



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

---

Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico

**LA CITOLOGIA URINARIA: REVISIONE DELLA  
LETTERATURA SUI CRITERI PER LA CLASSIFICAZIONE  
E SULL'UTILIZZO DEI BIOMARCATORI**

Relatore: *Chiar.ma*

*Prof.ssa Scarpelli Marina*

Tesi di Laurea di:

**Gatto Elisa**

Correlatore:

*Dott.ssa Antaldi Elena*

A.A. 2019/2020

*“Non bisogna temere i momenti difficili,  
perché è da quelli che viene il meglio”*

*Rita Levi-Montalcini*

# Indice

1	INTRODUZIONE.....	6
2	IL CONCETTO DELLA CITOLOGIA URINARIA E I RAPPORTI CON LE NEOPLASIE DELLE VIE URINARIE.....	8
2.1	Citologia urinaria.....	8
2.1.1	Vantaggi e limiti.....	9
2.2	Informazioni utili a fini diagnostici.....	9
2.3	Anatomia dell'apparato urinario.....	10
2.4	Neoplasie delle vie urinarie.....	11
2.4.1	Neoplasie della vescica.....	13
2.4.2	Neoplasie della pelvi e degli ureteri.....	15
2.4.3	Neoplasie dell'uretra.....	15
3	TECNICHE TRADIZIONALI DI PRELIEVO, PROCESSAZIONE E COLORAZIONE PER L'ESAME CITOLOGICO DELLE URINE.....	16
3.1	Prelievo e fissazione:.....	16
3.2	Processazione.....	17
3.2.1	Striscio diretto.....	18
3.2.2	Centrifugazione e citocentrifugazione.....	18
3.2.3	Citologia in fase liquida.....	21
3.2.4	Confronto tra le metodiche in fase liquida più utilizzate.....	23
3.3	Colorazione.....	24
3.3.1	Colorazione di Papanicolaou con coloratore automatico.....	24
4	REVISIONE CRONOLOGICA DELLE DIVERSE CATEGORIE DIAGNOSTICHE.....	26

4.1	Classificazione di Papanicolaou .....	26
4.2	Classificazione di Koss .....	26
4.3	Classificazione di Murphy .....	27
4.4	Classificazione di Ooms e Veldhuizen .....	27
4.5	Classificazione di Layfield .....	27
4.6	Classificazione di Rosenthal .....	28
4.7	Alcune riflessioni sulla categoria di atipico.....	29
5	IL PARIS SYSTEM ED IL CONFRONTO CON LE PRECEDENTI CLASSIFICAZIONI .....	31
5.1	Inadeguato.....	32
5.2	Negativo per carcinoma uroteliale (NHGUC) .....	34
5.2.1	Cellule uroteliali benigne superficiali (a ombrello).....	35
5.2.2	Cellule epiteliali squamose.....	35
5.2.3	Cellule ghiandolari .....	36
5.2.4	Frammenti di tessuto uroteliale benigno (BUTF) .....	36
5.2.5	Cluster di cellule uroteliali con nefrolitiasi .....	37
5.2.6	Cambiamenti reattivi per infezioni batteriche o virali.....	37
5.2.7	Cambiamenti associati a trattamenti radioterapici, chemioterapici o immunoterapici.....	37
5.2.8	Cellule vescicali seminali .....	38
5.3	Cellule uroteliali atipiche (AUC).....	38
5.4	Sospetto per carcinoma uroteliale di alto grado (SHGUC) .....	41
5.5	Carcinoma uroteliale di alto grado (HGUC).....	43
5.5.1	HGUC con differenziazione squamosa .....	46
5.5.2	HGUC con differenziazione ghiandolare .....	46
5.6	Neoplasia uroteliale di basso grado (LGUN).....	46

5.7	Altre lesioni maligne primarie, metastatiche e varie .....	46
5.7.1	Lesioni maligne epiteliali non uroteliali .....	47
5.7.2	Lesioni maligne non epiteliali .....	48
5.7.3	Lesioni maligne ematologiche, Melanoma, Tumori metastatici .....	48
5.8	Tasso di malignità nelle diverse classificazioni.....	48
5.9	Confronto con le precedenti classificazioni.....	49
6	TECNICHE IMMUNOISTOCHEMICHE E MOLECOLARI A SUPPORTO DELLA DIAGNOSI CITOLOGICA .....	51
6.1	BTA .....	51
6.2	NMP-22 .....	52
6.3	p16INK4a.....	52
6.4	miRNA.....	53
6.5	ImmunoCyt .....	53
6.6	UroVysion.....	54
6.6.1	Campioni della FISH .....	55
6.6.2	Performance della FISH .....	56
6.6.3	Limiti della FISH.....	57
6.6.4	Analisi dei segnali .....	57
6.6.5	Lettura automatizzata della FISH .....	60
7	PROBLEMATICHE LEGATE ALLE NUOVE LINEE GUIDA .....	61
8	CONCLUSIONI.....	64
9	BIBLIOGRAFIA.....	65
10	RINGRAZIAMENTI .....	75

# 1 INTRODUZIONE

I tumori del tratto urinario sono, nella maggior parte dei casi, carcinomi uroteliali e insorgono nella vescica. Il carcinoma uroteliale della vescica è la nona neoplasia più frequente nel mondo ed è la neoplasia più frequente del tratto genito-urinario.

I dati AIRTUM 2007-2011 indicano che è il quarto tumore per frequenza nel maschio ed ha una età media di insorgenza intorno ai 65-70 anni. I nuovi casi di tumore della vescica attesi in Italia nel 2019, sono 29.700 (24.000 negli uomini e 5.700 nelle donne).

I fattori di rischio sono numerosi. Tra questi i principali sono il fumo di sigaretta, l'esposizione alle amine aromatiche (1) (2) (3) (4) e le infezioni da Schistosoma (5). Potenziali fattori di rischio sono anche le infezioni da HPV (6) e fattori ambientali e genetici (7) (8) (9).

La classificazione della Organizzazione Mondiale della Sanità è stata aggiornata nel 2016 e comprende carcinomi uroteliali infiltranti con diverse varianti istologiche e lesioni uroteliali non infiltranti. Sono inoltre riconosciuti, con frequenza molto minore, adenocarcinomi, carcinomi squamosi e tumori neuroendocrini (10).

I carcinomi uroteliali rappresentano fra l'80 ed il 90% dei carcinomi della vescica. Una proporzione molto elevata di pazienti, calcolata fra il 70 e l'80%, ha al momento della diagnosi, una neoplasia non invasiva o solo superficialmente invasiva e viene trattata con resezione transuretrale.

Il rischio di recidiva per questi pazienti è legato a diversi fattori inclusa la multifocalità del tumore, le dimensioni dello stesso e il grado istologico.

La citologia urinaria ancora oggi continua ad avere un ruolo importante nel follow-up dei pazienti con carcinoma uroteliale (11) per le sue caratteristiche di basso costo e di non invasività, pur con dei limiti, rappresentati da una bassa sensibilità intrinseca nei tumori

uroteliali di basso grado, dalla necessità di una corretta preparazione/allestimento dei campioni e da una bassa riproducibilità fra osservatori.

Prima del 2013 la refertazione della citologia urinaria era gravata da una scarsa riproducibilità per mancanza di un sistema standard che ne permettesse una classificazione diagnostica accurata. I citopatologi utilizzavano termini descrittivi come “sospetto”, “indeterminato” o “atipico”, per definire gli stessi quadri diagnostici (12) creando confusione tra clinici e pazienti.

Durante il 18° Congresso Internazionale di Citologia, tenutosi a Parigi nel maggio del 2013, fu riconosciuta la necessità di una terminologia standardizzata per refertare i campioni citologici (13). Fu nominato un ‘Paris System Working Group’ composto da citopatologi, patologi e urologi che provvide a preparare e pubblicare un sistema standardizzato di refertazione della citologia urinaria appunto noto come *Paris system* (12).

Nello stesso contesto fu discusso anche il significato di test immunocitochimici e molecolari a supporto della diagnosi citologica urinaria. Alcuni test urinari sono stati approvati dalla FDA (Food and Drug Administration) ed altri sono ancora in fase di studio (14). La maggior parte dei Laboratori, in particolare quelli con livelli bassi-intermedi di attività, non ha inserito questi nuovi test nella routine diagnostica e continua a dipendere pesantemente dalla citologia urinaria tradizionale.

Lo scopo della tesi è stato quello effettuare una revisione della letteratura riguardante la citologia urinaria al fine di evidenziarne il ruolo aggiornato alla luce del sistema classificativo noto come Paris System e delle tecniche ancillari attualmente disponibili.

Una parte della tesi è dedicata alla descrizione delle metodiche citologiche utilizzate nel laboratorio di Citopatologia Diagnostica della Anatomia Patologica dell’Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedali Riuniti di Ancona.

## **2 IL CONCETTO DELLA CITOLOGIA URINARIA E I RAPPORTI CON LE NEOPLASIE DELLE VIE URINARIE**

Neoplasie possono insorgere lungo tutto il tratto urinario che comprende le cavità calicopieliche renali, gli ureteri, la vescica e l'uretra. Le cellule neoplastiche desquamano nel lume e vengono espulse con le urine. Nella prima metà del 1900, George Papanicolaou ipotizzò che la valutazione delle cellule del tratto urinario fosse un metodo utile per la ricerca di tumori in queste sedi (15). Negli anni, l'esame citologico del sedimento urinario si è rivelato un metodo molto utile per la diagnosi delle neoplasie urinarie anche se non definitivo dal momento che una diagnosi di neoplasia su citologico richiede comunque che il paziente sia sottoposto a cistoscopia e, eventualmente, a biopsia per la diagnosi definitiva (16).

### **2.1 Citologia urinaria**

La citologia urinaria è un esame che viene messo a punto mediante striscio convenzionale o citologia in fase liquida, a partire da un prelievo di urina spontanea, da catetere o lavaggi. Il campione subisce poi una fissazione, processazione e colorazione panottica, tali da permettere di visualizzare le cellule e le eventuali anomalie (17). La citologia urinaria non è un esame di screening per la popolazione generale. Viene impiegata infatti per la sorveglianza di pazienti sintomatici e per lo screening di una popolazione selezionata ad alto rischio di sviluppo del carcinoma uroteliale. I pazienti sintomatici che vengono sottoposti a questo tipo d'esame presentano sintomi urinari quali micro o macroematuria, pollachiuria e stranguria. Categorie di popolazione a rischio e, quindi sottoposti a screening mediante citologia urinaria, presentano infezioni o infiammazioni croniche (*Schistosoma haematobium*), o sono stati sottoposti ad irradiazione delle pelvi o a cicli di farmaci (ciclofosfamide, clornafazina, ecc.), o sono esposti al fumo di sigaretta o ad agenti cancerogeni industriali (18). La citologia urinaria viene impiegata, inoltre, come follow-up in pazienti con precedente neoplasia di alto o basso grado. Infatti, nonostante la



neoplasia di basso grado presenti prognosi favorevole, mostra un rischio di recidiva o progressione verso un carcinoma uroteliale di alto grado in circa il 10-15% dei casi (15). L'esame è richiesto anche per monitorare i pazienti con tumore uroteliale durante trattamento e pazienti con diagnosi citologica di neoplasia uroteliale, ma cistoscopia e biopsia non diagnostiche (19).

### **2.1.1 Vantaggi e limiti**

La citologia urinaria è un metodo semplice, non invasivo e relativamente economico per la ricerca dei carcinomi uroteliali. La sensibilità della citologia urinaria per la ricerca di tumori di basso grado varia tra il 26% e il 45 % con una specificità del 98%. Di contro, la sensibilità della citologia urinaria per il carcinoma uroteliale di alto grado, carcinoma in situ e displasia è del 70-80% con una specificità del 100% (20). I tumori di basso grado sono tra i più diffusi e la diagnosi rimane una sfida, dal momento che le cellule mostrano atipie da lievi a moderate (11). Per questo motivo un'alta percentuale di campioni urinari viene refertata in maniera ambigua. Questo tasso significativo di risultati ambigui può portare a problemi di gestione tra citologi e clinici. Le difficoltà della citologia urinaria sono associate alla scarsità di cellule, specialmente in associazione ad un quadro infiammatorio o con elevata contaminazione di cellule squamose, a cambiamenti degenerativi, a effetti dovuti alla strumentazione, a litiasi, a cambiamenti reattivi e a cambiamenti dovuti a terapie (21). Inoltre, l'esito dell'esame è strettamente condizionato dalla corretta preparazione e corretto allestimento del sedimento cellulare urinario e dall'esperienza dell'esaminatore (operatore-dipendente). È stata riscontrata, infatti, un'alta variabilità intra e inter-osservatori (22).

## **2.2 Informazioni utili a fini diagnostici**

Secondo le linee guida AIOM (Associazione Italiana Oncologia Medica) del 2019, il campione urinario deve essere accompagnato da una dettagliata descrizione della storia clinica del paziente (fumatore, pregresso carcinoma uroteliale), dalle modalità di raccolta/conservazione del campione, dalla natura del campione (minzione spontanea, cateterismo vescicale o ureterale, sacchetto di urostomia, lavaggio), dal motivo dell'esame (ematuria, urgenza/frequenza minzione, sospetto ecografico, screening lavoratori esposti, follow-up pregresso carcinoma), e da ogni dettaglio riguardante terapie precedenti o in atto, in quanto possono facilmente alterare le cellule e dare quindi dei falsi

positivi (23). Infatti, la cellularità e la morfologia cellulare possono essere alterate da manovre invasive (esempio cistoscopia o cateterismo), infezioni, infiammazioni, recenti interventi chirurgici, immunoterapia, radioterapia e chemioterapia locale o generale. Quindi, l'interpretazione dei campioni del tratto urinario è ottimizzata laddove c'è una stretta comunicazione tra urologi e citopatologi.

### **2.3 Anatomia dell'apparato urinario**

L'apparato urinario (24) è l'insieme di organi e di strutture finalizzati alla produzione e all'escrezione dell'urina e comprende i reni, le strutture calico-pielico renali, gli ureteri, la vescica e l'uretra.

Le strutture calico-pieliche renali, gli ureteri, la vescica e l'uretra costituiscono le vie urinarie e sono rivestite da un epitelio pseudostratificato noto come urotelio.

I reni sono due organi parenchimosi retroperitoneali pari e simmetrici posti ai lati della colonna vertebrale. Il rene è costituito da una zona midollare, che contiene le piramidi renali o del Malpighi, e da una zona corticale, che contiene i glomeruli. Le basi delle piramidi renali sono rivolte verso l'esterno, mentre gli apici (papille) sono rivolti verso l'ilo. Ciascuna papilla sporge in strutture dette calici che si uniscono a formare la pelvi renale che ha il compito di convogliare l'urina verso l'uretere. L'unità funzionale del rene è il nefrone costituito dal glomerulo, dalla capsula di Bowmann e dai tubuli renale e ansa di Henle. Il sangue, tramite l'arteriola afferente, arriva nel glomerulo dove si ottiene l'ultrafiltrato glomerulare (1.60-1.80 litri/die), che viene ulteriormente filtrato prima di diventare urina (1.5 litri/die) passando attraverso il tubulo renale, formato dal tubulo contorto prossimale, dall'ansa di Henle, dal tubulo contorto distale e dal dotto collettore.

Gli ureteri sono i canali escretori che convogliano l'urina dai reni alla vescica. Sboccano sul fondo della vescica posteriormente e lateralmente nel trigono vescicale.

La vescica è un organo cavo, muscolomembranoso ed impari, posto nella regione anteriore del bacino, appoggiato al pavimento pelvico. E' situata posteriormente alla parete addominale e alla sinfisi pubica, anteriormente al retto e sopra la prostata, nel maschio; anteriormente all'utero e vagina, nella femmina. Macroscopicamente la vescica viene suddivisa in tre regioni: fondo (o base), corpo ed apice. Sul fondo della vescica si

trovano, uno per lato, gli sbocchi degli ureteri (la zona compresa tra questi e l'orifizio dell'uretra è denominata trigono vescicale). Si riconoscono quattro tuniche, che dall'interno all'esterno prendono il nome di: tonaca mucosa, tonaca sottomucosa, tonaca muscolare e tonaca sierosa. La tonaca mucosa è caratterizzata da un epitelio pseudostratificato (urotelio), costituito da più strati cellulari che adattano la propria forma al grado di riempimento della vescica. Quando l'organo è vuoto le cellule superficiali hanno forma ad ombrello o a testa di fungo, quelle intermedie assomigliano ad una clava e quelle inferiori hanno una forma rotondeggiante. Nella vescica piena, invece, le cellule superficiali si appiattiscono e quelle intermedie si incuneano nelle basali rendendo l'epitelio molto più sottile e bistratificato.

L'uretra è il condotto che convoglia l'urina dalla vescica al meato urinario. L'uretra maschile è differente dall'uretra femminile sia per dimensioni (15-20 centimetri contro i 4-5 centimetri dell'uretra femminile) sia per funzione (nell'uomo funge anche da canale per il passaggio dello sperma). Dal punto di vista istologico è rivestita da urotelio.

## **2.4 Neoplasie delle vie urinarie**

La classificazione WHO 2016 delle neoplasie del tratto urinario è riportata di seguito (Tabella 1):

Tabella 1: Classificazione WHO dei tumori del tratto uroteliale (10)

## WHO classification of tumours of the urothelial tract

<b>Urothelial tumours</b>		<b>Neuroendocrine tumours</b>	
<i>Infiltrating urothelial carcinoma</i>	8120/3	Small cell neuroendocrine carcinoma	8041/3
Nested, including large nested		Large cell neuroendocrine carcinoma	8013/3
Microcystic		Well-differentiated neuroendocrine tumour	8240/3
Micropapillary	8131/3	Paraganglioma	8693/1
Lymphoepithelioma-like	8082/3		
Plasmacytoid / signet ring cell / diffuse		<b>Melanocytic tumours</b>	
Sarcomatoid	8122/3	Malignant melanoma	8720/3
Giant cell	8031/3	Naevus	8720/0
Poorly differentiated	8020/3	Melanosis	
Lipid-rich			
Clear cell		<b>Mesenchymal tumours</b>	
		Rhabdomyosarcoma	8900/3
<i>Non-invasive urothelial neoplasms</i>		Leiomyosarcoma	8890/3
Urothelial carcinoma in situ	8120/2	Angiosarcoma	9120/3
Non-invasive papillary urothelial carcinoma, low-grade	8130/2	Inflammatory myofibroblastic tumour	8825/1
Non-invasive papillary urothelial carcinoma, high-grade	8130/2	Perivascular epithelioid cell tumour	
Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential	8130/1	Benign	8714/0
Urothelial papilloma	8120/0	Malignant	8714/3
Inverted urothelial papilloma	8121/0	Solitary fibrous tumour	8815/1
Urothelial proliferation of uncertain malignant potential		Leiomyoma	8890/0
Urothelial dysplasia		Haemangioma	9120/0
		Granular cell tumour	9580/0
		Neurofibroma	9540/0
<b>Squamous cell neoplasms</b>		<b>Urothelial tract haematopoietic and lymphoid tumours</b>	
Pure squamous cell carcinoma	8070/3		
Verrucous carcinoma	8051/3	<b>Miscellaneous tumours</b>	
Squamous cell papilloma	8052/0	Carcinoma of Skene, Cowper, and Littre glands	8140/3
		Metastatic tumours and tumours extending from other organs	
<b>Glandular neoplasms</b>		Epithelial tumours of the upper urinary tract	
Adenocarcinoma, NOS	8140/3	Tumours arising in a bladder diverticulum	
Enteric	8144/3	Urothelial tumours of the urethra	
Mucinous	8480/3		
Mixed	8140/3		
Villous adenoma	8261/0		
<b>Urachal carcinoma</b>	8010/3		
<b>Tumours of Müllerian type</b>			
Clear cell carcinoma	8310/3		
Endometrioid carcinoma	8380/3		

The morphology codes are from the International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) [917A]. Behaviour is coded /0 for benign tumours; /1 for unspecified, borderline, or uncertain behaviour; /2 for carcinoma in situ and grade III intraepithelial neoplasia; and /3 for malignant tumours. The classification is modified from the previous WHO classification [756A], taking into account changes in our understanding of these lesions.

La classificazione delle neoplasie uroteliali comprende forme infiltranti e forme non infiltranti.

Nell'ambito dei carcinomi uroteliali infiltranti viene riconosciuta la possibilità di differenziazione di solito verso un istotipo ghiandolare (adenocarcinoma) o squamoso. Sono inoltre identificate in base alle loro caratteristiche morfologiche e, in parte, immunoistochimiche, alcune varianti.

Rispetto alla classificazione precedente le neoplasie uroteliali papillari non invasive sono suddivise in due gradi (basso ed alto grado) e viene introdotto il concetto di PUNLMP

(Neoplasia a Basso Potenziale di Malignità) per una serie di lesioni papillari di basso grado con un basso rischio di recidiva.

#### **2.4.1 Neoplasie della vescica**

La vescica è la sede più frequente di neoplasia dell'apparato urinario. I carcinomi vescicali sono spesso multifocali

Il carcinoma uroteliale rappresenta tipo istologico più frequente di neoplasia vescicale, può avere diverse forme di differenziazione, più comunemente in senso ghiandolare (adenocarcinoma) e squamoso. Adenocarcinomi puri e carcinomi squamosi puri sono molto rari così come i tumori neuroendocrini puri. La maggior parte dei carcinomi uroteliali non infiltra la parete al momento della diagnosi. I livelli di infiltrazione della parete costituiscono la base per la classificazione TNM ed hanno un ruolo fondamentale per la prognosi e la terapia dei pazienti. I carcinomi infiltranti possono infiltrare solo il tessuto connettivo sottoepiteliale o possono estendersi ad infiltrare la tonaca muscolare ed i tessuti extravescicali. La classificazione TNM è stata aggiornata nel 2018 (25).

Al momento della prima diagnosi una quota del 70%-80% dei tumori della vescica è composto da neoplasie uroteliali papillari non infiltranti (26) o solo superficialmente infiltranti.

I criteri principali per la classificazione istologica delle lesioni papillari sono:

- *Papilloma uroteliale*: proliferazione costituita da papille separate senza tendenza alla confluenza rivestite da urotelio normale non ispessito.
- *Papilloma a crescita invertita*: cordoni anastomizzati e trabecole costituiti da cellule non atipiche che originano dall'epitelio superficiale e si invaginano nella lamina propria.
- *Neoplasia uroteliale papillare di basso potenziale di malignità (PUNLMP)*: si tratta di lesioni ad architettura papillare rivestite da urotelio ispessito, 'iperplastico', privo di evidente atipia. Sono considerati biologicamente e clinicamente intermedi tra il papilloma e il carcinoma uroteliale papillare di basso grado. Il rischio principale è la recidiva locale. Sono descritti rari casi con progressione di malignità nelle recidive.

- *Carcinoma uroteliale papillare non infiltrante di basso grado (LGPUC)*: è una neoplasia papillare, con aspetto di solito ramificato, rivestita da urotelio ispessito con minime atipie citologiche, di tipo ‘displastico’. Le cellule sono moderatamente ipercromiche, con lieve pleomorfismo nucleare e bassa attività mitotica. L’invasione della lamina propria o della tonaca muscolare propria è estremamente rara.
- *Carcinoma uroteliale papillare non infiltrante di alto grado (HGUPC)*: neoplasia papillare con architettura grossolana caratterizzata da disordine della polarizzazione cellulare e da significativa atipia citologica associate ad elevata attività proliferativa. La morfologia è come quella di un carcinoma in situ. Circa l’80% dei tumori di alto grado invade la lamina propria e, meno frequentemente, la tonaca muscolare propria. Nel 50% dei casi sono presenti metastasi linfonodali.

La classificazione delle lesioni piatte (non papillari) è più complessa e comprende:

- *Proliferazione uroteliale a incerto potenziale di malignità (UPUMP)*: lesioni costituite da un urotelio ispessito che si dispone a formare pliche mucose ridondanti di altezza variabile senza formazione di assi connettivo-vascolari.
- *Displasia uroteliale*: lesione di solito associata ad altre proliferazioni dell’urotelio. Quando isolata si riconosce per con alterazioni architetturali e citologiche intermedie tra quelle dell’iperplasia reattiva e il carcinoma in situ. Si tratta di una lesione poco studiata con una bassa riproducibilità diagnostica.
- *Carcinoma uroteliale in situ (CIS)*: è comunemente associato ad altre lesioni ed in particolare al carcinoma uroteliale papillare di alto grado. In forma isolata è estremamente raro e si caratterizza per la presenza di un disordine. Definisce una neoplasia uroteliale intra-epiteliale piana (non-papillare) caratterizzata da atipie severe distribuite in tutti gli strati dell’urotelio. La lesione è caratterizzata da urotelio di spessore variabile che mostra atipie cellulari dallo strato basale sino a quello più superficiale. L’atipia consiste in nuclei ipercromici, irregolari, di dimensione aumentata e con nucleoli prominenti. La membrana basale è integra e gli elementi uroteliali neoplastici non infiltrano la lamina propria.

I carcinomi papillari non infiltranti e i carcinomi in situ possono progredire nelle recidive o presentarsi, già all'inizio associati ad una componente infiltrante. In alcuni casi esordiscono già come tumori estesamente infiltranti e poco differenziati in cui non è riconoscibile una lesione precursore meglio differenziata.

#### **2.4.2 Neoplasie della pelvi e degli ureteri**

I tumori delle pelvi e degli ureteri sono simili a quelli vescicali, ma assai più rari. Più del 90% delle neoplasie della pelvi renali e degli ureteri sono carcinomi uroteliali e condividono gli agenti eziologici dei carcinomi uroteliali della vescica. Il 2-4% di tali tumori sono bilaterali e circa il 50% dei pazienti che vengono trattati per questa neoplasia sviluppa successivamente tumori uroteliali in sede vescicale (8).

#### **2.4.3 Neoplasie dell'uretra**

I tumori dell'uretra sono estremamente rari e interessano prevalentemente i maschi. In questa sede prevalgono i carcinomi squamosi e solo il 15% circa sono carcinomi uroteliali.

### **3 TECNICHE TRADIZIONALI DI PRELIEVO, PROCESSAZIONE E COLORAZIONE PER L'ESAME CITOLOGICO DELLE URINE**

Le tecniche tradizionali prevedono allestimento del campione citologico urinario mediante processi di centrifugazione o con la citologia in fase liquida. Adeguatezza e opportuna conservazione del campione urinario sono fattori imprescindibili per una corretta diagnosi citologica.

Di seguito vengono espone le tappe principali.

#### **3.1 Prelievo e fissazione:**

Le tipologie di campioni che possono essere utilizzate per l'esame citologico urinario sono: urina spontanea; urina da catetere; campioni di urina prelevata tramite spazzole e lavaggi; campioni di urina dal condotto ileale; e campioni da ureteri con catetere a doppia J.

L'urina spontanea è il campione più economico e ampiamente usato per la diagnosi delle neoplasie della vescica, ma è poco sensibile per diagnosticare neoplasie a livello dell'uretere e dell'uretra, dove possono essere necessarie tecniche di lavaggio e spazzolamento. Per l'esame chimico-fisico, in genere, viene richiesto il mitto intermedio della prima urina del mattino; mentre, per l'esame citologico, è opportuno raccogliere la seconda urina del mattino così da evitare la presenza di eventuali batteri e cellule squamose deteriorate che residuano lungo l'uretra tutta la notte e possono inficiare l'interpretazione microscopica. Per aumentare l'affidabilità del test è necessario effettuare la raccolta dell'urina in 3 giorni consecutivi, all'interno di provette Falcon da 50 ml l'uno, con tappo a vite, pre-riempite con 20 ml di fissativo a base alcolica (Cytospin collection fluid) (27).



I campioni da lavaggio vescicale possono essere più appropriati quando il sospetto clinico di una malignità uroteliale è elevato o quando viene eseguita la cistoscopia per altri motivi. A causa della maggiore cellularità e di una migliore conservazione di questi campioni rispetto all'urina spontanea, rappresentano il campione ideale per l'ibridazione in situ in fluorescenza (FISH) (23). Poiché le tecniche di cateterizzazione e spazzolamento possono modificare le caratteristiche citologiche (aumento del numero e delle dimensioni degli ammassi cellulari) del campione, il citologo deve essere informato sul tipo di campione inviato per l'esame. I lavaggi devono essere ottenuti utilizzando una soluzione isotonica sterile.

I campioni prelevati tramite spazzolamento possono essere strisciati immediatamente su vetrino, ma è preferibile posizionare l'estremità della spazzola direttamente sul barattolo per il trasporto liquido contenente fissativo (50% di etanolo) o soluzione di sale bilanciata e inviarlo immediatamente al laboratorio, dove vengono preparati strisci diretti e/o Cytospin o altri vetrini in fase liquida. Tale tecnica è adottabile per vescica, ureteri e pelvi renale ed è più accurata nella diagnosi delle neoplasie uroteliali del tratto urinario superiore, rispetto ad altre tecniche citologiche (23).

Per la sorveglianza dei pazienti il cui tratto inferiore è stato interrotto a seguito di cistectomia, si possono usare i campioni di urina del condotto ileale (23).

### **3.2 Processazione**

Per prima cosa è necessario accettare il campione controllando: i dati identificativi del paziente, il tipo di campione, il tempo di raccolta e la storia clinica pertinente. Segue la processazione, ovvero l'insieme delle procedure che consentono di preparare il campione in modo tale che sia possibile l'osservazione microscopica. Le tecniche usate riguardano:

- Striscio diretto;
- Centrifuga e citocentrifuga;
- Citologia in fase liquida.

### **3.2.1 Striscio diretto**

Il materiale ottenuto con le diverse tecniche di prelievo viene strisciato direttamente sui vetrini portaoggetti, previa centrifugazione per arricchimento. Per lo striscio è necessario preparare i vetrini apponendo l'etichetta sul bordo sabbiato per la corretta identificazione. Apporre una goccia di sedimento urinario poco sotto il bordo sabbiato, prelevandola con una pipetta e utilizzare un secondo vetrino portaoggetti con cui toccare la goccia e strisciare in avanti fino a metà della lunghezza del vetrino stesso. In questo modo si ottiene un vetrino con una goccia dalla forma allungata su un monostrato ben distribuito e concentrato di cellule (28).

### **3.2.2 Centrifugazione e citocentrifugazione**

Le tecniche di centrifugazione, compresi i tempi e le velocità, possono variare da un laboratorio all'altro. La tecnica che segue, con i relativi tempi e velocità di centrifugazione, è quella adottata dal laboratorio di Citopatologia diagnostica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedali Riuniti di Ancona. Si tratta di una tecnica tradizionale utilizzata da molti anni dal laboratorio con alcuni adattamenti migliorativi (29).

Pretrattare i 3 campioni di urina spontanea, contenuti nelle provette Falcon con fissativo, (Figura 1) mediante una centrifugazione per arricchimento a 3000 rpm per 5 min. Ripetere la centrifugazione qualora il pellet non risulti ben deposto. Al termine di questa operazione eliminare il surnatante, lasciando 10-15 ml di campione (Figura 2). Risospendere il pellet al vortex e unificare in un'unica provetta Falcon. Posizionare il vetrino (opportunamente identificato con nome e cognome del paziente) nel cytofunnel e dispensare il campione all'interno delle camerette (Figura 3) nella quantità pari a 2-3 gocce (con pipetta pasteur) o 3 microlitri (con pipetta automatica) (23). Citocentrifugare il cytofunnel a 1500 rpm per 8 min. premere la leva laterale del cytofunnel ed estrarre il vetrino ottenuto. Fissare immediatamente i vetrini in etanolo 96° per almeno 10 min. Il vetrino deve presentare 2 spot di cellule su monostrato e morfologicamente ben preservati (Figura 4). Un sedimento visibilmente spesso può essere strisciato per evitare sovrapposizione cellulare.

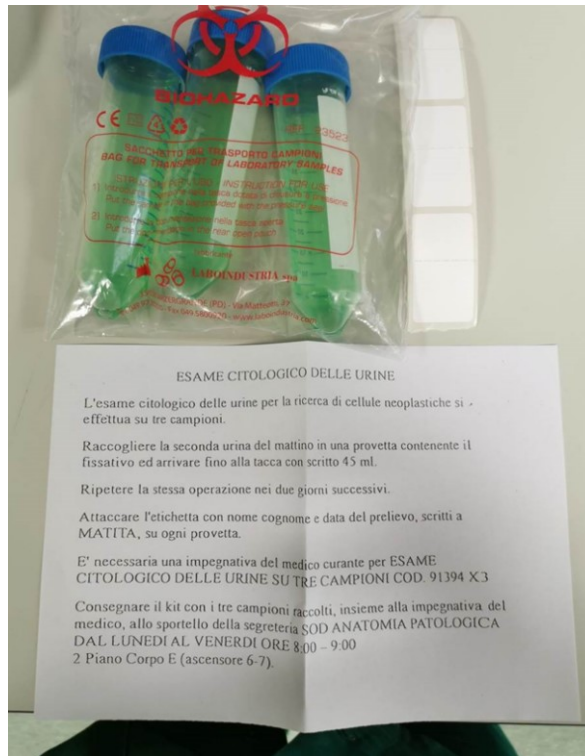


Figura 1: Campioni di urina spontanea raccolti in 3 giorni consecutivi in provette Falcon con fissativo a base alcolica, accompagnati dalle relative istruzioni per la raccolta e da 3 etichette da apporre su ciascuna provetta.

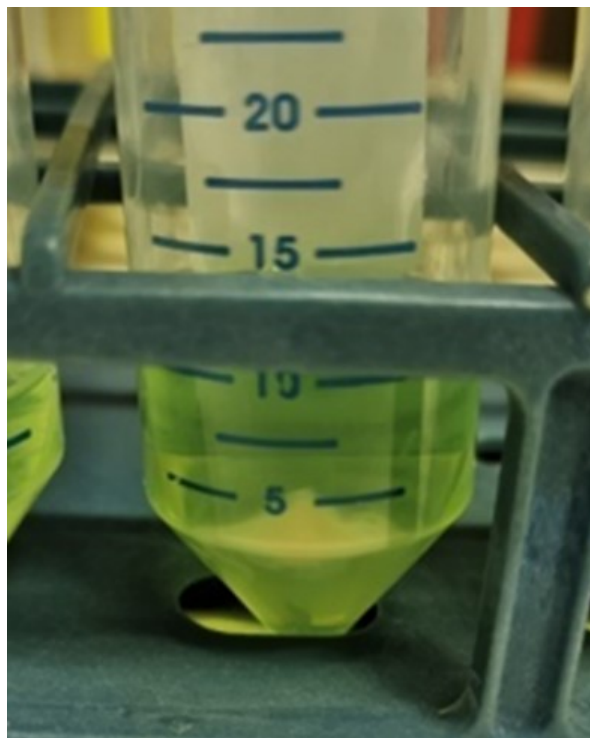
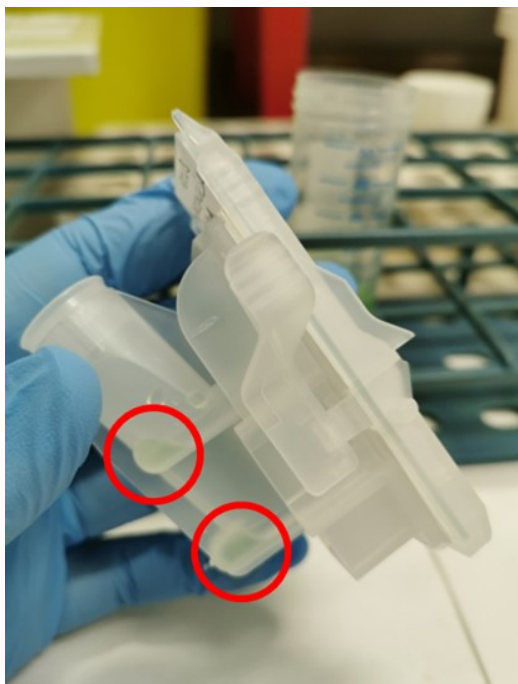


Figura 2: Sedimento cellulare ben visibile dopo centrifugazione ed eliminazione del surnatante.



*Figura 3: Camerette del cytofunnel (cerchiate in rosso) in cui caricare il campione, fino al riempimento delle camerette stesse.*



*Figura 4: Spot (in numero di 2, cerchiati in rosso) di cellule su monostrato e ben conservate su vetrino ottenuti mediante citocentrifugazione.*

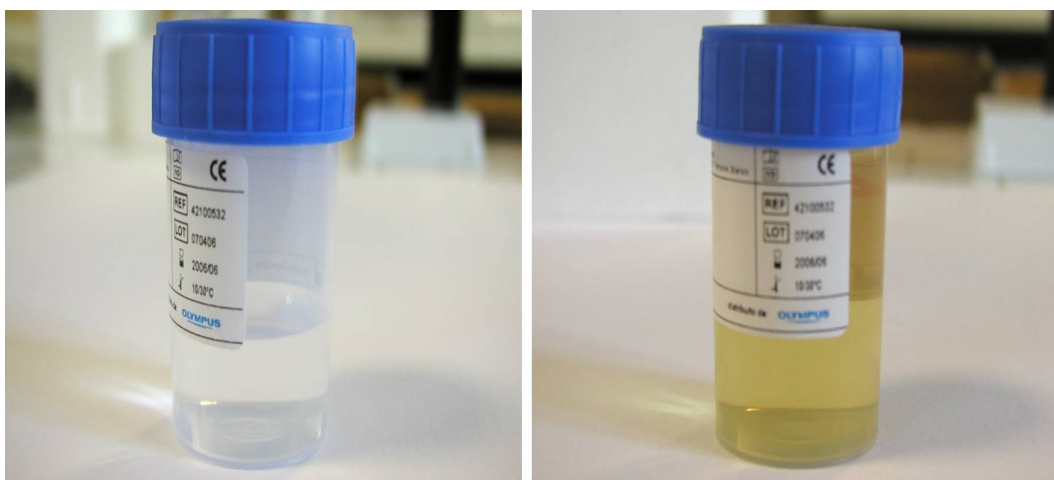
### 3.2.3 Citologia in fase liquida

Recentemente, sono state utilizzate con successo tecniche di citologia in fase liquida, quali: ThinPrep, Autocyte (SurePath) e Cytoscreen. Tutti e tre si avvalgono dell'uso di una fiala (vial) per la raccolta e il trasporto del materiale prelevato, al cui interno è presente una quota di una miscela fissativa a base di alcool etilico a 95° e/o di Alcool metilico e/o di Formalina (Figura 5).

- Il ThinPrep è stato approvato dall'FDA (Food and Drug Administration) nel 1991 e, negli ultimi anni, ha subito un'evoluzione che ha permesso una forte automazione della procedura con l'introduzione di strumentazioni quali Thin Prep 2000, ThinPrep 3000 e ThinPrep 5000, per i preparati non-ginecologici. Il primo sistema commercializzato, ThinPrep 2000, richiede la presenza quasi continua di un operatore dedicato; il ThinPrep 3000 riduce fortemente la presenza dell'operatore, limitata alla fase di inserimento e raccolta a fine ciclo dei preparati in strato sottile; processa fino a 80 campioni per ciclo e può effettuare fino a tre cicli nelle 8 ore lavorative; il sistema ThinPrep 5000, di recente introduzione, ha una forte automazione e processa circa 160 campioni per ciclo. Permette, inoltre, l'esatto abbinamento fiala-vetrino attraverso un sistema di lettura del codice a barre sulla fiala e la stampa della corrispettiva etichetta sul vetrino. Il ThinPrep è un metodo automatico per eseguire preparati su strato sottile. Il campione viene raccolto all'interno del vial, chiuso, etichettato e inviato al laboratorio dove viene inserita all'interno del sistema ThinPrep. Le cellule che si trovano disperse all'interno del fissativo vengono catturate dal filtro transcyt, senza danneggiarne morfologie e cluster, grazie ad un software che controlla la pressione negativa che fa aderire le cellule al filtro. Avviene poi la deposizione del materiale su di un vetrino pretrattato facendo ruotare il filtro e premendolo dolcemente sul vetrino su un'area definita di 20 mm. La soluzione Cytolit contenuta nel barattolo aiuta a ridurre la presenza di eritrociti, muco ed altro materiale che potrebbe interferire con la valutazione finale (30).
- L'Autocyte (SurePath), previa adeguata preparazione dei campioni, prelevati in modo simile al metodo precedente, attraverso una serie di operazioni e di centrifugazioni per eliminare eritrociti, muco e proteine in eccesso, permette di

allestire 48 campioni alla volta, provvedendo anche alla colorazione di Papanicolaou. La fase di pre-processazione prevede la miscelazione del campione su vortex e il passaggio su uno strumento PrepMate che trasferisce il materiale in una provetta con specifico reagente bucando la fiala. Si procede quindi a una prima centrifugazione, alla rimozione del sovrarnatante e a un'ulteriore centrifugazione del liquido rimanente. La provetta con il pellet viene trasferita sullo strumento PrepStain che risospende i precipitati di cellule nell'acqua deionizzata tamponata e trasferisce un'aliquota delle sospensioni cellulari su appositi vetrini. Avviene il trasferimento dei vetrini nella camera di sedimentazione dove vengono lasciati incubare per permettere alle cellule di sedimentare. Si ottiene un vetrino con uno strato di cellule uniforme del diametro di 13 mm. Le sequenze, i volumi, i tempi e l'orientamento delle fasi di trasferimento e colorazione sono controllate dalla stazione di lavoro.

- L'altra tecnologia è denominata Cytoscreen e consiste in un metodo molto semplice basato sulla citocentrifugazione mediante il quale è possibile preparare 6 campioni simultaneamente. Il metodo si avvale di comuni strumenti di laboratorio e di colorazioni classiche. L'uso del nefelometro permette di ottenere uno standard omogeneo. Il sistema conserva il "fondo" (al contrario dei due metodi precedenti) senza oscurare il preparato e consente di ottenere fino a 3 spot per vetrino nelle preparazioni di campioni non ginecologici (anche a diluizioni diverse). La lettura dei preparati non comporta training di formazione.



*Figura 5: Fiale (vial) per la citologia in fase liquida. Prima fiala contiene il solo fissativo, la seconda contiene fissativo e campione (urina).*

I metodi di citologia in fase liquida offrono maggior sicurezza, riducono il rischio di campionamento inadeguato, permettono il mantenimento delle cellule nel loro stato naturale e la possibilità di ripetere e/o di approfondire il test senza dover richiamare il paziente.

Queste tecniche sono in fase di implementazione presso il laboratorio di Citopatologia Diagnostica della Azienda Ospedali Riuniti.

### **3.2.4 Confronto tra le metodiche in fase liquida più utilizzate**

La maggior parte dei laboratori utilizza il metodo ThinPrep o la tecnica Cytospin (31). Le maggiori obiezioni all'impiego della citocentrifuga (Cytospin) sono: la possibile distorsione delle cellule che vengono "sparate" sul vetrino e la possibile perdita di cellule per assorbimento del fluido nel passaggio attraverso il filtro. Inoltre, prima della citocentrifugazione, il materiale biologico va trattato manualmente dal personale tecnico in quanto deve essere prima centrifugato per ottenere un sedimento e questo causa un potenziale incremento del rischio biologico. I risultati delle due tecniche sembrano comparabili nel carcinoma uroteliale di alto grado (32). In uno studio che ha messo a confronto i campioni citologici in fase liquida (ThinPrep e SurePath) con i preparati ottenuti con metodica tradizionale i primi risultavano migliori nella valutazione delle categorie maligne, ma non nella identificazione dell'adenocarcinoma (20). In uno studio di Straccia et al (29) sono stati presi in considerazione i risultati della refertazione secondo il Paris System e non si sono osservate differenze significative di sensibilità o specificità per la diagnosi di carcinoma uroteliale di alto grado tra ThinPrep e Cytospin. Tuttavia, emerge che le cellule uroteliali atipiche (AUC nel Paris system) sono più facili da riconoscere utilizzando il ThinPrep, piuttosto che il Cytospin e solo gli AUC diagnosticati con ThinPrep sono risultati statisticamente collegati a casi negativi per carcinoma o con carcinoma uroteliale di basso grado. In generale vi è accordo che i dettagli nucleari sono più evidenti nei preparati ThinPrep rispetto ai Cytospin. Inoltre, il ThinPrep offre una cellularità maggiore, una migliore conservazione delle cellule ed un fondo più pulito rispetto ai metodi convenzionali (33). Nella tecnica SurePath il problema principale è rappresentato dalla fase di pre-processazione in quanto relativamente indaginosa, lunga, poco standardizzabile e poco automatizzabile, con necessità di un operatore dedicato. Inoltre, in fase di aspirazione del sovrantante, c'è il rischio che le cellule più piccole

possono essere asportate con altro materiale rischiando una perdita della cellularità del campione.

In conclusione, dalla revisione della letteratura emerge che la metodica ThinPrep, fra quelle di citologia liquida è la migliore per la citologia urinaria ed è superiore, almeno in alcuni campi diagnostici, allo striscio tradizionale.

### **3.3 Colorazione**

Dopo la fissazione per 10 minuti in alcol 96%, i vetrini possono essere colorati utilizzando la colorazione di Papanicolaou o colorazioni citochimiche speciali (Grocott, Gram e PAS). La colorazione di Papanicolaou, che prende il nome dal citopatologo che per primo la mise a punto, è una colorazione tricromica data dalla combinazione di una colorazione nucleare con Ematossilina, e due controcolorazioni, OG-6 e EA-50 (eosina acida al 50%). OG-6 colora la cheratina mentre EA-50 (una miscela di verde luce, di bruno di Bismark e di eosina con aggiunta di acido fosfotungstico e di carbonato di litio) colora il citoplasma delle cellule squamose epiteliali, nucleoli e globuli rossi. Ad oggi, viene utilizzata la colorazione Papanicolaou modificata, ovvero senza OG-6. La colorazione può essere effettuata manualmente o con coloratore automatico. La colorazione manuale permette un ottimo dettaglio nucleare e una buona definizione dei preparati, ma, di contro, il colorante automatico è più efficiente permettendo di ridurre il TAT (Turn Around Time), cioè il tempo che intercorre dal momento della richiesta fino alla refertazione. Il Leica Autostainer XL produce risultati coerenti e di alta qualità sia per le colorazioni di routine che per le colorazioni speciali e può eseguire protocolli singoli o multipli in contemporanea.

#### **3.3.1 Colorazione di Papanicolaou con coloratore automatico**

Il Laboratorio di Citopatologia dell'Azienda Ospedali Riunti di Ancona utilizza il coloratore Autostainer XL Leica che è stato programmato per la colorazione Papanicolaou modificata ed ottimizzata per tale strumento. I dettagli della colorazione sono rappresentati in tabella 2:



Tabella 2: Metodica per Autostainer XL Laica del laboratorio di Citopatologia SOD di Ancona.

<b>METODICA PER AUTOSTAINER XL LAICA</b>	
<b>ALCOOL 50°</b>	<b>2 MIN</b>
<b>H2O DISTILLATA</b>	<b>1 MIN</b>
<b>EMATOSSILINA DI GILL</b>	<b>2,30 MIN</b>
<b>H2O FONTE</b>	<b>9 MIN</b>
<b>ALCOOL 50°</b>	<b>2 MIN</b>
<b>ALCOOL 96°</b>	<b>1 MIN</b>
<b>EA50</b>	<b>2 MIN</b>
<b>ALCOOL 96°</b>	<b>1,30 MIN X 2 CAMBI</b>
<b>ALCOOL 100°</b>	<b>3 MIN X 2 CAMBI</b>
<b>XILOLO</b>	<b>3 MIN</b>
<b>MONTAGGIO COPRIOGGETTO CON BALSAMO</b>	

## **4 REVISIONE CRONOLOGICA DELLE DIVERSE CATEGORIE DIAGNOSTICHE**

Nel corso degli anni sono stati pubblicati diversi schemi di classificazione diagnostica per la citologia urinaria, in concomitanza con l'evoluzione della classificazione istopatologica, della comprensione della citologia urinaria e del carcinoma uroteliale. Le difficoltà per la definizione di uno schema di classificazione definitivo includono: mancanza di una definizione rigorosa di criteri citologici convalidati per categorie specifiche, mancanza di consenso per la categorizzazione atipica e mancanza di un'ampia accettazione e utilizzo da parte della comunità dei patologi (34).

### **4.1 Classificazione di Papanicolaou**

Il primo che iniziò a considerare l'applicazione della citologia urinaria per la ricerca del carcinoma fu proprio Papanicolaou che, nel 1947, propose uno schema di classificazione che comprendeva 5 classi. Le classi 1 e 2 erano essenzialmente considerate negative, la classe 3 indicava un sospetto per carcinoma uroteliale e le classi 4 e 5 indicavano un positivo per carcinoma uroteliale. In questa fase iniziale le definizioni o i criteri per ciascuna categoria non furono definite in maniera rigorosa (34).

### **4.2 Classificazione di Koss**

Per la sua classificazione, pubblicata nel 1973, Koss seguì in parallelo la citopatologia e l'istopatologia e osservò che, all'inizio, le due discipline erano abbastanza distinte e che la comprensione dei patologi era molto vaga su ciò che la citopatologia poteva offrire (35). Quindi propose una classificazione citologica che si basava su quella istologica. Divise i carcinomi papillari in tumori di basso grado (grado 1), di grado intermedio (grado 2) e di alto grado (grado 3), a seconda delle anomalie architetturali e nucleari. Osservò che i tumori di basso grado, compresi i papillomi e i carcinomi papillari di grado 1, non potevano essere classificati come maligni (36). Infatti, gli ammassi papillari presenti all'esame citologico di pazienti con tumori di basso grado, si potevano osservare anche in condizioni infiammatorie e in campioni prelevati tramite strumentazione, come

lavaggio o spazzolamento. Definì le seguenti caratteristiche citomorfologiche che caratterizzavano il carcinoma: ipercromasia nucleare (più importante), contorni nucleari irregolari, disegno cromatinico anormale e alta cellularità. Definì come cellule uroteliali atipiche quelle cellule che avevano cambiamenti nucleari ma senza le caratteristiche inequivocabili del cancro. Le cellule atipiche con ipercromasia e contorni prevalentemente rotondi o ovali le classificò come cellule atipiche 1 (ATY 1), e quelle che presentavano ipercromasia e anomalie della membrana nucleare le classificò come cellule atipiche 2 (ATY 2) (34).

### **4.3 Classificazione di Murphy**

Nel 1984, Murphy et al descrissero le caratteristiche citomorfologiche del carcinoma uroteliale e suggerirono un sistema di classificazione per la citologia delle urine che includeva: citologia negativa; displasia; cellule atipiche, sospetto per malignità; cellule tumorali maligne divise in carcinoma di grado 1, carcinoma di grado 2, carcinoma di grado 3 e carcinoma in situ squamo-cellulare; carcinoma indifferenziato; e altre neoplasie non epiteliali. Fu introdotta la categoria diagnostica di displasia per quei casi borderline tra lesioni di basso grado e cambiamenti reattivi difficili da interpretare (34).

### **4.4 Classificazione di Ooms e Veldhuizen**

Qualche anno dopo, nel 1992, Ooms e Veldhuizen, evidenziarono la mancanza di criteri diagnostici per la categoria di displasia introdotta da Murphy e proposero un nuovo schema di classificazione diagnostica. Questo comprendeva le seguenti categorie: citologia negativa; cellule atipiche con significato incerto; cellule atipiche con sospetto di malignità; carcinoma di grado 1; carcinoma di grado 2; carcinoma di grado 3; carcinoma in situ squamo-cellulare; adenocarcinoma a piccole cellule ed altri (34).

### **4.5 Classificazione di Layfield**

Nel 2003, Layfield et al, sotto gli auspici della Papanicolaou Society of Cytopathology Task Force, pubblicarono le categorie diagnostiche per la citologia delle urine formattate in modo simile al sistema Bethesda del 2001 per la refertazione della citologia cervicale. Il loro schema comprendeva 3 categorie: negativo, positivo e una categoria equivoca, chiamata semplicemente cellule uroteliali atipiche. Gli autori riconoscevano che le cellule

atipiche rappresentavano un problema diagnostico e che sarebbero stati necessari ulteriori studi per stabilire meglio i criteri per la sottoclassificazione dei campioni atipici. Gli autori affrontarono anche l'introduzione di studi ausiliari, come l'ibridazione in situ in fluorescenza (FISH) per una migliore definizione diagnostica (34).

#### **4.6 Classificazione di Rosenthal**

Nel 2013 Rosenthal et al pubblicarono il template dell'Ospedale John Hopkins proponendo le seguenti 7 categorie diagnostiche: 1) negativo per atipia uroteliale o malignità (NUAM); 2) carcinoma uroteliale di basso grado (LGUC); 3) carcinoma uroteliale di alto grado (HGUC); 4) cellule uroteliali atipiche di significato indeterminato (AUC-US); 5) cellule uroteliali atipiche che non escludono HGUC (AUC-H); 6) altri tipi di cancro; 7) inadeguato. Si focalizzò, quindi, sulla categoria di atipico provando a definire delle sottocategorie (37).

La tabella seguente (Tabella 3) mette a confronto le principali categorie diagnostiche pubblicate prima del Paris System.

<b>Papanicolau (1947)</b>	<b>Koss (1985)</b>	<b>Murphy (1984)</b>	<b>Ooms e Veldhuizen (1993)</b>	<b>Layfield (2004 )</b>	<b>Rosenthal (2013)</b>
I	Cellule benigne	negativo	negativo	negativo	NUAM <sup>1</sup>
II	Poche cellule atipico 1 (ATY 1) <sup>2</sup>				
III	Cluster, ingrandimento nucleare, poche cellule atipico 2 (ATY 2) <sup>3</sup>	Cellule displastiche	Atipico, significato incerto	Cellule uroteliali atipiche	AUC-US
IV		Sospetto per malignità	Sospetto per malignità		AUC-H
V	Cellule tumorali maligne e/o presenza di numerose cellule atipico 2 (ATY 2)	Cellule maligne	Cellule maligne	Carcinoma uroteliale	Carcinoma uroteliale

Tabella 3: Confronto delle principali classificazioni classificazione prima del Paris System (34).

#### 4.7 Alcune riflessioni sulla categoria di atipico

La categoria di atipico non è ben definita in letteratura e un osservatore può chiamare atipico non ulteriormente specificato ciò che un altro osservatore può classificare come sospetto per malignità. Questo stato di refertazione della citologia delle urine può essere frustrante per i clinici e i pazienti. In uno studio sono state prese in considerazione le caratteristiche di “atipia” che erano più utili per classificare un campione come sospetto

<sup>1</sup> Negativo per atipia uroteliale o malignità

<sup>2</sup> Cellule atipiche con ipercromasia e forma rotonda o ovale.

<sup>3</sup> Cellule con ipercromasia e membrane nucleari anormali

per carcinoma uroteliale o come benigno (38). Sono emersi 7 caratteristiche comuni e l'atipia fu definita al pari del carcinoma uroteliale di basso grado, ovvero come aumento del rapporto nucleo-citoplasma e contorni nucleari irregolari. Nella pratica clinica, la maggior parte dei citopatologi praticanti separava le urine atipiche in 2 categorie generali: sospette per carcinoma uroteliale e atipiche non altrimenti specificate. Per anni sono stati osservati gli stessi quadri diagnostici dando loro nomi diversi (34). A differenza della citologia cervicale, non vi era un unico sistema di refertazione standard e ampiamente accettato. Pertanto, le categorie diagnostiche per la segnalazione della citologia delle urine erano variabili tra i diversi laboratori, riflettendo le tendenze dei singoli citopatologi e il feedback dei medici.

## 5 IL PARIS SYSTEM ED IL CONFRONTO CON LE PRECEDENTI CLASSIFICAZIONI

Nella consapevolezza che l'uso della citologia urinaria era fortemente limitato dalla variabilità della refertazione fra diversi osservatori, nel 2006 furono pubblicati i risultati di un Quiz internazionale telecitologico effettuato da 246 partecipanti internazionali. I partecipanti erano chiamati a dare la loro diagnosi su 292 immagini da 42 casi di citologia urinaria con aspetti morfologici 'equivoci' e da 10 casi di controllo con morfologia non equivoca. I risultati mettevano in evidenza divergenze preoccupanti e clinicamente significative. Infatti, il 48.4% di carcinomi uroteliali di alto grado (HGUC) furono diagnosticati come alterazioni reattive; il 54.5% di cellule infette da poliomavirus (decoy) furono diagnosticate come sospetto/HGUC; il 79.2% di cellule basali come atipiche (su lavaggi vescicali); e il 64% di carcinomi uroteliali di basso grado (LGUC) come negativi (39). Emergeva chiaramente come fosse necessario ridefinire i criteri diagnostici. Una Task Force della International Academy of Cytology durante il 18° Congresso Internazionale di Citologia tenuto a Parigi a Maggio 2013 prese in carico il mandato di: identificare gli HGUC, per cui la citologia mostra elevata sensibilità; standardizzare i criteri e la terminologia; ridefinire i criteri di adeguatezza del campione e ridefinire i criteri di "atipico". Nel 2016, fu pubblicato il Paris System che rappresenta il risultato del mandato del Congresso di Parigi (12).

Il Paris System comprende le seguenti 6 categorie diagnostiche più una categoria definita 'inadeguato':

1. Negativo per carcinoma uroteliale (NHGUC)
2. Cellule uroteliali atipiche (AUC)
3. Sospetto per carcinoma uroteliale di alto grado (SHGUC)
4. Carcinoma uroteliale di alto grado (HGUC)
5. Neoplasia uroteliale di basso grado (LGUN)
6. Altre lesioni maligne primarie, metastatiche e varie

## **5.1 Inadeguato**

Il volume del campione è un fattore importante per determinare l'adeguatezza (Figura 6) dello stesso. Infatti, esiste una chiara correlazione tra i campioni con volume scarso e una mancata diagnosi di malignità (40). Un volume appropriato per un campione di urina spontanea fresca da studiare mediante citologia in fase liquida, in particolare con la metodica SurePath, è di almeno 30 ml. Ma questo fattore non è sufficiente a definire l'inadeguatezza del campione e non è corretto scartare a priori campioni con volume scarso. Infatti, mentre per le urine spontanee è importante considerare il volume, per le urine prelevate tramite strumentazione bisogna considerare l'abilità dell'operatore e la cellularità. Sono da ritenersi adeguati i campioni con 10-20 cellule per 10 HPF (campi ad alto ingrandimento) ben conservate. Inadeguati se ci sono meno di 10 cellule per 10 HPF (12) (Figura 7).



## Adequacy of Urine Specimens

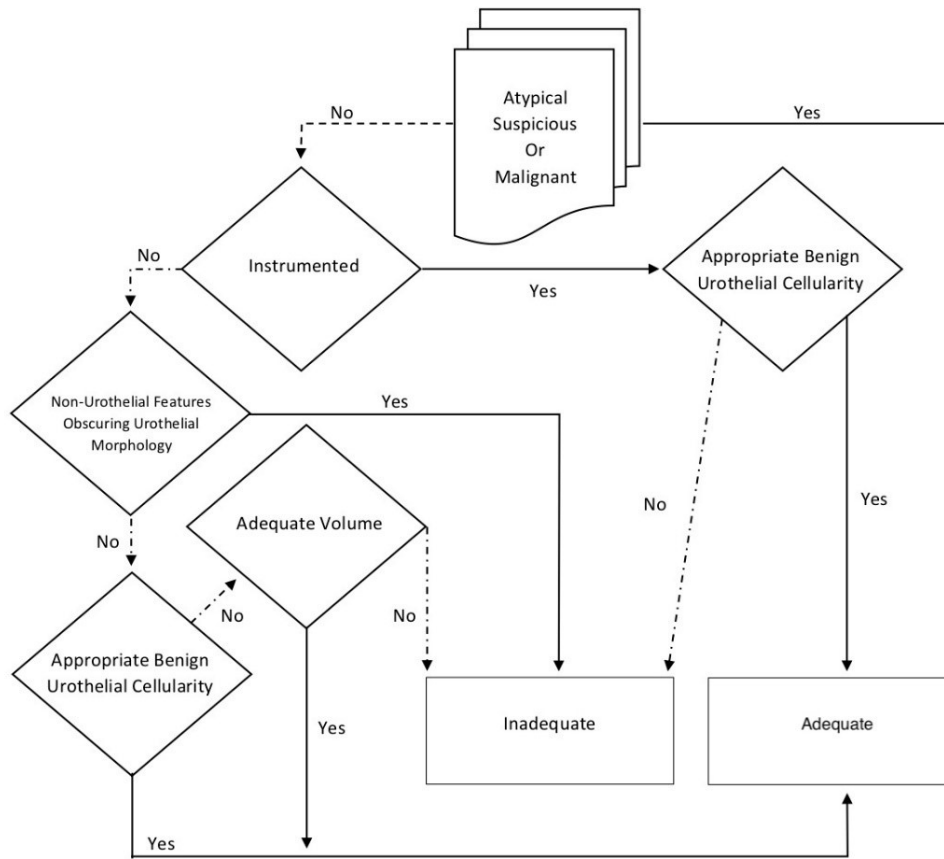
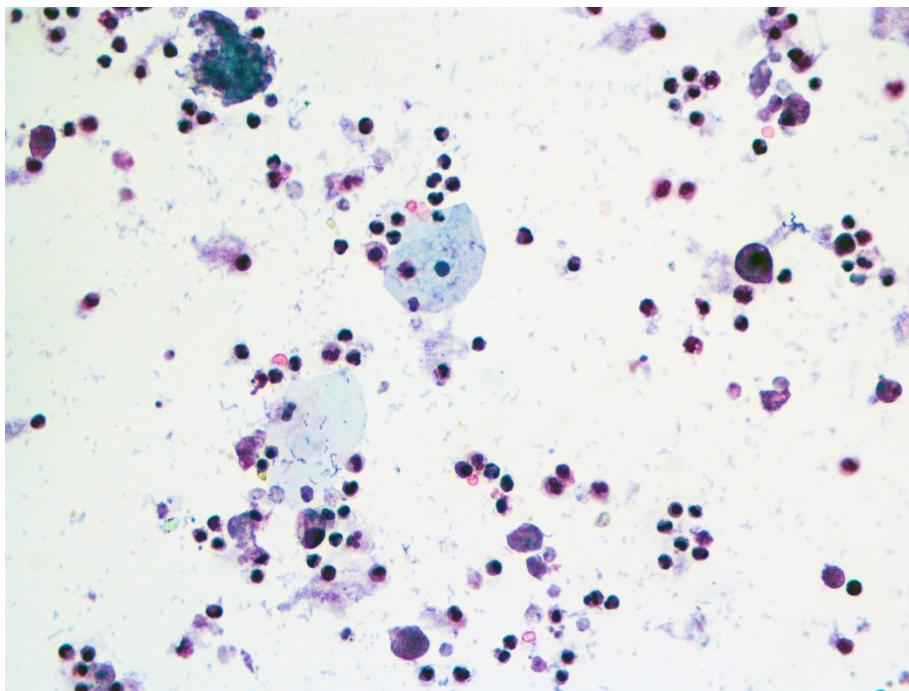


Figura 6: L'algoritmo di adeguatezza mostra la raccomandazione del Paris System per la corretta relazione tra la fonte del campione, la diagnosi citologica, il volume delle urine, la cellularità uroteliale e le caratteristiche oscuranti. Le caratteristiche oscuranti includono cellule non uroteliali come contaminanti vaginali, batteri, infiammazione acuta, spermatozoi e cristalli che, quando abbondanti, possono oscurare le cellule uroteliali e le loro caratteristiche. L'adeguatezza deve essere validata per i campioni strumentali e non (12).



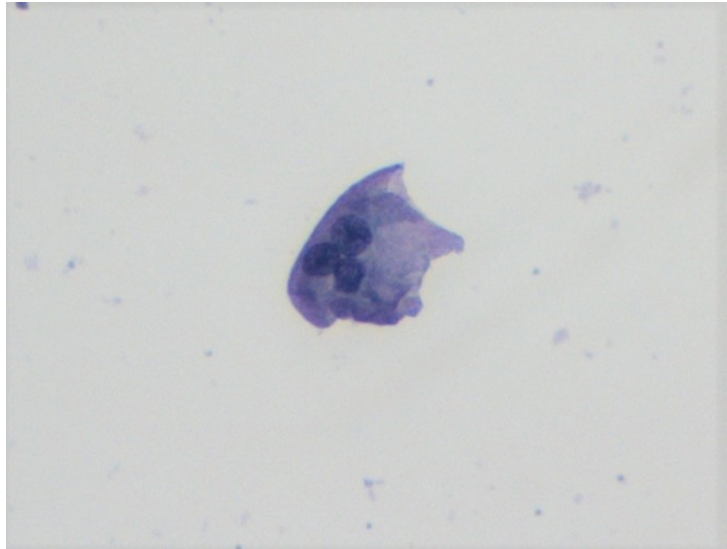
*Figura 7: Poche cellule degenerate e granulociti. Quadro non diagnostico, da refertare come inadeguato. (urine spontanee, Cytospin) (Laboratorio di Citopatologia Anatomia Patologica)*

## **5.2 Negativo per carcinoma uroteliale (NHGUC)**

La definizione di negativo, in generale, comprende cellule normali che non mostrano alterazioni. Il Paris System include nella categoria di negativo tutte quelle entità che, pur presentando delle alterazioni, non sono correlate ad un rischio di sviluppare carcinoma di alto grado. Esistono infatti dei cambiamenti citologici benigni dovuti a uno stato reattivo/infiammatorio; a effetto citopatico virale; a litiasi; a trattamenti chemioterapici, immunoterapici e radioterapici. Sono da refertare come negativi anche frammenti di tessuto uroteliale benigno (BUTF), senza modifiche morfologiche in assenza di strumentazioni o post strumentazione e cellule normali inusuali, ad esempio spermatozoi, cellule delle vescicole seminali e cellule del tratto genitale femminile (41). Tuttavia, Brimo et al (42) hanno riscontrato il carcinoma uroteliale di alto grado o il carcinoma in situ in 16 su 103 casi (15,5%) citologicamente benigni su biopsia di follow-up al momento dello screening sintomatico e della sorveglianza del cancro uroteliale. Il successo della citologia urinaria dipende dal tipo di campione (spontaneo o strumentale) e dal grado (basso o alto) del carcinoma uroteliale.

### 5.2.1 Cellule uroteliali benigne superficiali (a ombrello)

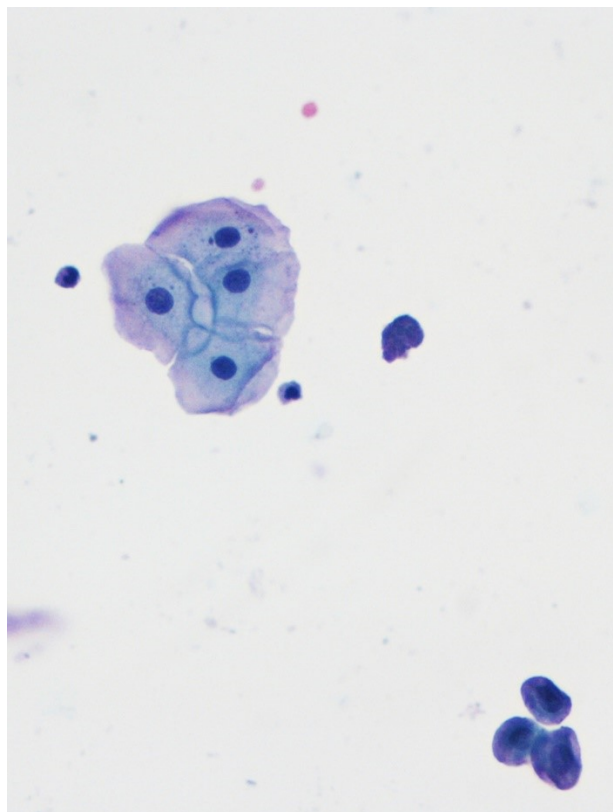
Le cellule a ombrello (Figura 8) possono apparire “atipiche” con nuclei ingranditi e numerosi nucleoli. Ma fa parte di una condizione benigna/reattiva. Ciò che le distingue dalla controparte maligna è il basso rapporto nucleo/citoplasma (N/C), bordi smerlati caratteristici, citoplasma vacuolato e membrane nucleari lisce.



*Figura 8: Cellula a ombrello plurinucleata. NHGUC (urine spontanee, Cytospin) (Laboratorio di Citopatologia Anatomia Patologica)*

### 5.2.2 Cellule epiteliali squamose

Sono più frequenti nelle donne, potendo prendere origine anche dalla vagina e dal perineo. Se il campione è di tipo strumentale possono originare dall'uretra o dal trigono vescicale. Le cellule epiteliali squamose (Figura 9) possono presentare delle alterazioni morfologiche in caso di litiasi o, nelle donne giovani, se dovute a contaminazione vaginale, per influenza ormonale. Ma negli anziani possono indicare la presenza di un HGUC con differenziazione squamo-cellulare.



*Figura 9: Gruppo di 4 cellule epiteliali in alto a sinistra e piccolo gruppo di cellule basali o parabasali in basso a destra. Le cellule non presentano atipie (NHGUC). (urine spontanee, Cytospin) (Laboratorio di Citopatologia Anatomia Patologica)*

### **5.2.3 Cellule ghiandolari**

Nelle donne possono derivare dalla cervice o dal corpo uterino e sono, in genere, poche e degenerate. Nelle urine spontanee si possono rinvenire normalmente cellule ghiandolari dell'endometrio, anche se nelle donne in menopausa rappresentano un campanello d'allarme. Nelle urine da lavaggio vescicale sono più spesso raggruppate in cluster ma possono anche trovarsi come cellule singole con piccoli nuclei e citoplasma vacuolato.

### **5.2.4 Frammenti di tessuto uroteliale benigno (BUTF)**

Prima si riteneva che la presenza di BUTF nelle urine spontanee fosse anormale, in realtà sono benigni e si possono rinvenire per vari motivi (43). Le cause includono manipolazione rettale/prostatica, jogging, ecc. Nelle urine prelevate mediante strumentazione sono costituiti da numerose cellule benigne disposte in gruppi che assomigliano a cluster papillari con confini lisci, e che mancano di asse fibrovascolare.

### **5.2.5 Cluster di cellule uroteliali con nefrolitiasi**

Sono gruppi di cellule che possono presentare nuclei ingranditi, rapporto N/C leggermente aumentato, degenerazione nucleare e citoplasmatica. Ma tali alterazioni sono da considerarsi benigne in presenza di litiasi.

### **5.2.6 Cambiamenti reattivi per infezioni batteriche o virali**

Nella citologia urinaria, cambiamenti morfologici nelle cellule quali nuclei leggermente ingranditi, nucleoli prominenti, ma con fine cromatina uniformemente, membrane nucleari sottili e presenza di neutrofili con cellule uroteliali reattive, supportano un processo reattivo e benigno (cistite acuta), testimoniati anche da cluster di batteri sul fondo e dovrebbero essere diagnosticati come NHGUC.

Gli effetti citopatici virali sono dovuti all'herpes virus (HSV 1,2), papillomavirus (HPV), citomegalovirus (CMV) e, più frequentemente, al poliomavirus (BK). Le cellule infette dal virus del poliomavirus (cellule decoy) si presentano ingrandite con singole inclusioni basofile omogenee che occupano la maggior parte dell'area nucleare. Le membrane nucleari di tali cellule sono di forma liscia e regolare, rispetto alle membrane nucleari irregolari nelle cellule maligne di alto grado, che spesso imitano. Quando queste cellule degenerano, la basofilia scompare lasciando una ragnatela di cromatina residua. Tuttavia, se è vero che una cellula le cui alterazioni dovute a un'infezione da virus è da considerarsi negativa, è anche vero che le cellule tumorali possono essere infettate dal virus. In questo caso bisogna prestare attenzione alla mancanza di regolarità della membrana nucleare.

### **5.2.7 Cambiamenti associati a trattamenti radioterapici, chemioterapici o immunoterapici**

I trattamenti radioterapici inducono cambiamenti quali citomegalia e nucleomegalia, ma rapporto N/C conservato. Si possono osservare anche vacuoli nucleolari o citoplasmatici, questi ultimi ingranditi, e la presenza di più nuclei.

I trattamenti chemioterapici causano ingrandimento del nucleo delle cellule superficiali, cellule multinucleate, ipercromasia e aumento del rapporto N/C. In questi casi possono essere d' aiuto i test ancillari come la FISH.

I trattamenti immunoterapici endovesicali con BCG (Bacillo di Calm ette-Guerin) possono dar luogo a granulomi (Figura 9), composti da istiociti epitelioidi misti a linfociti. Occasionalmente, si vedono anche cellule giganti multinucleate. Ancora una volta, la presenza di granulomi in un ambiente clinico appropriato, cio  nei pazienti trattati con BCG, non deve innescare la diagnosi di atipia nei campioni di urina.

### **5.2.8 Cellule vescicali seminali**

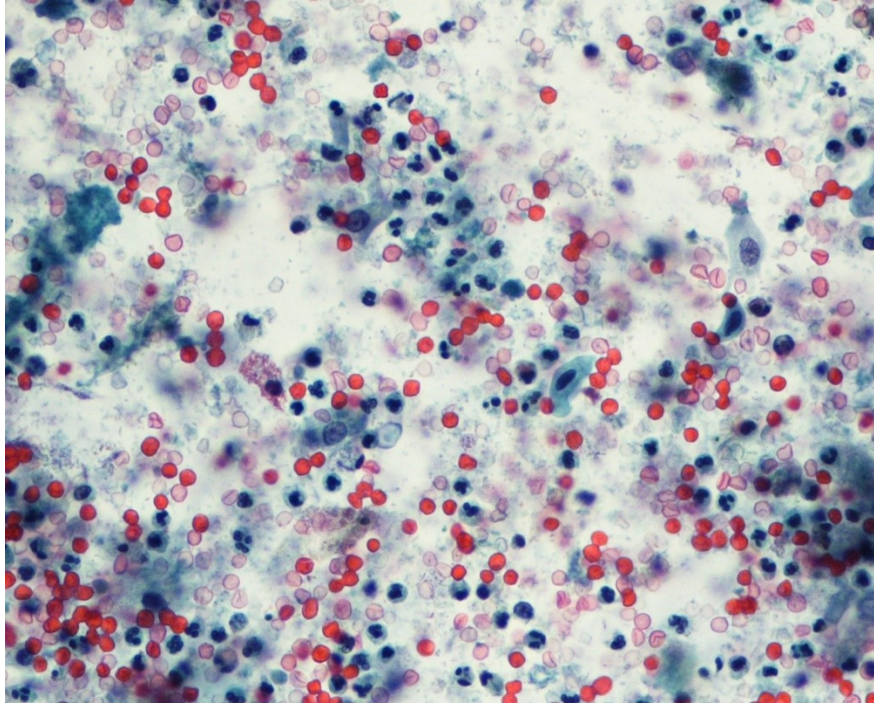
Sporadicamente si possono rinvenire cellule delle vescicole seminali nelle urine, specialmente in pazienti anziani dopo esame digito-rettale. Le cellule delle vescicole seminali hanno spesso un aspetto bizzarro con nuclei notevolmente ingranditi e citoplasma schiumoso. La cromatina   ipercromica e degenerata, mentre nelle cellule maligne   grossolana. Si distinguono dalle cellule tumorali anche per la presenza di pigmento giallo/marrone dovuto alle lipofuscine. Spesso, le cellule seminali sono accompagnate da spermatozoi maturi.

### **5.3 Cellule uroteliali atipiche (AUC)**

Il termine “atipico” fu introdotto per la prima volta da Papanicolaou per definire le cellule che presentavano un sospetto molto basso di malignit  (44). Oggi questo termine   criticato dai clinici, ma   un reale bisogno del citopatologo, com’  testimoniato dal suo crescente uso, per definire ci  che non   benigno da ci  che non   chiaramente maligno (45). Sulla base dell’esperienza del passato e sulle critiche avanzate da molti ricercatori, la classificazione del Paris System propone una definizione standard per la categoria di atipia, mediante criteri quantitativi, immagini di riferimento concordate e chiaro significato clinico. Rientrano in questa categoria i campioni citologici che contengono atipie citologiche da lievi a moderate e sono esclusi i campioni che presentano modificazioni reattive da calcoli, infezioni, infiammazioni, terapie e campioni mal conservati e degenerati in cui il grado di atipia non pu  essere valutato con certezza. Affinch  un campione citologico rientri in questa categoria, devono essere soddisfatti il criterio maggiore e un solo criterio minore (se soddisfa due o pi  criteri minori rientra nella categoria diagnostica di SHGUC, a meno che non vi siano cambiamenti degenerativi marcati).

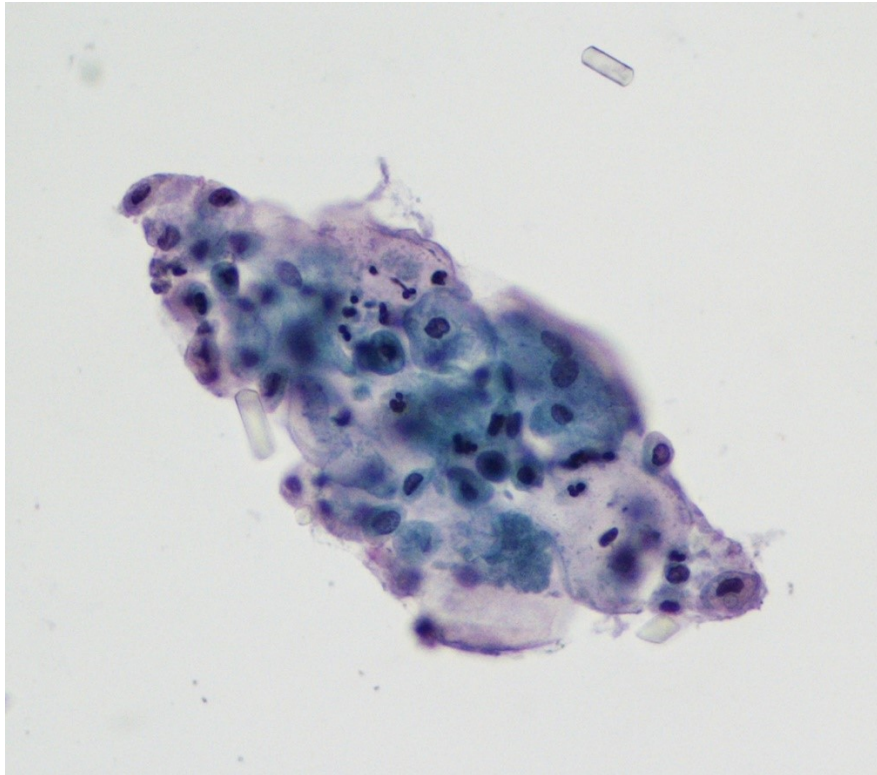
- ❖ Criteri maggiori richiesti:
  - cellule uroteliali non superficiali e non degenerate con aumento del rapporto nucleo/citoplasma ( $>0.5$ ).
  
- ❖ Criteri minori richiesti (uno solo tra questi):
  - ipercromasia nucleare;
  - membrane nucleari irregolari;
  - cromatina irregolare grossolana;
  - meno di 5 cellule ben conservate.

Le normali cellule uroteliali intermedie e basali, tipicamente osservate in campioni di urina strumentali, devono essere identificate e classificate come NHGUC, nonostante abbiano un alto rapporto N/C e possano apparire leggermente ipercromatiche. Nei casi in cui vi è un sospetto per HGUC, ma c'è anche una degenerazione estesa, AUC (Figure 10-11) è una scelta valida. Sia la qualità e la quantità di AUC in un campione di urina sono importanti per la diagnosi. Al momento, non vi è alcuna raccomandazione per contare il numero di cellule uroteliali atipiche per una diagnosi di AUC. Tuttavia, è chiaro che con l'aumentare del numero di cellule atipiche con le caratteristiche descritte aumenta anche la possibilità di malignità e la probabilità che il caso venga diagnosticato come SHGUC o HGUC (12).



*Figura 10: Presenza di numerosi granulociti ed emazie con cellule dai nuclei ipercromici e rapporto N/C leggermente aumentato, suggestivi di AUC. (urine spontanee, Cytospin) (Laboratorio di Citopatologia Anatomia Patologica)*





*Figura 11: Gruppo di cellule con nuclei ipercromici e, in alcuni casi, rapporto N/C aumentato (AUC). Presenza di cristalli. (urine spontanee, Cytospin) (Laboratorio di Citopatologia, Anatomia Patologica)*

#### **5.4 Sospetto per carcinoma uroteliale di alto grado (SHGUC)**

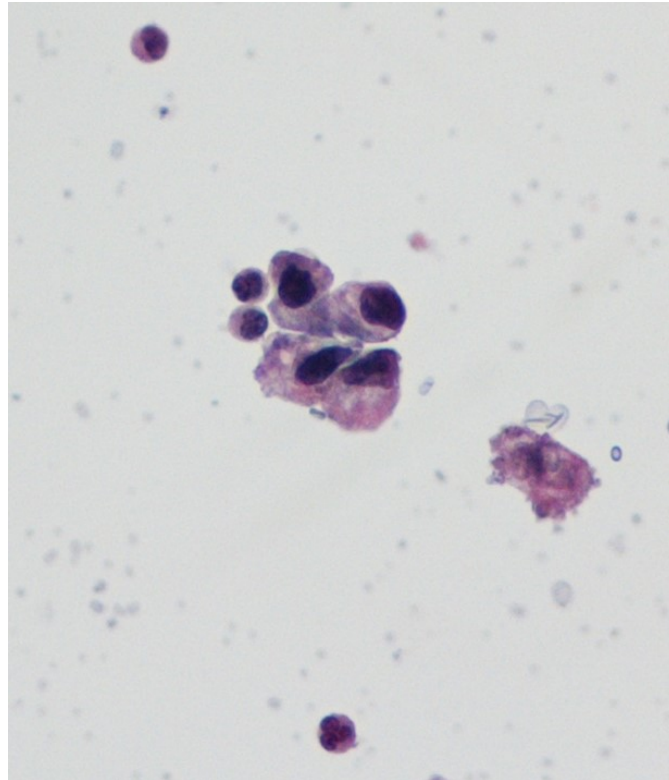
Questo termine non è stato usato in maniera coerente in letteratura. Per definire lo stesso concetto sono state usate terminologie come “AUC che non esclude HGUC”, “AUC-H”, o “sospetto per malignità” o “AUC tendente al maligno” (46). Ricadono in questa categoria diagnostica le cellule che mostrano severe atipie che non sono comunque sufficienti per un HGUC e sono eccessive per AUC. Affinché un campione citologico rientri in questa categoria dovrebbe soddisfare entrambi i criteri maggiori e almeno uno dei criteri minori.

- ❖ Criteri maggiori:
  - Aumento del rapporto N/C (>0,5-0,7);
  - Ipercromasia da moderata a grave.
- ❖ Criteri minori (almeno uno di questi):
  - Cromatina irregolare;
  - Membrane nucleari irregolari.

Le caratteristiche che possono essere riscontrate ma non devono necessariamente essere presenti sono:

- Posizione nucleare eccentrica;
- Fondo necrotico;
- Pleomorfismo;
- Mitosi;
- Corpi apoptotici.

La decisione di assegnare il caso nelle categorie "SHGUC" (Figura 12) o "positivo per HGUC" si basa sul numero delle cellule anomale, secondo i criteri di cui sopra, che devono essere in numero di 5-10 (criterio quantitativo). Ma di fronte ad atipie severe, contesto clinico e tipo di campione particolari si può assegnare la categoria HGUC anche con un numero così esiguo di cellule. Infatti, i campioni di urina spontanea sono meno cellulati rispetto a quello strumentali e, se si osservano poche cellule ma con gravi atipie, si può refertare come HGUC. D'altra parte, si raccomanda di avere almeno 10 cellule anormali prima di etichettare un caso come "positivo per HGUC" in campioni strumentali derivati dal tratto uroteliale superiore. Le cellule sono di solito viste singole o in gruppi e i criteri diagnostici di cui sopra sono valutati in modo più affidabile nelle singole cellule (12).



*Figura 12: Gruppo di cellule con rapporto nucleo citoplasma aumentato e ipercromasia, suggestivi di SHGUC. (urine spontanee, Cytospin) (Laboratorio di Citopatologia Anatomia Patologica)*

## **5.5 Carcinoma uroteliale di alto grado (HGUC)**

Nonostante la bassa sensibilità per la neoplasia uroteliale di basso grado (LGUN) e lo sviluppo di diverse tecniche più recenti come l'ibridazione in situ (FISH) per lo screening e la diagnosi di carcinoma uroteliale (UC), la citologia urinaria rimane ancora il gold standard per lo screening del cancro della vescica, soprattutto per l'HGUC. Infatti, le cellule maligne di alto grado possono essere identificate con la citologia ma non con la cistoscopia (47). La sensibilità della citologia urinaria varia dal 10 al 43,6 % per il basso grado al 50-85 % per l'HGUC; e la specificità varia dal 26,3 all'88 %, a seconda della tipologia di raccolta del campione e della presentazione clinica (48). In citologia è impossibile distinguere tra carcinoma in situ o invasivo. L'unica differenza sta nel fatto che il carcinoma in situ ha fondo pulito, senza emazie, molta flogosi e detriti cellulari.

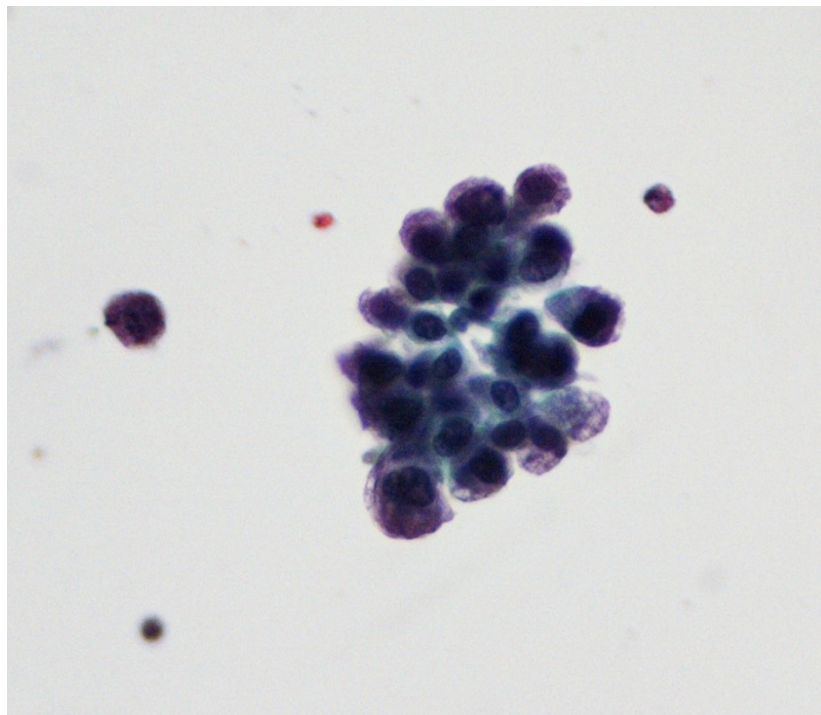
L'HGUC (Figure 13-14-15) viene diagnosticato sulla base dei seguenti criteri:

- Cellularità: almeno 5-10 cellule anormali;
- Rapporto N/C:  $\geq 0,7$ ;

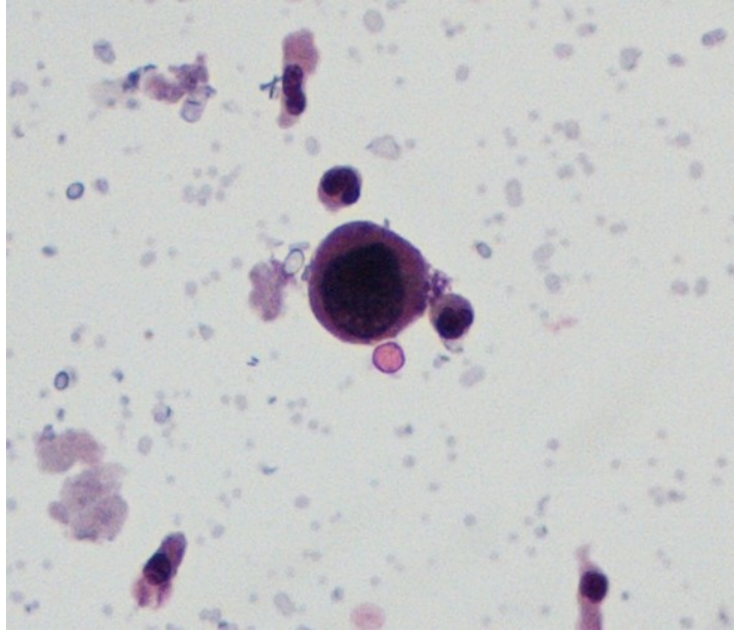
- Ipercromasia da moderata a grave;
- Membrana nucleare marcatamente irregolare;
- Cromatina grossolana.

Altre caratteristiche citomorfologiche:

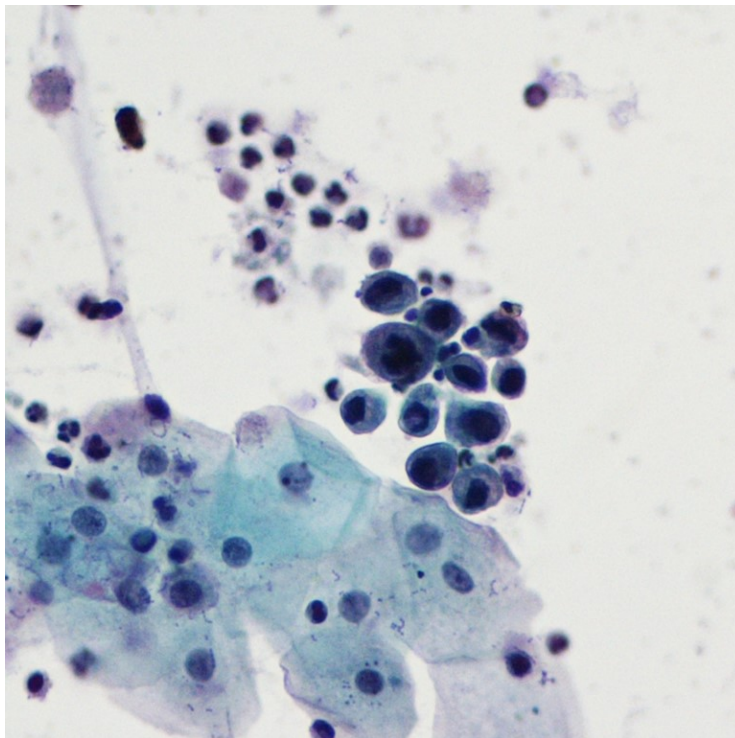
- Pleomorfismo cellulare;
- Evidente variazione nelle dimensioni e nelle forme cellulari, cioè ovale, arrotondato, allungato o plasmacitoide (cellule a cometa);
- Citoplasma pallido o denso;
- Nucleoli prominente;
- Mitosi;
- Detriti Necrotici.



*Figura 13: Gruppo di cellule on ipercromia e rapporto N/C aumentato e membrana nucleare irregolare. Le atipie cellulari potrebbero anche essere suggestive per un SHGUC, ma il numero di cellule è tale da poter classificare tale gruppo di cellule come HGUC. (urine spontanee, Cytospin) (Laboratorio di Citopatologia, Anatomia Patologica)*



*Figura 14: Singola cellula con gravi atipie che suggeriscono la categoria diagnostica di HGUC. Le atipie sono rapporto N/C >0.7, membrana nucleare irregolare, ipercromasia grave e cromatina grossolana. (urine spontanee, Cytospin) (Laboratorio di Citopatologia, Anatomia Patologica)*



*Figura 15: In posizione centrale, gruppo di cellule con ipercromasia, rapporto N/C aumentato e membrane nucleari irregolari, suggestive di HGUC. (urine spontanee, Cytospin) (Laboratorio di Citopatologia, Anatomia Patologica)*

### **5.5.1 HGUC con differenziazione squamosa**

È definita dalla cheratinizzazione e/o ponti intercellulari di cellule squamose che presentano le caratteristiche di un HGUC. Le cellule squamose mostrano ipercromasia a forma di fuso mitotico con cromatina agglomerata. Il citoplasma è denso, cheratinizzato e arangiofilo.

### **5.5.2 HGUC con differenziazione ghiandolare**

È definita come la presenza di formazioni ghiandolari all'interno di gruppi di cellule tumorali. Le cellule ghiandolari sono frammiste con cellule maligne che presentano le caratteristiche di un HGUC.

## **5.6 Neoplasia uroteliale di basso grado (LGUN)**

Già solo con la presenza di ammassi papillari tridimensionali con sovrapposizione nucleare e asse fibrovascolare comprendente capillari è possibile fare diagnosi citologica di LGUN. Sebbene determinate caratteristiche quali cromatina omogenea, bordi nucleari irregolari e aumento del rapporto N/C potrebbero anche essere associate a HGUC (42), non si può classificare come tale in assenza di altre caratteristiche associate al carcinoma di alto grado. Le caratteristiche citologiche ed istologiche della LGPUN (carcinoma uroteliale papillare di basso grado) si sovrappongono e l'atipia cellulare presente nelle singole cellule di LGPUN o displasia uroteliale di basso grado può essere molto sottile e non ben riconosciuto dai citologi. Si raccomanda, pertanto, che la categoria diagnostica "neoplasia uroteliale di basso grado" (LGUN) comprenda sia le neoplasie papillari di basso grado (papilloma uroteliale, PUNLMP e LGPUC) sia la displasia uroteliale piatta di basso grado (12).

## **5.7 Altre lesioni maligne primarie, metastatiche e varie**

I tumori alla vescica non uroteliali rappresentano meno del 5% e raramente possono essere rilevati mediante la citologia urinaria (49). La diagnosi citologica di carcinoma non uroteliale (non-UC) è stata descritta raramente e spesso rappresenta una sfida a causa della sovrapposizione delle caratteristiche con il carcinoma uroteliale (UC). Le neoplasie primarie non UC presentano un corso clinico aggressivo e spesso sono presenti in uno stadio avanzato della malattia. Un approccio multimodale che utilizza dettagli clinici,

risultati di imaging e diagnosi patologica è fondamentale per una decisione tempestiva di analisi e un intervento terapeutico precoce. La sopravvivenza complessiva, tuttavia, rimane scarsa (50). La metastasi alla vescica urinaria è un evento raro ed è necessaria una revisione del tumore primario precedente per escludere la possibilità di un tumore primario non-UC.

### 5.7.1 Lesioni maligne epiteliali non uroteliali

Tra i tumori epiteliali si annoverano il carcinoma squamo-cellulare, l'adenocarcinoma e i tumori neuroendocrini.

1. *Carcinoma squamo-cellulare.* I principali criteri diagnostici sono: cellule tumorali grandi, poligonali con citoplasma cheratinizzato, bordi taglienti e nuclei ipercromatici marcatamente atipici. Il fondo può mostrare placche e frammenti ("cellule fantasma") di cellule squamose anucleate, globuli rossi e neutrofilii. Possono essere presenti gruppi cellulari maligni non cheratinizzati con aspetto metaplastico.
2. *Adenocarcinoma.* La cellularità dei campioni citologici è variabile. L'adenocarcinoma di tipo enterico mostra gruppi di cellule colonnari e singole cellule degenerate in un fondo di necrosi e mucina. I nuclei sono grandi, ipercromatici, con forme irregolari e nucleoli visibili o prominenti. Il citoplasma può essere vacuolato. L'adenocarcinoma di tipo mucinoso mostra gruppi tridimensionali arrotondati di cellule affollate, piuttosto blande con piccole o moderate quantità di citoplasma e nuclei di medie dimensioni con nucleoli visibili. Il carcinoma a cellule ad anello con castone presenta cellule con un grande quantitativo citoplasma contenente vacuoli che possono apparire otticamente chiari e che spinge il nucleo ipercromatico a forma di mezzaluna alla periferia della cellula. L'adenocarcinoma a cellule chiare presenta abbondante citoplasma vacuolato e nuclei in posizione centrale che possono essere presenti in cluster.
3. *Tumori neuroendocrini.* Sono eccezionalmente rari e possono essere forme ben differenziate (carcinoidi) o forme altamente indifferenziate (carcinoma neuroendocrino a piccole cellule e grandi cellule). Le cellule hanno forma rotonda, ovale o irregolare e presentano nuclei ipercromici, alto rapporto N/C e cromatina distribuita uniformemente. La cellularità è di solito da moderata ad alta

e lo sfondo è emorragico e necrotico. Si possono trovare cellule isolate o piccoli gruppi di cellule maligne indifferenziate disposte singolarmente, in fila o a rosette.

### **5.7.2 Lesioni maligne non epiteliali**

Le lesioni maligne non epiteliali della vescica sono estremamente rare e includono una serie di neoplasie maligne di alto grado con morfologia sovrapponibile a quella dei sarcomi dei tessuti molli. Alcuni carcinomi uroteliali di alto grado possono avere componenti di tipo sarcomatoso con differenziazione eterologa e sono classificati come carcinosarcomi o carcinomi sarcomatoidi.

La citologia degli strisci di urina spontanea nel carcinoma sarcomatoide mostra cellule tumorali bifasiche con cellule UC e cellule sarcomatoidi pleiomorfe avvolte a spirale.

I restanti sarcomi sono estremamente rari e gli aspetti della diagnosi citologica non sono perfettamente definiti.

### **5.7.3 Lesioni maligne ematologiche, Melanoma, Tumori metastatici**

Esistono descrizioni occasionali, spesso come singoli case report, dei reperti citologici di pazienti affetti da queste patologie che sono estremamente rare. Meritano attenzione la diagnosi differenziale fra il plasmocitoma e la variante plasmocitoide del carcinoma uroteliale (51) e i reperti che caratterizzano il melanoma primitivo o metastatico (52). E le localizzazioni metastatiche alla vescica dei tumori della prostata, della cervice e del colon-retto (53)

## **5.8 Tasso di malignità nelle diverse classificazioni**

La percentuale di casi di citologia urinaria segnalati come "positivo per malignità" è relativamente basso. Nella pubblicazione iniziale di Papanicolaou, in cui dimostrava la fattibilità dell'uso della citologia urinaria 27 casi su 83 (33 %) erano stati segnalati come positivi per il cancro (18). Indubbiamente si trattava di popolazione selezionata e ad alto rischio. Studi più recenti e più ampi hanno riportato tassi molto più bassi di malignità che variano dall'1,7% al 5,8% (37). Questi studi hanno anche confermato che lavaggi della vescica e campioni del tratto urinario superiore tendono ad avere una maggiore percentuale di casi maligni rispetto a campioni di urina spontanea. Il gruppo di lavoro del



Paris System ha anche fatto un tentativo internazionale di accertare il tasso di malignità in vari ambienti di pratica accademica e non accademica, facendo riferimento ai dati del 2013. Il tasso di malignità o casi identificati come "positivo per malignità" variavano da 1,0 a 6,3 %. Inoltre, i casi SHGUC hanno mostrato un tasso da 0,2 a 5,4 %. Anche questo studio ha dimostrato un basso numero di casi refertati come equivoci, come nella maggior parte dei laboratori clinici. I casi che sono stati designati come "negativi per malignità" variavano dal 64,8 al 96,1 %, il che dimostra che la maggior parte dei campioni esaminati sono benigni (12). Secondo Piaton (53), con la nuova categoria AUC, precedentemente riportata come AUC-US, sono segnalati tassi di atipia che vanno dal 2% al 31% e il rischio di rilevare HGUC istologicamente provato dopo AUC varia dall'8,3% al 37,5%. Più utile, probabilmente, è la nuova categoria SHGUC (precedentemente registrato come AUC-H) perché ha un successivo rischio istologicamente provato di HGUC che va dal 61,3% al 95% oltre i 6 mesi di follow-up.

## **5.9 Confronto con le precedenti classificazioni**

Uno studio condotto nel 2017 da Bertsch et al (54) ha confrontato la diagnosi tradizionale e la diagnosi aggiornata con il Paris System con le corrispondenti diagnosi istologiche. I risultati hanno evidenziato che il nuovo sistema di classificazione permette una maggiore correlazione con le diagnosi istologiche, in particolare quando è interessato il tratto urinario inferiore. Un altro studio, condotto nel 2017 (55) ha valutato l'affidabilità e la precisione della citologia urinaria che, grazie al Paris System, diviene un test molto utile per diagnosticare i carcinomi uroteliali. Nello stesso anno, Wang et al (56) conducevano uno studio per valutare l'impatto del Paris System sulla prevalenza di varie categorie citologiche e sulla loro associazione con una successiva diagnosi di carcinoma uroteliale di alto grado (HGUC), facendo un confronto con i dati del 2013 e con i successivi risultati di follow-up istologico sia prima che dopo l'adozione del nuovo sistema. Ne è emerso che i criteri di AUC per il Paris System si concentrano sull'atipia nucleare, che è più probabilmente associata all'HGUC, come l'iperchromia, i contorni nucleari irregolari e la cromatina grossolana e che varie condizioni reattive come l'urolitiasi e l'infezione da Poliomavirus non sono più incluse nella categoria AUC e sono invece classificate come NHGUC. Inoltre, è emerso che la categoria AUC ingloba due vecchie categorie che venivano denominate come "cellule uroteliali atipiche che favoriscono un processo reattivo" (AR) e "cellule uroteliali atipiche non ben definite come reattive o neoplastiche"

(AU). Secondo uno studio condotto da Wang et al, il tasso di diagnosi di AUC è diminuito notevolmente, mentre è aumentato quello per NHGUC, e i tassi delle categorie SHGUC e HGUC non sono cambiati tra il 2013 e il 2016, molto probabilmente perché i criteri diagnostici utilizzati erano molto simili per queste due categorie diagnostiche. Con il Paris System è emerso un alto valore predittivo di HGUC (46,1%) dopo diagnosi di AUC, mentre nel 2013 era del 28,3%. È interessante notare che, con il del Paris System, c'è una migliore gestione della categoria di atipico (AUC), che prima veniva trattata come negativa, e ora la soglia clinicamente significativa è passata da SHGUC ad AUC (56).

## **6 TECNICHE IMMUNOISTOCHEMICHE E MOLECOLARI A SUPPORTO DELLA DIAGNOSI CITOLOGICA**

Numerosi studi hanno sollecitato l'introduzione di tecniche immunoistochimiche e molecolari a supporto della citologia, proprio a causa dei limiti che questa presenta sia in termini di interpretazione delle categorie diagnostiche sia in termini di sensibilità. I test disponibili e approvati dalla Food and Drug Administration (FDA) e Health Canada sono 33 tra cui l'Antigene Tumorale della Vescica (BTA), Proteina della Matrice Nucleare 22 (NMP-22), UroVysion (Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, Ill) e ImmunoCyt/uCytþ (Diagnocure, Inc., Quebec City, Quebec, Canada). Molti dei test vengono eseguiti regolarmente oltre alla citologia; tuttavia, nessun singolo test è ampiamente utilizzato dagli urologi nel follow-up dei pazienti con cancro alla vescica (11), perché sono altamente sensibili o specifici e mai entrambi.

### **6.1 BTA**

Il test BTA rileva il fattore di complemento umano H e relative proteine (hCFHrp) nelle urine. Esistono 2 test per il rilevamento del BTA: il BTA Stat qualitativo e il BTA Trak quantitativo (entrambi da Polymedco, Inc., Cortlandt Manor, NY). Anche se entrambi i test hanno una maggiore sensibilità rispetto alla citologia, presentano una minore specificità. In particolare, nelle persone sane (senza segni genitourinari o sintomi), la specificità di BTA stat è del 97 %, ma nei pazienti con condizioni genitourinarie benigne la specificità è solo del 46 % (57). Questo perché, oltre ai processi infiammatori per il cancro della vescica, manovre strumentali recenti, calcoli, altri tumori genitourinari, terapia BCG, farmaci antinfiammatori e/o nicotina possono aumentare i livelli di hCFHrp, causando risultati falsi positivi (58) e, ancora, qualsiasi condizione non neoplastica che causa ematuria può provocare un falso positivo BTA test, perché il fattore di complemento H è un componente ematico normale (59). I test BTA stat e BTA Trak sono

approvati dalla FDA per rilevare il cancro alla vescica nei pazienti sintomatici e per la sorveglianza dei pazienti con cancro alla vescica.

## **6.2 NMP-22**

L’NMP-22 è una proteina coinvolta nella regolazione e nella separazione cellulare durante la mitosi. I carcinomi uroteliali (UC) hanno elevate concentrazioni di questa proteina che viene rilasciata nelle urine. NMP-22 viene rilevata utilizzando un saggio immuno-assorbente quantitativo legato ad enzimi (BladderChek, Matritech, Inc., Newton, Mass) (60). Il test è facile da eseguire e ha una sensibilità più elevata rispetto alla citologia; infatti l'analisi quantitativa originale basata sull’ELISA ha mostrato un'ampia gamma di sensibilità (47-100 %) che è in parte influenzata dalla scelta del valore cut-off (12). Sempre dalla stessa analisi è risultato un valore piuttosto alto di specificità (60-90 %); tuttavia, livelli elevati di NMP-22 sono stati associati anche a condizioni infiammatorie, litiasi, terapia e strumentazione, con risultati falsi positivi (61). In uno studio prospettico sull'efficacia in termini di costi dell'incorporazione di NMP22 e UroVysion FISH, emerge che la cistoscopia è rimasta la strategia più conveniente per rilevare le recidive dei tumori della vescica invasivi non muscolari, mentre l'aggiunta di marcatori urinari comporta un aumento dei costi senza migliorare il rilevamento del cancro invasivo (62). Sia il kit quantitativo NMP22 Bladder Cancer ELISA e il test NMP22 BladderChek sono approvati dalla FDA per il rilevamento e la sorveglianza di carcinoma uroteliale nei campioni urinari.

## **6.3 p16INK4a**

Il gene p16 (INK4a), situato sul cromosoma 9p21, è noto anche come CDKN2A. La sovraespressione della proteina p16 è stata segnalata nelle lesioni uroteliali (63), in particolare nell'80% dei tumori di alto grado e nel 100% dei carcinomi in situ (64). La sovraespressione della p16INK4a, nel contesto di HGUC, non è utile da un punto di vista diagnostico perché il valore predittivo positivo della citologia urinaria convenzionale è già alto (53). La doppia marcatura p16/Ki67 potrebbe svolgere un ruolo aggiuntivo nella sorveglianza, oltre alla cistoscopia e alla citologia urinaria. Alla luce dello studio condotto da Piaton et al (53), la p16/Ki-67 potrebbe aiutare a identificare i pazienti a rischio di sviluppare lesioni potenzialmente letali nei casi NHGUC, AUC e LGUN (vale a dire, tutti quelli che sono citologicamente negativi per HGUC al momento della valutazione). In

conclusione, è stata dimostrata una valutazione a lungo termine della doppia marcatura p16/Ki-67 per identificare i casi di HGUC e progressione tra i pazienti con risultati di citologia urinaria negativa o di basso grado, e ci sono potenziali implicazioni per la gestione clinica dopo il trattamento conservativo del carcinoma uroteliale non invasivo muscolare.

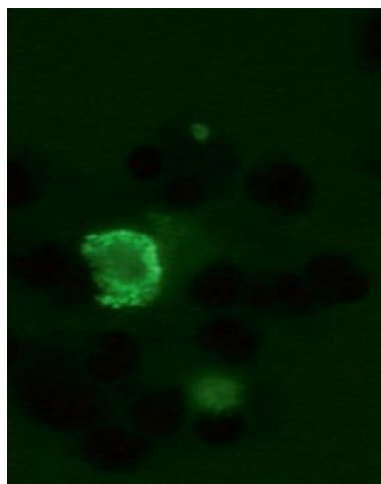
## **6.4 miRNA**

Uno studio sull'utilizzo di miRNA (microRNA) circolanti nel plasma e nelle urine, come potenziale marker per lo screening di forme non invasive del cancro della vescica, ha mostrato risultati incoraggianti (65). I miRNA sono RNA brevi e non codificanti di 20-22 nucleotidi che svolgono un ruolo importante in alcuni processi cellulari, tra cui differenziazione, proliferazione, apoptosi e autofagia. Sono anche coinvolti in varie fasi della cancerogenesi e svolgono ruoli chiave nell'iniziazione e nella progressione del cancro alla vescica. Inoltre, i miRNA possono funzionare sia come soppressori tumorali (miR-15a e miR-16-1) sia come oncogeni (miR-155 e membri del cluster miR-17-92) (65). In particolare, l'espressione alterata dei miRNA nei tumori si riflette nei fluidi corporei, tra cui sangue e urina, e apre la strada a diagnosi e prognosi non invasive. L'alta riproducibilità, specificità e sensibilità dei livelli di miRNA nei fluidi ne suggerisce un potenziale uso come screening del carcinoma alla vescica. Infatti, studi successivi come quello condotto da Hofbauer et al (66) hanno identificato miRNA in grado di prevedere con precisione la presenza di cancro alla vescica da campioni di urina, indipendentemente da fase e grado.

## **6.5 ImmunoCyt**

Il test ImmunoCyt/uCyt<sup>®</sup> (Diagnocure, Inc.) è un'analisi fluorescente immunocitologica (Figura 16) che contiene 3 anticorpi monoclonali: M344 e LDQ10 (marcati con fluoresceina) diretti verso un antigene simile a mucina e 19A211 (marcato con Texas Red) diretto verso una forma di antigene carcinoembrionario glicosilato ad alto peso molecolare. A differenza di alcuni degli altri test approvati dalla FDA che vengono utilizzati per monitorare i pazienti con cancro alla vescica, l'ImmunoCyt/uCyt<sup>®</sup> viene utilizzato in combinazione con la citologia, il che rende difficile il confronto con gli altri test (11). È stato stabilito che ImmunoCyt è più sensibile per rilevare UC di basso grado rispetto alla citologia o al saggio FISH multiprobe (67), ma risente di limitata specificità.

Tuttavia, così come per l'UroVysion, l'ImmunoCyt/uCyt $\phi$  non risente dell'influenza di condizioni reattive come l'infiammazione, a differenza dei test BTA e NMP-22 che, in tal caso, potrebbero restituire dei risultati falsi-positivi (68). Un altro importante problema da considerare insieme all'accuratezza di questi test è la loro efficacia in termini di costi, soprattutto perché il cancro alla vescica ha il costo più alto per paziente, tenuto conto a partire dal momento della diagnosi fino alla morte (69).



*Figura 16: Esempio di un campione citologico positivo ImmunoCyt/uCyt. Cellule positive per immunofluorescenza verde (fluoresceina) (12).*

## **6.6 UroVysion**

Il test di ibridazione in situ in fluorescenza (FISH) UroVysion (Abbott Molecular, Inc.), è un saggio FISH eseguito su preparati citologici urinari che identifica anomalie specifiche nei cromosomi 3, 7 e 17 e delezioni del 9p21 (sul gene p16), che sono spesso presenti nell'UC. È un test multiprobe (Figura 17), cioè si avvale di più sonde marcate con fluorocromi differenti. Utilizza tre sonde CEP (Centromeric Enumeration Probe) e una LSI (Locus Specific Identifier). Nello specifico: CEP 3 marcato con Spectrum Red, CEP 7 marcato con Spectrum Green, CEP 17 marcato con Spectrum Aqua e LSI 9p21 marcato con Spectrum Gold. In generale si è assistito all'accettazione del saggio FISH come aggiunta alla citologia convenzionale, dal momento che presenta una maggiore sensibilità per tutti i gradi e le fasi di UC (70), anche se è comunque meno sensibile nella rilevazione di tumori di basso grado rispetto a quelli di alto grado. La FDA ha approvato

l'uso del test FISH multiprobe per la rilevazione di UC ricorrenti e la determinazione delle cause di ematuria (11).

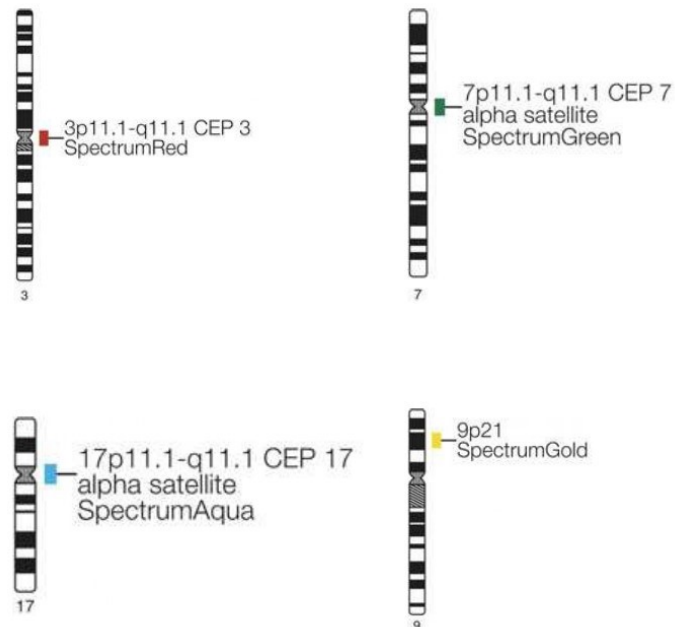


Figura 17: CEP 3 Spectrum Red, CEP 7 Spectrum Green, CEP 17 Spectrum Aqua e LSI 9p21 Spectrum Gold (71).

### 6.6.1 Campioni della FISH

Il test UroVysion-FISH era originariamente destinato all'uso su campioni di urina spontanea, ma studi successivi hanno dimostrato il suo uso su altri campioni del tratto urinario, ad esempio, lavaggi della vescica e lavaggi del tratto urinario superiore. I campioni devono essere strisciati e fissati su vetrini il prima possibile dopo la raccolta (entro 3 h). Se si prevede un ritardo nella lavorazione, i campioni possono essere prefissati con 2 % di glicole di polietilene, con 50 % etanolo o con altri conservanti (ad esempio, un volume uguale del 50 % di etanolo) e preferibilmente processati entro 72 h. I preparati comuni per i vetrini includono il Cytospin in cui una sospensione delle cellule viene centrifugata su vetrini in un monostrato uniforme di 6 mm di diametro utilizzando una centrifuga ad alta velocità. Sono accettabili anche i vetrini ottenuti tramite tecnica Thin Prep (Hologic, Boxborough, MA), dopo centrifugazione e cattura con filtro con membrana, o SurePath (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ), mediante sedimentazione dei campioni urinari pretrattati. Dovrebbero esserci 100-200 cellule ben conservate nell'area destinata all'ibridazione disposte su monostrato. Tuttavia, la FISH è

applicabile anche ai vetrini che sono stati precedentemente colorati secondo il metodo Papanicolaou (12).

### **6.6.2 Performance della FISH**

Nello studio condotto da Daniely et al (72), è stata testata l'utilità diagnostica di un approccio combinato tra citologia e analisi FISH utilizzando il sistema di scansione automatica Duet in pazienti con citologia urinaria benigna che venivano monitorati per il carcinoma uroteliale ricorrente o in fase di valutazione per vari sintomi urologici. Tutti i pazienti che hanno avuto risultati positivi alla cistoscopia hanno riportato un risultato positivo all'analisi combinata. Pertanto, un risultato positivo dell'analisi combinata è associato ad un aumento del rischio di comparsa di tumori e quindi impone una stretta sorveglianza. Mentre l'analisi combinata negativa è stata trovata predittiva di una mancanza di recidiva della malattia per una durata di almeno 12 mesi (72). La FISH, eseguita in combinazione con la citologia urinaria, in pazienti in terapia BCG può essere molto utile nel rilevare il cancro residuo o ricorrente che può non essere rilevato in un campione di urina post-BCG, cateterizzato, in caso di infiammazione acuta, degenerazione o presenza di un gran numero di cellule a ombrello. Savic et al (73) ha dimostrato che risultati FISH e citologia positive dopo trattamento BCG sono stati associati ad una mancata risposta alla terapia BCG. I pazienti che hanno riportato risultati FISH positivi alla fine del trattamento sono stati associati ad alto rischio di progressione di cancro alla vescica invasivo (74). Una questione controversa che può sorgere quando si utilizza un test molecolare sensibile come la FISH, da solo o combinato con la citologia, è il problema del risultato falso positivo in assenza di una lesione visibile da cui ottenere una biopsia. Questi sono i cosiddetti "casi positivi anticipati", e Yoder et al (75) ha osservato che, in un periodo di 29 mesi, fino al 65% dei loro pazienti avevano sviluppato tumori ricorrenti al follow-up. Tuttavia, in una piccola percentuale di pazienti, la lesione rimaneva inosservata e, in ultima analisi, le cellule anormali nelle urine scomparivano. Questo può essere a causa della risoluzione spontanea del tumore o per false interpretazioni dovute alle cellule a ombrello o alle cellule virali. Di conseguenza, ci sono alcuni urologi che non amano eseguire FISH in combinazione con la citologia e preferiscono eseguire solo la citologia come un più specifico, anche se meno sensibile, ma più conveniente test (76). Secondo Barkan et al (13) una diagnosi citologica di "positivo per malignità" ha un'alta specificità e un valore predittivo positivo superiore al



90% per la diagnosi di HGUC. In questo scenario, il test FISH non aggiunge alcun beneficio clinico, ma solo costi inutili. Il test UroVysion FISH può aumentare la sensibilità della citologia per il rilevamento di LGUC dal 25 al 60-75%, ma di solito le neoplasie di basso grado sono chiaramente visibili alla cistoscopia e il risultato della FISH non avrebbe alcun impatto sulla gestione clinica. Al contrario, la FISH trova utilità nell'impostazione dell'atipia con risultati negativi o inconcludenti alla cistoscopia. Infatti, un test negativo di UroVysion FISH rende molto improbabile che queste cellule anormali derivino da un HGUC e queste informazioni aggiuntive aiuterebbero l'urologo in un'ulteriore gestione del paziente (77).

### **6.6.3 Limiti della FISH**

Indipendentemente dalla sua elevata sensibilità, il risultato della FISH dipende dalla presenza di un numero adeguato di cellule tumorali esfoliate nel campione di urina. Pertanto, un volume di urina insufficiente, un basso carico di cellule tumorali o cellule tumorali che non esfoliano precluderanno l'adempimento dei criteri di positività. La FISH nonostante mostri un'elevata sensibilità nel rilevamento dei tumori uroteliali di alto grado, mostra una ridotta sensibilità nel rilevamento di lesioni di basso grado (78). Anche se i risultati della FISH sono determinati indipendentemente dalla citologia, dovrebbero essere rapportati con questa. Infatti, potrebbe dare risultati falsi positivi in presenza di numerose cellule a ombrello (come si può osservare nei campioni di lavaggio della vescica), perché sono spesso tetraploidi (79), e in campioni di urina con poliomavirus (80). Poiché i cambiamenti del DNA di solito precedono i cambiamenti macroscopici nell'aspetto del tessuto (81), l'analisi combinata della citologia con la FISH rileverebbe la presenza di cellule maligne mesi prima che siano visibili alla cistoscopia, producendo i "casi positivi anticipati" (75) che provocano malcontento e ansia tra patologi e pazienti.

### **6.6.4 Analisi dei segnali**

Secondo le linee guida del produttore (UroVysion, Abbott Molecular, Inc.), un risultato positivo della FISH (Figura 18) è definito tale dalla presenza di 4 cellule morfologicamente anormali (grande dimensione nucleare e forma irregolare) su 25 cellule analizzate che presentano 2 o più cromosomi 3, 7 e 17 nella stessa cellula o dalla presenza di 12 cellule su 25 che presentano delezione omozigote di 9p21. Se questi criteri per la positività del test non vengono soddisfatti dopo la visualizzazione di 25 cellule, l'analisi

deve continuare fino a quando non viene analizzato l'intero campione (12). La polisomia, ovvero la presenza di uno o più cromosomi sovranumerari all'interno della stessa cellula, è l'anomalia cromosomica più frequente e, di solito, è identificativa di un UC di alto grado. La delezione omozigote di 9p21 si riferisce all'assenza di entrambi i segnali gialli che vengono utilizzati per ibridarsi al gene 9p21 ed è molto meno frequente della polisomia. Oltre a queste linee guida la società raccomanda che, se c'è solo tetrasomia<sup>4</sup>, ci dovrebbero essere almeno 10 cellule anormali per valutare la FISH come positiva. Sebbene durante la scansione delle diapositive FISH, si consiglia di concentrarsi su nuclei grandi o irregolari o su quelli che appaiono altrimenti sospetti (81), bisogna tenere conto anche delle aberrazioni cromosomiche che possono verificarsi anche in cellule con piccoli nuclei (82). Quindi, il numero di segnali per tutte e quattro le sonde deve essere conteggiato per ogni cellula anomala e registrato solo quando c'è un guadagno (più di 2 segnali) per due o più cromosomi 3 (rosso), 7 (verde), 17 (acqua), o c'è una perdita di entrambe le copie di 9p21 (giallo).

---

<sup>4</sup> Cellule caratterizzate dalla presenza di 4 cromosomi omologhi, anziché 2.

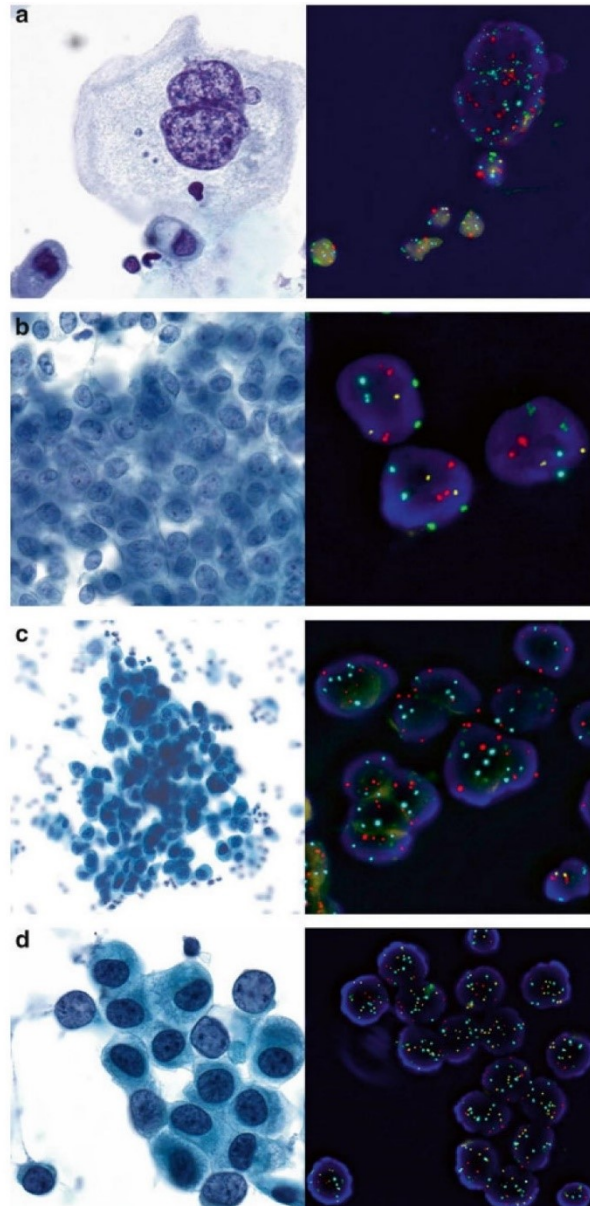


Figura 18: Esempi di FISH UroVysion e corrispondente citologia (con colorazione di Papanicolaou). Cromosomi 3 in rosso, 7 in verde, 17 in azzurro-acqua e 9p21 in oro. (a) Cellula ombrello benigna bi- o multinucleata con cambiamenti reattivi pronunciati in un paziente con irritazione (lavaggio della vescica). Numero molto elevato di tutti i segnali FISH a causa del raddoppio ripetuto del genoma (cioè endoreplicazione), ma nessun numero di copia sbilanciato e nessuna delezione 9p21. (b) Fogli di cellule uroteliali leggermente atipiche in un lavaggio del bacino renale. Risultato FISH normale (due copie per cromosoma), coerente con le modifiche reattive. (c) Cellule uroteliali atipiche sospette di carcinoma uroteliale di alto grado (SHGUC) in un lavaggio del bacino renale. Risultato FISH positivo con un aumento del numero di copie di tutti e 3 i cromosomi e una delezione omizigote di 9p21. Si noti il nucleo cellulare normale con segnali 9p21 mantenuti come controllo normale interno (angolo inferiore destro). (d) Cellule uroteliali atipiche FISH-positivo (SHGUC) con un aumento del numero di copie di tutti i cromosomi ma senza delezione di 9p21. Si noti il nucleo cellulare normale con numeri di copia normali (angolo inferiore destro) (12).

### **6.6.5 Lettura automatizzata della FISH**

Un nuovo approccio ai test FISH è il recente avvento dello screening automatizzato per le cellule anormali nel test FISH multiprobe (83). Questo approccio, che utilizza la quantificazione automatizzata dei segnali FISH, è stato utilizzato in precedenza da altri ricercatori per quantificare i danni del DNA nella ricerca sulla dosimetria di biologia delle radiazioni e per la quantificazione di HER2/neu (84). Affinché un campione possa essere definito negativo su un saggio automatizzato, è necessario che siano presenti 200 cellule. Tuttavia, è più adatto per le urine cateterizzate o strumentali, che di solito sono abbastanza cellulate. Tuttavia, se ci sono 4 cellule anormali, allora sono sufficienti anche meno di 100 cellule (83). Ma rimane preferibile un saggio FISH manuale.

## **7 PROBLEMATICHE LEGATE ALLE NUOVE LINEE GUIDA**

Secondo quanto riportato dalle linee guida del 2019 (AIOM, American Urological Association e Associazione Europea di Urologia) la citologia urinaria rimane ad oggi l'unico esame utilizzato universalmente nella pratica clinica per la diagnosi delle neoplasie uroteliali e il follow-up delle neoplasie vescicali di alto grado e si raccomanda sia eseguita per i pazienti ad alto e basso rischio di tumore non invasivo muscolare quando potrebbe differire la necessità di cistoscopia e cateterizzazione del tratto urinario superiore (22). Ma la sola citologia urinaria non è sufficiente. Infatti, sebbene una citologia urinaria positiva sia virtualmente diagnostica di neoplasia uroteliale, una citologia urinaria negativa non è discriminante di assenza di neoplasia (85), dato che presenta una bassa sensibilità nei tumori di basso grado. Quindi deve essere accompagnata dalla cistoscopia, un esame invasivo, costoso e poco tollerato dal paziente, ma che presenta una specificità e una sensibilità superiore a quelle di altri esami proposti. Ciò implica la necessità di un controllo cistoscopico per tutta la vita.

Il gruppo di lavoro che ha dato vita al Paris System ha cercato di superare l'interpretazione soggettiva nella refertazione delle categorie diagnostiche ridefinendo criteri diagnostici e standardizzando le terminologie. Secondo uno studio condotto da Bertsch et al (54) esiste una correlazione significativa tra le diagnosi del Paris System e le corrispondenti diagnosi di biopsia chirurgica, in particolare nei campioni derivati dal tratto urinario inferiore. È emersa una migliore gestione della categoria di atipico e sono stati riscontrati meno casi di AUC rispetto al passato e sono aumentate le diagnosi di NHGUC. Inoltre, con il Paris System è emerso un alto valore predittivo di HGUC (46,1%) dopo diagnosi di AUC, mentre nel 2013 era del 28,3% (56). Questa scoperta fornisce la prova che un ampio uso del nuovo schema di classificazione diagnostico può portare a diagnosi più accurate e fornire agli urologi informazioni più specifiche con cui guidare il trattamento. Ma mancano da definire alcuni criteri per campioni e metodologie diverse da quelle adottate

dal gruppo di lavoro del Paris System e ulteriori studi per far sì che ci sia una più ampia accettazione da parte di urologi e citopatologi. Inoltre, al momento non vi è alcuna raccomandazione per contare il numero di cellule uroteliali atipiche per una diagnosi di AUC (12).

Gli studi del Paris System sono stati condotti principalmente su campioni ottenuti da lavaggio vescicale con la metodologia Thin Prep, quindi i criteri devono comunque essere definiti per gli altri tipi di campioni e con le altre metodologie (12). Le linee guida dell'AIOM raccomandano allestimento tramite Thin Prep o convenzionale, di urine spontanee o strumentali, cercando di superare il problema della variabilità interlaboratorio di allestimento e tipo di campione da usare.

Nonostante gli studi su altri possibili marcatori, non sono stati riscontrati test validi per la diagnosi o il follow-up delle neoplasie uroteliali. Esistono alcune controversie sulla valutazione dei test ancillari dovute alla mancanza di indicazioni chiare (12). E infatti il flusso diagnostico delle linee guida AIOM del 2019 non prevede l'uso di alcuna tecnica ancillare. I dati della letteratura sembrano comunque a favore della FISH che troverebbe impiego nei casi di AUC con cistoscopia negativa, AUC in seguito a terapia con BCG e lavaggio delle alte vie escrettrici (71). Secondo Barkan et al (15), esiste una forte evidenza sull'utilità della FISH nell'impostazione della citologia urinaria atipica (AUC). Secondo l'EAU (European Association Urology) del 2017, è improprio l'uso della FISH nella popolazione sottoposta a sorveglianza a causa delle numerose recidive di tumore di basso grado e conclude che non si può raccomandare un follow-up sistematico basato sull'uso di marcatori (86). Aggiunge che vari test migliorano la sensibilità a costo di una minore specificità rispetto alla citologia e che le condizioni benigne e il BCG possono influenzare i risultati, i quali dipendono dal contesto clinico del paziente (87). Il pannello NCCN (National Comprehensive Cancer Network) afferma che possono essere presi in considerazione i marcatori urinari approvati dalla FDA, l'ibridazione in situ in fluorescenza (FISH) o la proteina a matrice nucleare 22 (NMP22) solo nel monitoraggio delle recidive (87). Contrariamente alle altre linee guida, NICE (National Institute of Health and Clinical Excellence) raccomanda un test di biomarcatori urinari (come UroVysion, ImmunoCyt e NMP22) in pazienti con sospetto di cancro alla vescica. È interessante notare che giustifica i costi iniziali dei test ausiliari, superiori alla citologia

urinaria, in quanto compensati da diagnosi più accurate e da una diminuzione delle recidive. Tuttavia, sottolinea che i test di biomarcatori urinari non possono sostituire la cistoscopia per la sorveglianza dopo il trattamento del cancro alla vescica (87).

In generale, un problema che va attentamente considerato quando vengono proposte nuove tecniche di follow-up è l'utilità di sensibilità "tecnica" di un esame, ovverossia il fatto che esso possa risultare positivo quando i tradizionali mezzi diagnostici non siano capaci di confermare la presenza della patologia ricercata. In questo caso il problema diventa ancora maggiore qualora la specificità di quell'esame non sia del 100%. A seguito di tale positività potrebbero partire degli studi costosi e indaginosi che, con i mezzi diagnostici tradizionali, non darebbero alcuna risposta definitiva provocando ansia tra clinici e pazienti. Non è chiaro quanto un eventuale trattamento terapeutico possa interferire con l'interpretazione degli esami successivi e non è chiaro quanto si possa giovare da una diagnosi tanto precoce, dati i mezzi terapeutici attuali.

## 8 CONCLUSIONI

Dalla revisione della letteratura effettuata emergono i seguenti punti principali:

La citologia urinaria rimane l'esame gold standard per la neoplasia uroteliale di alto grado.

I nuovi test diagnostici proposti non possono, al momento, sostituire la cistoscopia per la sorveglianza dopo il trattamento del cancro alla vescica.

Il Paris System, negli studi pubblicati, si rivela un buono strumento di classificazione diagnostica della citologia urinaria, soprattutto per quanto riguarda il tratto urinario inferiore. Ci si augura che urologi e citopatologi diventino familiari con la refertazione secondo il Paris System.

Sarebbe auspicabile l'adesione ad un unico sistema di allestimento dei preparati citologici, anche se le linee guida AIOM consigliano indistintamente striscio convenzionale e citologia in fase liquida. Nell'eventualità dell'adozione del ThinPrep, quale unico metodo di allestimento dei campioni urinari, in un futuro prossimo si potrebbe ricorrere alla lettura automatizzata, ad oggi ancora non disponibile per la citologia urinaria.

Per quanto riguarda i test molecolari ed in particolare FISH UroVysion, che rappresenta il metodo più popolare e più ampiamente diffuso, rimangono da stabilire linee guida condivise che risolvano il problema della gestione clinica dei falsi positivi.



## 9 BIBLIOGRAFIA

1. **Negri E, La Vecchia C.** *Epidemiology and prevention of bladder cancer.* 2001.
2. **Puente D, Hartge P, Greiser E, et al.** *A pooled analysis of bladder cancer case-control studies evaluating smoking in men and women.* 2006.
3. **IARC, International Agency for Research on Cancer.** *Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Tobacco smoke and involuntary smoking.* 2004.
4. **Pashos CL, Botteman MF, Laskin BL, Redaelli A.** *Bladder cancer: epidemiology, diagnosis, and management.* . 2002.
5. **Ferris J, Berbel O, Alonso-López J et al.** *Environmental non-occupational risk factors associated with bladder carcinoma.* . 2013, Actas Urol Esp. , p. 579-86.
6. **Shigehara K, Sasagawa T, Kawaguchi S et al.** *Etiologic role of human papillomavirus infection in bladder carcinoma.* 2011, Cancer, p. 2067-76.
7. **Rafnar T, Vermeulen SH, Sulem P, et al.** *European genome-wide association study identifies SLC14A1 as a new urinary bladder cancer susceptibility gene.* . Nov;20(21): 4268-81. 2011, Hum Mol Genet.
8. **David S. Strayer, Emanuel Rubin, Jeffrey E. Saffitz and Alan L. Schiller.** *Rubin's Pathology: Cytopathologic Foundations of Medicine.* s.l. : Piccin, 2015.
9. **Crockett DG, Wagner DG, Holmäng S, et al.** *Upper urinary tract carcinoma in Lynch syndrome cases.* 2011, J Urol , p. 627-30.
10. **Moch, H., Cubilla, A. L., Humphrey, P. A., Reuter, V. E., & Ulbright, T. M.** *The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—*

*Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours.* s.l. : European Urology, 70(1), 2016. p. 93-105.

11. **Caraway, N. P., & Katz, R. L.** *A review on the current state of urine cytology emphasizing the role of fluorescence in situ hybridization as an adjunct to diagnosis.* s.l. : Cancer Cytopathology, 118(4), 2010.

12. **Rosenthal et al.** *The Paris System for Reporting Urinary Cytology.* s.l. : Switzerland, Springer International Publishing D.L., 2016.

13. **Barkan, G. A., Wojcik, E. M., Nayar, R., Savic-Prince, S., Quek, M. L., Kurtycz, D. F. I., & Rosenthal, D. L.** *The Paris System for Reporting Urinary Cytology: The Quest to Develop a Standardized Terminology.* s.l. : Acta Cytologica, 60(3), 2016.

14. **Oeyen, E., Hoekx, L., De Wachter, S., Baldewijns, M., Ameye, F., & Mertens, I.** *Bladder Cancer Diagnosis and Follow-Up: The Current Status and Possible Role of Extracellular Vesicles.* International Journal of Molecular Sciences, 2019, Vol. 20(4).

15. **Barkan, G. A., Wojcik, E. M., Nayar, R., Savic-Prince, S., Quek, M. L., Kurtycz, D. F. I., & Rosenthal, D. L.** *The Paris System for Reporting Urinary Cytology: The Quest to Develop a Standardized Terminology.* 2015. p. 185–197.

16. **Halling, K. C., & Kipp, B. R.** *Bladder Cancer Detection Using FISH (UroVysion Assay).* 2008.

17. **Cooksley CD, Avritscher EB, Grossman HB, et al.** *Clinical model of cost of bladder cancer in the elderly.* 2008, Urology, p. 519-525.

18. **GEORGE N. PAPANICOLAOU, VICTOR F. MARSHALL.** *URINE SEDIMENT SMEARS AS A DIAGNOSTIC PROCEDURE IN CANCERS OF THE URINARY TRACT.* 1945.

19. **Kini, SR.** *Color atlas of differential diagnosis in exfoliative and aspiration cytopathology.* 2011.

20. **Rodolfo Laucirica, MD, et al.** *Do Liquid-Based Preparations of Urinary Cytology Perform Differently Than Classically Prepared Cases? Observations From the College of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program in Nongynecologic Cytology.* 2010, Arch Pathol Lab Med, p. 19-22.
21. **Dorothy L. Rosenthal and Stephen S. Raab.** *Cytologic Detection of Urothelial Lesions (Essentials in Cytopathology).* 2005.
22. **Babjuk, M., Burger, M., Compérat, E. M., Gontero, P., Mostafid, A. H., Palou, J., van Rhijn, B. W. G., Rouprêt, M., Shariat, S. F., Sylvester, R., Zigeuner, R., Capoun, O., Cohen, D., Escrig, J. L. D., Hernández, V., Peyronnet, B., Seisen, T., & Soukup, V.** *European Association of Urology Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (TaT1 and Carcinoma In Situ) - 2019 Update.* 2019.
23. **Layfield, L. J., Elsheikh, T. M., Fili, A., Nayar, R., & Shidham, V.** *Review of the state of the art and recommendations of the Papanicolaou Society of Cytopathology for urinary cytology procedures and reporting: The Papanicolaou Society of Cytopathology Practice Guidelines Task Force.* s.l. : Diagnostic Cytopathology, 30(1), 2003.
24. **M. Castellucci, O. Cremona, A. De Luca, G. Giuliani Piccari, M.S. Lantini, P.C. Marchisio, L.F. Rodella.** *Anatomia umana.* . s.l. : Monduzzi editore, 2009.
25. **Paner, G. P., Stadler, W. M., Hansel, D. E., Montironi, R., Lin, D. W., & Amin, M. B.** *Updates in the Eighth Edition of the Tumor-Node-Metastasis Staging Classification for Urologic Cancers.* . 560–569. : European Urology, 2018.
26. **Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, et al.** *Bladder cancer: epidemiology, staining and grading, and diagnosis.* 2005, Urology, p. 4-34.
27. **Koss LG, Deitch D, Ramanathan R, Sherman AB.** *Diagnostic value of cytology of voided urine.* 1985, Acta Cytol, p. 810–816.
28. **IDEXX laboratories.** *SediVue DX: How to dry prep.* [Online] 2019.

29. Straccia, P., Bizzarro, T., Fadda, G., & Pierconti, F. *Comparison between cytospin and liquid-based cytology in urine specimens classified according to the Paris System for Reporting Urinary Cytology*. 2016, *Cancer Cytopathology*, 124(7), p. 519–523.
30. NASSAR H. *Use of ThinPrep monolayer technique and Cytospin preparation in urine cytology: a comparative analysis*. . *DIAGNOSTIC CYTOPATHOLOGY* 2003, 28, p. 115-118.
31. Barkan, G. A., Tabatabai, Z. L., Kurtycz, D. F. I., Padmanabhan, V., Souers, R. J., Nayar, R., & Sturgis, C. D. *Practice Patterns in Urinary Cytopathology Prior to the Paris System for Reporting Urinary Cytology*. 2019, *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 144(2), p. 172-177.
32. Richardson, C. J., Pambuccian, S. E., & Barkan, G. A. *Split-sample comparison of urothelial cells in ThinPrep and cytospin preparations in urinary cytology: Do we need to adjust The Paris System for Reporting Urinary Cytology criteria?* 2019, *Cancer Cytopathology*, 128(2), p. 119–125.
33. Elsheikh, T. M., Kirkpatrick, J. L., & Wu, H. H. *Comparison of ThinPrep and cytospin preparations in the evaluation of exfoliative cytology specimens*. 2006.
34. Owens, C. L., VandenBussche, C. J., Burroughs, F. H., & Rosenthal, D. L. *A review of reporting systems and terminology for urine cytology*. . 2012.
35. Nelson, B. *A career with “No Regrets.”* 2010.
36. LG Koss, MR Melamed. *Koss' diagnostic cytology and its histopathologic bases*. 2006.
37. Rosenthal DL, VandenBussche CJ, Burroughs FH, Sathiyamoorthy S, Guan H, Owens C. *The Johns Hopkins Hospital template for urologic cytology samples: part I—creating the template*. 2013, *Cancer Cytopathol.*, p. 15-20.
38. AA., Renshaw *Subclassifying atypical urinary cytology specimens*.

39. Glatz, K., Willi, N., Glatz, D., Barascud, A., Grilli, B., Herzog, M., Dalquen, P., Feichter, G., Gasser, T. C., Sulser, T., & Bubendorf, L. *An International Telecytologic Quiz on Urinary Cytology Reveals Educational Deficits and Absence of a Commonly Used Classification System.* 2006, *American Journal of Clinical Pathology*, 126(2), p. 294-301.
40. VandenBussche CJ, Rosenthal DL, Olson MT. *A minimum volume of 30 mL is necessary to ensure that a voided urine specimen is benign: a retrospective review of 15,731 cases.* . s.l. : *Cancer Cytopathol.*, 2015.
41. EM., Wojcik. *What should not be reported as atypia in urine cytology.* 2015, *J Am Soc Cytopathol.*, p. 30–6.
42. Brimo F, Vollmer RT, Case B, Aprikian A, Kassouf W, Auger M. *Accuracy of urine cytology and the significance of an atypical category.* 2009, *Am J Clin Pathol*, p. 785–93.
43. Onur I, Rosenthal DL *Benign-appearing urothelial tissue fragments in noninstrumented voided urine specimens are associated with low rates of urothelial neoplasia.* VandenBussche CJ. 2015, *Cancer Cytopathol.*, p. 180–5.
44. SE., Pambuccian. *What is atypia? Use, misuse and overuse of the term atypia in diagnostic cytopathology.* 2015, *J Am Soc Cytopathol.* , p. 44-52.
45. SE., Pambuccian. *What is atypia? Use, misuse and overuse of the term atypia in diagnostic cytopathology.* 2015, *J Am Soc Cytopathol.* , p. 44–52.
46. Brimo F, Vollmer RT, Case B, Aprikian A, Kassouf W, Auger M. *Accuracy of urine cytology and the significance of an atypical category.* 2009, *Am J Clin Pathol*, p. 785-793.
47. Karakiewicz PI, Benayoun S, Zippe C, Lüdecke G, Boman H, Sanchez-Carbayo M, et al. *Institutional variability in the accuracy of urinary cytology for predicting recurrence of transitional cell carcinoma of the bladder.* 2006, *BJU Int.* , p. 997-1001.

48. Yafi a FA, Brimob F, Auger M, Aprikian A, Tanguay S, Kassouf W. *Is the performance of urinary cytology as high as reported historically? A contemporary analysis in the detection and surveillance of bladder cancer.* 2014, Urol Oncol.
49. Chalasani V, Chin JL, Izawa JI. *Histologic variants of urothelial bladder cancer and nonurothelial histology in bladder cancer.* 2009, Can Urol Assoc J., p. 193-198.
50. Abol-Enein H, Kava BR, Carmack AJ. *Nonurothelial cancer of the bladder.* Urology, 2007.
51. Schindler S, De Frias DV, Yu GH. *Primary angiosarcoma of the bladder: cytomorphology and differential diagnosis.* 1999, Cytopathology., p. 137-143.
52. Khalbuss WE, Hossain M, Elhosseiny A. *Primary malignant melanoma of the urinary bladder diagnosed by urine cytology: a case report.* 2001, Acta Cytol., p. 631-635.
53. Piaton, E., Advenier, A.-S., Carré, C., Decaussin-Petrucci, M., Mège-Lechevallier, F., Hutin, K., Nennig, C., Colombel, M., & Ruffion, A. *p16/Ki-67 dual labeling and urinary cytology results according to the New Paris System for Reporting Urinary Cytology: Impact of extended follow-up.* 2017, Cancer Cytopathology, 125(7), p. 552-562.
54. Bertsch, E. C., Siddiqui, M. T., & Ellis, C. L. *The Paris system for reporting urinary cytology improves correlation with surgical pathology biopsy diagnoses of the lower urinary tract.* 2018, Diagnostic Cytopathology, 46(3), p. 221-227.
55. Das, S. *Evaluation of Urine Cytology in Urothelial Carcinoma with respect to the Paris System for Reporting Urinary Cytology.* 2017, Journal of Medical Science And Clinical Research.
56. Wang, Y., Auger, M., Kanber, Y., Caglar, D., & Brimo, F. *Implementing The Paris System for Reporting Urinary Cytology results in a decrease in the rate of the “atypical” category and an increase in its prediction of subsequent high-grade urothelial carcinoma.* 2017, Cancer Cytopathology, 126(3), p. 207-214.

57. Leyh H, Marberger M, Conort P, Sternberg C, Pansadoro V, Pagano F, et al. *Comparison of the BTA stat test with voided urine cytology and bladder wash cytology in the diagnosis and monitoring of bladder cancer.* 1999, *Eur Urol.*, p. 52-56.
58. LS., Liou. *Urothelial cancer biomarkers for detection and surveillance.* 2006, *Urology.*, p. 33-34.
59. Oge O, Kozaci D, Gemalmaz H. *The BTA stat test is nonspecific for hematuria: an experimental hematuria model.* 2002, *J Urol.* , p. 9-20.
60. Van Tilborg AA, Bangma CH, Zwarthoff EC. *Bladder cancer biomarkers and their role in surveillance and screening.* 2009, *Int J Urol.*, p. 23-30.
61. Chang YH, Wu CH, Lee YL, Huang PH, Kao YL, Shiao MY. *Evaluation of nuclear matrix protein-22 as a clinical diagnostic marker for bladder cancer.* 2004, *Urology*, p. 687-692.
62. Kamat AM, Karam JA, Grossman HB, Kader AK, Munsell M, Dinney CP. *Prospective trial to identify optimal bladder cancer surveillance protocol: reducing costs while maximizing sensitivity.* 2011, *BJU Int.*, p. 1119–23. .
63. Kruger S, Mahnken A, Kausch I, et al. *p16 immunoreactivity is an independent predictor of tumour progression in minimally infiltrating urothelial bladder carcinoma.* 2005, *Eur Urol.* , p. :463-467.
64. Nakazawa, K., Murata, S., Yuminamochi, T., Ishii, Y., Ohno, S., Nakazawa, T., Kondo, T., & Katoh, R. *p16INK4a Expression Analysis as an Ancillary Tool for Cytologic Diagnosis of Urothelial Carcinoma.* 2009, *American Journal of Clinical Pathology*, 132(5), p. 776–784.
65. Liu, X., Liu, X., Wu, Y., Wu, Q., Wang, Q., Yang, Z., & Li, L. *MicroRNAs in biofluids are novel tools for bladder cancer screening.* 2017, *Oncotarget*, 8(19), p. 32370–32379.
66. *A urinary microRNA (miR) signature for diagnosis of bladder cancer.* 2018, *Urologic Oncology.*

67. Sebastian L. Hofbauer, Michela de Martino, , Ilaria Lucca, Andrea Haitel, Martin Susani, Shahrokh F. Shariat, Tobias Klatte. *uCytb test: alternative to cystoscopy for less-invasive follow-up of patients with low risk of urothelial carcinoma.* . Lodde M, Mian C, Comploj E, et al. 2006, Urology. , p. 950-954.
68. Hong YM, Loughlin KR. *Economic impact of tumor markers in bladder cancer surveillance.* 2008, Urology, p. 131-135.
69. Botteman MF, Pashos CL, Redaelli A, Laskin B, Hauser R. *The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature.* 2003, Pharmacoeconomics., p. 1315-1330.
70. SKACEL, M., FAHMY, M., BRAINARD, J. A., PETTAY, J. D., BISCOTTI, C. V., LIOU, L. S., PROCOP, G. W., JONES, J. S., ULCHAKER, J., ZIPPE, C. D., & TUBBS, R. R. *Multitarget Fluorescence In Situ Hybridization Assay Detects Transitional Cell Carcinoma in the Majority of Patients with Bladder Cancer and Atypical or Negative Urine Cytology.* 2003, Journal of Urology, 169(6), p. 2101–2105.
71. Istituto cantonale di patologia, Locarno. *Citologia del carcinoma uroteliale. La classificazione di Parigi.* s.l. : Elisabetta Merlo, 2016.
72. Daniely, M., Rona, R., Kaplan, T., Olsfanger, S., Elboim, L., Freiburger, A., Lew, S., & Leibovitch, I. *Combined morphologic and fluorescence in situ hybridization analysis of voided urine samples for the detection and follow-up of bladder cancer in patients with benign urine cytology.* 2007, Cancer, 111(6), p. 517–524.
73. Savic S, Zlobec I, Thalmann GN, et al *The prognostic value of cytology and fluorescence in situ hybridization in the follow-up of nonmuscle-invasive bladder cancer after intravesical Bacillus Calmette-Guerin therapy.*. 2009, Int J Cancer., p. 2899-2904.
74. Kipp BR, Karnes RJ, Brankley SM, et al. *Monitoring intravesical therapy for superficial bladder cancer using fluorescence in situ hybridization.* 2005, J Urol. , p. 401-404.



75. Yoder BJ, Skacel M, Hedgepeth R, et al. *Reflex UroVysion testing of bladder cancer surveillance patients with equivocal or negative urine cytology: a prospective study with focus on the natural history of anticipatory positive findings.* 2007, *Am J Clin Pathol.*
76. Nieder AM, Soloway MS, Herr HW. *Should we abandon the FISH test?* 2007, *Eur Urol.* , p. 1469-1471.
77. Tapia C, Glatz K, Obermann EC, et al. *Evaluation of chromosomal aberrations in patients with benign conditions and reactive changes in urinary cytology.* 2011, *Cancer Cytopathol.*
78. Junker K, Fritsch T, Hartmann A, Schulze W, Schubert J. *Multicolor fluorescence in situ hybridization (M-FISH) on cells from urine for the detection of bladder cancer.* 2006, *Cytogenet Genome Res.* , p. 279-283.
79. Zellweger T, Benz G, Cathomas G, et al. *Multi-target fluorescence in situ hybridization in bladder washings for prediction of recurrent bladder cancer.* 2006, *Int J Cancer.* , p. 1660-1665.
80. Kipp BR, Sebo TJ, Griffin MD, Ihrke JM, Halling KC. *Analysis of polyomavirus-infected renal transplant recipients' urine specimens: correlation of routine urine cytology, fluorescence in situ hybridization, and digital image analysis.* *Am J Clin Pathol.*
81. DN., Jones SJ. *A-based molecular cytology for bladder cancer surveillance.* 2006, *Urology*, p. 35-47.
82. Dalquen P, Kleiber B, Grilli B, Herzog M, Bubendorf L, Oberholze M. *DNA image cytometry and fluorescence in situ hybridization for noninvasive detection of urothelial tumors in voided urine.* 2002, *Cancer (Cancer Cytopathol).*, p. 374–379.
83. Smith GD, Bentz JS *“FISHing” to detect urinary and other cancers: validation of an imaging system to aid in interpretation..* 2010, *Cancer (Cancer Cytopathol).* , p. 56-64.

84. Konsti J, Lundin J, Jumppanen M, Lundin M, Viitanen A, Isola J. *A public-domain image processing tool for automated quantification of fluorescence in situ hybridisation signals*. 2008, *J Clin Pathol.* , p. 278-282.

85. Brown, FM. *It is still the gold standard for screening? Urine cytology* . 2000, *Urol.Clin.North.Am*, p. 25-37.

86. Morgan Roupret, Marko Babjuk, Eva Comperat, Richard Zigeuner, Richard J. Sylvester, Maximilian Burger, Nigel C. Cowan, Paolo Gontero, Bas W.G. Van Rhijn, A. Hugh Mostafid, Joan Palou, Sharhokh F. Shariat. *European Association of Urology Guidelines on Upper Urinary*. 2017.

87. Power, N. E., & Izawa, J. *Comparison of Guidelines on Non-Muscle Invasive Bladder Cancer (EAU, CUA, AUA, NCCN, NICE)*. s.l. : Bladder Cancer, 2(1), 2016.

## 10 RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare la Prof.ssa Marina Scarpelli, relatore di questa tesi, per la supervisione e il supporto forniti per la stesura.

Un ringraziamento particolare va alla Dott.ssa Elena Antaldi, correlatrice di questa tesi, per la sua infinita disponibilità, pazienza e dolcezza; alla Prof.ssa Doriana Morichetti per il materiale fornito.

Ringrazio anche la mia famiglia che mi ha sopportato e supportato in questo periodo.