

Le metodiche ISH vanno comunque eseguite su tutti i casi 2+ (o "equivoci" secondo le linee guida) all'analisi immunohistochimica o su richiesta del medico curante.

La CISH è una metodica ampiamente validata che presenta un'elevata concordanza con la FISH.

La metodica SISH, sviluppata più recentemente, ha ottenuto risultati sovrapponibili a quelli della CISH. La SISH può essere quindi utilizzata nella determinazione dell'amplificazione di HER2.

#### Quando e su quali campioni effettuare il test

FISH/CISH/SISH possono essere efficacemente impiegati su preparati istologici fissati in formalina neutra tamponata.

FISH/CISH rappresentano la metodica di elezione per preparati citologici (convenzionali o in monostrato) di lesioni metastatiche.

Non vi sono ancora procedure standardizzate per la SISH su preparati citologici. L'impiego di fissativi diversi dalla formalina neutra tamponata richiede sempre adeguata validazione dei risultati.

I tessuti fissati in Bouin o decalcificati non sono adeguati per la valutazione dell'amplificazione di HER2.

#### Come si effettua la metodica

E' necessario acquisire competenze che consentano di adattare alle variabili pre-analitiche i reattivi e i protocolli dei kit commerciali per FISH/CISH/SISH. Eventuali modifiche delle metodiche devono essere accuratamente validate su casi con stato di HER2 noto.

#### FISH - L'interpretazione dei risultati

Si raccomanda di valutare non meno di 20 cellule/campo in almeno 2 campi della componente invasiva identificata sulla sezione in E/E.

I preparati citologici vanno esaminati interamente.

E' opportuno esaminare il preparato allestito con la FISH sulla base della reattività dell'IIC.

Non è raro il riscontro di eterogeneità nella iperespressione/amplificazione di HER2 nei tumori mammari. In caso di popolazione neoplastica eterogenea è opportuno riportare la percentuale di cellule in cui il gene risulta amplificato. Tutti i tumori valutati in prima istanza con ISH e con quota di cellule neoplastiche amplificate pari o inferiore al 10% devono essere ristestati con tecniche di IIC.

E' opportuno aggiungere nel referto la percentuale di cellule con amplificazione del gene (ratio >2 o numero di copie HER2 >6 o cluster), anche se inferiore al 10%.

Nei casi con rapporto gene/cromosoma 17 compreso tra 1,8-2,2, la conta dovrebbe essere ripetuta dallo stesso o da un secondo osservatore.

In alternativa la reazione dovrebbe essere effettuata su altre sezioni o, se disponibile, su una diversa inclusione della neoplasia.

E' auspicabile documentare il risultato delle indagini con una immagine fotografica digitale. È auspicabile l'istituzione di un database nazionale, per la registrazione di tutti i casi con iperespressione/amplificazione focale riscontrati dall'1-6-2010 all'1-6-2011 per valutare incidenza, caratterizzazione biologica, prognosi, programmazione studi clinici.

#### CISH/SISH - L'interpretazione dei risultati

Si deve esaminare tutta la sezione a 20x.

Nel caso in cui si rilevi omogeneità di segnale, selezionare almeno 2 campi della neoplasia infiltrante e valutarli ad alto ingrandimento, evitando le aree periferiche della sezione.

I preparati citologici vanno esaminati interamente.

In caso di sicura amplificazione (>10 segnali o clusters) o non amplificazione (1-4 segnali), 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 maggior ingrandimento (63x o 100x) contando almeno 40 cellule.

È opportuno determinare la media dei segnali CEP17 e la media dei segnali HER2 osservati nelle due sezioni consecutive.

E' opportuno esaminare il preparato allestito con la CISH sulla base della reat-

tività dell'IIC. Nei casi eterogenei si può esprimere il risultato anche come percentuale di cellule amplificate.

#### Polisomia

Il tumore è considerato polisomico quando la media delle copie del centromero 17 è  $\geq 3$ .

La vera polisomia del cromosoma 17 è un evento molto raro.

La presenza di un numero di segnali >2 del centromero del 17 è quasi sempre causata da gain o da amplificazione di tale regione e non da polisomia

In questi casi, onde evitare sottostime della amplificazione di HER2, si deve considerare amplificato il tumore che mostri un valore medio >6 copie del gene per cellula, o clusters. Il referto deve includere la dizione "non amplificato" o "amplificato" e la giustificazione (ratio  $\geq 2$  per i casi disomici, o >6 copie del gene o clusters di HER2 nei casi apparentemente polisomici).

#### Chi valuta il risultato

L'interpretazione dei risultati relativi allo stato di HER2 deve essere effettuata da personale con consolidata esperienza in patologia mammaria e nelle procedure utilizzate. I dati devono essere integrati nel referto istopatologico e la loro congruità garantita dal Patologo.

#### Controllo di qualità

E' opportuno utilizzare controlli positivi esterni di reazione periodicamente e, comunque, a ogni cambio di lotto del kit.

E' opportuna l'implementazione di programmi di VEQ per FISH/CISH/SISH su base regionale, nazionale o sovra-nazionale.

#### Centri di riferimento

La limitata esperienza nelle procedure e/o la valutazione di un esiguo numero di casi/anno deve indurre a considerare la centralizzazione dei test presso un laboratorio di riferimento.

#### Referenze bibliografiche

Downs-Kelly E et al. Am J Surg Pathol 2005;29:1221-1227.

Gong Y et al. Cancer. 2005 May 1;103(9):1763-9.

Ménard S et al. Biologic and therapeutic role of HER2 in cancer. Oncogene, 2003; 22: 6570-78.

Sauter G et al. J Clin Oncol, 2009; 27: 1323-1333.

Vance GH et al. Arch Pathol Lab Med. 2009;133(4):611-612.

Wolff AC et al. J Clin Oncol 2007; 25: 118-145.

# Raccomandazioni sui requisiti minimi e gli standard di refertazione e sull'utilizzo di metodiche per la determinazione dello stato di HER2 nel carcinoma mammario

## A cura del gruppo di lavoro AIOM-SIAPEC-IAP

Vincenzo Adamo (Messina), Oscar Bertetto (Torino), Generoso Bevilacqua (Pisa), Roberto Bordonaro (Catania), Antonino Carbone (Aviano-PN), Emanuele D'Amore (Vicenza), Marco Danova (Pavia), Sabino De Placido (Napoli), Angelo Paolo Dei Tos (Treviso), Lucia Del Mastro (Genova), Nicola Gebbia (Palermo), Annunziata Gloghini (Milano), Stefania Gori (Perugia), Stefano Iacobelli (Chieti), Michele De Laurentis (Napoli), Vito Lorusso (Lecce), Eugenio Maiorano (Bari), Annamaria Molino (Verona), Filippo Montemurro (Torino), Oscar Nappi (Napoli), Cecilia Nisticò (Roma), Carmine Pinto (Bologna), Anna Sapino (Torino), Gianluigi Taddei (Firenze), Mauro Truini (Genova), Giovanni Tuccari (Messina), Marco Venturini (Verona), Giuseppe Viale (Milano)



# Raccomandazioni sui requisiti minimi e gli standard di refertazione e sull'utilizzo di metodiche per la determinazione dello stato di HER2 nel carcinoma mammario

L'identificazione dei carcinomi della mammella che mostrano l'iperespressione o amplificazione del gene HER2 e che, quindi, sono potenzialmente responsivi a terapie *targeted*, si basa su accertamenti di laboratorio che devono essere accurati e riproducibili. Lo stato del gene HER2 è determinato correntemente mediante metodo immunostochimico, che consente di evidenziare la eventuale iperespressione della proteina codificata da HER2 e/o mediante ibridazione in situ (ISH) che verifica la presenza o assenza di amplificazione genica. Attualmente l'ibridazione in situ fluorescente (FISH) è la tecnica di riferimento per la determinazione della amplificazione del gene HER2. Malgrado siano stati ottenuti significativi progressi nell'aumentare la riproducibilità e l'accuratezza della determinazione dello stato di HER2 nella pratica clinica routinaria, l'imprecisione nel test rimane ancora oggi un aspetto cruciale sia per quanto riguarda l'approccio immunostochimico che quello con FISH.

In questo ambito è stato intrapreso un percorso già da diversi anni dal gruppo di lavoro AIOM-SIAPEC, nel corso dei vari Consensus Workshop - Palermo (2007), Taormina (2008), Paestum (2009) e Catania (2010) - culminato con la messa a punto di raccomandazioni per la determinazione dello stato di HER2 nel carcinoma della mammella, unitamente alla definizione di requisiti minimi di refertazione e standardizzazione dello stesso tumore.

## Requisiti minimi e standard di refertazione

### Campionamento della neoplasia

Da ogni neoplasia della mammella si devono ottenere non meno di 3 inclusioni in paraffina se le dimensioni del tumore lo consentono.

### Stato dei margini

Per la valutazione dei margini il campione va chinato.

La valutazione dei margini va eseguita macroscopicamente con conferma istologica del margine più vicino, indicando la distanza in mm.

Nel caso di infiltrazione visibile solo istologicamente si deve riportare se la medesima è focale o estesa (>1 di campo a 4x).

### Focolai multipli

Il termine "multicentrico" o "multifocale" deve essere sostituito con il termine "multiplo".

Tumori multipli nettamente separati da parenchima normale vanno campionati con le stesse modalità utilizzate per le neoplasie singole.

Focolai multipli di invasione insorti su un carcinoma duttale in situ vanno considerati come lesione singola.

### Refertazione

Il referto deve includere tutti gli 8 parametri prognostico/predittivi identificati dal Consenso di St. Gallen. L'inclusione nel referto di parametri aggiuntivi non è attualmente raccomandata.

Parametri San Gallen

- Tipo istologico (sec. WHO 2003)
- Diametro del tumore
- Grado
- Invasione vascolare
- Stato linfonodale
- Assetto recettori ormonali
- HER2
- Ki67.

### Tipo istologico

La neoplasia deve essere classificata in accordo al tipo istologico previsto da OMS.

### Diametro del tumore

La dimensione del tumore è quella macroscopica, a meno che non venga indicata nel referto istologico una diversa dimensione microscopica.

In tumori con nodi multipli si misura e si stadia (T) il nodo di diametro maggiore; le dimensioni degli altri nodi vanno comunque riportate.

Il patologo deve garantire la massima accuratezza nella identificazione e nella misurazione della componente invasiva nei carcinomi mammari di piccole dimensioni (minori o uguali a cm. 1,0), specificandone anche il diametro massimo istologico.

La presenza di iperespressione/amplificazione di HER2 è associata a prognosi peggiore anche nei tumori T1 di piccole dimensioni (pT1a-b) pN0; il trattamento adiuvante con target therapy potrebbe essere efficace anche in pazienti con tumore mammario HER2-positivo di dimensioni pari od inferiori ad 1 cm. La valutazione dello stato di HER2 (oltre che degli altri parametri prognostico-predittivi) nei carcinomi di piccole dimensioni, anche microinvasivi, deve essere limitata alla componente infiltrante.

La valutazione dell'amplificazione del gene nei carcinomi di piccole dimensioni è facilitata dall'impiego di reazioni di ibridazione in situ in campo chiaro (CISH/SISH).

### Grado

Il grado istologico deve essere valutato secondo i criteri di Elston & Ellis, ed applicato a tutti i carcinomi della mammella. Per le agobiopsie, si suggerisce di utilizzare i sistemi di grading nucleare quando non è possibile valutare in modo adeguato il grado di Elston & Ellis.

### Invasione vascolare

La presenza o meno di invasione vascolare peritumorale deve essere indicata, e definita "estesa", se identificata in 2 o più inclusioni della stessa neoplasia.

### Diagnosi su linfonodo sentinella

E' opportuno indicare il protocollo utilizzato per la valutazione del linfonodo sentinella.

La diagnosi morfologica su linfonodo sentinella deve essere riportata secondo la definizione TNM.

### Stato linfonodale

Lo stato linfonodale, comprendente il numero di linfonodi esaminati e delle eventuali metastasi, deve essere sempre riportato nel referto.

### Stadiazione TNM

La stadiazione TNM deve essere sempre riportata.

### Referto del carcinoma in situ

Nelle neoplasie in situ va indicato il tipo istologico, il grado nucleare, la presenza di necrosi comedonica e la relativa classificazione DIN/LIN

Per la definizione dell'estensione e dei margini il campione chirurgico va incluso in toto a meno di non disporre di studio radiologico del pezzo.

### Scelta del campione per la determinazione dei fattori prognostico predittivi

E' necessario che l'inclusione scelta per la determinazione dei parametri biologici includa anche parenchima mammario non neoplastico in tutti i casi in cui ciò sia possibile.

La valutazione dei parametri biologici (assetto recettoriale, stato di HER2 e Ki67) deve essere effettuata anche sulle biopsie pre-operatorie se è prevista terapia neo-adiuvante e sulle biopsie di recidive e metastasi. Nel caso di neoplasie multiple, la determinazione dei parametri biologici va effettuata su tutte le lesioni solo se di diverso istotipo o grado.

### Determinazione sulle neoplasie in situ fattori prognostico predittivi

La determinazione dell'assetto recettoriale (ER/PR) deve essere effettuata anche sulle neoplasie intraduttali.

### Determinazione dei recettori ormonali

Il referto deve riportare il clone utilizzato per la determinazione immunocitochimica dei recettori.

La valutazione dell'assetto dei recettori ormonali deve essere espressa in valori percentuali indipendentemente dalla intensità di colorazione.

La valutazione dell'assetto recettoriale deve corrispondere alla espressione media di recettori dell'intera sezione esaminata.

Il controllo positivo interno deve mostrare una colorazione eterogenea 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 ad una scarsa sensibilità della reazione. Le cellule mioepiteliali e le cellule stromali rappresentano un utile controllo negativo interno: una loro colorazione, per quanto debole, è segno di specificità della reazione.

### Determinazione dell'indice di proliferazione (Ki67)

Ki67 va determinato in ogni carcinoma primitivo invasivo della mammella.

La valutazione della frazione di cellule proliferanti dovrebbe essere espressa come percentuale di cellule positive per Ki67 indipendentemente dalla intensità di colorazione e deve essere effettuata alla periferia della neoplasia su più campi non selezionati.

### Determinazione di HER2

L'iperespressione/amplificazione di HER2 deve essere valutata in ogni carcinoma invasivo mammario primitivo all'atto della prima diagnosi o della recidiva (per le metodiche vedi sotto).

### Integrazione dei parametri morfologici e biologici

Il patologo è responsabile della congruità dei parametri diagnostici, prognostici e predittivi.

### Controlli di qualità

E' fortemente raccomandata la partecipazione a programmi di controllo esterno della qualità (VEQ) per la determinazione di ER, PR, HER2 e Ki67.

### Integrazione nei nomenclatori/tariffari

E' necessario il riconoscimento della determinazione dei parametri biologici nel nomenclatore/tariffario.

## Valutazione di HER2

### Quando e su quali campioni effettuare il test?

La determinazione dello stato di HER2 deve essere effettuata sempre al momento della diagnosi sul tumore primario.

In presenza di progressione di malattia la determinazione va effettuata sulla lesione metastatica, se disponibile, o sul tumore primario (se non precedentemente effettuata secondo gli attuali standard).

Qualora siano disponibili solo preparati citologici non inclusi, si raccomanda l'utilizzo di FISH/CISH come metodo di determinazione.

### Modalità e tempi di fissazione dei campioni tessutali

I campioni tessutali da sottoporre a valutazione dello stato di HER2 devono essere fissati in formalina neutra tamponata al 10%, a meno che l'uso di fissativi alternativi sia stato validato presso l'istituzione stessa.

E' necessario mettere in opera tutte le procedure atte a garantire l'immediata, adeguata e completa fissazione, anche attraverso la rivisitazione delle procedure che possono coinvolgere altri operatori. Il tempo di fissazione ottimale in formalina è compreso fra le 8 h e le 48 h, in relazione alla tipologia del campione.

### Con quale metodica effettuare il test

L'immunostochimica è la metodica più comunemente utilizzata come valutazione di primo livello. Le metodiche ISH vengono prevalentemente utilizzate per l'accertamento dell'eleggibilità alla terapia con trastuzumab nei casi con immunoreattività 2+, e/o quando richiesto dal curante nell'appropriato contesto clinico.

## IIC

### Come effettuare il test IIC

Kit standardizzati o anticorpi policlonali e monoclonali referenziati (nel

contesto di una procedura tecnica validata) possono essere attualmente utilizzati per la determinazione dello stato di HER2.

### Letture del preparato IIC

E' opportuno valutare l'intera neoplasia infiltrante, evitando campi periferici o con artefatti morfologici.

In presenza di frequente immunoreattività (2+) in strutture duttulo-lobulari normali, la procedura va nuovamente standardizzata (con particolare riferimento a tempi e modalità di fissazione). Non è raro il riscontro di eterogeneità nella iperespressione/amplificazione di HER2 nei tumori mammari. In questi casi se la frazione di cellule positive infiltranti è pari o inferiore al 10%, la paziente non è candidata al trattamento con *targeted therapy* (risultato negativo per FDA/EMA/AIFA; equivoco per ASCO/CAP).

Prima di escludere la paziente dal possibile beneficio del trattamento è necessario che lo stato di HER2 venga accuratamente rivalutato con ulteriori colorazioni immunostochimiche e/o con tecniche di ibridazione in situ.

Quando si sia evidenziata iperespressione/amplificazione in <10% cellule in una inclusione, è raccomandato di testare ulteriori inclusioni della neoplasia primaria e/o delle eventuali metastasi linfonodali.

Tutti i tumori con quota di cellule neoplastiche HER2 3+ IIC pari o inferiore al 10% devono essere ritestati con tecniche di ibridazione in situ.

### Refertazione

Lo stato di HER2 deve essere espresso mediante lo scoring system (0, 1+, 2+, 3+) e, possibilmente, anche con la valutazione descrittiva che tenga conto della percentuale di cellule positive e della completezza ed intensità della colorazione di membrana.

Nel referto vanno riportati i dati salienti della procedura analitica impiegata.

### Correlazioni dei test IIC vs FISH

E' opportuno che ciascun laboratorio provveda a validare una quota parte della casistica valutata in IIC con FISH/CISH, ottenendo una concordanza non inferiore al 90% nei casi 3+.

### Controlli di qualità

E' necessario che ogni laboratorio includa sezioni o linee cellulari di controllo positivo (3+) e negativo (0, 1+) in ogni sessione di colorazione. La valutazione dell'immunoreattività dei controlli deve precedere quella dei campioni in esame.

E' necessario pianificare la verifica periodica (annuale/semestrale) del tasso di positività IIC per HER2 nei casi testati localmente (percentuale attesa di casi con iperespressione di HER2 2+/3+ = 15-20% dei casi di carcinoma mammario primitivo).

L'uso sporadico delle procedure e/o la valutazione di un limitato numero di casi/ anno deve indurre a considerare la centralizzazione dei test presso un laboratorio di riferimento.

E' opportuna l'adesione a programmi di VEQ per IIC su base regionale, nazionale o sovra-nazionale.

### Nomenclatore tariffario

E' necessario provvedere con urgenza all'inclusione della valutazione IIC di HER2 nel nomenclatore tariffario.

### Chi valuta il risultato IIC

L'interpretazione dei risultati relativi allo stato di HER2 deve essere effettuata da personale con consolidata esperienza in patologia mammaria e nelle procedure utilizzate. I dati devono essere integrati nel referto istopatologico e la loro congruità garantita dal Patologo responsabile.

## ISH

Le metodiche di ibridazione in Situ-ISH sono, come precedentemente specificato, utilizzate per confermare i casi equivoci in IIC, ma possono essere ugualmente impiegate come valutazione di primo livello per determinare lo stato di HER 2.