



	<p>REGIONE PIEMONTE AZIENDA OSPEDALIERO UNIVERSITARIA "MAGGIORE della CARITA'" – Novara <b>SC ANATOMIA PATOLOGICA</b> Direttore: Prof. Renzo Luciano Boldorini</p>	
<b>STANDARD DI SERVIZIO</b>		

## INDICE

PRESENTAZIONE SC ANATOMIA PATOLOGICA .....	2
LA MISSION:.....	2
ATTIVITA' DI ECCELLENZA.....	3
DIAGNOSTICA ISTOLOGICA DI ECCELLENZA .....	3
DATI DI ATTIVITA' .....	7
IMMUNOISTOCHEMICA.....	7
DATI DI ATTIVITA' .....	8
S.S. ONCOEMATOLOGIA E PATOLOGIA MOLECOLARE.....	8
DATI DI ATTIVITA' .....	10
CONTROLLI DI QUALITA' .....	10
PERCORSO DI CERTIFICAZIONE EUSOMA.....	10
ATTIVITÀ DI ROUTINE.....	11
DIAGNOSTICA ISTOLOGICA DI ROUTINE .....	11
DIAGNOSTICA CITOLOGICA.....	11
DATI DI ATTIVITA' .....	12
ATTIVITA' AUTOPTICA.....	12
ATTIVITA' DIDATTICA, ATTIVITA' DI RICERCA E COLLABORAZIONI .....	12
PROGETTI DI MIGLIORAMENTO .....	13
ACCESSIBILITA' E TEMPI DI ATTESA .....	13



## PRESENTAZIONE SC ANATOMIA PATOLOGICA

Il laboratorio di Anatomia Patologica è una struttura complessa a direzione universitaria, il cui responsabile, dal 2012 è il prof. Renzo Luciano Boldorini.

Opera all'interno del Dipartimento di Diagnosi e Cura dell'Azienda Ospedaliero Universitaria Maggiore della Carità di Novara e rappresenta il centro HUB di riferimento del quadrante del Piemonte Orientale.

Afferiscono alla struttura oltre 30.000 utenti/anno, incluse afferenze extra quadrante tramite specifiche convenzioni.

### LA MISSION:

Il laboratorio di Anatomia Patologica si occupa dell'attività di diagnostica istologica, citologica e autoptica tradizionale, e con il supporto di metodiche immunoistochimiche. Tale attività risulta completata e potenziata da settori ad alta specializzazione quale la S.S. Oncoematologia e Patologia Molecolare, con la garanzia di diagnosi sempre più accurate, fornendo fattori diagnostici, prognostici e predittivi della risposta terapeutica, secondo le attuali richieste specie in campo oncologico.

## ATTIVITA' DI ECCELLENZA

### DIAGNOSTICA ISTOLOGICA DI ECCELLENZA

La diagnostica istologica viene effettuata con l'ausilio di colorazioni istologiche ed istochimiche di routine, metodiche immunostochimiche e tecniche di biologia molecolare. Al nostro servizio pervengono annualmente circa 16000 campioni istologici relativi ad altrettanti pazienti.

Nell'ambito di tale diagnostica, il nostro laboratorio garantisce alcune attività di eccellenza:

- Valutazione del linfonodo sentinella nella patologia neoplastica della mammella attraverso metodica istologica tradizionale intraoperatoria in caso di terapia neoadiuvante e, dal 2011 mediante tecnica di biologia molecolare OSNA.
- Valutazione del linfonodo sentinella nel melanoma cutaneo.
- Centro di riferimento della patologia renale non neoplastica, con particolare riferimento alla trapiantologia.
- Patologia emopoietica e linfoproliferativa.
- Patologia polmonare a supporto della Chirurgia Toracica e della Pneumologia presenti presso il nostro Ospedale.
- Neuropatologia oncologica a supporto della Neurochirurgia presente presso il nostro Ospedale.
- Attività di screening: di 1° livello del carcinoma colo-rettale per la ricerca di lesioni piatte o poliploidi precursori e screening di 2° livello del carcinoma della mammella tramite effettuazione e valutazione di preparati agoaspirativi e microistologici (tru cut, core biopsy) di lesioni mammarie riscontrate al controllo mammografico.
- Tecnica chirurgica di MOHS e MOHS modificata Tubingen.
- Diagnostica istoenzimatica dei difetti di innervazione autonoma intestinale (MORBO DI HIRSCHSPRUNG).
- Indagini su tessuto in casi sospetti per sindrome di Lynch su tessuto neoplastico (proteine MMR in immunostochimica e instabilità microsatellitare con metodica molecolare).

#### 1. Linfonodo sentinella nel carcinoma mammario

La tecnica del linfonodo sentinella (LS) nella terapia chirurgica del carcinoma mammario con metodica istologica classica è stata messa a punto presso l'Istituto Europeo di Oncologia ed è diventata procedura standard a livello internazionale nella pratica clinica a partire dal 2003.

Presso il nostro laboratorio è entrata in uso dall'anno 2004.

La metodica del LS si basa sul principio secondo il quale le cellule tumorali che penetrano nel circolo linfatico da un determinato distretto anatomico si localizzano nella prima stazione linfatica di drenaggio denominata appunto "linfonodo sentinella". Così, l'identificazione di tale linfonodo, la sua asportazione e la sua analisi risultano fondamentali nel processo decisionale di ablazione chirurgica dei linfonodi del cavo ascellare, situati a valle del LS: in caso di localizzazione metastatica al linfonodo sentinella infatti non si può escludere che cellule tumorali siano migrate a valle, mentre in caso di negatività, tale ipotesi può essere ragionevolmente esclusa. Ne consegue che, in quest'ultimo caso, ci si può astenere dalla esecuzione della linfadenectomia ascellare, evitando possibili complicanze chirurgiche.

La tecnica si basa sulla inoculazione sottocutanea (nell'area di proiezione cutanea della neoplasia) o intratumorale di una sostanza radioattiva e/o di un colorante vitale che poi migrano, attraverso i linfatici, ai linfonodi regionali.

Le modalità di analisi di LS sono essenzialmente due, quella tradizionale istologica (intraoperatoria e differita) che, come detto risale ai primi anni 2000 e quella molecolare, di più recente introduzione.

Con la metodica in differita si applicano protocolli di diagnosi posticipata su materiale fissato in formalina ed incluso in paraffina, che prevedono l'allestimento di numerosi preparati istologici e immunostochimici, fino ad esaurimento del linfonodo incluso.

Considerato che in caso di negatività dell'indagine istologica tradizionale su preparati colorati con ematossilina/eosina, si richiede un'ulteriore indagine immunoistochimica, un tempo ragionevole di risposta va considerato di almeno cinque giorni lavorativi. Di conseguenza la paziente viene sottoposta ad un primo intervento chirurgico in cui si asporta la neoplasia mammaria e contestualmente il LS; in caso di positività di quest'ultimo, la paziente deve essere richiamata e nuovamente sottoposta ad intervento chirurgico di asportazione del cavo ascellare. Questa metodica quindi, pur accreditata per alta sensibilità e specificità, ha un impatto economico negativo (due interventi con conseguenti degenze) ed è, essendo la risposta dilazionata nel tempo, inevitabilmente fonte di ansia per la paziente.

Con la metodica intraoperatoria si applicano protocolli di diagnosi intraoperatoria utilizzando il criostato, vengono allestiti numerosi preparati istologici, fino ad esaurimento del linfonodo. In questo caso il tempo di risposta avviene in una giornata lavorativa.

Con la seconda metodica, indicata come "One Step Nucleic Acid Amplification" (OSNA), è possibile condurre nel corso dell'intervento di asportazione del tumore la contestuale analisi del linfonodo. Tale metodica, introdotta nel nostro laboratorio dal 2011, non consente il riconoscimento morfologico delle cellule neoplastiche, ma, attraverso una procedura molecolare, permette l'analisi quantitativa di RNA messaggero della Citocheratina 19 (CK19), marcatore specifico delle cellule metastatiche del carcinoma mammario su tessuto linfonodale giunto a fresco. La tempistica di questa analisi è di circa 35-40 minuti e può pertanto essere condotta contestualmente all'asportazione del tumore mammario con indubbio vantaggio di tempo, risparmio di eventuale re-intervento e disagio psicologico della paziente. I dati di letteratura indicano una sensibilità e specificità sovrapponibili alla metodica tradizionale.

La tabella mostra la comparazione tra metodica istologica tradizionale e OSNA per LS di carcinoma mammario:

<b>Metodica istologica tradizionale</b>	<b>Metodica istologica intraoperatoria</b>	<b>OSNA</b>
Tempistica di risposta: 5 giorni lavorativi circa	Intraoperatorio: dalle 3 alle 5 ore	Intraoperatorio: 35-40 minuti
In caso di positività di LS: doppio utilizzo della sala operatoria e doppia anestesia per la paziente	In caso di positività di LS: utilizzo singolo della sala operatoria e unica anestesia per la paziente	In caso di positività di LS: utilizzo singolo della sala operatoria e unica anestesia per la paziente
Tecnica operatore-dipendente	Tecnica operatore-dipendente	Tecnica standardizzata
Interpretazione dell'anatomo-patologo	Interpretazione dell'anatomo-patologo	Dato analitico strumentale

## 2. Linfonodo sentinella nel melanoma cutaneo

In base agli stessi principi sopra esposti per la patologia mammaria, anche nel caso del melanoma cutaneo è possibile andare a valutare lo stato del linfonodo sentinella in modo da decidere, sulla base di esso, l'eventuale dissezione dei linfonodi loco-regionali.

Nel caso del melanoma, i protocolli attualmente in uso prevedono l'utilizzo della metodica istologica e immunoistochimica tradizionale.

Il linfonodo giunge infatti in laboratorio fissato in formalina e viene interamente tagliato in più sezioni lungo l'asse minore e processato.

Il protocollo di taglio prevede, per ciascuna inclusione in paraffina una serie di 2 sezioni seriate intervallate da 100 µm sino a esaurimento del linfonodo, secondo il seguente schema: EE, MelaTriple → EE, MelaTriple → EE, bianca → Bianca, bianca → Bianca, bianca → Bianca, bianca.

Nell'ambito della diagnostica del melanoma sono inoltre disponibili, presso la nostra struttura, tecniche di biologia molecolare per la ricerca di mutazioni dei geni BRAF, N-RAS, c-KIT con valore predittivo di risposta alla terapia.

### **3. Patologia renale non neoplastica, con particolare riferimento alla trapiantologia**

Il Servizio di Anatomia Patologica annovera tra le attività di eccellenza, la patologia renale non neoplastica. Annualmente giungono oltre 100 biopsie renali provenienti dai servizi di Nefrologia del nostro Ospedale e dagli Ospedali di Borgomanero, Verbania e Vigevano. La diagnostica nefropatica consta di una valutazione morfologica delle biopsie coadiuvata dalla metodica di immunofluorescenza per la ricerca di depositi glomerulari di catene pesanti delle immunoglobuline e frazioni del complemento. È inoltre presente la possibilità di una valutazione ultrastrutturale dei campioni, tramite convenzione con il II servizio dell'Anatomia Patologica dell'Ospedale Luigi Sacco di Milano.

L'AOU di Novara, insieme con l'AOU Città della Salute e della Scienza di Torino, è centro di riferimento piemontese per l'esecuzione di trapianti renali. Pertanto la diagnostica nefropatologica comprende anche la valutazione di biopsie di reni trapiantati, allo scopo di valutare eventuale rigetto o insorgenza di altra patologia. A questo scopo, la componente medica e gli assistenti tecnici garantiscono un servizio di reperibilità diurna (dalle 8 alle 20) anche durante i giorni festivi.

### **4. Patologia emopoietica e linfoproliferativa**

La patologia emopoietica e linfoproliferativa è rappresentata, nella nostra struttura, da materiale istologico di biopsie osteo-midollari (circa 790/anno) e di linfonodi o masse di neoplasie linfoproliferative, asportati in toto o campionati con macrobiopsie. Occasionalmente giungono anche preparati citologici di sospette malattie linfoproliferative. La valutazione di questo tipo di patologia richiede imprescindibilmente, oltre alla valutazione morfologica tradizionale, un ampio spettro di reazioni immunoistochimiche presenti nella nostra struttura. A questo, il nostro laboratorio aggiunge anche la possibilità di una valutazione molecolare del riarrangiamento del gene del TCR-gamma e della clonalità dei riarrangiamenti delle catene pesanti delle immunoglobuline (IgH) mediante analisi di frammenti.

### **5. Patologia polmonare**

La presenza presso la nostra AOU di un servizio di Chirurgia toracica e di Pneumologia, garantisce al laboratorio di Anatomia patologica un ampio spettro di campioni di patologia polmonare: biopsie trans-bronchiali e trans-toraciche, pneumectomie parziali o totali, prelievi in corso di mediastinoscopia e biopsie pleuriche. La diagnostica di patologia polmonare, prevalentemente di tipo neoplastico, si avvale di reazioni immunoistochimiche e di valutazioni molecolari che rispondono alle attuali richieste oncologiche per la valutazione di risposta di una terapia mirata. Il laboratorio di Oncoematologia e Patologia molecolare è in grado di fornire un'analisi accurata mediante tecnica di sequenziamento di nuova generazione (NGS) mediante kit certificati CE-IVD.

Sono inoltre presenti un discreto numero di biopsie polmonari per valutazione di eventuali interstiziopatie.

### **6. Neuropatologia oncologica**

La Neurochirurgia presente nella nostra AOU fornisce all'Anatomia patologica materiale prevalentemente di tipo tumorale. Su di esso, presso il nostro laboratorio, è possibile eseguire l'esame estemporaneo su striscio ed eventualmente al congelatore. Il materiale viene quindi processato generalmente in regime di urgenza, seguendo cioè una via preferenziale che garantisce la diagnosi morfologica in circa 5 giorni lavorativi. Alla diagnostica tradizionale, è possibile affiancare dei fattori prognostici e predittivi di risposta alla terapia tramite tecniche di biologia molecolare, quali: lo stato di metilazione del gene MGMT; la ricerca di mutazioni dei geni IDH1 e IDH2, pTERT amplificazione di EGFR mediante metodica FISH e LOH di 1p36 e 19q13.

## 7. Attività di screening

L'Anatomia Patologica è parte integrante dell'attività di screening della popolazione nell'ambito del Progetto Serena:

- Screening I livello del carcinoma colo-rettale per la ricerca di lesioni piatte o polipoidi precursori.
- Screening di II livello del carcinoma della mammella ottenuto tramite effettuazione e valutazione di preparati agoaspirativi e micro-istologici (tru-cut, core-biopsy) di lesioni mammarie riscontrate al controllo mammografico.

## 8. La tecnica chirurgica di Mohs (variante diretta)

La tecnica chirurgica di Mohs è un approccio microtopografico alla dermochirurgia atta a verificare la radicalizzazione (n.d.r. escissione completa e radicale) di neoplasie dai limiti poco definibili sulla base solo morfologica.

Tale tecnica viene utilizzata preferenzialmente per neoplasie cutanee non melanocitarie a basso grado di metastatizzazione (prevalentemente basaliomi cutanei), ed è indicata preferenzialmente quando, a causa della sede anatomica di insorgenza, sia necessario ridurre al minimo il quantitativo di tegumento da asportare. Altre indicazioni sono: la valutazione dei margini di resezione nel caso di applicazione di lembi cutanei oppure nel caso di neoplasia recidive su tessuti già precedentemente trattati chirurgicamente o radioterapeuticamente.

In tutti questi casi è di importanza fondamentale una valutazione estemporanea dei margini di resezione che permette di indirizzare l'intervento nel senso di un eventuale ulteriore allargamento, senza bisogno di successivi re-interventi. Tale valutazione viene assicurata attraverso un esame al criostato di tutti i margini di resezione.

## 9. Diagnostica istoenzimatica dei difetti di innervazione autonoma intestinale (MORBO DI HIRSCHSPRUNG)

La diagnosi della malattia di Hirschsprung (HD) si basa su elementi clinici, strumentali ed istologici. Questi ultimi comprendono:

- valutazione della presenza/assenza dei gangli nervosi parasimpatici nel plesso sottomucoso e/o in quello mioenterico in un tratto di colon di lunghezza variabile, da pochi cm dalla rima anale a tutta l'estensione del colon;
- valutazione della morfologia e grado di maturazione dei gangli;
- valutazione della presenza e distribuzione delle fibre nervose colinergiche;
- valutazione della morfologia e localizzazione del plesso mioenterico.

Salvo casi particolari, tali valutazioni possono essere eseguite su biopsie per suzione, con minimo traumatismo per il paziente, senza anestesia ed in regime ambulatoriale.

Questi prelievi, inviati immediatamente dopo l'esecuzione in appositi contenitori chiusi, con all'interno garza imbevuta di soluzione fisiologica, vengono congelati in ghiaccio secco anidro.

Al momento della processazione, vengono scongelati e orientati su supporti da criostato, in modo che le sezioni comprendano mucosa e sottomucosa e si ricongelino in ghiaccio secco anidro.

La diagnosi certa di HD e di disordini correlati, si basa sull'uso di metodiche di istochimica enzimatica, che forniscono indicazioni certe sulla presenza/assenza e sulla tipologia della lesione. Per questo motivo, si eseguono circa 30 sezioni seriate dello spessore di 16 micron, su ogni vetrino. Dopo asciugatura, si applicano le seguenti colorazioni isto-enzimatiche: ACE (acetil-colinesterasi), LDH (lattico-deidrogenasi), SDH (succinico-deidrogenasi), NADPH (nitrato ossido-sintetasi) e la colorazione istochimica Syrius-Red.

Si passa quindi alla valutazione microscopica dei preparati ed alla diagnosi conclusiva.

Nella nostra esperienza, tale metodica è risultata altamente sensibile e specifica, fornendo indicazioni importanti per il trattamento successivo del paziente ed attualmente risulta l'unica in grado di fornire una diagnosi certa sulle patologie da disordini dell'innervazione autonoma intestinale.

## 10. Indagini su tessuto in casi sospetti per sindrome di Lynch

La sindrome di Lynch o Tumore ereditario del colon-retto non poliposico (HNPCC, Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer) è una forma di predisposizione ereditaria allo sviluppo di tumori dovuta a mutazioni nei geni che codificano per proteine coinvolte nel meccanismo di riparazione del DNA detto Mismatch Repair. Ciò comporta un rischio elevato di sviluppare tumori del colon-retto ed extracolici. La maggior parte dei tumori del colon associati a sindrome di Lynch presenta un fenotipo caratterizzato da instabilità dei microsatelliti e perdita di espressione della proteina codificata dal gene mutato; l'instabilità dei microsatelliti viene valutata con metodiche di biologia molecolare, la perdita di espressione proteica con indagini immunoistochimiche, entrambe su preparati istologici.

I criteri di Bethesda sono stati formulati per selezionare i nuclei familiari da sottoporre ad analisi su tessuto tumorale; dai dati pubblicati in letteratura, tali criteri consentono di identificare il 75-95% delle famiglie con mutazione.

Lo studio su tessuto rappresenta solo una parte del percorso diagnostico in tale patologia, che è fondamentalmente di pertinenza genetica e che quindi necessita di una Consulenza Genetica Oncologica dei pazienti con fenotipo sospetto, che verranno ulteriormente indagati con questionario specifico ed eventualmente con indagini per identificare mutazioni germinali.

Benché venga riportato in letteratura che mutazioni riconducibili alla sindrome di Lynch vengano identificate solo nell'1-2% dei casi di tumore del colon-retto o dell'endometrio, tale reperto consente tuttavia di intraprendere una sorveglianza clinica mirata dei pazienti a rischio al fine di una diagnosi precoce.

Nel nostro Servizio di Anatomia Patologica, questo tipo di indagini su tessuto è iniziato nel 2011. Nell'anno 2023 sono stati studiati 203 pazienti con l'identificazione di fenotipo sospetto in 21.

### DATI DI ATTIVITA'

La tabella sottostante mostra il numero totale di linfonodi sentinella esaminati in intraoperatoria **con tecnica OSNA e al criostato** per anno dal 2011

DATI DI ATTIVITA'	2021	2022	2023
Totale linfonodi sentinella esaminati in intraoperatoria OSNA	191	131	189
Totale linfonodi sentinella esaminati in intraoperatoria al criostato	36	54	48

La tabella sottostante mostra il numero totale di MOHS diretta (estemporanea) e indiretta eseguite dal 2021:

DATI DI ATTIVITA'	2021	2022	2023
MOHS DIRETTA	62	66	80
MOHS INDIRETTA	145	144	154

### IMMUNOISTOCHIMICA

È l'applicazione dei principi e delle metodiche immunologiche che permettono lo studio di cellule e tessuti, soprattutto in ambito oncologico, con scopi diagnostici, prognostici e di misurazione di risposta alla terapia. È applicabile sia su preparati istologici che su materiale biologico incluso, prelevato per esame citologico. Permette all'anatomo-patologo di chiarire, tramite la valutazione dell'espressione di specifiche proteine, la reale natura di strutture cellulari laddove la pura morfologia risulti insufficiente.

Le attuali maggiori applicazioni diagnostiche dell'immunoistochimica sono nell'ambito della diagnosi differenziale tra neoplasie di diversa istogenesi, nella migliore caratterizzazione di neoplasie appartenenti ad uno stesso gruppo, nella identificazione dell'origine di una metastasi di cui non si conosce il tumore primitivo e nella produzione di dati di utilizzo prognostico e predittivo di risposta terapeutica.

L'interpretazione dei risultati è di competenza dell'anatomo-patologo che dispone di una specifica preparazione per questo tipo di attività.

Nella S.C. di Anatomia Patologia si eseguono all'incirca 25.000 test di immunoistochimica all'anno eseguiti con metodi standardizzati grazie all'utilizzo di apparecchiature completamente automatiche (Benchmark ULTRA Ventana – link <http://www.ventanamed.com>) sottoposte a periodiche manutenzioni programmate da parte di tecnici specializzati.

Vengono eseguiti inoltre circa 700 indagini all'anno di Immunofluorescenza diretta (DIF) su tessuti provenienti da biopsie renali e cutanee e indiretta (IIF) su sieri, per la ricerca di immunocomplessi e malattie autoimmuni.

Inoltre viene eseguita determinazione di EBV (Epstein-Barr Virus) su materiale istologico e citologico con metodo CISH (ibridazione in situ) automatizzato su Benchmark ULTRA Ventana.

L'elenco degli anticorpi presenti presso la S.C. di Anatomia Patologia può essere consultato nella sezione "Diagnostica laboratorio".

## DATI DI ATTIVITA'

La tabella mostra il numero di vetrini su cui è stata eseguita l'immunoistochimica dal 2021:

DATI DI ATTIVITA'	2021	2022	2023
N° di vetrini allestiti per immunoistochimica	18.480	19.440	25.423

## S.S. ONCOEMATOLOGIA E PATOLOGIA MOLECOLARE

Il laboratorio di Patologia Molecolare nasce nel 1999 con finalità di ricerca clinica; dal 2002 è iniziata l'attività di diagnostica molecolare applicata alla clinica, attraverso la identificazione di genoma di Polyomavirus umani (BKV, JCV e SV40) nei trapiantati di rene. Nel corso degli anni l'attività si è progressivamente diversificata per soddisfare nuove esigenze diagnostiche e prognostico-predittive di varie neoplasie solide ed ematologiche. Ciò ha determinato un sensibile aumento del numero di prestazioni, sia in valore assoluto sia in termini percentuali rispetto alle attività di diagnostica cito-istologica. Il laboratorio di Oncoematologia e Patologia molecolare è il centro HUB sia di quadrante che extraquadrante. E' possibile effettuare la maggior parte degli esami di diagnostica molecolare su materiale istologico, autoptico e citologico, sia fissato in formalina e incluso in paraffina che fresco. Principalmente gli esami di diagnostica molecolare si basano su tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS), analisi di frammenti, ibridazione in situ fluorescente (FISH), Real Time PCR.

La sezione di Patologia Molecolare si focalizza sia su attività di diagnostica, sia su attività di ricerca applicata alla diagnostica molecolare:

1. ricerca di virus e batteri con implicazione nelle principali patologie neoplastiche e non
2. ricerca di alterazioni cromosomiche (traslocazioni, amplificazioni, delezioni, aneuploidie) mediante la tecnica di ibridazione in situ fluorescente (FISH) su tessuti paraffinati, strisci e/o apposizioni nel carcinoma mammario, gastrico e del polmone, nel colangiocarcinoma, oligodendrogliomi e nella diagnosi di linfoma follicolare e mantellare e in generale per l'oncoematologia.



3. Diagnosi mirata e target therapy, in particolare viene utilizzata tecnologia NGS sia su DNA, sia RNA e cfDNA (biopsia liquida) sui principali tumori umani. Questa tecnologia è stata implementata nel 2020 e permette la valutazione in contemporanea e in un'unica seduta dei seguenti geni di interesse nella oncologia polmonare, del colon retto, dei melanomi, tumori gastro intestinali e altre patologie neoplastiche. Il pannello permette il rilevamento delle principali mutazioni hotspot a carico del DNA, CNV (copy number variation) e traslocazioni/riarrangiamenti a carico dell'RNA come di seguito riportato.

Geni valutati per la ricerca di mutazioni hotspot (DNA) mediante tecnologia NGS: AKT1, AKT2, AKT3, ALK, AR, ARAF, BRAF, CDK4, CDKN2A, CHEK2, CTNNB1, EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ESR1, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT3, GNA11, GNAQ, GNAS, HRAS, IDH1, IDH2, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MET, MTOR, NRAS, NTRK1, NTRK2, NTRK3, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, RAF1, RET, ROS1, SMO, TP53

Geni valutati per CNV mediante tecnologia NGS: ALK, AR, CD274, CDKN2A, EGFR, ERBB2, ERBB3, FGFR1, FGFR2, FGFR3, KRAS, MET, PIK3CA, PTEN

Geni valutati per la ricerca di traslocazioni/riarrangiamenti (RNA) mediante tecnologia NGS: ALK, AR, BRAF, EGFR, ESR1, FGFR1, FGFR2, FGFR3, MET, NGR1, NTRK1, NTRK2, NTRK3, NUTM1, RET, ROS1, RSPO2, RSPO3.

All'analisi NGS vengono affiancate ulteriori metodiche molecolari, quali per esempio la Real-time PCR e/o il sequenziamento diretto. Viene inoltre valutato lo stato di metilazione del gene MGMT mediante elettroforesi capillare e instabilità dei microsatelliti (sia in IIC che in biologia molecolare).

La patologia molecolare è di ausilio nella diagnosi dei disordini linfoproliferativi: valutazione del riarrangiamento del gene del TCR-gamma e valutazione della clonalità dei riarrangiamenti delle catene pesanti delle immunoglobuline (IgH) mediante PCR semi-nested e analisi mediante analisi di frammenti su sequenziatore automatico.

- 4 Test genomici su carcinoma mammario localizzato ormono-positivo a rischio intermedio per definire l'opportunità o meno di una chemioterapia adiuvante.

Presso il nostro centro si esegue EndoPredict®, test prognostico in vitro che consente di predire il rischio di metastasi a distanza in pazienti affette da carcinoma mammario localizzato, positivo al recettore degli estrogeni e HER2/neu negativo (N0/N1 e con indice di proliferazione >20%). E' un test di espressione genica e fornisce informazioni aggiuntive a quelle derivanti dai comuni fattori prognostici, permettendo di formulare una prognosi più specifica per la singola paziente.

Il test aiuta in ultima analisi a determinare se una paziente abbia un rischio di metastasi tale da beneficiare della chemioterapia adiuvante (dopo la chirurgia) o se la sola terapia ormonale costituisca un trattamento sufficiente.

Viene inoltre preparato, su richiesta dell'Oncologia, il materiale per l'esecuzione del test genomico Oncotype® e inviato presso il laboratorio centralizzato situato in America.

Di particolare rilievo è l'applicazione di metodiche molecolari in ambito citologico a fini diagnostici e prognostico-predittivi. In particolare, nell'ambito della citologia tiroidea, la nostra struttura garantisce la ricerca di mutazioni del gene BRAF e di riarrangiamenti del gene RET/PTC nel sospetto di carcinomi papillari della tiroide, e la ricerca di mutazioni dei geni PAX8/PPARγ per lo screening di lesioni follicolari sospette per malignità.

È inoltre possibile una valutazione FISH di aneuploidie cromosomiche nel sospetto di neoplasie delle vie biliari e di neoplasia uroteliali e la valutazione dello stato mutazionale di K-ras su materiale agoaspirativo di sospette neoplasie pancreatiche.

## DATI DI ATTIVITA'

La tabella mostra il numero di esami molecolari eseguiti dal 2021

DATI DI ATTIVITA'	2021	2022	2023
N° test molecolari	2128	2494	2594

## CONTROLLI DI QUALITA'

Il laboratorio di Patologia Molecolare, essendo centro di riferimento, ha superato numerosi **controlli di qualità** esterni (VEQ) ed interlaboratori nazionali ed internazionali, per quanto concerne

- 1) marcatori molecolari in tumori solidi: EGFR, KRAS, HER2, BRAF, ALK, RAS.
- 2) identificazione di virus/batteri: HPV

## PERCORSO DI CERTIFICAZIONE EUSOMA

Il laboratorio di Anatomia Patologica fa parte della Brest Unit e nel 2022 ha ottenuto la certificazione EUSOMA, che rappresenta il massimo organismo scientifico europeo nell'ambito dei tumori mammari. L'equipe medica fa parte dei componenti fondamentali della Breast Unit, già precedentemente diretta dal Prof. Boldorini; ciò comporta una presenza imprescindibile in presenza fisica o su specifica richiesta di chiamata, agli incontri interdisciplinari per la discussione di casi complessi (GIC), una riduzione dei tempi di refertazione all'interno di determinati parametri (vedi ACCESSIBILITA' E TEMPI DI ATTESA)

## GARANZIE PROFESSIONALI

Il Laboratorio garantisce l'affidabilità dei risultati anche sulla base della formazione, dell'addestramento e dell'aggiornamento continuo e del mantenimento delle competenze degli operatori. A tale scopo vengono organizzati corsi di formazione sul campo.

## GARANZIE TECNOLOGICHE

Il laboratorio di Anatomia Patologica è dotato di un Sistema Informatico "Data Entry" che gestisce tutte le fasi dall'accettazione alla refertazione; è inoltre collegato in modo informatico bidirezionale con tutti i reparti e sale operatorie che effettuano una richiesta del materiale inviato presso la struttura e la successiva visualizzazione dei referti.

Il laboratorio è inoltre dotato di ben due sistemi di Tracciabilità interni:

- Tracciabilità di tutte le fasi di lavorazione del materiale: dalla riduzione alla creazione dei vetrini e loro consegna al patologo. Questo sistema è interfacciato con il Data entry in modo bidirezionale.
- Tracciabilità, rintracciabilità e custodia dei reperti dell'anatomia patologica, interfacciato con il sistema precedente, si ottiene la completa tracciabilità dei preparati (vetrini e biocassette) all'interno dell'archivio sia manuale che automatizzato garantendo così la massima sicurezza in fase di conservazione e rintracciabilità di tutti i passaggi.

Il Direttore definisce l'acquisto di nuove attrezzature in collaborazione con il CAS e i Referenti dei settori e tutto il personale utilizzatore partecipa alla stesura delle specifiche tecniche e dei criteri di valutazione delle attrezzature sulla base delle proprie conoscenze teorico-pratiche.

## ATTIVITÀ DI ROUTINE

La Struttura Complessa si articola in:

- Diagnostica istologica di routine
- Diagnostica citologica di routine
- Attività autoptica

Il personale medico è rappresentato da 1 Direttore, 7 Dirigenti Medici, 1 Dirigente Biologo, 2 Medici Specializzandi, 1 TSLB CAS, 17 TSLB, 2 OSS, 2 amministrativi.

Il laboratorio è aperto dal lunedì al venerdì dalle h. 8:00 - 18.00, sabato e festivi turno di pronta disponibilità h 8.00 – 20.00.

## DIAGNOSTICA ISTOLOGICA DI ROUTINE

Il laboratorio esegue esami di diagnostica istopatologica (su tessuti) relativi al materiale prelevato dai pazienti a scopo di diagnosi e cura. Tali esami sono di fondamentale importanza sia in campo oncologico per diagnosi di neoplasia con definizione del grado di malignità, prognosi e terapia, sia in ambiti diversi quali la diagnosi e la terapia di malattie non neoplastiche infiammatorie, infettive e degenerative. Si utilizzano metodiche di studio morfologico tradizionale integrate, ove necessario, da tecniche istochimiche, immunoistochimiche e molecolari.

La diagnostica istologica viene effettuata su agobiopsie, biopsie, pezzi chirurgici e riscontri diagnostici. Viene inoltre garantita diagnosi di routine intraoperatoria.

## DIAGNOSTICA CITOLOGICA

Branca dell'anatomia patologica che si occupa della valutazione di organo tramite l'esame di cellule esfoliate spontaneamente o agoaspirate e conseguentemente strisciate su vetrino. Rappresenta una tecnica che associa ad alta sensibilità e specificità, una facile applicabilità e limitata invasività.

La diagnostica citologica è effettuata sia con criteri morfologici, valutabili al microscopio ottico, sia con tecniche di istochimica, immunoistochimica e di biologia molecolare.

Il nostro Servizio comprende 3 aree principali:

- **citologia per aspirazione con ago sottile**, metodica di prelievo effettuata con ago 22-23 G, che consente di ottenere materiale diagnostico di lesioni nodulari superficiali (mammella, tiroide, tessuti molli, ghiandole salivari), attraverso manovra agoaspirativa eco-guidata e di lesioni profonde (polmone e mediastino, fegato, pancreas, ovaio, linfonodi profondi, ...) in guida ecografica, fluoroscopica o TAC.

Il patologo esegue di persona il prelievo agoaspirativo sotto guida ecografica di lesioni in sedi superficiali e di neoformazioni epatiche.

Nel caso di lesioni profonde, la manovra agoaspirativa viene eseguita da radiologi o broncoscopisti.

In entrambi i casi, l'Anatomia Patologica fornisce il servizio di valutazione estemporanea on-site (ROSE) dei prelievi citologici. Questo consiste nella presenza, in corso dell'esame, di un patologo o biologo, in grado di valutare immediatamente al microscopio il tipo di prelievo eseguito, tramite una colorazione rapida del materiale prelevato e strisciato su vetrino. Questa valutazione consente una definizione dell'adeguatezza del tessuto esaminato in termini di correttezza di sede del prelievo, di natura e di quantità del materiale prelevato. In questo modo si garantisce l'eventuale immediata ripetizione del prelievo, riducendo drasticamente il numero dei preparati non idonei alla valutazione definitiva. Permette inoltre, nel caso di sospetto neoplastico, di richiedere un arricchimento del materiale prelevato, fondamentale ormai per le analisi biomolecolari necessarie per chiarimenti diagnostici e soprattutto per la pianificazione di approcci terapeutici biologici.

La valutazione on-site è disponibile durante tutti gli ambulatori di citologia ambulatoriali (ecografia tiroidea e senologia) dal patologo che esegue anche il prelievo citologico, e in corso di esami endoscopici. In particolare,

STS Anatomia Patologica 240201.doc

nella nostra azienda, è garantita una seduta settimanale con citopatologo presente nell'ambulatorio di broncoscopia per lesioni polmonari e di gastroscopia per lesioni pancreatiche.

- **citologia di prevenzione**, mediante valutazione di materiale citologico prelevato da pazienti sani, ma a rischio di neoplasia; è principalmente rappresentata dalla diagnostica mammaria, effettuata da patologi, nell'ambito dello screening di II livello del **Progetto Serena**. Si tratta cioè dell'agoaspirazione sotto guida ecografica di lesioni mammarie di primo riscontro agli esami radiologici mammografici.

- **citologia esfoliativa**, su campioni cellulari raccolti direttamente (cioè contenenti cellule distaccatesi spontaneamente: espettorato, urina, liquidi di versamento, liquor, secreto mammario, ...) oppure ricorrendo a manovre atte ad asportare le cellule dalla loro sede naturale (abrasione, spazzolamento, lavaggio, ...), mediante lettura effettuata da dirigenti biologi e patologi.

## DATI DI ATTIVITA'

Esami citologici e tru-cut mammari eseguiti nel corso degli anni. La tabella mostra in particolare che a una riduzione degli agoaspirati mammari si assiste a un aumento dei tru-cut mammari in modo da eseguire immediatamente i fattori prognostico-predittivi:

DATI DI ATTIVITA'	2022	2023
Mammella	430	380
Tiroide	514	501
Polmone	257	403
Linfonodo	380	224
Tru-cut mammella	306	418

## ATTIVITA' AUTOPTICA

Il personale medico dell'anatomia patologica, supportato da 1 TSLB, si occupa dell'esecuzione di tutti i riscontri autoptici anatomo-patologici richiesti dai reparti dell'AOU. Viene assicurata, sempre dal nostro personale anche l'esecuzione di riscontri su salme ad alto rischio infettivo (es. COVID +) presso l'ospedale Luigi Sacco, tramite opportuna convenzione.

## ATTIVITA' DIDATTICA, ATTIVITA' DI RICERCA E COLLABORAZIONI

I laboratori di Anatomia Patologica e di Oncoematologia e Patologia molecolare svolgono inoltre:

- Ricerca applicata. Collaborano infatti sia con i reparti ospedalieri sia con personalità di prestigio di fama internazionale che fruttano numerose pubblicazioni scientifiche su riviste internazionali con impact factor. L'elenco delle pubblicazioni è possibile visualizzarlo sia sulla sezione "Lab news" sia sul sito <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>, inserendo il nominativo da consultare.
- Sono inoltre possibili delle collaborazioni internazionali a scopo scientifico con periodi di stage presso strutture estere.
- Attività didattica. Il personale del laboratorio è assistente del Prof. Boldorini alla didattica di Anatomia Patologica nei corsi di laurea di Tecniche Sanitarie di Laboratorio Biomedico e Biotecnologie Mediche.
- All'interno del laboratorio è presente un'aula didattica munita di un microscopio collegato a monitor dove si svolgono conferenze clinico-patologiche, lezioni, seminari e riunioni di gruppi interdisciplinari cure (GIC).
- attività di tirocinio formativo per studenti di Biotecnologie mediche, Medicina e Chirurgia, Scienze Biologiche e Tecniche diagnostiche di Laboratorio, con possibilità di effettuare tesi di Laurea.



### Collaborazioni internazionali.

- Michele Carbone. University of Hawai'i, Cancer Center, Honolulu, Hawaii
- Milo Frattini. Istituto Cantonale di Patologia, Locarno, Svizzera
- Raphael Viscidi. Johns Hopkins Medical School, Baltimora, Maryland, USA
- Eili Huhtamo. Department of Virology, Haartman Institute, Faculty of Medicine, University of Helsinki, Helsinki, Finland
- Kamel Khalili. School of Medicine, Temple University, Philadelphia, Pennsylvania
- Federico Roncaroli. Professor Clinical Neuropathology, University of Manchester.

### PROGETTI DI MIGLIORAMENTO

Riduzione dei tempi di attesa di refertazione per agoaspirati mammella e percorso diagnostico privilegiato per le neoplasie mammarie (compresi marcatori prognostico-predittivi).

Implementazione dei controlli di qualità per la diagnostica immunoistochimica, FISH e tecniche di indagine molecolare.


Miglioramento tracciabilità del campione biologico dall'accettazione allo smaltimento.

### ACCESSIBILITA' E TEMPI DI ATTESA

Il Reparto è ubicato al 1° piano del Padiglione F.

All'ingresso sono presenti, una rampa di scale e due ascensori/montacarichi (1 utilizzato dal personale dell'azienda e 1 dai visitatori).

ATTIVITA' di routine	TEMPI DI ATTESA
diagnosi istologica	5 gg lavorativi per piccole biopsie 10/12 gg lavorativi per pezzi operatori
diagnosi citologica di ago aspirati	5 gg lavorativi
diagnosi citologica di campioni urinari e pap test	15 gg lavorativi
diagnostica molecolare	7/10 gg lavorativi

Redatto: TSLB-CAS SC Anatomia Patologica Dott.ssa Claudia Veggiani  TSLB SC Anatomia Patologica Dott.ssa Cristina Boieri	Verificato e Approvato: Direttore SC Anatomia Patologica prof. Renzo Luciano Boldorini	Data emissione: 01/02/2024	Vers. 2 – 2024 
STS Anatomia Patologica 240201.doc		Pag. 13 di 13	