nel laboratorio periferico	IHC 3+: 82/104 (79%) FISH +: 82/104 (79%)
N9831 <sup>b</sup>	<b>119</b> IHC 3+ e/o FISH+ nel laboratorio periferico	IHC 3+: 44/59 (75%) FISH +: 6/9 (67%)
<sup>a</sup> Paik S et al <sup>(28)</sup> <sup>b</sup> Roche PC et al <sup>(29)</sup>		

Queste evidenze hanno portato ad una modifica del protocollo N9831, che ha reso obbligatorio la ri-valutazione dello stato di HER2 in un laboratorio centralizzato prima dell'arruolamento di ogni paziente nel protocollo ed un test addizionale in un laboratorio di riferimento nei casi risultati discordanti. Questa procedura ha ridotto il grado di discordanza <sup>(7)</sup>, ma ha anche **evidenziato la necessità che siano laboratori con esperienza ed elevato volume di attività ad essere preposti alla valutazione dello stato di HER2, al fine di selezionare nella maniera più accurata possibile le pazienti che possono beneficiare del trattamento con trastuzumab** ed, in futuro, con altri farmaci anti-HER2.



# Metodologia e articolazioni del Consensus

Piero Zucchi

Responsabile Scientifico – Editree, Monza

Gli obiettivi della *Consensus* regionale sulla ottimizzazione delle metodiche di conservazione dei tessuti neoplastici da destinare a indagini biomolecolari erano i seguenti:

- a) analizzare le attuali modalità di gestione dei tessuti
- b) identificare e correggere eventuali anomalie
- c) uniformare le procedure di conservazione e di fissazione attraverso l'elaborazione di un protocollo operativo.

La metodologia scelta per la *Consensus* è simile a quella del *Dephi process*, metodo sviluppato per poter raggiungere un accordo su problemi complessi in ambito medico ed industriale. Un elemento fondamentale di questo metodo è l'uso di questionari anonimi, che permette di esprimere il proprio parere su ogni punto di discussione evitando imbarazzi o critiche per ogni cambiamento di opinione; questo processo è controllato da un *chairman* non votante.

Le principali fasi del processo sono state le seguenti:

- **Identificazione di un *Consensus Group*.** I membri sono stati selezionati dal Responsabile Scientifico sulla base della rilevanza del loro impegno professionale in campo senologico. Sono stati pertanto coinvolti Anatomici, Chirurghi senologi e Radiologi senologi interventisti. La scelta si è basata altresì su criteri geografici, in modo da assicurare la rappresentanza di tutti i Presidi Sanitari ed i Centri Ospedalieri ed Universitari che, nella Regione Umbria, svolgono attività diagnostico-terapeutiche in patologia mammaria, ivi compresa l'attività di prelievo e conservazione dei campioni tissutali. Sulla base di tali considerazioni sono stati coinvolti in totale 29 centri così suddivisi: 7 Laboratori di Anatomia Patologica, 12 reparti di Chirurgia Generale e 10 Reparti di Radiologia/Senologia. Gli Enti di appartenenza dei singoli centri erano i seguenti: Policlinico Monteluca, Perugia; Ospedale S. Maria della Misericordia, Perugia; Presidio Ospedaliero di Città di Castello (PG); Ospedale Generale di zona, Marsciano (PG); Ospedale S. Maria della Stella, Orvieto (TR); Azienda Ospedaliera S. Maria, Terni; Ospedale di Assisi (PG); Ospedale S. Matteo degli Infermi, Spoleto (PG); Ospedale di Narni (TR); Ospedale S. Giovanni Battista, Foligno (PG); Centro di Senologia, ASL, Perugia. In tabella 4 sono elencati i Membri che hanno partecipato alla *Consensus* Regionale.

Amoroso Maurizio	Chirurgia Generale	Narni (TR)
Antoniella Amedeo	Radiologia/Senologia	Assisi (PG)
Ascani Stefano	Anatomia Patologica	Terni
Baffa Nicodemo	Radiologia/Senologia	Perugia
Brecolotto Fausto	Chirurgia Generale	Assisi (PG)
Carli Luciano	Chirurgia Generale	Perugia
Carlone Giancarlo	Chirurgia Generale	Marsciano (PG)
Catarinelli Luciana	Radiologia/Senologia	Terni
Cavaliere Antonio	Anatomia Patologica	Perugia
Ceccarelli Graziano	Chirurgia Generale	Spoleto (PG)
Cirenei Giulia Maria Rita	Radiologia/Senologia	Foligno (PG)
Correnti Filippo Stefano	Chirurgia Generale	Orvieto (TR)
Cristallini Giuseppe	Anatomia Patologica	Foligno (PG)
Farabi Raffaele	Anatomia Patologica	Terni
Fenocchio Daniela	Anatomia Patologica	Perugia

**Tabella 4. Elenco dei Partecipanti al Consensus Group Regionale**

Fioriti Lorella	Radiologia/Senologia	Terni
Gerli Paolo	Chirurgia Generale	Perugia
Livolsi Lanfranco	Radiologia/Senologia	Orvieto (TR)
Lombardi Tiziana	Radiologia/Senologia	Città di Castello (PG)
Lucaccioni Antonella	Anatomia Patologica	Città di Castello (PG)
Marchettoni Vincenzo	Senologia	Perugia
Monico Silvio	Anatomia Patologica	Spoletto (PG)
Panzarola Patrizia	Radiologia/Senologia	Perugia
Rossi Giovanni Maria	Chirurgia Generale	Città di Castello (PG)
Rulli Antonio	Chirurgia Generale	Perugia
Sanguinetti Alessandro	Chirurgia Generale	Terni
Tacchi Piergiorgio	Chirurgia Generale	Foligno (PG)

- Invio del questionario conoscitivo. A tutti i Professionisti che avevano espresso la volontà di partecipare è stato inviato, tramite E-mail e/o Fax, un questionario a risposte multiple elaborato dal Responsabile Scientifico ed avente lo scopo di rilevare le attuali modalità di conservazione e fissazione dei tessuti neoplastici mammari nelle diverse realtà operative della Regione ed il relativo grado di consapevolezza/responsabilizzazione degli operatori. Le risposte ai questionari sono state raccolte via E-mail o tramite fax, ed elaborate in forma anonima (analisi statistica descrittiva e distribuzione percentuale).
- Questionari per la condivisione degli *statements*. In una fase successiva, sono stati inviati ai Partecipanti, sempre via E-mail o Fax, 18 *statements* preparati dal Responsabile Scientifico e riguardanti il nesso esistente tra livello di standardizzazione delle metodiche di conservazione e fissazione dei tessuti mammari neoplastici ed il grado di attendibilità delle caratterizzazioni biopatologiche e molecolari che su di essi vengono effettuate. Le risposte possibili (sono d'accordo, non sono d'accordo o non so) sono state raccolte via E-mail o tramite fax ed elaborate in forma anonima (statistica descrittiva e percentuale).
- *Consensus Group Meeting*. Nel corso della riunione finale plenaria, svoltasi a Perugia il 6 giugno 2008, a cui sono stati invitati, oltre ai Partecipanti, anche alcuni professionisti delle stesse aree disciplinari e dell'Onco-logia Medica, sono state discusse le risposte al questionario conoscitivo, evidenziando le criticità degli attuali livelli di conoscenza e di coinvolgimento in tema di corretta gestione dei tessuti neoplastici. In una sessione successiva, tutti gli *statements* sono stati commentati in rapporto alle risposte fornite dai partecipanti, valutati criticamente anche alla luce delle evidenze più recenti della letteratura, modificati ove necessario e approvati in via definitiva. L'insieme degli *statements*, discussi ed approvati dal *Consensus Group*, costituiscono implicitamente un protocollo operativo condiviso che, trasformato nel presente documento scritto, verrà diffuso ed adottato nelle singole realtà locali per migliorare ed uniformare le procedure di conservazione e di fissazione dei tessuti mammari prelevati.

# Discussione dei risultati del questionario conoscitivo

**Antonio Cavaliere**

*Anatomia Patologica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Perugia*

I questionari conoscitivi sono stati inviati a tutti i 29 Partecipanti prima della riunione plenaria via E-mail. 24 centri hanno inviato le risposte, che sono state elaborate in forma anonima. In particolare hanno risposto 11 centri di Chirurgia su 12, 7 centri di Radiologia/Senologia su 10 e 6 laboratori di Anatomia Patologica su 7.

---

## 1. Tutte le seguenti affermazioni sul ruolo della fissazione dei tessuti sono esatte, ad eccezione di:

1) Evita i fenomeni autolitici	2 (8,3%)
2) Evita i fenomeni putrefattivi	1 (4,2%)
3) Preserva le funzioni cellulari	21 (87,5%)
4) Preserva la morfologia cellulare	0
5) Conserva i siti antigenici	0

La fissazione dei tessuti ha lo scopo di evitare i fenomeni putrefattivi ed i fenomeni autolitici, di preservare la morfologia cellulare e di conservare i siti antigenici, mentre, come correttamente affermato dalla maggior parte dei Partecipanti, non preserva le funzioni cellulari. L'errata o ritardata fissazione può determinare la comparsa di fenomeni autolitici, con conseguente alterazione della morfologia del citoplasma e del nucleo e rende impossibile la corretta determinazione del numero di mitosi. Inoltre può alterare la morfologia cellulare causando, ad esempio, una difficoltà di interpretazione della natura e del tipo di neoplasia. Viene compromessa anche l'affidabilità delle indagini di immunoistochimica e la caratterizzazione biopatologica delle neoplasie (recettori ormonali, attività proliferativa, HER2, ecc). Per preservare le principali caratteristiche del tessuto, la fissazione deve essere eseguita il più rapidamente possibile e comunque non oltre i 30 minuti dal prelievo del pezzo operatorio.

---

## 2. Nella Tua struttura il fissativo tissutale utilizzato è:

1) Formalina calcica (cloruro di calcio) al 10%	1 (4,2%)
2) Formalina salata al 10%	1 (4,2%)
3) Formalina neutra tamponata al 10%	16 (66,6%)
4) Formalina neutra (carbonato di calcio) al 10%	2* (4,2%)
5) Alcool etilico	0
6) Sostituto della formalina (indicare):	0
7) Altro (indicare)	0
8) Nessuna risposta	5 (20,8%)

\*Un partecipante ha dato una duplice risposta: 3 e 4

Quasi l'80% dei Partecipanti dichiara, correttamente, che nella propria struttura viene utilizzata la formalina al 10%, (neutra tamponata nei 2/3 del totale) mentre in pochi casi vengono utilizzati altri tipi di fissativi. Di rilievo è la mancata risposta del 21% dei Partecipanti.

La formaldeide, o aldeide formica (HCHO), è il precursore della formalina, il fissativo utilizzato nella pratica clinica quotidiana. La formalina prodotta dall'industria chimica è una soluzione acquosa della formaldeide alla concentrazione di circa il 40%; si presenta incolore, con un odore sui generis (pungente ed irritante). Per essere utilizzata come fissativo la formalina disponibile in commercio deve essere diluita e addizionata con altre sostanze atte a controllarne il pH, come verrà discusso successivamente. Nella tabella 5 vengono riassunte le formulazioni dei tipi di formalina più comunemente utilizzati.

<b>Tabella 5. Tipi di formalina più comunemente utilizzati per la fissazione dei tessuti</b>	
<b>Formalina calcica di Baker (1966) modificata</b>	<b>- fosfolipidi -</b>
1. Formalina 40%	100 ml (100 ml)
2. Acqua distillata	900 ml (800 ml)
3. Cloruro di calcio 10%	100 ml (100 ml)
<b>Formalina salata (o di Policard)</b>	
1. Formalina 40%	100 ml
2. Acqua distillata	900 ml
3. Cloruro di sodio 10%	9 g
<b>Formalina neutra tamponata (Lillie)</b>	
1. Formalina 40%	100 ml
2. Acqua distillata	900 ml
3. Fosfato acido di sodio (NaH <sub>2</sub> POH <sub>2</sub> O)	4 g
4. Fosfato disodico anidro (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	6,5 g
<b>Formalina neutra (carbonato di calcio)</b>	
1. Formalina 40%	100 ml
2. Acqua distillata	900 ml
3. Carbonato di calcio (CaCO <sub>3</sub> )	

### 3. La formalina utilizzata nella Tua struttura per la fissazione dei campioni tissutali viene preparata da:

1) Laboratorio di Anatomia Patologica	9 (37,5%)
2) Farmacia dell'Ospedale	10 (41,6%)
3) Si tratta di prodotto già pronto presente in commercio	6* (16,7%)
4) Non so	1 (4,2%)

\*Due partecipanti hanno dato una duplice risposta: 1 e 3

A livello dei singoli centri, la formalina viene preparata (diluita) o direttamente dal laboratorio di Anatomia Patologica (37,5%) oppure dalla Farmacia dell'Ospedale (41,6%). In pochi casi [6, pari al 16,7%] viene acquistata direttamente dal commercio come prodotto già diluito. In due di questi casi, l'approvvigionamento è fatto dal locale laboratorio di Anatomia Patologica.

### 4. Con quale frequenza viene preparata la formalina utilizzata nel tuo reparto?

1) Mensilmente	5 (20,8%)
2) Settimanalmente	5 (20,8%)
3) Giornalmente	4 (16,7%)
4) Altro (indicare)	0
5) Non so	9 (37,5%)
6) Nessuna risposta	1 (4,2%)

La maggior parte dei Partecipanti non è informata sulla frequenza di preparazione della formalina, mentre i rimanenti casi sono equamente distribuiti sulla preparazione giornaliera, settimanale o mensile.

La preparazione giornaliera, settimanale o mensile (ma non oltre) ha poca importanza purché la soluzione venga preparata in maniera adeguata, cioè alla giusta concentrazione ed al giusto valore di pH.

## 5. Il pH ottimale della formalina deve essere:

1) < 6,5	1 (4,2%)
2) > 7,5	1 (4,2%)
3) tra 6,8 e 7,2	16 (66,7%)
4) Non so	6 (24,9%)

Due terzi dei partecipanti ha risposto correttamente, indicando che il valore ottimale del pH della formalina deve essere compreso tra 6,8 e 7,2.

La formalina agisce creando legami crociati (ponti metilenici) tra le proteine e formando una specie di gel, che consente la conservazione ed il mantenimento *in situ* dei costituenti cellulari e l'indurimento del tessuto. Quando la formaldeide viene messa in soluzione acquosa, si forma un metilen glicole monoidrato che è ritenuto essere l'elemento attivo capace di esprimere la massima attività ad un pH neutro o leggermente alcalino. Per questo motivo, la maggior parte degli Autori suggerisce di utilizzare una formalina tamponata neutra<sup>[30-34]</sup>, oppure una formalina con un pH leggermente alcalino, da 7,0 a 7,4<sup>[35]</sup> o da 7,5 a 8,0<sup>[36]</sup>.

## 6. La diluizione effettiva della formalina da utilizzare per la fissazione dei tessuti è:

1) 40%	1 (4,2%)
2) 10%	7 (29,2%)
3) 4%	12 (50%)
4) Non so	4 (16,6%)

La metà dei partecipanti ha indicato che la diluizione effettiva della formalina da utilizzare per la fissazione dei tessuti deve essere pari al 4%, mentre il 29,2% ha suggerito una diluizione maggiore (10%). A questo proposito, occorre precisare che se si prende in considerazione il fatto che si parte da una soluzione satura di formalina, la diluizione finale della soluzione sarà pari al 10%; se, invece, si fa riferimento alla concentrazione effettiva della formaldeide (40%), la soluzione finale di formalina risulterà essere al 4%. In commercio sono disponibili soluzioni di formalina a concentrazione diversa (39%, 37% ecc): in questi casi per la preparazione finale della formalina al 10% si può fare riferimento ad una tabella di conversione<sup>[37]</sup> (tabella 6).

**Tabella 6. Esempio di tabella di preparazione della formalina al 10% a partire da soluzioni di formaldeide a diversa concentrazione**

Densità della formalina pura	Percentuale di formaldeide	Millilitri di formalina	Millilitri di acqua
Necessari per preparare la formalina al 10 %			
1.090	40.00	10.00	90.00
1.086	39.00	10.25	89.75
1.083	38.00	10.56	89.44
1.080	37.00	10.84	89.16
1.075	35.15	11.37	88.63
1.070	33.30	12.00	88.00
1.065	31.45	12.70	87.30
1.060	29.60	13.35	86.65
1.055	27.75	14.40	86.00
1.050	25.90	15.44	84.56
1.045	24.05	16.62	83.38
1.040	22.20	18.00	82.00
1.035	20.35	19.61	80.39
1.030	18.50	21.65	78.35
1.025	14.80	27.00	73.00
1.020	12.95	30.92	69.08
1.015	11.10	36.10	63.90
1.012	9.25	43.24	56.74
1.010	7.40	54.00	46.00
1.0085	5.55	72.07	27.93
1.0065	4.00	100.00	0.00

Mod. da Rodriguez - Martinez et al<sup>[37]</sup>

---

**7. Il rapporto tra volume del campione da fissare e quantità di formalina da utilizzare deve essere:**

1) 1 : 10	19* (79,2%)
2) 10 : 1	0
3) Altro (indicare)	1** (4,2%)
4) Non so	4 (16,6%)

\*Un partecipante ha indicato anche 1 : 20

\*\* 1 : 20

In circa l'80% dei casi è stato indicato che il rapporto tra volume del campione da fissare e quantità di formalina da utilizzare deve essere di almeno 1 a 10, ed in 2 casi addirittura di 1 a 20.

La letteratura supporta questo tipo di scelta: alcuni Autori suggeriscono di utilizzare un rapporto tessuto/liquido fissativo di 1 : 20 <sup>[33,38]</sup>, altri da 1 : 10 fino a 1 : 20 <sup>[31]</sup>, altri ancora di almeno 1 : 10 <sup>[39, 34]</sup> o un rapporto compreso tra 1: 10 e 1 : 5 <sup>[32]</sup>. Curiosamente, viene suggerito anche di immergere il frammento da fissare in "liquido piuttosto abbondante" <sup>[40]</sup>.

---

**8. In un campione di tessuto la velocità di penetrazione della formalina è:**

1) 1 mm/ora	11 (45,8%)
2) 1 cm/ora	4 (16,7%)
3) Istantanea	0
4) Non so	9 (37,5%)

Quasi la metà dei Partecipanti ha risposto che la velocità di penetrazione della formalina nel campione di tessuto è di 1 millimetro/ora, contro il 16,7% che ha indicato una velocità superiore (1 cm/ora).

La velocità di penetrazione della formalina suggerita da vari Autori è variabile tra 0,8 e 1 mm/ora, e dipende dal tipo di tessuto da fissare <sup>[31, 33, 39]</sup>. Ciascun fissativo ha un suo coefficiente di diffusibilità, che viene indicato con la lettera K ed è riferito a tessuti sufficientemente uniformi, come ad esempio il fegato; il coefficiente di diffusibilità dell'etanolo è pari a 1, della formalina è di 0,78, dell'acido acetico 1,2, ecc. <sup>[34, 41]</sup>. Va comunque sottolineato che la penetrazione tissutale del fissativo non equivale a fissazione: pertanto, il tempo di fissazione è di solito più lungo rispetto a quello di penetrazione <sup>[39]</sup>.

---

**9. Le caratteristiche chimico-fisiche (pH e concentrazione) della formalina utilizzata nel Tuo reparto vengono verificate periodicamente?**

1) SI	7 (29,2%)
2) NO	11 (45,8%)
3) Non so	6 (25%)

In questo caso, la situazione emersa dalle risposte dei partecipanti è preoccupante, poiché in quasi la metà dei centri coinvolti le caratteristiche chimico-fisiche della formalina utilizzata non vengono verificate periodicamente, e in un quarto dei casi questa informazione è sconosciuta.

---

**10. La formalina tende ad acidificare a causa della trasformazione dell'aldeide formica in acido formico; questo processo è accelerato da fattori ambientali. In quali recipienti viene conservata la formalina nella Tua struttura?**

1) Contenitori in plastica trasparente	9 (37,5%)
2) Contenitori in vetro chiaro	1 (4,2%)
3) Contenitori in vetro scuro	7 (29,2%)
4) Altro (indicare)	5* (20,8%)
5) Non so	2 (8,3%)

\*4: plastica opaca, 1: contenitore metallico

Dieci partecipanti hanno dichiarato che la formalina viene conservata in contenitori trasparenti (in 9 casi plastica trasparente ed in 1 caso vetro chiaro); in 12 casi centri vengono adoperati contenitori opachi di vetro scuro, plastica opaca o contenitori metallici.

In presenza di ossigeno atmosferico, la formaldeide viene ossidata in acido formico (CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) che provoca un abbassamento del pH della soluzione (acidificazione) e, di conseguenza, una riduzione dell'attività fissativa<sup>[31, 40]</sup>. Oltre all'ossigeno, anche la luce contribuisce all'acidificazione della soluzione. Occorre pertanto conservare la formalina in recipienti opachi, al riparo dalla luce<sup>[32, 42-44]</sup>.

---

**11. In considerazione della tossicità e della cancerogenicità della formalina ritieni opportuno sostituirla in futuro con altri fissativi presenti in commercio?**

1) SI	12 (50%)
2) NO	4 (16,7%)
3) Non so	8 (33,3%)

Metà dei Partecipanti ritiene opportuno sostituire la formalina con altri fissativi eventualmente disponibili, altrettanto efficaci ma meno tossici, mentre un terzo non sa rispondere al quesito. Infine, in 4 casi non viene percepita la necessità di nuovi fissativi oltre alla formalina.

La formalina viene attualmente utilizzata come disinfettante per uso domestico, per la produzione di deodoranti, detersivi, saponi e cosmetici, per la produzione di vaccini e di anafilotossine, per l'imbalsamazione, per la produzione di numerose sostanze industriali (bachelite, resine, colle, vernici, solventi, laminati plastici, adesivi, schiume isolanti, cartoni, cartoni del latte, imballaggi, legno, truciolo, ecc.). La formalina pertanto è uno dei più diffusi inquinanti di interni, ma a concentrazioni generalmente basse. Il limite di qualità dell'aria suggerito dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) è pari a 0,1 mg/m<sup>3</sup> su 30 minuti di prelievo.

In Italia è ammesso il suo utilizzo come additivo alimentare (E240); è presente nel fumo di legno; in alcuni prodotti alimentari affumicati raggiunge la concentrazione di 1.000 ppm. Il contenuto in alcuni frutti, come le mele, arriva fino a 20 ppm. È stato accertato che la formalina è un agente cancerogeno, almeno sui roditori, nei quali provoca carcinoma delle vie respiratorie superiori. Dal 2006, la IARC (International Agency for Research on Cancer) ha definito la formalina "cancerogena per l'uomo". Le persone più esposte a questo rischio sono per gli addetti alle lavorazioni industriali, in cui occorre valutare accuratamente i rischi per la salute.

## Discussione interattiva degli statements proposti ed elaborazione di un protocollo operativo condiviso

Hanno risposto al questionario relativo agli *statements* 24 dei 29 Partecipanti (83%) così distribuiti: 10 centri di Chirurgia su 12; 8 centri di Radiologia/Senologia su 10 e 6 laboratori di Anatomia Patologica su 7.

Nel corso della riunione finale plenaria sono state svolte le seguenti attività:

- discussione delle preferenze date a ciascun *statement*;
- illustrazione delle evidenze scientifiche a supporto;
- analisi critica di ciascun *statement* con apporto di eventuali modifiche e sua approvazione in via definitiva.

Da una prima analisi sommaria, si può constatare come la maggioranza dei Partecipanti si dichiarò d'accordo con gli *statement* proposti (tabella 7). Infatti, le risposte positive (sono d'accordo con l'affermazione) variavano dal 50% al 95,8%. In 11 casi su 18 (61%) l'accordo globale era superiore al 70%.

Per quanto riguarda la rimanente quota di risposte, nella maggior parte dei casi è stata data una risposta di non conoscenza dell'argomento (non so), mentre le risposte contrarie (non sono d'accordo con l'affermazione) erano minime (1 caso ciascuno per gli *statements* n. 7, 9 11 e 15).

Si deve notare che gli *statements* in cui è stato espresso un elevato tasso di "non so" erano soprattutto quelli ritenuti (erroneamente) di esclusiva pertinenza specialistica anatomopatologica e che riguardavano il meccanismo d'azione della formalina, i tempi e le modalità di fissazione (ipofissazioni, iperfissazioni, ritardi di fissazione).



**Tabella 7. Elaborazione delle risposte agli statements inviate dai 24 centri che hanno risposto ai questionari**

<b>Statement</b>	<b>Sono d'accordo</b>	<b>Non sono d'accordo</b>	<b>Non so</b>
1. Nelle adiacenze della neoplasia non deve essere usato l'elettrobisturi onde evitare la necrosi coagulativa che compromette la morfologia dei tessuti, le caratteristiche antigeniche e l'integrità degli acidi nucleici	22 (91,6%)	0	2 (8,4%)
2. L'uso di aghi trancianti di scarsa qualità può comportare artefatti meccanici in grado di compromettere l'interpretazione morfologica convenzionale, immunofenotipica e molecolare. La fornitura di questi presidi deve, pertanto, basarsi su una idonea analisi comparativa tra i vari prodotti disponibili in commercio	23 (95,8%)	0	1 (4,2%)
3. Considerando i pregi ed i difetti dei vari fissativi disponibili, la formalina neutra tamponata al 4% (pH 6,8-7,2) è, attualmente, il fissativo preferibile per i tessuti neoplastici	19 (79,2%)	0	5 (20,8%)
4. L'uso di fissativi alternativi alla formalina può essere introdotto nella pratica routinaria solo dopo validazione presso il laboratorio di Anatomia Patologica di riferimento	23 (95,8%)	0	1 (4,2%)
5. La fissazione in formalina produce legami crociati tra le proteine. Questi effetti sono fonte di scarsa riproducibilità delle indagini immunoistochimiche in assenza di una standardizzazione della fissazione	15 (62,5%)	0	9 (37,5%)
6. Le modalità di fissazione dei tessuti in formalina devono essere standardizzate (monitoraggio delle caratteristiche chimico-fisiche, tempi di fissazione, etc.)	23 (95,8%)	0	1 (4,2%)
7. Nei casi in cui, per motivi logistici, non si è in grado di assicurare costantemente le qualità chimico-fisiche della formalina neutra tamponata (diluizione, molarità e pH) è preferibile acquistare il prodotto già pronto per l'uso (formalina neutra tamponata al 4%) disponibile in commercio	22 (91,6%)	1 (4,2%)	1 (4,2%)
8. La formalina acidificata (non tamponata) favorisce la degradazione degli acidi nucleici (idrolisi dei legami $\beta$ -glicosidici delle basi puriniche) compromettendo la qualità del DNA e dell'RNA estraibili	15 (62,5%)	0	9 (37,5%)
9. Gli operatori coinvolti nella gestione dei tessuti neoplastici devono concordare tutti gli accorgimenti atti a garantirne una fissazione immediata, adeguata e completa, anche attraverso variazioni degli orari in cui vengono effettuati i prelievi e/o gli interventi chirurgici*	19 (90,6%)	1 (4,7%)	1 (4,7%)
10. Per i pezzi operatori, specialmente se voluminosi, è necessario facilitare la penetrazione della formalina frazionando il campione in più segmenti attraverso procedure concordate tra anatomopatologi e chirurghi	18 (75%)	0	6 (25%)
11. Al fine di evitare problemi di ipo- o iper-fissazione del campione è necessario annotare sulla richiesta d'esame l'ora della sua immersione in formalina	20 (83,3%)	1 (4,2%)	3 (12,5%)
12. Il tempo minimo di fissazione in formalina dei prelievi agobiottici deve essere di almeno 6-8 ore	16 (66,7%)	0	8 (33,3%)

<b>Statement</b>	<b>Sono d'accordo</b>	<b>Non sono d'accordo</b>	<b>Non so</b>
13. I tempi ottimali di fissazione in formalina dei pezzi operatori (quadrantectomie e mastectomie) devono essere contenuti tra 24 e 48 ore	19 (79,2%)	0	5 (20,8%)
14. La permanenza in formalina per tempi troppo brevi interrompe il processo di fissazione (legami crociati) che prosegue ad opera dell'alcool (coagulazione) durante il processamento	14 (58,4%)	0	10 (41,7%)
15. Le ipofissazioni condizionano la possibilità di risultati immunoistochimici falsamente positivi per HER2	16 (66,6%)	1 (4,2%)	7 (29,2%)
16. Le iperfissazioni (> 72 ore) compromettono l'interpretabilità della FISH	12 (50%)	0	12 (50%)
17. I ritardi di fissazione possono influenzare il grado di differenziazione di un carcinoma	17 (70,8%)	0	7 (29,2%)
18. I ritardi di fissazione possono essere alla base di notevole eterogeneità delle colorazioni immunoistochimiche per i recettori ormonali	15 (62,5%)	0	9 (37,5%)
*3 partecipanti non hanno risposto al quesito			

# Report della discussione plenaria degli statements da parte del Consensus Group

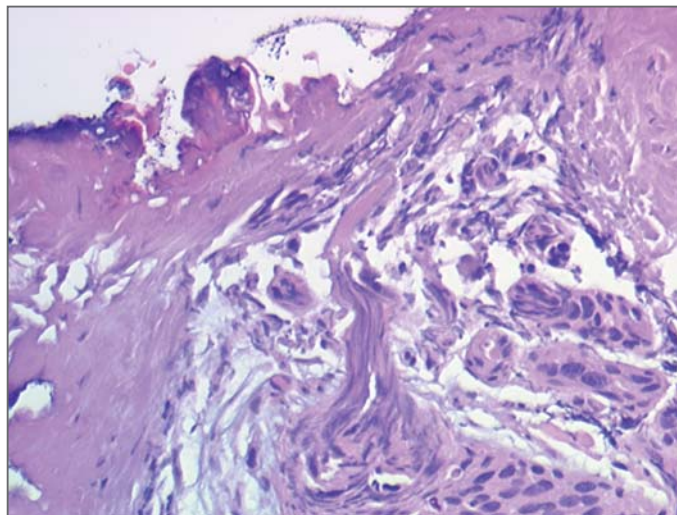
**Angelo Sidoni**

Anatomia Patologica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Perugia

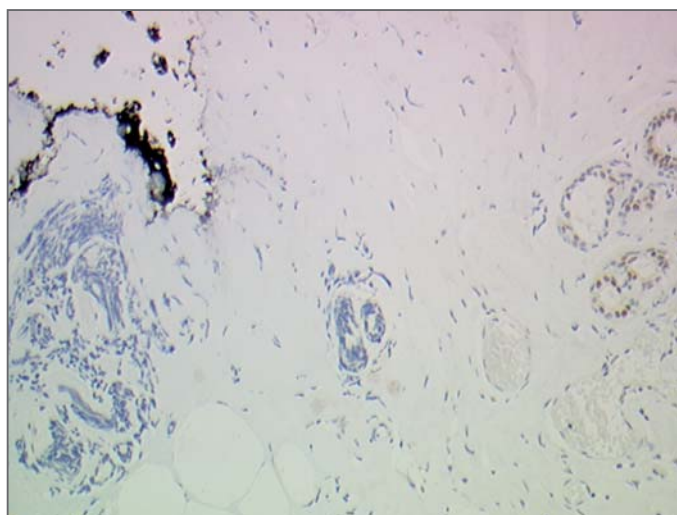
- 1. Nelle adiacenze della neoplasia non deve essere usato l'elettrobisturi onde evitare la necrosi coagulativa che compromette la morfologia dei tessuti, le caratteristiche antigeniche e l'integrità degli acidi nucleici**

La temperatura elevata e le forze del campo elettrico generate dall'elettrocauterizzazione provocano alterazioni morfologiche (figura 4) in grado di compromettere irreparabilmente sia la valutazione dei margini di resezione chirurgica che, nel caso di piccole neoplasie, la morfologia della lesione e, conseguentemente, la diagnosi. Inoltre nel tessuto sottoposto a stress termico si determinano alterazioni antigeniche che compromettono l'analisi biopatologica ed in particolare l'espressione recettoriale estrogenica (figura 5) <sup>(45)</sup>. Lo *statement* viene approvato all'unanimità senza modifiche.

**Figura 4. Gravi alterazioni elettrocoagulative in corrispondenza di un margine di resezione chirurgico che impediscono la valutazione della radicalità oncologica.**



**Figura 5. Perdita dell'espressione dei recettori estrogenici nell'area elettrocauterizzata (lato sinistro della figura).**

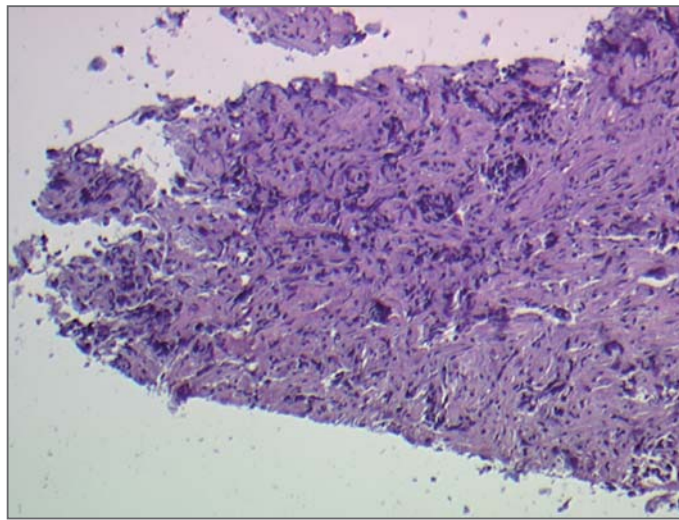


**2. L'uso di aghi trancianti di scarsa qualità può comportare artefatti meccanici in grado di compromettere l'interpretazione morfologica convenzionale, immunofenotipica e molecolare. La fornitura di questi presidi deve, pertanto, basarsi su una idonea analisi comparativa tra i vari prodotti disponibili in commercio**

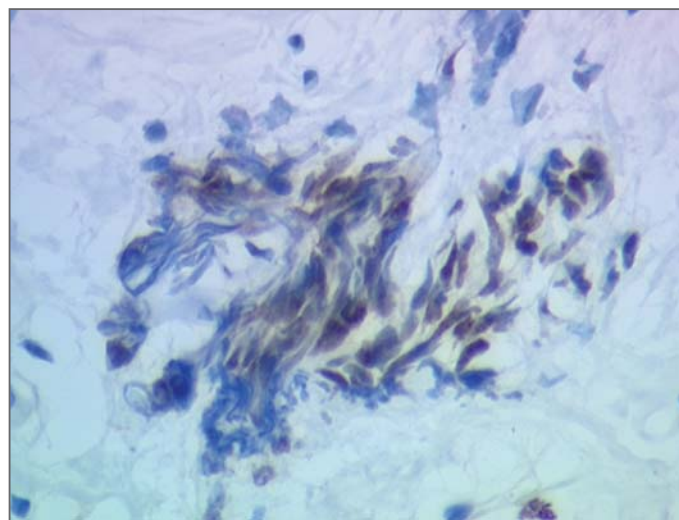
L'esecuzione di core biopsy con aghi poco idonei o scadenti può provocare artefatti da schiacciamento o da stiramento (figura 6) in grado di compromettere sia la morfologia delle lesioni (e conseguentemente l'attendibilità della diagnosi) che l'esame di parametri biologici (figura 7). Inoltre, questi aspetti possono concorrere alla incongruenza degli assetti ormonali valutati su agobiopsie rispetto a quelli relativi ai pezzi operatori <sup>[46]</sup>.

Il Consensus Group approva all'unanimità lo *statement* sottolineando che, talvolta, le caratteristiche strutturali delle lesioni mammarie (desmoplasia e calcificazioni) possono condizionare artefatti meccanici, anche se si utilizzano aghi di elevata qualità. Si conferma comunque la necessità di vigilare sulle forniture di questi presidi segnalando alle rispettive amministrazioni le eventuali carenze qualitative.

**Figura 6. Evidenti artefatti meccanici, conseguenti ad inidonea attività tranciante, che precludono la valutazione morfologica della lesione.**



**Figura 7. Non valutabilità della colorazione immunohistochimica per ER (stesso caso della figura precedente).**



---

**3. Considerando i pregi ed i difetti dei vari fissativi disponibili, la formalina neutra tamponata al 4% (pH 6,8-7,2) è, attualmente, il fissativo preferibile per i tessuti neoplastici**

Il Consensus Group approva all'unanimità lo *statement* senza discussione.

---

**4. L'uso di fissativi alternativi alla formalina può essere introdotto nella pratica routinaria solo dopo validazione presso il laboratorio di Anatomia Patologica di riferimento**

Attualmente nessuno dei potenziali sostituti della formalina ha mostrato caratteristiche in grado di farli adottare universalmente. D'altro canto i preparati istologici ottenuti con la fissazione in formalina continuano a riscuotere il gradimento degli anatomopatologi quando confrontati con quelli fissati con modalità alternative <sup>(47)</sup>.

In ogni caso la sostituzione definitiva della formalina presupporrà un periodo di validazione del nuovo fissativo d'intesa con il laboratorio di Anatomia Patologica di riferimento.

Lo *statement* viene approvato all'unanimità senza discussione.

---

**5. La fissazione in formalina produce legami crociati tra le proteine. Questi effetti sono fonte di scarsa riproducibilità delle indagini immunostochimiche in assenza di una standardizzazione della fissazione**

La fissazione in formalina causa la formazione di ponti metilenici, che stabilizzano le proteine e conferiscono maggiore consistenza al tessuto. I ponti metilenici si possono formare tra diverse zone dello stesso antigene, tra due antigeni diversi oppure interessare direttamente l'epitopo <sup>(48)</sup>. In tutti questi casi però si ottiene un mascheramento dei siti antigenici nei confronti degli anticorpi monoclonali, che condizionano risultati immunostochimici falsamente negativi. Per ovviare a questo problema bisogna smascherare gli antigeni (antigen retrieval) mediante tecniche di laboratorio (digestione enzimatica, microonde, pentola a pressione, ecc.), la cui scelta e modulazione dovrebbe basarsi sulla conoscenza dei tempi e delle modalità di fissazione. Purtroppo la formazione di ponti metilenici è una reazione dinamica, che continua nel tempo: infatti è abbastanza estesa dopo 24 ore di fissazione, ma si intensifica nelle ore successive <sup>(48)</sup>. Ne consegue che se non si conoscono esattamente i tempi di fissazione, non sarà possibile utilizzare razionalmente gli agenti smascheranti <sup>(8)</sup> con ovvie ripercussioni sull'accuratezza e riproducibilità dei risultati immunostochimici, primi fra tutti quelli relativi ai recettori ormonali e a HER2.

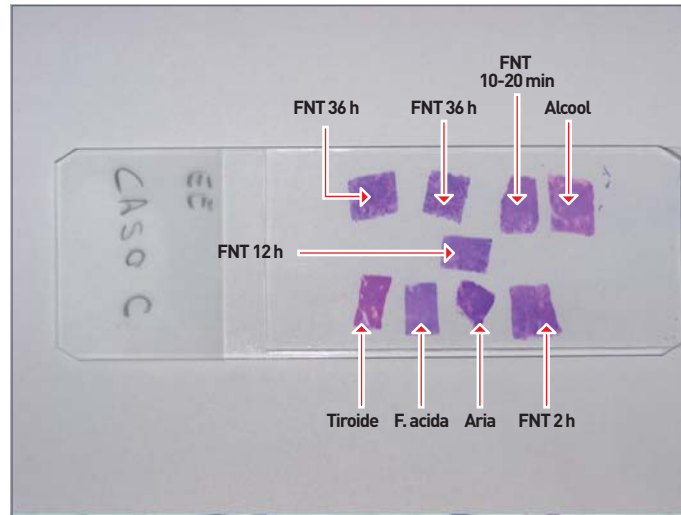
Lo *statement* viene approvato all'unanimità senza discussione.

**6. Le modalità di fissazione dei tessuti in formalina devono essere standardizzate (monitoraggio delle caratteristiche chimico-fisiche, tempi di fissazione, etc.)**

A corredo di questo *statement* viene riportato un semplice esperimento realizzato presso il Laboratorio di Anatomia Patologica dell'Università di Perugia in cui, suddividendo una stessa neoplasia in vari frammenti che, fissati in maniera diversa, sono stati successivamente assemblati in un solo preparato (figura 8), si può dimostrare l'estrema difformità dei risultati immunohistochimici sia per quanto riguarda l'espressione di proteine nucleari (figura 9) che di membrana (figura 10).

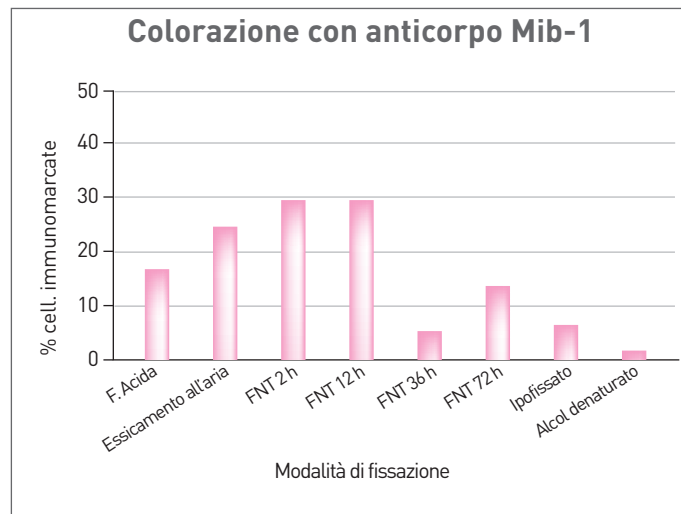
Lo *statement* viene approvato all'unanimità senza discussione.

**Figura 8. Array tissutale contenente 8 frammenti di uno stesso carcinoma mammario e sottoposti a diverse condizioni di conservazione e fissazione.**

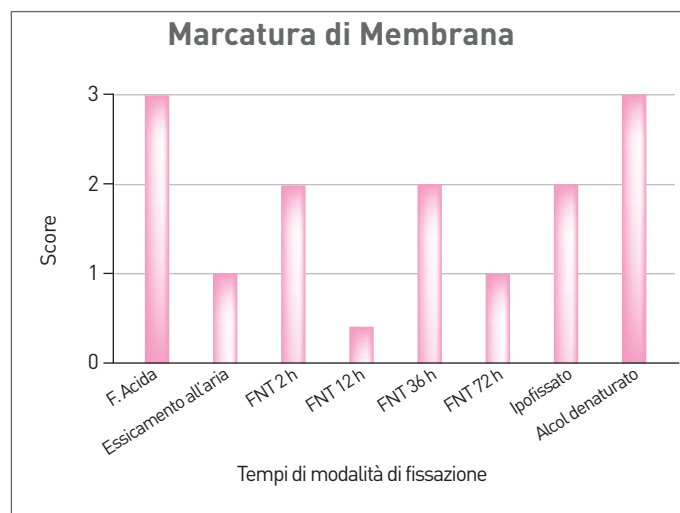


*Legenda. FNT36h: fissazione in formalina neutra tamponata per 36 ore; FNT72h: fissazione in formalina neutra tamponata per 72 ore, FNT10-20 min: ipofissazione in formalina neutra tamponata per 10-20 minuti, Alcool: fissazione in alcool denaturato (90°) per 12 ore, FNT12h fissazione in formalina neutra tamponata per 12 ore, F. acida: fissazione in formalina acida (pH=4,5) per 36 ore, Aria: ritardo di fissazione dopo permanenza all'aria per 2 ore e successiva fissazione in formalina neutra tamponata per 36 ore; FNT2h fissazione in formalina neutra tamponata per 2 ore (il frammento di tiroide ha la funzione di punto di riferimento).*

**Figura 9. Variabilità dell'espressione di Ki-67 (clone Mib-1) nella stessa neoplasia a seconda delle modalità di fissazione (vedasi figura 8 per le abbreviazioni).**



**Figura 10. Variabilità dell'espressione di HER2/neu nella stessa neoplasia a seconda delle modalità di fissazione (vedasi figura 8 per le abbreviazioni).**



- 7. Nei casi in cui, per motivi logistici, non si è in grado di assicurare costantemente le qualità chimico-fisiche della formalina neutra tamponata (diluizione, molarità e pH) è preferibile acquistare il prodotto già pronto per l'uso (formalina neutra tamponata al 4%) disponibile in commercio**

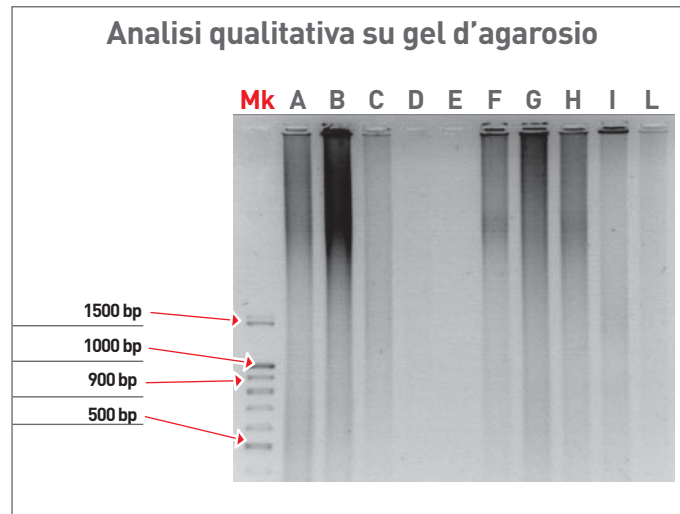
Lo *statement* viene approvato all'unanimità senza discussione.

## 8. La formalina acidificata (non tamponata) favorisce la degradazione degli acidi nucleici (idrolisi dei legami $\beta$ -glicosidici delle basi puriniche) compromettendo la qualità del DNA e dell'RNA estraibili

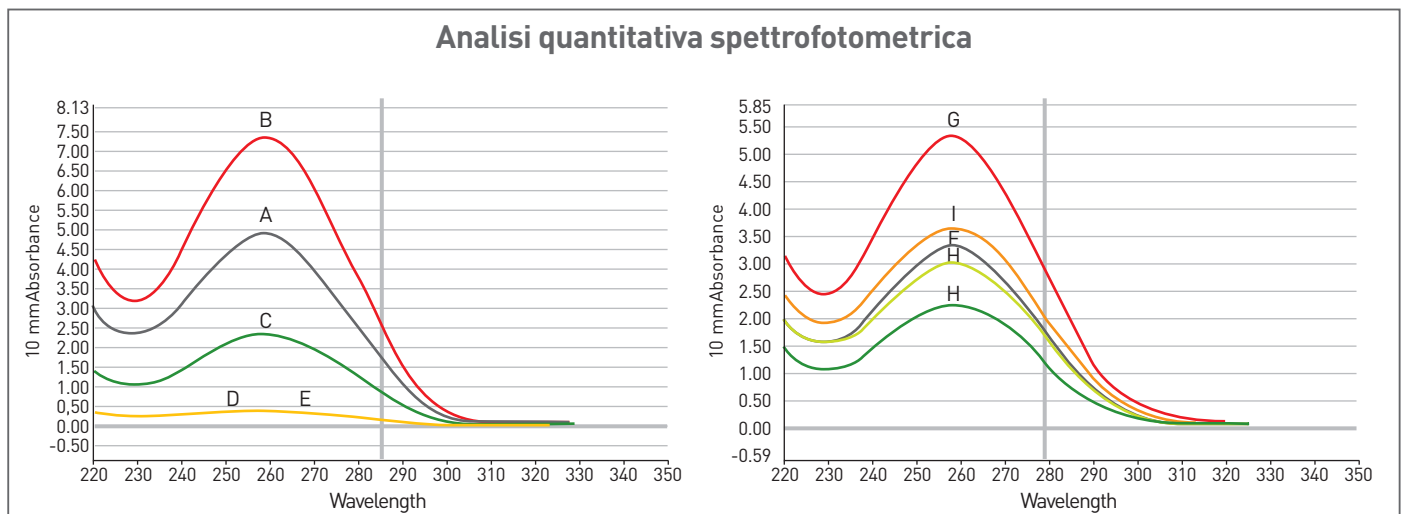
Uno degli aspetti più preoccupanti della biologia molecolare applicata ai tessuti tumorali fissati in formalina ed inclusi in paraffina è rappresentato dalla scarsa qualità del DNA e dell'RNA da essi estraibili. Questo problema costituisce una grave menomazione alla potenzialità delle informazioni che potremmo ottenere dai nostri archivi. Uno studio recente ha ribadito in maniera incontrovertibile che la formalina acida (non tamponata, conservata in modo non idoneo o per lungo tempo) è in grado di alterare irreversibilmente il DNA cellulare <sup>[49]</sup>.

D'altro canto, estraendo il DNA da 10 casi consecutivi e non selezionati di carcinoma della mammella, pervenuti nel Laboratorio di Anatomia Patologica dell'Università di Perugia da vari Ospedali, si ottengono risultati estremamente eterogenei sia sul piano qualitativo (figura 11) che quantitativo (figura 12). Questa variabilità è espressione della mancata standardizzazione delle procedure di conservazione e fissazione ed è in grado di precludere ulteriori analisi genomiche in una rilevante porzione dei casi. Lo *statement* viene approvato all'unanimità.

**Figura 11. Variabilità della qualità del DNA estratto in 10 casi consecutivi di carcinoma mammario fissati in formalina ed inclusi in paraffina**



**Figura 12. Variabilità della quantità del DNA estratto in 10 casi consecutivi di carcinoma mammario fissati in formalina ed inclusi in paraffina**



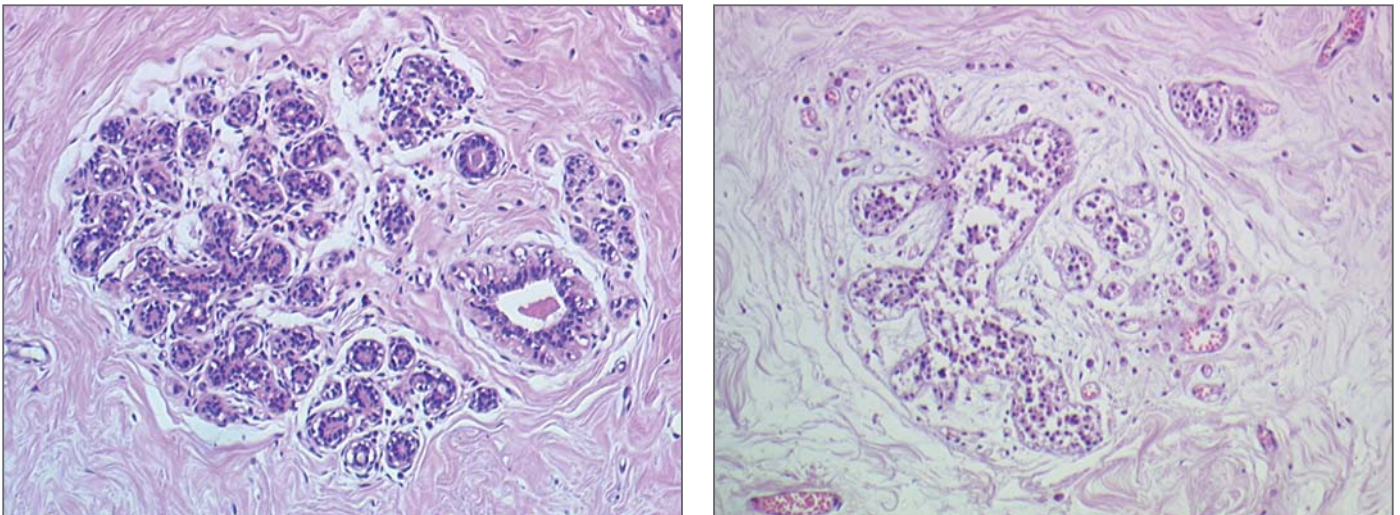


**9. Gli operatori coinvolti nella gestione dei tessuti neoplastici devono concordare tutti gli accorgimenti atti a garantirne una fissazione immediata, adeguata e completa, anche attraverso variazioni degli orari in cui vengono effettuati i prelievi e/o gli interventi chirurgici**

L'inadeguata fissazione dei campioni tumorali nuoce, ancor prima che alla preservazione degli antigeni e degli acidi nucleici, alla morfologia di cellule e tessuti sulla quale, storicamente, si fonda e continuerà a fondarsi la diagnosi istopatologica. Può sembrare superfluo farlo in questa sede, ma forse giova ricordare che la maggior parte dei parametri irrinunciabili per un corretto inquadramento prognostico e terapeutico (istotipo, grading, angioinvasione, stato linfonodale, ecc.), vengono rilevati su base puramente morfologica (preparati colorati con ematossilina-eosina e osservati al microscopio da un anatomopatologo esperto). Le considerazioni fin qui riportate, unitamente a quelle puramente etiche e deontologiche, appaiono sufficientemente rilevanti per stimolare l'impegno a migliorare la fase pre-analitica, prevenendo la comparsa di fenomeni autolitici che compromettono irreversibilmente l'analisi morfologica del tessuto (figura 13).

Nell'ambito della collaborazione tra chirurghi ed anatomopatologi, come verrà richiamato anche successivamente, si potrebbe, ad esempio, prevedere di evitare l'invio di campioni a ridosso del fine settimana, o riuscire a programmare e raggruppare interventi simili nella stessa seduta operatoria, con l'organizzazione di un invio immediato dei pezzi operatori al Laboratorio di Anatomia Patologica di riferimento. Lo *statement* viene approvato all'unanimità.

**Figura 13. A destra: lobulo mammario in sfacelo autolitico da ritardo di fissazione. Ogni dettaglio morfologico è compromesso. A sinistra: lobulo mammario fissato adeguatamente.**



---

## 10. Per i pezzi operatori, specialmente se voluminosi, è necessario facilitare la penetrazione della formalina frazionando il campione in più segmenti attraverso procedure concordate tra anatomopatologi e chirurghi, anche mediante brevi periodi di addestramento

L'abbondante componente adiposa dei tessuti mammari costituisce un fattore di rallentamento della penetrazione della formalina; pertanto, nel caso di pezzi operatori voluminosi, è necessario che questa venga accelerata mediante apposite incisioni o suddivisioni in frazioni meno voluminose<sup>(50)</sup>. È noto infatti che la parte centrale di campioni chirurgici mammari con diametro  $\geq$  a 5 cm può non essere fissata anche dopo 24 ore di permanenza in formalina<sup>(51)</sup>, divenendo quindi preda dei fenomeni autolitici.

I tagli atti a facilitare la fissazione devono essere concordati in precedenza tra i chirurghi che li eseguiranno e gli anatomopatologi che riceveranno i pezzi operatori così manipolati.

Poiché la fissazione del pezzo operatorio in formalina deve essere avviata immediatamente (al massimo entro 30 minuti dal prelievo), si possono suggerire le seguenti condotte operative:

- se il Laboratorio di Anatomia Patologica è vicino alla sala operatoria, il pezzo appena prelevato deve essere inviato immediatamente ed allo stato "fresco";
- in caso contrario, è preferibile che il personale medico della sala operatoria esegua personalmente le operazioni di orientamento, inchiostratura, incisione e immersione in formalina dopo un breve periodo di addestramento sotto la guida di un anatomopatologo;
- resta confermato che, ove le condizioni logistiche e organizzative lo consentono, è auspicabile la presenza in sala chirurgica di un anatomopatologo per una consulenza diretta sul prelievo e sulla gestione del pezzo operatorio.

Rispetto allo *statement* originario, il Consensus Group ha discusso ed approvato all'unanimità l'inserimento della seguente precisazione: "anche mediante brevi periodi di addestramento", effettuati da anatomopatologi al personale medico addetto alla sala operatoria (che ha una visione globale della malattia e procede alla resezione del pezzo operatorio), mentre non si ritiene opportuno coinvolgere in questo delicato compito personale paramedico, anche se esperto.

---

## 11. Al fine di evitare problemi di ipo- o iper-fissazione del campione è necessario annotare sulla richiesta d'esame l'ora della sua immersione in formalina

Per le motivazioni già ricordate e per quelle riportate negli *statements* successivi, la conoscenza esatta del tempo di permanenza in fissativo, previa indicazione dell'ora di immersione in formalina nel modulo che accompagna il campione (attualmente non richiesta), può rivelarsi di estrema utilità per consentire all'anatomopatologo la gestione ottimale del preparato, la scelta dei metodi di smascheramento più adeguati e per dedurre lo stato di fissazione a seconda della volumetria del campione<sup>(52)</sup>.

Lo *statement* viene approvato all'unanimità.

---

## 12. Il tempo minimo di fissazione in formalina dei prelievi agobiopsici deve essere di almeno 6-8 ore

In teoria, considerando la velocità di penetrazione della formalina ( $\approx$  1mm/ora), un frustolo di tessuto prelevato tramite agobiopsia del diametro di 2 millimetri verrà fissato in un'ora. In realtà, come già osservato in precedenza, per permettere la formazione dei ponti metilenici tra le proteine non basta la semplice permeazione del tessuto, ma occorre un tempo maggiore (fino alle 24 ore)<sup>(53-54)</sup>. L'esperienza pratica suggerisce che un buon compromesso è rappresentato da una permanenza del frustolo nel liquido fissativo per 6-8 ore per la fissazione e lo sviluppo di un'adeguata rete di ponti metilenici.

Per i laboratori con esigenze particolari, la fissazione può essere accelerata con altri mezzi, per esempio ricorrendo agli ultrasuoni, portando i tempi a 5-10 minuti e con ottimi risultati sia sul piano della morfologia tissutale che delle reazioni immunohistochimiche<sup>(55)</sup>.

Lo *statement* viene approvato all'unanimità.

---

### 13. I tempi ottimali di fissazione in formalina dei pezzi operatori (quadrantectomie e mastectomie) devono essere contenuti tra 24 e 48 ore

In letteratura esiste una sostanziale unanimità nel ritenere che i tempi ottimali di fissazione in formalina dei pezzi operatori sono compresi tra 24 e 48 ore; il superamento di questo limite temporale potrebbe comportare problemi nell'esecuzione di alcuni test, come la FISH o altre metodiche molecolari. Lo *statement* viene approvato all'unanimità.

---

### 14. La permanenza in formalina per tempi troppo brevi (incompleta fissazione) interrompe il processo di fissazione (legami crociati) che prosegue ad opera dell'alcool (coagulazione) durante il processamento

I tessuti ipofissati in formalina, essendo dotati di un'insufficiente rete di ponti metilenici, sono particolarmente vulnerabili all'azione dell'alcool (reagente indispensabile per la disidratazione dei tessuti e per l'inclusione in paraffina). In queste condizioni, si realizza una post-fissazione alcolica che induce coagulazione delle proteine<sup>[48]</sup>; ne conseguono alterazioni morfologiche, anche per gli eventuali sovrapposti fenomeni autolitici e, soprattutto, una refrattarietà alle metodiche di smascheramento antigenico. Rispetto allo *statement* originario, il Consensus Group ha discusso ed approvato all'unanimità l'inserimento della seguente precisazione: "incompleta fissazione", sinonimo di ipofissazione.

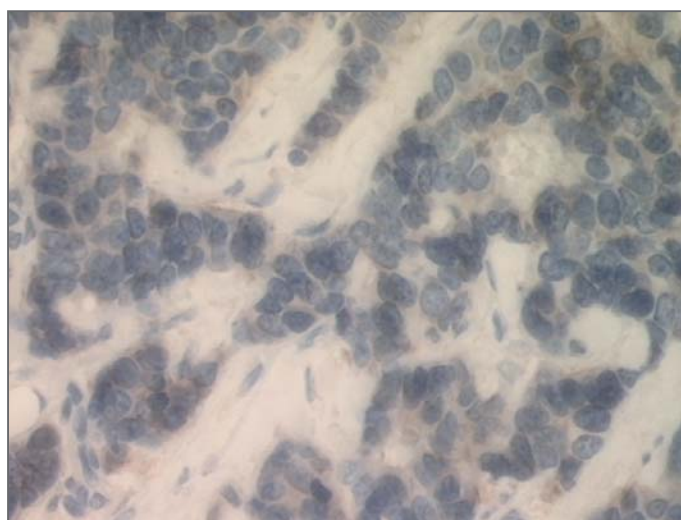
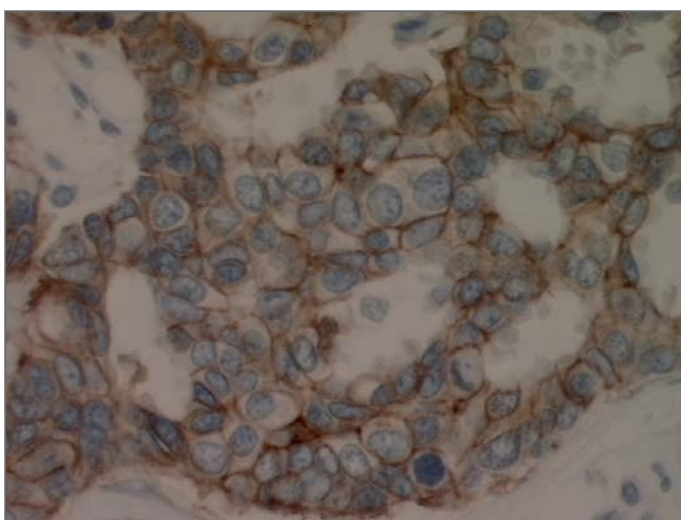
---

### 15. Le ipofissazioni condizionano la possibilità di risultati immunistochemici falsamente positivi per HER2

Gli effetti dannosi della incompleta fissazione sono molto evidenti per la valutazione immunistochemica del recettore HER2, come illustrato nelle figure 10 e 14.

Il Consensus Group approva all'unanimità lo *statement* sottolineando che la ipofissazione è una situazione più sfavorevole rispetto all'iperfissazione: infatti, mentre in quest'ultima condizione è pur sempre possibile un recupero antigenico con tecniche di smascheramento, nella prima l'espressione antigenica viene perduta irrimediabilmente.

**Figura 14. A sinistra: campione fissato per 2 ore con sovraespressione membranosa di HER2. A destra: campione proveniente dallo stesso tumore dopo fissazione per 36 ore (score 0) (immunoperoxidasi con anticorpo clone CB11).**



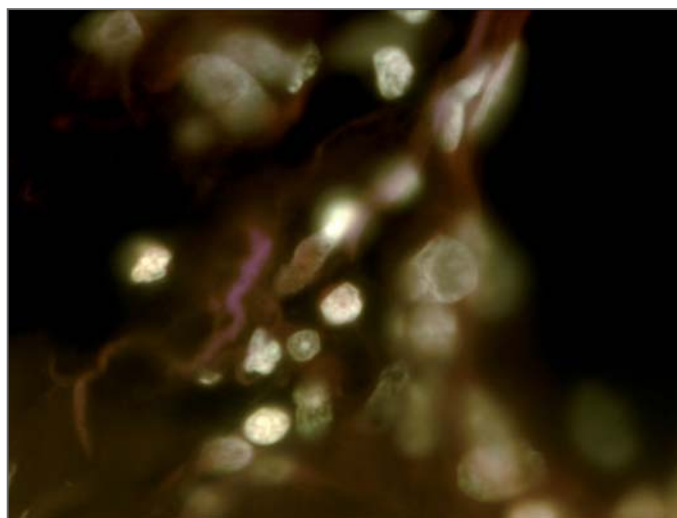
## 16. Le iperfissazioni (> 48 ore) compromettono l'interpretabilità della FISH

L'eccessivo protrarsi della fissazione (per più giorni) compromette l'indagine FISH, poichè i nuclei assumono una spiccata autofluorescenza che impedisce la visualizzazione dei segnali delle sonde (figura 15). Eseguendo la FISH per HER2 sui campioni dell'esperienza illustrato nello *statement* n. 6, si può osservare come la visibilità dei segnali di colore rosso (indicatori del locus cromosomiale gene-specifico) è massima intorno alle 36 ore di fissazione, mentre decade nettamente dopo 72 ore (figura 16). Per ottenere risultati perfettamente leggibili, la fissazione deve essere compresa tra le 12 e le 36 ore (figura 17).

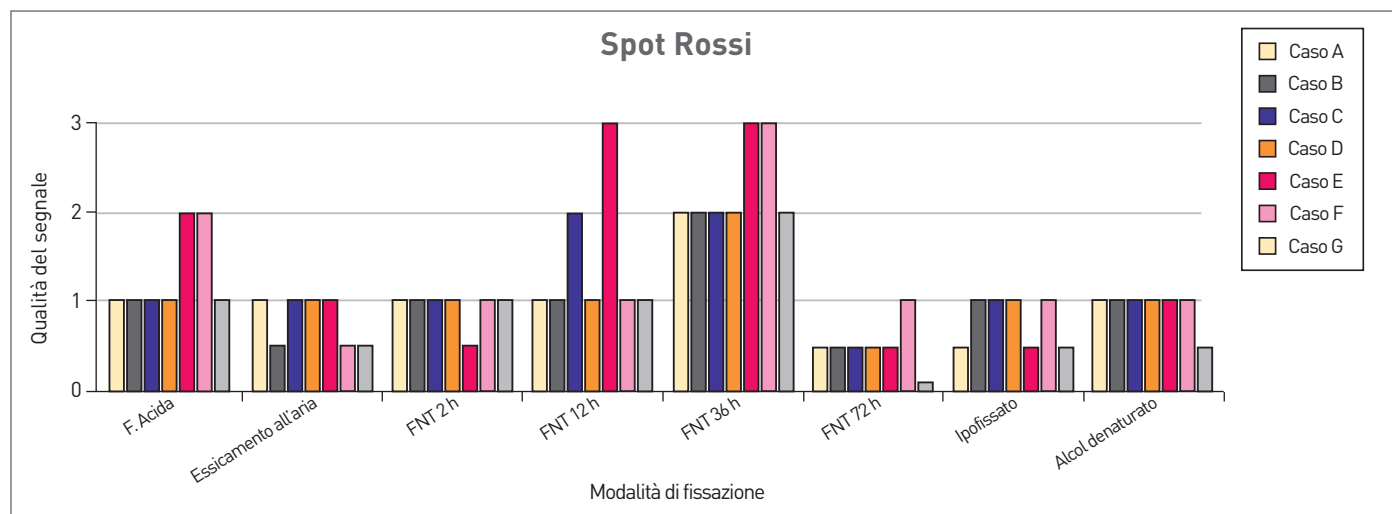
Rispetto allo *statement* originario, il Consensus Group ha discusso ed approvato all'unanimità la modifica del tempo di iperfissazione: da "**> 72 ore**" a "**> 48 ore**".

Lo *statement* viene approvato all'unanimità.

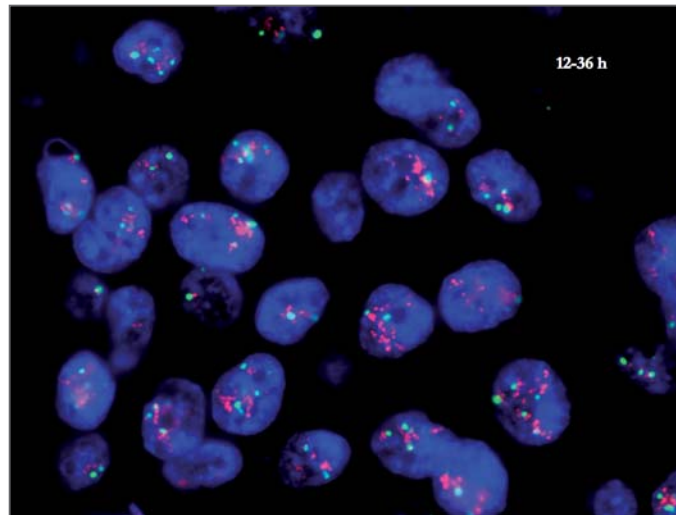
**Figura 15. Spiccata autofluorescenza nucleare da eccessiva permanenza in formalina.**



**Figura 16. Valutazione semiquantitativa della brillantezza e nitidezza dei segnali locus specifici (stessa neoplasia in diverse condizioni di fissazione).**



**Figura 17. Risultato ottimale in un preparato fissato tra le 12 e le 36 ore.**



---

### **17. I ritardi di fissazione possono influenzare il grado di differenziazione di un carcinoma**

È ormai accertato che le mitosi in atto nel tessuto neoplastico al momento della sua exeresi, se non raggiunte rapidamente dal fissativo, riescono a completare il loro ciclo divenendo non più rilevabili all'osservazione microscopica. Verosimilmente questo artefatto è alla base dell'eccessiva prevalenza di neoplasie di grado 2 che caratterizza molte delle nostre casistiche<sup>[8]</sup> e rappresenta, di fatto, una sottostadiazione<sup>[56]</sup> di tutti i carcinomi che subiscono un ritardo di fissazione.

Lo *statement* viene approvato all'unanimità.

---

### **18. I ritardi di fissazione possono essere alla base di notevole eterogeneità delle colorazioni immunohistochemiche per i recettori ormonali**

La lunga permanenza in fissativo aumenta il tasso di positività dei recettori ormonali, specialmente di quelli estrogenici, mentre la fissazione incompleta provoca eterogeneità della colorazione immunohistochemica, con relativa sottostima dello status ormonale<sup>[57]</sup>. Un fenomeno simile può essere trascurabile se si utilizzano anticorpi monoclonali molto sensibili, ma può essere fonte di erronea interpretazione dell'assetto ormonale se si utilizzano anticorpi poco sensibili.

Lo *statement* viene approvato all'unanimità.

## Conclusioni

I risultati dell'indagine conoscitiva, che costituisce parte integrante di questa *Consensus*, consentono di affermare che attualmente, nella nostra Regione, le conoscenze in tema di conservazione e fissazione dei tessuti neoplastici e le relative procedure sono eterogenee e carenti, soprattutto in riferimento all'uso della formalina.

È molto probabile che in un futuro non troppo lontano la formalina, utilizzata da oltre un secolo per la fissazione dei tessuti, verrà soppiantata da sostituti meno tossici e, parallelamente, dalla creazione delle banche tissutali crioconservate. È indubbio però che questa sostanza condizionerà ancora a lungo i criteri diagnostici e le metodologie in campo istopatologico e biopatologico, poiché sia il bagaglio culturale e professionale degli anatomopatologi che gli *standards* di riferimento dei laboratori sono inscindibilmente legati ai tessuti fissati in formalina. D'altro canto non va dimenticato che gli attuali archivi istopatologici, costituiti da tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina, costituiscono un patrimonio biologico di straordinario valore scientifico, in cui sono conservati tessuti neoplastici che racchiudono una vastissima gamma di informazioni di ordine epidemiologico, eziopatogenetico e molecolare, che dovremo custodire con la massima cura ed utilizzare proficuamente per studi retrospettivi.

Pertanto, sia la necessità di fornire caratterizzazioni biomolecolari attendibili ai fini dell'impostazione terapeutica per il singolo paziente, che considerazioni di più ampio respiro inerenti la disponibilità di materiale utile per la ricerca scientifica ed il progresso delle conoscenze in campo oncologico, impongono che i tessuti asportati a scopo diagnostico vengano conservati e fissati con la massima cura.

I Partecipanti a questa *Consensus* Regionale hanno discusso, riconosciuto e convalidato una serie di *statements* la cui implementazione nella pratica clinica quotidiana potrà sicuramente apportare sensibili miglioramenti alla situazione attuale. Non resta altro che augurarci che ciò avvenga.

1. **Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO.** Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer* 109:25-32, 2007
2. **Fadare OF and Tavassoli FA.** The phenotypic spectrum of basal-like breast cancer: a critical appraisal. *Adv Anat Pathol* 14:358-273, 2007
3. **Schnitt SJ.** Estrogen receptor testing of breast cancer in current clinical practice: what's the question? *J Clin Oncol* 24:1797-1799, 2006
4. **Dowsett M.** Estrogen receptor: methodology matters. *J Clin Oncol* 24:5626-5628, 2006
5. **Viale G, Regan MM, Maiorano E, Mastropasqua MG, Dell'Orto P, Rasmussen BB, Raffoul J, Neven P, Orosz Z, Braye S, Ohlschlegel C, Thürlimann B, Gelber RD, Castiglione-Gertsch M, Price KN, Goldhirsch A, Gusterson BA, Coates AS.** Prognostic and predictive value of centrally reviewed expression of estrogen and progesterone receptors in a randomized trial comparing letrozole and tamoxifen adjuvant therapy for postmenopausal women with early breast cancer: results from the BIG 1-98 Collaborative Groups. *J Clin Oncol* 25:3846-3852, 2007
6. **Yaziji H, Gown AM.** Accuracy and precision in HER2/neu testing in breast cancer: are we there yet? *Hum Pathol* 35:143-146, 2004
7. **Perez EA, Suman VJ, Davidson NE, Martino S, Kaufman PA, Lingle WL, Flynn PJ, Ingle JN, Visscher D, Jenkins RB.** HER2 testing by local, central, and reference laboratories in specimens from the North Central Treatment Group N9831 Intergroup Adjuvant Trial. *J Clin Oncol* 24:3032-3038, 2006
8. **Ross JS, Symmans WF, Pusztai L, Hortobagyi GN.** Standardizing slide-based assays in breast cancer: hormone receptors, HER2, and sentinel lymph nodes. *Clin Cancer Res* 13:2831-2835, 2007
9. **Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, Moreno A, Penault-Llorca F, Ruschoff J, Tomasic G, van de Vijver M.** Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines. *Mod Pathol* 16:173-182, 2003
10. **Ellis IO, Bartlett J, Dowsett M, Humphreys S, Jasani B, Miller K, Pinder SE, Rhodes A, Walker R.** Updated recommendations for HER2 testing in the UK. *J Clin Pathol* 57: 233-237, 2004
11. **Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists.** American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendation for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 25:118-145, 2007
12. **Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF. 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* 131:18-43, 2007
13. **Mathews AW.** Bad cancer tests drawing scrutiny. *Wall Street Journal*, January 4, 2008, pp B1-B2
14. **Walker RA.** Immunohistochemical markers as predictive tools for breast cancer. *J Clin Pathol.* 61:689-696, 2008
15. **Verma S, Clemons M.** First-line treatment options for patients with HER2 negative metastatic breast cancer: the impact of modern adjuvant chemotherapy. *Oncologist* 12:785-797, 2007
16. **Bonnetterre J, Buzdar A, Nabholz JM, Robertson JF, Thürlimann B, von Euler M, Sahnoud T, Webster A, Steinberg M; Arimidex Writing Committee; Investigators Committee Members.** Anastrozole is superior to tamoxifen as first-line therapy in hormone receptor positive advanced breast carcinoma. *Cancer* 92:2247-2258, 2001
17. **Mouridsen H, Gershanovich M, Sun Y, Perez-Carrion R, Boni C, Monnier A, Apffelstaedt J, Smith R, Sleeboom HP, Jaenicke F, Pluzanska A, Dank M, Becquart D, Bapsy PP, Salminen E, Snyder R, Chaudri-Ross H, Lang R, Wyld P, Bhatnagar A.** Phase III study of letrozole versus tamoxifen as first-line therapy of advanced breast cancer in postmenopausal women: analysis of survival and update of efficacy from the International Letrozole Breast Cancer Group. *J Clin Oncol* 21:2101-2109, 2003
18. **Paridaens R, Therasse P, Dirix L, Beex L, Piccart M, Cameron D, Cufer T, Roozendaal K, Nooij M, Mattiacci MR.** First line hormonal treatment for metastatic breast cancer with exemestane or tamoxifen in postmenopausal patients. A randomized phase III trial of the EORTC Breast Group. *Proc Am Soc Clin Oncol* 23:6 (Abstract 515), 2004
19. **Mauri D, Pavlidis N, Polyzos NP, Ioannidis JP.** Survival with aromatase inhibitors and inactivators versus standard hormonal therapy in advanced breast cancer: meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 98:1285-1291, 2006
20. **Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L.** Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344:783-792, 2001
21. **Marty M, Cognetti F, Maraninchi D, Snyder R, Mauriac L, Tubiana-Hulin M, Chan S, Grimes D, Antón A, Lluch A, Kennedy J, O'Byrne K, Conte P, Green M, Ward C, Mayne K, Extra JM.** Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group. *J Clin Oncol* 23:4265-4274, 2005
22. **Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ, 10th St. Gallen conference.** Progress and Promise: Highlights of the International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2007. *Ann Oncol* 18:1133-1144, 2007
23. **Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG).** Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 365:1687-1717, 2005
24. **Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination (ATAC) Trialists' Group, Forbes JF, Cuzick J, Buzdar A, Howell A,**

- Tobias JS, Baum M.** Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 100-month analysis of the ATAC trial. *Lancet Oncol* 9:45-53, 2008
- 25. Coombes RC, Kilburn LS, Snowdon CF, Paridaens R, Coleman RE, Jones SE, Jassem J, Van de Velde CJ, Delozier T, Alvarez I, Del Mastro L, Ortmann O, Diedrich K, Coates AS, Bajetta E, Holmberg SB, Dodwell D, Mickiewicz E, Andersen J, Lønning PE, Cocconi G, Forbes J, Castiglione M, Stuart N, Stewart A, Fallowfield LJ, Bertelli G, Hall E, Bogle RG, Carpentieri M, Colajori E, Subar M, Ireland E, Bliss JM; Intergroup Exemestane Study.** Survival and safety of exemestane versus tamoxifen after 2-3 years' tamoxifen treatment (Intergroup Exemestane Study): a randomised controlled trial. *Lancet* 369:559-570, 2007
- 26. Breast International Group (BIG) 1-98 Collaborative Group, Thürlimann B, Keshaviah A, Coates AS, Mouridsen H, Mauriac L, Forbes JF, Paridaens R, Castiglione-Gertsch M, Gelber RD, Rabaglio M, Smith I, Wardley A, Price KN, Goldhirsch A.** A comparison of letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer. *N Engl J Med.* 353:2747-2757, 2005
- 27. Viani GA, Afonso SL, Stefano EJ, De Fendi LI, Soares FV.** Adjuvant trastuzumab in the treatment of HER2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials. *BMC Cancer* 7:153, 2007
- 28. 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* 94:852-854, 2002
- 29. Roche PC, Suman VJ, Jenkins RB, Davidson NE, Martino S, Kaufman PA, Addo FK, Murphy B, Ingle JN, Perez EA.** Concordance between local and central laboratory HER2 testing in the breast intergroup trial N9831. *J Natl Cancer Inst* 94:855-857, 2002
- 30. Puchtler H, Meloan SN.** On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. *Histochemistry* 84:201-204, 1985
- 31. Vacca LL.** Laboratory manual of histochemistry. Raven Press, New York, 1985, pp 62-70
- 32. Woods AE, Ellis RC.** Laboratory histopathology. A complete reference. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1994, section 4.1
- 33. Ruco L, Scarpa A.** Anatomia Patologica – Le basi. UTET, Torino, 2007, pp 51-52
- 34. Mariuzzi GM.** Anatomia Patologica e correlazioni anatomo-cliniche. Piccin-Nuova Libreria, Padova, 2006, pp 55-56
- 35. Bonucci E.** Manuale di istochimica. Lombardo Editore, Roma, 1981, pp 3-18
- 36. Hayat MA.** Principles and techniques of electron microscopy. Van Nostrand Reinhold Co., New York, 1970, pp 84-90
- 37. Rodriguez-Martinez HA, Santos-Estrada L, Rosales MM, Cruz-Ortiz H.** Formol o formalina al diez por ciento? *Patologia (Mexico)* 9:223-231, 1971
- 38. Melis M, Carpino F, Di Tondo U.** Tecniche di Anatomia Patologica. Edi Ermes, Milano, 1989, pp 191-204
- 39. Rosai J.** Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. Mosby, Edinburgh, 2004, pp 27-29
- 40. Beccari N, Mazzi V.** Manuale di tecnica microscopica. Casa Editrice Dr. Francesco Vallardi Società Editrice Libreria, Milano, 1972 pp 31-49
- 41. Bancroft JD, Gamble M.** Theory and practice of histological techniques. Churchill Livingstone, London, 2002, pp 63-84
- 42. Montaldo G.** Manuale di tecnica istopatologica. Edizioni Minerva Medica, Torino, 1973, pp 75-91
- 43. Burck HC.** Tecnica istologica. Editrice Internazionale "Arti e Scienze", Roma, 1977, pp 38-40
- 44. Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP.** Formaldehyde fixation. *J Histochem Cytochem* 33:845-853, 1985
- 45. Rosen PP.** Electrocautery instruments have been used routinely for the excision of tissue from the urinary bladder, prostate gland, and other sites for many years. *Ann Surg* 204:612-613, 1986
- 46. Cavaliere A, Sidoni A, Scheibel M, Bellezza G, Brachelente G, Vitali R, Bucciarelli E.** Biopathologic profile of breast cancer core biopsy: is it always a valid method? *Cancer Lett* 218:117-121, 2005
- 47. Titford ME, Horenstein MG.** Histomorphologic assessment of formalin substitute fixatives for diagnostic surgical pathology. *Arch Pathol Lab Med* 129:502-506, 2005
- 48. Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H.** Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 24:1016-1019, 2000
- 49. Zsikla V, Baumann M, Cathomas G.** Effect of buffered formalin on amplification of DNA from paraffin wax embedded small biopsies using real-time PCR. *J Clin Pathol* 57:654-656, 2004
- 50. Provenzano E, Pinder SE.** Guidelines for the handling of benign and malignant surgical breast specimens. *Curr Diagn Pathol* 13:96-105, 2007
- 51. Ruban EP, Sumnall W, Stephens M.** Breast biopsy specimen fixation. *J Clin Pathol* 45:743-744, 1992
- 52. Start RD, Layton CM, Cross SS, Smith JH.** Reassessment of the rate of fixative diffusion. *J Clin Pathol.* 45:1120-1121, 1992
- 53. Ellis IO, Humphreys S, Michell M, Pinder SE, Wells CA, Zakhour HD; UK National Coordinating Committee for Breast Screening Pathology; European Commission Working Group on Breast Screening Pathology. Best Practice No 179.** Guidelines for breast needle core biopsy handling and reporting in breast screening assessment. *J Clin Pathol* 57:897-902, 2004
- 54. Goldstein NS, Ferkowicz M, Odish E, Mani A, Hastah F.** Minimum formalin fixation time for consistent estrogen receptor immunohistochemical staining of invasive breast carcinoma. *Am J Clin Pathol* 120:86-92, 2003
- 55. Chu WS, Furusato B, Wong K, Sesterhenn IA, Mostofi FK, Wei MQ, Zhu Z, Abbondanzo SL, Liang Q.** Ultrasound-accelerated formalin fixation of tissue improves morphology, antigen and mRNA preservation. *Mod Pathol* 18:850-863, 2005
- 56. Start RD, Flynn MS, Cross SS, Rogers K, Smith JH.** Is the grading of breast carcinomas affected by a delay in fixation? *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 419:475-477, 1991
- 57. Oyama T, Ishikawa Y, Hayashi M, Arihiro K, Horiguchi J.** The effects of fixation, processing and evaluation criteria on immunohistochemical detection of hormone receptors in breast cancer. *Breast Cancer* 14:182-188, 2007









