



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico

**LA CITOLOGIA CERVICO-VAGINALE NELL'ERA
MOLECOLARE: REVISIONE DELLA LETTERATURA CON
PARTICOLARE RIFERIMENTO ALL'ACCURATEZZA DEI
TEST DIAGNOSTICI TRADIZIONALI E MOLECOLARI**

Relatore: Chiar.ma

Prof.ssa **Marina Scarpelli**

Tesi di Laurea di:

Asya Cesaretti

Correlatore:

Dott.ssa **Elena Antaldi**

A.A. 2019/2020

Ad Alan Turing

Indice

INTRODUZIONE.....	5
1- IL CONCETTO DI NEOPLASIA SQUAMOSA CERVICALE E A CELLULE COLONNARI: RUOLO DELL'HPV.....	7
1.1 Anatomia macroscopica e microscopica della cervice uterina.....	7
1.2 Lesioni preneoplastiche della cervice.....	9
1.2.1 Lesioni di basso grado.....	10
1.2.2 Lesioni di alto grado.....	12
1.2.3 Carcinoma superficialmente invasivo e carcinoma invasivo	13
1.2.4 Potenziali simulatori di SIL	14
1.2.5 Adenocarcinoma in situ	15
1.2.6 Adenocarcinoma invasivo	16
1.3 Classificazioni	16
1.3.1 Classificazione di Papanicolaou	16
1.3.2 Classificazione di Reagan	17
1.3.3 Classificazione Congresso di Vienna.....	17
1.3.4 Classificazione di Richart	17
1.3.5 Classificazione Bethesda.....	18
1.4 HPV.....	20
1.4.1 Storia naturale infezione da HPV e epidemiologia	21
1.4.2 Prevenzione primaria dell'infezione da HPV	22
2 TECNICHE TRADIZIONALI.....	25
2.1 Prelievo	26
2.2 Processazione Tradizionale	28

2.3 Metodica Thin prep	28
2.4 Colorazione	31
2.5 Processazione e colorazione dei campioni di citologia vaginale presso la Citopatologia Diagnostica Ospedali Riuniti	32
2.6 Test immunoistochimici.....	33
2.7 Sistemi automatizzati per la lettura	35
2.8 Accuratezza dei test tradizionali	37
3 TECNICHE MOLECOLARI.....	39
3.1 NGS.....	42
3.2 Accuratezza test molecolari.....	42
4 ALGORITMI PER I PROGRAMMI DI SCREENING IN BASE ALLE LINEE GUIDA NAZIONALI ED INTERNAZIONALI.....	44
4.1 Vecchio algoritmo	45
4.1.1 Gestione della paziente con diagnosi di ASC-US	47
4.1.2 Gestione delle pazienti con diagnosi citologica: L-SIL e ASC-H....	49
4.1.3 Gestione delle pazienti con diagnosi citologica: H-SIL o carcinoma squamocellulare	51
4.1.4 Gestione delle pazienti con diagnosi citologica di: AGC-AIS o adenocarcinoma	53
4.2 Nuovo Algoritmo	55
4.2.1 Citologia di triage.....	61
5 PROBLEMATICHE LEGATE ALLE NUOVE LINEE GUIDA.....	63
CONCLUSIONI.....	66
BIBLIOGRAFIA.....	68
RINGRAZIAMENTI.....	84

INTRODUZIONE

Il carcinoma della cervice uterina è il quarto tumore più comune nelle donne in tutto il mondo e la quarta causa di morte. A causa delle disparità economiche e sanitarie l'incidenza e la mortalità sono elevate nei paesi in via di sviluppo, dove i programmi di screening, molto spesso, sono limitati o assenti. [3]

L'introduzione dei primi programmi di screening cervico-vaginale nel mondo occidentale risale agli anni '50 del secolo scorso. Il Canada fu uno dei primi ad introdurlo circa 30 anni dopo che Papanicolaou aveva fatto la sua iniziale presentazione sui risultati della citologia vaginale per la diagnosi del carcinoma della cervice. Grazie ai programmi di screening la mortalità per carcinoma della cervice si è stabilmente ridotta nei paesi che li promuovono. Questo tipo di screening, universalmente noto come PapTest, è un test semplice, rapido, economico, poco invasivo e ben tollerato dalle donne. Tuttavia presenta delle limitazioni potendo essere influenzato dalle fasi di campionamento e allestimento del campione oltre che dall'esperienza del citologo esaminatore. Inoltre ha una sensibilità di poco superiore al 50%, per rilevare lesioni di alto grado e deve essere ripetuto a intervalli brevi per ottenere una buona sensibilità. [76]

Negli ultimi anni, è stato individuato come metodo di screening primario l'HPV test in sostituzione del PapTest. Questo test ha valori di sensibilità elevati, intorno al 90%, è un test affidabile, non necessita di alti requisiti di formazione, è automatizzabile e, avendo un elevato valore predittivo negativo, l'intervallo di screening può essere esteso a 5 anni. [6] [88] Il PapTest rimane come test secondario di triage in quanto l'HPV test presenta bassi livelli di specificità.

Nel corso degli anni sono state sviluppate nel mondo nuove modalità preventive contro il carcinoma cervicale rappresentate dai vaccini. L'Organizzazione Mondiale della Sanità nel 2014 ha raccomandato di includere la vaccinazione anti HPV nei programmi nazionali di immunizzazione. [95]

La tesi ha lo scopo di fare il punto sulle linee guida attuali per la prevenzione del carcinoma della cervice uterina e sulle modalità pratiche di applicazione delle stesse, attraverso una revisione della letteratura. In particolare vengono prese in considerazione le tecniche tradizionali e quelle molecolari e la loro accuratezza nella pratica clinica.

1- IL CONCETTO DI NEOPLASIA SQUAMOSA CERVICALE E A CELLULE COLONNARI: RUOLO DELL'HPV

1.1 Anatomia macroscopica e microscopica della cervice uterina

La cervice uterina fa parte dell'apparato riproduttore femminile ed è una stretta porzione cilindrica, di circa 3 cm di lunghezza e 2,5 cm di diametro, situata nella parte inferiore dell'utero e proiettata nella cavità vaginale. La parte esterna della cervice è chiamata *esocervice*, ovvero quella porzione che protrude nella cavità vaginale ed è rivestita da epitelio squamoso pluristratificato, ricco di glicogeno. La parte più interna è detta *endocervice*, comunica, da un lato, con l'ambiente vaginale attraverso l'orifizio uterino esterno (OUE) e dall'altro con la cavità uterina attraverso l'orifizio uterino interno (OUI) ed è rivestita da epitelio cilindrico monostratificato, costituito da rare cellule ciliate intercalate da numerose cellule mucosecarnenti. I due epiteli si uniscono a livello della giunzione squamo-colonnare in quella che è nota come zona di trasformazione. Questa zona è soggetta a rimodellamento fisiologico durante la vita riproduttiva a seguito delle influenze ormonali e delle gravidanze.

In pratica è riconosciuta una giunzione squamo-colonnare nativa che è la sede in cui l'epitelio squamoso e quello colonnare si uniscono alla nascita. Al tempo del menarca e durante la gravidanza la cervice aumenta di dimensioni e l'epitelio esocervicale si estende all'esocervice realizzando una forma di ectopia. Con il tempo l'epitelio colonnare che costituisce l'ectopia viene sostituito da epitelio pavimentoso metaplastico. Si forma così una nuova giunzione squamo-colonnare di tipo funzionale o fisiologico. La regione compresa fra le due giunzioni è la zona di trasformazione.

Nella immagine sottostante riprodotta da un articolo pubblicato online nel 2018 Deng, H., Hillpot, E., Mondal, S. *et al.* HPV16-Immortalized Cells from Human Transformation Zone and Endocervix are More Dysplastic than Ectocervical Cells in Organotypic Culture. *Sci Rep* 8, 15402 (2018) si può osservare la rappresentazione della zona di trasformazione ed il suo rapporto con la giunzione squamo-colonnare.

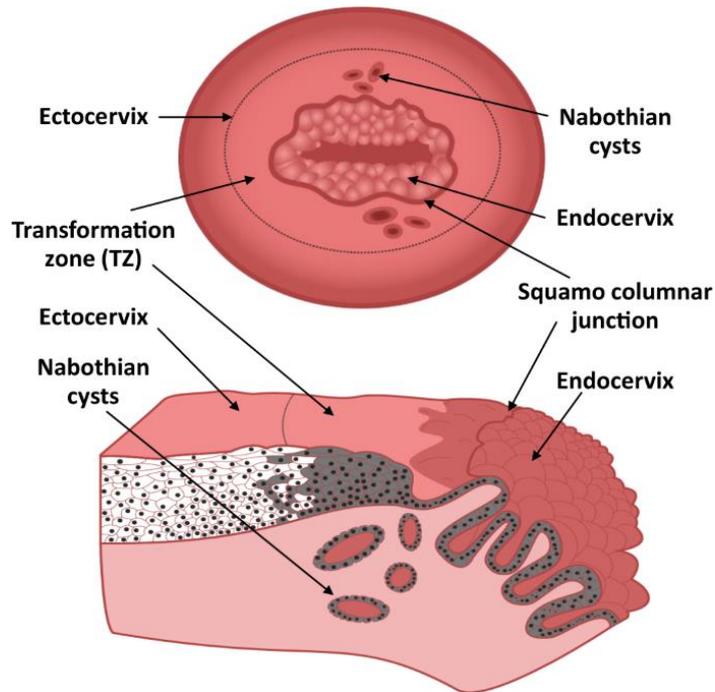


Figura 1

1.2 Lesioni preneoplastiche della cervice

La esistenza di lesioni precursore del carcinoma invasivo della cervice è nota da più di 100 anni. La conoscenza di queste lesioni si è sviluppata enormemente negli ultimi 50 anni causando diversi cambiamenti nella loro nomenclatura. Fin dai primi anni del '900 venne descritto il carcinoma in situ come precursore del carcinoma infiltrante e, a seguito dell'implementazione delle campagne di screening, divenne chiaro che alterazioni delle cellule epiteliali meno severe di quelle osservabili nel carcinoma potevano essere evidenti in alcune pazienti. Per queste lesioni fu creato il termine di 'displasia'. Una serie di studi che risalgono alla fine degli anni '60 misero in evidenza che la displasia ed il carcinoma in situ erano morfologicamente simili e che contenevano modificazioni comuni del DNA.

Sulla base di questi studi Richart propose il concetto di CIN o Cervical Intraepithelial Neoplasia. [96]

Successivamente è stato suggerito che la terminologia per descrivere queste lesioni fosse modificata, per riflettere meglio il complesso processo biologico che porta alle alterazioni istologiche e citologiche osservabili. Fu pertanto introdotto il concetto di SIL o 'squamous intraepithelial lesion' adottato anche dal sistema di Bethesda per la classificazione citologica. Nella tabella 1 sono riportate le terminologie utilizzate per le lesioni precancerose della cervice.

CLASSIFICAZIONI PIÙ VECCHIE	CIN	WHO/Bethesda
Displasia lieve	CIN 1	LSIL
Displasia moderata	CIN2	HSIL
Displasia grave	CIN3	
Carcinoma in situ		

Tabella 1

SIL è caratterizzata da una alterata proliferazione e maturazione delle cellule e da atipia citologica. Le alterazioni citologiche includono nuclei ipercromatici, distribuzione alterata della cromatina, pleomorfismo nucleare e incrementato rapporto N/C.

1.2.1 Lesioni di basso grado

Le lesioni cervicali intra-epiteliali di basso grado sono generalmente associate a infezione da HPV a basso rischio (in genere 6-11) la cui replicazione esita in morte della cellula e le alterazioni epiteliali sono di tipo policlonale (infezioni produttive). La infezione produce lesioni piatte o esofitiche note con il nome di condiloma.

Le cellule sede di infezione virale produttiva mostrano una cavitazione citoplasmatica perinucleare accompagnata da ispessimento della membrana citoplasmatica. I nuclei sono atipici con variazione nelle dimensioni, ipercromasia e irregolarità della membrana nucleare. Questi aspetti definiscono la cellula coilocitotica che è caratteristica della LSIL [44]

Nelle LSIL è presente una significativa atipia nucleare che interessa solo gli strati superficiali dell'epitelio e risparmia i 2/3 profondi. [49] (Figura 2 e Figura 3).

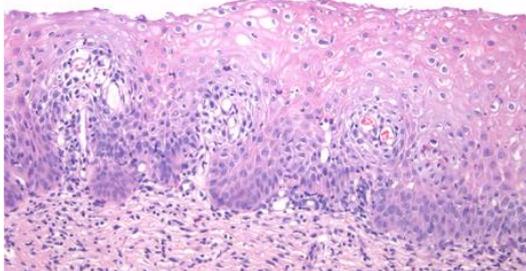


Figura 2

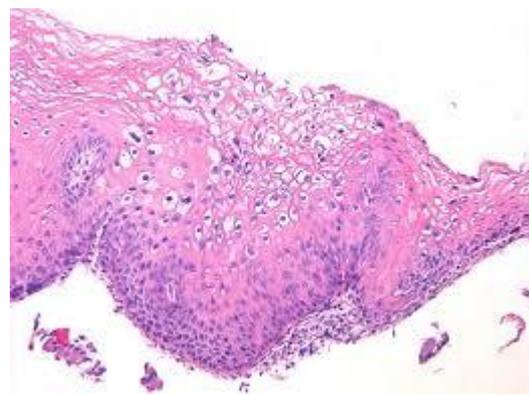


Figura 3

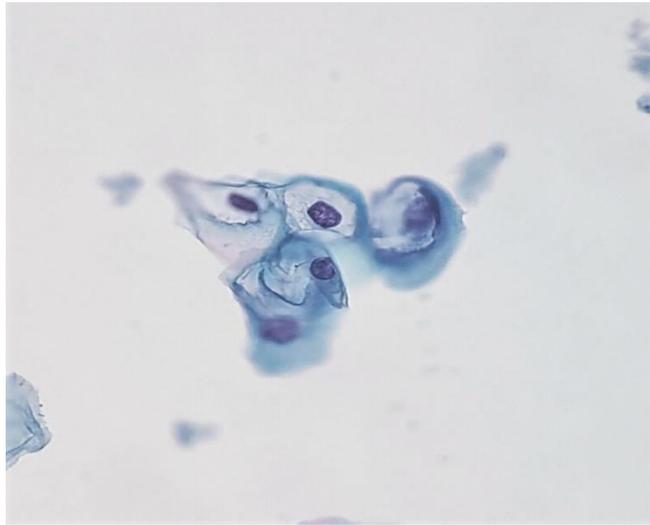


Figura 4

L'85% delle LSIL è associato a infezione da HPV a basso rischio (6 o 11) e nella maggior parte dei casi non si osserva progressione verso HSIL e carcinoma.

Uno studio condotto nel 2003 con lo scopo di valutare la influenza della coilocitosi sulla progressione ad un grado più alto di CIN durante il follow-up ha evidenziato che la presenza di coilocitosi in lesioni CIN1 non è associata di solito a progressione. [48] I coilociti sono meglio evidenziati nei preparati citologici (Figura 4)

1.2.2 Lesioni di alto grado

Nelle lesioni di alto grado l'infezione prevalente è quella da HPV ad alto rischio (16, 18, 31, 33, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, e 68). I genotipi 16 e 18 di HPV sono stati riscontrati nel 70% dei carcinomi invasivi.

In presenza di HPV ad alto rischio, le cellule staminali della zona di trasformazione subiscono una trasformazione verso lesioni di alto grado, che possono progredire fino alla neoplasia invasiva, in base al sottotipo virale e a fattori propri dell'organismo ospite. Infatti si attribuisce alle difese immunitarie un ruolo significativo nel contrastare la cancerogenesi cervicale. Le proteine codificate dai geni E6 ed E7 di HPV 16 si legano e inattivano i prodotti proteici dei geni oncosoppressori p53 e pRb, inibendone la funzione. In corso di H-SIL (CIN-2/CIN-3) l'integrazione del genoma virale interessa le cellule basali proliferanti. Da un punto di vista istologico la atipia è presente in tutti gli strati dell'epitelio squamoso ed è particolarmente evidente a livello dello strato basale e parabasale; sono riconoscibili figure mitotiche atipiche anche nella parte superiore dell'epitelio. Cellule di tipo basale immaturo, tipicamente, occupano più del terzo inferiore dell'epitelio. La crescita è disordinata e vi è perdita della polarizzazione cellulare. (Figura 5).

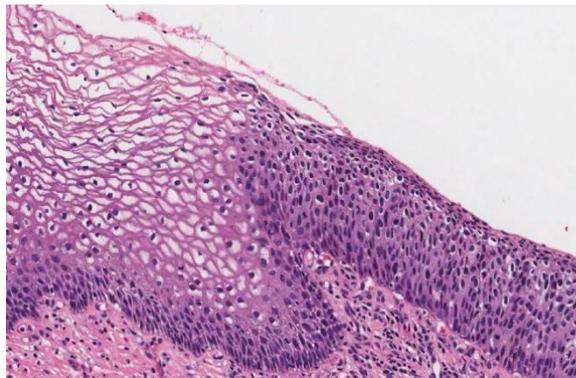


Figura 5

Il classico schema riportato sotto riassume il passaggio istologico e citologico dall'epitelio normale a LSIL a HS

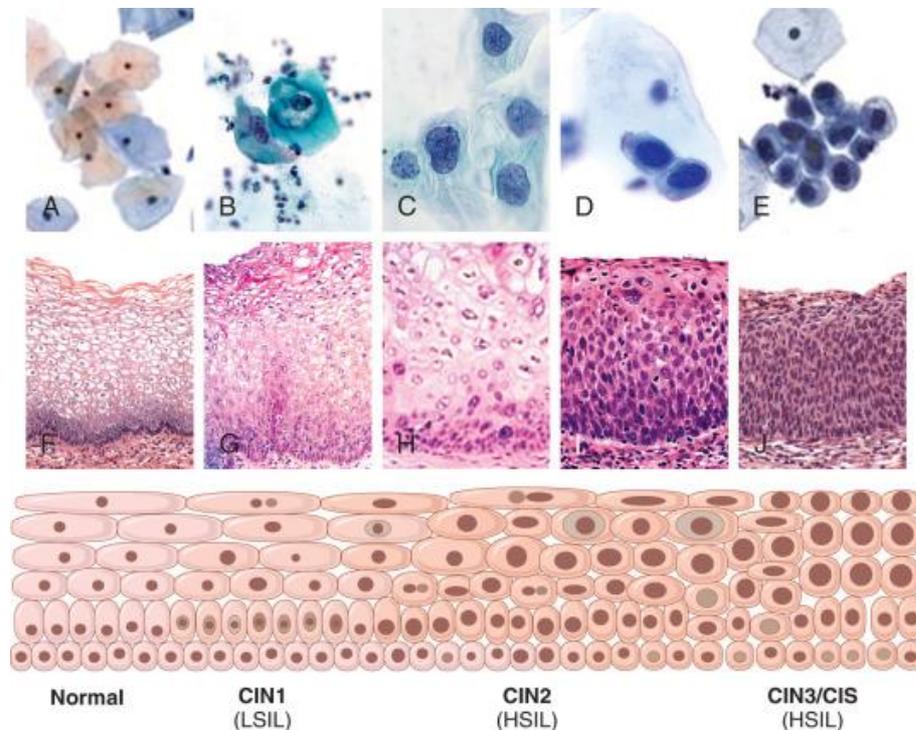


Figura 6 estratta da: *Crum et al. Diagnostic Gynecologic and Obstetric Pathology, 2018*

1.2.3 Carcinoma superficialmente invasivo e carcinoma invasivo

Il 7% circa dei campioni chirurgici derivanti da trattamento di un carcinoma in situ evidenzia un carcinoma superficialmente invasivo. Quest'ultimo è definito sulla base dell'estensione e della profondità di infiltrazione neoplastica.

Infiltrazione stromale (sotto-epiteliale) < 3 mm di distanza dalla membrana basale (Ia1) e < 5 mm di distanza dalla membrana basale (Ia2), massima estensione orizzontale ≤ 7 mm.

La fase iniziale della invasione stromale, originariamente definita microinvasione, è costituita da piccole propaggini di epitelio neoplastico che si estendono oltre la membrana basale di una H-SIL. Queste porzioni microscopiche (< 1 mm) di epitelio neoplastico non influenzano la prognosi della H-SIL. Nel carcinoma microinvasivo

le cellule della porzione infiltrativa sono, paradossalmente, meglio differenziate delle cellule della neoplasia intraepiteliale da cui provengono. Nel punto di invasione notiamo l'interruzione della membrana basale e un infiltrato infiammatorio cronico intorno alla lesione. [1] [26] Per tumori con profondità di infiltrazione stromale inferiore ai 3 mm la conizzazione e/o la isterectomia semplice sono considerate interventi curativi. Qualora le dimensioni tumorali superino quelle sopra riportate, si parlerà non più di carcinoma superficialmente invasivo ma di carcinoma invasivo.

1.2.4 Potenziali simulatori di SIL

Alcune lesioni reattive possono simulare la neoplasia squamosa in situ di basso e alto grado. Fra queste la metaplasia immatura atipica (AIM) e la displasia eosinofila (DE).

Il termine metaplasia immatura atipica fu introdotto per la prima volta nel 1983 per descrivere una proliferazione uniforme a tutto spessore di cellule basali con alta densità cellulare e assenza di maturazione, ma senza criteri sufficienti per una diagnosi di CIN3. Mentre per le forme vegetanti la ipotesi di maggiore probabilità è che si tratti di un condiloma immaturo. Per le lesioni piatte la problematica di differenziazione da HSIL rimane anche per la scarsa riproducibilità nella diagnosi. [62] [63]

Diversi studi hanno dimostrato che l'AIM può essere positiva o negativa per l'HPV e, se vengono utilizzate colorazioni immunohistochimiche quali p16 e Ki-67, può essere positiva in modo variabile per p16 e mostrare un'ampia gamma variabilità di proliferazione con Ki-67. Studi di follow-up hanno riportato che l'AIM associata all'HPV che mostra espressione di p16 e alti tassi di proliferazione successivamente si ripresenta, in molti casi, come lesione displastica. Si è ipotizzato che le lesioni AIM positive per HPV e p16 ma ipoproliferative con Mib-1 possano essere lesioni precoci.

La displasia eosinofila (DE) è un termine utilizzato per le lesioni intraepiteliali che mostrano sia metaplasia squamosa che displasia. La displasia eosinofila è

comunemente associata a infezione da HPV e HSIL. La maggior parte delle lesioni DE sono fortemente positive per p16, iperproliferative con Mib-1 e positive per HPV DNA a alto rischio o intermedio. Pertanto, la DE rappresenta probabilmente una variante di HSIL con caratteristiche morfologiche fuorvianti che suggeriscono una diagnosi benigna. [51]

Esempi di AIM e displasia eosinofila ripresi dalla letteratura sono riportati di seguito. (Figura 7 e Figura 8)

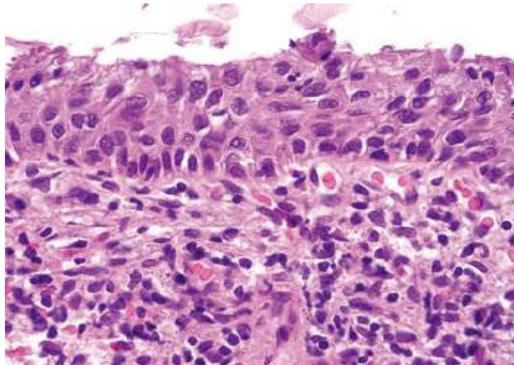


Figura 7

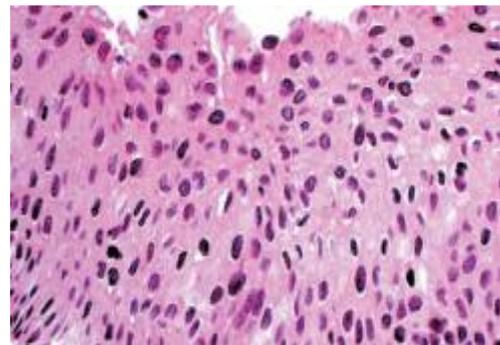


Figura 8

1.2.5 Adenocarcinoma in situ

Nella maggioranza dei casi, l'adenocarcinoma in situ insorge nella giunzione squamo-colonnare e si estende, per continuità, nel canale cervicale. È caratteristico il brusco passaggio da epitelio endocervicale normale a quello neoplastico. Gli elementi neoplastici sono di tipo colonnare alto, con citoplasma eosinofilo o mucinoso. Il pattern di diffusione è simile a quello della SIL. Per definizione, l'adenocarcinoma in situ è una neoplasia intra-epiteliale, riproduce la normale architettura ghiandolare endocervicale e non interessa lo stroma peri-ghiandolare; c'è un coinvolgimento di una parte o di tutte le ghiandole dell'epitelio o che ne formano la superficie. Le cellule sono lievemente ingrandite, con nuclei ipercromici atipici, cromatina grossolana, piccoli nucleoli singoli o multipli, rapporto nucleo/citoplasma aumentato e variabile numero di mitosi. [27] Il citoplasma può essere scarso o abbondante, vacuolato, granulare e basofilo o eosinofilo. Il 90% circa di adenocarcinoma in situ è associato a HPV, più precisamente HPV-16 e

HPV-18. Risulta difficoltoso identificarlo perché non ben visibile con la colposcopia, inoltre i criteri citologici per identificare le lesioni ghiandolari non sono così ben definiti come per le SIL. [45]

1.2.6 Adenocarcinoma invasivo

La neoplasia ha l'aspetto di una massa fungiforme, polipoide o papillare. Nei tumori esofitici prevale un pattern istologico di tipo papillare; in quelli endofitici prevale la struttura tubulare/ghiandolare. I carcinomi scarsamente differenziati possono perdere la strutturazione ghiandolare. L'adenocarcinoma dell'endocervice diffonde localmente e per via linfatica. La prognosi è peggiore rispetto al carcinoma squamoso.

1.3 Classificazioni

Il progresso delle conoscenze ha portato alla determinazione di diverse classificazioni citologiche:

1.3.1 Classificazione di Papanicolaou

Papanicolaou è considerato il padre fondatore della citologia cervicale; ha descritto la tecnica per prelevare le cellule cervicali, ha messo a punto la tecnica di colorazione e ha definito un criterio di interpretazione delle alterazioni cellulari.

Nel 1942 propose la prima classificazione numerica suddivisa in 5 classi:

CLASSE I: striscio benigno (normale)

CLASSE II: striscio con minime anomalie cellulari, benigne

CLASSE III: striscio con evidenti anomalie cellulari ma non riferibili a neoplasia

CLASSE IV: striscio molto probabilmente riferibile a neoplasia

CLASSE V: striscio maligno, positivo per cancro

Il problema principale di questa classificazione è la classe III; in quanto suggerisce malignità ma non è considerata una neoplasia. [98]

1.3.2 Classificazione di Reagan

Nel 1953 viene introdotto il termine di displasia; [97]

DISPLASIA LIEVE: interessa il terzo inferiore dello spessore dell'epitelio

DISPLASIA MODERATA: le alterazioni interessano fino ai due terzi dello spessore epiteliale

DISPLASIA SEVERA E CARCINOMA "in situ": la displasia interessa tutto lo spessore dell'epitelio

1.3.3 Classificazione Congresso di Vienna

Nel 1961 si tenne il primo Congresso Internazionale di Citologia a Vienna in cui furono definiti i concetti di "displasia" e di "carcinoma in situ". La displasia venne suddivisa in lieve, medio, grave e CIS (carcinoma in situ). La diagnosi di quest'ultimo è ristretta a lesioni dell'epitelio che non hanno superato la membrana basale e non hanno potenziale metastatico. Con il termine displasia si indicano alterazioni cellulari di grado variabile, precursori del carcinoma invasivo. [98]

1.3.4 Classificazione di Richart

Nel 1967 venne definito il concetto di CIN (Cervical Intraepithelial Neoplasm) in cui le lesioni vennero suddivise in tre gradi.

CIN 1 corrisponde alla displasia lieve, CIN 2 displasia moderata, CIN 3 alla displasia grave e al CIS. [98]

1.3.5 Classificazione Bethesda

Nel dicembre del 1988 un gruppo di esperti in citopatologia ginecologica e istopatologia si riunì, con l'obiettivo di sviluppare una terminologia per la refertazione che comunicasse i risultati dell'esame citologico in modo chiaro e fosse in grado di ridurre la variabilità interosservatore. Gli esperti si accordarono su tre principi fondamentali: [98]

- La terminologia deve comunicare informazioni clinicamente rilevanti;
- La terminologia dovrebbe essere riproducibile tra i diversi laboratori e anche abbastanza flessibile da poter essere adattata in un'ampia varietà di laboratori e posizioni geografiche;
- La terminologia deve riflettere la comprensione più attuale della neoplasia cervicale;

Nel 1988 fu creato un quadro standardizzato per i referti citologici cervicali che includeva la valutazione dell'adeguatezza del campione, una categorizzazione generale e una diagnosi descrittiva. Inoltre fu introdotto un sistema di reporting su due livelli delle lesioni intraepiteliali squamose (SIL): L-SIL (lesioni intraepiteliali squamose di basso grado) e H-SIL (lesioni intraepiteliali squamose di alto grado). Nel 1991 fu convocata una nuova conferenza con l'obiettivo di sviluppare criteri per le categorie interpretative e determinare l'adeguatezza dei campioni. Questo ha portato alla pubblicazione del primo atlante Bethesda nel 1994, il quale diventò un riferimento mondiale per la citologia cervicale. Il successivo workshop si tenne nel 2001 in cui venne sostituito il termine "diagnosi" con "interpretazione" o "risultato" in quanto il Pap-test è considerato un test di screening che rappresenta una consultazione medica che contribuisce alla diagnosi quando integrata con la storia della paziente. Inoltre venne fatto un aggiornamento all'atlante e si cercò di migliorare la standardizzazione, la chiarezza e la riproducibilità dei referti citologici cervicali, fornendo criteri interpretativi più dettagliati. La categoria ASCUS fu modificata in ASC-US e ASC-H. Furono inoltre, introdotte e sempre più utilizzate le tecniche di imaging, l'automazione, il test HPV e la citologia su base liquida.

[28] Negli ultimi anni ci sono stati diversi cambiamenti a livello di screening, prevenzione e gestione del cancro della cervice uterina. L'aumento dell'uso di citologia su base liquida, l'aggiunta di cotesting (Pap e hrHPV test) e il test primario di hrHPV. Alla luce di tutti questi cambiamenti, nel 2014 è stata effettuata una revisione e un aggiornamento della terminologia del Sistema Bethesda 2001, perfezionando i criteri morfologici. C'è stata un'incorporazione di nuove informazioni aggiuntive nella terza edizione dell'atlante per la citologia cervicale. La task force è stata divisa in 12 gruppi ognuno dei quali responsabile dei 12 capitoli della nuova edizione dell'atlante; sei dei quali corrispondono alle principali categorie interpretative di Bethesda, i restanti sono dedicati ad altre neoplasie maligne. [29]

1.4 HPV

Il papilloma virus umano (HPV) è un virus privo di pericapside a DNA circolare a doppio filamento, contenuto nel capside icosaedrico. Sono stati identificati più di 130 genotipi di HPV suddivisi in mucosi e cutanei. I sottotipi mucosi sono associati a infezioni del tratto genitale e sono classificati in HPV a basso rischio (HPV-6, HPV-11, HPV-40, HPV-42, HPV-43, HPV-44, HPV-53, HPV-54, HPV-61, HPV-72, HPV-81) e HPV ad alto rischio (HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-68, HPV-69, HPV-73, HPV-82). HPV-16 e HPV-18 sono associati al 70% delle lesioni squamose intraepiteliali di alto grado e al cancro cervicale invasivo. [1] Gli HPV ad alto rischio sono associati a circa il 99% dei casi di cancro della cervice uterina. Il genoma dei Papillomavirus è organizzato in una regione precoce (early, E), una regione tardiva (late, L) e una regione lunga di controllo (long-control region, LCR). Nelle lesioni di alto grado la produzione non regolamentata delle oncoproteine E6 ed E7 interferisce con la funzione di p53 e pRB inibendoli, portando a trasformazioni maligne dovute alla perdita della funzione apoptotica e del controllo del ciclo cellulare. [2,4]

L'HPV viene trasmesso per via sessuale. Il rischio è aumentato in caso di partner sessuali multipli e di giovane età al momento del primo rapporto sessuale, [5] fumo di sigaretta, uso di contraccettivi orali e coinfezione da HIV. [2] L'infezione da HPV è molto frequente nella popolazione e la sua evoluzione dipende dal potenziale oncogeno. La maggior parte delle infezioni sono transitorie e regrediscono spontaneamente in poco tempo; in un anno nel 50% circa dei casi e in due anni nell'80% circa. La regressione è dovuta all'efficacia della risposta immunitaria. Alcune, talvolta, sono persistenti e in base al tipo virale infettante si hanno lesioni benigne (HPV a basso rischio) oppure lesioni maligne (HPV ad alto rischio). Sono stati condotti degli studi i quali hanno evidenziato che pazienti con infezioni persistenti di alcuni tipi di hrHPV avevano una probabilità 3 volte maggiore di sviluppare CIN2 rispetto a quelli che avevano una nuova infezione da hrHPV.

Perciò la persistenza, per più di 2 anni, è correlata allo sviluppo di lesioni preneoplastiche o maligne. [2,6]

1.4.1 Storia naturale infezione da HPV e epidemiologia

L'infezione da HPV si ha quando il virus raggiunge le cellule dello strato epiteliale basale, probabilmente attraverso microlesioni. La sede anatomica di maggiore fragilità è la zona di trasformazione. Una volta che il virus ha raggiunto la cellula ospite, il processo riproduttivo della progenie virale evolve in parallelo al processo di maturazione della cellula stessa, e termina negli strati più superficiali dell'epitelio con l'assemblaggio della particella virale. I virus neoformati vengono poi rilasciati nell'ambiente insieme alle cellule superficiali desquamate.

Lo schema sottostante, tratto dal lavoro pubblicato da Kahn nel 2009 esemplifica il ciclo del virus e la correlazione con le alterazioni squamose intraepiteliali. [99]

(Figura 9)

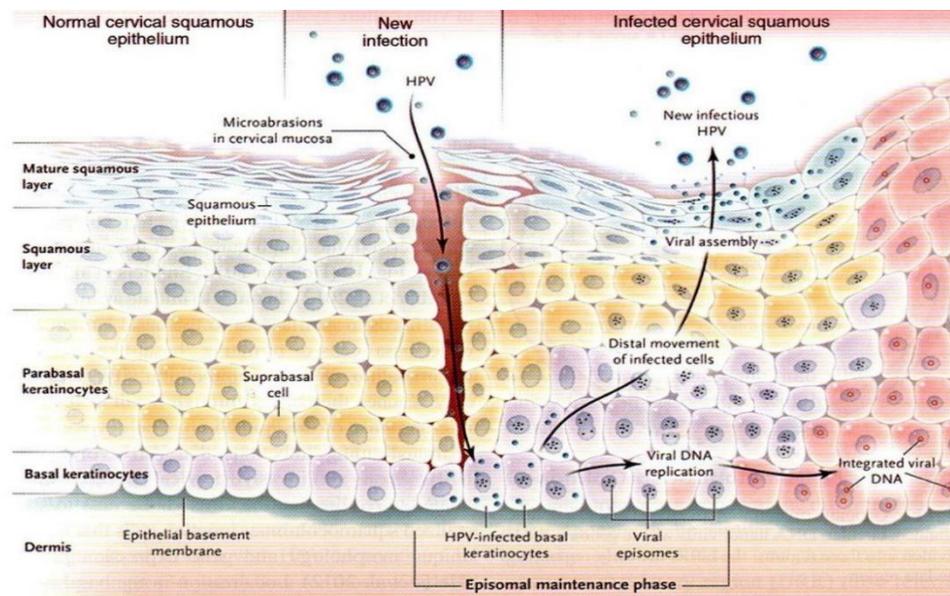


Figura 9

Uno studio internazionale ha rilevato una prevalenza di HPV nel 10,4% delle pazienti con citologia normale. Le donne nei paesi meno sviluppati e quelle che hanno meno di 25 anni hanno una prevalenza maggiore, che va dal 15 al 45%. La più alta prevalenza di HPV è stata osservata nell'Africa subsahariana (24%), in Europa orientale (21,4%) e in America Latina (16,1%) e la più bassa in Nord America (4,7%) e in Asia occidentale (1,7%). L'HPV di tipo 16 è il virus più comune al mondo con tassi di prevalenza che rappresentavano il 32,3% di tutte le infezioni nell'Asia meridionale, il 28,9% nell'Europa meridionale, il 24,4% nell'Europa occidentale, il 24,3% nell'America settentrionale e il 12% in Africa [7]. In Italia la prevalenza di HPV ad alto rischio nella popolazione generale è dell'8% fra gli studi condotti sul Centro-Nord e Sud-Isole, tuttavia, la prevalenza è leggermente più alta al Sud che al Centro-Nord tra le donne fino a 54 anni d'età. L'HPV 16 è risultato il più frequente nella popolazione sana con un valore medio di quasi 5%, la prevalenza di HPV 18 è più bassa, poco più dell'1%. La positività all'HPV 16 è del 64% per le CIN2/3 e 68% per i tumori invasivi, quella all'HPV 18 è del 7% per le CIN2/3 e 11% per i tumori invasivi. L'incidenza di cancro invasivo della cervice uterina in Italia è in calo, passando da un tasso standardizzato di 9,2 a 7,7 per 100.000 in 10 anni. L'incidenza è minore al Sud. La copertura del Pap test è oltre l'80% al Centro-Nord e non arriva al 60% nel Sud-Isole. [8]

1.4.2 Prevenzione primaria dell'infezione da HPV

La scoperta della stretta correlazione tra carcinoma della cervice e HPV ha rappresentato la premessa per una strategia di prevenzione primaria contro il papillomavirus: il vaccino.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità già dal 2006 ha tracciato le linee guida per la introduzione della vaccinazione e nel 2014 ha raccomandato di includere la vaccinazione anti HPV nei programmi nazionali di immunizzazione.

Gli Stati Uniti, in accordo con le raccomandazioni dell'OMS, nel 2006 furono i primi a raccomandare la vaccinazione contro l'HPV nelle bambine in età pre-adolescenziale tra 9 e 12 anni, con un recupero delle ragazze fino a 26 anni. Nel

2011 gli Usa hanno aggiornato la loro posizione raccomandando la vaccinazione anche ai maschi di 11-12 anni, con recupero dei ragazzi fino a 21 anni. [11]

In Canada, la vaccinazione è stata introdotta nel 2008, con raccomandazione di vaccinare le bambine di 9-13 anni, con recupero fino a 26 anni. A gennaio 2012 la raccomandazione è stata estesa anche ai maschi di 9-13 anni, con recupero fino a 26 anni. [12]

Per quanto riguarda l'Europa, nel 2015, 26 Stati su 31 raccomandavano la vaccinazione contro l'HPV; di questi solo i programmi vaccinali di Austria e Liechtenstein includevano la vaccinazione dei maschi. [13]

In Italia nel dicembre 2007 è stata formulata un'Intesa Stato-Regioni che raccomandava la vaccinazione gratuita contro l'HPV alle ragazze nel corso del dodicesimo anno di vita. Sono state scelte ragazze di questa età per garantire la massima efficacia della vaccinazione rivolgendosi a ragazze prima del primo rapporto sessuale e che frequentano la scuola dell'obbligo in modo da rendere più semplice la comunicazione con le famiglie. [14]

Il PNPV (Piano Nazionale di Prevenzione vaccinale) 2016-2018 propone l'estensione dell'offerta della vaccinazione contro l'HPV a tutti i dodicenni, maschi e femmine. [10]. I dati pubblicati dal Ministero della salute, aggiornati al 31 Dicembre 2018, per la coorte 2006, riportano una copertura vaccinale che va dal 71,84% in Umbria al 17,88% in Friuli Venezia Giulia. Nella Regione Marche la copertura stimata è del 29,57%.

I vaccini contro HPV sono composti da proteine purificate da alcuni tipi di HPV, che formano particelle simil-virali (Vlp, Virus-like Particles) associate a sostanze adiuvanti. Le Vlp mimano il capsido virale, ma non contengono materiale genetico dei virus; pertanto sono in grado di indurre una risposta anticorpale specifica per tipo di Hpv, a seconda delle proteine utilizzate, ma non sono in grado di provocare infezioni [1].

Al momento sono disponibili due vaccini preventivi contro HPV: un vaccino quadrivalente e un vaccino bivalente, autorizzati in Europa a settembre 2006 e 2007 rispettivamente. Ambedue i vaccini proteggono contro HPV 16 e HPV18, responsabili di circa il 70% dei tumori del collo dell'utero. Il vaccino quadrivalente

protegge anche contro HPV 6 e HPV 11, responsabili del 90% dei condilomi genitali.

A giugno 2015 è stato autorizzato in Europa un nuovo vaccino 9-valente (non ancora in commercio), che oltre a HPV 6, 11, 16 e 18, protegge contro altri 5 sierotipi oncogeni (1, 33, 45, 52 e 58).

L’Australia è stato il primo paese a inserire, tra il 2007 e il 2009 un programma di immunizzazione interamente finanziato per le donne tra i 12 e 26 anni e, come risultato dell’elevato assorbimento del vaccino ha segnalato un calo significativo del tasso di lesioni precancerose di alto grado. [87]

[1] Lo scopo di questi vaccini è quello di ridurre la prevalenza, l’insorgenza del cancro cervicale e fornire l’immunità di gregge. [3] Nonostante la loro efficacia nella protezione dall’infezione da HPV, i vaccini non possono essere considerati terapeutici perché non permettono la cura delle infezioni persistenti da HPV. [15]

2 TECNICHE TRADIZIONALI

Il Pap-test o Papanicolau test è un metodo di screening citologico tradizionale; risalente agli anni '40, quando Georgios Nicholas Papanicolaou riferì per la prima volta che la valutazione microscopica degli strisci vaginali poteva essere un approccio utile per rilevare il cancro della cervice uterina. [46] Ancora oggi è rimasto un valido metodo di screening, in quanto presenta un buon rapporto costo/efficacia ed è considerato come la miglior strategia per la prevenzione secondaria del cancro della cervice uterina. La citologia di screening, infatti, ha ridotto sensibilmente l'incidenza e la mortalità per cancro della cervice nei paesi occidentali; l'80% dei tumori si manifesta oggi nei paesi in via di sviluppo, ove si raggiungono tassi di incidenza di 50 casi per 100000 donne, proprio perché la carenza di informazione e risorse non ha permesso l'istituzione dello screening di massa.[17] La sua efficacia deriva dal fatto che riesce ad identificare la presenza di lesioni precancerose che evolvono di solito lentamente, consentendo così un trattamento precoce e potenzialmente meno invasivo e più mirato. [19] Il Servizio Sanitario Nazionale Italiano ha istituito nel 1999 programmi di screening del cancro della cervice; le autorità sanitarie locali devono attuare questi programmi di screening, invitando tutte le donne di età compresa tra 25 e 64 anni ad eseguire un Pap-test ogni 3 anni. [18]

Nelle sezioni che seguono vengono descritte le tappe dell'esame citologico cervicale con riferimento anche alle procedure adottate presso la Citopatologia Diagnostica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedali Riuniti di Ancona

2.1 Prelievo

Il prelievo deve essere effettuato dopo tre giorni dall'ultima mestruazione, nei due giorni prima la donna non deve aver avuto rapporti sessuali, fatto visite ginecologiche o ecografie per via vaginale e nei tre giorni precedenti non deve aver usato ovuli, creme o lavande vaginali. L'ostetrica o il ginecologo posiziona una sorgente di luce idonea a livello vaginale, calibra la misura dello speculum (Figura 10) e lo posiziona in modo da visualizzare la portio. La scelta della misura dello speculum da usare (piccolo, medio, grande) va in base all'età della donna, al trofismo del tessuto e modalità del parto (cesareo o spontaneo). Per facilitare

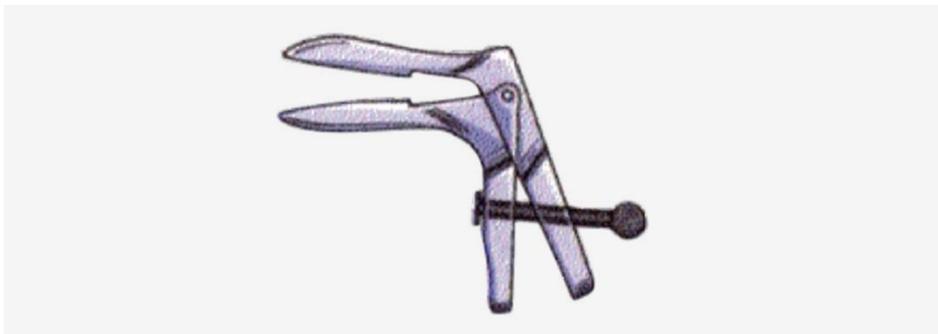


Figura 10: Speculum estratta da "Indicazioni per il prelievo nello screening del carcinoma cervicale" Gisci (Gruppo Italiano Screening del Cervicocarcinoma); 2006

l'introduzione dello speculum si utilizza dell'acqua. È sconsigliato l'uso del lubrificante perché, specialmente se usato in eccesso, può contaminare e alterare il preparato. A questo punto si ispeziona la cervice per vedere se ha un'abbondanza di muco o essudato, in tal caso si tampona utilizzando una garza bagnata con soluzione fisiologica, per garantire che il prelievo sia effettuato direttamente sull'epitelio. Questo farà in modo che il preparato non contenga un'abbondanza di muco o cellule degenerate in quanto staccate dall'epitelio già da tempo. Nel caso si sospetti una vaginite per la presenza di un essudato molto abbondante o in caso di perdita ematica è consigliabile rimandare il prelievo, dopo aver effettuato una terapia prescritta dal medico di base e/o dal ginecologo. Si effettua, in sequenza, un prelievo esocervicale ed endocervicale. Il prelievo esocervicale viene effettuato per primo per evitare che venga contaminato dal sanguinamento che può seguire il

prelievo endocervicale. Per il prelievo dall'esocervice si utilizza la spatola di Ayre, (Figura 11) inserendo la parte più allungata all'inizio dell'orifizio cervicale e ruotando la spatola in senso orario per 360 gradi. Per il prelievo endocervicale si utilizza una spazzolina montata su uno stelo rigido, il cytobrush, (Figura 12) che viene inserita nel canale cervicale e ruotata per 180/360°. [20] [21]

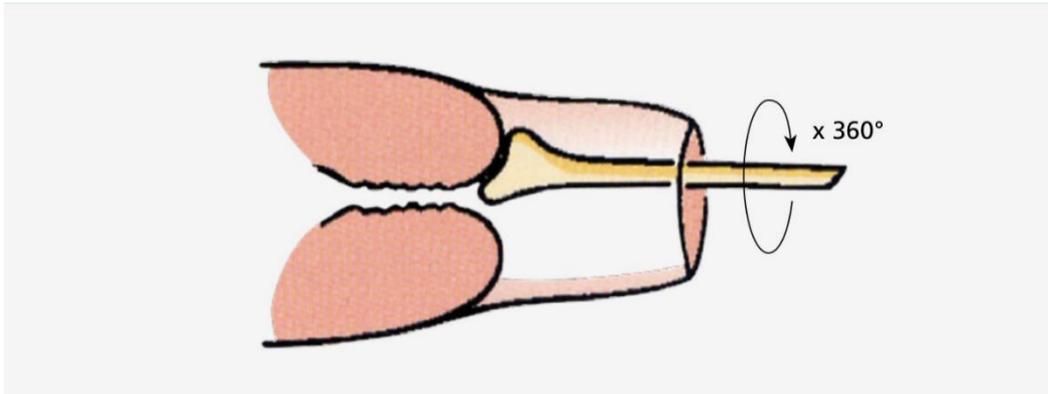


Figura 11: Spatola di Ayre per prelievo esocervicale tratta da "Indicazioni per il prelievo nello screening del carcinoma cervicale" Gisci (Gruppo Italiano Screening del Cervicocarcinoma)

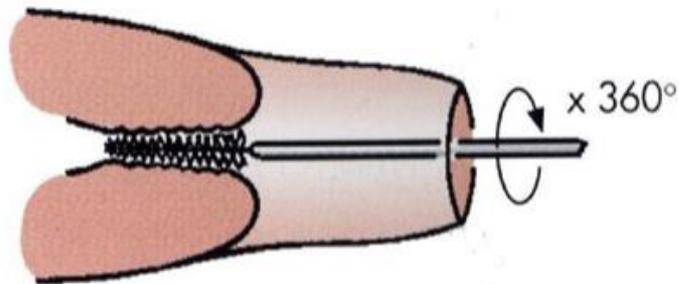


Figura 12: Cytobrus per prelievo endocervicale "Indicazioni per il prelievo nello screening del carcinoma cervicale" Gisci (Gruppo Italiano Screening del Cervicocarcinoma)

2.2 Processazione Tradizionale

Il materiale prelevato dall'esocervice e quello prelevato dall'endocervice vengono posti in zone distinte del vetrino, definite per convenzione, in modo che il lettore sia informato sulla sede da cui proviene il materiale in esame. Per quanto riguarda lo striscio esocervicale bisogna strisciare entrambi i lati della spatola su una parte del vetrino avendo cura di non sovrapporre il materiale, effettuando una leggera pressione per mantenere l'integrità delle cellule ed evitare processi di degenerazione. Il materiale strisciato deve essere sottile, in quanto la presenza di strati sovrapposti impedisce un'adeguata lettura del preparato. Per lo striscio endocervicale il cytobrush va strisciato mediante un movimento rotatorio antiorario. Il preparato va fissato immediatamente per evitare fenomeni di degenerazione cellulare dovuti all'essiccazione: anche una breve attesa può danneggiare le cellule. Nel caso si utilizzi un fissativo spray, il dispositivo deve essere tenuto a distanza di 15 /20 cm dal vetrino: infatti, se effettuata a minor distanza, la potenza dell'erogazione sposterà le cellule alla periferia e indurrà la formazione di bolle d'aria al centro del vetrino stesso. Successivamente il vetrino viene lasciato asciugare in posizione orizzontale. [20] [21]

2.3 Metodica Thin prep

Tale tecnica è stata approvata dalla Food and Drug Administration nel 1996 come alternativa allo striscio convenzionale. Presenta numerosi vantaggi rispetto al Pap-test: notiamo una diminuzione della frequenza di cellule ghiandolari squamose e atipiche di significato indeterminato, una riduzione dei costi complessivi grazie a un minor numero di strisci di Papanicolaou ripetuti per campioni inadeguati, meno colposcopie per cellule squamose atipiche di significato indeterminato, una lettura più efficiente delle immagini microscopiche da parte dei citoscreener, una riduzione dei preparati inadeguati a causa del filtraggio di sangue, muco e cellule infiammatorie e un aumento del rilevamento di lesioni intraepiteliali squamose di

basso e alto grado. [32] Tale tecnica prevede l'immersione del campione di cellule prelevate dall'esocervice e dall'endocervice in un liquido di conservazione contenuto in appositi barattoli, aperti e identificati prima di iniziare il prelievo. Il campionamento dell'esocervice e dell'endocervice in genere viene effettuato separatamente. In caso di allestimento su strato sottile, per il prelievo esocervicale si deve utilizzare una spatola di plastica che garantisce un maggior rilascio di cellule nel mezzo di conservazione; per il prelievo endocervicale si utilizza il cytobrush. La tecnica del prelievo è uguale a quella utilizzata per il pap test convenzionale. Con questa modalità di allestimento, la qualità del prelievo è migliore perchè meno influenzata dal ginecologo o dall'ostetrica. Alcuni centri utilizzano uno strumento di prelievo unico a forma di spazzola che presenta una parte più lunga per il prelievo endocervicale e una parte più corta per l'esocervice. Lo spazzolino una volta introdotto nel canale cervicale viene fatto ruotare per 360 gradi. La parte più lunga della spazzola campiona l'endocervice, quella più corta campiona l'esocervice. In caso di campionamento unico la spazzolina va scossa energicamente sul fondo e sulle pareti del barattolo. In caso di doppio campionamento, per rilasciare un maggior numero di cellule nel liquido di conservazione, la spatola e lo spazzolino una volta immersi nel barattolo vanno sfregati contro le pareti del flacone oppure la spatola va utilizzata per eliminare le cellule dal cytobrush. [20] L'allestimento del preparato non è manuale ma viene fatto con appositi macchinari presso il laboratorio dove vengono analizzati i campioni. Il campione viene posto nel sistema ThinPrep 2000 dove viene miscelato e, successivamente, sottoposto a una fase di lieve dispersione che separa il sangue, il muco e i detriti non diagnostici. Le cellule vengono quindi raccolte su un filtro. Durante la fase di raccolta il sistema ThinPrep 2000 controlla costantemente la quantità di fluido che passa attraverso il filtro in modo da evitare che le cellule siano insufficienti o troppo dense. A questo punto uno strato sottile di cellule viene trasferito su un vetrino in un'area circolare del diametro di 20 mm e il vetrino viene depositato in una soluzione fissativa.

- (1) Dispersione: Il filtro ruota all'interno del barattolo contenente il campione, creando un moto vorticoso in grado di separare i detriti e di disperdere il muco, non modificando la morfologia delle cellule d'interesse.
- (2) Raccolta delle cellule: All'interno del filtro si crea una lieve pressione negativa,

che permette la raccolta delle cellule sulla superficie esterna della membrana. La raccolta è controllata dal software del sistema ThinPrep 2000 regolando il flusso che passa attraverso il filtro.

(3) Trasferimento delle cellule: Dopo che le cellule sono state raccolte sulla superficie della membrana, il filtro viene fatto ruotare e viene delicatamente appoggiato sul vetrino. Le cellule aderiscono al vetrino e si dispongono in modo uniforme in un'area circolare ben definita. (Figura 13)

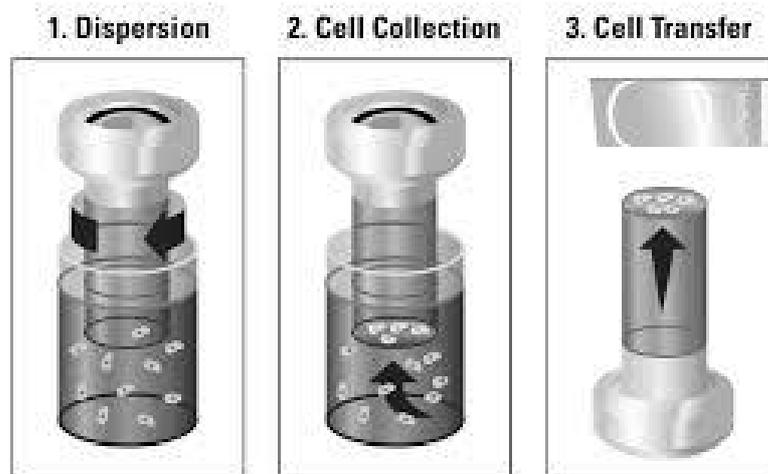


Figura 13: Estratta da “ThinPrep 2000 System, istruzioni per l’uso”. Processo di preparazione del campione ThinPrep

Il ThinPrep 2000 fu il primo sistema commercializzato, che richiede una presenza quasi continua di un operatore dedicato. Negli ultimi anni Il sistema ThinPrep ha avuto un’evoluzione che ha permesso una forte automazione della procedura con l’introduzione di nuove strumentazioni; ThinPrep 3000 e ThinPrep 5000. Il primo permette la processazione di 80 campioni per ciclo, può effettuare fino a tre cicli in 8 ore lavorative. Inoltre la presenza dell’operatore è ridotta, limitata solo alle fasi di inserimento e raccolta, a fine ciclo, dei preparati in strato sottile. Il sistema ThinPrep 5000, introdotto recentemente, 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 corrispondente etichetta sul vetrino. [92]

2.4 Colorazione

Dopo essere stati fissati, i vetrini, vengono colorati con la colorazione tricromica di Papanicolaou, per mettere in evidenza le strutture cellulari. Questo tipo di colorazione è la combinazione di una colorazione nucleare, ematossilina e due controcolorazioni, Orange G 6 (OG-6) ed eosina 50 (EA-50). OG-6 colora la cheratina dall'arancio brillante al giallo, mentre EA-50, una miscela policroma di Eosina e Verde Luce. Nella cervice uterina l'Eosina colora il citoplasma delle cellule pavimentose mature superficiali di rosa che vengono dette eosinofile. Il Verde Luce colora il citoplasma delle cellule più immature quali le intermedie parabasali o basali di verde-celeste, che perciò vengono dette "cianofile". Inoltre colora i nucleoli e i globuli rossi. Le immagini mostrano esempi di strisci colorati con il Papanicolaou. (Figura 14 e 15)

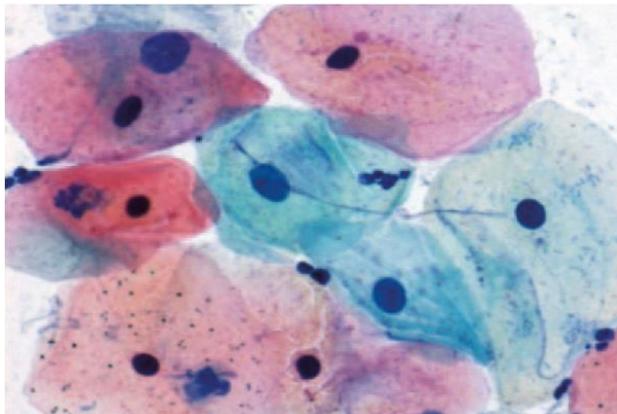


Figura 14

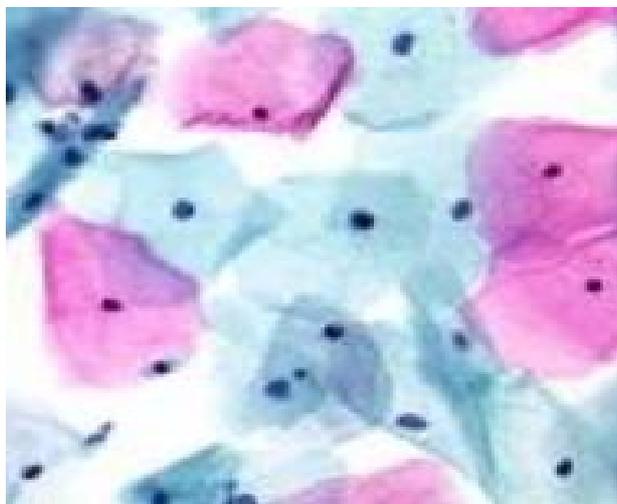


Figura 15

2.5 Processazione e colorazione dei campioni di citologia vaginale presso la Citopatologia Diagnostica Ospedali Riuniti

Nel laboratorio di Citopatologia diagnostica di Ancona viene seguita la metodica tradizionale. I vetrini arrivano al Laboratorio già strisciati dall'ostetrica in sede di prelievo e fissati o in alcol 96° o con un fissativo spray.

Il Tecnico di laboratorio verifica che nome e cognome riportati sui vetrini corrispondano al modulo di accompagnamento e attribuisce le eventuali priorità in base a criteri dedotti dalle informazioni cliniche.

Le principali priorità sono rappresentate da: Pap-test precedente inadeguato; Pap-test non negativo fino ai 5 anni precedenti; Positività per HPV, HCV, HIV; Stato di gravidanza; Cupola vaginale.

Pap- test di screening urgenti e di diagnostica seguono una linea preferenziale e hanno un tempo di refertazione medio (turnaround time) di 2-3 giorni.

Successivamente i Pap-test verranno colorati secondo il protocollo del Laboratorio che utilizza una colorazione di Papanicolaou modificata (Tabella 2). La colorazione viene eseguita con un coloratore Autostainer XL Laica e prevede l'utilizzo di ematossilina di Gill e EA50 senza l'utilizzo dell'OG6. Dopo la colorazione segue l'identificazione dei vetrini tramite etichette che presentano i dati anagrafici del paziente e il numero del caso. A questo punto i vetrini possono essere visionati al microscopio dal citotecnico per la prima valutazione

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

Tabella 2 Protocollo di colorazione Laboratorio di Citopatologia Diagnostica SOD Anatomia Patologica- Ospedali Riuniti di Ancona.

2.6 Test immunoistochimici

La p16INK4A è una proteina inibitrice della chinasi ciclina dipendente 2A (CDKN2A) ed è codificata dal gene CDKN2A situato sul braccio corto cromosoma 9 (9p21.3); si lega specificamente ai complessi della ciclina D – CDK4 / 6 per controllare il ciclo cellulare nell'interfase G1-S, fosforilando la pRB (proteina del retinoblastoma). Nelle cellule normali non displastiche, la proteina p16 è espressa a un livello molto basso ed è praticamente non rilevabile dall'immunoistochimica. Al contrario, in presenza di HR-HPV, notiamo un'interazione della proteina virale E7, espressa nelle cellule epiteliali in replicazione, con il complesso pRb-E2F. Questo comporta la distruzione del complesso, l'inattivazione funzionale del pRb, la liberazione di E2F e l'iperespressione dell'inibitore chinasi p16INK4a nelle cellule cervicali displastiche che può essere facilmente rilevato dall'immunoistochimica. L'iperespressione della p16 permetterà il passaggio della cellula dalla fase G1 alla fase S. [50] Ciò si manifesta come colorazione diffusa citoplasmatica e / o nucleare nelle lesioni squamose e ghiandolari associate a infezione da HR-HPV. [51]

Ki-67 è una proteina nucleare non istonica considerato un marcatore di proliferazione cellulare. È codificato dal gene MKI-67 ed espresso in tutte le fasi del ciclo cellulare, tranne che durante la fase di quiescenza G0. [40] Ki-67 è necessario per la normale distribuzione cellulare degli antigeni dell'eterocromatina e per la sua associazione nucleolare. Durante la mitosi Ki-67 è essenziale per la formazione dello strato pericromosomico, una guaina ribonucleoproteica che va a rivestire i cromosomi condensati. In questa struttura, Ki-67 agisce da tensioattivo biologico per impedire l'aggregazione dei cromosomi mitotici durante la disgregazione dell'involucro nucleare. In quanto marker di proliferazione cellulare, Ki-67 predice il potenziale maligno dei tumori. La rilevazione del Ki-67 è stata ampiamente utilizzata nella diagnosi ausiliaria di precancerosi cervicali e tumori. [41] La co-espressione di p16/Ki-67 è utile per prevedere la trasformazione cellulare da HR-HPV e la presenza di CIN di alto grado. La loro presenza viene rilevata usando anticorpi contro la p16 e il Ki-67. La positività della doppia colorazione p16/Ki-67 è indice di H-SIL o CIN2-3. [40] In condizioni fisiologiche, non noteremo un'espressione di entrambi i marker contemporaneamente. Presso la Citopatologia Diagnostica degli Ospedali Riuniti i casi selezionati vengono sottoposti alla doppia colorazione p16/Ki-67 utilizzando il CINtec PLUS kit. I campioni vengono posti all'interno di vaschette contenenti un tampone per lo smascheramento dell'epitopo, precedentemente diluito 1:10 nel bagnetto di acqua riscaldata a 95-99°C per 10 minuti. È importante monitorare la temperatura e, per evitare l'evaporazione, è necessario coprire la vaschetta con un coperchio. Successivamente i vetrini vengono fatti raffreddare per 20 minuti a temperatura ambiente. A questo punto i vetrini vengono sciacquati prima con acqua distillata e poi con un Wash buffer per 20 minuti. I vetrini vengono inseriti all'interno dell'Autostainer Link 48, dove avverrà il blocco della perossidasi endogena, segue un lavaggio con un tampone, i vetrini, poi, vengono trattati con una soluzione di anticorpi primari, che legheranno la p16 e il Mib-1, per 30 minuti, si esegue un altro risciacquo con un tampone di lavaggio e si fanno reagire i campioni con l'HRP (horseradish peroxidase), successivamente il campione viene fatto reagire con un anticorpo secondario polisaccaridico che presenta tanti siti di legame per la p16. Si esegue un altro risciacquo con un tampone di lavaggio e a

questo punto si utilizza un reagente di visualizzazione AP, un polimero coniugato con la fosfatasi alcalina che lega il Mib-1, si effettua un risciacquo e successivamente un passaggio con DAB per 10 minuti, si effettua un altro lavaggio e un passaggio con substrate batc: Fast Red per 15 minuti, infine i vetrini vengono sciacquati in acqua corrente e poi posti in acqua distillata e si esegue una contro colorazione con ematossilina per 10 secondi, infine si sciacqua in acqua corrente e si montano con un montante acquoso che permette la conservazione del Fast Red. Il Fast Red non viene caricato subito nello strumento, ma viene aggiunto poco prima della fine della metodica, poiché non è stabile. I vetrini, poi, vengono osservati al microscopio per la valutazione della positività per p16 o per il ki-67. (Figura 16)

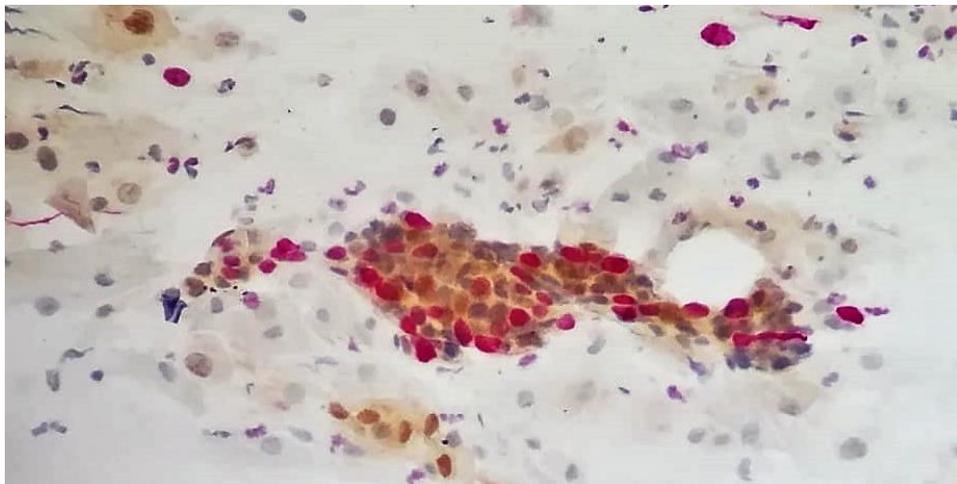


Figura 16: Co-espressione p16 e Ki-67; notiamo il citoplasma marrone (iper-espressione di p16) e nucleo rosso (espressione di Ki67). Questa immagine è stata estratta dall'archivio del Laboratorio di Citopatologia diagnostica di Ancona.

2.7 Sistemi automatizzati per la lettura

Nell'attività di screening l'errore umano può essere la causa principale di falsi negativi. Perciò sono stati introdotti sistemi automatizzati per l'analisi delle immagini assistita dal computer per migliorare la sensibilità del Pap test. L'International Academy of Cytology ha definito i requisiti per i sistemi automatizzati degli screening cervicali: il sistema deve selezionare le cellule o i

vetrini sospetti e presentarle/i al citologo per la classificazione finale; deve essere in grado di valutare l'adeguatezza dello striscio in modo rapido e non deve escludere gli strisci che sono idonei. La sensibilità del sistema automatico, unita al citologo deve eguagliare o superare la sensibilità dello screening manuale. Infatti, i sistemi automatizzati permettono di diagnosticare con accuratezza la maggioranza dei casi. Le strumentazioni automatiche hanno alcune limitazioni che risiedono nella necessità di assistenza costante, pulizia delle lenti e aggiornamenti continui del software. La colorazione deve essere ottimizzata per lo strumento e la lettura può essere dipendente dalla pulizia dei preparati e dal montaggio ottimale dei vetrini. Essendo delle strumentazioni complesse devono essere gestite da personale specializzato. Si deve tener conto infine del costo aggiuntivo che l'utilizzo delle macchine automatizzate comporta. I due approcci, quello manuale e quello automatizzato, si equivalgono per quanto riguarda l'accuratezza ma differiscono in ambito economico.

L'approccio tradizionale ha un costo umano elevato (*labour intensive*), mentre quello computer-assistito ha un costo elevato in termini di strumentazione (*technology intensive*). [93] Tra la fine degli anni '80 e l'inizio degli anni '90 FDA ha approvato due sistemi automatizzati che utilizzano reti neurali: PapNet e AutoPap [89] Il sistema di selezione cellulare PapNet è composto da due fasi: un classificatore algoritmico, seguito da una rete neurale addestrata che consente una grande flessibilità e precisione nel riconoscimento di immagini cellulari anormali, comparandole con una serie di immagini conosciute, contenute in un archivio. Contrariamente ad altri tentativi di automazione citologica, questa macchina non tenta di diagnosticare anomalie cellulari; è interattiva, lasciando la valutazione delle cellule su uno schermo video ad alta risoluzione ad osservatori umani addestrati. I vetrini che contengono cellule anormali o sono inadeguati vengono inviati per una seconda revisione microscopica. Inizialmente è stato approvato come controllo di qualità o come screening supplementare degli strisci cervicali. Successivamente è stato approvato per lo screening primario. [90] AutoPap (attualmente FocalPoint) è stato anch'esso progettato per effettuare un esame di screening dei vetrini. Il sistema classifica gli strisci come: no need for review (da non rivedere ulteriormente); to be reviewed (da rivedere); process

review (lo striscio deve essere rivisto manualmente a causa di problemi tecnici). Questo sistema utilizza un microscopio ad alta velocità e un software in grado di immagazzinare, interpretare e classificare le immagini dello striscio in base a parametri predeterminati (densità ottica, rapporto nucleo/citoplasma ecc.). Inoltre fornisce delle PapMaps. Si tratta di stampe su carta delle dimensioni di un vetrino coprioggetto che mostrano 15 aree indicanti le zone dello striscio in cui il materiale cellulare era stato classificato come anormale. Una limitazione all'uso dell'AutoPap è legato al fatto che l'analisi del preparato scannerizzato viene fatta in modalità semiautomatica su uno pseudo vetrino. Lo strumento individua i punti di interesse che devono, però, essere trasferiti manualmente sul preparato per essere poi analizzati con un microscopio ottico tradizionale. [91]

2.8 Accuratezza dei test tradizionali

L'accuratezza di uno screening è l'insieme combinato di sensibilità, specificità, valore predittivo positivo (PPV) e valore predittivo negativo (NPV). Nonostante i miglioramenti nell'assistenza sanitaria delle donne derivanti dallo screening del cancro cervicale, rimane una popolazione di donne in cui la malattia si sviluppa a causa di falsi negativi. Un falso negativo al Pap-test è definito come l'incapacità di dimostrare l'anomalia dall'esame di Papanicolaou in una donna affetta da malattia. La citologia ha una specificità molto elevata (~98%), mentre la sua sensibilità per l'individuazione della neoplasia intraepiteliale cervicale è solo leggermente superiore al 50%. Questa cifra implica che circa la metà dei vetrini di donne con lesioni cervicali sarà erroneamente classificata come negativa. [47] La corretta identificazione delle lesioni precancerose cervicali si basa su diversi fattori, tra cui la raccolta del campione, la preparazione e l'esame delle cellule esfoliate dalla cervice uterina. Secondo diversi studi sull'accuratezza del Pap-test, l'errore di campionamento comporta un maggior numero di falsi negativi. Oltre al rischio di diagnosi false negative, le diagnosi false positive possono creare confusione nel triage dei pazienti. Inoltre l'accuratezza diagnostica può essere influenzata da fattori variabili, inclusi il tempo di studio, l'area geografica e la popolazione. [94]

Secondo uno studio il ThinPrep permette una maggiore rilevazione delle neoplasie cervicali quali, lesioni intraepiteliali squamose di basso e alto grado e un miglioramento dell'adeguatezza del campione. [32] Questa metodica su strato sottile consente ulteriori test, come la tipizzazione del papillomavirus umano e l'imaging computerizzato, per fornire una diagnosi più completa rispetto al Pap-test tradizionale. [30] È stata inoltre condotta un'analisi retrospettiva di tutti i pazienti sottoposti a Pap test convenzionali e ThinPrep per un periodo di 1 anno. È emerso che il ThinPrep potrebbe non essere efficace nel rilevare il carcinoma invasivo, rispetto al Pap test convenzionale. [31] Un altro studio afferma che il Thin prep è più sensibile e specifico rispetto al Pap-test. La sensibilità aggiunta determina una maggiore rilevazione di pazienti con L-SIL e H-SIL. Inoltre si è visto che è una tecnica altamente riproducibile, cattura la maggior parte dei campioni raccolti e fornisce un sottocampione rappresentativo su ogni vetrino preparato. Inoltre un'ampia applicazione della tecnologia ThinPrep potrebbe portare a diagnosticare ulteriori 162.000 pazienti con H-SIL e 3000 pazienti con carcinoma cervicale invasivo che altrimenti non sarebbero diagnosticati con lo striscio convenzionale in quanto considerati falsi negativi. [33] Secondo uno studio le anomalie cervicali, comprese le neoplasie maligne, sono associate a campioni citologici inadeguati e potrebbero dare luogo ad un rapporto falso negativo. Per campioni inadeguati si intendono campioni con un eccesso di sangue, infiammazione o aree spesse che compromettono parzialmente o totalmente l'interpretazione. [72] Se messi a confronto notiamo che LBC non è più sensibile del Pap-test per il rilevamento di HSIL e CIN2 + indipendentemente dall'età. Inoltre LBC ha diminuito il tasso di strisci inadeguati, ma ha aumentato il tasso di CIN 2 + indipendentemente dall'età, ha aumentato il rilevamento di SIL, di H-SIL e CIN 3 + solo nelle donne al di sotto dei 40 anni e ha ridotto il tasso di strisci anomali nelle donne con più di 40 anni. [71]

3 TECNICHE MOLECOLARI

Il test HPV analizza una piccola quantità di cellule prelevate dal collo dell'utero per verificare la presenza dei diversi tipi di HPV responsabili del cancro della cervice uterina. Inoltre può essere utilizzato per il triage delle anomalie citologiche di basso grado sulla base del rischio associato al tipo di HPV, per la valutazione dell'infezione persistente da HR-HPV e follow-up dopo il trattamento della neoplasia intraepiteliale di alto grado. [34] Il prelievo è lo stesso del Pap-test, semplice, non doloroso e rapido; si applica lo speculum che dilata il canale vaginale e permette la visualizzazione della cervice. A questo punto si inserisce una spatola in plastica per il prelievo esocervicale, oppure un unico dispositivo che consente il doppio campionamento di esocervice ed endocervice. I campioni vanno poi immersi immediatamente nel liquido di conservazione contenuto negli appositi contenitori. Questo tipo di test viene effettuato, su chiamata, ogni 5 anni. La presenza dell'HPV viene determinata attraverso quattro saggi basati sulla ricerca del DNA e uno basato sulla ricerca dell'RNA.

- HC2
- Cervista HR HPV test
- Cobas HPV test
- Aptima HPV Assay

L'HC2 è un test di ibridazione dell'acido nucleico su micropiastra con amplificazione del segnale, basato sulla chemiluminescenza, per la rilevazione qualitativa di 13 tipi di DNA di HPV ad alto rischio.[1] I campioni contenenti il

DNA bersaglio si ibridano con una specifica sonda a RNA. Gli ibridi RNA/DNA vengono catturati sulla superficie di una

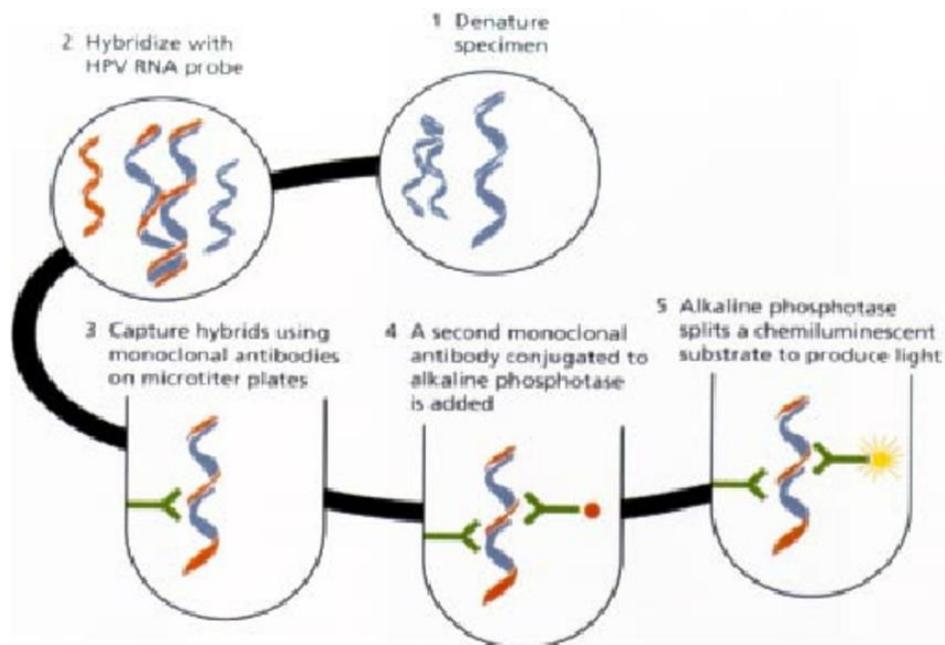


Figura 17: Estratta da: “Molecular Diagnosis of Human Papillomavirus; I. Dutra, I. Foroni. 2012”
Schema del processo di ibridazione HC2

micropiastra rivestita con anticorpi specifici per tali ibridi. Gli ibridi immobilizzati vengono quindi fatti reagire con anticorpi coniugati con fosfatasi alcalina e poi sottoposti a rilevazione tramite un substrato chemiluminescente. Più anticorpi coniugati si legano a ogni ibrido catturato, dando luogo a un’amplificazione del segnale. Poiché il segnale viene scisso dalla fosfatasi alcalina legata, si verifica l’emissione di luce, misurata dal luminometro e quantificata in RLU (unità di luce relative). L’intensità della luce emessa indica la presenza o l’assenza di DNA bersaglio nel campione. (Figura 6) Una misurazione di RLU uguale o superiore al valore cut-off indica la presenza di sequenze di DNA dell’HPV nel campione, al contrario, un valore inferiore al cut-off indica l’assenza delle sequenze di DNA dell’HPV o inferiori al limite di rivelazione del test.

Il test Cervista HPV oltre ai 13 tipi di HPV rilevati all'HC2HR rileva anche l'HPV-66. Questo test utilizza tre miscele separate di oligonucleotidi che contengono le sonde per i 14 tipi di HR HPV. Il risultato negativo è costituito da un segnale fluorescente che si colloca sotto al cut-off ricavato empiricamente; il risultato positivo è indicato da un segnale fluorescente collocato sopra al cut-off. [23]

Il Cobas HPV test è una real time PCR multiplex che usa primer e sonde fluorescenti per rilevare il DNA di 14 tipi di HPV ad alto rischio (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68) e la beta-globina umana, che funge da misura della cellularità umana nel campione. In particolare, il test impiega primer che amplificano una regione di circa 200 paia di basi all'interno della regione polimorfica L1 del genoma dell'HPV. Il segnale fluorescente da dodici tipi di HR HPV (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68) viene rilevato utilizzando la stessa etichetta fluorescente, mentre l'HPV-16, HPV-18 e la beta-globina vengono rilevati con tre etichette fluorescenti uniche separate. Questo permette di ottenere, simultaneamente, la genotipizzazione dell'HPV-16 e HPV-18 separatamente dagli altri HR HPV. [24]

Il saggio Aptima è anch'esso un test di amplificazione che usa sonde di acidi nucleici che permettono l'individuazione, in vitro, dell'RNA messaggero (mRNA) E6/E7 da 14 tipi di HR HPV. Il test si basa sulla cattura del target a seguito della lisi cellulare, segue un'amplificazione basata sulla trascrizione; infine l'amplicone neoformato viene rilevato tramite sonde di acido nucleico a singolo filamento marcate. [25]

3.1 NGS

La tecnologia emergente alternativa per il rilevamento dell'HPV è l'NGS un metodo promettente per la caratterizzazione dei genotipi dell'HPV, che fornisce una comprensione più profonda dei meccanismi di cancerogenicità. Questa tecnica non si basa sul metodo Sanger, ma sull'uso di coppie di primer, durante l'amplificazione contrassegnati con sequenze iniziali di nucleotidi specifici per ogni singolo campione, che sono chiamati: "barcode primer". Questi ultimi incorporano sequenze uniche di 8-12 bp nell'amplicone target dopo il primo ciclo di PCR; in modo tale che ogni campione diventa unicamente codificato dalla coppia di primer. I campioni, dopo la PCR, vengono raggruppati in una singola provetta. È inoltre possibile utilizzare più primer nella stessa reazione PCR, con più sequenze di DNA bersaglio. Il risultato è un massiccio sequenziamento parallelo e frammenti di DNA, tutti aventi in comune la sequenza iniziale specifica per ogni campione. Un singolo sequenziatore può generare la lettura NGS di milioni di sequenze di DNA in 24 ore, più di centinaia di sequenziatori di tipo Sanger nello stesso momento. [37]

3.2 Accuratezza test molecolari

In qualsiasi contesto avvenga, l'uso del test HR-HPV non può prescindere da una valutazione sulle caratteristiche che deve avere il test. I test molecolari applicabili in un contesto di screening devono essere standardizzati, validati ed avere una sensibilità e una specificità clinica ottimali per lesioni di alto grado. Il test HR-HPV, nello screening, non deve avere un'elevata sensibilità analitica; cioè la capacità di individuare poche copie virali, ma deve evidenziare le infezioni da HR-HPV clinicamente rilevanti e il gruppo di HPV ad alto rischio. [22] Il test HR-HPV ha la caratteristica di avere un elevato valore predittivo negativo ciò permette una migliore gestione delle donne negative all'HPV che difficilmente, nei prossimi 5-10 anni, svilupperanno il cancro cervicale. Inoltre indica un basso rischio di sviluppare una neoplasia cervicale intraepiteliale di grado 3 (CIN3+). [35]

Il saggio Aptima, il test dell'mRNA E6 / E7, basato su RT-PCR non solo fornisce la quantificazione della carica virale, ma indica anche la sua attività trascrizionale, il che significa che il test dell'mRNA E6 / E7 ha un valore prognostico. L'elevata precisione e specificità lo hanno reso ottimale per la diagnosi precoce del cancro cervicale. [36] L'HC2 test ha una sensibilità analitica simile a quella di molti metodi di PCR per la rivelazione dell'HPV DNA. [3] Il test HC2 presenta inoltre un certo grado di inaccuratezza analitica legata alla cross reattività del cocktail di sonde con altri tipi di HPV rispetto ai 13 tipi hr-HPV target. Infatti, uno studio americano (ATLAS) ha messo in evidenza che il 7,8% dei test hr-HC2 positivo erano falsi positivi dovuti alla cross reattività di HPV con tipi di HPV non carcinogeni, come HPV-53 e HPV-66. Una criticità del test HC2 è rappresentata dalla mancanza di un controllo interno per la valutazione dell'adeguatezza del campione o di eventuali sostanze che possono interferire con il processo di ibridazione. [38] Secondo uno studio che ha messo a confronto il test Aptima e il Cobas 4800 è emerso che entrambi i test hanno mostrato una sensibilità equivalente per il rilevamento di CIN2+. Inoltre l'Aptima ha una maggiore specificità per la determinazione della categoria ASCUS. [39] L'NGS è un metodo ad alto rendimento, in grado di sequenziare singole molecole con piccole quantità di DNA. Inoltre è un metodo altamente accurato, riproducibile e ha un'elevata sensibilità nel rilevare e tipizzare infezioni multiple da HPV. Tuttavia, la disponibilità e il costo di NGS possono ancora rappresentare degli ostacoli per il suo ampio utilizzo nella pratica clinica e negli studi scientifici. [37] I marcatori molecolari p16 e Ki67 hanno una sensibilità per il rilevamento di CIN2+ e CIN3+ del 91,9% e 96,4%, mentre la specificità è dell'82,1% e 76,9%; [43] maggiore rispetto ai test HC2 per HSIL. [42]

4 ALGORITMI PER I PROGRAMMI DI SCREENING IN BASE ALLE LINEE GUIDA NAZIONALI ED INTERNAZIONALI

Ci sono vari fattori che influenzano l'attuazione di un programma di screening: l'importo dei fondi sanitari disponibili in ogni regione o paese, le infrastrutture mediche ed economiche preesistenti, l'età, l'istruzione e la percezione del rischio. I diversi paesi dell'UE affrontano in modo differente la questione dello screening del cancro della cervice uterina; l'indagine più recente sullo stato di implementazione dello screening del cancro cervicale nell'UE ha mostrato che, sebbene nell'ultimo decennio sia stato documentato un sostanziale miglioramento nell'implementazione dello screening e che un totale di 22 Stati membri stessero implementando o pianificando il programma di screening del cancro nel 2016, l'avvio dei programmi di screening è stato completato solo in nove dei 28 Stati membri: Danimarca, Estonia, Finlandia, Lettonia, Polonia, Slovenia, Svezia, Paesi Bassi e Regno Unito. [53] Un programma di screening ha come scopo di identificare lesioni pre-neoplastiche o neoplasie in fase precoce, in modo da prevenire lo sviluppo del tumore e migliorare la prognosi e quello di aumentare l'assorbimento dello screening cervicale. Il programma di screening, in Italia è rivolto a tutte le donne di età compresa tra i 25-64 anni su chiamata ogni tre anni. Recentemente è stato dimostrato che sopra i 30 anni è più costo-efficace l'HPV-DNA test effettuato ogni 5 anni. Infatti il SSN, attraverso le regioni, sta cercando di modificare il programma di screening, questa modifica dovrebbe concludersi a fine 2020. Molte regioni hanno già adottato questo nuovo metodo di screening.

4.1 Vecchio algoritmo

Il Pap-test è un test di screening di primo livello utilizzato in tutto il mondo per rilevare cambiamenti precancerosi all'interno della cervice prima che progrediscono verso il carcinoma invasivo. Si è visto che circa il 30% delle lesioni classificate come CIN 3 impiega 30 anni prima di progredire verso lesioni più gravi. [56] In Italia, secondo l'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità), lo screening deve essere rivolto alle donne tra i 25-64 anni e effettuato ogni tre anni. Anche se si è notato che c'è una riduzione del rischio di cancro cervicale se lo screening citologico viene protratto fino all'età di 75 anni. [57]

Se l'esito del Pap-test è negativo, verrà ripetuto dopo tre anni, se positivo, come esame di secondo livello, viene eseguita una colposcopia, se l'esito di quest'ultima, è positivo si eseguiranno dei trattamenti terapeutici e follow-up. (Figura 18)



Figura 18: Rappresentazione schematica del vecchio algoritmo. Estratta dalla sezione “Screening oncologici dal sito della Regione Marche”

L’HPV test è stato originariamente utilizzato come test di riflesso, per aiutare il triage degli strisci atipici, se inviarli a colposcopia o follow-up. Secondo uno studio condotto nel 2016 la ricerca del DNA dell’HPV è un test efficace per classificare e gestire le diagnosi citologiche incerte. [54]

4.1.1 Gestione della paziente con diagnosi di ASC-US

Le pazienti con diagnosi di ASC-US (Figura 20) hanno una previsione di circa il 5-17% di avere una diagnosi istologica di CIN 2 CIN 3. La raccomandazione per le pazienti con diagnosi di ASC-US è l'invio all'esame colposcopico. Se l'esame colposcopico conduce ad una biopsia positiva con diagnosi di CIN 1, si possono prevedere due percorsi. Il primo è quello di rivedere la paziente dopo sei mesi o, in alternativa, è possibile fare un trattamento, nel caso di GSC visibile. Se la GSC non è visibile o si rinvia ad un controllo a sei mesi e se fosse ancora positiva si consiglia un trattamento escissionale. In questo caso si raccomanda che il procedimento escissionale sia il più possibile conservativo. Se la diagnosi istologica fosse di CIN 2/3 si deve procedere ad un trattamento. Al contrario se al primo controllo l'esame colposcopico fosse negativo, si raccomanda un attento studio del canale cervicale e della vagina. Se la negatività è confermata si rimanda ad un controllo colposcopico e citologico a sei mesi e se fosse ancora negativo la paziente si rinvia a screening. Per le pazienti che dopo un primo controllo colposcopico negativo, risultassero, dopo sei mesi, ancora positive all'esame citologico, in assenza di lesioni vaginali, si consiglia un trattamento escissionale diagnostico. È inoltre valida l'opzione, per il solo ASC-US, dell'invio immediato alla esecuzione del test per l'HPV, con esecuzione dell'esame colposcopico nel solo gruppo di pazienti risultate positive per HPV ad alto rischio. Le pazienti negative all'HPV-test possono essere inviate a controllo citologico dopo 12 mesi; se risultano negative, ritornano a screening. [58] (Figura 19)

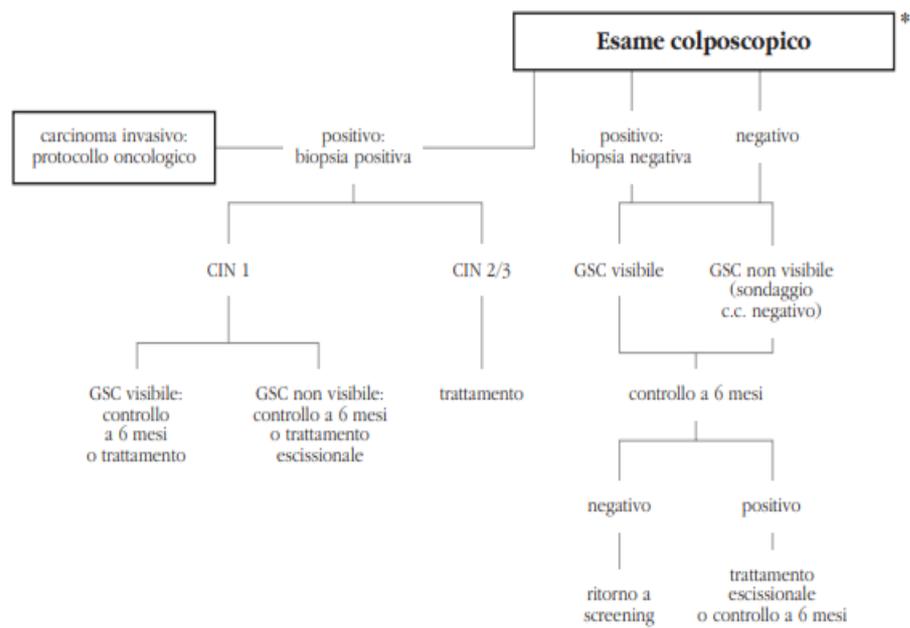


Figura 19: Schema per la gestione delle pazienti con diagnosi di ASC-US. Estratta da “Gestione della paziente con pap test anormale” Linee Guida Edizione 2006 a cura della Società italiana di Colposcopia e Patologia Cervico Vaginale

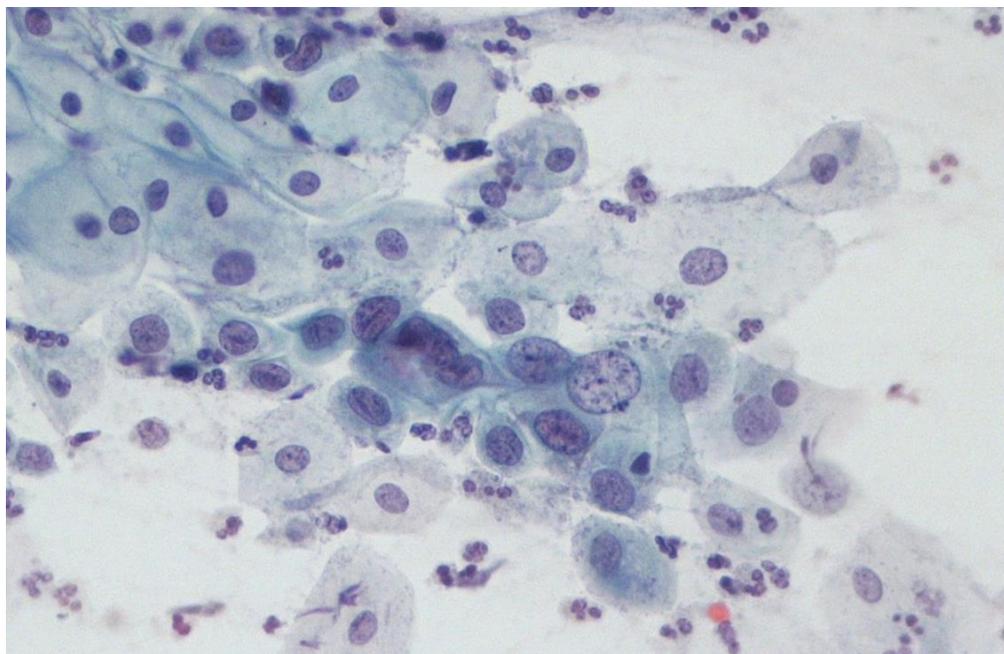


Figura 20: Classificazione Bethesda: ASC-US 40x. Nell'immagine notiamo le caratteristiche tipiche di un ASC-US: lieve incremento del rapporto nucleo/citoplasma, minima ipercromia nucleare, bordo nucleare più marcato e irregolarità della cromatina. Questa immagine è stata estratta dall'archivio del Laboratorio di Citopatologia diagnostica di Ancona.

4.1.2 Gestione delle pazienti con diagnosi citologica: L-SIL e ASC-H

Le pazienti con ASC-H (Figura 22) possono giungere ad una diagnosi istologica di CIN 2 CIN 3 nel 24-94% dei casi. La diagnosi citologica di L-SIL è correlata, secondo i dati della letteratura, con circa il 15-30% di diagnosi istologica finale di CIN 2-CIN 3 54. Con questa diagnosi al Pap test, la paziente deve essere inviata ad esame colposcopico. Se la diagnosi definitiva istologica è di carcinoma invasivo si deve procedere secondo il protocollo oncologico inerente allo stadio di quella neoplasia. Nel caso di diagnosi istologica fosse quella di CIN 2/3 occorre eseguire il trattamento. In caso di CIN 1 alla biopsia, si può rimandare ad un controllo a sei mesi oppure, si può considerare l'ipotesi del trattamento. Anche per L-SIL (Figura 23) e ASC-H se, dopo il primo controllo colposcopico, non si evidenziasse alcuna lesione, si rimanda ad un controllo colposcopico e citologico a sei mesi e poi, se si conferma la negatività, la paziente ritorna a screening. Al contrario se al secondo controllo fosse positivo l'esame citologico, si procede ad un trattamento escissionale diagnostico o un controllo a 6 mesi. [59] (Figura 21)

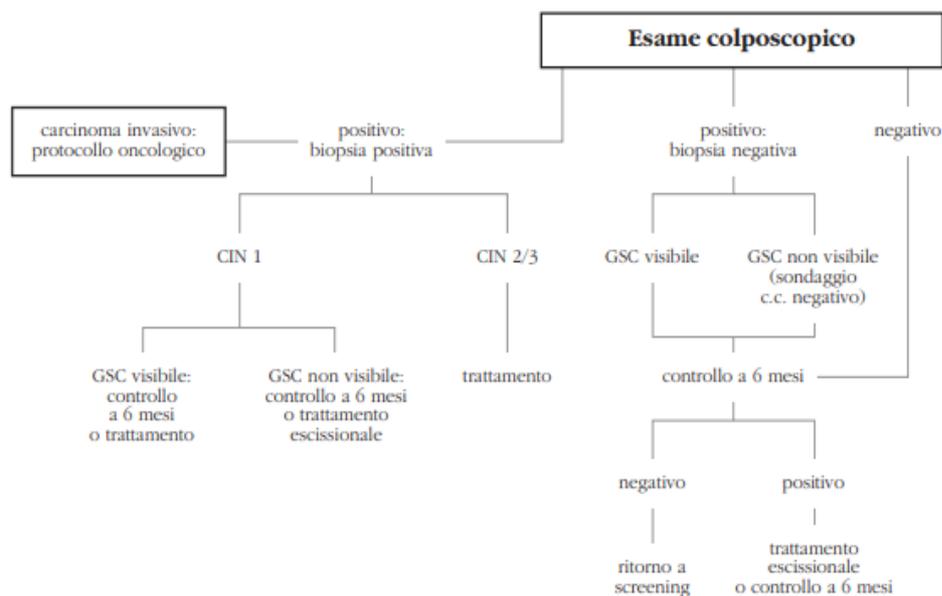


Figura 21: Schema per la gestione delle pazienti con ASC-H. Estratta da "Gestione della paziente con pap test anormale" Linee Guida Edizione 2006 a cura della Società italiana di Colposcopia e Patologia Cervico Vaginale.

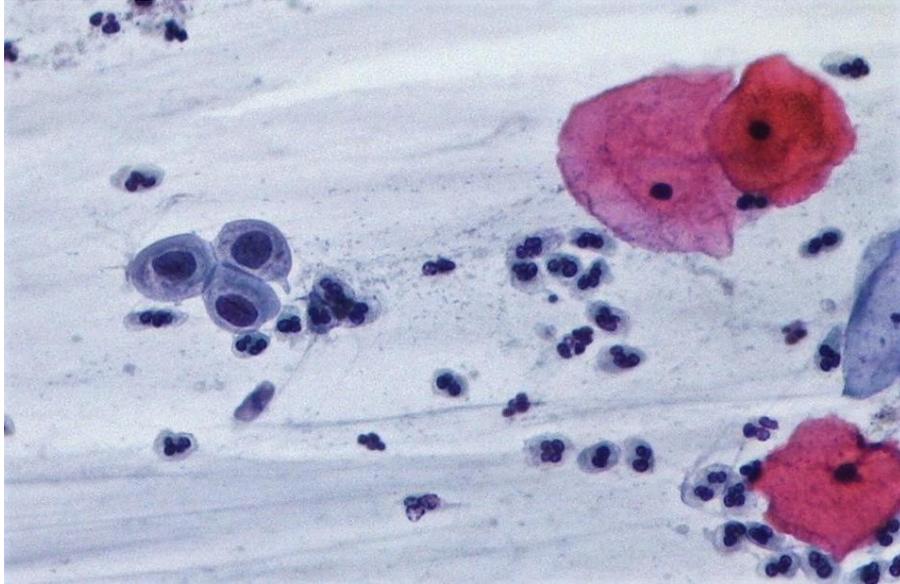


Figura 22: Classificazione Bethesda: ASC-H 40x. In questa immagine notiamo cellule con un alto rapporto nucleo/citoplasma, elevata ipercromasia ed irregolarità nucleare. Questa immagine è stata estratta dall'archivio del Laboratorio di Citopatologia diagnostica dell'Ospedale di Ancona.

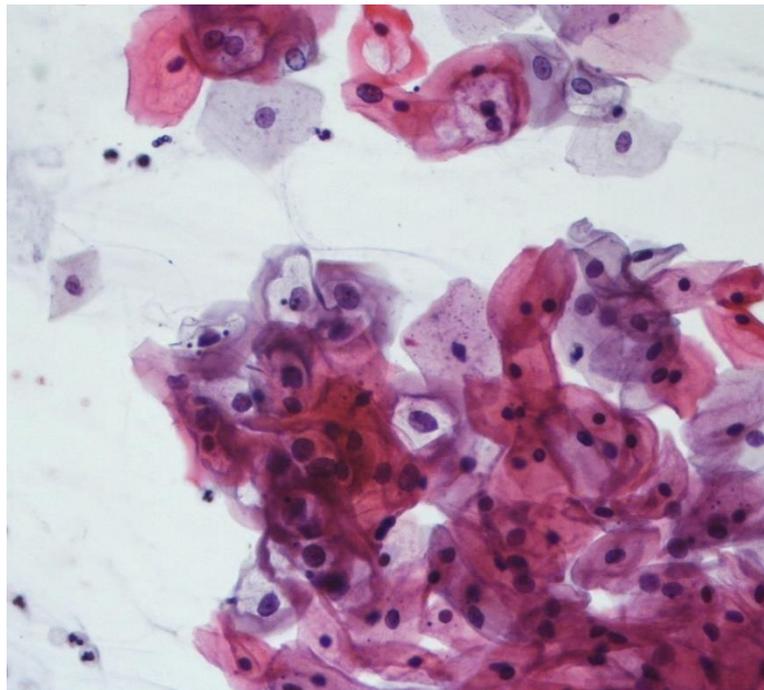


Figura 23: Classificazione Bethesda L-SIL 40x. Cellule singole o a grappoli di dimensioni intermedie o grandi, l'atipia nucleare è dovuta a contorni irregolari, ipercromasia e cromatina granulare. In questa immagine notiamo dei coilociti; le caratteristiche principali sono binucleazione, alone perinucleare con bordi netti e ben definiti. Inoltre è possibile osservare un aumento della cheratinizzazione con citoplasma denso ed orangiofilo. Questa immagine è stata estratta dall'archivio del Laboratorio di Citopatologia diagnostica dell'Ospedale Torrette di Ancona.

4.1.3 Gestione delle pazienti con diagnosi citologica: H-SIL o carcinoma squamocellulare

Sicuramente la paziente con H-SIL (Figura 25), o positività citologica per sospetto carcinoma, (Figura 26) deve essere inviata ad esame colposcopico. Se la diagnosi istologica conferma un carcinoma la gestione dovrà seguire il protocollo oncologico in base allo stadio. Invece, se la diagnosi istologica è CIN 2 o CIN 3 si procede al trattamento. In caso di CIN 1 all'istologia, si può rinviare la paziente ad un secondo controllo dopo tre mesi, ma solo se la GSC è visibile. Se, al contrario, non è visibile, si raccomanda un trattamento escissionale. Infine se al primo controllo colposcopico non si identifica nessuna lesione si rimanda ad un secondo controllo colposcopico e citologico a tre mesi, raccomandando un accurato studio del canale cervicale. Con GSC non visibile, colposcopia negativa, ma Pap test ancora positivo, viene raccomandato un trattamento escissionale diagnostico. [60] (Figura 24)

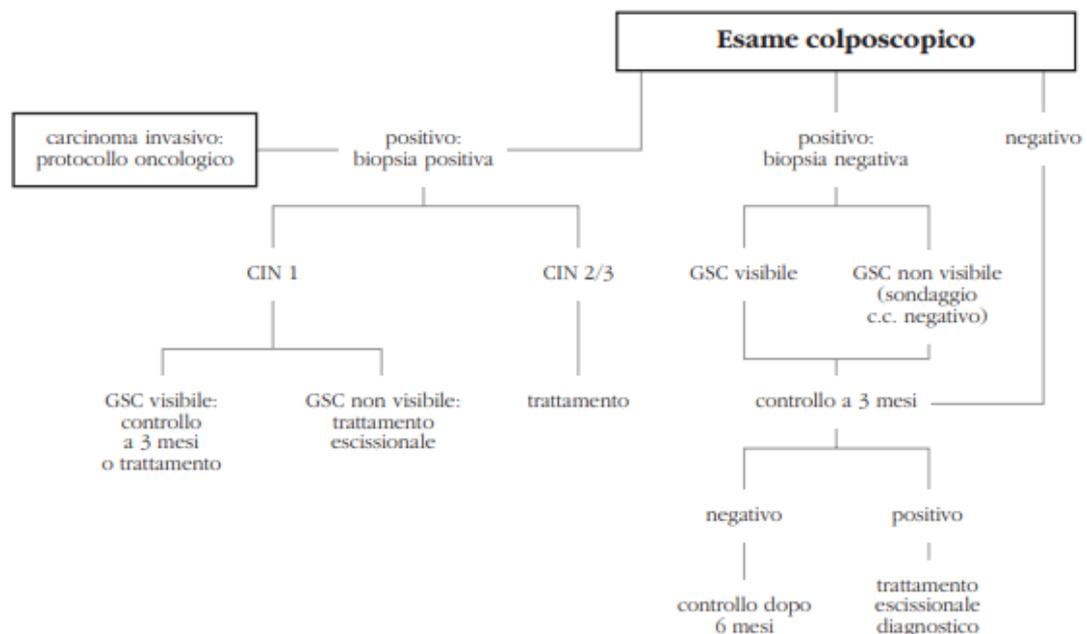


Figura 24: Schema per la gestione delle pazienti con H-SIL o carcinoma squamocellulare Estratta da "Gestione della paziente con pap-test anormale" Linee Guida Edizione 2006 a cura della Società italiana di Colposcopia e Patologia Cervico Vaginale.

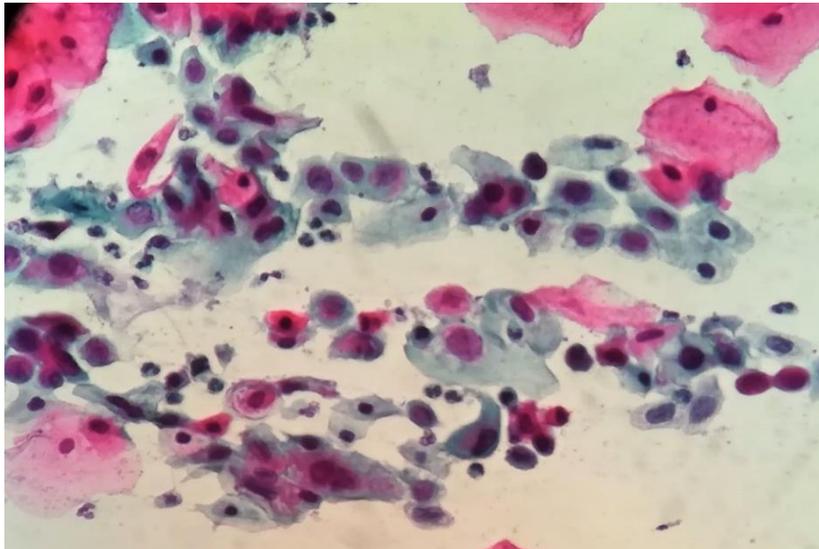


Figura 25: Classificazione Bethesda: H-SIL. Caratteristiche sono le cellule a girino cheratinizzate, nucleo ingrandito e ipercromico, cromatina addensata e distribuita in maniera irregolare le membrane nucleari possono essere irregolari (carta increspata) ed ispessite, inoltre il rapporto nucleo/citoplasma è variabile. Questa immagine è stata estratta dall'archivio del Laboratorio di Citopatologia diagnostica dell'Ospedale di Ancona.

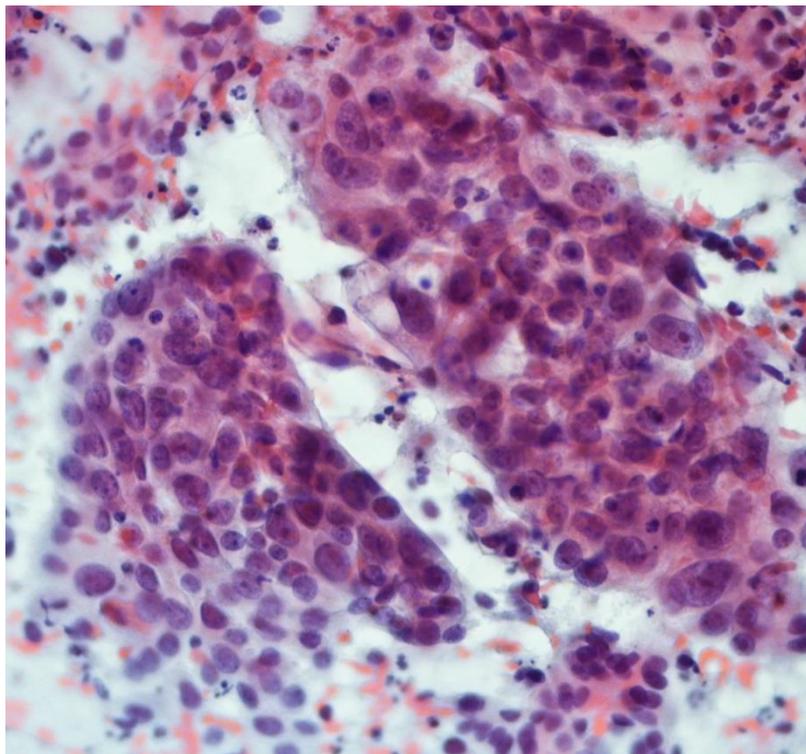


Figura 26: Classificazione Bethesda: Carcinoma squamocellulare 40x: I nuclei sono ipercromici con cromatina addensata, nucleoli prominenti, bordi nucleari ispessiti, N/C elevato, evidente polimorfismo nucleare. Citoplasma orangiofilo. Questa immagine è stata estratta dall'archivio del Laboratorio di Citopatologia diagnostica dell'Ospedale Torrette di Ancona.

4.1.4 Gestione delle pazienti con diagnosi citologica di: AGC-AIS o adenocarcinoma

Le pazienti con AGC (Figura 28) presentano un rischio di diagnosi di CIN dal 9 al 54%; di un AIS (Figura 29) dallo 0 all'8% e di carcinoma invasivo dall'1 al 9%. Per la paziente con questa diagnosi citologica positiva si raccomanda l'esame colposcopico e è raccomandato il campionamento endometriale insieme alla colposcopia e al campionamento endocervicale nelle donne dai 35 anni in su e è raccomandato anche per le donne di età inferiore ai 35 anni con indicazioni cliniche che suggeriscono il rischio di lesioni neoplastiche endometriali. [61] Se dopo il primo esame colposcopico non si evidenziano lesioni, si rimanda ad un secondo controllo, colposcopico e citologico, a 6 mesi e, infine, se anche il terzo controllo fosse negativo, si rimanda la paziente a screening. Se ad un controllo colposcopico negativo, l'esame citologico endocervicale si conferma positivo, si raccomanda un trattamento escissionale diagnostico. Se all'esame istologico risulta una diagnosi di carcinoma squamoso o adenocarcinoma, si procede secondo i protocolli oncologici. Se la diagnosi istologica è di CIN 2/CIN 3 o AIS si procede con un trattamento escissionale. Se la diagnosi istologica è di CIN 1, con GSC non visibile, si procede con un trattamento escissionale; se la GSC è visibile e ancora positivi all'esame citologico e/o istologico, si consiglia un trattamento escissionale. (Figura 27)

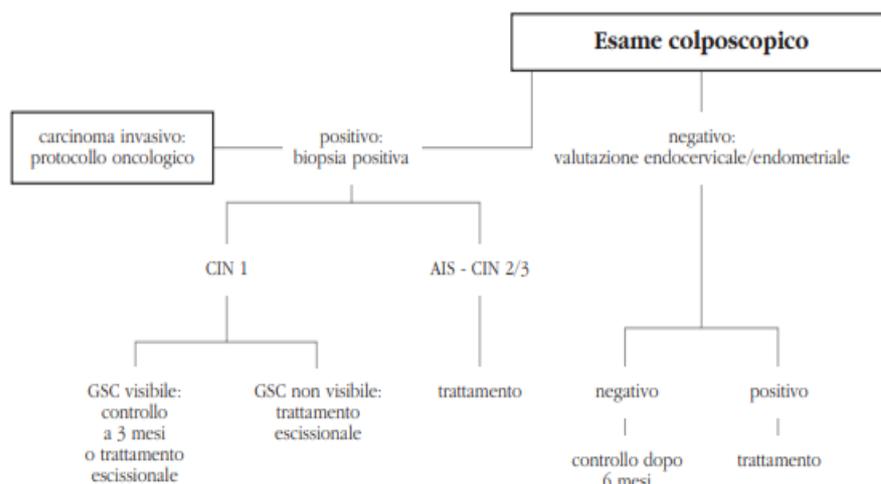


Figura 27: Schema per la gestione delle pazienti con diagnosi di AGC-AIS o adenocarcinoma. Estratta da "Gestione della paziente con pap test anormale" Linee Guida Edizione 2006 a cura della Società italiana di Colposcopia e Patologia Cervico Vaginale.

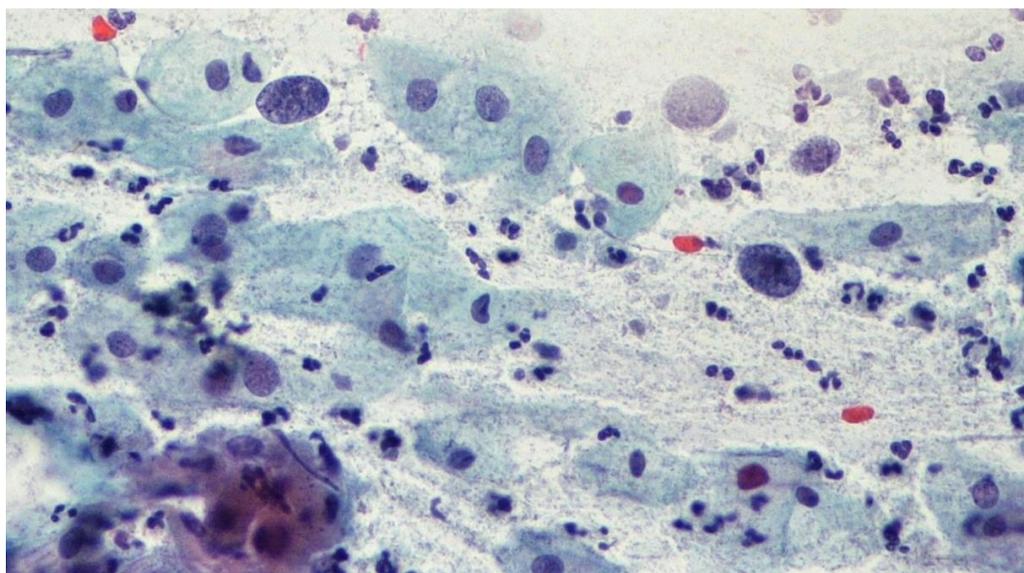


Figura 28: Classificazione Bethesda AGC 40x: Pochi elementi con N/C elevato, con una leggera ipercromasia, cromatina irregolare, nucleoli non sempre presenti, bordo citoplasmatico non ben visibile. Questa immagine è stata estratta dall'archivio del Laboratorio di Citopatologia diagnostica dell'Ospedale di Ancona.

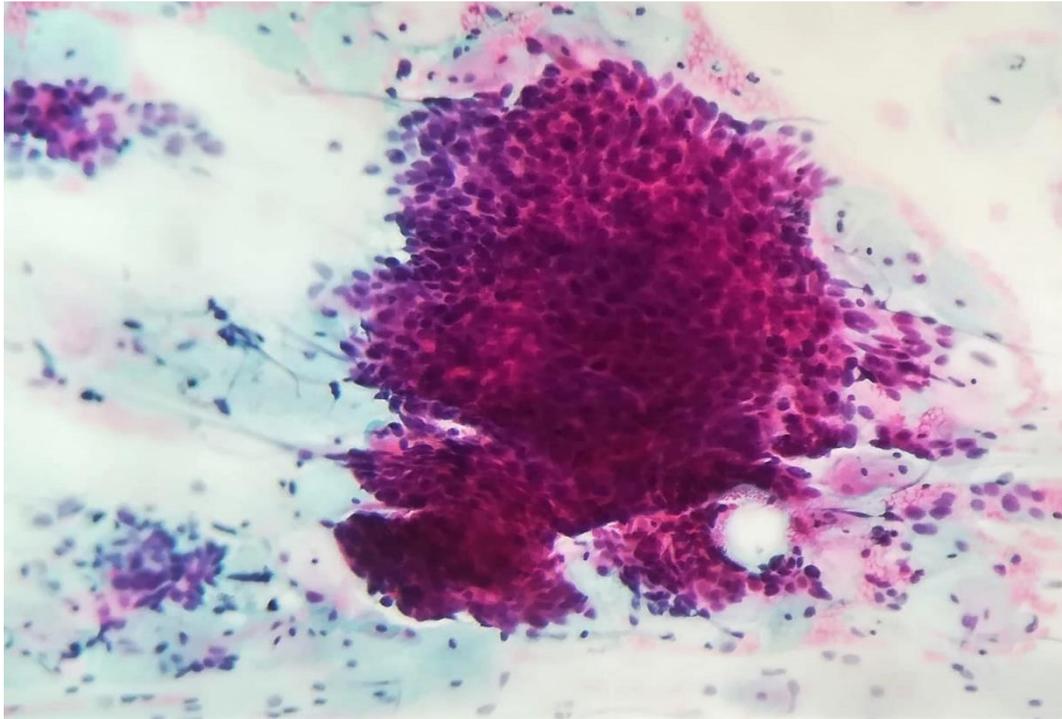


Figura 29: Classificazione Bethesda AIS: Ammassi di cellule in gruppi papillari (rosette) o in lembi sovrapposti, fenomeno del "feathering" ovvero nuclei allungati che protendono verso l'esterno. Questa immagine è stata estratta dall'archivio del Laboratorio di Citopatologia diagnostica dell'Ospedale Torrette di Ancona.

4.2 Nuovo Algoritmo

La consapevolezza che l'HPV è una causa necessaria del cancro cervicale ha portato a importanti progressi nella prevenzione secondaria. È stata introdotta la rilevazione del DNA dell'HPV e il co-test HPV-citologia. Alcuni studi clinici hanno definito che lo screening HPV DNA è più sensibile e efficace rispetto allo screening citologico poiché rileva precocemente le lesioni persistenti di alto grado e fornisce un periodo più lungo a basso rischio, inoltre fornisce informazioni diagnostiche e prognostiche per la valutazione clinica delle donne a rischio. Tuttavia, nelle donne più giovani, lo screening HPV porta a una diagnosi eccessiva di CIN2 regressivo. [64]

Un'analisi aggregata dei dati di follow-up a lungo termine ha mostrato una ridotta mortalità per cancro cervicale nelle donne sottoposte a screening con HPV rispetto alla citologia. Di conseguenza, molti sistemi sanitari stanno attualmente passando a programmi di screening basati sull'HPV. [52] L'American Cancer Society nel 2020 ha emanato delle linee guida per permettere l'individuazione precoce del cancro cervicale. Secondo queste linee guida il test di screening dovrebbe iniziare all'età di 25 anni e le donne tra i 25 e 65 anni devono essere sottoposte a un test HPV primario ogni cinque anni; se questo non fosse possibile si può eseguire con co-test (combinazione tra HPV test e Pap-test) ogni cinque anni, oppure un Pap-test ogni tre anni. L'ACS raccomanda che le persone di età > 65 anni che non hanno avuto una storia di neoplasia intraepiteliale cervicale di grado 2 o malattia più grave negli ultimi 25 anni e che hanno documentato uno screening negativo nei 10 anni precedenti, possono interrompere lo screening. Le persone che hanno subito un'isterectomia totale devono interrompere lo screening a meno che l'isterectomia non è sia

POPOLAZIONE RACCOMANDAZIONI PER LO SCREENING DEL CANCRO CERVICALE

ACS 2020 ^a

ACS 2012 ^b

Età <25 anni	Nessuno screening	Solo citologia ogni 3 anni a partire dai 21 anni
25-65 anni	A partire dall'età di 25 anni, solo test HPV primario ogni 5 anni (preferito)	Solo citologia ogni 3 anni fino all'età di 29 anni
	<i>Utilizzare un test HPV approvato dalla FDA per lo screening primario</i>	Di età compresa tra 30 e 65 anni, passare al cotesting (preferito), solo citologia ogni 3 anni (accettabile) ^a
	Il cotesting ogni 5 anni o il solo citologia ogni 3 anni sono opzioni accettabili ^b	<i>Lo screening mediante il solo test HPV primario non è raccomandato per la maggior parte delle impostazioni cliniche</i>
	<i>Il cotesting o il solo test citologico sono accettabili laddove l'accesso al test HPV primario è limitato o non disponibile; poiché gli Stati Uniti effettuano la transizione al test HPV primario, l'uso del cotesting o della sola citologia per lo screening del cancro cervicale non sarà incluso nelle linee guida future ^b</i>	
	Per la gestione dei risultati positivi e la successiva sorveglianza, fare riferimento a ASCCP 2020 Risk-Based Management Consensus Guideline (Perkins, 2020 21)	
Età > 65 anni	Interrompere lo screening se lo screening precedente è negativo adeguato	Nessuno screening dopo un adeguato screening precedente negativo

Gli individui di età > 65 anni senza documentazione dello screening precedente devono continuare lo screening fino a quando non vengono soddisfatti i criteri per la cessazione

Un adeguato screening precedente negativo è attualmente definito come 2 test HPV primari negativi consecutivi o 2 cotest negativi o 3 test citologici negativi negli ultimi 10 anni, con il test più recente che si verifica negli ultimi 3-5 anni, a seconda del test Usato

Dopo l'isterectomia	Gli individui senza cervice e senza una storia di CIN2 o una diagnosi più grave negli ultimi 25 anni o il cancro cervicale non dovrebbero mai essere sottoposti a screening	Nessuno screening dopo l'isterectomia (con rimozione della cervice) per motivi non correlati al cancro cervicale e nessuna storia di cancro cervicale o precanceroso grave
---------------------	---	--

Tabella 3: Confronto tra le linee guida dell'ACS del 2012 e 2020

eseguita come trattamento per il cancro cervicale. Inoltre le donne che hanno subito un'isterectomia sopra-cervicale devono continuare lo screening secondo le linee guida. Anche le donne vaccinate contro l'HPV devono comunque sottoporsi a screening. [68]

Il Piano Nazionale della Prevenzione (PNP 2014-2018) prevedeva che le Regioni, in Italia, riconvertissero il programma di screening per la cervice uterina dal Pap test al test HPV per le donne al di sopra dei 30-35 anni di età entro il 2020. Fino al 2018 solo sei regioni avevano adottato l'HPV test come screening; Emilia Romagna, Piemonte, Veneto, Toscana, Umbria e Basilicata. Le donne ricevono a domicilio la lettera di invito per fare il prelievo cervico-vaginale, uguale per entrambi i test: Le donne in fascia di età compresa fra 25 e 29-34 anni continuano ad essere invitate a fare il Pap test ogni 3 anni. Le donne in fascia di età compresa

fra 30-35 e 64 anni sono invitate a fare il test HPV ogni 5 anni. L'intervallo di screening per l'HPV test è maggiore per due ragioni: l'alto valore predittivo negativo dell'HPV test che consente un allungamento sicuro ed economico dell'intervallo di screening, inoltre si è visto che le donne positive all'HPV, 3 anni dopo un test HPV negativo avevano un rischio molto più basso di CIN2 o CIN3 + rispetto alle donne che sono positive all'HPV al primo screening e, quindi, avevano già un'infezione persistente. Questo fatto importante impone intervalli di screening per l'HPV molto più lunghi rispetto agli attuali intervalli di screening citologico. Le donne che hanno una risposta di test HPV positivo necessitano di un controllo e un follow-up mirato finché l'infezione non scompare, in quanto hanno un rischio elevato di CIN3. [65] Le linee guida europee raccomandano questo intervallo di cinque anni che però può anche essere esteso fino a 10 anni, a seconda dell'età e della storia di screening della paziente. [15] L'adozione del test HPV come screening primario è stata ritardata dalla specificità non ottimale di questo metodo, stimata tra l'85% e il 95%, soprattutto tra le giovani donne che spesso sono affette da infezioni da HPV che regrediscono senza evolvere in tumori. Queste infezioni da HPV rappresentano test HPV veri positivi, ma sono schermi di cancro falsi positivi. Un altro fattore che ha limitato l'adozione dello screening HPV è stata l'inadeguata educazione delle donne sulla storia naturale delle infezioni da HPV. [66] Nonostante questi limiti, diversi studi hanno dimostrato che il test HPV è più efficace del Pap test nel ridurre l'incidenza del carcinoma cervicale e del precancro, pur presentando una minore specificità. Quando il test HPV è positivo, dallo stesso prelievo fatto per il test HPV viene eseguito anche un Pap test (Citologia di triage) che permette di vedere se il virus HPV ha già provocato o meno delle alterazioni iniziali alle cellule. Solo le donne il cui Pap test di triage presenta alterazioni saranno invitate a fare un esame colposcopico; un esame di approfondimento che permette la visualizzazione del collo dell'utero. Se il pap-test di triage è negativo, la donna sarà inviata dopo un anno ad eseguire un nuovo test HPV. Solo le donne che dopo un anno presentano una positività per l'HPV test saranno invitate

ad eseguire una nuova colposcopia, altrimenti ripeteranno l'HPV test dopo cinque anni. (Figura 30)

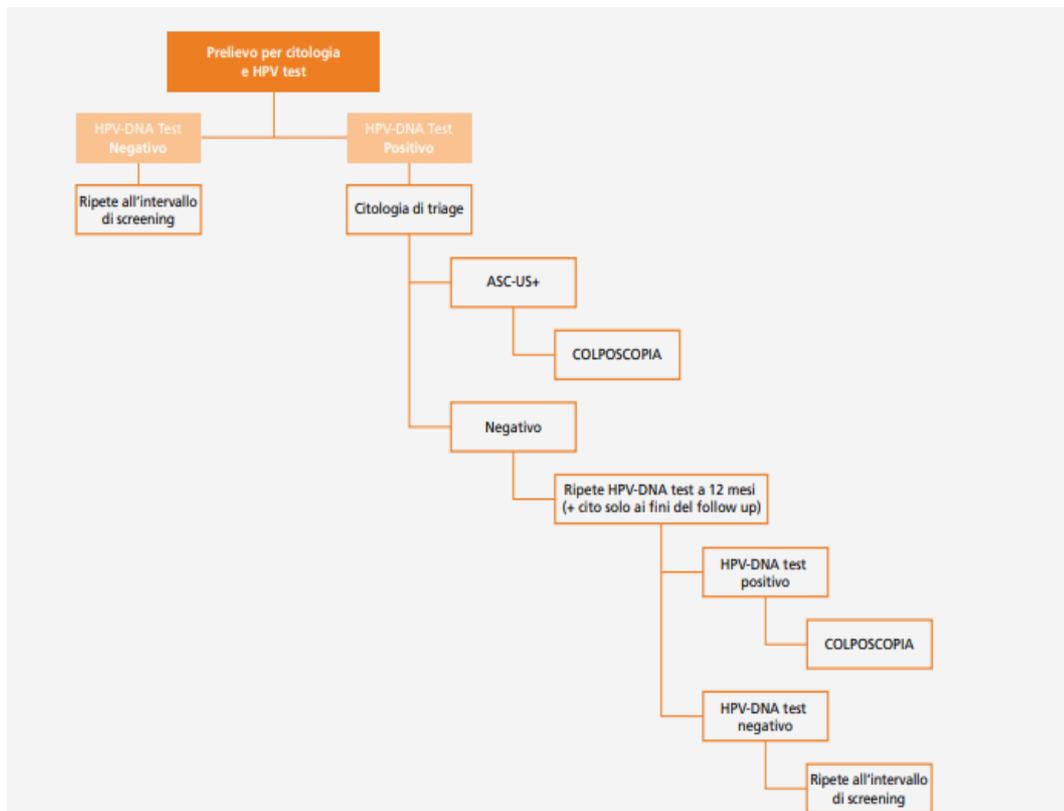


Figura 30: Rappresentazione schematica del nuovo algoritmo Estratta da “Raccomandazioni sul test hr-hpv come test di screening primario e rivisitazione del ruolo del pap test” Gisci (Gruppo Italiano Screening del Cervicocarcinoma) Edizione 2010.

Le donne con età superiore ai 65 anni, dovrebbero interrompere lo screening se hanno avuto precedenti screening negativi e nessuna diagnosi di CIN 2 negli ultimi 20 anni. Inoltre può non essere ripreso anche se la donna riferisce di avere un nuovo partner sessuale. Per screening negativi si intende che negli ultimi tre test citologici consecutivi la donna deve essere risultata negativa o gli ultimi due test citologici consecutivi negativi e un HPV negativo negli ultimi 10 anni.

4.2.1 Citologia di triage

Come test storicamente convalidato e ampiamente disponibile, la citologia è uno strumento ideale per il triage. Dal punto di vista epidemiologico, l'elevata specificità della citologia permette di equilibrare la sensibilità dei test HPV. La citologia funziona meglio come triage, poiché la prevalenza della malattia è elevata nel campione e i citologi hanno un numero limitato di campioni da valutare. [67] Ci sono prove che dimostrano che la competenza dei citologi migliora con la conoscenza preliminare dello stato di HPV. [69] La citologia cervicale è un'opzione per il triage delle donne positive all'HPV. Limitare la citologia alle donne positive al virus elimina il gruppo di risultati citologici anormali; ASC-US HPV-negativi che non hanno praticamente nessun aumento del rischio di precancro o cancro. Quindi, con un aumento del rischio di base nelle donne positive all'HPV e senza un ampio gruppo di risultati non specifici (HPV-negativi ASC-US esclusi), ci si aspetta che la citologia abbia prestazioni migliori per il triage delle donne positive all'HPV rispetto allo screening primario. Un recente studio ha suggerito che la citologia è più sensibile per la rilevazione delle lesioni precancerose quando si è a conoscenza dello stato dell'HPV. [70] In un algoritmo di screening alternativo recentemente approvato dalla FDA, la citologia è raccomandata per lo smistamento di donne positive all'HPV che sono negative per l'HPV16 o l'HPV18. In questo algoritmo, per le donne positive all'HPV, coloro che sono HPV16/18-negativi e citologici-negativi sono seguiti dopo 12 mesi. La citologia CINtec PLUS rappresenta un triage sensibile ed efficiente nelle donne HPV positive. La performance clinica della doppia colorazione p16 e Ki-67 è stata più notevole nelle donne di età inferiore ai 25 anni e potrebbe potenzialmente migliorare i percorsi di gestione. [79] Infatti è risaputo che la specificità dello screening è minore nelle donne tra 21 e 24 anni perché le infezioni da papillomavirus umano sono più comuni, non fornisce quasi alcun beneficio e potrebbe causare più danni a causa della diagnosi eccessiva e del trattamento associato. [78] Ma con l'avvento di marcatori molecolari più specifici e di modelli di previsione del rischio accurati per guidare la gestione clinica dei

pazienti, si potrebbe decidere di iniziare il test dell'HPV, in modo sicuro ad un'età più precoce.

Nelle regioni con risorse più elevate la principale strategia di screening risulta essere questo nuovo algoritmo; la combinazione tra HPV-test, per la ricerca di HPV ad alto rischio e la citologia di triage per le donne HPV positive. La citologia convenzionale, permette di identificare le donne che dovrebbero essere sottoposte a colposcopia, è ad alta intensità di lavoro. L'uso della citologia interpretata dal computer per il triage consentirebbe l'automazione dell'intero processo di screening. [80] Uno studio ha dimostrato che la valutazione citologica automatizzata basata sul sistema FocalPoint può raggiungere prestazioni simili a quelle di una citologia non assistita e interpretata al microscopio. Ciò potrebbe portare allo sviluppo di approcci integrati che utilizzano il test HPV e la citologia automatizzata, riducendo al minimo la soggettività dello screening del cancro del collo dell'utero [76] Pertanto, motivi di qualità, organizzazione e costi [81] indicano la necessità che la lettura dei Pap test di screening e di triage venga effettuata in centri di grandi dimensioni. È noto che la qualità della lettura citologica è influenzata dalla numerosità della casistica che il lettore/laboratorio vede annualmente. A supporto di queste valutazioni vi sono le raccomandazioni delle Linee Guida nazionali che prevedono centri di lettura con carichi di lavoro minimi di 15.000 Pap test/anno. Se da un lato il nuovo ruolo della citologia previene plausibilmente il rischio di cadute di attenzione del lettore e quindi di falsi negativi, dall'altro la maggiore frequenza di casi anormali comporta che l'analisi morfologica del preparato è più impegnativa. Il tempo di lettura della citologia di triage è influenzato dalla frequenza delle anomalie al round di prevalenza rispetto ai round di incidenza, dalla maggiore complessità della lettura, dal maggiore impegno necessario per l'assicurazione della qualità. È opportuno che all'interno dei laboratori ci siano minimo tre citologi esperti, dove si prevede una centralizzazione dei Pap test di screening e di triage con carichi di lavoro di 15.000 Pap test all'anno. Va da sé che qualora il carico di lavoro fosse maggiore sarà maggiore anche il numero di citologi esperti. [77] I citologi devono ricevere una adeguata formazione mirata ad un corretto atteggiamento diagnostico, rivolto a donne ad elevato rischio di patologia. Perciò è opportuno che all'interno dei

laboratori ci sia una figura professionale che, partendo dall'esperienza maturata nello screening primario, sia in grado di selezionare fra le pazienti HR-HPV positive quelle con anomalie citologiche a reale rischio di presenza di lesioni CIN2+.

5 PROBLEMATICHE LEGATE ALLE NUOVE LINEE GUIDA

Sebbene non ci siano dubbi sul fatto che il test HR-HPV prenderà il posto dello screening citologico, c'è ancora incertezza se le strategie di screening possono essere applicate a tutte le donne in tutti i contesti e se le donne e gli operatori sanitari che guardano ancora al vecchio algoritmo sono pronti ad accettare una strategia innovativa con un intervallo di screening più esteso. Infatti, ancora, rimangono molti interrogativi sugli intervalli appropriati e sulle soglie di rischio accettabili. Questi algoritmi sono stati sviluppati per le donne con un rischio medio e non si applicano alle donne immunocompromesse da trapianto di organi, chemioterapia o trattamento cronico con corticosteroidi; o donne positive al virus dell'HIV. Infatti lo screening del cancro cervicale non è indicato per le donne che hanno subito la rimozione della cervice. Le donne sottoposte a isterectomia sopracervicale devono essere sottoposte a screening seguendo le raccomandazioni per le donne a rischio medio che non sono state sottoposte a isterectomia. Le donne con una storia di CIN2 o una diagnosi più grave dovrebbero continuare a seguire le raccomandazioni di screening di routine per almeno 20 anni, anche se lo screening si estende oltre i 65 anni. Le donne immunocompromesse da trapianto d'organo, chemioterapia o trattamento con corticosteroidi cronici o quelle sieropositive devono essere sottoposte a test due volte durante il primo anno dopo la diagnosi o il trattamento, e successivamente ogni anno. Non esiste un'età specifica alla quale interrompere lo screening per le donne con una storia di cancro cervicale e per le donne immunocompromesse. [82] La copertura della popolazione per lo screening del cancro cervicale è un fattore importante che spiega le differenze di incidenza del

cancro nei vari paesi. [73] Purtroppo i livelli di conoscenza del cancro cervicale sono scarsi soprattutto nei paesi meno abbienti. Uno studio ha descritto la consapevolezza del cancro cervicale nello stato della Tanzania; è emerso che, pur essendo la principale causa di morte tra le donne, la conoscenza è inadeguata ed è associata al livello di istruzione, al reddito familiare e alla storia familiare di cancro. Le paure principali tra le donne di Zanzibar sono il disagio e la paura dello screening. Pertanto sono necessarie più politiche per superare tali barriere; come l'educazione alla salute pubblica, gli interventi degli operatori sanitari all'interno delle strutture sanitarie, per migliorare la conoscenza delle donne su questo tema molto importante. [83] Le donne statunitensi non hanno ben accettato questo allungamento nell'intervallo di screening perciò hanno preferito eseguire lo screening ogni anno. Altri studi hanno notato che i medici statunitensi, per paura che le donne non si sottoponevano agli screening, fornivano gli screening più frequentemente rispetto alle nuove linee guida. Purtroppo, però, lo screening eccessivo ha delle conseguenze negative, in quanto aumenta la probabilità di un risultato falso positivo che comporta ansia, trattamenti eccessivi e l'utilizzo inutile di preziose risorse sanitarie. [84] Migliorare ed espandere lo screening cervicale su soggetti sempre più vaccinati e su contesti con risorse inferiori rimarrà una priorità di prevenzione globale; in caso contrario, il peso globale del cancro cervicale continuerà ad aumentare [85]. Potrebbe essere possibile espandere la portata dei programmi di screening utilizzando l'automazione per superare la carenza cronica di professionisti di laboratorio qualificati. [86] Per sopperire al fatto che non tutte le donne partecipano allo screening si possono offrire dispositivi per effettuare l'autocampionamento. Nel 2017-2018 circa il 7% delle donne, nei Paesi Bassi, ha utilizzato questa tecnica. Si prevede che più donne eseguiranno l'autocampionamento nei prossimi anni di screening, invece di ottenere un campione prelevato da un ginecologo o dall'ostetrica. Si è visto che la citologia può essere usata come un test di triage su auto-campioni, ma non deve sostituire l'ulteriore esame citologico eseguito dal medico di base nei casi di HR-HPV positivi. Gli autocampionamenti vengono prelevati dall'area cervicovaginale, non dalla giunzione squamocolumnare della cervice. Contengono una miscela di cellule cervicali vaginali ed esfoliate e di solito non mostrano cellule endocervicali,

sebbene la presenza di cellule endocervicali non sia un criterio di adeguatezza secondo le linee guida. La possibilità di rilevare anomalie è ridotta quando sono presenti meno cellule cervicali anormali rispetto allo striscio cervicale regolare. D'altra parte, il vantaggio dell'analisi dei campioni cervicovaginali è la mancanza di cellule endocervicali, endometriali e infiammatorie, che facilita l'interpretazione del vetrino. L'errore di campionamento e l'errore di screening potrebbero spiegare l'elevato numero di falsi negativi. Mentre la citologia rimane soggetta all'interpretazione soggettiva e alle alterazioni morfologiche delle cellule cervicali esfoliate, i metodi di triage molecolare, come la genotipizzazione dell'HPV sono più oggettivi e riproducibili. Infatti da uno studio è emerso che analisi molecolari su autocampionamenti HPV positivi permette la rivelazione di CIN 2 o lesioni peggiori, come il triage citologico. [74] Pertanto, la citologia eseguita sugli autocampionamenti come test di triage aggiuntivo potrebbe essere un'alternativa nell'attuale programma di screening per migliorare ulteriormente la prevenzione del cancro cervicale. Un altro vantaggio della citologia eseguita sul materiale autocampionato è che potrebbe essere facilmente implementato nella pratica clinica attuale con bassi costi aggiuntivi. Circa il 15% delle donne potrebbe non effettuare una visita dal medico di base; ciò ridurrebbe la perdita di follow-up e accorcerebbe il ritardo nell'iter diagnostico. [75]

CONCLUSIONI

Gli studi che hanno stabilito il legame fra l'HPV e le lesioni prerinvasive e invasive della cervice uterina hanno portato da una parte, alla approvazione di campagne vaccinali contro l'HPV e dall'altra all'inserimento nei programmi di screening dell'HPV come test primario.

La revisione della letteratura effettuata ha permesso di evidenziare la rapida trasformazione legata a questi due fattori nel campo della citologia cervico-vaginale

L'introduzione della citologia in fase liquida ha permesso di aumentare la sensibilità della citologia cervico-vaginale fornendo la possibilità di eseguire sul medesimo campione test di immunocitochimica e molecolari.

I nuovi algoritmi, prevedono uno screening basato sulle tecniche molecolari, le quali presentano una sensibilità molto elevata ma una più bassa specificità.

Il PapTest come citologia di triage permette di garantire i necessari requisiti specificità

Con il modificarsi delle procedure si modifica di necessità anche il ruolo del citotecnico che effettua la procedura di screening sugli strisci (citoscreener).

Il nuovo modello organizzativo dello screening cervico-vaginale prevede che il citoscreener valuterà donne con HPV DNA test positivo quindi trattandosi di una popolazione a rischio, la percentuale di PapTest anormali che si valuteranno aumenterà sensibilmente, assumendo a tutti gli effetti il ruolo di citologia diagnostica.

E' prevedibile che nei prossimi anni, a seguito della riduzione di PapTest tradizionali legati alle metodiche di screening molecolari il ruolo del citotecnico si espanda ad includere test molecolari ed immunoistochimici non solo legati alla citologia cervico-vaginale ma anche ad altri tipi di patologia in cui la diagnosi citologica ha un ruolo fondamentale.

Inoltre la riduzione del numero di Pap test annui, dovuta all'introduzione del test HPV primario, renderà indispensabile lo sfruttamento di un numero minore di citoscreener e un maggior numero di sistemi automatizzati per la revisione dei casi.

La lettura automatica dei preparati citologici è certamente una soluzione che comporta un impatto economico non indifferente, sia in termini organizzativi sia di spesa per l'attrezzatura. Sicuramente con l'avanzare delle tecnologie informatiche ci si proietterà verso una diagnostica automatizzata; potrebbe entrare in gioco l'intelligenza artificiale che permetterà una diagnosi più precisa rispetto alla lettura manuale. Sarebbe opportuno effettuare degli studi sul rapporto tra l'intelligenza artificiale e il ruolo del citoscreener, e come questi possano cooperare per permettere una diagnosi affidabile. Infine con l'avvento dei vaccini ipotizzare ora uno scenario di quanto avverrà tra 10-15 anni, cioè quando le prime ragazze vaccinate saranno in età di screening, è difficile, ma alcune cose possono essere previste: la presenza nei programmi di screening di un numero consistente di donne vaccinate ridurrà il numero di HPV positivi e diminuirà in misura ancora maggiore il numero lesioni di alto grado che si riscontreranno. Si tratta comunque di scenari che potranno verificarsi nei prossimi decenni e sui quali vi sono ancora molte incertezze.

BIBLIOGRAFIA

[1] *Panagiotis Tsikouras, Stefanos Zervoudis, Bachar Manav, Eirini Tomara, George Iatrakis, Constantinos Romanidis, et al. Cervical cancer: screening, diagnosis and staging. JBUON 21, (2016), 320-325.*

[2] Anthony E Rizzo, Sarah Feldman,
Update on primary HPV screening for cervical cancer prevention. Current Problems in Cancer Volume 42, Issue 5, (September 2018), 507-520.

[3] *Gradissimo, A., & Burk, R. D. Molecular tests potentially improving HPV screening and genotyping for cervical cancer prevention. Expert Review of Molecular Diagnostics, 17(4), (2017), 379–391.*

[4] *John Doorbar, Nagayasu, Egawa, Heather Griffin, Christian Kranjec, and Isao Murakami. Human papillomavirus molecular biology and disease association, 2015, Reviews in Medical Virology, (2015 Mar), 2–23.*

[5] *T.A. Berman, J.T. Schiller. Human papillomavirus in cervical cancer and oropharyngeal cancer: one cause, two diseases Cancer 123, (2017), 2219-2229*

[6] Goodman A. *HPV testing as a screen for cervical cancer. BMJ. (2015); 350: h2372.*

[7] de Sanjosé S., Diaz M., Castellsagué X., Clifford G., Bruni L., Muñoz N., & Bosch, F. X. *Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. The Lancet Infectious Diseases, 7(7), (2007), 453–459.*

[8] Paolo Giorgi Rossi, Francesco Chini, Piero Borgia, Gabriella Guasticchi, Francesca Maria Carozzi, Massimo Confortini, Claudio Angeloni. *Human Papilloma Virus (HPV), cervical cancer incidence and screening uptake: differences among Northern, Central and Southern Italy, Epidemiol Prev (2012); 36 (2): 108-119*

[9] Diane M. Harper, Leslie R. DeMars. *HPV vaccines – A review of the first decade Gynecologic Oncology (2017), 196-204*

[10] Ministero della Salute. *Piano Nazionale Prevenzione Vaccinale: PNPV 2017-2019*

[11] Lauri E. Markowitz, Eileen F. Dunne, Mona Saraiya, Harrell W. Chesson, C. et al. *Centers for Disease Control and Prevention. Human Papillomavirus Vaccination. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Morbidity and Mortality Weekly Report Centers for Disease Control & Prevention (CDC) Vol. 63, n. 5 (2014), 1-30*

[12] *Canadian Immunization Committee. Recommendations for Human Papillomavirus Immunization Programs. Canada Communicable Disease Report, (2014); 40 (8), 152–153.*

[13] *Hpv vaccination in EU countries: review of new evidence (2014) European Centre for Disease Prevention and Control*

[14] *Intesa tra il governo, le Regioni e le Provincie autonome concernente “Strategie per l’offerta attiva del vaccino contro l’infezione da Hpv in Italia”. L’epidemiologia per la sanità pubblica Istituto Superiore di Sanità (2007)*

[15] *Chrysostomou, A., Stylianou, D., Constantinidou, A., & Kostrikis, L. Cervical Cancer Screening Programs in Europe: The Transition Towards HPV Vaccination and Population-Based HPV Testing. Viruses, (2018), 10(12), 729.*

[16] *Aiom: i numeri del cancro in Italia 2019*

[17] *Estimated Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Cancer fact sheets. Cervical Cancer WHO (World Health Organization). Globocan 2012.*

[18] *Alessio Petrelli, Paolo Giorgi Rossi, Lisa Francovich, Barbara Giordani, Anteo Di Napoli, Marco Zappa, Concetta Mirisola, and Lidia Gargiulo. Geographical and socioeconomic differences in uptake of Pap test and mammography in Italy: results from the National Health Interview Survey. BMJ Open (2018); 8 (9)*

[19] James Dickinson, Eva Tsakonas, Sarah Conner Gorber, Gabriela Lewin, Elizabeth Shaw, Harminder Singh et al. **Recommendations on screening for cervical cancer. CMAJ. (2013); 185 (1): 35-45.**

[20] Gisci (Gruppo Italiano Screening del Cervicocarcinoma). **Indicazioni per il prelievo citologico nello screening per il carcinoma cervicale. (2006)**

[21] Dr. G. Albertyn, Dr. M. Arbyn, Dr. C. Bourgain, Prof. Dr. F. Buntinx, Prof. Dr. M. Dhont, Prof. Dr. M. Drijkoningen, et al. **A technical guideline: collection of adequate Papsmears of the uterine cervix. Ministry of the Flemish Community Department of Public Health Flemish Steering Group on Cervical Cancer Screening (2001)**

[22] Gisci (Gruppo Italiano Screening del Cervicocarcinoma). **Raccomandazioni sul test HR-HPV come test di screening primario e rivisitazione del ruolo del Pap test. 2010.**

[23] Aniek Boers, Lorian Slagter-Menkema, Bettien M. van Hemel, Jerome L. Belinson, Teus Ruitenbeek, Henk J. Buikema, et al. **Comparing the Cervista HPV HR Test and Hybrid Capture 2 Assay in a Dutch Screening Population: Improved Specificity of the Cervista HPV HR Test by Changing the Cut-Off. PLoS One . 2014; 9 (7).**

[24] Agorastos T, Chatzistamatiou K, Katsamagkas T et al. **Primary Screening for Cervical Cancer Based on High-Risk Human Papillomavirus (HPV) Detection and HPV 16 and HPV 18 Genotyping, in comparison to Cytology. PLoS One, (2015); 10 (3)**

- [25] D. A. M. Heideman, A. T. Hesselink F. J. van Kemenade, T. Iftner, J. Berkhof, F. Topal, D. Agard, C. J. L. M. Meijer, P. J. F. Snijders. ***The Aptima HPV Assay Fulfills the Cross-Sectional Clinical and Reproducibility Criteria of International Guidelines for Human Papillomavirus Test Requirements for Cervical Screening. Journal of Clinical Microbiology (2013); 51 (11)***
- [26] Coleman DV, Evans DMD. ***Microinvasive and occult invasive squamous carcinoma. In: Neville AM, Walker F, Gottlieb LS (Eds): Biopsy pathology and cytology of the cervix. Chapman and Hall Medical University Press, Cambridge, (1988), 240-259***
- [27] Richard J Zaino M.D. ***Glandular Lesions of the Uterine Cervix. Modern Pathology (2000); 13 (3): 261-74.***
- [28] Sherman, M. E., Dasgupta, A., Schiffman, M., Nayar, R., & Solomon, D. ***The Bethesda interobserver reproducibility study (BIRST). Cancer, 111(1), (2006), 15–25.***
- [29] Nayar, R., & Wilbur, D. C. ***The Pap test and Bethesda 2014. Cancer Cytopathology, 123(5), (2015), 271–281.***
- [30] J Linder, D Zahniser. ***The ThinPrep Pap test. A review of clinical studies. Acta Cytologica, (1997); 41(1)***
- [31] Mary S Chacho, Mark E Mattie, Peter E Schwartz. ***Cytohisticologic correlation rates between conventional Papanicolaou smears and ThinPrep cervical cytology: a comparison. Cancer. (2003); 99:135–40.***

[32] S. J. Bernstein, L. Sanchez-Ramos, B. Ndubisi *Liquid-based cervical cytologic smear study and conventional Papanicolaou smears: A metaanalysis of prospective studies comparing cytologic diagnosis and sample adequacy. American Journal of Obstetrics and Gynecology, (2001);185(2): 308-317*

[33] Abulafia O, Pezzullo JC, Sherer DM. *Performance of ThinPrep liquid-based cervical cytology in comparison with conventionally prepared Papanicolaou smears: a quantitative survey. Gynecologic Oncology (2003);90: 137–44*

[34] Abreu, A. L. P., Souza, R. P., Gimenes, F. & Consolaro, M. E. L. *A review of methods for detect human Papillomavirus infection. Virology Journal 9, 262 (2012).*

[35] Dillner J., Rebolj M., Birembaut P., Petry K.-U. Szarewski, A., Munk, C., et al. *Long term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study. BMJ, (2008), 337 a1754–a1754*

[36] Fan Y, Meng Y, Yang S, Wang L, Zhi W, Lazare C, Cao C, Wu P. *Screening of Cervical Cancer with Self-Collected Cervical Samples and Next-Generation Sequencing. Dis Markers. (2018); 2018: 4826547.*

[37] da Fonseca AJ, Galvão RS, Miranda AE et al. **Comparison of three human papillomavirus DNA detection methods: Next generation sequencing, multiplex-PCR and nested-PCR followed by Sanger based sequencing** *Journal of Medical Virology*, (2016); 88(5): 888-94.

[38] Ronco G., Accetta G., Claudio A., Arbyn M., Barzon L., Biggeri A., et al. **Ricerca del dna di papillomavirus umano (hvp) come test primario per lo screening dei precursori del cancro del collo uterino**, *Epidemiologia e prevenzione*, (2012); 36 (3-4) suppl 1: e16

[39] Tewari P., White C., Kelly L., Pilkington L. Keegan H., D'Arcy T., et al. **Clinical performance of the Cobas 4800 HPV test and the Aptima HPV assay in the management of women referred to colposcopy with minor cytological abnormalities**, *Diagnostic Cytopathology* (2018); 46 (12): 987-9922018

[40] Yu L, Fei L, Liu X, Pi X, Wang L and Chen S. **Application of p16/Ki-67 dual-staining cytology in cervical cancers**. *Journal of Cancer* (2019); 10 (12): 2654-2660.

[41] Sun X., Kaufman P. D. **Ki-67: more than a proliferation marker**. *Chromosoma*, (2018;127(2):175-186.

[42] Ordi J, Sagasta A, Munmany M, Rodriguez-Carunchio L, Torne A, del Pino M. **Usefulness of p16/Ki67 immunostaining in the triage of women referred to colposcopy**. *Cancer Cytopathology*. (2014); 122: 227– 235.

[43] *KU Petry, D Schmidt, S Scherbring, et al. Triaging Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. Gynecologic Oncology, 121 (2011), pp. 505-509*

[44] *Indraccolo U., Bracalenti C., Indraccolo S. R. Significato della coilocitosi riscontrata al Pap test. La Colposcopia in Italia Anno XXII N. 2 pagg. 16-18.*

[45] *Bertrand M., Lickrish G. M., Colgan T.J. The anatomic distribution of cervical adenocarcinoma in situ: Implications for treatment. American Journal of Obstetric and Gynecology (1987); 157(1): 21-5.*

[46] *Tota, J. E., Ramana-Kumar, A. V., El-Khatib, Z., & Franco, E. L. The road ahead for cervical cancer prevention and control. Current Oncology, 21(2), (2014), 255.*

[47] *Cuzick J., Clavel C., Petry K.-U., Meijer C. J. L. M, Hoyer H., Ratnam S., et al. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. International Journal of Cancer (2006);119(5):1095-101.*

[48] *Kruse AJ, Baak JP, Helliesen T, Kjellevoid KH, Robboy SJ. Prognostic value and reproducibility of koilocytosis in cervical intraepithelial neoplasia. International Journal of Gynecological Pathology (2003);22(3):236-9.*

[49] Katherine A. Krause, Daniel Neelon, Samantha L. Butler **Koilocytosis 2020. Stat Pearls**

[50] Narges I., Kourosch A., Hadi S., Soheila S., Seyed A.A., Sanaz S., Leila H.C. **Potential diagnostic value of p16 expression in premalignant and malignant cervical lesions. J. Res. Med. Sci., 17 (2012), pp. 428-433**

[51] Kay J Park, Robert A Soslow, Kay J. Park, Robert A. Soslow, **Current Concepts in Cervical Pathology. Arch Pathol Lab Med (2009) 133 (5): 729–738.**

[52] Wentzensen N. and Arbyn M. **HPV-based cervical cancer screening- facts, fiction, and misperceptions. Preventive Medicine (2017); 98: 33-35**

[53] Basu P, Ponti A, Anttila A, Ronco G, Senore C, Vale DB, et al. **Status of implementation and organization of cancer screening in The European Union Member States-Summary results from the second European screening report. International Journal of Cancer. (2018);142(1):44–56**

[54] Cheng JX, Yao LL, Xiang H, et al. **Cervical cytology ASCUS patients with HPV detection and clinical value. Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology (2016); 43: 592-596**

[55] *Boselli F. Colposcopia e gestione della paziente con paptest anormale. Riv It Ost Gin (2008): 908*

[56] *Sawaya GF, Smith-McCune K, Kuppermann M. Cervical cancer screening: more choices in 2019. JAMA. (2019); 321(20): 2018–9.*

[57] *Malagon T, Kulasingam S, Mayrand MH, et al. Age at last screening and remaining lifetime risk of cervical cancer in older, unvaccinated, HPV-negative women: a modelling study. Lancet Oncol. (2018); 19: 1569- 1578.*

[58] *Massimo Confortini Utilizzo del test hpv hr nel triage delle diagnosi citologiche di atipia squamosa di significato indeterminato e delle diagnosi di lsil in donne con piu' di 35 anni nonche' nel follow-up delle lesioni cin2-3 come indicatore di rischio di recidiva. CSPO Istituto Scientifico Prevenzione Oncologica Firenze; Guglielmo Ronco, Centro per l'Epidemiologia e la Prevenzione Oncologica (CPO) Piemonte, Torino. (2005): 6*

[59] *TC Wright Jr, JT Cox, LS Massad, et al. 2001 consensus guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. JAMA, 287 (2002), pp. 2120-2129*

[60] *Wright TCJr, Massad LS, Dunton CJ, et al. 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening tests, Am J Obstet Gynecol., 2007, vol. 197 4(pg. 346-355)*

[61] *Iossa A., Carozzi F. M., Mantellini P. e il Gruppo di lavoro regionale per la prevenzione del tumore della cervice uterina. Protocollo regionale per la gestione delle citologie anormali e del follow-up post-trattamento delle lesioni precancerose della cervice uterina: 108-109*

[62] *Crum CP, Egawa K, Fu YS, et al. Atypical immature metaplasia (AIM): A subset of human papillomavirus infection of the cervix. Cancer 51 (1983): 2214–2219*

[63] *Duggan MA Akbari M Magliocco AM. Atypical immature cervical metaplasia: immunoprofiling and longitudinal outcome. Hum Pathol. (2006); 37: 1473–1481.*

[64] *Ronco G Giorgi-Rossi P Carozzi F et al. New Technologies for Cervical Cancer Screening (NTCC) Working Group. Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial. Lancet Oncol. (2010); 11: 249–257*

[65] *M Schiffman, N Wentzensen, S Wacholder, W Kinney, JC Gage, PE Castle. Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. J Natl Cancer Inst, 103 (2011), pp. 368-383*

[66] *Massad, L. S. Replacing the Pap Test With Screening Based on Human Papillomavirus Assays. JAMA, (2018) 320(1), 35.*

- [67] P. Basu, F. Meheus, Y. Chami, R. Hariprasad, F. Zhao, R. Sankaranarayanan. **Management algorithms for cervical cancer screening and precancer treatment for resource-limited settings. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics*, 138 (2017), pp. 26-32**
- [68] Fontham E.T., Wolf A.M., Church T.R. et al. **Cervical cancer screening for individuals at average risk: 2020 guideline update from the American Cancer Society. *CA Cancer J Clin.* (2020).**
- [69] Richardson, L. A. et al. **HPV DNA testing with cytology triage in cervical cancer screening: influence of revealing HPV infection status. *Cancer Cytopathol.* 123, (2015) 745–754.**
- [70] Bergeron, C. et al. **Informed cytology for triaging HPV-positive women: substudy nested in the NTCC randomized controlled trial. *J. Natl Cancer Inst.* 107, dju423 (2015).**
- [71] Sigurdsson K. **Is a liquid-based cytology more sensitive than a conventional Pap smear? *2013 Cytopathology*; (2013), (4):254-63**
- [72] Bentz, J., L. Rowe, E. Gopez, and J. Marshall. **The unsatisfactory ThinPrep Pap test: missed opportunity for disease detection? *Am J Clin Pathol* (2002), 117:457–463.**
- [73] Verdoodt F, Jentschke M, Hillemanns P, Racey C S, Snijders P J F, Arbyn M. **Reaching women who do not participate in the regular cervical cancer screening programme by offering self-sampling kits: a systematic review and meta-analysis of randomised trials. *Eur J Cancer* (2015);51(16):2375-852015**

[74] *V.M. Verhoef, R.P. Bosgraaf, F.J. van Kemenade, L. Rozendaal, D.A. Heideman, A.T. Hesselink, et al. Triage by methylation-marker testing versus cytology in women who test HPV-positive on self-collected cervicovaginal specimens (PROHTECT-3): a randomised controlled non-inferiority trial Lancet Oncol., 15 (2014), 315-322*

[75] *Loopik DL, Melchers WJ, Vedder JE, van den Brule AJ, Massuger LF, Bekkers RL, et al. Reflex cytology for triage of high-risk human papillomavirus positive self-sampled material in cervical cancer screening: a prospective cohort study. BJOG (2020).*

[76] *Wentzensen, N., Schiffman, M., Palmer, T. & Arbyn, M. Triage of HPV positive women in cervical cancer screening. J. Clin. Virol. 76, S49–S55 (2016).*

[77] *Di Stefano F, Giorgi Rossi P, Carozzi F. L'implementazione del DNA-HPV come test primario nei programmi italiani di screening del cervicocarcinoma. Indicazioni dai risultati del Progetto MIDDIR. (2016): 54*

[78] *Sasieni P, Castanon A, Cuzick J. Efficacia dello screening cervicale conetà: studio caso-controllo basato sulla popolazione di dati registrati prospetticamente. BMJ (2009); 339: b2968*

[79] *McMenamin M, McKenna M, McDowell A. Clinical utility of CINTec PLUS triage in equivocal cervical cytology and human papillomavirus primary screening. Am J Clin Pathol. 2018; 150(6): 512- 521.*

[80] Yu K., Hyun N., Fetterman B, Lorey T, Raine-Bennett T R, Zhang H, *at al.* ***Automated Cervical Screening and Triage, Based on HPV Testing and Computer-Interpreted Cytology. J Natl Cancer Inst. (2018); 110 (11): 1222-1228***

[81] L. Karsa, M. Arbyn, H.D. Vuyst, J. Dillner, L. Dillner, S. Franceschi, *et al.* ***European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. Summary of the supplements on HPV screening and vaccination. Papillomavirus Res. (2015)***

[82] Smith RA, Brooks D, Cokkinides V, Saslow D, Brawley OW. ***Cancer screening in the United States, 2013: a review of current American Cancer Society guidelines, current issues in cancer screening, and new guidance on cervical cancer screening and lung cancer screening. CA Cancer J Clin. 2013; 63: 88- 105.***

[83] Weng, Q., Jiang, J., Haji, F. M., Nondo, L. H., & Zhou, H. ***Women's knowledge of and attitudes toward cervical cancer and cervical cancer screening in Zanzibar, Tanzania: A crosssectional study. BMC Cancer, 20(1), (2020), 1–12.***

[84] Perkins RB, Anderson BL, Gorin SS, Schulkin JA. ***Challenges in cervical cancer prevention: a survey of US obstetrician-gynecologists. Am J Prev Med 2013; 45(2):175-81***

[85] Vaccarella S, Laversanne M, Ferlay J, Bray F. ***Cervical cancer in Africa, Latin America and the Caribbean and Asia: regional inequalities and changing trends. Int J Cancer. 2017; 141: 1997- 2001***

[86] Schiffman, M. et al. *Proof-of-principle study of a novel cervical screening and triage strategy: computer-analyzed cytology to decide which HPV-positive women are likely to have \geq CIN2*. *International Journal of Cancer*. (2016)

[87] Brotherton JM, Fridman M, May CL, Chappell G, Saville AM, Gertig DM. *First effect of hpv vaccination program on abnormalities cervicals in Victoria, Australia: an ecological study*. *The Lancet*; Volume 377, issue 9783, (2011), 2085-2092.

[88] M Grce, P Davies. *Human papillomavirus testing for primary cervical cancer screening*. *Expert Rev Mol Diagn*, 8 (2008), 599-605.

[89] Stephen E. Godfrey. *The Pap Smear, Automated Rescreening, and Negligent Nondisclosure*. *American Journal of Clinical Pathology*, Volume 111, Issue 1, (1999), 14–17

[90] L.G. Koss, E. Lin, K. Schreiber, P. Elgert, L. Mango. *Evaluation of the PAPNET cytological screening system for quality control of cervical smears*. *American Journal of Clinical Pathology*, 101 (1994), 220-229

[91] Dalla Palma P, Moresco L, Giorgi Rossi P e Gruppo di lavoro HTA lettura computer-assistita. *Computer-assisted pap test for cervical cancer screening*. *Epidemiologia e Prevenzione*, (2012); 36(5 Suppl 3): e1-432012

- [92] Ronco G, Calvia M, Confortini M, Maccallini V, Naldoni C, Segnan N et al. *Use of liquid-based cytology for cervical cancer precursors screening; Health Technology Assessment. Epidemiologia e Prevenzione (2012), e9-11*
- [93] Dalla Palma P, Moresco L, Rossi P G e Gruppo di lavoro HTA lettura computer-assistita. *Computer-assisted pap test for cervical cancer screening. 2012 Epidemiologia e Prevenzione (2012); 36 (5 Suppl 3): e1-43*
- [94] Jung-Soo Pyo, Guhyun Kang, Hye Kyoung Yoon, Hyun Jung Kim. *Diagnostic Test Accuracy Review of Cytology for Squamous Intraepithelial Lesion and Squamous Cell Carcinoma of Uterine Cervix. J Korean Med Sci (2019); 34 (2): e16*
- [95] WHO. **Human papillomavirus vaccines: WHO position paper, October 2014. Weekly epidemiological record, (2014); 89 (43):465-492.**
- [96] RM Richart *Cervical Intraepithelial Neoplasia Pathol Annu (1973), 8:301-328*
- [97] Lu B., Chen X. *Intraepithelial Neoplasia of the Female Reproductive Tract. In: Lai M. (eds) Intraepithelial Neoplasia. Springer, Berlin, Heidelberg. (2009); 273-340*
- [98] Broccolo F. *2008 Carcinoma della cervice uterina Eziopatogenesi e profilassi; Milano-Monza, 3-4*
- [99] Kahn JA. *HPV vaccination for the prevention of cervical intraepithelial neoplasia. N Engl J Med 2009; 361:273*

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la Prof.ssa Marina Scarpelli, direttrice della struttura operativa dipartimentale della SOD di Anatomia Patologica e mia relatrice, per i suggerimenti, le preziose indicazioni e il supporto forniti.

Ringrazio la Dott.ssa Elena Antaldi per la sua grande disponibilità e cortesia dimostratemi.

Ringrazio la Prof.ssa Doriana Morichetti e la Dott.ssa Silvia Caimmi per ogni tipo di supporto.

Ringrazio anche i miei compagni di corso e le mie compagne e amiche speciali Caterina e Sara che mi hanno supportata e sopportata in questi tre anni. Inoltre tutti coloro che mi sono stati accanto durante questi anni universitari, in modo particolare mia madre, la persona più forte che conosca, mio padre che dal cielo starà festeggiando con me e Michele per esserci sempre stato.

Che questo momento di gioia possa portare una nota di positività in questo periodo che stiamo vivendo.