

Questionario conoscitivo e raccomandazioni IMI – SIAPEC per il protocollo di minima dell’esame istopatologico del linfonodo sentinella nel melanoma cutaneo

Hanno collaborato: Maria Cristina Montesco, Padova; Daniela Massi, Firenze; Roberto Mencarelli, Rovigo; Gerardo Botti, Napoli; Paolo Visca, Roma e Claudio Clemente, Milano

INTRODUZIONE

La biopsia del linfonodo sentinella (SLN) costituisce oggi una procedura standard nel trattamento del melanoma cutaneo localizzato, permettendo una accurata stadiazione e una più precisa valutazione prognostica.

Un esame istopatologico approfondito del SLN ha un ruolo fondamentale per l’accuratezza della metodica. Attualmente tuttavia, non esiste consenso sul protocollo patologico ottimale da utilizzare e vengono impiegate procedure diverse che vanno dall’allestimento di poche sezioni all’esame in toto del SLN.

La mancata standardizzazione della metodica si riflette sulle diverse percentuali di positività del SLN riportate in letteratura e rende i risultati dei diversi studi tra loro non comparabili.

Tenuto conto, inoltre, della recente revisione del sistema di stadiazione del melanoma cutaneo AJCC 2009^{1,2}, nel quale un SLN viene definito positivo in presenza di isolate cellule tumorali (ITC) evidenziate anche solo con colorazioni immunoistochimiche per gli anticorpi anti-antigeni melanoma associati, particolarmente sentita è l’esigenza di pervenire sul territorio nazionale ad un protocollo di minima, che tenga conto sia delle diverse realtà operative che della necessità di bilanciare l’accuratezza della metodica con le risorse dei differenti laboratori.

QUESTIONARIO CONOSCITIVO

Dopo una prima fase di ricognizione delle procedure utilizzate nei diversi laboratori di Anatomia Patologica in Italia, è stato diffuso tra i patologi via web e tramite le società scientifiche IMI (Intergruppo Melanoma Italiano) e SIAPeC IAP (Società Italiana di Anatomia Patologica e Citopatologia diagnostica, Divisione italiana della International Academy of Pathology) GISD (Gruppo Italiano di Studio di Dermatopatologia) un questionario (Fig. 1) in cui è stato richiesto di scegliere tra diverse opzioni per ciascuna fase di allestimento dell’esame istologico: campionamento, taglio, marcatori immunoistochimici. Una parte del questionario è stata riservata ad eventuali commenti e suggerimenti.

E’ stata inoltre condotta l’analisi dei costi dei differenti protocolli, usando come metodologia il modello *Bottom-Up* (analisi di un’attività che

entra nei dettagli dell'azione produttiva, determinandone i valori di base fino alla valorizzazione finale di processo)

Linfonodo sentinella nel melanoma cutaneo
scelta protocollo
(barrare nello spazio grigio con una X l'ipotesi scelta)

Campionamento, inclusione e taglio	
Ipotesi 1 bivalving + taglio sequenziale (protocollo di Cochran)	☐
Ipotesi 2 bivalving + taglio con steps multipli (protocollo EORTC)	☐
Ipotesi 3 bread loaf + taglio sequenziale	☐
Marcatori immunoistochimici	
Ipotesi 1 S100 come anticorpo di prima linea	☐
Ipotesi 2 Melan A come anticorpo di prima linea	☐
Ipotesi 3 S100 e Melan A come anticorpi di prima linea	☐
Ipotesi 4 S100, Melan A, HMB45 sempre	☐
Commenti e suggerimenti	

Fig. 1. Questionario inviato ai patologi relativo al protocollo del linfonodo sentinella per melanoma.

Risultati

In totale, 47 centri di cui 22 distribuiti nel Nord-Italia, 14 nel Centro-Italia e 11 nel Sud-Italia hanno risposto al questionario.

Per quanto concerne **campionamento e taglio**, il 55% (26/47) dei centri ha optato per il protocollo EORTC³ con campionamento "bivalving", dividendo il linfonodo in due parti con una sezione condotta lungo l'asse maggiore del linfonodo ed esecuzione di sezioni seriate a differenti livelli, il 26% (12/47) per il campionamento con sezioni parallele ogni 2-3 mm condotte secondo l'asse minore del linfonodo ("bread loafing") seguito dall'allestimento di sezioni sequenziali ed il 19% (9/47) per il protocollo di Cochran⁴ con campionamento "bivalving" e taglio sequenziale (Fig. 2).

Molti centri non ravvedono la necessità di includere separatamente ciascun frammento, purché l'inclusione avvenga con cura, allineando i frammenti in modo da evitare perdite di materiale durante la fase di sgrossatura.

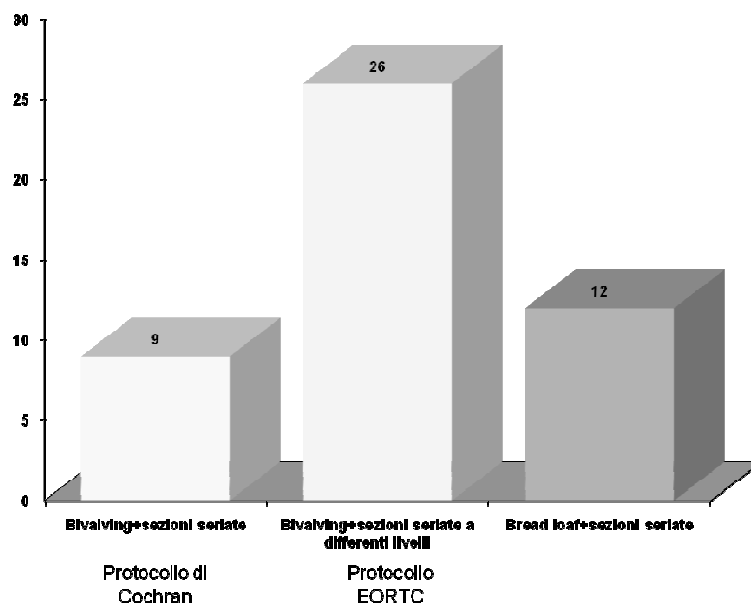


Fig. 2. Risultati del questionario relativi a campionamento e taglio

Per quanto concerne i **marcatori immunoistochimici** il 49% (23/47) dei centri ritiene opportuno utilizzare un unico anticorpo in prima linea (15/47 proteina S100 e 8/47 MelanA), il 30% (14/47) due anticorpi (proteina S100 e MelanA) e solo il 19% (9/47) tre anticorpi (MelanA, proteina S100 ed HMB45) (Fig.3).

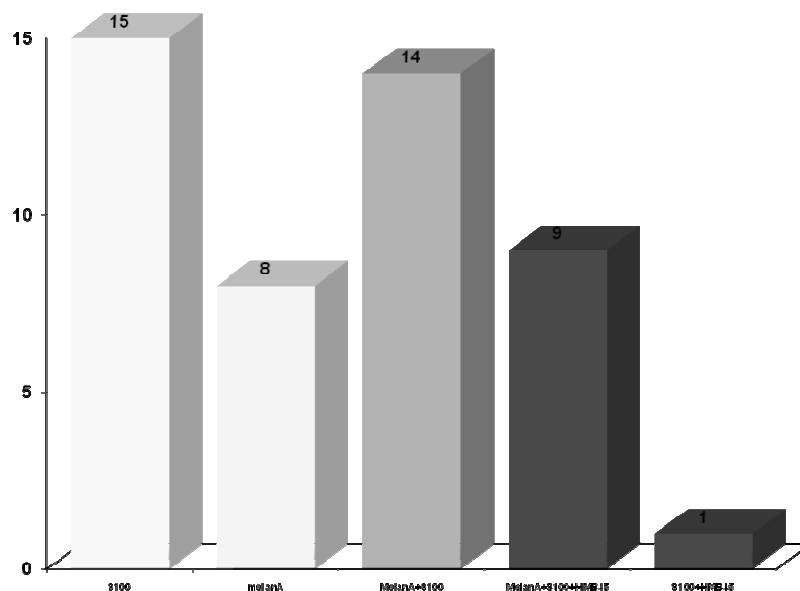


Fig. 3. Risultati del questionario relativi alle indagini immunoistochimiche.

Dai risultati ottenuti è emerso che la maggior parte dei centri ritiene importante esaminare ai fini dell'accuratezza della metodica anche le porzioni periferiche del linfonodo, come evidenziato dai dati della letteratura più recente^{5,6,7,8,9}. Ciò può essere raggiunto o attraverso l'esecuzione di sezioni a differenti livelli, oppure con un campionamento di

tipo “*bread loafing*”. Studi che hanno comparato le due metodiche hanno evidenziato infatti, una percentuale simile di rilevamento sia di micrometastasi che di agglomerati nevici¹⁰.

Per quanto concerne i marcatori immunoistochimici l’orientamento generale è quello di utilizzare uno o al massimo due marcatori: proteina S100 e/o MelanA. Quest’ultimo marcatore, pur avendo una minore sensibilità rispetto alla proteina S100 è dotato di maggiore specificità e consente una facile individuazione anche di cellule isolate. L’utilizzo di altri marcatori (Tirosinasi, MITF, HMB45) dovrebbe essere di seconda istanza e riservato ai casi con difficoltà interpretative in quanto marcatori più specifici ma molto meno sensibili dell’ S100 e del Mart1.

L’analisi dei costi ha inoltre evidenziato come entrambi i protocolli abbiano un impatto economico sovrapponibile (Tab.1)

PROTOCOLLO “BREAD LOAFING”						
Serie con 1 marcatore	1 ^a E&E	S100 x 3	4 fette in bianco	2 ^a E&E x 2	TOTALE PER INCLUSIONE	4 INCLUSIONI MEDIE
	7,88	36,27	2,68	6,16	€ 52,99	€ 211,96
Serie con 2 marcatori	1 ^a E&E	S100 x 3	2 fette in bianco e 2 MelanA	2 ^a E&E x 2	TOTALE PER INCLUSIONE	4 INCLUSIONI MEDIE
	7,88	36,27	29,54	6,16	€ 79,85	€ 319,40
PROTOCOLLO EORTC						
Serie con 1 marcatore	1 ^a E&E	S100 x 6	8 fette in bianco e 5 salti	2 ^a E&E x 5	TOTALE PER INCLUSIONE	2 INCLUSIONI MEDIE
	7,88	72,54	5,96	15,4	€ 101,78	€ 203,56
Serie con 2 marcatori	1 ^a E&E	S100 x 6	3 fette in bianco, 5 salti e 5 MelanA	2 ^a E&E x 5	TOTALE PER INCLUSIONE	2 INCLUSIONI MEDIE
	7,88	72,54	63,06	15,4	€ 158,88	€ 317,76

Tab.1. Raffronto dei costi per i due protocolli.

RACCOMANDAZIONI IMI-SIAPeC IAP/GISD

Sulla base dei risultati del questionario conoscitivo, anche alla luce dei recenti dati della letteratura, si ritiene opportuno raccomandare un protocollo che preveda un campionamento estensivo del LSN, secondo le seguenti modalità:

l’esame istologico del linfonodo sentinella deve essere effettuato su materiale fissato in formalina

è sconsigliabile l’esame estemporaneo al congelatore^{11,12,13}, infatti, i dati della letteratura hanno dimostrato come questa procedura sia gravata da bassa sensibilità e possa comportare perdita di materiale.

il protocollo dovrebbe essere applicato anche ai linfonodi definiti ipercaptanti.

Reperto macroscopico

Nel reperto macroscopico devono essere riportate le dimensioni nei due diametri del linfonodo/i, l’eventuale presenza di colorante e di metastasi macroscopicamente evidenti.

Campionamento, taglio e colorazioni

Il campionamento può essere eseguito sia con metodica "*bivalving*" che con metodica "*bread loafing*". Nel primo caso il linfonodo deve essere suddiviso in due parti con una sezione condotta secondo l'asse maggiore della capsula all'ilo linfonodale (Fig. 4), nel secondo caso il linfonodo deve essere campionato con sezioni parallele ogni 2-3 mm secondo l'asse minore del linfonodo (Fig. 5). In entrambi i casi l'inclusione in paraffina deve essere eseguita con particolare accuratezza, eventualmente utilizzando inclusioni separate per evitare perdita della capsula e delle regioni sottocapsulari.

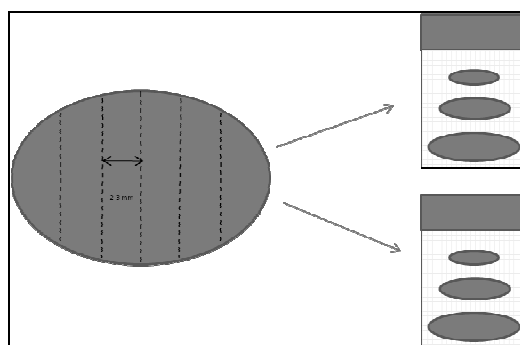
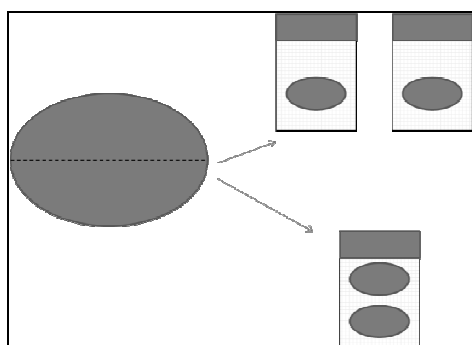


Fig.4. Campionamento "*bivalving*" Fig.5. Campionamento "*bread loafing*"

In caso di campionamento "*bivalving*" da ciascuna inclusione, come proposto nel protocollo EORTC³, vengono allestite 6 serie di sezioni ciascuna separata da un intervallo di 50µm. Di ciascuna serie vengono colorate le prime due sezioni una con EE e la seconda per proteina S100 secondo lo schema od in alternativa possono essere colorate le prime tre sezioni affiancando alla proteina S100 anche il MelanA (Fig. 6). Le restanti sezioni vengono risparmiate e possono essere utilizzate per ulteriori indagini nei casi di più difficile interpretazione.

Sezione 1	EE
Sezione 2	S100
Sezione 3	bianca (MelanA)
gap 50 µm	
Sezione 4	EE
Sezione 5	S100
Sezione 6	bianca (MelanA)
Sezione 7	bianca
Sezione 8	bianca
Sezione 9	bianca
gap 50 µm	
Sezione 10	EE
Sezione 11	S100

Sezione 12	bianca (MelanA)
gap 50 µm	
Sezione 13	EE
Sezione 14	S100
Sezione 15	bianca (MelanA)
gap 50 µm	
Sezione 16	EE
Sezione 17	S100
Sezione 18	bianca (MelanA)
gap 50 µm	
Sezione 19	EE
Sezione 20	S100

Fig. 6. Protocollo per l'esame istologico del SLN secondo EORTC modificato

In caso di campionamento "*bread loafing*" da ciascuna inclusione vengono allestite 10 sezioni consecutive che vengono colorate secondo il seguente schema (Fig. 7).

Sezione 1	EE
Sezione 2	S100
Sezione 3	bianca (MelanA)
Sezione 4	EE
Sezione 5	S100
Sezione 6	bianca (MelanA)
Sezione 7	bianca
Sezione 8	bianca
Sezione 9	EE
Sezione 10	S100

Fig.7. Protocollo per l'esame istologico del linfonodo sentinella dopo campionamento "*bread loafing*"

Analogo procedimento di campionamento, taglio e colorazione immunocitochimica è quello suggerito dal WHO Melanoma programme¹⁴.che prevede per ciascun blocco di inclusione (*bread loafing*) la colorazione di una 1° sezione con EE quindi, nel caso di assenza di metastasi l'allestimento di 10 sezioni per ciascun blocco di inclusione. La 1° e la 6°, delle 10 sezioni allestite, vengono colorate con S-100 e la 2° e la 7° con EE; infine la 3°, 4° e 5° sezione e la 8°, 9° e 10° sono utilizzabili per ulteriori colorazioni (Mart1, Tirosinasi, MITF, HMB45)

Per ciascuna inclusione	1 EE
-------------------------	------

Sezione 1	S100
Sezione 2	EE
Sezione 3	Bianca
Sezione 4	Bianca
Sezione 5	Bianca
Sezione 6	S100
Sezione 7	EE
Sezione 8	Bianca
Sezione 9	Bianca
Sezione 10	Bianca

Fig. 8. Protocollo per l'esame istologico del linfonodo sentinella secondo il WHO Melanoma programme.

Nel caso in cui i risultati siano ambigui è consigliabile ripetere il protocollo e/o portare il linfonodo ad esaurimento.

Si rammenta che per i pazienti che entrano nei trials EORTC è indispensabile eseguire il protocollo EORTC.

Refertazione

Nella refertazione devono essere riportati il numero di linfonodi sentinella esaminati, il numero di linfonodi positivi ed il risultato delle colorazioni immunoistochimiche.

Poiché come evidenziato da numerosi studi¹⁵⁻²⁵ le dimensioni e le caratteristiche delle metastasi a carico del SLN sembrano avere impatto prognostico si suggerisce di segnalare nel referto anche:

- il diametro massimo della metastasi (se ci sono più focolai, il diametro massimo di quello maggiore) misurato sul preparato istologico

- la sede: sottocapsulare, parenchimale o mista
- la presenza di estensione extracapsulare

E' opportuno segnalare nel referto anche la presenza di agglomerati nevici capsulari per la cui identificazione è utile la colorazione immunocitochimica con sieri anti p16.

BIBLIOGRAFIA

1. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol.* 2009;27:6199–206.
2. Balch, CM. Melanoma of the Skin. In: Edge, SB.; Byrd, DR.; Compton, CC., et al., editors. *AJCC Cancer Staging Manual.* ed 7th. Springer Verlag; New York: 2010.
3. Chakera AH, Hesse B, Burak Z, et al. EANM-EORTC general recommendations for sentinel node diagnostics in melanoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2009;36:1713-42.
4. Cochran AJ, Huang RR, Guo J, Wen DR. Current practice and future directions in pathology and laboratory evaluation of the sentinel node. *Ann Surg Oncol.* 2001;8(9 Suppl):13S-17S.
5. Cook MG, Green MA, Anderson B, et al.; EORTC Melanoma Group. The development of optimal pathological assessment of sentinel lymph nodes for melanoma. *J Pathol.* 2003, 200:314-9.
6. Cook MG, Di Palma S. Pathology of sentinel lymph nodes for melanoma. *J Clin Pathol.* 2008 61:897-902.
7. Spanknebel K, Coit DG, Bieligg SC, et al. Characterization of micrometastatic disease in melanoma sentinel lymph nodes by enhanced pathology: Recommendations for standardizing pathologic analysis. *Am J Surg Pathol* 2005;29:305–17.
8. Abrahamsen HN, Hamilton-Dutoit SJ, Larsen J, Steiniche T. Sentinel lymph nodes in malignant melanoma: Extended histopathologic evaluation improves diagnostic precision. *Cancer* 2004;100:1683–91.
9. Riber-Hansen R, Sjoegren P, Hamilton-Dutoit SJ, Steiniche T. Extensive pathological analysis of selected melanoma sentinel lymph nodes: High metastasis detection rates at reduced workload. *Ann Surg Oncol* 2008;15:1492–501.
10. Mitteldorf C, Bertsch HP, Zapf A et al. Cutting a sentinel lymph node into slices is the optimal first step for examination of sentinel lymph nodes in melanoma patients. *Mod Pathol* 2009, 22:1622-7.
11. Koopal SA, Tiebosch AT, Albertus Piers D et al. Frozen section analysis of sentinel lymph nodes in melanoma patients. *Cancer* 2000, 89:1720-5.
12. Stojadinovic A, Allen PJ, Clary BM et al. Value of frozen section analysis of sentinel lymph node for primary cutaneous malignant melanoma. *Ann Surg* 2002, 235:92-8.
13. Murali R, Thompson JF, Scolyer RA. Sentinel lymph node biopsy for melanoma: aspects of pathologic assessment. *Future Oncol* 2008, 4:535-51.
14. Clemente C, Cook M, Ruiter D and Mihm CM Jr. Histopathologic diagnosis of melanoma. *W.H.O. Melanoma Programme Publications – number 5, 2001*
15. Starz H, Balda BR, Kramer KU et al. A micromorphometry-based concept for routine classification of sentinel lymph node metastases and its clinical relevance for patients with melanoma. *Cancer* 2001, 91:2110-21.
16. Ranieri JM, Wagner JD, Azuaje R. Prognostic importance of lymph node tumor burden in melanoma patients staged by sentinel node biopsy. *Ann Surg Oncol.* 2002, 9:975-81.
17. Carlson GW, Murray DR, Lyles RH et. The amount of metastatic melanoma in a sentinel lymph node: does it have prognostic significance? *Ann Surg Oncol.* 2003, 10:575-81.

18. Cochran AJ, Wen DR Huang RR et al. Prediction of metastatic melanoma in nonsentinel nodes and clinical outcome based on the primary melanoma and the sentinel node. *Mod Pathol* 2004, 17:747-55.
19. Dewar DJ, Newell B, Green MA, et al. The microanatomic localization of metastatic melanoma in sentinel lymph nodes predicts nonsentinel lymph node involvement. *J Clin Oncol* 2004, 16:3345-9.
20. Scolyer RA, Li LX, McCarthy SW et al. Micromorphometric features of positive lymph nodes predict involvement of nonsentinel nodes in patients with melanoma. *Am J Clin Pathol* 2004, 122:532-9.
21. Vuylsteke RJ, Borgstein PJ, van Leeuwen PA, et al. Sentinel lymph node tumor load: an independent predictor of additional lymph node involvement and survival in melanoma. *Ann Surg Oncol.* 2005, 12:440-8.
22. Pearlman NW, McCarter MD, Frank M, et al. Size of sentinel node metastases predicts other nodal disease and survival in malignant melanoma. *Am J Surg.* 2006, 192:878-81.
23. Govindarajan A, Ghazarian DM, McCreedy DR, Leong WL. Histological features of melanoma sentinel lymph node metastases associated with status of the completion lymphadenectomy and rate of subsequent relapse. *Ann Surg Oncol.* 2007, 14:906-12.
24. Rossi CR, De Salvo GL, Bonandini E, et al. Factors predictive of nonsentinel lymph node involvement and clinical outcome in melanoma patients with metastatic sentinel lymph node. *Ann Surg Oncol.* 2008, 15:1202-10
25. Meier A, Satzger I, Völker B, et al. Comparison of classification systems in melanoma sentinel lymph nodes--an analysis of 697 patients from a single center. *Cancer* 2010, 116:3178-88.
26. van der Ploeg AP, van Akkooi AC, Rutkowski P, et al. Prognosis in patients with sentinel node-positive melanoma is accurately defined by the combined Rotterdam tumor load and Dewar topography criteria. *J Clin Oncol.* 2011, 29:2206-14.