

Consenso Técnico para a determinação do status da proteína HER2 por imunocitoquímica em carcinoma da mama

Mário Maia-Matos (mario.matos@estesl.ipl.pt), Amadeu Ferro, Alexandra Teixeira, Ana Coias, Ana C. Fernandes, A. Cristina Gavinho, Ana Cunha, Ana F. Santos, Ana Isabel Silva, Ana L. Marques, Ana Vilas Boas, Ana Margarida Rodrigues, Ana Margarida Lopes, Ana Paula Tavares, Ana Melanda, Ana Rute Fernandes, Salomé Pereira, Ana Teodósio, Anabela Penela, Filipe Teixeira, Carmelina Ramos, Catarina Araújo, Daniel H. Almeida, Daniela Alves, Dina Leitão, M. Edite Figueira, Estela Martins, Fátima P. Silva, Filipa Areia, Helena Simões, Ilda Simões, Joana R. Cunha, Lúcia Carrão, Manuel Lourenço, Manuela Henriques, Manuela D. Soares, Mara Santos, Amélia Silva, Salomé Pessoa, Maria Teresa Assunção, Mariana Ganhão, Marta Roquette, Nuno Silva, Patrícia Mendes, Paula Borges, Paula Casimiro, Paula Laranjeiro, Paulo Teixeira, Renata Vieira, Rosa Garcia, Ruth Sardinha, Marisa Sá, Sónia Carretas, Teresa Franco, Teresa Lacerda, Teresa Pereira, Vasco Serra

Introdução

A determinação do *status* da proteína HER2 por imunocitoquímica é uma metodologia fundamental para o diagnóstico, prognóstico e indicação terapêutica no carcinoma da mama, nomeadamente para o encaminhamento terapêutico com Herceptin®/trastuzumab. O estabelecimento desta terapêutica nas vertentes adjuvante ou neoadjuvante, e até em doença metastática, tem vindo a acentuar a importância da determinação do referido *status* de modo a melhor responder às necessidades dos doentes¹⁻⁴.

Sendo a imunocitoquímica o método validado para determinação do *status* HER2 em carcinoma da mama⁵⁻⁶, é de extrema importância definir linhas de orientação para a sua correta performance como tem sido estabelecido em diversos países em todo o mundo^{5,7-11}.

A área científica de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (APCT-ESTeSL) e a Associação Portuguesa de Técnicos de Anatomia Patológica (APTAP) reuniram um painel de especialistas para a construção e estabelecimento de linhas de orientação técnica para a determinação do *status* HER2 em carcinoma da mama para a realidade portuguesa.

Objetivo

Pretende-se com este consenso criar linhas de orientação técnicas para a construção, validação e manutenção do teste imunocitoquímico para determinação do *status* HER2 em carcinoma da mama, no que diz respeito à realidade portuguesa. Todas as orientações aqui descritas têm em conta o estado da arte atual no que diz respeito à determinação do *status* HER2 por imunocitoquímica em carcinoma da mama, bem como a experiência pessoal e académica de cada um dos membros do painel de especialistas que a subscrevem.

Intenções do consenso

As orientações práticas submetidas a consenso pretendem ser declarações sistemáticas desenvolvidas para ajudar os profissionais de saúde na tomada de decisões sobre os cuidados de saúde apropriados a circunstâncias clínicas precisas. Para ser exequível, uma orientação deve possuir características específicas como: confiabilidade, validade, reprodutibilidade, aplicabilidade clínica, flexibilidade, clareza, possuir possibilidade de revisão e documentação. Estas orientações podem ser úteis na produção de melhores cuidados e na redução do custo.

Ao formular recomendações técnicas para a determinação do *status* HER2 em carcinoma da mama, a APCT-ESTeSL e a APTAP consideraram estes princípios do desenvolvimento de diretrizes. No entanto, é importante notar que estas orientações técnicas não podem ter sempre em consideração todas as particularidades, mas pretendem designar a situação ideal para a prestação de melhores cuidados de saúde. Estas diretrizes também não se destinam a substituir o julgamento técnico em relação a situações particulares ou situações clínicas especiais, mas a dar guias que permitam sustentar essas mesmas decisões. A publicação destas recomendações técnicas para a determinação do *status* HER2 em carcinoma da mama permitem uma discussão mais alargada sobre o tema e a eventual criação de linhas de orientação não exclusivamente técnicas. Estas orientações práticas pretendem também identificar questões importantes e lacunas na literatura que permitam lançar temas para futuras investigações.

Métodos

Composição do painel de especialistas

A APCT-ESTeSL e a APTAP reuniram um painel de 57 técnicos de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica de diversos laboratórios de Anatomia Patológica portugueses (públicos e privados). A composição final do painel estabeleceu-se após cada membro cumprir todos os critérios previamente estipulados, nomeadamente:

- I. Deter o título profissional de Técnico de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica;
- II. Possuir experiência laboratorial na determinação do *status* HER2 por imunocitoquímica em carcinoma da mama;
- III. Ter sido aprovado no curso de formação avançada da ESTeSL “Determinação do *status* HER2 por imunocitoquímica em carcinoma da mama”;
- IV. Ter respondido ao questionário de consenso promovido pela APCT-ESTeSL;
- V. Ter participado na reunião de consenso “Determinação do *status* HER2 por imunocitoquímica em carcinoma da mama” no dia 20 de Outubro de 2012 promovida pela APCT-ESTeSL e pela APTAP.

As opiniões dos membros do painel representaram a sua visão individual e não necessariamente a visão do laboratório a que estão associados, seja ele público ou privado. A lista completa dos membros do painel poderá ser encontrada no Apêndice A.

Formação

O curso de formação avançada “Determinação do *status* HER2 por imunocitoquímica em carcinoma da mama” foi organizado pela APCT-ESTeSL com o objetivo de congregar técnicos de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica de todo o país com experiência na determinação por imunocitoquímica do *status* HER2 em carcinoma da mama, promovendo a formação específica respeitante ao tema, bem como a reflexão e partilha de experiências entre profissionais de diferentes regiões e realidades hospitalares. O curso consistia numa componente teórica, uma componente teórico-prática de discussão e *brainstorming* e uma componente prática de realização de técnica e discussão de casos, e concedia 0,8 créditos de acordo com o *European Credits Transfer and Accumulation System* (ECTS). Realizaram-se 8 edições do curso, formando um total de 80 profissionais de todo o país. A partir de uma revisão da literatura e das conclusões da componente teórico-prática e prática do curso, construiu-se um documento de consenso provisório que foi submetido à apreciação de todos os formandos através de um questionário eletrónico. De acordo com as respostas ao questionário elaborou-se um documento de trabalho para ser submetido a consenso a 20 de outubro de 2012. Apenas os formandos que responderam ao questionário foram convidados para o painel de especialistas da reunião de consenso.

Metodologia de consenso

O painel de especialistas reuniu-se no dia 20 de outubro de 2012 nas instalações da ESTeSL. Durante a reunião de consenso apresentaram-se e colocaram-se a discussão as declarações propostas pelo documento de trabalho. Foram recebidas contrapropostas, devidamente fundamentadas, dos membros do painel e/ou pedidos de esclarecimento acerca da declaração. Após apresentação da declaração final submetia-se a consenso, podendo cada membro do painel: dar consentimento, afastar-se da decisão permitindo consentimento ou bloquear o consenso levando a nova discussão dos argumentos. Estabelecido o consenso acerca de cada declaração iniciava-se nova discussão de uma nova declaração. As linhas seguidamente apresentadas foram consensuais aos 57 membros do painel de especialistas presentes na reunião de consenso.

Conflito de interesses

Todos os membros subscritores deste documento declararam não existir qualquer conflito de interesses, comprometendo-se a declarar qualquer interesse financeiro ou outro que possa ser interpretado como constituindo um conflito real, potencial ou aparente.

Linhas de orientação técnicas para a construção, validação e manutenção do teste imunocitoquímico para determinação do *status* HER2 em carcinoma da mama

1. Aspetos gerais

1.1. Planeamento do teste

A implementação do teste de imunocitoquímica para determinação do *status* HER2 em carcinoma da mama necessita de um planeamento inicial de modo a garantir que existem todas as condições para um teste fidedigno.

O planeamento deve passar por:

- I. Avaliação das necessidades humanas, físicas e materiais para cumprimento das condições mínimas do teste;
- II. Estabelecimento de procedimentos adequados em todas as fases do teste, desde a colheita da amostra até ao relatório final;
- III. Criação de metodologias de registo, monitorização e rastreabilidade de procedimentos;
- IV. Formação de todo o pessoal envolvido no teste (e.g., cirurgiões, enfermeiros, assistentes técnicos, assistentes operacionais, oncologistas, anatomopatologistas e técnicos de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica);
- V. Realização de testes e validação de resultados;
- VI. Implementação do teste para diagnóstico;
- VII. Planeamento de momentos de revisão de procedimentos e de atualização da formação do pessoal envolvido em todas as fases do teste.

1.2. Registo de procedimentos

O registo de procedimentos é um dos passos fundamentais e deve ser o mais preciso possível de modo a se poder rastrear todo o circuito. Para além das informações clínicas e institucionais devem-se registar vários elementos de acordo com a fase do teste. Todos os registos devem ser efetuados pela pessoa que os executa devendo o seu nome ficar registado na fase respetiva.

1.3. Garantias de qualidade de todos os reagentes

Todos os reagentes utilizados durante o teste devem ser de qualidade certificada, devendo ter maior atenção para aqueles que mais diretamente influenciam os resultados finais, nomeadamente:

1.3.1. Solução fixadora

O laboratório que recebe amostras para determinação do *status* HER2 deve indicar a solução fixadora para a qual tem o teste validado (marca e referência). O serviço onde é efetuada a colheita deve respeitar esta indicação e fica responsável por registar o lote da solução fixadora que utiliza em cada amostra. Devem ser utilizados reagentes “prontos a utilizar”.

1.3.2. Agentes de desidratação

Devido à relevância da desidratação é importante monitorizar o número de cassetes que é processado e efetuar substituições regulares dos reagentes de acordo com norma a estabelecer pela instituição. Deve-se ter atenção aos diferentes tecidos, pois estes poderão apresentar taxas diferentes de saturação dos reagentes (etanol, acetona, etc.).

1.3.3. Meio de impregnação e inclusão

Deve-se monitorizar a temperatura do meio de impregnação e inclusão de forma a garantir que não sofre ciclos de aquecimento/arrefecimento que provoquem a perda das suas características.

1.3.4. Reagentes de imunocitoquímica

Os reagentes utilizados em imunocitoquímica devem ser manuseados e acondicionados de acordo com as instruções do fabricante, nomeadamente: conservação no frio, protegido da luz, respeitando as validades e os tipos de recipientes, entre outras.

1.4. Condições técnicas e humanas

1.4.1. Formação do pessoal.

- a) O pessoal envolvido na determinação do *status* HER2 por imunocitoquímica (e.g., cirurgiões, enfermeiros, assistentes técnicos, assistentes operacionais, oncologistas, anatomopatologistas e técnicos de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica) deve ter formação específica, sobre o teste¹².
- b) A formação deve ser oferecida sempre que alguém é integrado no circuito do teste e deve ser regular para todo o pessoal envolvido. A frequência da formação deve ser de acordo com as necessidades do pessoal e com a implementação de novos procedimentos. Esta formação deve incluir temáticas relacionadas com o impacto do teste na vida dos doentes, com os procedimentos do teste e com a parte específica do procedimento em que estão envolvidos.
- c) Para o teste ser válido, a fase analítica deve ser executada por um técnico de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica com experiência na área de imunocitoquímica (este requisito básico não dispensa a formação contínua)¹².

2. Orientações técnicas para determinação do *status* HER2 por imunocitoquímica em carcinoma da mama.

2.1. Fase pré-analítica

2.1.1. Colheita, acondicionamento e transporte (Apêndice C).

2.1.1.1. Aspetos gerais.

- a) A determinação do *status* HER2 por imunocitoquímica pode ser efetuada em biópsias bem como em peças cirúrgicas, não devendo ser executado em amostras de citologia (Apêndice B)^{9,13-14}.
- b) Na colheita deve-se registar a data e hora de colheita da amostra (início do tempo de isquémia a frio*) bem como a temperatura a que fica até ao acondicionamento (quando não é acondicionado imediatamente).
- c) Todas as amostras devem ser fixadas numa solução aquosa de formaldeído a 4% (formalina a 10%) tamponada por fosfatos a pH 7.0 num volume mínimo de 4 vezes o volume do tecido a fixar^{5,9,17-18}. O tempo de isquémia a frio deve ser reduzido ao mínimo podendo estender-se a um máximo de 60 minutos (Apêndice B)^{15-16,19-20}.

* Entende-se por tempo de isquémia a frio o tempo que decorre entre a remoção do tecido e a imersão do tecido na solução fixadora¹⁵⁻¹⁶.

2.1.1.2. Acondicionamento de biópsias.

- a) As biópsias devem ser colocadas na solução fixadora imediatamente após a sua colheita, devendo o tempo de fixação ser no mínimo de 6 horas para uma temperatura aproximada de 22 a 26 °C, não devendo exceder as 96 horas de fixação por falta de evidência científica que valide essa opção (Apêndice B)^{5,16,21-22}.
- b) As biópsias não devem ser colocadas a 4 °C se estiverem na solução fixadora, pois podem induzir uma fixação inferior à real.
- c) Deve-se registrar a data e hora de imersão em solução fixadora (se for imediatamente após excisão deve ser indicada a mesma hora da colheita) e a temperatura a que fica sujeita a amostra até ao transporte.

2.1.1.3. Acondicionamento de peças cirúrgicas.

- a) As peças cirúrgicas devem ser prontamente seccionadas (ver 3.1.2.2.) e posteriormente imergidas em solução fixadora, devendo o tempo de fixação ser no mínimo de 24 horas para uma temperatura aproximada de 22 °C a 26 °C, não devendo exceder as 96 horas de fixação por falta de evidência científica que valide essa opção (Apêndice B)^{5-6,9,16,21-22}.
- b) Quando não for possível a secção imediata (em menos de 60 minutos após excisão cirúrgica), as peças deverão ser refrigeradas a 4 °C, não podendo o tempo de isquémia a frio sob refrigeração ser superior a 4 horas (Apêndice B)^{6,16}.
- c) Deve-se registrar o método de preservação antes da fixação adequada* (indicação da temperatura, data e hora de preservação). Quando o seccionamento da amostra é efetuado fora do laboratório deve-se indicar a data e hora de início da fixação (final do tempo de isquémia a frio).

2.1.1.4. Transporte.

- a) O recipiente a ser utilizado para acondicionamento e transporte deve ser de material não reativo e tampa vedante que encerre hermeticamente a solução fixadora e a amostra. Deve estar rotulado com:
 - I. Identificação da solução fixadora (nome, marca, lote);
 - II. Sinalização de risco químico e/ou identificação de risco biológico do *Global Harmonized System* (GHS);
 - III. Identificação do serviço (identificação do hospital e serviço requisitante);
 - IV. Identificação da amostra (e.g., número interno do doente, nome completo, tipo de amostra).
- b) O transporte de amostras deve ser efetuado no menor tempo possível sob condições de temperatura controlada, respeitando todas as normas de segurança aplicáveis ao transporte de amostras biológicas.
- c) Devem ser registadas todas as alterações que tenham impacto na sua preservação (e.g. derrame de solução fixadora, alterações de temperatura superiores a 4 °C).
- d) Para peças cirúrgicas não fixadas é aconselhado o transporte a baixa temperatura entre 4 °C a 8 °C sob condições de vácuo. Deve-se registrar a temperatura a que fica sujeita até chegar ao laboratório.

2.1.2. Receção, macroscopia, fixação, processamento e inclusão (Apêndice D).

2.1.2.1. Receção de amostras no laboratório.

- a) A receção das amostras deve ser feita garantindo que todos os procedimentos estabelecidos pelo laboratório como mínimos foram cumpridos durante a colheita, acondicionamento e transporte das mesmas. Deve-se confirmar todos os dados e registrar a data e hora da receção no laboratório.
- b) Deve-se verificar se as amostras que chegam ao laboratório em fixador possuem solução fixadora em volume adequado. Caso o volume não seja adequado deve-se registrar e garantir que durante o restante tempo de fixação o volume é de no mínimo 4 vezes o volume da amostra^{5,9,17-18}.

2.1.2.2. Macroscopia.

- a) As peças cirúrgicas não seccionadas chegam a fresco, e devem ser devidamente seccionadas, colocando-se de imediato em solução fixadora de acordo com as condições indicadas anteriormente.
- b) Na descrição macroscópica devem-se registrar todos os dados da peça de acordo com os procedimentos estabelecidos pelo laboratório. Deve-se registrar o número de fragmentos colhidos, a sua respetiva localização, a data e hora de imersão na solução fixadora e a temperatura a que ficam sujeitos.
- c) Antes de se iniciar o processamento deve-se garantir que as amostras possuem o número mínimo e não ultrapassam o número máximo de horas de fixação para prosseguirem para processamento (ver 3.1.1.2. e 3.1.1.3.).

* Entende-se por fixação adequada a que ocorre após seccionamento da peça cirúrgica, pois é a que garante uma fixação homogénea de todos os fragmentos.

2.1.2.3. Processamento e inclusão.

- a) O processamento das amostras deve ser o mais automatizado possível e a qualidade dos reagentes deve ser monitorizada tendo em conta o número e tipo de amostras que entram em contacto com os mesmos. Deve-se registar o processamento a que cada fragmento é sujeito (pode ser de forma genérica, desde que fiquem registadas todas as alterações ao processamento)²³. O laboratório deverá monitorizar a qualidade dos reagentes do processamento.
- b) Processamentos que utilizem reagentes ou procedimentos alternativos (e.g. substitutos de etanol e xilol, aquecimento de soluções e micro-ondas) devem ser devidamente validados para garantir a fiabilidade dos resultados^{5,9,18}.
- c) Ao processar amostras que devam aguardar no processador mais de 24 horas (dias feriados ou fins de semana) deve-se privilegiar que aguardem o início do processamento em solução fixadora¹⁶. Deve-se evitar que os fragmentos aguardem em etanol ou em meio de impregnação no estado líquido.
- d) A inclusão das amostras deve ser efetuada com brevidade, devendo os blocos ser armazenados a uma temperatura aproximada de 20 °C a 25 °C⁹.

2.2. Fase analítica

A técnica imunocitoquímica utilizada deve ser o mais automatizada e uniformizada possível, de modo a diminuir o erro humano e aumentar a monitorização dos procedimentos.

2.2.1. Microtomia

- a) As condições de microtomia devem ser mantidas ao máximo de análise para análise.
- b) A espessura do corte deve ser 2-4µm e a extensão deve ser efetuada em água com uma condutividade controlada, nomeadamente água destilada. A temperatura do banho-maria deve ser constante e monitorizada sendo no máximo 50 °C.
- c) O tempo e temperatura de adesão devem ser constantes, sendo aconselhável uma temperatura não superior a 65 °C²⁴.
- d) Os cortes de amostras para determinação do *status* HER2 por imunocitoquímica devem ser obtidos o mais próximo possível da realização da determinação. A utilização de cortes histológicos obtidos mais de 6 semanas antes da determinação pode levar a alteração da antigenicidade^{5,9,18,24-27}.
- e) Deve-se registar a data de corte e do método de adesão (o método de adesão pode ser registado de forma genérica desde que se registem todas as alterações ao procedimento).

2.2.2. Controlos

- a) Nos casos para determinação do *status* HER2 por imunocitoquímica devem-se selecionar sempre que possível as amostras que possuam ductos mamários normais que possam servir de controlo interno negativo. A imunomarcagem em ductos mamários normais deve ser negativa, ou seja, 0 ou 1+⁵⁻⁶.
- b) Todas as lâminas deverão ter um controlo externo com casos do laboratório representativos dos quatro tipos de imunomarcagem possíveis, ou seja: dois casos negativos (0 e 1+), um caso *borderline* (2+) e um caso positivo (3+)^{6,28-30}. Este controlo poderá ser construído através de um *tissue microarray*⁵. A avaliação inicial destes casos tem de ser devidamente validada por um anatomopatologista.

2.2.3. Técnica imunocitoquímica

Deve ficar registada a data de execução, bem como todos os elementos referentes à técnica imunocitoquímica, mesmo se de forma genérica, desde que se registem todas as alterações. Deve ser registado:

- I. Método de recuperação antigénica;
- II. Métodos de bloqueio de substâncias endógenas;
- III. Características da incubação do anticorpo primário (e.g., referência do anticorpo, clone, lote, concentração, tempo e temperatura de incubação);
- IV. Método de amplificação de sinal;
- V. Método de lavagens;
- VI. Características do cromogénio e sua incubação e método de contraste.

2.2.4. Recuperação antigénica

- a) O método de recuperação antigénica selecionado deverá depender das condições da fase pré-analítica das amostras do laboratório bem como do anticorpo primário e sistema de deteção utilizados^{6,23}.
- b) Independentemente do método selecionado e validado, as condições de recuperação antigénica devem ser mantidas entre cada teste (e.g. temperatura, volume de solução, tipo de solução de recuperação e quantidade de lâminas). A uniformização de procedimentos diminuirá a variabilidade de resultados e todas as alterações carecem de verificação de fiabilidade do controlo.

2.2.5. Anticorpo primário

- a) Recomenda-se a utilização de anticorpos primários ou *kits* de diagnóstico aprovados por entidades reconhecidas, como a *Food and Drug Administration* (FDA) ou a *European Medicines Agency* (EMA)⁵⁻⁶. A utilização de kits aprovados não isenta a validação do teste pelo próprio laboratório.
- b) As condições de aplicação do anticorpo devem ser mantidas entre cada teste (e.g., concentração, lote, solução de lavagem, tempo e temperatura de incubação e de lavagens). Todas as alterações carecem de verificação de fiabilidade do controlo.

2.2.6. Sistema de deteção

A seleção do sistema de deteção deve ser feita de acordo com as características do anticorpo primário.

2.2.7. Contraste

O contraste deve ser o suficientemente claro para não obscurecer a marcação específica e o suficientemente intenso para permitir distinguir a morfologia do tecido.

2.3. Fase pós-analítica

2.3.1. Gestão de controlo de qualidade.

- a) O técnico de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica deve efetuar um controlo técnico de cada caso, registando a data em que este é realizado e o seu resultado.
- b) Deve-se manter um registo de todos os testes não aprovados no controlo de qualidade, bem como do motivo e o modo como evoluíram as possíveis repetições do teste.
- c) Os resultados da determinação do *status* HER2 por imunocitoquímica em carcinoma da mama serão tanto mais consistentes ao longo do tempo quanto mais o laboratório for rigoroso no que diz respeito à formação e à existência de pessoal experiente, minimizando a sua rotatividade, mantendo um controlo de qualidade interno e aderindo a um programa de controlo de qualidade externo⁵.

2.3.1.1. Boas práticas de avaliação de qualidade.

- a) Aconselha-se que o laboratório deva ter pelo menos 250 determinações anuais do *status* HER2 por imunocitoquímica para garantir a consistência dos resultados^{6,31-32}. Laboratórios com números inferiores devem enviar os seus casos para centros de referência que cumpram este valor mínimo³¹⁻³².
- b) O laboratório deve ter o máximo de estabilidade de pessoal. Quando existe rotatividade, a determinação do *status* HER2 por imunocitoquímica deve ser supervisionada por um técnico experiente, tendo já realizado 250 determinações anuais^{5,31-32}.
- c) A avaliação da qualidade deve ser realizada através de uma análise anual dos registos do laboratório. Podem-se indicar como exemplos de indicadores de qualidade do teste para avaliação anual: o número de repetições por ano e a proporção (%) de determinações 2+ que são amplificadas por hibridização *in situ* (HIS). O número de repetições por ano deve ser o menor possível e a percentagem de determinações 2+ que são amplificadas por HIS deverá ser inferior a 30%³³⁻³⁴.

2.3.1.2. Critérios de avaliação da qualidade da técnica.

- a) A avaliação da qualidade da técnica deve ser efetuada pelo técnico de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica que realizou a técnica imunocitoquímica e validada pelo técnico de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica mais experiente na determinação do *status* HER2 por imunocitoquímica do laboratório.
- b) Os critérios a avaliar em todas as amostras deverão ser: morfologia celular, marcação específica e marcação inespecífica. A morfologia celular deve ser mantida o mais íntegra possível. A marcação específica a considerar pode surgir nas células normais dos ductos mamários (1+) e, nas células tumorais do componente invasivo, esta deve ser membranar e de acordo com os seguintes critérios^{5,35-36}:
 - I. Marcação completa, uniforme e intensa para células 3+;
 - II. Marcação completa, não uniforme ou fraca para células 2+;
 - III. Marcação obrigatoriamente incompleta e não uniforme ou fraca para células 1+
 A marcação de outras células, ou outro tipo de marcação deve ser considerada marcação inespecífica (Apêndice B)⁵.
- c) Estão sujeitos a avaliação da qualidade da técnica o controlo externo, o controlo interno, e o caso em estudo.
- d) A avaliação deve iniciar-se pelo controlo externo (ver 3.2.2.), cujos resultados devem ser concordantes com os resultados dados aos mesmos casos em avaliações anteriores. Qualquer discrepância que implique uma classificação diferente da anterior deve levar à rejeição dos resultados (Apêndice B)⁵. Outras alterações devem ser registadas.
- e) Na avaliação do controlo interno este deve ser negativo (0 ou 1+), sendo que qualquer resultado equívoco (2+) ou positivo (3+) deve levar à rejeição dos resultados⁵. Outras alterações devem ser registadas.
- f) A avaliação do caso deve ser efetuada na componente invasiva do tumor⁵. Deve-se garantir que a morfologia celular é íntegra, que a marcação específica quando presente é inequívoca e que não existe marcação inespecífica. A presença de marcação citoplasmática é aceitável desde que não obscureça a marcação membranar (Apêndice B)⁵.

- g) O não cumprimento dos critérios de avaliação da qualidade da técnica para o caso, não é critério absoluto de exclusão, mas deve ser objeto de discussão com o anatomopatologista responsável pelo caso.

3. Validação do teste

Antes de se iniciar a determinação do *status* HER2 por imunocitoquímica para carcinoma da mama, deve-se validar o teste. Para validação da técnica imunocitoquímica consideram-se apenas os resultados dicotómicos da determinação do *status* HER2, ou seja os casos negativos (0/1+) e positivos (3+)⁵.

3.1. Esquema de validação técnica (Apêndices E, F e G).

- A validação do teste é feita por comparação de pelo menos 25 resultados da determinação do *status* HER2 por imunocitoquímica com um teste validado (HIS ou teste de imunocitoquímica já validado por outra instituição)⁵⁶.
- Para validar o teste deve-se calcular a percentagem de concordância que deve ser igual ou superior a 95%. A percentagem de concordância combina a sensibilidade e especificidade numa mesma medida, calculando-se pelo número total de casos concordantes positivos e negativos sobre o número total de casos avaliados⁵.
- A percentagem de concordância pode ser altamente influenciada pelo número de casos negativos e positivos se os valores da sensibilidade e especificidade não forem semelhantes. Deste modo, deve-se calcular a sensibilidade e a especificidade, se estas não apresentarem valores semelhantes deve-se garantir uma representação adequada de casos positivos e negativos (pelo menos 30 de cada)⁵.
- Entende-se por sensibilidade a proporção (%) de casos com resultados positivos obtidos quando são avaliados apenas os verdadeiros positivos⁵, calcula-se dividindo o número de casos positivos para ambos os testes pelo número de casos positivos para o teste validado.
- Entende-se por especificidade a proporção (%) de casos com resultados negativos obtidos quando são avaliados apenas os verdadeiros negativos⁵, calcula-se dividindo o número de casos negativos para ambos os testes pelo número de casos negativos para o teste validado.

Notas finais

As normas apresentadas para a fase pré-analítica são virtualmente válidas para os outros marcadores imunocitoquímicos da mama bem como para HIS⁵. No entanto, deverão ser alvo de apreciação por um painel de especialistas específico.



A *mícron* é a Revista Técnica de Anatomia Patológica, criada em 1998, sob a alçada da Associação Portuguesa de Técnicos de Anatomia Patológica e que ao longo destes anos tem procurado divulgar diversos projectos nesta área.

A revista tem uma periodicidade anual. No passado mês de Maio, foi editado o nº16.

A *mícron* publica, em português e inglês, **Artigos originais de investigação, Artigos de revisão e Casos clínicos** no âmbito das Ciências da Saúde, considerados relevantes para a Anatomia Patológica.

Contamos com a colaboração de todos os estudantes e profissionais para a publicação de artigos científicos na nossa revista.

Os artigos deverão ser submetidos para o e-mail: mícron@aptap.pt. As normas de publicação podem ser consultadas em: <http://www.aptap.pt/media/files/Normas-de-Publicação.pdf>

Apêndice A

Membros do painel

Membro do painel	Instituição
Amadeu Ferro, Co-preside	Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa
Mário Maia-Matos, Co-preside	Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa
Alexandra Teixeira	Hospital de Faro
Ana Coias	Hospital Garcia de Orta
Ana C. Fernandes	Centro Hospitalar de Setúbal
A. Cristina Gavinho	Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia
Ana Cunha	Instituto Português de Oncologia de Lisboa
Ana F. Santos	Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental
Ana Isabel Silva	Hospital Prof. Doutor Fernando Fonseca
Ana L. Marques	Hospital CUF Descobertas
Ana Vilas Boas	Instituto Português de Oncologia de Coimbra
Ana Margarida Rodrigues	Hospital Prof. Doutor Fernando Fonseca
Ana Margarida Lopes	Hospital Prof. Doutor Fernando Fonseca
Ana Paula Tavares	Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental
Ana Melanda	Centro Hospitalar Leiria Pombal
Ana Rute Fernandes	Roche Sistemas de Diagnóstico
Salomé Pereira	Centro Hospitalar de S. João
Ana Teodósio	Instituto Português de Oncologia de Coimbra
Anabela Penela	Hospital de Faro
Filipe Teixeira	Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho
Carmelina Ramos	Hospital Distrital de Santarém
Catarina Araújo	Hospital de Faro
Daniel H. Almeida	Centro de Diagnóstico Anátomo-Patológico
Daniela Alves	Unidade Local de Saúde de Matosinhos
Dina Leitão	Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto
M. Edite Figueira	Hospital CUF Descobertas
Estela Martins	Laboratório de Anatomia Patológica Dr. Albino Oliveira, Lda
Fátima P. Silva	Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra
Filipa Areia	Instituto Português de Oncologia de Lisboa
Helena Simões	Centro Hospitalar Lisboa Norte
Ilda Simões	Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra
Joana R. Cunha	Unidade Local de Saúde de Matosinhos
Lúcia Carrão	Centro Hospitalar Lisboa Norte
Manuel Lourenço	Centro Hospitalar do Barlavento Algarvio
Manuela Henriques	Instituto Português de Oncologia de Coimbra
Manuela D. Soares	Centro Hospitalar Barreiro Montijo
Mara Santos	Centro Hospitalar Lisboa Norte
Amélia Silva	Centro Hospitalar Lisboa Ocidental
Salomé Pessoa	Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

Maria Teresa Assunção	Instituto Português de Oncologia de Coimbra
Mariana Ganhão	Centro Hospitalar de S. João
Marta Roquette	Centro Hospitalar Lisboa Ocidental
Nuno Silva	Hospital Dr. Nélio Mendonça
Patrícia Mendes	Instituto Português de Oncologia de Lisboa
Paula Borges	Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra
Paula Casimiro	Serviços de Assistência Médico-Social do Sindicato dos Bancários do Sul e Ilhas, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa
Paula Laranjeiro	Centro Hospitalar Lisboa Ocidental
Paulo Teixeira	Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra
Renata Vieira	Instituto Português de Oncologia do Porto
Rosa Garcia	Hospital Dr. Nélio Mendonça
Ruth Sardinha	Hospital do Espírito Santo de Évora
Marisa Sá	Centro Hospitalar Lisboa Norte
Sónia Carretas	Centro Hospitalar de Setúbal
Teresa Franco	Centro Hospitalar Lisboa Ocidental
Teresa Lacerda	Centro Hospitalar Lisboa Central
Teresa Pereira	Instituto Português de Oncologia de Lisboa
Vasco Serra	Instituto Português de Oncologia de Coimbra

Apêndice B

Resumo de critérios de exclusão para determinação do *status* HER2 por imunocitoquímica em carcinoma da mama

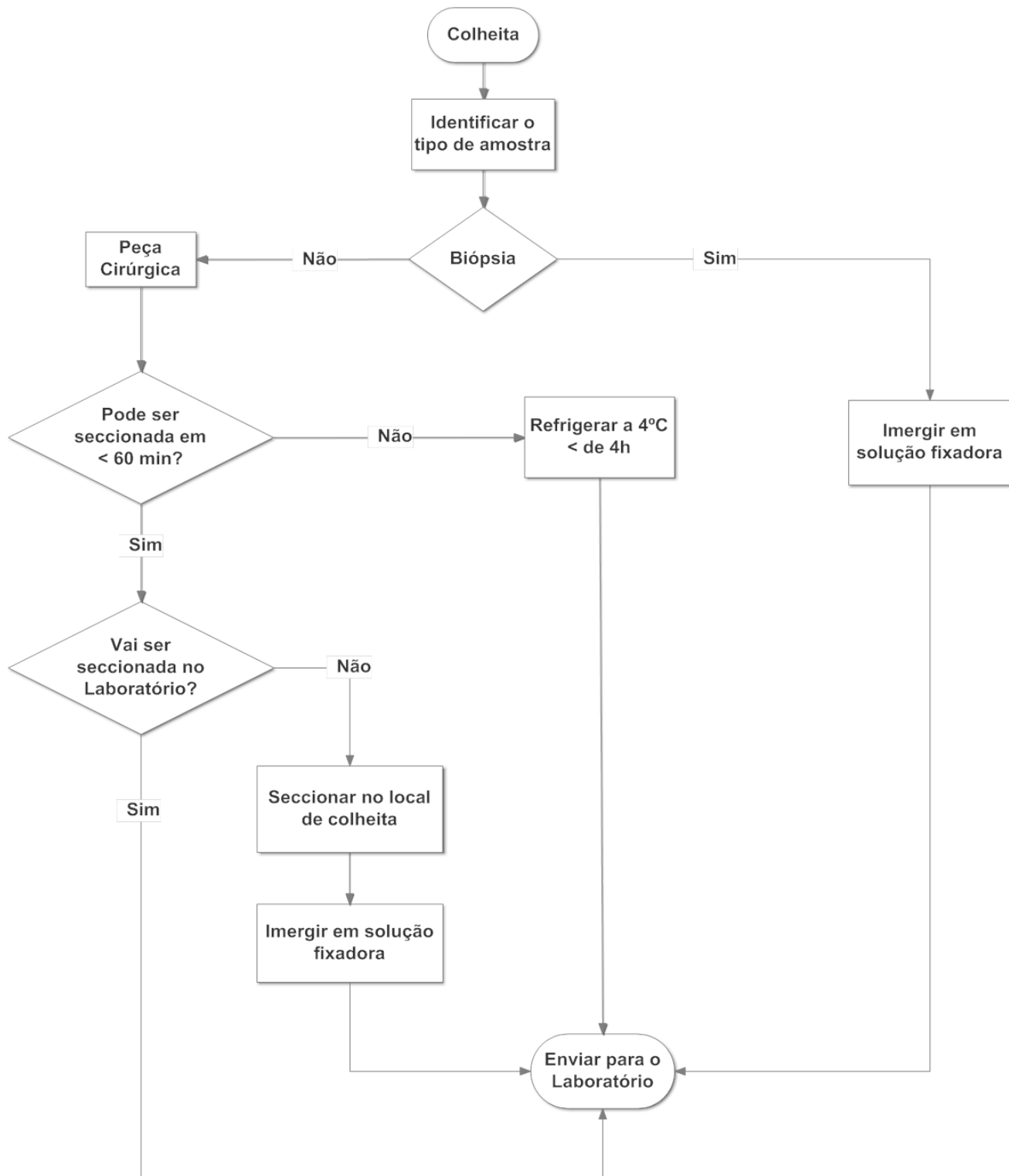
Amostras citológicas
Tempo de isquémia a frio superior a 1h a temperaturas entre 20 °C e 25 °C ou igual ou superior a 4h quando preservadas a 4 °C fora do fixador ¹⁶ .
Fixação noutras soluções fixadoras que não solução aquosa de formaldeído a 4% (formalina a 10%) tamponada por fosfatos a pH 7*.
Tempos de fixação inferiores a 6 horas para biópsias e a 24 horas para peças cirúrgicas ou superiores a 96 horas para ambos ^{15,16} .
Controlo externo positivo com marcação diferente da esperada.
Ductos normais com marcação superior a 1+.
Marcação citoplasmática que obscureça a marcação membranar.
Alterações morfológicas que impeçam a avaliação da membrana celular.

* Poderão ser utilizadas outras soluções desde que devidamente validadas.

† Tempos de fixação superiores a 96h não são critério absoluto de exclusão, devendo esta informação ser reportada para ser tida em consideração durante a avaliação.

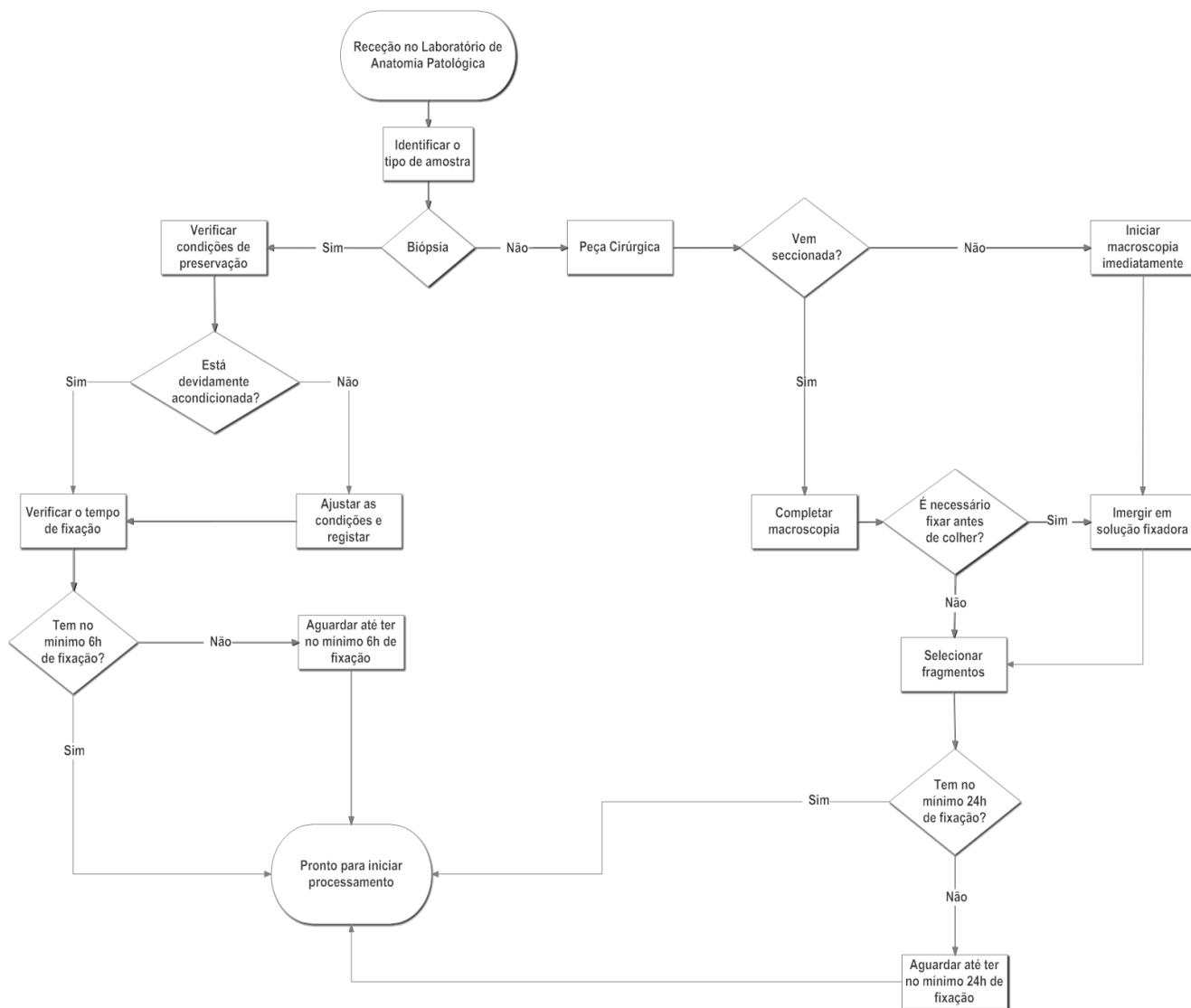
Apêndice C

Fluxograma de tomada de decisões no local de colheitas para a preservação de amostras para determinação do status HER2 por imunocitoquímica.



Apêndice D

Fluxograma de tomada de decisões no laboratório de Anatomia Patológica para a preservação de amostras para determinação do status HER2 por imunocitoquímica.



Apêndice E

Tabela de dupla entrada para cálculos de validação e controlo de qualidade

Resultado		Teste validado		Total
		Positivo	Negativo	
Imunocitoquímica	Positivo (3+)	a	b	a+b
	Equívoco (2+)	c	d	c+d
	Negativo (0/1+)	e	f	e+f
Total		a+c+e	b+d+f	Somatório

Apêndice F

Formulário

$$\text{Sensibilidade} = \frac{a}{a+e} \times 100$$

$$\text{Especificidade} = \frac{f}{b+f} \times 100$$

$$\text{Porcentagem de concordância} = \frac{a+f}{a+b+e+f} \times 100$$

$$\text{Porcentagem de determinações 2+ amplificadas} = \frac{c}{c+d} \times 100$$

Apêndice G

Algoritmo de cálculo da percentagem de concordância para validação do teste.

