



Raccomandazioni dell'Associazione Tecnico Scientifica – S.I.T.La.B.

N.001/24

La multidisciplinarietà del Tecnico sanitario di laboratorio biomedico durante i processi di diagnosi, prognosi e cura del carcinoma mammario

Levetti S. (ASL CN2 Verduno), Martinello V. (CRO Aviano), Quaranta A. (CRO Aviano)

Rev. 1.0

SITLaB news

Pubblicato: 19 Aprile 2024

Copyright: © SITLaB

Abstract

Introduzione: Il carcinoma della mammella (BC) è il tumore che con maggior frequenza viene diagnosticato nelle donne in Italia. La sopravvivenza dipende da molti fattori, tra cui: il tipo di tumore, il grado istologico, lo stadio della malattia e le terapie intraprese.

Obiettivo: L'obiettivo di questo lavoro è quello di mettere in evidenza il prezioso contributo offerto dal Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico (TSLB), nel processo di diagnosi, prognosi e cura del BC. Inoltre, si vogliono valutare e confrontare: le modalità operative, i tempi di allestimento e ricostituzione dei farmaci nelle Unità Farmaci Antiblastici (UFA) di ASL CN2, ASU FC e CRO di Aviano.

Materiali e metodi: L'attività del TSLB per il BC si esplica nell'ambito di discipline diverse: 1. Anatomia Patologica (immunoistochimica); 2. Biologia Molecolare (diagnostica molecolare); 3. Laboratorio Analisi (chimica clinica ed ematologia); 4. Farmacia Oncologica (manipolazione farmaci antineoplastici).

Risultati: 1. *Anatomia Patologica.* L'utilizzo dell'immunocoloratore automatizzato, consente al TSLB di ridurre i tempi di esecuzione delle colorazioni, a fronte di quelle manuali di immunoistochimica (IHC) ed ematossilina-eosina (H&E). Per l'IHC, tuttavia, risulta complesso il dosaggio iniziale dei tempi di incubazione degli anticorpi da utilizzare nella colorazione ed è pertanto necessaria una «messa a punto». 2. *Biologia Molecolare.* L'utilizzo della tecnica amplificazione in singola fase degli acidi nucleici (OSNA) prevede specifiche tempistiche prestabilite, strettamente connesse all'operatività dello strumento, per la preparazione di un singolo linfonodo (SNL) o per l'analisi di 14 SNL. 3. *Laboratorio Analisi.* Prima dell'inizio del trattamento chemioterapico devono essere effettuati esami ematochimici completi, per la valutazione della riserva midollare e le funzionalità d'organo, che necessitano di tempi di risposta celeri, precisi e standardizzati. 4. *Farmacia Oncologica.* Le tempistiche di allestimento dei farmaci antiblastici sono risultate differenti nelle tre UFA esaminate e sono legate: alla scelta dell'utilizzo dell'isolatore o delle cappe a flusso laminare verticale che influisce sulle tempistiche di preparazione; alle modalità operative diverse; alla variabilità individuale legata alla manualità dell'operatore.

Conclusioni: Il percorso diagnostico terapeutico assistenziale (PDTA) del BC, costituisce un esempio di come il TSLB sia responsabile nei vari settori di attività, essendo una figura formata e qualificata sia in ambito universitario che specialistico. Attraverso l'utilizzo di strumentazioni automatizzate si ha la garanzia di poter fornire prestazioni standardizzate, certificate e riproducibili anche in termini di tempistiche di esecuzione. L'acquisizione di tecnologie robotiche, per le UFA, potrebbe ridurre la variabilità individuale andando così a migliorare le performance e la sicurezza del prodotto e dell'operatore, certificando l'intero processo di allestimento. Il TSLB, misurandosi quotidianamente con tecnologie in continua evoluzione e avendo un ruolo sempre più attivo anche nel campo della profilazione genomica e dei test genetici, ha acquisito e consolidato un'elevata autonomia tecnico-professionale che gli consente di essere una figura di spicco nell'oncologia di precisione.

Parole chiave: BC, PDTA, UFA.

Introduzione

Il carcinoma della mammella (BC) è il tumore che con maggiore frequenza viene diagnosticato nelle donne in Italia. La sopravvivenza, dipende da molti fattori tra cui il grado di malattia, il tipo di tumore, le terapie intraprese. La letalità, invece, è in costante diminuzione grazie al miglioramento delle metodologie di screening, all'affinamento delle tecniche chirurgiche e radioterapiche e ai processi registrati nel campo dei farmaci antitumorali. I Paesi europei hanno introdotto programmi di screening mammografico per rilevare precocemente piccoli tumori che non causano sintomi. Tuttavia un numero pressoché equivalente di tumori al seno viene rilevato dall'autoesame per noduli al seno e altri sintomi tra cui un cambiamento nelle dimensioni o nella forma di un seno, fossette della pelle, capezzolo introflesso, eruzione cutanea, secrezione del capezzolo e gonfiore o nodulo sotto l'ascella. I fattori di rischio sono molteplici e variegati: età, stile di vita, fattori riproduttivi e ormonali, fattori dietetici e metabolici fino a toccare familiarità e genetica^a. (Figura 1)



Figura 1- Prevenzione^a

Nel 2020 in Italia sono state stimate circa 55.000 nuove diagnosi di tumore nelle donne, con una sopravvivenza netta a 5 anni dalla diagnosi dell'88%. La sopravvivenza dal tumore della mammella dipende da molti fattori: lo stadio di malattia alla diagnosi, il tipo di tumore, le terapie intraprese^b. La pandemia da COVID-19, ha determinato un calo delle nuove diagnosi, legate all'interruzione degli screening oncologici e al rallentamento delle attività diagnostiche, causando una progressione da forme precoci verso forme più avanzate (Figura 2)^{c, d}.

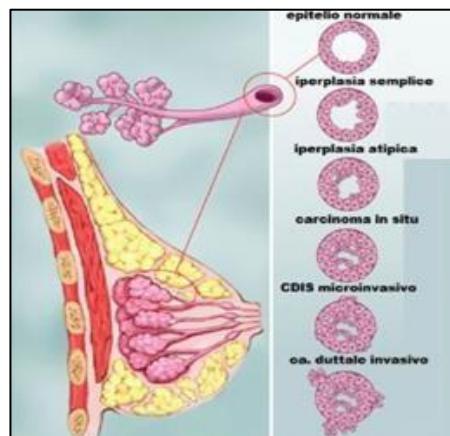


Figura 2 - Epitelio normale e BC invasivo ^d

Il percorso diagnostico terapeutico assistenziale (PDTA) di soggetti affetti da CA, richiede un'elevata specializzazione a tutti i livelli e necessita di personale dedicato. All'interno di questo percorso è prevista la figura del Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico (TSLB).

Il TSLB è il professionista sanitario in possesso di Laurea o titolo equipollente^e che si occupa, assieme ad altre figure professionali, sia dell'intero percorso diagnostico (laboratorio analisi, anatomia patologica e biologia molecolare) che di una parte del percorso curativo (allestimento delle terapie antineoplastiche).

Obiettivo

L'obiettivo di questo lavoro è quello di mettere in evidenza la multidisciplinarietà del TSLB durante i processi di diagnosi e cura del carcinoma mammario^f:

- utilizzo dell'immunoistochimica;
- saggio diagnostico molecolare;
- laboratorio analisi;
- allestimento dei farmaci antineoplastici (*Figura 3*).

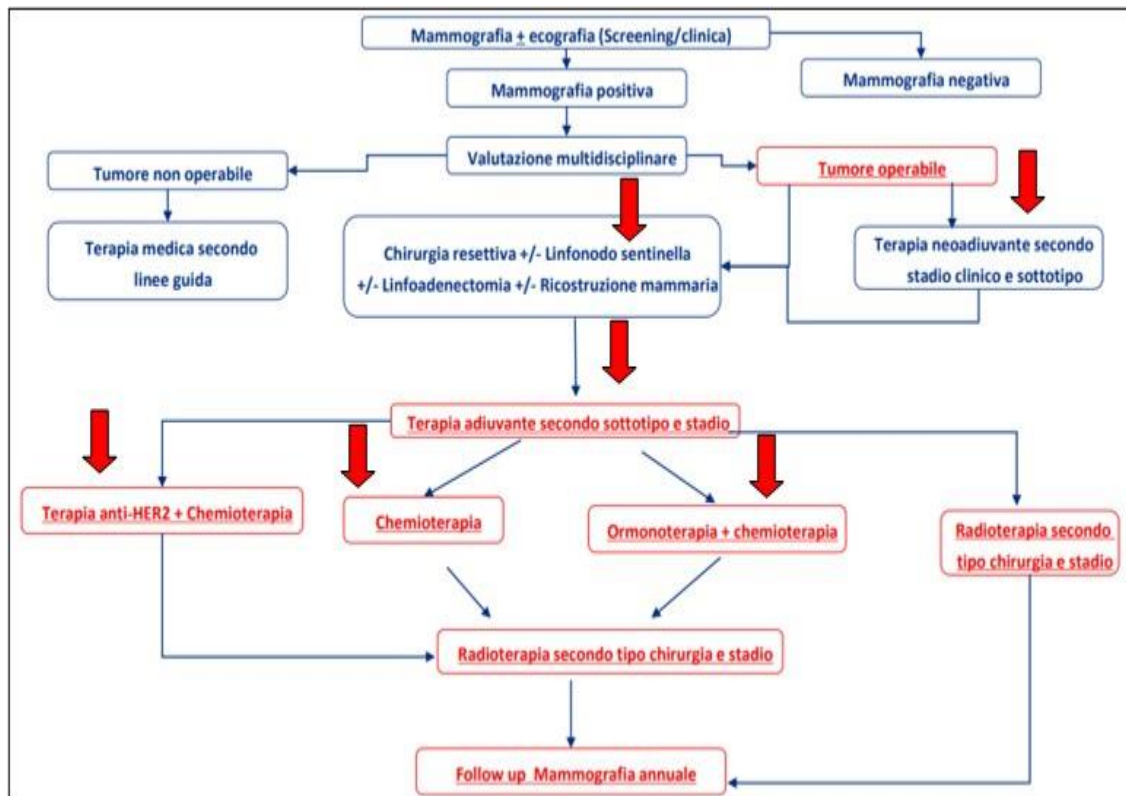


Figura 3- Flow Chart: percorso diagnostico-terapeutico assistenziale (PDTA) per tumore operato della mammella ^f

Le frecce in rosso indicano il coinvolgimento del TSLB nel PDTA. È presente, ma non segnalata, la parte che riguarda la determinazione dei valori ematochimici completi utili all'oncologo per la valutazione della terapia antineoplastica da prescrivere. Oltre alle evidenze descritte, si elencano le singole tempistiche di allestimento di terapie oncologiche e le procedure correlate in tre diverse realtà che operano secondo Good Manufacturing Practice (GMP).

Materiali e metodi

Anatomia Patologica

La diagnosi deve essere effettuata da parte del medico oncologo accorpando una "triplice valutazione diagnostica": clinica (anamnesi del paziente ed esame fisico), imaging (mammografia e/o ecografia) e Anatomia Patologica: biopsia con ago centrale o se evidente dal punto di vista ecografico si procede con l'operazione e la richiesta dell'esame intraoperatorio per la valutazione dei margini del tumore e del linfonodo sentinella.

Il linfonodo sentinella viene analizzato a livelli nell'intraoperatoria, se interessato dalla lesione si procede con lo svuotamento ascellare dei linfonodi all'interno della stessa seduta chirurgica.

Il BC viene classificato in diagnosi secondo il sistema Tumore, Nodulo, Metastasi (TNM) e dato un grade di differenziazione cellulare (atipie nucleari e proliferazione Ki67) e formazione di tubuli. Tutti i carcinomi mammari invasivi devono essere valutati per estrogeni (ER), progesterone (PR) e stato del recettore 2 per il fattore di crescita epiteliale (HER2).

Il grado istologico (GRADING) esprime il grado di differenziazione del tumore rispetto al tessuto ghiandolare mammario dal quale deriva e può essere:

- G0: assenza di tumore;
- G1: tumore ben differenziato;
- G2: tumore moderatamente differenziato (grado di differenziazione intermedio);
- G3: scarsamente differenziato ^d.

Il TSLB si occupa di processare il tessuto e i linfonodi che arrivano in Anatomia Patologica sia in intraoperatoria che nella seduta chirurgica. Con la tecnica dell'immunoistochimica (IHC) viene formulata una diagnosi Anatomico Patologica con la valutazione di tutti i fattori sopra descritti. Per l'esecuzione delle reazioni immunoistochimiche viene impiegato un immunocoloratore BenchMark ULTRA IHC/ISH ² di ultima generazione, che permette di eseguire molteplici reazioni contemporaneamente in condizioni standardizzate, controllate e riproducibili. ³ I campioni di tessuto fissato in formalina ed inclusi in paraffina, dopo il taglio al microtomo, vengono raccolti su vetrini con carica elettrostatica e polisilinati. I vetrini vengono posti nell'immunocoloratore dove subiscono sparaffinatura e uno smascheramento dei siti antigenici con tampone acido o basico e calore. E dopo il blocco della perossidasi endogena, se colorato in DAB, il vetrino viene incubato con il reagente anticorpale. Il TSLB ha il compito di preparare i protocolli di colorazione e di mettere a punto le diluizioni degli anticorpi per arrivare ad una lettura chiara e inequivocabile del preparato da parte dell'anatomico patologo.

Markers di proliferazione cellulare: Il Ki67 mette in evidenza le cellule in replicazione in tutte le fasi del ciclo cellulare eccetto in G0, la conta di tale marker sulle cellule tumorali indica quanto velocemente si duplica e quanto è aggressivo (si esprime in percentuale %).

Markers di aggressività tumorale C-erbB2 (HER2/neu): Oncogene codificante un recettore di membrana simile ad EGFr. In molti tumori maligni il gene è amplificato o iper-espresso. Nei tumori mammari questa iper-espressione è legata ad una prognosi peggiore (FISH- Herceptin). ^g ⁴ È un fattore predittivo di risposta ai farmaci anti-HER2 e verosimilmente di resistenza alla terapia endocrina. È estremamente importante che la determinazione venga effettuata in laboratori accreditati, oltre all'immunoistochimica viene eseguita l'ibridazione in situ (in situ hybridization, ISH, tipicamente in fluorescenza, nota come FISH), che misura l'amplificazione del gene.

Recettori per ormoni steroidei ER e PR: Sono recettori per i fattori di crescita intranucleari. Con la produzione di anticorpi monoclonali anti ER e PR aumenta enormemente la sensibilità per la loro rilevazione nei tumori. È importante definire lo stato sia dei recettori estrogenici che progestinici e riportare la percentuale delle cellule positive che deve essere valutata come una variabile quantitativa continua. Le nuove raccomandazioni dell'ASCO per la determinazione IHC dei recettori ormonali considerano positivi i tumori con almeno 1% di cellule positive. Esiste una correlazione tra i livelli di positività dei recettori e i benefici ottenuti con i trattamenti ormonali sia nella malattia metastatica che nel setting adiuvante e neoadiuvante. I tumori con elevati livelli di recettori sono quelli che hanno maggiori probabilità di beneficiare di una terapia endocrina anche se molti altri fattori possono influenzare l'ormono-responsività dei tumori come lo stato di HER2, il grado istologico ed il Ki67 ⁵.

Recettori di membrana: Il PD-1 è un recettore presente sulla superficie dei linfociti T attivati (attivati da un processo di infiammazione cronica che si verifica nelle infezioni croniche o nel cancro). Programmed death-ligand 1 (PD-L1) è una proteina (codificata dal gene CD274) che si trova sulla membrana delle cellule immunitarie e delle cellule tumorali. In seguito al legame di PD-L1 con il recettore PD-1 risulta essere inibita l'attività immunitaria attraverso l'inibizione della proliferazione dei linfociti T e della produzione di interleukina-2 ^d.

Nel caso di tumori metastatici e/o scarsamente differenziati la determinazione dell'esatto tipo di tumore con l'impiego della colorazione ematossilina-eosina (H&E) standard su tessuti fissati in formalina può

essere difficile. L'IHC fornisce un metodo relativamente rapido e semplice per determinare più precisamente l'origine del tessuto neoplastico e indagare il comportamento o la progressione di una certa neoplasia^h.

Biologia Molecolare

Stato dei linfonodi ascellari: La positività dei SNL rappresenta il principale fattore prognostico negativo anche se è un dato da valutare unitamente agli altri fattori prognostici. La positività dei linfonodi ascellari è considerata indicativa del fatto che il tumore possa aver iniziato una diffusione sistemica ed è quindi più probabile l'esistenza in sedi periferiche di micro-focolai metastatici, sebbene non ancora rilevabili radiologicamente e clinicamente. Per tali ragioni le pazienti con linfonodi positivi > 4 all'esame istologico vengono indirizzate ad un trattamento farmacologico chemioterapico sistemico precauzionale ed eventualmente anche radioterapia. Nelle pazienti con un numero di linfonodi coinvolti da 1 a 3 si considerano gli altri fattori prognostici (dimensione del tumore, grado, recettori ormonali, indice proliferativo e invasione vascolare).⁵ La biopsia del SNL è l'approccio standard per i pazienti che presentano un'ascella clinicamente negativa e si sottopongono alla chirurgia al seno conservativa. L'amplificazione in singola fase degli acidi nucleici (OSNA) è una metodica di diagnostica molecolare svolta dal TSLB in biologia molecolare che permette l'analisi automatizzata dell'intero tessuto linfonodale. Il linfonodo è una struttura circondata da una capsula connettivale, interposta lungo i vasi del sistema linfatico. La sua funzione è la difesa immunitaria dell'organismo essendo il sito di produzione degli anticorpi (Figura 4)ⁱ.

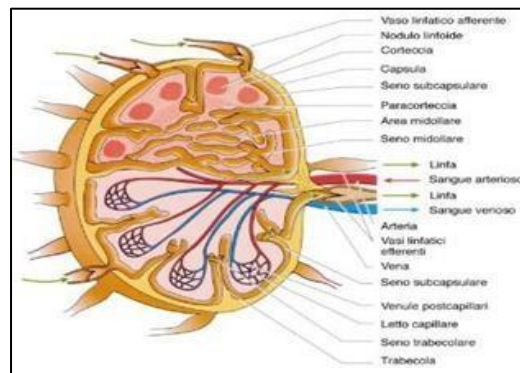


Figura 4- Il SNLⁱ

Il SLN è la prima stazione di drenaggio linfonodale dalla sede del tumore e viene di norma prelevato dal medico chirurgo per essere esaminato al fine di stabilire quali pazienti necessitino di una dissezione ascellare linfonodale completa, perché è la sede più probabile di metastasi linfonodali.

Nei sistemi tradizionali di IHC, il SNL viene esaminato durante l'intervento chirurgico dall'anatomo patologo attraverso l'analisi al microscopio con tecnica intraoperatoria, o in alternativa viene esaminato, sempre al microscopio, con tempistiche più lunghe che richiedendo la necessità di procedere, in caso di positività, con un secondo intervento chirurgico.^j Questa metodica prevede la colorazione H&E rapida manuale (esame estemporaneo) o la colorazione della Citocheratina 19 (CK19) con IHC (Figura 5).

Il CK19 è un marcatore cellulare epiteliale e normalmente non è presente all'interno del tessuto linfonodale, ma rileva la presenza anche di poche cellule tumorali. CK-IHC analizza solo una limitata quantità di tessuto fornendo così un'informazione parziale che potrebbe non rispecchiare la reale massa metastatica⁶.

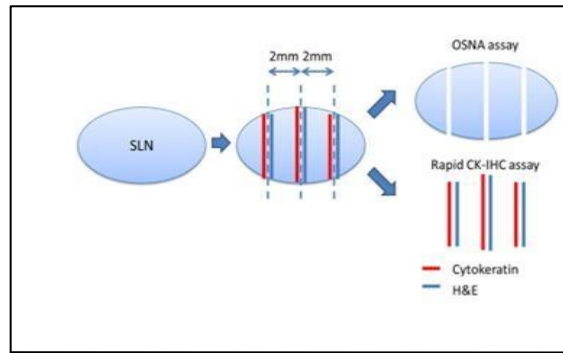
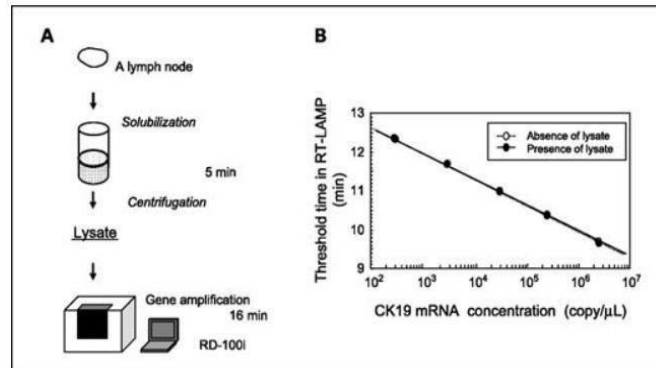


Figura 5- Preparazione del SLN: le metodiche a confronto⁶

La metodica OSNA è un sistema automatizzato a ciclo chiuso per l'individuazione rapida e in un'unica fase della quantità di mRNA ^k di CK19 (SCHEMA A-B), che consiste nella solubilizzazione di un linfonodo seguito da un ciclo di trascrizione inversa mediato dall'amplificazione isoterma (RT-LAMP) di un mRNA bersaglio e assenza di amplificazione del DNA genomico⁶. I risultati sono espressi in numero di copie di mRNA di CK19/ μ l. La procedura per effettuare la metodica OSNA viene fatta in ghiaccio. Il linfonodo, dal peso compreso tra 20mg e 600mg, viene omogeneizzato in 4 ml di tampone di lisi. Viene prelevato 1ml di omogenato e centrifugato.

Si prelevano 500 μ l di lisato linfonodale di cui 20 μ l vengono aggiunti a 180 μ l di tampone di lisi. Del campione ottenuto 2 μ l vengono sottoposti alla reazione RT-LAMP⁷.



Schema A-B: Metodica OSNA.

A: diagramma schematico della procedura OSNA.

B: curva standard dell'mRNA di CK19 umana misurata da RD-100 in presenza e in assenza di li-sato linfonodale.⁷

In Piemonte è stata messa a confronto la metodica OSNA con quella CK-IHC (Tabella 1)⁷.

	TOTAL CASES		NEGATIVE and ITC				MICROMTS		MACROMTS	
	OSNA(%)	NON OSNA(%)	OSNA	NON OSNA			OSNA (%)	NON OSNA (%)	OSNA (%)	NON OSNA (%)
			Neg (%)	Neg (%)	ITC (%)	Neg + ITC (%)				
Number of cases	110 (100)	169 (100)	78 (71)	112 (66)	11 (7)	123 (73)	20 (18)	13 (8)	12 (11)	33 (20)

Tabella 1- I casi negativi OSNA erano paragonabili ai casi negativi determinati dall'istologia standard (negativo + ITC).⁷ Le micro-metastasi OSNA erano superiori a quelle determinate dallo standard seguendo la procedura (χ^2 7.0; $P < 0.01$). Le macro-metastasi erano inferiori ma non erano significativamente diverse da quella determinata dall'istologia⁷. La metodica OSNA è stata presa come gold standard per l'analisi del linfonodo sentinella in toto e per permettere una valutazione sulla terapia da intraprendere.

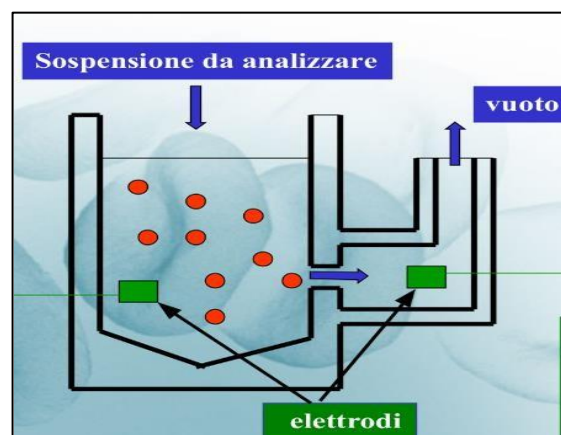
Laboratorio Analisi

La valutazione e l'analisi ematologica del sangue periferico forniscono importanti indicazioni cliniche e diagnostiche dei suoi principali componenti. A seconda delle esigenze si possono eseguire esami di routine per il follow up. L'analisi ematologica comprende 4 fasi principali:

1. Raccolta e preparazione del campione di sangue periferico;
2. Determinazione della conta ematica completa;
3. Definizione della conta differenziale dei leucociti;
4. Striscio su vetrino per potenziali anomalie morfologiche.

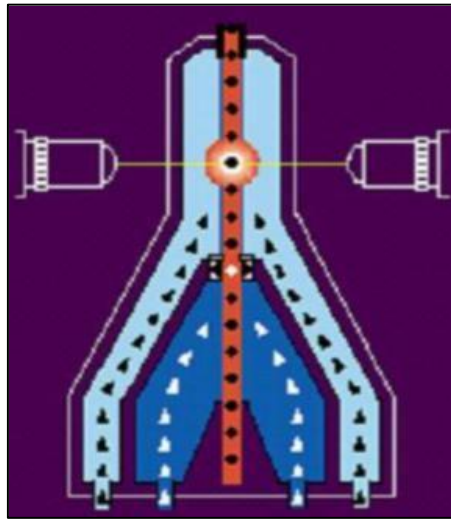
Principi di Misura dei sistemi PENTRA Emocromo:

- Conteggio di globuli rossi (RBC), globuli bianchi (WBC), piastrine (PLT), basofili;
- Variazione di Impedenza Differenziazione Leucocitaria;
- Variazione di Impedenza: Analisi volumetrica delle cellule allo stato nativo;
- Assorbanza: Analisi della complessità cellulare previa colorazione citochimica¹.



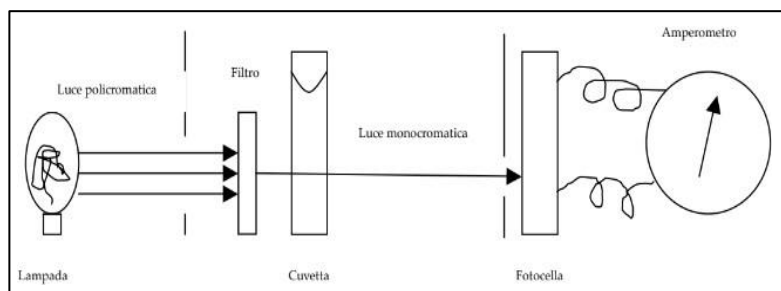
Schema C - Sistema di misura di impedenza¹

Questo sistema (*Schema C*) riassume il metodo di riferimento per la conta delle cellule, fornisce l'esatto volume cellulare e analizza le cellule allo stato nativo ¹.



Schema D - Camera Termostata con specifico reagente (LMNE) ¹

Nella camera avviene la colorazione, la misura dell'assorbanza e una doppia focalizzazione idrodinamica con conteggio e misura del volume tramite resistività (*Schema D*). Gli apparecchi utilizzati per compiere le misure necessarie per gli esami di chimica clinica sono i fotometri (selettore di λ a filtri) o gli spettrofotometri (selettore di λ a prisma o reticolo). Il loro schema di funzionamento è di seguito riportato (*Schema E^m*).



Schema E - Funzionamento Spettrofotometro ^m

La luce policromatica (bianca) emessa dalla lampada passando attraverso il filtro è resa monocromatica (colore complementare a quello da leggere). Il raggio monocromatico, attraversando la soluzione contenuta nella cuvetta di lettura, è parzialmente assorbito. Il raggio emergente (non assorbito) colpisce la fotocella che trasforma in corrente elettrica l'energia luminosa del raggio incidente su di essa secondo un rapporto di proporzionalità diretta; la corrente elettrica è misurata da un milliamperometro ^m.

Farmacia

L'impatto della presenza delle cellule tumorali isolate (ITC) o di micro-metastasi nel linfonodo sentinella sulla prognosi non viene considerato rilevante (*Tabella 2*)⁸.

Stage	Ovarian Suppression	Type and duration of endocrine therapy	Chemotherapy
Stage 1	T1ab T1c	No OFS No OFS	No Individualized decision based on: T size, N status, histological subtype, LVI, grade, proliferation, quantitative hormone receptor expression, genomic signatures, and patient preferences
Stage 2	Node-negative Node-positive	OFS and AI/tam for higher risk historically warranting chemo (e.g large T, age < 35, high grade, adverse gene signature) OFS and AI/tam	• AI preferred as initial therapy. • Extended therapy favored (especially after initial 5 years of tamoxifen) • AI based. • Extended therapy.
Stage 3	OFS and AI/tam	• AI based. • Extended therapy.	Yes

^aSome consider OFS along same criteria as stage 2, node-negative.
AI, aromatase inhibitor; Tam, tamoxifen; LVI, lymphovascular invasion; OFS, ovarian function suppression.

Tabella 2- Terapia sistemica per HER2-positivo o triplo negativo nei casi di tumore al seno⁸

Nei pazienti con linfonodi clinicamente positivi si consiglia di fare una dissezione ascellare di completamento, viceversa possono essere asportati solo i linfonodi positivi, se individuati (*Tabella 3*)⁹.

Stage	Tumor Subtype		
		HER2+	TNBC
Stage 1	T1a	TH – case by case	Chemotherapy – case by case
Typically as adjuvant therapy	T1b	TH	TC chemo
	T1c	TH	AC/T chemo
Stages 2 and 3		AC TH (± P) or TCH (± P) Consider neratinib in N2, ER+ tumors not receiving P	AC/T chemotherapy ± platinum ^a
Neoadjuvant therapy is preferred			
Residual invasive cancer after NST		Trastuzumab emtansine	capecitabine

N2 = 4+ positive lymph nodes.
^aSome panelist prefer including platinum-based chemotherapy in women with BRCA1/2 associated breast cancers though data for this are inconsistent.
H, trastuzumab; P, pertuzumab; A, anthracycline chemotherapy; Cb, carboplatin chemotherapy; C, cyclophosphamide chemotherapy; T, taxane chemotherapy.

Tabella 3- Terapia sistemica per ER+ HER2- nei casi di tumore al seno⁹

La preparazione delle terapie antineoplastiche per il CA viene effettuata in ambienti dedicati denominati UFA (Unità Farmaci Antiblastici), ossia camere bianche ad atmosfera controllata, sterili e protette, istituite come luoghi deputati a queste preparazioni grazie al Provvedimento n° 236 del 5 agosto 1999.¹⁰ L'allestimento viene effettuato in cappa a flusso laminare verticale o in isolatore. Vengono indossati i DPI richiesti dalla normativa vigente per la sicurezza dell'operatore esposto a farmaci antineoplastici^{10;11}. Per le diluizioni e il prelievo dei farmaci vengono utilizzati dei sistemi a due vie con filtro in linea. Nella pratica clinica, la valutazione immunoistochimica dello stato dei recettori ormonali, del Ki67 e di HER2, permette di identificare in maniera surrogata i seguenti sottogruppi fenotipici di CA che presentano una “relativa” corrispondenza con i derivati dai profili di espressione genica. I gruppi immunofenotipici di rilevanza clinica e con implicazioni terapeutiche importanti, anche a livello di terapia adiuvante, sono:

- Luminali A: recettori ormonali positivi, HER2 negativo e bassa attività proliferativa (di cui fanno parte frequentemente alcuni istotipi speciali quali carcinoma tubulare e carcinoma lobulare tipo classico). Secondo la Consensus di San Gallen 2013 i tumori mammari Luminali A sono rappresentati dai tumori con recettori estrogenici positivi, con recettori progestinici positivi con valore di positività superiore al 20%, con HER2 negativo e basso Ki67 (cut off 20% e non più 14% come riportato nella Consensus 2009);
- Luminali B/HER2 negativi: recettori ormonali positivi, HER2 negativo ed alta attività proliferativa;
- Luminali B/HER2 positivi: recettori ormonali positivi, HER2 sovraespresso (score 3+ delle reazioni di immunoistochimica) o amplificato, qualsiasi valore di attività proliferativa;
- HER2 positivi (non luminali): HER2 sovraespresso (score 3+ delle reazioni di immunoistochimica) o amplificato (FISH o altre metodiche) ed entrambi i recettori ormonali negativi. Tumore di dimensioni più grandi, interessamento dei linfonodi ⁵;
- Triplo-negativi: Il carcinoma mammario triplo negativo (TNBC) è un sottotipo di carcinoma mammario caratterizzato dalla mancanza di estrogeni, progesterone e recettore 2 del fattore di crescita epidermico umano (HER2). Il TNBC insorge principalmente nelle giovani donne e rappresenta circa il 10-15% di tutti i tumori al seno. Il TNBC è generalmente un carcinoma metastatico altamente aggressivo, che mostra un alto tasso di mortalità e recidiva. Inoltre, i pazienti con TNBC identificati dal classificatore di rete WNT/ β -catenina hanno un rischio maggiore di metastasi ¹².

Risultati

Anatomia Patologica

L'utilizzo di uno strumento automatizzato, come il "Benchmark Ultra Ventana", permette la standardizzazione della metodica, quindi non si riscontra nessuna difficoltà di tipo tecnico, rispetto alla colorazione manuale in urgenza H&E che obbliga il TSLB a rispettare scrupolosamente i tempi di colorazione. La parte iniziale più complicata è la "messa a punto" degli anticorpi presi in esame. Una volta individuato il tempo di incubazione la metodica è standard. I markers e i recettori individuati hanno un tempo di incubazione variabile da 5 a 15 min. I risultati vengono successivamente interpretati al microscopio ottico a diversi ingrandimenti dall'anatomo-patologo ¹³.

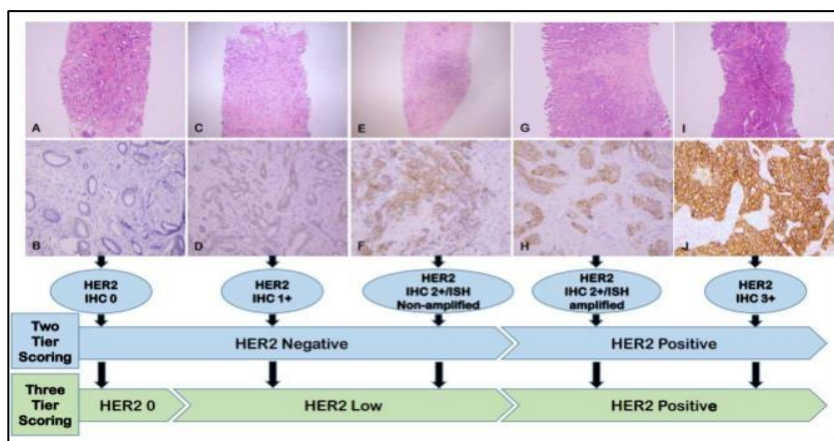


Figura 6- Differenza di score tra HER2 negativo, dubbio e positivo. H&E e IHC a confronto¹³

La presenza di recettori HER2 sulla membrana cellulare tumorale viene evidenziata con una IHC che determina una colorazione che assumerà una diversa graduazione a seconda della “ricchezza” di recettore HER2 presente: 0 (test negativo), 1+ (test negativo), 2+ (test dubbio), 3+ (test positivo) (Figura 6)^d. La valutazione di PD-L1 nelle cellule tumorali da CA viene effettuata utilizzando un metodo IHC: Ventana PDL1-SP142.

Per valutare PD-L1 nelle cellule immuni si calcola la percentuale dell’area di tumore occupata da cellule immunitarie con colorazione PD-L1 di qualsiasi intensità rispetto all’area totale della neoplasia includendo qualsiasi colorazione di cellule immunitarie, indipendentemente dal tipo di cellule o dalla localizzazione (Figura 7)^d.

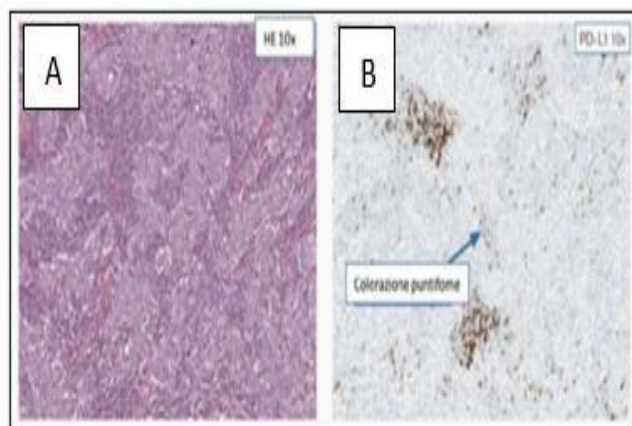


Figura 7- A Colorazione del BC con H&E. B Colorazione delle cellule immunitarie che infiltrano il BC con IHC^d

MIB-1 è un anticorpo monoclonale che identifica la proteina Ki-67 nel tessuto paraffinato: la colorazione permette di poter definire la percentuale di cellule tumorali in attività proliferativa. Tale percentuale viene indicata nel referto anatomico-patologico con la sigla Ki-67 o MIB-1 (Figura 8). Nei carcinomi mammari triplo negativi più frequentemente si riscontra una elevata percentuale di cellule proliferanti (alti valori di Ki-67/Mib-1)^d.

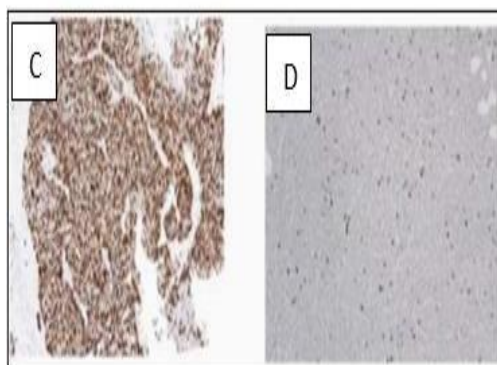


Figura 8- C) BC duttale infiltrante: Ki-67 presente nel 95% delle cellule tumorali alto.

D) Ki-67 presente nel 5% delle cellule tumorali basso^d

Biologia Molecolare

La metodica CK-IHC e la metodica OSNA hanno capacità diagnostiche comparabili nelle valutazioni intraoperatorie per le metastasi da SNL ¹⁴. In alcune realtà italiane il metodo CK-IHC viene preferito, rispetto al metodo OSNA, perché in presenza di un numero basso di campioni questo metodo risulta meno dispendioso. La tecnica OSNA, alternativa all'indagine microscopica tradizionale, permette in fase intraoperatoria di analizzare il SNL con tecnica automatizzata molecolare (ha il vantaggio di essere scarsamente influenzata dall'operatore). Si tratta di una procedura molecolare in quanto è in grado di rilevare e dosare una molecola (mRNA) che codifica per proteine espresse nel carcinoma della mammella e mai rilevabili in linfonodi non metastatici.

Permette, quindi, di riconoscere il tumore quando è presente ⁿ, non lascia spazio a falsi positivi e negativi con elevata accuratezza diagnostica. La tecnica OSNA, rispetto a quella tradizionale IHC, è maggiormente riproducibile e standardizzabile, non viziata dalla soggettività dell'operatore e ha una valenza diagnostica certificata a livello internazionale. Le tempistiche indicate per OSNA sono intorno ai 35-40 min ^j di cui 23 min dello strumento, i restanti minuti riguardano la preparazione del SNL. 15 min per l'analisi di un singolo SNL, aumenta a 30 min per 14 SNL. ^j I risultati di un saggio OSNA definiscono le tre categorie diagnostiche:

- -: numero di copie di CK19 (cCP/μl) < 250, linfonodo negativo;
- +: numero di copie di CK19 (cCP/μl) compreso tra 250 e 4999, presenza di micro-metastasi;
- ++: numero di copie di CK19 (cCP/μl) ≥ 5000, presenza di macro-metastasi ⁵.

Laboratorio Analisi

Prima dell'inizio del trattamento antineoplastico devono essere effettuati esami ematochimici completi per la valutazione della riserva midollare, la funzionalità epatica e renale: emocromo con formula, sodio, potassio, creatinina, azotemia, alt, ast, bilirubina. Il TSLB che lavora nel laboratorio analisi deve garantire le migliori performance relativamente alla strumentazione utilizzata (esecuzione calibrazioni, controlli, manutenzioni e utilizzo di reattivi idonei), fornire i risultati nel più breve tempo possibile, verificare se gli stessi rientrano nel range di normalità e segnalare valori che necessitano di particolare

attenzione. I tempi di refertazione variano da 15 minuti a 30 minuti. Talvolta attraverso gli esami eseguiti viene evidenziato un livello troppo basso di WBC e/o PLT oppure una sofferenza dei reni o del fegato legata alle cure. In tali casi i medici oncologi possono decidere di allungare gli intervalli tra un trattamento e l'altro o ad abbassare le dosi dei farmaci prescritti. Ogni seduta è seguita da un periodo di riposo variabile da qualche giorno a qualche settimana per consentire all'organismo di smaltire gli effetti collaterali del trattamento e permette alle cellule ematiche di rientrare nei valori di normalità. Il completamento dei cicli antineoplastici standard per il trattamento della malattia può richiedere diversi mesi ¹¹.

Farmacia

La preparazione delle terapie oncologiche viene effettuata in ambienti dedicati denominati UFA. In Italia, la Raccomandazione Ministeriale n°14 ¹⁵ e le raccomandazioni SIFO ¹⁶ sono le principali fonti bibliografiche per il rispetto dei requisiti fondamentali delle preparazioni antineoplastiche.

Accanto a queste esistono dei pilastri normativi europei ed internazionali riguardanti gli standard tecnici dei locali nei quali allestire questi preparati sterili, tra cui le GMP ¹⁷, la Farmacopea Ufficiale con le norme di buona preparazione¹⁸, le normative dell'International Organization for Standardization (ISO) ¹⁹ e le Linee Guida (Quapos) della European Society of Oncology Pharmacy (ESOP) ²⁰.

All'interno delle UFA lavora personale adeguatamente formato: il percorso di formazione deve essere specifico, continuo e sistematico affinché tutti gli operatori sanitari mantengano le appropriate conoscenze e abilità definite secondo i diversi profili professionali ¹², ⁶.

I compiti dei preparatori di farmaci antitumorali, che lavorano in stretta collaborazione con i farmacisti oncologici sono:

- Conoscenza delle tecniche generali di preparazione, delle norme della Farmacopea (FUI) in vigore pertinenti la propria attività e Linee-Guida applicabili, fattori di contaminazione nelle aree critiche, fattori inerenti il rischio per il personale, requisiti e metodiche per il monitoraggio ambientale, metodiche ed uso dei dispositivi medici nella pratica della preparazione, controllo dei calcoli delle formulazioni, concentrazioni, stabilità ed incompatibilità dei componenti sterili, caratteristiche chimiche dei prodotti impiegati nella preparazione, conoscenza delle procedure informatiche utilizzate nel laboratorio e nozioni sulle caratteristiche delle apparecchiature e dei dispositivi in uso durante la preparazione.

Procedure

L'operatore che utilizza i farmaci chemioterapici (CTA) deve essere munito dei dispositivi di protezione individuale (DPI) in riferimento al D.Lgs 81/08 ¹¹ che impone l'applicazione di misure preventive per la loro manipolazione. Nella fattispecie l'operatore dovrà essere munito di:

- Guanti;
- Camici;
- Mascherine;
- Occhiali E Visiere;
- Cuffie;
- Soprascarpe;
- Pantaloni o tute⁰.

Preparazione del campo di manipolazione e del farmaco:

- Per il processo di diluizione è indispensabile elaborare una modulistica standard che sia di facile comprensione in ogni parte, completa di ogni riferimento ai farmaci e che permetta la completa tracciabilità di ogni atto che accompagna il farmaco (foglio di lavoro). Il foglio di lavoro deve essere chiaro, con le informazioni utili alla manipolazione del farmaco.
- Per ogni cappa a flusso laminare verticale o isolatore deve essere presente un operatore diluitore detto “preparatore” ed un operatore di supporto. Quest’ultimo consegna il materiale idoneo per la preparazione del farmaco.
- La manipolazione del farmaco antineoplastico è la fase più critica. Per questa ragione È fortemente sconsigliato l’utilizzo di aghi, favorendo ove possibile l’utilizzo di sistemi a circuito chiuso (CSTD), in modo tale da ridurre notevolmente il rischio di contaminazione (liquidi o aerosol) da parte del personale. Tutti i dispositivi utilizzati devono essere Luer Lock (LL).
- L’ingombro dei dispositivi sotto cappa deve essere minimo, al fine di non confondere l’operatore durante le fasi a rischio, pertanto è necessario scegliere accuratamente i dispositivi più sicuri da utilizzare.
- Durante la ricostituzione di un farmaco in polvere, perforare il flacone centralmente ed iniettare lentamente lungo la parete il volume di liquido necessario. Accertarsi che la polvere sia completamente passata in soluzione prima di passare allo step successivo.
- Il volume da prelevare deve essere verificato dall’operatore di supporto prima di essere iniettato nel contenitore finale. ^p
- Per mantenere la sterilità e garantire la sicurezza non deve essere toccata la punta della siringa e l’attacco LL. Per garantire la sicurezza degli operatori il volume da prelevare non deve superare i $\frac{3}{4}$ della siringa utilizzata. ^o
- L’ulteriore diluizione del farmaco dalla siringa alla sacca del paziente deve avvenire con dispositivi che proteggano l’operatore da eventuali spandimenti accidentali.

Tempistiche di allestimento

Partendo dai risultati ottenuti sulle tempistiche di diluizione e ricostituzione presso l’Azienda Sanitaria Locale CN2 Alba-Bra sede Verduno (ASL CN2) in isolatore ²¹, si è deciso di effettuare le medesime misurazioni nelle Aziende Ospedaliere ASU FC Udine Centrale (ASU FC) ed IRCSS CRO di Aviano (CRO) ²² per un confronto ed una valutazione incrociate.

I farmaci presi in esame sono quelli più frequentemente utilizzati per la cura del CA sia in forma liofila che concentrata (*Grafico 1-2*).

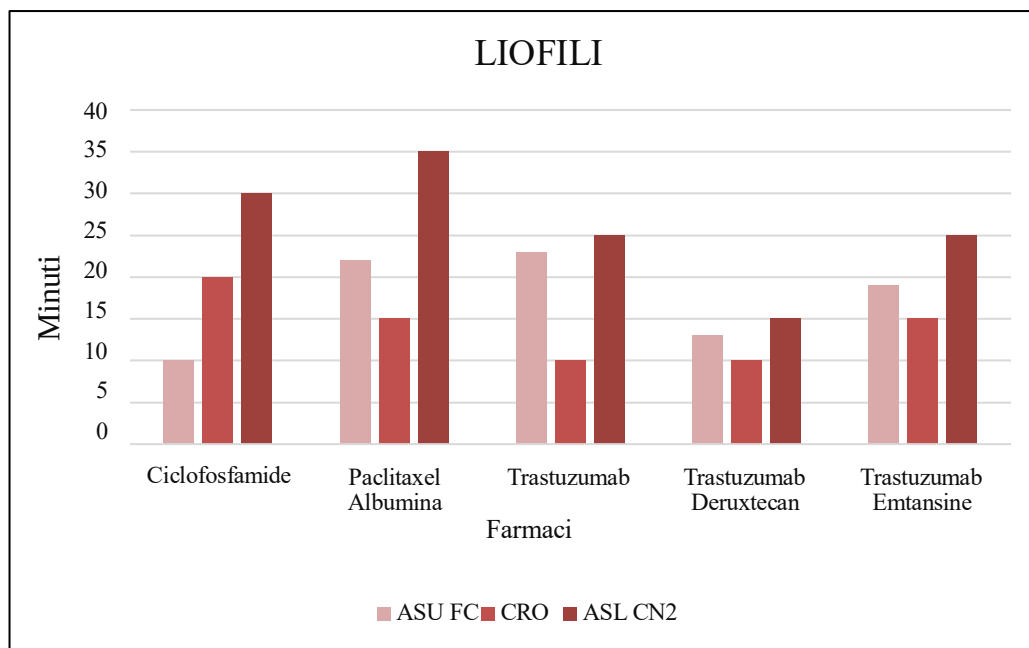


Grafico 1 - Tempo di ricostituzione, espresso in minuti, per ognuno dei farmaci liofilici presi in esame da ASL CN2, ASU FC e CRO^{21,22}

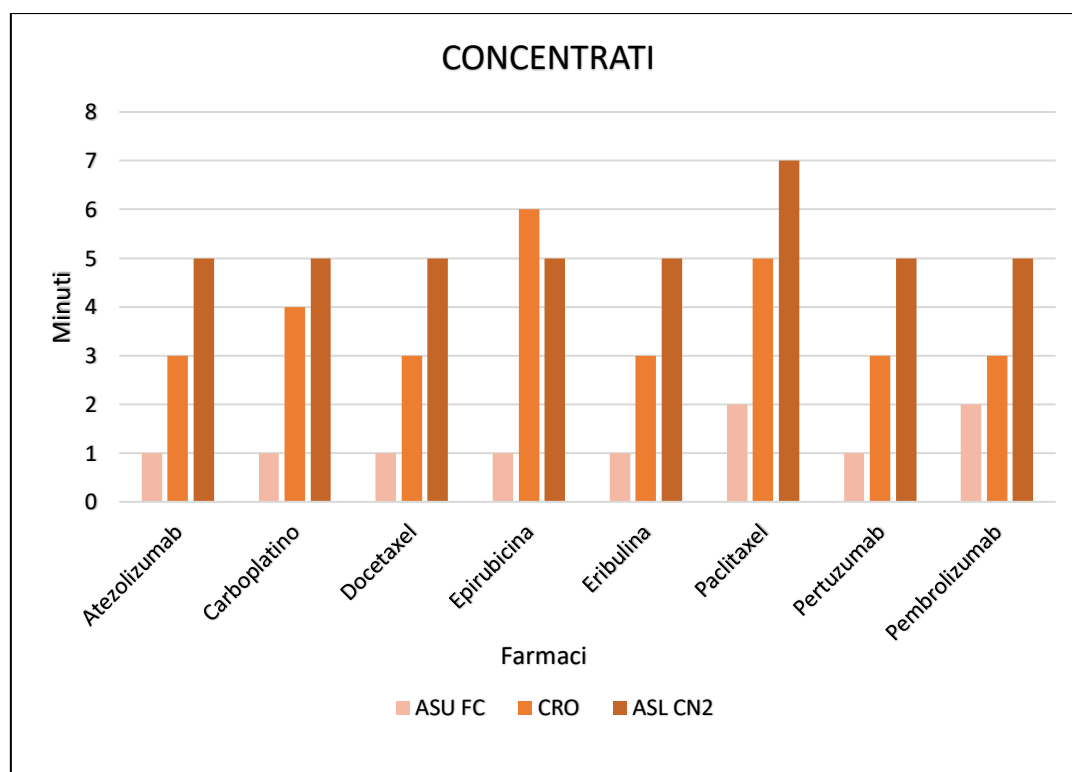


Grafico 2 - Confronto tra farmaci concentrati presi in esame da ASL CN2, ASU FC e CRO^{21,22}

L'allestimento delle terapie e quindi i dati riportati tengono conto di:

- Tempistiche di ricostituzione/diluizione;
- Etichettatura o scrittura a mano sul flacone con l'ausilio di un pennarello da Clean Room;
- Deflussare la sacca con un codino (con o senza filtro 0,2 micron) o deflussore;
- Prelievo ed eliminazione del volume di diluente corrispondente a quello del farmaco da inserire;
- Inserimento del farmaco in sacca con avvinamento (LL);
- Controllo della tenuta della sacca;
- Controllo della presenza o assenza di particolati o precipitati.

I farmaci che necessitano di un deflussore o con filtro in linea sono: Trastuzumab Deruxtecan, Trastuzumab Emtansine, Paclitaxel Albumina o Pembrolizumab. Questi farmaci necessitano di qualche secondo in più per pre-riempire il filtro o deflussore con il diluente. Sono stati utilizzati come dispositivi di sicurezza con l'attacco LL. L'unico farmaco che necessita di essere agitato con forza è la Ciclofosfamide, mentre gli altri farmaci liofilici necessitano di riposo fino a completa dissoluzione della polvere. I farmaci concentrati, invece, richiedono tempi di preparazione più brevi. Le tempistiche di allestimento nella ASL CN2 sono risultate più lunghe (GRAFICO 1-2) a causa dell'isolatore, che richiede obbligatoriamente l'utilizzo di entrambi gli arti in simultanea e con una pressione negativa all'interno dello stesso, ma a differenza della cappa, l'isolatore è un sistema chiuso di grado A. Presso le farmacie di ASU FC e del CRO invece, sono state utilizzate delle cappe a flusso laminare verticale.

I protocolli presi in esame in ASL CN2 per i farmaci antineoplastici utilizzati per curare pazienti con HER2 positivo (*Tabella 2*) sono:

- Trastuzumab (25 min)
- Trastuzumab con Pertuzumab ($25+5 = 30$ min)
- Trastuzumab con Paclitaxel ($25+7 = 32$ min)
- Trastuzumab con Paclitaxel con Carboplatino ($25+7+5 = 37$ min)
- Trastuzumab, Pertuzumab Paclitaxel ($25+5+7 = 37$ min)
- AC (Adriamicina e Ciclofosfamide) ($5+30 = 35$ min)
- Trastuzumab Emtansine (25 min)
- Trastuzumab Deruxtecan (15 min).

I farmaci orali consigliati sono Capecitabina con Lapatinib, Capecitabina con Tucatinib. La gestione della terapia orale è responsabilità esclusiva del farmacista. Le aziende di ASU FC e del CRO hanno verificato la durata di preparazione delle terapie HER2 positivo con allestimento in cappa (*Grafico 3*).

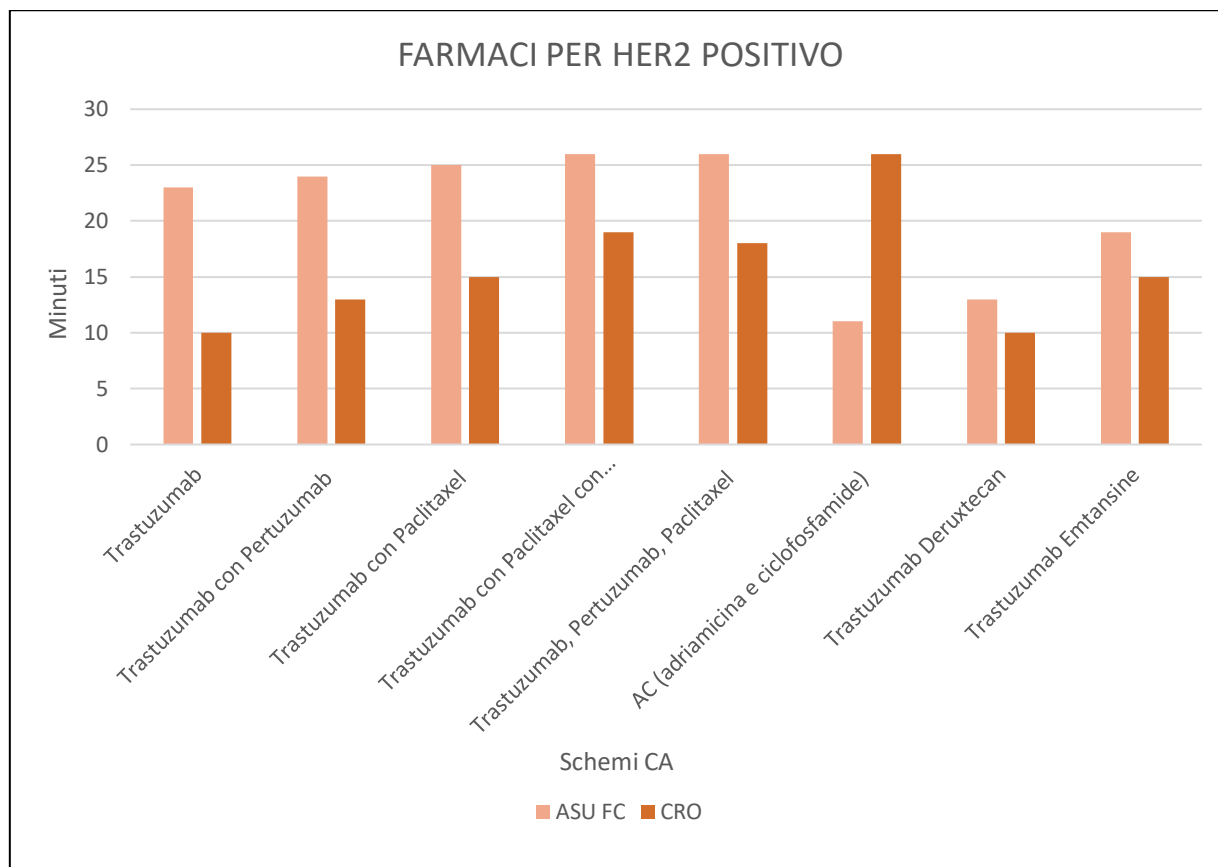


Grafico 3 - Schemi a confronto per HER2 positivo presi in esame da ASU FC e CRO

Le tempistiche per i farmaci antineoplastici utilizzati per curare pazienti con TNBC (Tabella 2) sono:

- TC (Docetaxel e Ciclofosfamide) (5+30= 35 min);
- AC (Adriamicina e Ciclofosfamide) (5+30= 35 min);
- EC (Epirubicina e Ciclofosfamide) (5+30 =35 min);
- Paclitaxel e Carboplatino (7+5=12 min);
- Paclitaxel (7 min);
- Paclitaxel Albumina (35 min);
- Atezolizumab (5 min);
- Atezolizumab con Paclitaxel Albumina (5 + 35 = 40 min);
- Pembrolizumab, Paclitaxel e Carboplatino (5+7+5= 17 min);
- Sacituzumab Govitecan non presente.

Le aziende di ASU FC e del CRO hanno verificato la durata di preparazione delle terapie TNBC con allestimento in cappa (Grafico 4). Solamente il Cro ha dichiarato un tempo di allestimento di 20 min del Sacituzumab Govitecan. Per stadi avanzati viene utilizzato l'Eribulina.

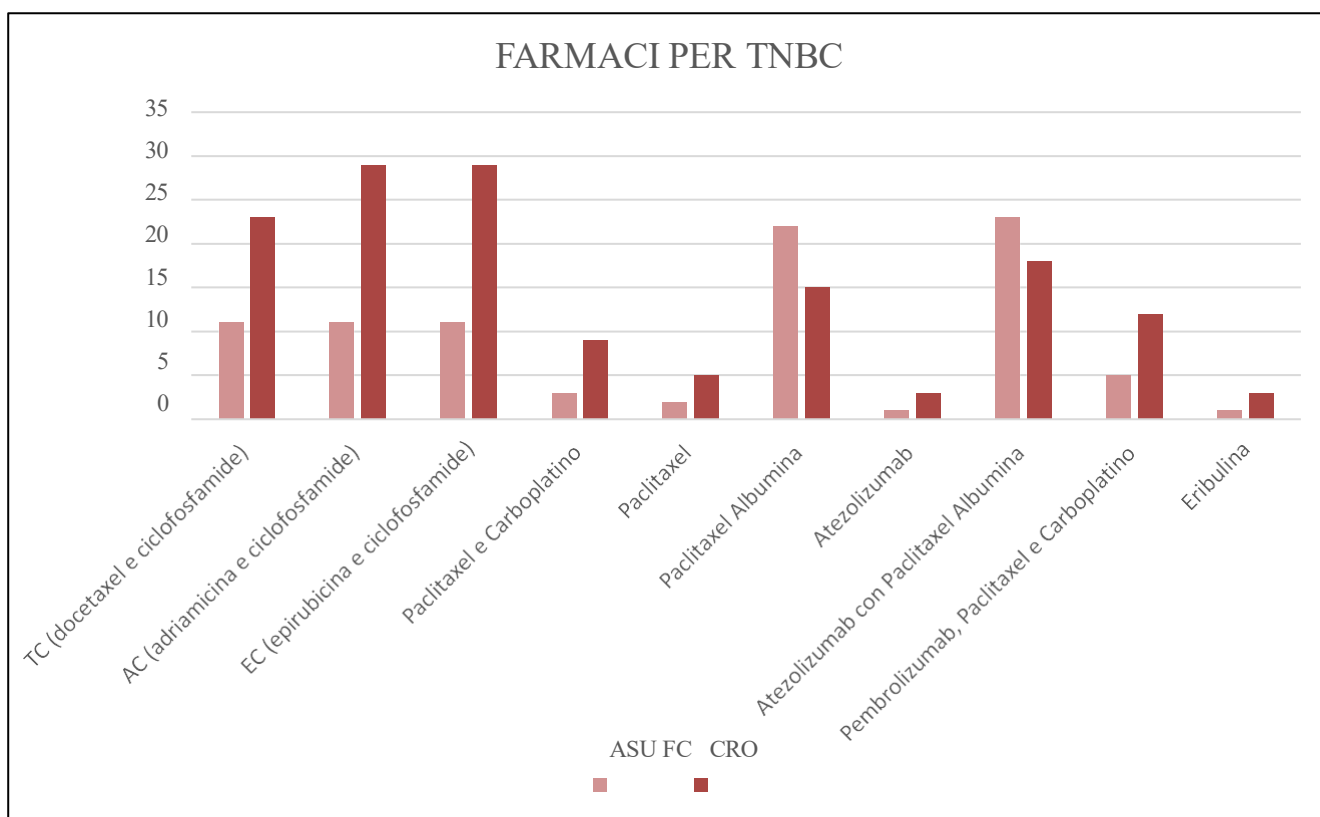


Grafico 4 - Schemi a confronto per TNBC presi in esame da ASU FC e CRO

È stato effettuato anche un confronto tra ASU FC e CRO per i farmaci per HER2+ (*Grafico 3*) e per TNBC (*Grafico 4*). Le variazioni riscontrate sono riconducibili ai tempi di ricostituzione dei diluiti per il CRO che risultano inferiori rispetto a quelli di Udine.

In tutte e tre le farmacie le diluizioni sono state effettuate sempre con la collaborazione di un operatore di supporto che ha cronometrato le terapie.

Non sono state tenute in considerazione le tempistiche pre e post diluizione, poiché queste variano a seconda del laboratorio (utilizzo di sistemi informatici differenti e preparazione o meno di terapie ancillari).

Confrontando le tempistiche di allestimento delle ricostituzioni e delle diluizioni dei farmaci maggiormente utilizzati per il CA presso ASL CN2, ASU FC, CRO si riscontrano delle differenze:

- l'utilizzo dell'isolatore, che richiede obbligatoriamente l'uso di entrambi gli arti in simultanea e con una pressione negativa all'interno dello stesso, aumenta le tempistiche di diluizione rispetto alle cappe a flusso laminare verticale;
- le ricostituzioni tra il CRO e ASU FC variano in termini di tempistica a seconda delle modalità operative utilizzate presso i propri laboratori.

Conclusioni

Alla luce dei sopraelencati compiti svolti dal TSLB nel PDTA del BC, si evincono:

- Il valore dell'opera prestata dal TSLB nei diversi laboratori citati;
- La necessità di formazione adeguata e specifica attraverso la partecipazione a corsi di formazione extra universitari e relative certificazioni (OSNA), congressi, convegni e seminari multidisciplinari;
- La necessità di linee guida uniformi per i professionisti che operano nelle UFA al fine di ridurre la variabilità negli outcome; uniformare
- La necessità di allineare le tempistiche di allestimento delle terapie antineoplastiche e uniformare le modalità di preparazione del campione (IHC e OSNA);
- La necessità di adeguare le unità di personale e/o i locali in base al numero di preparati in ogni Azienda Ospedaliera.

Nel campo della profilazione genomica e dei test genetici il TSLB sta consolidando ogni giorno sempre di più il suo ruolo. Il profilo di espressione genica prevede la determinazione qualitativa e quantitativa dei geni trascritti, in un momento specifico, nella cellula o nel tessuto esaminato. I clusters dei geni possono essere raggruppati in base a profili di espressione simili. Questa tecnica permette di distinguere le differenze tra cellule normali e cellule neoplastiche di diversi tumori fornendo dati importanti a scopo prognostico e predittivo.

Le analisi più diffuse per la profilazione genica sono:

- DNA Microarrays;
- RNA-seq;
- qPCR.²³

I test genomici disponibili in commercio sono:

- Oncotype DX;
- MammaPrint;
- Prosigna (PAM-50);
- Endopredict;
- Breast Cancer Index (BCI)^d.

Le pazienti con tumori ER+/HER2- vengono divise in categorie di rischio (prognosi) in base alla presenza o assenza di geni specifici maggiormente legati alla proliferazione. Per la maggior parte dei casi i test vengono svolti in laboratori centralizzati. Potrebbe risultare meno dispendioso e più rapido poter eseguire i test nel proprio laboratorio acquisendo un'idonea strumentazione e formando adeguatamente il personale²³.

Il Decreto del Ministro della Salute, 18 maggio 2021, ai sensi della D.G.R. n. 9-3819 del 24.09.2021, prevede "la modalità di riparto e requisiti di utilizzo del fondo per i test genomici ormono-responsivo per il carcinoma mammario in stadio precoce" e quindi la rimborsabilità degli stessi. Purtroppo l'accessibilità a questi fondi è limitata solo ad un range prestabilito di pazienti²⁴.

Il carcinoma mammario ereditario si manifesta nel 5-10% dei casi. Si ritiene che l'84% di queste forme ereditarie derivi dalla mutazione dei geni BRCA1 e BRCA2^q. L'analisi effettuata tramite metodica Next Generation Sequencing (NGS) è molto lunga e dispendiosa. Vengono utilizzati dei panel con diversi geni da analizzare a seconda della patologia esaminata. Anche in questo caso l'analisi può essere svolta in centri specializzati con personale dedicato e formato²⁵. La rapida evoluzione delle conoscenze sui geni BRCA e delle tecnologie diagnostiche crea le basi per continui cambiamenti nell'approccio e nell'interpretazione dei test.

Bibliografia

1. L. Biganzoli, F. Cardoso, M. Beishon, D. Cameron, L. Cataliotti, C. E. Coles, R. C. Delgado Bolton, M. Die Trill, S. Erdem, M. Fjell, R. Geiss, M. Goossens, C. Kuhl, L. Marotti, P. Naredi, S. Oberst, J. Palussiere, A. Ponti, M. Rosselli Del Turco, I. T. Rubio, A. Sapino, E. Senkus-Konefka, M. Skelin, B. Sousa, T. Saarto, A. Costa, P. Poortmans. The requirements of a specialist breast centre. Elsevier The Breast 51 65-84, 2020.
2. S. Levetti Tesi di Laurea Use of immunohistochemistry for a biological sub-classification of adult medulloblastoma Torino 2014.
3. S. Levetti. P88 Caratterizzazione di tipo biologico del medulloblastoma dell'età adulta. P. 37 2° Congresso nazionale FNO TSRM e PSTRP 2021.
4. J. Metovic, A. Bragoni, S. Osella-Abate, F. Borella, C. Benedetto, M. R. Gualano, E. Olivero, G. Scaioli, R. Siliquini, P. M. Ferrando, L. Bertero, A. Sapino, P. Cassoni, I. Castellano. Clinical Relevance of Tubular Breast Carcinoma: Large Retrospective Study and Meta-Analysis. Front. Oncol., 29 April 2021.
5. AIOM Linee Guida Neoplasia della Mammella 2020.
6. M. Tsujimoto, K. Nakabayashi, K. Yoshidome, T. Kaneko, T. Iwase, F. Akiyama, Y. Kato, H. Tsuda, S. Ueda, K. Sato, Y. Tamaki, S. Noguchi, T. R. Kataoka, H. Nakajima, Y. Komoike, H. Inaji, K. Tsugawa, K. Suzuki, S. Nakamura, M. Daitoh, Y. Otomo, N. Matsuura. One-step Nucleic Acid Amplification for Intraoperative Detection of Lymph Node Metastasis in Breast Cancer Patients. AACR Volume 13, Issue 16 15 August 2007.
7. I. Castellano, L. Macrì, C. Deambrogio, D. Balmativola, R. Bussone, A. Ala, C. Coluccia, A. Sapino. Reliability of whole sentinel lymph node analysis by one-step nucleic acid amplification for intraoperative diagnosis of breast cancer metastases. Annals of surgery Volume 00 Number 00, 2011.
8. G. Masci, R. Aldi, C. Andreoli, A. Caramanica, C. Carnaghi, R. Ceccherini, A. D'Amuri, E. Ferraro, D. Friedman, L. Galletto, G. La Torre, F. Pellini, S. Perrotta, F. Ricci, C. Rossetti, C. Vidali, M. Zuradelli. Terapia medica adiuvante nel Carcinoma Mammario, 2018.
9. H. J. Burstein, G. Curigliano, S. Loibl, P. Dubsy, M. Gnant, P. Poortmans, M. Colleoni, C. Denkert, M. Piccart- Gebhart, M. Regan, H.J. Senn, E. P. Winer, B. Thurlimann & Members of the St. Gallen International Consensus Panel on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2019 Estimating the benefits of therapy for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Consensus Guidelines for the primary therapy of early breast cancer 2019.
10. Documento di linee guida per la sicurezza e la salute dei lavoratori esposti a chemioterapici antiblastici in ambiente sanitario. (Repertorio atti n. 736). (GU Serie Generale n.236 del 07-10-1999).
11. D.LgS. 81/2008.
12. M. Koni, I. Castellano, E. Venturelli, A. Sarcinella, T. Lopatina, C. Grange, M. Cedrino, S. Femminò, P. Cossu-Rocca, S. Orrù, F. D'Ascenzo, I. Cotellessa, C. Tampieri, C. Debernardi, G. Cugliari, G. Matullo, G. Camussi, M. R. De Miglio, M. F. Brizzi Interleukin-3-Receptor- α in Triple-Negative Breast Cancer (TNBC): An Additional Novel Biomarker of TNBC Aggressiveness and a Therapeutic Target Cancers 14, 3918 MDPI 2022.
13. H. Zhang Y. Peng Current Biological, Pathological and Clinical Landscape of HER2-Low Breast Cancer MDPI 2022.
14. H. Shigematsu, S. Ozaki, D. Yasui, J. Zaitso, D. Taniyama, A. Saitou, K. Kuraoka, H. Yamashiro, K. Taniyama Comparison of CK-IHC assay on serial frozen sections, the OSNA assay, and in combination for intraoperative evaluation of SLN metastases in breast cancer Springer Breast Cancer 25:191–197 2018.
15. Raccomandazione n°14, ottobre 2012. Raccomandazione per la prevenzione degli errori in terapia con farmaci antineoplastici.
16. Standard tecnici di galenica oncologica, a cura dell'Area Oncologica Nazionale della SIFO 2012-2016.
17. Annex 1 – Manufacture of Sterile Medicinal Products – EudraLex – Volume 4 – Good Manufacturing Practice (GMP) guidelines, 2009.
18. Norme di buona preparazione dei medicinali in farmacia (Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana XII ed).

19. UNI EN ISO 14644 – 1 – Camere bianche ed ambienti associati controllati.
20. QUAPOS 6 ESOP 2018, Quality Standard for the Oncology Pharmacy Service.
21. C. Fantini, A. Tandelle, S. Levetti, L. Moretti, S. Casani. Riorganizzazione della gestione del flusso di lavoro all'interno delle UFA: come ottimizzare risorse e tempistiche di allestimento. Volume degli abstract X Congresso nazionale SIFaCT 45 2022.
22. S. Casani, G. Negri, S. Levetti, V. Martinello, A. Quaranta, C. Fantini, I. Cau, A. Tandelle, S. Russo, G. Modesti “La multidisciplinarietà del Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico durante i processi di diagnosi, prognosi e cura del carcinoma mammario” Procedure e Tempistiche di allestimento Convegno Nazionale Sitlab 2023.
23. Decreto del Ministro della Salute, 18 maggio 2021, ai sensi della D.G.R. n. 9-3819 del 24.09.2021.
24. Atto DD 1645/A1400A/2021 del 28/10/2021 Regione Piemonte.
25. Siviglia, C., Moatti, JP., Julian-Reynier, C. et al. Test per mutazioni BRCA1: un'analisi costo-efficacia. Eur J Hum Genet 10, 599–606 2002.

Sitografia

- a. <https://www.humanitasalute.it/salute-a-z/senologia/82691-tumore-al-seno-mortalita-calo-grazie-screening- nuovi-trattamenti-foto-parere-esperto/>
- b. <https://www.cro.sanita.fvg.it/export/sites/cro/it/ricercatori/documenti/registro-tumori-fvg-2020.pdf>
- c. https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2022/12/2022_AIOM_NDC-web.pdf
- d. https://www.reteoncologiaropi.it/wp-content/uploads/2021/08/ROPI_Quaderno_Carcinoma-mammario-Metastatico-Triplo-Negativo_def.pdf
- e. <https://www.tsrm-pstrp.org/wp-content/uploads/2021/11/TSLB-Codice-deontologico-2021.pdf>
- f. <https://pathways.nice.org.uk/pathways/early-and-locally-advanced-breast-cancer>
- g. https://moodle2.units.it/pluginfile.php/201867/mod_folder/content/0/L8-Biotec-ImmDiagn.pdf?forcedownload=1
- h. <https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/applications/clinical-testing-and-diagnostics-manufacturing/diagnostic-immunohistochemistry#ihc-and-cancers>
- i. <https://medicinaonline.co/2017/03/15/differenza-tra-cisti-e-linfonodo/>
- j. <https://www.gavazzeni.it/visite-ed-esami/osna/>
- k. <https://www.sysmex-partec.it/prodotti/oncologia/rilevamento-molecolare-di-metastasi-linfonodali-osna.html>
- l. <https://momilab.files.wordpress.com/2014/12/lezione-emocromo.pdf>
- m. https://biomedico.campusnet.unito.it/do/storicocorsi.pl/Show?_id=ab88_1213
- n. <https://www.airc.it/cancro/prevenzione-tumore/diagnosi-precoce/cancro-diagnosi-cosa-significa>
- o. <https://www.ciip-consulta.it/attachments/article/234/manuale.pdf>
- p. <http://www.ospedalesicuro.eu/storia/materiali/doc/chemioterapici.pdf>
- q. https://sigu.net/wp-content/uploads/2021/03/Linee-di-indirizzo-sullanalisi-dei-geni-BRCA1-e-BRCA2-in- ambito-clinico-Rev1_2021.pdf