



UNIVERSITÀ DI PISA

Scuola di Specializzazione in Patologia Clinica

Settore Scientifico Disciplinare MED/05

Tesi di Diploma di Specializzazione

Rivalutazione di Pap test ASC-US con test di trriage negativi per HPV ad alto rischio

Relatori:

Prof. Aldo Paolicchi

Dott.ssa Grazia Maria Troni

Candidato:

Dott. Andrea Di Domenicantonio

Anno Accademico 2013/2014

Sessione 22/06/2015

Ad Anna

INDICE

Abstract	4
1. Introduzione	6
1.1 Anatomia della cervice uterina e cellule rappresentate	7
1.2 Ruolo dell'HPV nel cancro cervicale	11
1.3 Pap-test: esecuzione e tecniche	12
1.4 Classificazione del Pap-test	15
1.5 Screening e follow-up pazienti	19
1.6 ASC-US: quadri citologici e diagnosi differenziale	22
2. Scopo della tesi	25
3. Materiali e metodi	27
3.1 Pazienti	27
3.2 Criteri morfologici di riferimento per ASC-US	29
3.3 Coloratore di vetrini automatizzato	30
3.4 Metodo per la ricerca di HPV DNA (HC2 High-Risk)	31
4. Risultati	34
4.1 Età delle pazienti	34
4.2 Risultati test HPV (HC2)	35
4.3 Discheratosi/Paracheratosi	37
4.4 Agenti infettivi	37
4.5 Analisi nucleo	37
4.5.1 Ipercromasia	39
4.5.2 Polimorfismo nucleare	40
4.6 Schema riassuntivo risultati	41
5. Conclusioni	47
Bibliografia	50

ABSTRACT

La categoria ASC-US introdotta dal sistema Bethesda 1988 nella classificazione del pap test vaginale e successivamente modificata nel 1991 e nel 2001 rappresenta il primo gradino di anormalità su cellule squamose. In un programma di screening la percentuale di ASC-US su tutte le citologie lette non dovrebbe superare il 5%. L'importanza di questa categoria diagnostica è tuttavia rappresentata dal suo valore predittivo positivo (VPP) per lesioni CIN2+.

I protocolli di approfondimento consigliati per le ASC-US sono la ripetizione a sei mesi del Pap test, l'invio diretto in colposcopia e il triage con test HPV ad alto rischio (hr-HPV). La logica del triage con test hr-HPV scelta dall'ISPO di Firenze deriva dall'alto valore predittivo negativo del test hr-HPV: una paziente con diagnosi ASC-US con successivo test molecolare negativo ha una bassissima probabilità di avere una patologia CIN2+. Il triage delle ASC-US con test hr-HPV permette quindi di selezionare le pazienti a rischio fra tutte quelle che hanno alterazioni morfologiche simili.

La presente tesi ha lo scopo di rivalutare una serie di quadri morfologici di ASC-US negativi al test per la ricerca di hr-HPV, per approfondire e ottimizzare i criteri citologici indicativi di una diagnosi di ASC-US al fine di migliorare la specificità. La revisione dei suddetti quadri citologici ha quindi lo scopo di valutare se, sulla base di criteri morfologici citoplasmatici o nucleari prestabiliti, vi era stata un sovradiagnosi o se invece le alterazioni presenti erano perfettamente sovrapponibili a quelle presenti nelle ASC-US/hr-HPV positive.

Dall'archivio dell'ISPO di Firenze dell'anno 2012 sono stati revisionati 103 campioni con diagnosi ASC-US e successivo test di triage per hr-HPV negativo, scelti da un totale ben più ampio secondo il criterio dell'ordine cronologico di lettura.

Le caratteristiche citologiche che sono state sono principalmente quelle nucleari, nello specifico: ingrandimenti, forma e cromasia. Sulla base di questi parametri, la presente revisione effettuata su un totale di 103 casi di ASC-US negativi per hr-HPV, ha evidenziato:

- 23 casi riclassificati come negativi in quanto non presentavano alcun altro segno sospetto di alterazione nucleare;
- 42 casi riconfermabili con la diagnosi di ASC-US in quanto presentavano ingrandimenti nucleari importanti (da 2 a 3,5 volte) e ipercromasia,
- 38 casi con una maggiore difficoltà d'interpretazione citologica su cui bisognerebbe migliorare la scelta dei criteri morfologici ascrivibili ad ASC-US.

E' chiaro che uno sforzo su una migliore definizione dei criteri morfologici identificativi di ASC-US debba essere fatto. Questo permetterebbe non solo un risparmio di approfondimenti (Triage con test hr-HPV) ma anche una maggior concordanza interoperatore sulle diagnosi borderline.

1. INTRODUZIONE

Il Pap test è un test di screening, la cui funzione principale è quella di individuare, nella popolazione femminile, donne a rischio di sviluppare un cancro del collo uterino. Il suo nome deriva dal medico greco-americano Georgios Papanicolaou (1883-1962), il padre della citopatologia, che sviluppò questo test per la diagnosi rapida dei tumori del collo dell'utero. Il cancro della cervice uterina è la seconda forma di tumore più diffusa nelle donne, la settima in assoluto, con 529.000 nuovi casi e circa 275.000 morti stimati nel 2012 nel mondo. Più dell'85% dei casi si verifica nei paesi in via di sviluppo, dove questa patologia rappresenta il 13% dei tumori femminili (1). Nell'Unione europea (UE) dal 1980 al 2015 l'incidenza e la mortalità sono in continua riduzione e si attestano ogni anno a circa 34.000 nuovi casi e 16.000 decessi (2). Nel 2013 in Italia si sono stimati 1580 nuovi casi di tumore del collo dell'utero e circa 720 decessi, ovvero 5 nuovi casi annui ogni 100.000 donne e 2 decessi l'anno ogni 100.000 donne (3). L'incidenza e la mortalità del carcinoma della cervice uterina nel corso degli anni hanno avuto una notevole diminuzione per quanto riguarda i Paesi industrializzati; questo è stato possibile grazie all'attuazione di efficaci campagne di screening sulla popolazione basati sul Pap test. Infatti la scoperta di anomalie citologiche attraverso l'osservazione al microscopio ottico del vetrino permette di trattare le donne con alterazioni citologiche di alto grado evitando l'eventuale progressione a cancro cervicale (4).

Nel caso dei Paesi in via di sviluppo invece il carcinoma della cervice uterina continua a rimanere un importante problema di sanità pubblica con un alto tasso di mortalità. Questo perché, in questi paesi, non esiste uno screening appropriato che permetta di evidenziare il tumore in una fase in cui risulta limitato alla cervice uterina (5); infatti la mortalità per questo tipo di tumore è influenzata dallo stadio al momento della diagnosi, dalla possibilità

di accesso al trattamento e dall'efficacia dello stesso (6) e nel caso dei Paesi in via di sviluppo questi fattori non sono ottimali.

1.1 Anatomia della cervice uterina e cellule rappresentate

La cervice uterina rappresenta la porzione inferiore dell'utero; inferiormente confina direttamente con la parte superiore della vagina, mentre superiormente si continua con l'istmo uterino. La cervice uterina si presenta come una formazione cilindro-conica della lunghezza di 2,5-4 centimetri ed un diametro di 2 centimetri e mezzo (7). Le sue caratteristiche morfologiche, sono variabili in relazione all'età e al numero di gestazioni.

La cervice è suddivisa in due zone:

- porzione vaginale (o esocervice): si continua superiormente con l'endocervice ed in basso con la mucosa vaginale attraverso l'orifizio uterino esterno, sporgendo in vagina come un *muso di tinca* (porzione del collo uterino che sbocca nella vagina)
- porzione sopravaginale (o endocervice): si continua superiormente con l'istmo ed il corpo dell'utero attraverso l'orifizio uterino interno, ed in basso con l'esocervice.

Il canale endocervicale, appartenente all'endocervice, unisce esocervice ed istmo uterino: è un canale delimitato dai due orifizi uterini, interno ed esterno, caratterizzato da alcune sporgenze della mucosa dette pliche palmate (7).

Dal punto di vista istologico l'esocervice è ricoperta internamente da un epitelio pavimentoso pluristratificato non cheratinizzato, privo di ghiandole (lo stesso che caratterizza la vagina), detto anche epitelio squamoso, mentre l'endocervice è coperta da un epitelio monostratificato colonnare costituito da cellule ciliate e da cellule secernenti muco, con presenza di ghiandole o pseudo-ghiandole endocervicali. E' per questo noto anche come epitelio ghiandolare (**Figura 1**).

I due epiteli si uniscono nella cosiddetta giunzione squamo-colonnare. Nella maggior parte delle donne adulte tale passaggio non è brusco: la giunzione squamo-colonnare è una zona contenente aree irregolari di epitelio colonnare e squamoso metaplastico (7).

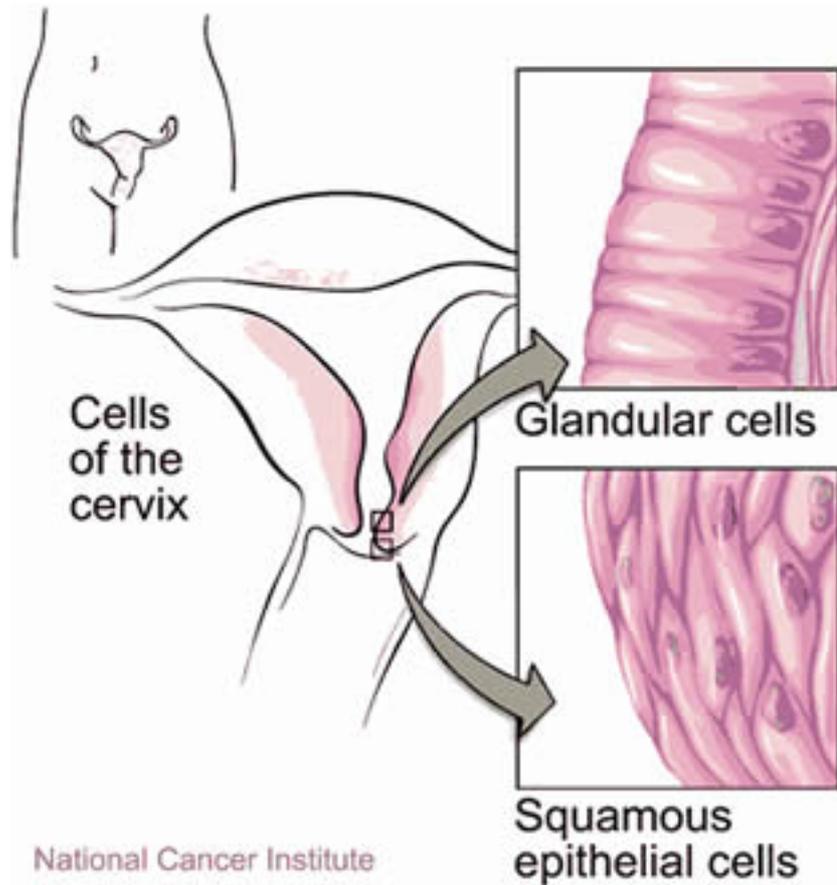


Figura 1: Anatomia della cervice uterina

Le cellule che possono essere presenti in un Pap-test sono:

Cellule superficiali: rappresentano la componente più superficiale dell'esocervice e la loro percentuale aumenta nella fase estrogenica del ciclo mestruale. Hanno una dimensione che varia dai 30 ai 50 micron e sono di forma poligonale; il citoplasma appare sottile ed è spesso eosinofilo al cui interno possiamo trovare granulazioni brunastre e goccioline lipidiche; il nucleo è centrale e picnotico (8) (**Figura 2**).

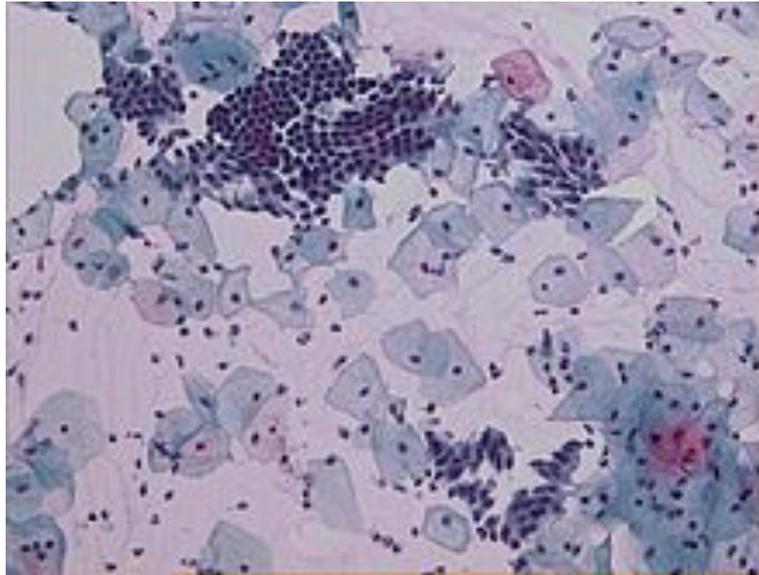


Figura 2: cellule superficiali in uno striscio cervicale

Cellule intermedie: si ritrovano soprattutto nella fase pre- e post-mestruale, in gravidanza e in generale nelle fasi progestiniche del ciclo; hanno dimensioni inferiori alle superficiali (30-40 micron) con forma poligonale variabile a seconda dello stato di maturazione. Il citoplasma è abbondante basofilo, mentre i nuclei non sono mai picnotici, ma appaiono tondi o ovalari dotati di reticolo cromatinico finemente granulare (8).

Cellule parabasali: si ritrovano negli strisci di donne in età pre-puberale, durante l'allattamento e in menopausa mentre in condizioni patologiche sono presenti in casi di erosione della mucosa esocervicale e in caso di carenza di estrogeni. Le dimensioni sono comprese tra 12-30 micron di forma rotondeggiante con nucleo tondo e vescicoloso (8).

Cellule basali: sono frequenti negli strisci atrofici, mentre non dovrebbero essere presenti in una donna fertile, a meno di processo patologico in atto (erosione). Le dimensioni sono ridotte (10-12 micron), di forma ovale o rotonda con citoplasma scarso e denso; il nucleo è posto centralmente ed è voluminoso (7-9 micron) (8).

Cellule endocervicali: Le dimensioni sono variabili (25-30 micron), il citoplasma è granulare o microvacuolizzato e può assumere diverse colorazioni; il nucleo è tondo,

decentrato e vescicoso. Gli aggregati prendono il nome di “palizzata” se visti di profilo o “nido d’ape” se visti dall’alto; si ritrovano raramente in uno striscio atrofico, in quanto la giunzione squamo-colonnare risale il canale cervicale (8) (**Figura 3**).

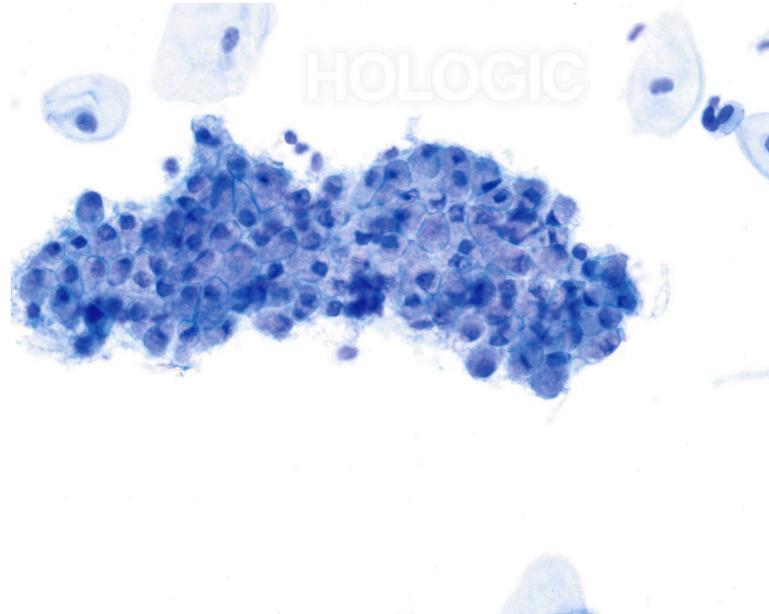


Figura 3: cellule endocervicali in uno striscio cervicale

Cellule endometriali: è possibile ritrovarle nello striscio di una donna fertile dalla 4^a alla 10^a giornata del ciclo, mentre in tutti gli altri casi il loro riscontro è patologico. Sono cellule cilindriche molto piccole che esfoliano a gruppo in mezzo a placards di cellule squamose o in sciami di una certa lunghezza. Il citoplasma è appena evidente, basofilo con contorni cellulari meno evidenti e nucleo ipercromatico (8).

Cellule metaplastiche: si trovano nella zona di congiunzione tra i due epiteli (squamoso e ghiandolare) e sono cellule che sotto determinati stimoli esterni (chimici, infettivi, etc...) possono maturare e diventare cellule squamose o endocervicali. Hanno dimensioni ridotte, aumentato rapporto N/C e spesso presentano una forma bizzarra (stellata o “a girino” se immature e rotondeggiante se mature). Il nucleo è di forma ovalare, disposto centralmente con cromatina finemente granulare (8) (**Figura 4**).

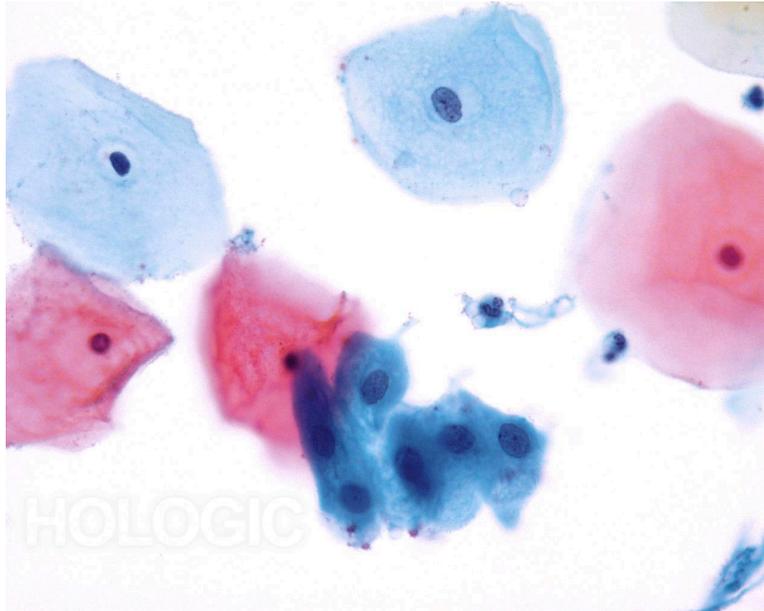


Figura 4: cellule metaplastiche in uno striscio cervicale

1.2 Ruolo dell'HPV nel cancro cervicale

Negli ultimi anni è stato dimostrato che il tumore cervicale ha un'origine virale, dovuta alla persistenza dei virus del papilloma umano (HPV) ad alto rischio oncogeno. Questo virus è molto comune e si trasmette per via sessuale. La maggior parte delle persone viene a contatto e diventa portatrice del virus senza esserne a conoscenza; solitamente l'organismo se ne libera spontaneamente nell'arco di alcuni mesi, come accade con altri virus come ad esempio quelli che provocano l'influenza (9). Una parte della popolazione non elimina però il virus; la persistenza di questo, associata ad altri fattori di rischio, come il numero di partner o il fumo, favorisce lo sviluppo di lesioni precancerose, che se non curate possono, nel tempo ed in una piccolissima percentuale dei casi, evolvere in tumore della cervice uterina (10).

Sono stati identificati oltre 120 genotipi di HPV divisi in due gruppi: virus a *basso rischio* oncogeno (lr-HPV) e virus ad *alto rischio* oncogeno (hr-HPV).

I genotipi a basso rischio oncogeno (HPV-6, -11, -40, -43, -44/55 e -70) sono associati a lesioni benigne quali i condilomi, mentre i genotipi ad alto rischio oncogeno (HPV-16, -18, -31, -33, -35, -45, -51, -52, -56, -58, -59 e -66) sono associati al carcinoma cervicale e ad altri tumori che interessano il tratto ano-genitale e l'orofaringe (10).

Esistono inoltre alcuni tipi di HPV classificati come potenzialmente oncogeni (HPV-53, -68, -73 e -82) (11,12).

I più comuni genotipi oncogeni sono l'HPV-16, responsabile di circa il 60% di tutti i carcinomi della cervice uterina, e l'HPV-18, responsabile di circa il 10% dei casi di carcinoma della cervice; quindi circa il 70% di tutti i carcinomi della cervice uterina è associato alla presenza di HPV-16 o HPV-18 (13).

La presenza del DNA dell'hr-HPV è quindi una condizione necessaria, ma non sufficiente, per lo sviluppo delle lesioni, mentre l'assenza dell'hr-HPV dà la quasi certezza di non avere lesioni e di non svilupparle nell'immediato futuro. Grazie alla lentezza del processo di carcinogenesi è possibile individuare precocemente e trattare le lesioni intraepiteliali; questo perché, il processo che da un'infezione persistente causata da hr-HPV porta al cancro invasivo, si può individuare attraverso trasformazioni cellulari morfologicamente identificabili, se le donne partecipano allo screening cervico-vaginale che permette di monitorarne i cambiamenti (10).

L'infezione persistente con ceppi cancerogeni di HPV ha reso necessaria l'attivazione di strategie di prevenzione primaria e secondaria (14). La diffusione di programmi di screening organizzati ha portato ad una forte diminuzione del cancro della cervice uterina nei Paesi sviluppati.

1.3 Pap-test: esecuzione e tecniche

L'esame citologico si fonda sulla proprietà dell'epitelio squamoso della portio e della

vagina di andare incontro ad un processo continuo di esfoliazione: il materiale di sfaldamento viene raccolto secondo varie procedure ed esaminato. L'esame deve essere eseguito nella fase iniziale della visita ginecologica e, nella donna fertile, preferibilmente nella fase ovulatoria (14° giorno del ciclo), quando cioè il muco è più fluido e il materiale prelevato comprende con maggiore probabilità anche cellule cilindriche dell'endocervice (15). Il materiale viene quindi raccolto dall'esocervice (citologia esocervicale) applicando la spatola di Ayre sulla portio intorno all'orifizio uterino esterno e imprimendo un movimento rotatorio tutt'attorno, il più vicino possibile alla giunzione squamo-colonnare. Il materiale di sfaldamento così prelevato viene strisciato in strato sottile su un vetrino porta oggetti. Sullo stesso vetrino, separatamente dall'esocervice, viene disteso anche il materiale prelevato dall'endocervice attraverso una sorta di spazzola, il cytobrush, o un altro dispositivo per aspirazione. Il cytobrush viene introdotto all'interno del canale cervicale attraverso l'orifizio uterino esterno e ruotato in questa sede di 360 gradi (**Figura 5**). Il tutto è fissato con una miscela di alcol etere emessa sottoforma di spray.

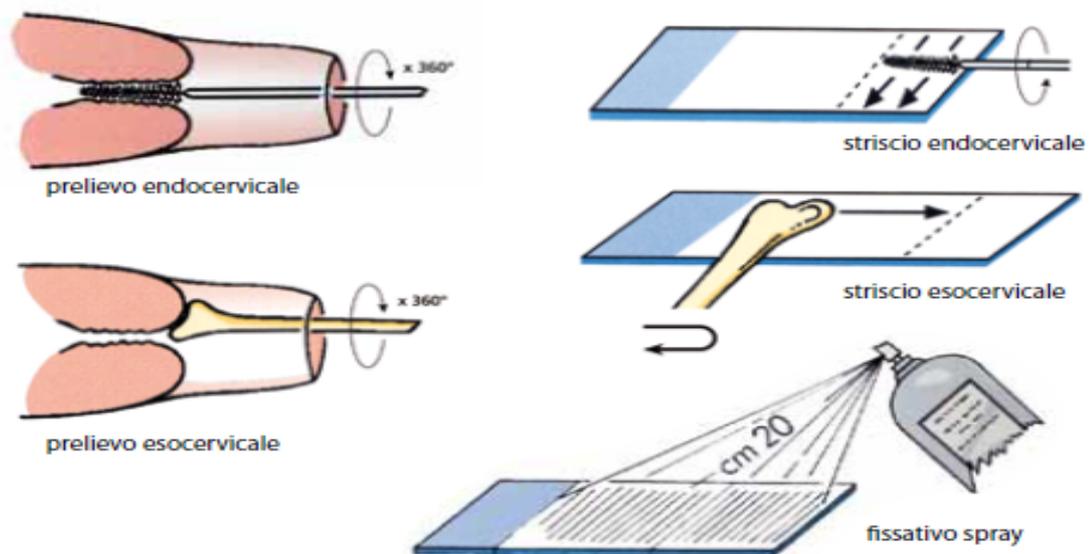


Figura 5: spatola di Ayre e cytobrush e loro utilizzo

Uno degli indicatori per valutare l'adeguatezza dello striscio cervico-vaginale è la presenza di cellule cilindriche endocervicali o di cellule pavimentose metaplastiche (16).

Il preparato effettuato con il Pap-test tradizionale risulta però sempre multistrato perchè le cellule si aggregano disordinatamente tra loro. Per superare questa problematica, negli ultimi anni è stata sviluppata una nuova metodica in fase liquida, in cui una macchina provvede ad allestire un preparato a "strato sottile". La metodica consente, quindi, rispetto al metodo tradizionale, di avere i seguenti vantaggi:

- Ottimizzazione del campione
- Riduzione fino al 93% dei prelievi giudicati non soddisfacenti o limitati da tracce di sangue, muco o frammenti
- Migliore sensibilità diagnostica e significativa riduzione dei casi di diagnosi incerta che possono allertare inutilmente la paziente
- Individuazione delle lesioni di basso o di alto grado e delle lesioni ghiandolari
- Possibilità di conservare il campione in fase liquida per poterlo riutilizzare per eventuali analisi di approfondimento senza dover ricorrere ad un nuovo prelievo.

Dopo la fissazione, si procede a colorare lo striscio con il metodo di Papanicolaou che consente la visualizzazione dei dettagli nucleari e la distinzione dei gradienti di basofilia e acidofilia (cheratinizzazione) citoplasmatica. L'ematossilina è il colorante nucleare; questa ha affinità per le nucleoproteine e colora i nuclei di rosso in ambiente acido, oppure di grigio-blu o viola in ambiente alcalino. Il colorante citoplasmatico è formato da una miscela di due coloranti: OG6 ed EA50. Questi due coloranti colorano il citoplasma con diverse colorazioni in base allo stato metabolico della cellula; in particolare OG6 è un colorante acido, monocromatico che negli strisci cervico-vaginali colora la cheratina dall'arancio brillante al giallo; EA50 è una miscela policroma composta da eosina, verde brillante e bruno di Bismarck che conferisce una colorazione del citoplasma che vira dal

verde al blu. Dopo la colorazione del preparato, avviene la chiarificazione o diafanizzazione delle cellule. Durante questa fase vengono usate sostanze che hanno un indice di rifrazione simile a quello del vetro. Questo consentirà al citologo di osservare il preparato al microscopio in modo ottimale; infatti l'indice di rifrazione è uno dei parametri in grado di influenzare il potere di risoluzione del microscopio. In seguito viene posta sul preparato la soluzione di montaggio che ha la funzione di tenere insieme il vetrino copri- e portaoggetto il più a lungo possibile e di proteggere il materiale cellulare dall'essiccamento e dal raggrinzimento. La soluzione di montaggio deve avere un indice di rifrazione il più prossimo possibile a quello del copri-oggetto, del campione cellulare e del vetrino porta-oggetto, in modo da rendere l'immagine microscopica il più trasparente possibile. A questo punto il vetrino può essere osservato al microscopio ottico da un citologo che lo valuterà seguendo i criteri morfologici del Sistema Bethesda del 2001 (17).

1.4 Classificazione del Pap-Test

Fino agli anni '80 i referti del Pap-test venivano descritti secondo diverse terminologie. Una delle prime classificazioni fu proposta da Georgios Papanicolaou, sulla base delle seguenti classi numeriche:

- Classe I: striscio chiaramente benigno (normale)
- Classe II: striscio con minime anomalie cellulari (infiammatorie) ma considerate benigne
- Classe III: striscio con evidenti anomalie cellulari, ma non chiaramente riferibili a neoplasia
- Classe IV: striscio "molto probabilmente" riferibile a neoplasia
- Classe V: striscio francamente maligno e quindi positivo per cancro.

Con il diffondersi del Pap test però, si sentì sempre più l'esigenza di modificare le originali classi di Papanicolaou con termini più rispondenti ai diversi quadri di patologia cervicale e

alle esigenze di una correlazione con il referto istologico. Infatti grazie all'avvento dello screening citologico fu appurato che le lesioni precoci differivano dal tumore invasivo. Questo fu possibile grazie a Reagan e collaboratori che introdussero nel 1953, il termine *displasia* per descrivere le lesioni precoci con un comportamento benigno non ancora degenerate verso il cancro invasivo, suddividendole in displasia lieve, moderata e grave (18). Richart RM nel 1973, suggerì il termine CIN (Cervical Intraepitelial Neoplasia) per enfatizzare il concetto di unicità del processo verso la progressione neoplastica che, iniziando dai tre gradi di displasia e passando dal carcinoma in situ, poteva arrivare al carcinoma invasivo (19). Per soddisfare le esigenze di terminologia, Richart applicò un grading di CIN secondo tre categorie: CIN I (corrispondente alla displasia lieve), CIN II (corrispondente alla displasia moderata) e CIN III (comprendente sia la displasia grave che il carcinoma in situ). Questa classificazione è tuttora utilizzata in istologia. (Figura 6).

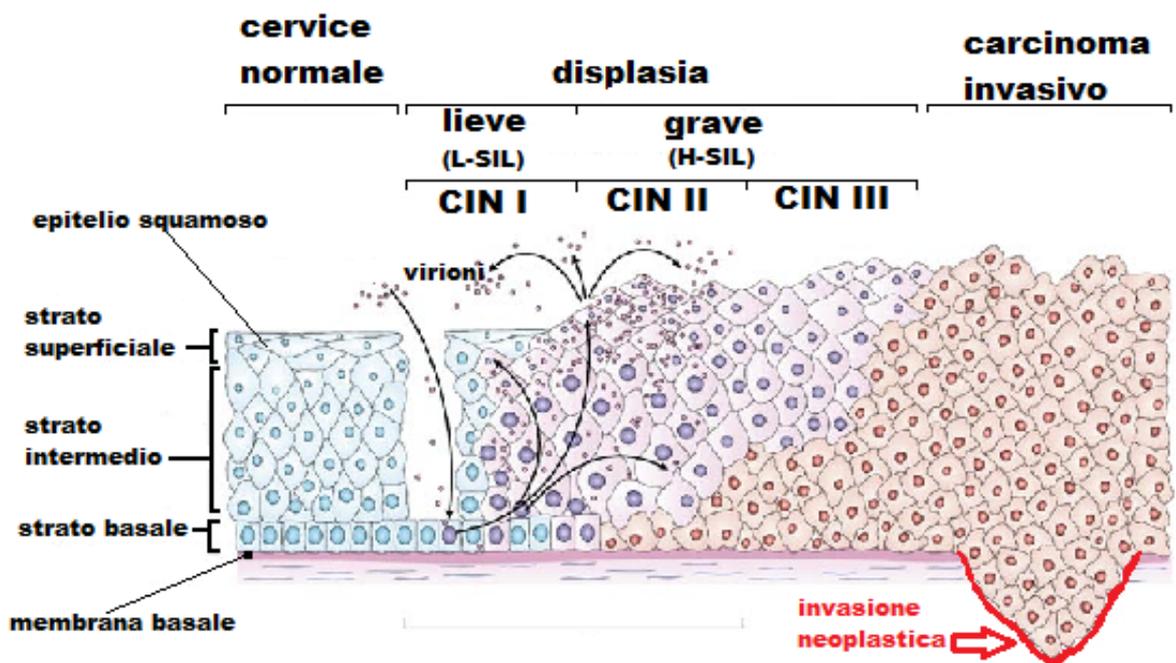


Figura 6: Classificazione CIN per la citologia cervicale

L'uso contemporaneo di differenti classificazioni ha generato confusione tra gli addetti ai lavori. Inoltre, la scoperta che la causa necessaria, ma non sufficiente per lo sviluppo del cancro della cervice è la presenza dell'hr-HPV e che non tutte le lesioni progrediscono verso il carcinoma, ma molte regrediscono spontaneamente, ha fatto nascere la necessità di creare una classificazione che considerasse maggiormente la biologia di questa infezione, che fosse universale e che migliorasse la riproducibilità di alcune classi diagnostiche. Per cui nel dicembre 1988 si costituì un gruppo di lavoro all'interno di un workshop organizzato dal National Cancer Institute nella città americana di Bethesda al fine di stabilire una terminologia diagnostica uniforme e capace di favorire la comunicazione tra laboratorio e clinico (20). Nella classificazione nata da quel gruppo di lavoro, denominata sistema Bethesda (TBS) non si parlava più di "displasia" o "neoplasia intraepiteliale", ma era stato introdotto il concetto di "lesione". Tutte le lesioni che anticipano il carcinoma, sono raggruppate in due classi: "Lesione Squamosa Intraepiteliale di basso grado" (LSIL), che corrisponde alla precedente classe CIN I (displasia lieve) e "Lesione Squamosa Intraepiteliale di alto grado" (HSIL), che corrisponde alle precedenti classi CIN II e CIN III.

Nella versione del 1988 del TBS fu introdotto per la prima volta, il termine citologico di "cellule atipiche di significato indeterminato" per indicare tutti quei casi di anormalità epiteliali, per i quali non si ha la certezza di essere in presenza di una lesione. Le cellule atipiche potevano essere squamose (ASCUS) o ghiandolari (AGUS) e la loro presenza prevedeva il consiglio di eseguire ulteriori indagini (20).

Questa categoria metteva in luce il costante conflitto esistente tra i patologi, non sempre in grado di decidere in termini di "bianco-nero" su un campione citologico ed istologico, ed i clinici, le cui decisioni devono rispondere più chiaramente ad un principio dicotomico, ovvero "trattare-non trattare" (20).

Nell'Aprile del 1991 si tenne un secondo workshop per valutare l'impatto del TBS sulla pratica ed apportare eventuali modifiche.

Secondo il TBS del 1991 rientrano nella categoria ASCUS "le anomalie nucleari che sono più marcate di quelle attribuibili a modificazioni reattive, ma che quantitativamente e qualitativamente non consentono di raggiungere una diagnosi definitiva di SIL" (21).

In questa versione del TBS si aggiunge la raccomandazione di specificare se l'orientamento diagnostico dell'ASCUS era favorevole ad un "processo reattivo" oppure ad una SIL (22).

La versione definitiva del TBS, a cui oggi si fa riferimento, è quella del 2001 che ha apportato ulteriori importanti modifiche, soprattutto nella valutazione del Pap-test e nella definizione delle classi ASCUS e AGUS (**Figura 7**). Infatti la categoria ASCUS è stata ridefinita come "cellule squamose atipiche" (ASC) e la categoria AGUS come "cellule ghiandolari atipiche" (AGC). La vera novità è stata l'eliminazione dell'orientamento diagnostico (*versus* reattivo o *versus* SIL) e l'introduzione di un'ulteriore suddivisione delle ASC in: "cellule squamose atipiche di significato indeterminato" (ASC-US) e "cellule squamose atipiche, non si esclude la presenza di una lesione squamosa intraepiteliale di alto grado" (ASC-H); quindi la nuova dizione di "cellule squamose atipiche" è la seguente: "*modificazioni citologiche suggestive di una lesione intraepiteliale squamosa, che sono qualitativamente insufficienti per una interpretazione definitiva*" (23).

Le ASC-US comprendono quadri morfologici indicativi di una lesione intraepiteliale lieve, mentre le ASC-H dovrebbero essere indicative di lesioni più gravi: da questo deriva un diverso VPP per CIN2+ tra le due classi diagnostiche (più alto per ASC-H). Si stima infatti che circa il 14% delle donne con ASC-US abbia un CIN2-3 istologico e che 1 su 1000 (0,1%-0,2%) abbia un carcinoma invasivo, mentre il VPP per CIN2+ di ASC-H è vicino al 50%. Le ASC-H sono quindi una classe dove è alta la probabilità di trovare lesioni con alto

rischio di progressione a carcinoma e per questo il follow-up di queste donne prevede l'invio immediato in colposcopia. Diversamente la categoria ASC-US ha un VPP per CIN2+ molto basso, ma non nullo, ed il follow-up utilizzato per queste pazienti prevede protocolli diversi a seconda delle linee guida adottate dalle strutture sanitarie, ossia ripetizione del Pap-test dopo 4, 6 o 12 mesi, test di triage con hr-HPV DNA, oppure invio in colposcopia.

Bethesda System 2001

ADEGUATEZZA DEL PREPARATO

- Soddisfacente per la valutazione (*segnalare la presenza / assenza di cellule cilindriche endocervicali / di componenti della zona di trasformazione*)
- Insoddisfacente per la valutazione (*specificare la ragione*)
- Rifiutato e non sottoposto a colorazione (*specificare la ragione*)
- Insoddisfacente per la valutazione di anomalità delle cellule epiteliali a causa di... (*specificare la ragione*)

CLASSIFICAZIONE GENERALE

- Negativo per lesioni intraepiteliali o maligne
- Anomalità delle cellule epiteliali
- Altro

DIAGNOSI DESCRITTIVA

NEGATIVO PER LESIONI INTRAEPITELIALI O MALIGNE

Organismi

- Trichomonas vaginalis
- Microrganismi fungini morfologicamente suggestivi di specie di *Candida*
- Presenza di flora suggestiva di "vaginosi batterica"
- Batteri compatibili con *Actinomiceti*
- Modificazioni cellulari compatibili con *Herpes simplex virus*

Modificazioni non neoplastiche

- Modificazioni cellulari reattive associate a:
 - Infiammazione (compresa la riparazione tipica)
 - Radiazioni
 - Dispositivi intrauterini (IUD)
- Presenza di cellule ghiandolari dopo isterectomia totale

ANORMALITÀ DELLE CELLULE EPITELIALI

Cellule squamose

- Cellule squamose atipiche (ASC) di incerto significato (ASC-US) non si può escludere l'H-SIL (ASC-H)
- Lesioni intraepiteliali squamose di basso grado (L-SIL) includenti: HPV/displasia lieve/CIN 1
- Lesioni intraepiteliali squamose di alto grado (H-SIL) includenti: displasia moderata e grave /CIN 2 e CIN 3/CIS
- Carcinoma squamocellulare

Cellule ghiandolari

- Cellule ghiandolari atipiche (AGC) (specificare se endocervicali, endometriali o non specificabili)
- Cellule ghiandolari atipiche suggestive di neoplasia (specificare se endocervicali, endometriali o non specificabili)
- Adenocarcinoma endocervicale in situ (AIS)
- Adenocarcinoma

Altro

- Cellule endometriali in donne ≥ 40 anni di età

Figura 7: riassunto delle principali modifiche apportate dal TBS 2001

1.5 Screening e follow-up pazienti

Nello screening citologico cervico-vaginale la metodica di riferimento è il Pap test. Molti lavori dimostrano che la sensibilità del Pap test non è molto alta, però è comunque un test efficace se inserito in un programma di screening (24). Infatti la lunga storia naturale dei precursori del cancro invasivo rende un test di moderata sensibilità, come il Pap test,

altamente protettivo all'interno di un programma di screening ripetuto e controllato nelle diverse fasi.

Se il Pap test della paziente è stato valutato come negativo, la donna sarà richiamata a ripetere il Pap test dopo 3 anni (che è il normale intervallo di screening adottato in Italia), altrimenti, in caso di presenza di anomalie cellulari (a partire dall'ASC-US fino a diagnosi più gravi), la paziente sarà monitorata affinché la lesione che le è stata riscontrata non progredisca verso la malignità o non regredisca a negativo.

A questo proposito entrano in gioco gli esami di secondo livello nello screening cervico-vaginale, quali il *test HPV* e la *colposcopia*.

- ❖ Il *test HPV* ha avuto la sua prima applicazione, proprio nel triage dell'ASC-US. Esso si basa sulla rilevazione del DNA dei vari tipi di HPV ad alto rischio, utilizzando sistemi in grado di individuare il gruppo di hr-HPV DNA tramite saggi qualitativi o semi-qualitativi nei quali il DNA dei tipi di HPV viene evidenziato usando un mix di sonde specifiche per gli hr-HPV; pertanto consentono la generica positività o negatività per il gruppo di HPV testato presente nel campione (6).
- ❖ La *colposcopia* permette di visionare a forte ingrandimento i genitali femminili (vulva, perineo, vagina, cervice uterina) servendosi, come strumento, del colposcopio. In presenza di uno striscio anormale è necessario localizzare colposcopicamente il sito da cui provengono le cellule anormali, valutare l'estensione e quindi ottenere la diagnosi istopatologica sulla base di biopsie mirate, eseguite sotto guida colposcopica. La sensibilità dell'esame colposcopico è di circa il 90% e la sua specificità può arrivare all'85% (25).

Solo per le ASC-US, in alcuni programmi di screening è adottata la ripetizione dell'esame citologico a distanza di 4-6-12 mesi di distanza; se le alterazioni cellulari dopo tale periodo sono scomparse, la donna rientra nel normale intervallo di screening. Se morfologicamente

si continua a vedere un'atipia (ASC-US+) è invece consigliabile eseguire una colposcopia (Figura 8).

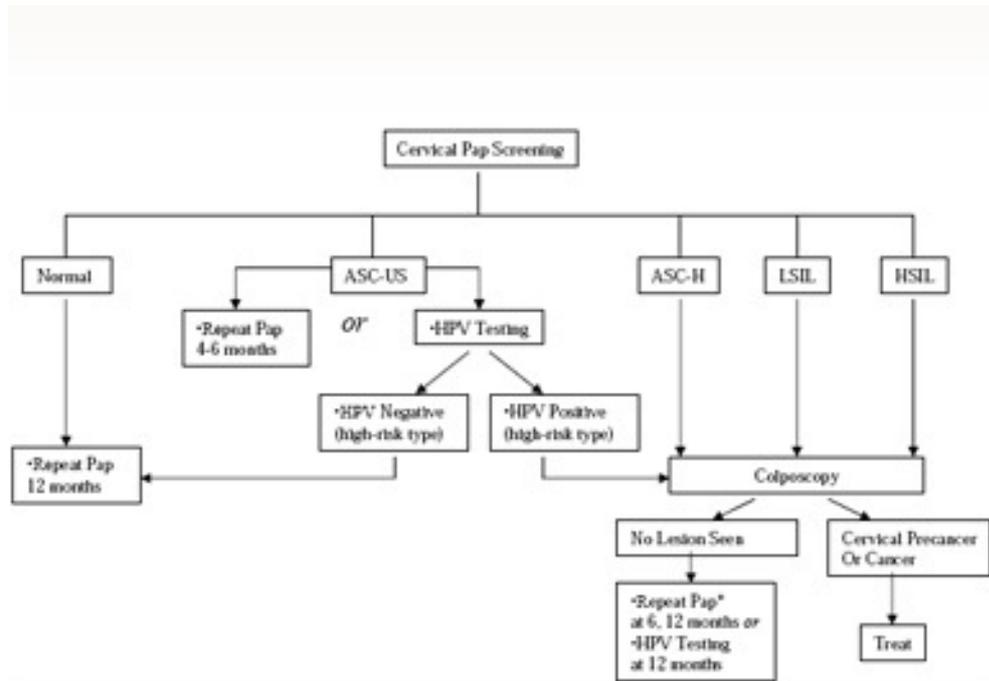


Figura 8: Algoritmo con Pap-test utilizzato come esame di primo livello

Al Convegno nazionale GISCI del 2012 è stato aggiornato il documento GISCI 2005/2007. In questo documento sono state presentate delle raccomandazioni, che forniscono il livello delle evidenze: il livello I si riferisce a prove ottenute da più studi clinici controllati randomizzati e/o da revisioni sistematiche di studi randomizzati, mentre la forza A indica che l'esecuzione di quella particolare procedura o test diagnostico è fortemente raccomandata sulla base di prove scientifiche di buona qualità (26) (Figura 9). Inoltre sono stati apportati aggiornamenti alla gestione del triage e alla gestione delle donne con citologia ASC-US, LSIL, AGC, ASC-H e HSIL e sono state fornite le indicazioni su come e quando è possibile inserire il test hr-HPV nel follow-up di queste pazienti (26).

Nel documento è stata data grande importanza all'utilizzo del test hr-HPV come triage per la gestione delle pazienti con diagnosi di ASC-US. Il documento GISCI si basa sul fatto

che il test hr-HPV abbia un alto valore predittivo negativo (probabilità che una donna con test HPV negativo sia davvero sana) e ciò permette di ridurre ed uniformare i controlli di follow-up.

RACCOMANDAZIONI GISCI:

Il triage delle ASC-US con HPV-hr viene fortemente raccomandato se la citologia è il test primario
Livello I Forza A

In caso di test HPV-hr negativo la donna deve rientrare nei normali intervalli di screening.
Livello I Forza A

In caso di test HPV-hr positivo si prevede l'invio in colposcopia
Livello I Forza A

Si raccomanda inoltre di porre particolare attenzione alla compliance al richiamo in due situazioni:

- nel 1° livello, quando non si utilizza la citologia in fase liquida, e quindi la donna viene invitata a ritornare per il prelievo per il test HPV-hr;
- nel 2° livello, quando la donna con un test HPV-hr positivo viene invitata ad effettuare la colposcopia.

Si sottolinea infine che il limitato numero di citologie ASC-US per programma induce a considerare l'eventuale centralizzazione degli HPV-hr di triage a livello regionale.

Figura 9: Raccomandazioni GISCI 2012 per la gestione dell'ASC-US in relazione al test HPV

Negli ultimi anni sta prendendo sempre più campo la citologia di Triage che comporta la lettura citologica esclusivamente dopo un test HPV positivo (17). Il citologo è consapevole che il Pap test proviene da una popolazione selezionata a rischio di patologia (test HPV positivo), ma anche che una sua valutazione negativa comunque non rimanda la paziente al normale intervallo di screening, bensì ad un controllo a 12 mesi con il test hr-HPV DNA.

1.6 ASC-US: quadri citologici e diagnosi differenziale

Le alterazioni cellulari della categoria ASC-US possono sottintendere un processo benigno esuberante o una lesione potenzialmente severa, non chiaramente classificabile; sono pertanto interpretate come alterazioni d'incerto significato.

Per quanto riguarda le caratteristiche citologiche riconducibili alla categoria ASC-US si può dire che: il nucleo è grande una e mezzo-due volte quello di una cellula squamosa intermedia normale con lieve aumento del rapporto nucleo/citoplasma con variazioni delle dimensioni e forma del nucleo e binucleazione. Talvolta è presente lieve ipercromasia: la cromatina non presenta comunque aspetto granulare ed è uniformemente distribuita; i bordi del nucleo sono generalmente lisci ed uniformi con lievi irregolarità (27).

L'ASC-US è una diagnosi di esclusione e si riferisce a quadri citopatologici non così ben definiti da consentire una valutazione più specifica. Nonostante i tentativi per stabilire dei criteri precisi per l'ASC-US, tale termine è usato dai patologi in diversi modi.

Le anomalie cellulari della categoria ASC-US hanno diversa eziologia, ma è impossibile definirne la causa in base al quadro citologico. Un'intensa reazione epiteliale ad un processo infiammatorio e riparativo e le alterazioni cellulari aspecifiche, che precedono o accompagnano una lesione intraepiteliale, possono avere analoghi caratteri citologici (28).

Le alterazioni da effetto citopatico da HPV sono classificate come LSIL e sono definite principalmente in base alla presenza di *coilociti* e *discheratociti*. I *coilociti* sono cellule squamose con nucleo ingrandito e ipercromatico che presentano un'ampia zona più chiara intorno al nucleo, ben definita e con margini irregolari (questo "alone perinucleare" è dovuto all'infezione virale che causa o il collasso dei filamenti citoplasmatici o la necrosi del citoplasma); il *discheratocita* invece è una cellula squamosa del tipo intermedio-parabasale, con il nucleo picnotico e il citoplasma intensamente orangiofilo, privo di alone perinucleare.

Le cellule che presentano solo alcuni di questi aspetti suggestivi di effetto citopatico da HPV, sono inserite nella categoria ASC-US.

I termini ipercheratosi, paracheratosi e discheratosi sono stati usati in passato senza un fondamento obiettivo e non rientrano nella terminologia del TBS. La classificazione delle

alterazioni cellulari, precedentemente indicate come "discheratosi", "ipercheratosi" e "paracheratosi, dipende da anomalie del nucleo e del citoplasma. Le irrilevanti cellule squamose mature poligonali anucleate, indicate come ipercheratosi, possono rappresentare un'alterazione cellulare benigna su base reattiva. In alternativa, può trattarsi di una contaminazione involontaria dello striscio con cellule squamose anucleate di origine vulvare. La presenza di piccole cellule squamose poligonali con denso citoplasma orangiofilo o eosinofilo e nucleo picnotico, cioè la cosiddetta *paracheratosi*, corrisponde generalmente ad un'alterazione benigna su base reattiva e non va quindi considerata come un'anomalia della cellula epiteliale. Tuttavia, le cellule esfoliate singolarmente o in gruppi tridimensionali con aspetto pleomorfo (forme caudate o allungate) e/o con aumento del volume o cromasia nucleare andrebbero classificate come ASC-US o SIL, secondo il grado delle anomalie cellulari (29, 30).

In presenza di tali dilemmi diagnostici, il citopatologo deve esaminare le anomalie morfologiche in base alla loro quantità e severità e nel contesto delle informazioni cliniche disponibili. Comunicando il proprio orientamento interpretativo al clinico, il citopatologo consente una migliore gestione del caso.

I dati disponibili indicano che in molti casi di ASC-US la paziente non ha lesioni significative: il follow-up citologico o le biopsie mirate risultano normali. Tuttavia in alcune pazienti le anomalie cellulari persistono e un numero significativo di queste mostrano una SIL in indagini successive. Per un giudizio conclusivo sull'evoluzione e la gestione di queste lesioni bisogna attendere i risultati di trial clinici ben controllati, in cui siano chiaramente stabiliti i criteri per l'ASC-US.

2. SCOPO DELLA TESI

La categoria ASC-US è stata una categoria problematica fin dalla sua introduzione, in quanto le modificazioni presenti possono essere equivoche. Infatti, insicurezza o problemi dovuti alle caratteristiche del materiale cellulare rischiano di far diventare tale categoria la roccaforte delle indecisioni. Per evitare, quindi, che ci possa essere un utilizzo non corretto della diagnosi ASC-US, all'interno di un programma di screening per il cervico-carcinoma, secondo il TBS la sua percentuale tra tutti i pap-test non deve superare il 5%. Tale categoria riveste tuttavia un ruolo importante; infatti, come riportato in letteratura, la sua eliminazione comporterebbe una diminuzione della sensibilità dello screening citologico. Inoltre, nonostante il rischio che una citologia ASC-US sottenda un carcinoma invasivo sia molto basso (0,1-0,2%), essa non può essere trascurata in quanto rende ragione di circa un terzo dei CIN2+ diagnosticati istologicamente.

Nel TBS 1991 le ASC-US venivano classificate come ASC-US verso un processo reattivo e ASC-US verso un processo displastico; questa suddivisione però comportava evidenti problemi di riproducibilità. Con il TBS 2001 fu suggerito di refertare come negative tutte le alterazioni morfologiche legate a processi reattivi e riparativi e mantenere all'interno della categoria ASC-US i quadri morfologici che potessero rappresentare un reale dubbio di diagnosi differenziale fra un negativo ed una lesione intraepiteliale.

Il protocollo di approfondimento applicato all'ISPO di Firenze per la categoria ASC-US prevede l'esecuzione del test hr-HPV. Nel caso l'esito del test sia negativo, la gestione della paziente è uguale a quella delle donne con un pap test negativo (screening a 3 anni). Nel caso di test hr-HPV positivo il protocollo prevede l'invio in colposcopia. Per questo motivo sarebbe importante individuare già dall'interpretazione citologica i quadri suggestivi di una eventuale presenza del virus; ciò permetterebbe di eliminare una buona

percentuale di sovradiagnosi citologiche e di risparmiare i costi per l'esecuzione dei test di approfondimento.

Questa tesi si propone di rivalutare un campione di citologie ad esito ASC-US con test di triage negativo per hr-HPV, in modo da individuare quante siano state le sovradiagnosi evitabili e quali potrebbero essere le caratteristiche morfologiche riproducibili, tali da riconfermare le diagnosi espresse. Tutto ciò aiuterebbe ad uniformare il più possibile il giudizio clinico di questa categoria e incentivare il citologo ad utilizzarla solo nel caso di una reale incertezza diagnostica.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Pazienti

Nella Regione Toscana la funzione di centro di riferimento per gli screening oncologici è affidata all'Istituto per lo Studio e la Prevenzione Oncologica (ISPO) di Firenze che dagli anni '80 ad oggi ha acquisito una notevole esperienza nel campo dello screening per il tumore della cervice uterina.

Nella regione Toscana, lo screening cervicale è attivo su tutto il territorio dal 2004 e il laboratorio di citopatologia dell'ISPO esegue tutti gli esami di screening per il programma del capoluogo toscano. Il test di screening usato nella prevenzione del tumore alla cervice uterina è attualmente il Pap test e il sistema di refertazione è il TBS 2001.

Secondo il quattordicesimo rapporto annuale dei programmi di screening della regione Toscana (31), nel 2012 sono state invitate 337.747 donne della fascia d'età 25-64 anni con un valore medio di estensione aggiustata pari al 102,9% della popolazione regionale bersaglio/anno (range 77,1-123,3%), di cui hanno risposto all'invito in 173.523 (in leggero aumento percentuale rispetto al 2011). Nella sola area fiorentina sono stati valutati 42.148 Pap test, rappresentando da sola il 24% dell'intera regione. Nella **tabella 1** è riportata la distribuzione dei risultati citologici per l'Azienda USL 10 Firenze e per la Regione Toscana (i dati sono riferiti all'anno 2012).

In regione Toscana la gestione delle ASC-US per l'anno 2012 è diversificata secondo i tre protocolli previsti dalle raccomandazioni del GISCI:

- invio diretto a colposcopia: Aziende USL 5 Pisa, USL 7 Siena, USL 8 Arezzo (a giudizio del lettore), USL 12 Viareggio per i primi 4 mesi dell'anno e USL 1 Massa e Carrara.

<u>Diagnosi citologica (TBS2001)</u>	<u>Regione Toscana</u>		<u>Area fiorentina</u>	
	<u>N°</u>	<u>%</u>	<u>N°</u>	<u>%</u>
Cancro	7	0.004%	3	0.007%
HSIL	376	0.2%	89	0.21%
LSIL	1794	1,04%	260	0.62%
ASC-H	231	0.1%	73	0.17%
ASC-US	1901	1,1%	443	1.05%
AGC	146	0.08%	25	0.06%
Negativo	166869	96.16%	40882	97%
Insoddisfacente	2`199	1.27%	373	0.88%
TOTALE	173523	100%	42148	100%

Tabella 1: distribuzione dei risultati citologici per la regione Toscana e per l'USL 10 (Firenze)

Quest'ultimo programma è stato inserito in questa sezione perché per il triage delle ASC-US non è stato utilizzato un test HPV ad alto rischio come raccomandato dalle Linee Guida Nazionali (32), ma è stato utilizzato un test per HPV ad alto e basso rischio, che è risultato positivo nel 98% dei casi. Pertanto, praticamente, tutte le donne con citologia ASC-US sono state inviate in colposcopia;

- ripetizione citologica a 6 mesi: Aziende USL 2 Lucca, USL 3 Pistoia, USL 4 Prato, USL 6 Livorno e USL 8 Arezzo (a giudizio del lettore);

- triage con test HPV-hr: Aziende USL 9 Grosseto, USL 10 Firenze, USL 11 Empoli e USL 12 di Viareggio.

L'estrema variabilità, nella frequenza e nel valore predittivo delle ASC-US, fra i programmi di screening (i.e. laboratori di citologia) indica l'utilizzo di criteri morfologici non univoci ed ha come conseguenza una scarsa riproducibilità inter-laboratorio, messa in evidenza da numerosi studi di concordanza (33, 34). La ripetizione del test citologico a sei

mesi risulta non efficace in quanto una percentuale significativa di donne segue percorsi e procedure al di fuori del programma di screening.

Studi di ampie dimensioni (35, 36) hanno evidenziato come il test hr-HPV DNA nel triage sia in grado di fornire una sensibilità comparabile a quella della colposcopia immediata nell'identificazione di lesioni CIN2+, riducendo il numero di donne inviate in colposcopia; viceversa le donne che risultano negative al test sono a minimo rischio di lesioni CIN2+.

Passando all'analisi dell'USL 10 di Firenze relativamente ai casi ASC-US, a seguito di test HPV si sono ottenuti i seguenti risultati :

- 281 casi di HPV ad alto rischio positivi;
- 230 casi di HPV ad alto rischio negativi;
- 96 casi di donne che non hanno effettuato il test HPV.

Si noter  subito la diversit  del dato totale degli ASC-US riportato in **tabella 1** (443) e il totale (607) analizzato rispetto al triage effettuato con HPV: questo perch  la tabella comprende solo gli esami di screening effettuati all'ISPO nel 2012, mentre il totale dei casi ASC-US comprende anche i Pap test extrascreening e quelli volontari. Dei 230 casi negativi, abbiamo estrapolato i primi 103 campioni in ordine cronologico di lettura e li abbiamo sottoposti a rivalutazione citologica, oggetto della presente tesi.

La revisione dei preparati citologici   stata eseguita, in cieco rispetto al follow-up, dal candidato, sotto la supervisione di una citologa esperta (S. C.).

3.2 Criteri morfologici di riferimento per ASC-US

Nel Laboratorio di Citopatologia dell'ISPO i criteri utilizzati per l'interpretazione di "Cellule squamose atipiche di significato incerto" (ASC-US) sono quelli descritti nel TBS 2001 (17):

- Il nucleo è grande una e mezzo-due volte quello di una cellula squamosa intermedia normale con lieve aumento del rapporto nucleo/citoplasma;
- Si possono osservare variazioni delle dimensioni e forma del nucleo e binucleazione;
- Talvolta è presente lieve ipercromia: la cromatina non presenta comunque aspetto granulare ed è uniformemente distribuita;
- I bordi del nucleo sono generalmente lisci ed uniformi: si possono osservare lievi irregolarità;
- Presenza di lieve discheratosi o paracheratosi.

3.3 Coloratore di vetrini automatizzato

Per la colorazione dei vetrini secondo il metodo di Papanicolaou, è stato utilizzato un coloratore automatizzato (AutostainerXL©Leica) (**Figura 10**), sistema che combina un coloratore e un montavetrini.



Figura 10: Coloratore automatizzato AutostainerXL (Leica)

Il coloratore riesce a colorare 30 vetrini per ciclo, è provvisto di varie postazioni per caricare i reagenti e gli scarichi e prevede diversi programmi da impostare.

Il metodo Papanicolaou prevede l'utilizzo di 3 soluzioni coloranti : ad una colorazione nucleare blu dovuta all'Ematossilina di Harris si associa una colorazione citoplasmatica ad opera della miscela policroma EA50 che permette di differenziare le cellule e gli elementi eosinofili dai cianofili. La soluzione OG6 completa la policromia del metodo colorando gli elementi cheratinizzati.

Metodo: 1) Etanolo 95° 2 minuti 2) Acqua distillata 2 minuti 3) Ematossilina di Harris 1minuto 4) Acqua corrente 5 minuti 5) Etanolo 95° 15 secondi 6) OG6 2 minuti 7) Etanolo 95° 15 secondi (2 volte) 8) EA50 5 minuti 9) Etanolo 95° 15 secondi 10) Etanolo assoluto 30 secondi (2 volte) 11) Xilene o Bio Clear 2 minuti (2 volte).

Il risultato delle letture al microscopio ottico, prevede le seguenti colorazioni per le componenti cellulari:

Nuclei.....blu-viola

Citoplasma basofilo.....blu-verde

Citoplasma eosinofilo.....rosa

Citoplasma cheratinizzato.....da rosa ad arancio

Una volta allestiti i vetrini, sono state eseguite le letture al microscopio ottico (Olympus BX43) agli ingrandimenti di 10x 20x e 40x; le foto sono state invece effettuate tramite la Fotocamera Olympus DP 21.

3.4 Metodo per la ricerca di HPV DNA (HC2 High-Risk)

I sistemi in grado d'individuare il gruppo di hr-HPV DNA sono saggi qualitativi o semi-qualitativi nei quali il DNA dei genotipi di HPV viene evidenziato usando un mix di sonde specifiche per gli hr-HPV, pertanto non consentono l'identificazione del tipo di HPV

presente nel campione, ma piuttosto la generica positività o negatività per il gruppo di HPV testato. Nel presente caso, è stato utilizzato il sistema Digene HC2 High-Risk HPV DNA (QIAGEN GmbH, Germany), attualmente considerato il saggio con il più collaudato valore diagnostico per hr-HPV, rappresentando un test di rischio oncogeno, non un test virologico classico (37). Il test utilizza la tecnologia Hybrid Capture 2 (HC2), ossia un test d'ibridazione dell'acido nucleico in micropiastra con amplificazione del segnale, che si avvale della chemiluminescenza per la rilevazione qualitativa di tredici tipi di DNA dell'hr-HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68) in campioni cervicali. Le cellule esfoliate sono trattate con un reagente alcalino e il loro DNA viene denaturato al calore; il DNA a singolo filamento può così legarsi in condizioni altamente stringenti, con un mix di sonde full length non marcate a singolo filamento di RNA. Gli ibridi RNA/DNA risultanti vengono catturati sulla superficie di una micropiastra rivestita di anticorpi specifici per tali ibridi; gli ibridi immobilizzati vengono quindi fatti reagire con anticorpi coniugati con fosfatasi alcalina specifici per gli ibridi RNA/DNA, successivamente rilevati mediante un substrato chemiluminescente (37). Ad ogni anticorpo sono coniugate varie molecole di fosfatasi alcalina: più anticorpi coniugati si legano ad ogni ibrido catturato, dando luogo ad una sostanziale amplificazione del segnale. Poiché il substrato viene scisso dalla fosfatasi alcalina legata, si verifica l'emissione di luce, misurata da un luminometro e quantificata in unità di luce relative (RLU) (**Figura 11**). L'intensità della luce emessa denota la presenza o l'assenza di DNA bersaglio nel campione. Una misurazione di RLU uguale o superiore al valore soglia indica la presenza nel campione di sequenze di DNA di hr-HPV. Una misurazione di RLU inferiore al valore soglia indica l'assenza delle sequenze di DNA dell'hr-HPV specifiche o livelli di DNA dell'hr-HPV inferiori al limite di rilevazione del test. Il cut-off usato per discriminare un campione positivo da uno negativo è di 1 pg/ml, che corrisponde a circa 5000 copie per test (37).

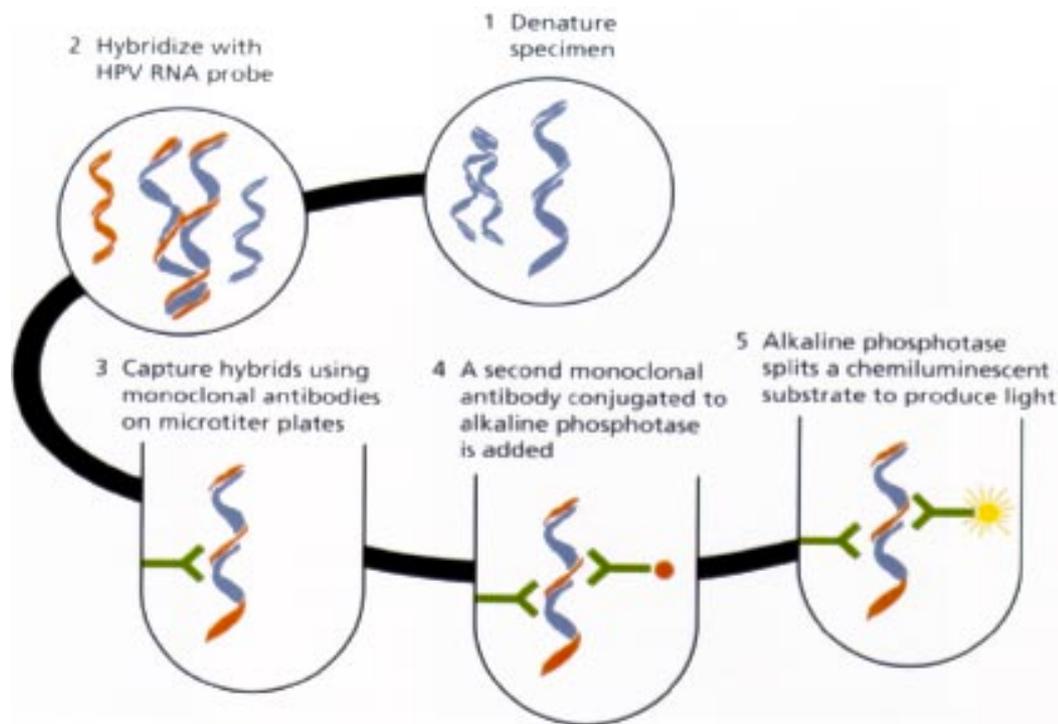


Figura 11: Riassunto del processo ibridazione HC2

In realtà, i campioni definiti negativi, dal punto di vista laboratoristico non sono tutti uguali, perché hanno una gamma di valori riportati come RLU/CO molto ampia (da 0,01 a 0,99). Nello specifico, i campioni sotto 0,20-0,30 probabilmente sono veri “HPV-negativi”, tuttavia, i campioni con valori di RLU/CO tra 0,31 e 0,99 potrebbero avere HPV ad alto rischio presente, ma a un valore inferiore alla soglia di sensibilità del metodo HC2 (con percentuali variabili a seconda del valore e tanto più possibile quanto il valore in RLU/CO si avvicina al cut-off). Con metodi più sensibili, questi campioni potrebbero risultare positivi e questo è tanto più probabile quanto più il valore si avvicina al cut-off: ciò è plausibile perché HC2 ha una sensibilità dichiarata di 5000 copie di HPV per test e altri test di nuova uscita una sensibilità di 500 copie, cioè ben 10 volte superiore a quella di HC2. Questa “bassa” sensibilità analitica di HC2 ha determinato un’ottimale performance clinica del test, ma non dimentichiamoci dell’alto valore predittivo negativo dello stesso test, ossia dei casi di hr-HPV positivi, risultati poi negativi al controllo citologico (37).

4. RISULTATI

Lo studio condotto è di tipo retrospettivo basato sulla rivalutazione di 103 casi di donne con diagnosi citologica di ASC-US e test negativo per la ricerca di hr-HPV. Per ciascuna paziente inoltre è stata considerata l'età e il tipo di alterazione presente nel vetrino, prendendo in particolare riferimento il nucleo.

4.1 Età delle pazienti

E' stata calcolata la media aritmetica dell'età delle 103 pazienti, ed è stata elaborata la tabella riportata di seguito (**Tabella 2**):

Età (anni)	Frequenza
32	1
33	1
34	2
35	1
36	2
37	5
38	4
39	3
40	7
41	5
42	5
43	3
44	6
45	6
46	3
47	10
48	11
49	4
50	3
51	9
52	1
53	2
54	1
57	2
58	3
60	2
61	1

Tabella 2: Età delle pazienti e loro frequenza

La media aritmetica calcolata sulla base delle frequenze è stata di **45,4 anni**, mentre gli altri indici di posizione hanno riportato un valore di **46 anni** per la mediana e **48 anni** per

la moda (**Grafico 1**). Inoltre, quasi la metà delle pazienti (47,5%) risulta compresa nella fascia 47-61 anni, ossia in una fase fisiologica in cui la donna presenta delle alterazioni ormonali con conseguenti risultati sullo striscio vaginale (menopausa, atrofia, etc...); tutto ciò potrebbe portare il citologo a fare una diagnosi di ASC-US con più facilità, dato il quadro cellulare atipico da valutare.

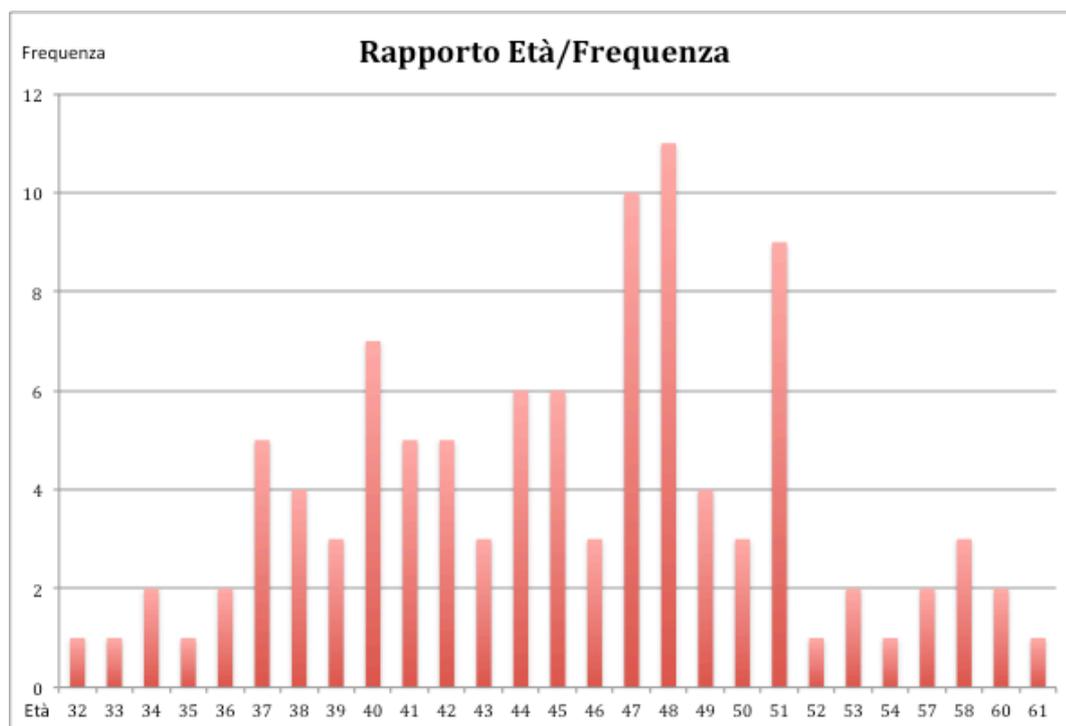


Grafico 1: Distribuzione età pazienti in relazione alla frequenza

4.2 Risultati test HPV (HC2)

Come accennato sopra, abbiamo selezionato tra i casi ASC-US del 2012, 103 casi con esiti molecolari negativi per la ricerca dell'hr-HPV; di seguito abbiamo riportato i valori di tale test (**Tabella 3**), raggruppati in ordine crescente e semplificati con le frequenze dei risultati ottenuti (si ricorda che il cut-off per esprimere parere negativo è 1,0):

Valore HC2	Frequenza (volte)
0,07	2
0,08	3
0,10	8
0,11	6
0,12	5

0,13	4
0,14	5
0,15	9
0,16	7
0,17	4
0,18	7
0,19	5
0,20	1
0,21	2
0,22	5
0,23	3
0,24	1
0,25	1
0,26	1
0,27	3
0,28	3
0,30	4
0,31	4
0,32	1
0,34	1
0,35	1
0,37	1
0,41	1
0,45	1
0,47	1
0,59	1
0,62	1
0,82	1

Tabella 3: Risultati test Hc2 delle pazienti con relative frequenze

Concentrando l'attenzione sui 10 valori di HC2 più elevati (da 0,32 a 0,82) e correlandoli con la lettura al microscopio dei relativi vetrini, possiamo affermare che 7 di loro presentavano degli aloni piuttosto evidenti (**Figura 12**) anche se non molto frequenti e soprattutto in assenza di ingrandimenti nucleari o con ingrandimenti minimi. Inoltre in 4 casi su 7 oltre agli aloni, si segnalava la presenza di discheratociti, dando il sospetto di presenza di HPV a basso rischio.

4.3 Discheratosi/Paracheratosi

Il 26,21% (27/103) delle pazienti ha evidenziato nello striscio vaginale la presenza di discheratociti, mentre solo il 3% (3/103) evidenziava segni di paracheratosi (**Figura 13**). Dei 27 vetrini, una buona parte (18/27) riguardava pazienti raggruppate nella fascia dai 47 ai 61 anni, supponendo il fatto che tali fenomeni possano dipendere o dalla degenerazione cellulare dettata dall'età o dalla presenza di HPV a basso rischio (**Figura 14**).

4.4 Agenti infettivi

Per quanto riguarda le infezioni batteriche e micotiche riscontrate da questa revisione citologica, esse sono state segnalate in quanto potrebbero essere proprio la causa di alcune degenerazioni e/o alterazioni viste dall'operatore che ha indicato la diagnosi di ASC-US, non potendo escludere al momento della lettura citologica la compresenza dell'HPV. Il 16,5% (17/103) presentava un agente eziologico ben riconoscibile in maniera univoca, in particolare di questi 17 pazienti, l'11,7% (2/17) ha evidenziato presenza di spore di Candida, il 35,3% (6/17) di Coccobacilli, il 47% (8/17) di Gardnerella Vaginalis e un solo caso (6%) aveva una coinfezione di Attinomiceti e Coccobacilli.

4.5 Analisi nucleo

Passando all'analisi del nucleo, che ha determinato la principale discriminante nella rivalutazione citologica dei casi ASC-US, sono state prese in considerazione tre caratteristiche: ingrandimenti, ipercromasia e irregolarità dei contorni nucleari.

Per quanto riguarda gli ingrandimenti, essi sono stati stimati confrontandoli con i nuclei picnotici delle cellule superficiali contigue, e hanno dato risultati variabili da 1,5 volte più grandi fino a 3,5 volte (**Grafico 2**). I risultati ottenuti sono stati i seguenti:

Il 22,3% (23/103) non presentava ingrandimenti nucleari.

Il 20,4% (21/103) presentava ingrandimenti nucleari di circa 1,5 volte;

Il 22,3% (23/103) presentava ingrandimenti nucleari di circa 2 volte;

Il 19,4% (20/103) presentava ingrandimenti nucleari di circa 2,5 volte (**Figura 15**);

L'11,6% (12/103) presentava ingrandimenti nucleari di circa 3 volte;

Il 3,9% (4/103) presentava ingrandimenti nucleari di circa 3,5 volte (**Figura 16**);

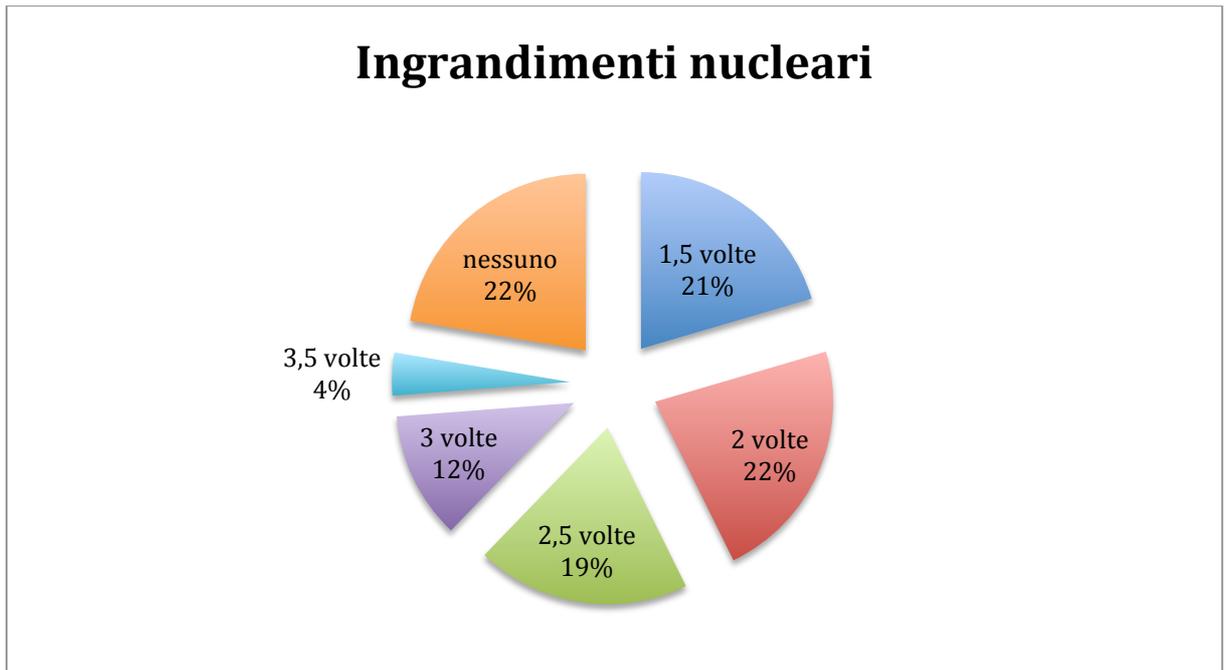


Grafico 2: Suddivisione degli ingrandimenti nucleari rispetto a squamose superficiali normali

Analizzando i risultati delle 16 pazienti che hanno mostrato ingrandimenti maggiori (3/3,5 volte), è emerso il dato interessante che il 75% (12/16) di esse, presentava un fondo del vetrino fortemente flogistico, con infiltrato infiammatorio notevole e in moltissimi casi (8/12) presenza di emazie; questi dati potrebbero avvallare l'ipotesi che gli ingrandimenti nucleari, in assenza dell'hr-HPV, sarebbero conseguenza del fisiologico fenomeno riparativo/rigenerativo a cui l'epitelio, in presenza di danno, è sottoposto (**Figura 17**).

Tra i 23 casi di vetrini che non presentavano alcun ingrandimento, il 52% (12/23) mostrava qualche forma nucleare irregolare, spesso allungata o lievemente frastagliata, ma non tale

da dare sospetti di lesione, mentre il restante 48% (11/23) non ha evidenziato alcuna caratteristica riconducibile ad anomalie nucleari tendendo verso la refertazione di negatività. Altro aspetto interessante di questi strisci è che il 70% (16/23) non ha riscontrato segni di flogosi (leucociti e/o emazie), lasciando intendere l'assenza di un agente eziologico infettivo.

Infine il 43% (10/23) presentava di sovente dei piccoli o discreti aloni intorno alle cellule superficiali, lasciando presagire all'operatore durante la lettura, la presenza dell'HPV (**Figura 18**), smentita poi dalla negatività del test per lo stesso virus ad alto rischio. Interessante è un dato relativo a questi ultimi 10 casi citati: di essi infatti, la metà (5/10) ha effettuato in passato colposcopie o test hr-HPV risultati positivi; per la precisione: 2 pazienti hanno riscontrato in passato un condiloma piano all'esame colposcopico, una paziente ha avuto un referto di displasia moderata, un'altra con esito di displasia grave e addirittura è stato registrato un caso di una signora che aveva effettuato il test per l'hr-HPV 7 mesi prima con esito positivo, poi non rilevato al prelievo successivo. Questi dati sono degni di segnalazione in quanto le cellule della cervice sono entrate in contatto con il virus nel periodo antecedente e seppur negativizzato, quindi escludendo la comparsa di una lesione, possono portare ancora i segni citopatici di tale infezione.

4.5.1 Ipercromasia

Per continuare l'analisi dei nuclei delle cellule presenti nel Pap-test, altra caratteristica che è stata valutata è l'ipercromasia; il risultato ha portato ad identificare 59/103 casi di nuclei ipercromatici, da cui si deduce che il 43% (44/103) dei nuclei totali non ha mostrato segni d'ipercromasia. Inoltre tra i 59 casi d'ipercromasia, 42/59 (41% dei totali) sono stati riscontrati tra le cellule che presentavano ingrandimenti nucleari importanti (2/3,5 volte) (**Figura 19**), mentre i restanti 17/59 (16%) riguardavano nuclei con ingrandimenti minori e

in due casi anche nuclei non ingranditi (**Grafico 3**). Infine, analizzando l'ipercromasia nei tipi cellulari, il 30% (18/59) è stato evidenziato nelle cellule endocervicali e il restante 70% nelle cellule superficiali (41/59). Ad ogni modo tutti i casi d'ipercromasia hanno mostrato caratteristiche nucleari riconducibili a cellule non neoplastiche, ossia cromatina finemente dispersa e nucleoli di numero e dimensione costanti (nella maggior parte singoli e piccoli).

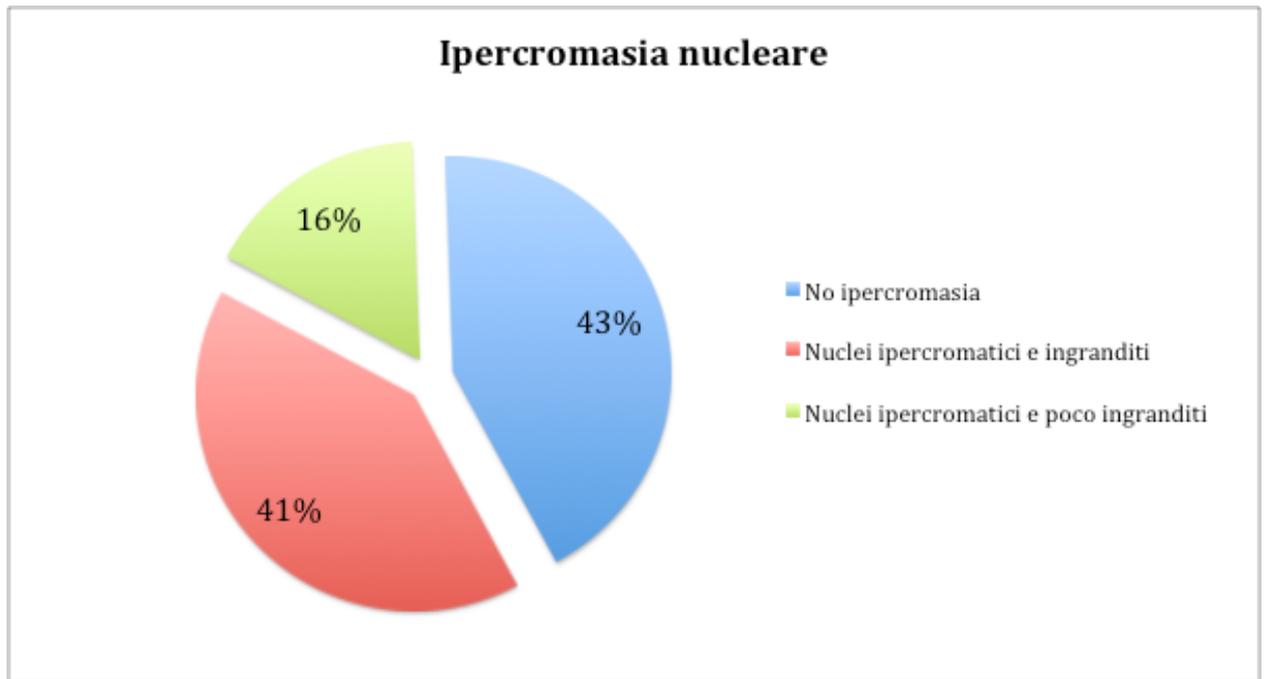


Grafico 3: Percentuali di cellule raggruppate secondo il parametro dell'ipercromasia

4.5.2 Polimorfismo nucleare

L'ultima analisi che è stata effettuata tra le caratteristiche nucleari è stata per la presenza di forme irregolari, in particolare le eventuali binucleazioni. Il riscontro di polimorfismo nucleare è avvenuto nel 60% dei casi (62/103). Sono state considerate anche irregolarità lievi (**Figura 20**), che potrebbero essere state causate dalla cattiva conservazione del campione o da difetti causati dall'esecuzione dello striscio. Tra le 62 pazienti con nuclei irregolari, il 34% (21/62) presentavano delle binucleazioni (**Figura 21**), dato importante perché sintomo di una reattività.

4.6 Schema riassuntivo risultati

La revisione ha evidenziato 44 casi di ASC-US con ingrandimenti nucleari assenti o minimi (1,5 volte rispetto al nucleo picnotico delle cellule squamose superficiali); tra questi 44 casi, 23 sono stati riclassificati come negativi in quanto non presentavano alcun altro segno sospetto. I rimanenti 21 casi presentano una maggiore difficoltà d'interpretazione, potendo tendere sia verso la refertazione di negatività sia verso quella di ASC-US, per la presenza o di lievi irregolarità morfologiche nucleari o di aloni perinucleari appena accennati o di ipereosinofilia citoplasmatica.

Inoltre, tra i 59 casi con ipercromasia nucleare, 42 casi presentavano anche ingrandimenti nucleari importanti (da 2 a 3,5 volte). Questi 42 casi rappresentano i casi sicuramente riconfermabili con la diagnosi di ASC-US e probabilmente legati ad una infezione da HPV a basso rischio. I rimanenti 17 casi di questo gruppo presentano atipie meno marcate e quindi di più difficile interpretazione diagnostica.

In totale i casi d'inquadramento non chiaro sono 38 (21+17) e rappresentano il 37% dei casi totali analizzati, delineando la categoria citologica su cui bisognerebbe migliorare la scelta dei criteri morfologici ascrivibili ad ASC-US (**Grafico 4**).

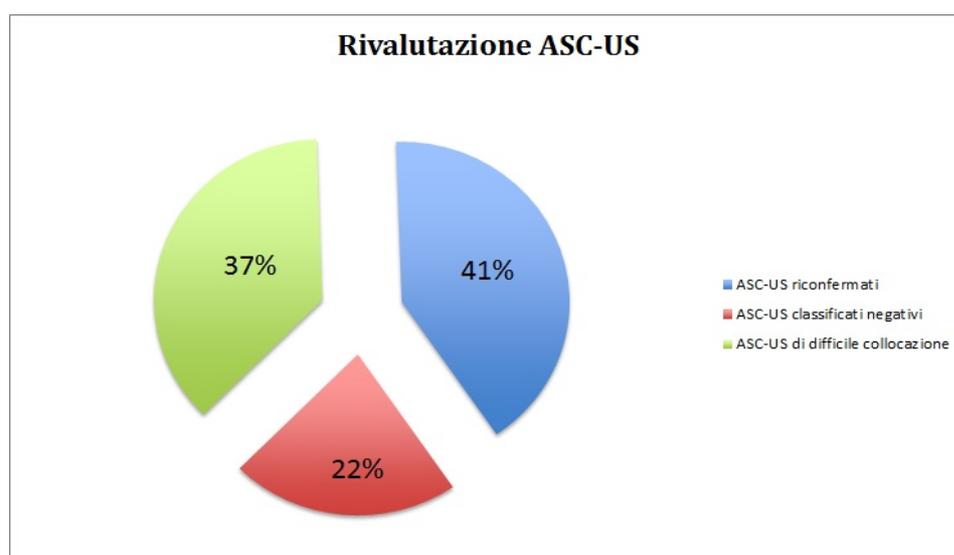


Grafico 4: Rivalutazione casi ASC-US secondo riconfermati e riclassificati.

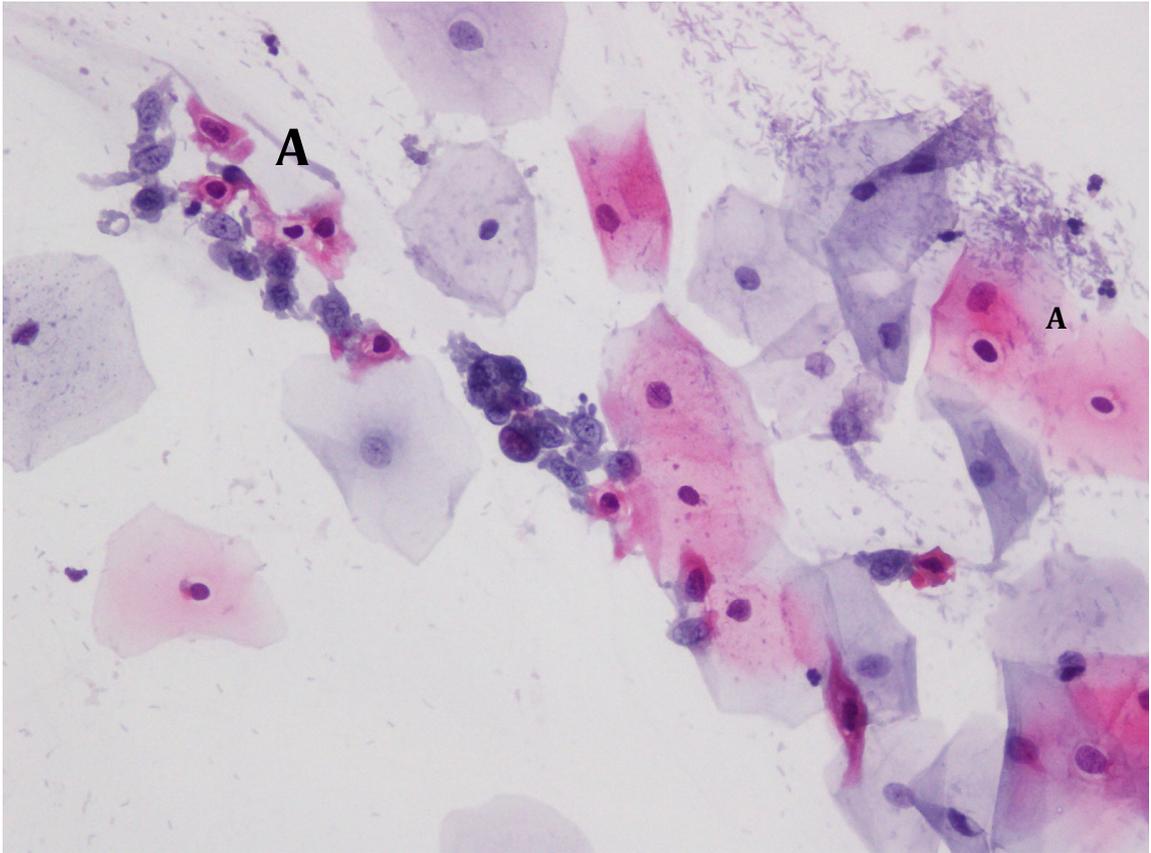


Figura 12: Cellule squamose con aloni ben evidenti (A) e nuclei regolari (40x)

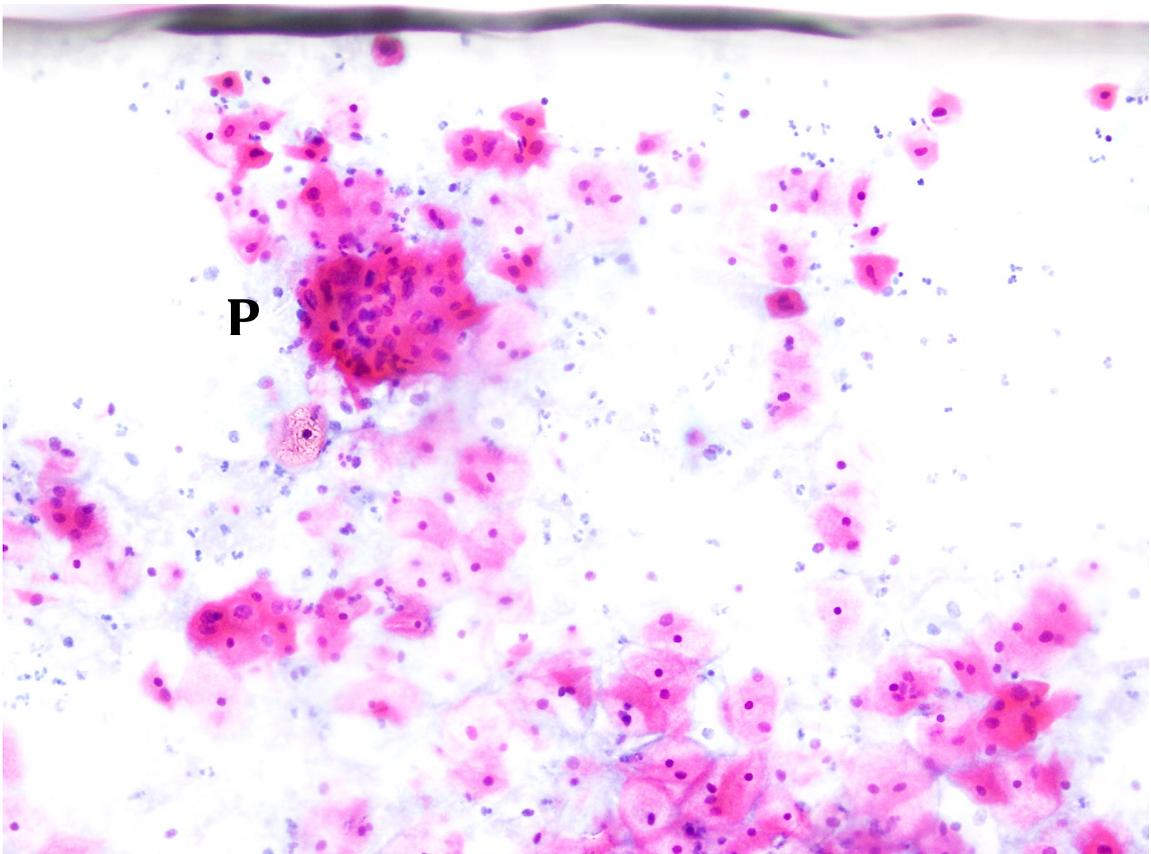


Figura 13: Gruppo di cellule con importante paracheratosi (P) (citoplasma orangiofilo) (20x)

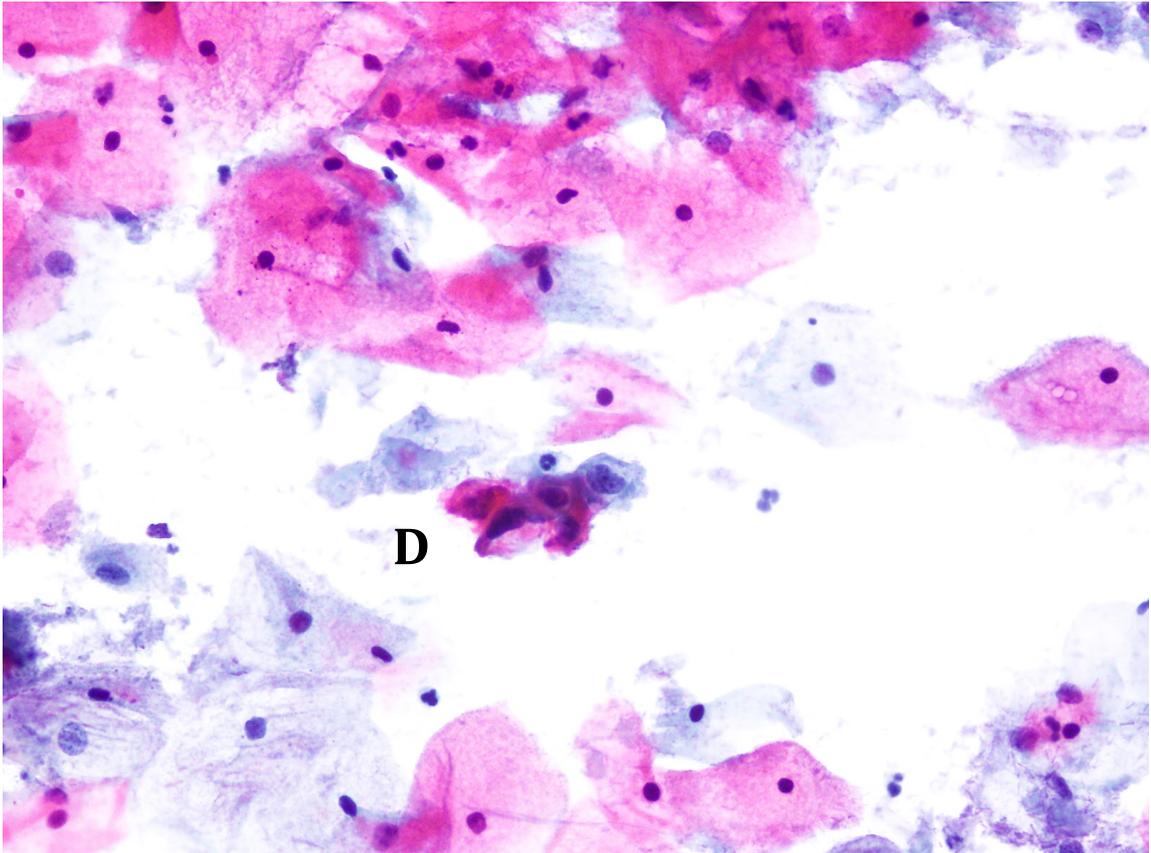


Figura 14: Discheratociti (D) con effetto citopatico (40x)

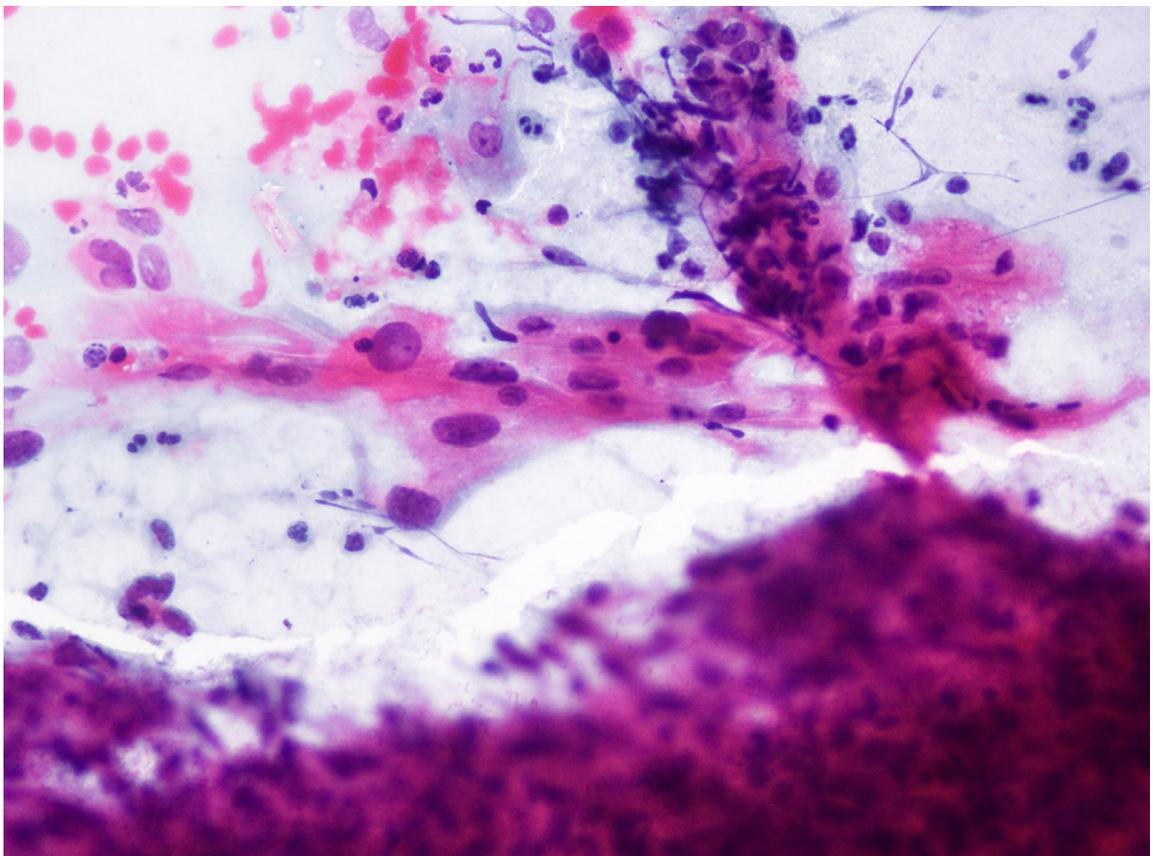


Figura 15: Ingrandimenti nucleari su cellule superficiali (40x)

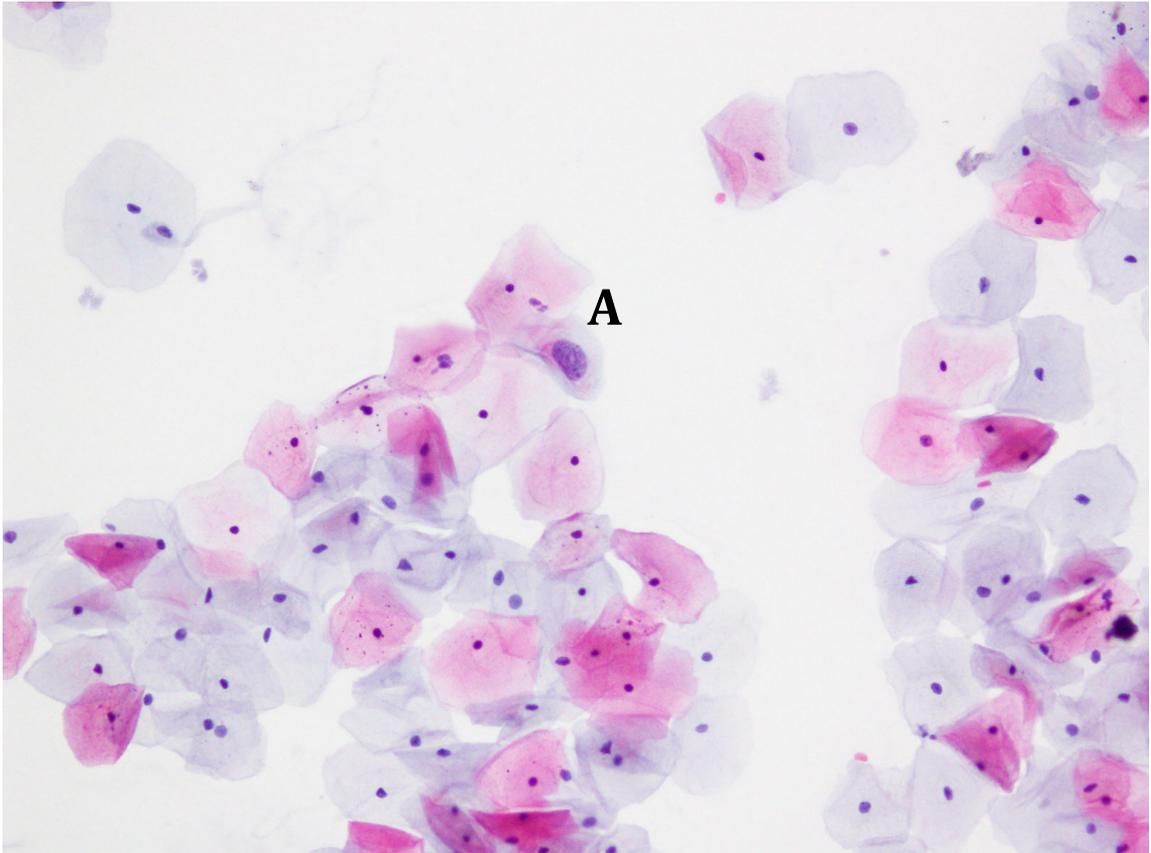


Figura 16: Cellula (A) con nucleo ingrandito 3,5 volte rispetto alla normale superficiale (20x)

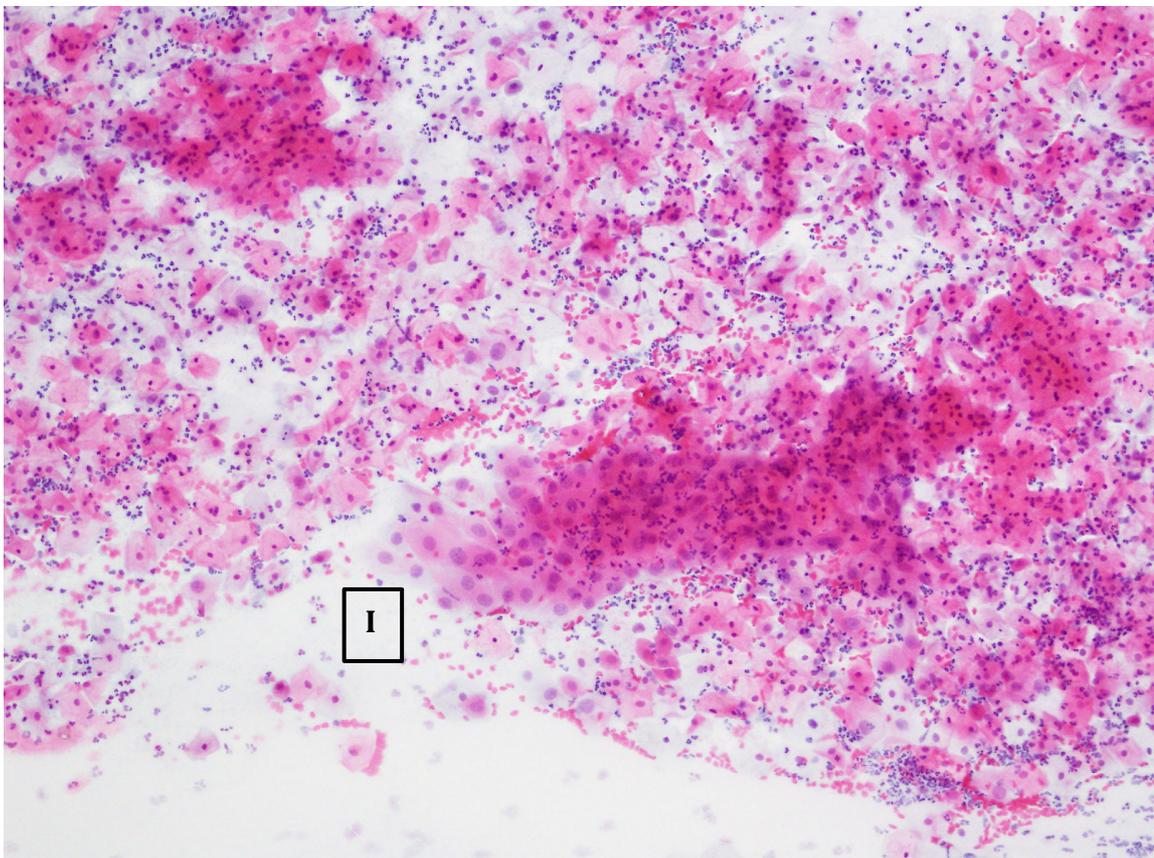


Figura 17: Ingrandimenti nucleari (I) (3,5 volte) con importante flogosi (10x)

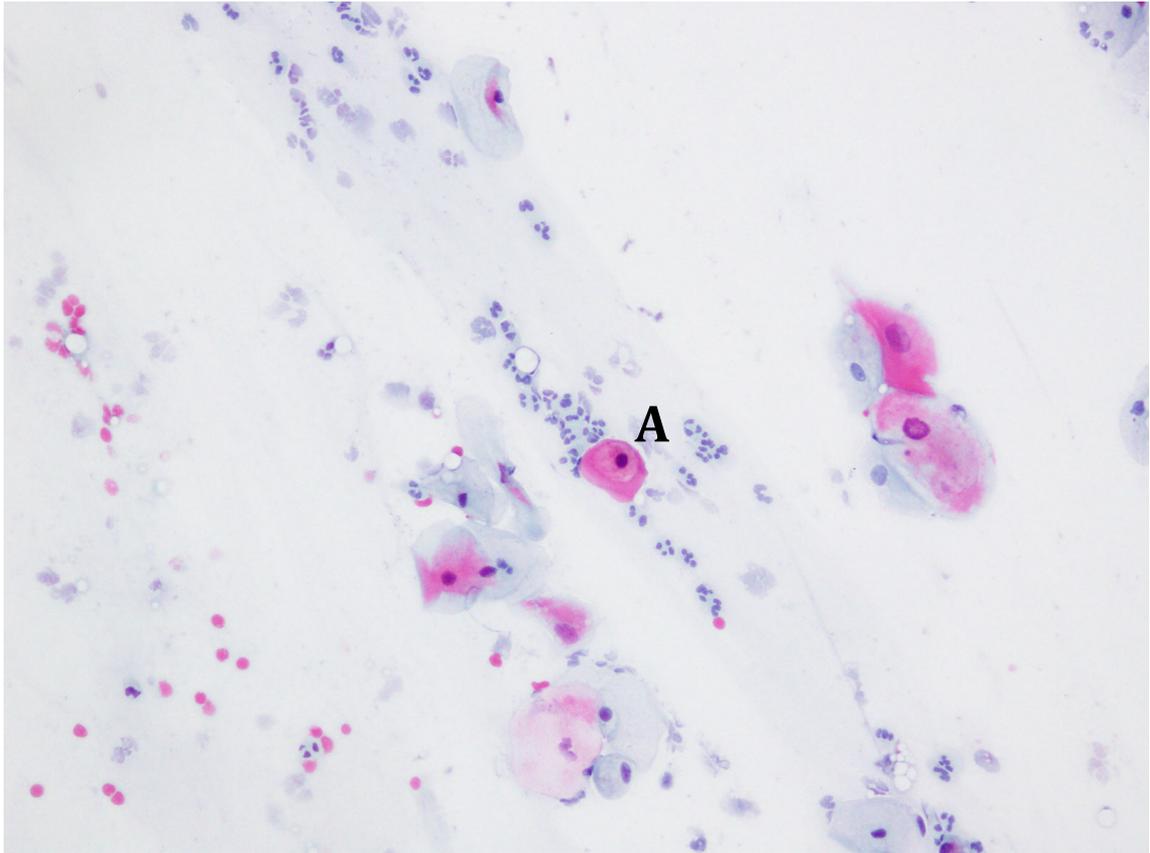


Figura 18: Cellula superficiale con grande alone perinucleare (A), con nucleo regolare (20x)

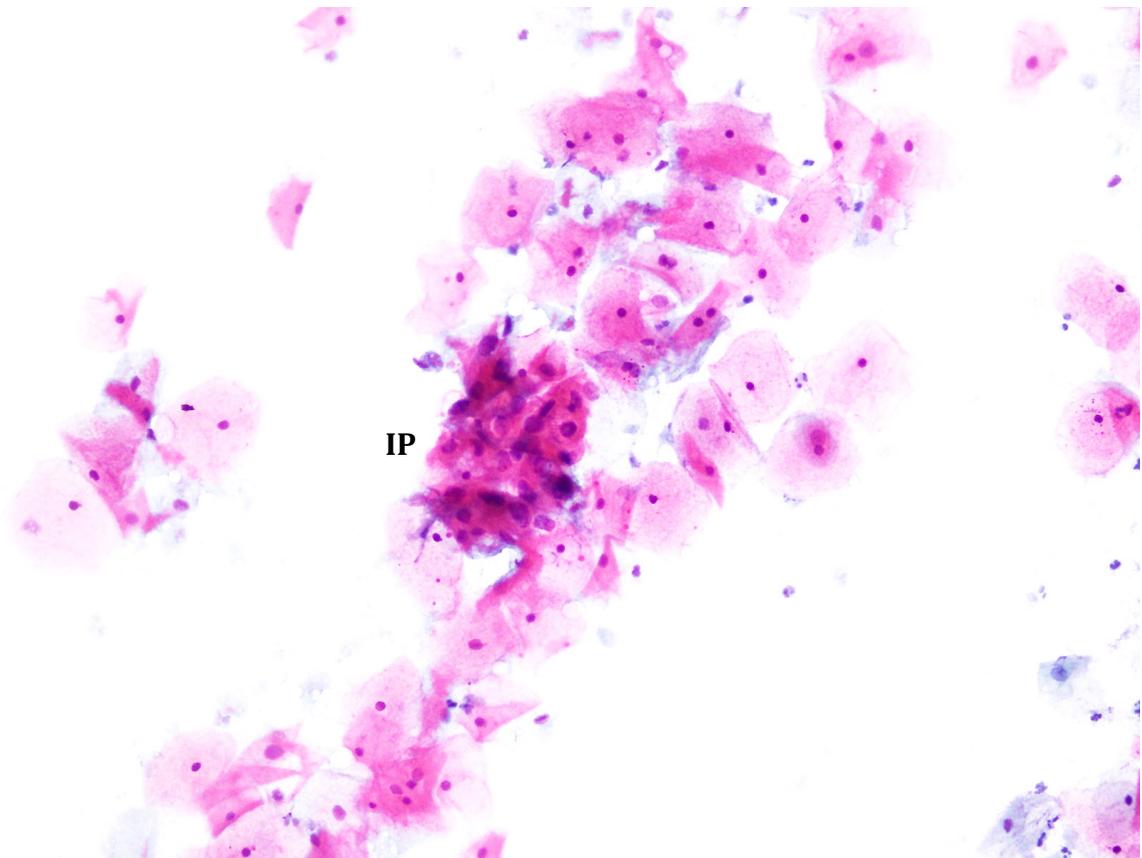


Figura 19: Gruppo di cellule con nuclei ingranditi (2,5 volte) e ipercromatici (IP) (20x)

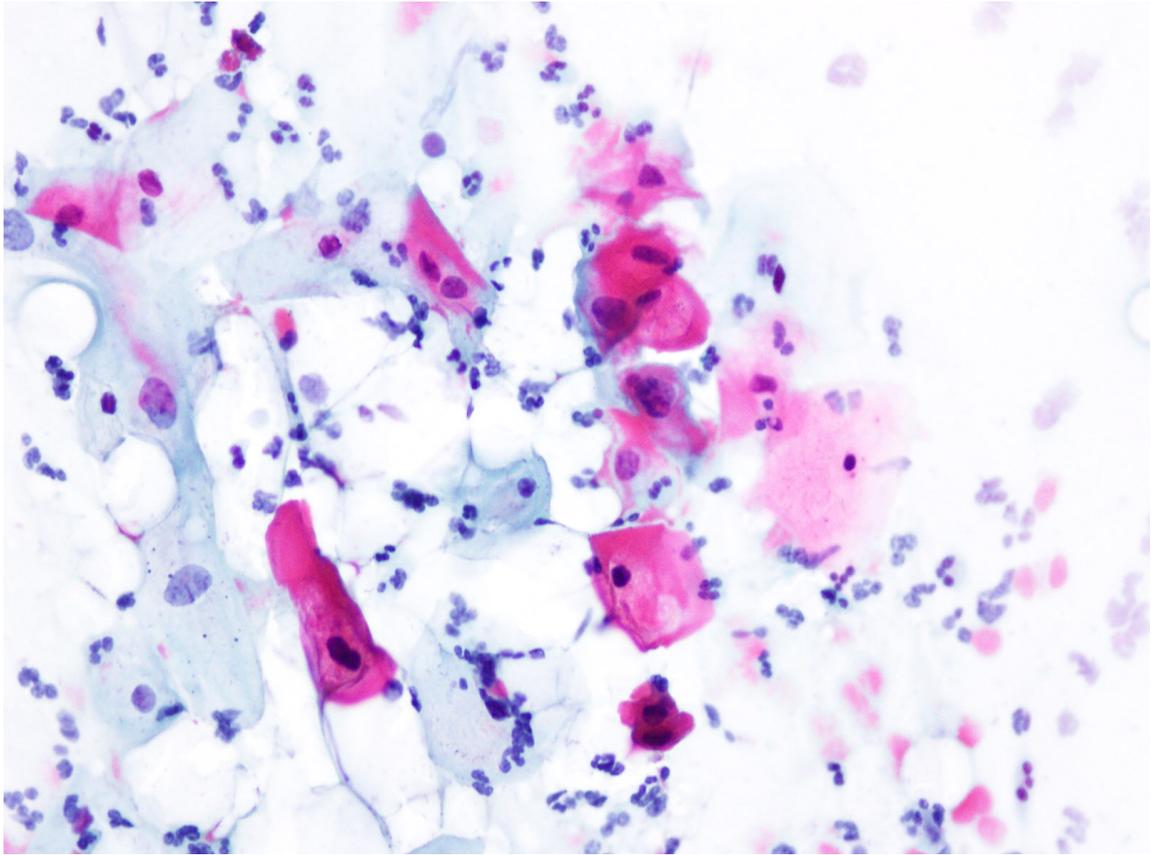


Figura 20: Cellule con nuclei dalle forme irregolari (40x)

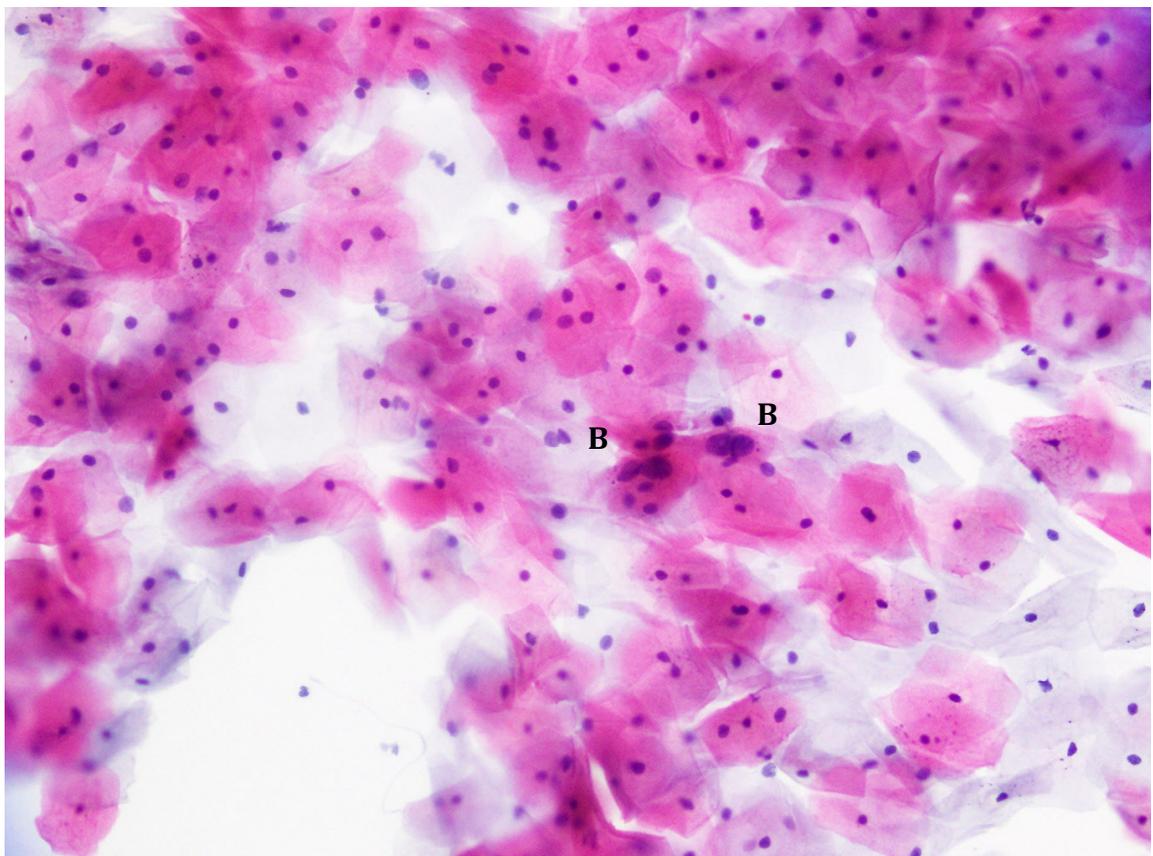


Figura 21: Due cellule superficiali contigue con nuclei ingranditi e binucleati (B) (20x)

5. CONCLUSIONI

La categoria ASC-US introdotta dal sistema Bethesda 1988 e successivamente modificata nel 1991 e nel 2001 rappresenta il primo gradino di anormalità su cellule squamose.

La sua importanza in un programma di screening è rappresentata dal suo valore predittivo positivo: i dati delle Survey del GISCI (38) hanno evidenziato che una donna con una citologia ASC-US ha una probabilità che varia dal 2% al 56% di avere una lesione istologica CIN2-3 (con rischio di carcinoma invasivo che scende fino allo 0,1-0,2%). Per questo motivo, nonostante la sua scarsa riproducibilità, ha mantenuto un ruolo strategico nel migliorare la sensibilità del PAP test.

Il protocollo di approfondimento può prevedere la ripetizione a sei mesi del Pap test, l'invio diretto in colposcopia o il triage con test hr-HPV. La logica del triage con test HPV deriva dall'alto valore predittivo negativo del test HPV: una paziente con diagnosi ASC-US con successivo test molecolare negativo ha una bassissima probabilità di avere una patologia CIN2+. Il triage quindi permette di selezionare pazienti a rischio e pazienti non a rischio fra quelle che morfologicamente hanno comunque entrambe alterazioni citologiche simili.

Questa tesi si riprometteva di rivalutare una serie di quadri morfologici di ASC-US negativi al virus, al fine di approfondire e migliorare i criteri morfologici indicativi di una diagnosi di ASC-US in termini di specificità.

Nella struttura fiorentina dell'ISPO, nell'anno 2012, circa il 50% delle ASC-US sono risultate HPV negative e quindi rappresentano chiaramente un falso positivo in termini di rischio di lesione CIN2+. La loro revisione aveva quindi lo scopo di valutare se vi era stata un sovra-diagnosi sulla base di criteri morfologici citoplasmatici e/o nucleari o se invece le alterazioni presenti erano perfettamente sovrapponibili a quelle presenti nelle ASC-US HPV positive.

Le caratteristiche citologiche che devono essere prese in considerazione per formulare una diagnosi sono principalmente quelle nucleari, nello specifico: ingrandimenti, forma e cromasia.

Sulla base di questi parametri, la presente revisione effettuata su un totale di 103 casi di ASC-US negativi per hr-HPV, ha evidenziato:

- 23 casi riclassificati come negativi in quanto non presentavano alcun altro segno sospetto di alterazione nucleare;
- 42 casi riconfermabili con la diagnosi di ASC-US in quanto presentavano ingrandimenti nucleari importanti (da 2 a 3,5 volte) e ipercromasia,
- 38 casi con una maggiore difficoltà d'interpretazione citologica su cui bisognerebbe migliorare la scelta dei criteri morfologici ascrivibili ad ASC-US.

Dallo studio emerge quindi che i criteri morfologici del TBS 2001 devono essere applicati con rigore per la categoria ASC-US, che altrimenti rischia di essere confinata alla categoria delle insicurezze e non delle incertezze. Per cui è importante sempre considerare come primo quadro valutativo la grandezza e le caratteristiche del nucleo, unico chiaro elemento che viene alterato in caso di lesioni causate da hr-HPV; ciò è fondamentale soprattutto in relazione ai quadri citologici in cui è presente molta flogosi, in quanto le alterazioni nucleari riscontrate molto probabilmente sono rigenerative/reattive, anche se non può essere esclusa la presenza dell'HPV.

La media dell'età riscontrata (45 anni) è in perfetta linea con le medie nazionali di diagnosi ASC-US con test di triage negativo per hr-HPV (**Figura 22**): questo dato è molto importante in quanto le alterazioni presenti sono più caratteristiche dello stato fisiologico ed ormonale della donna, piuttosto che di un'eventuale infezione da hr-HPV, spingendo però il lettore a sovrastimare lo striscio. L'età della paziente deve essere sempre presa in considerazione prima di effettuare una diagnosi.

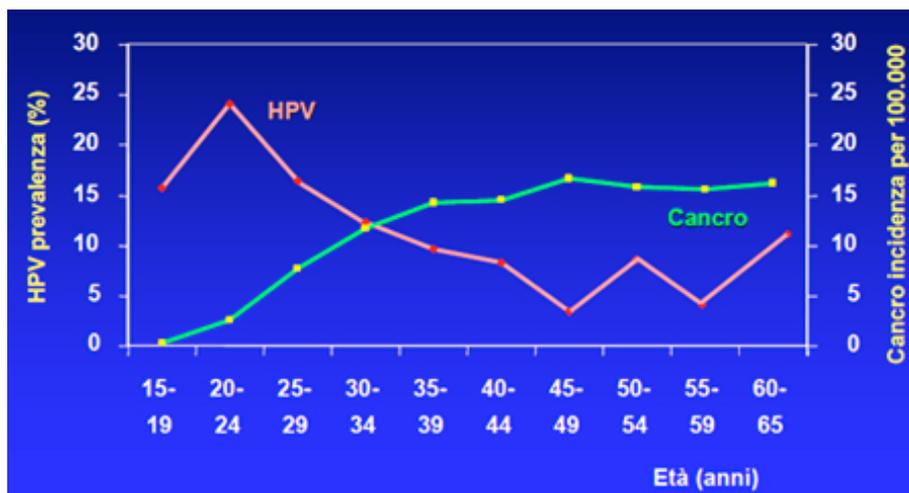


Figura 22: Grafico che mette in relazione l'infezione da HPV e l'età delle pazienti

E' chiaro che uno sforzo su una migliore definizione dei criteri morfologici identificativi di ASC-US debba essere fatto, in modo da essere inquadrati in tale categoria gli effettivi quadri caratteristici dell'infezione da HPV o sospetti per una lesione intraepiteliale. Gli elementi da ricercare sono confinati principalmente alle caratteristiche nucleari (ingrandimenti, ipercromasia e forma del nucleo), ma anche alla presenza di discheratociti e di aloni perinucleari evidenti, tutti segni dell'effetto citopatico causato dal virus. E' importante anche tenere in considerazione il numero delle cellule con alterazioni importanti, perché il riscontro di un solo elemento (un discheratocita ad esempio) non può bastare da solo in uno striscio per fare diagnosi, ma se ripetuto potrebbe dare il giusto sospetto per essere classificato come ASC-US.

L'aspetto più importante rimane la condivisione intra- e inter-laboratorio dei criteri morfologici comuni più riproducibili basati su anomalie morfologiche indicative/sospette di una lesione intraepiteliale o dell'effetto citopatico del virus.

BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN database. Cancer Mondial (online). <http://www.globocan.iarc.fr>
2. Arbyn M, Kyrgiou M, Gondry J, Petry KU, Paraskeva E. *Long term outcomes for women treated for cervical precancer*. BMJ 2014;348:f7700.
3. www.tumori.net/it3
4. Miller AB. *Cervical Cancer Screening Programmes: Managerial Guidelines*. Geneva, Switzerland: World Health Organisation 1992.
5. IARC Working Group on the Evaluation of Cancer Preventive Strategies. *Cervix Cancer Screening. IARC handbooks of cancer prevention*. Vol. 10. Lyon: IARC Press, 2005.
6. Confortini M, Carozzi F. *Prevenzione del carcinoma della cervice uterina: dal test HPV al vaccino. Le nuove strategie*. Milano: ELSEVIER, 2011.
7. Broccolo F. *Carcinoma della cervice uterina*. Berlin, Germany: Springer 2008.
8. McKee GT. *Citopatologia*. Torino, Italia: UTET 1999.
9. Howley PM, Lowy DR. *Papillomaviruses and their replication*. In Fields: Knipe BN, Howley DM, Fields PM. *Virology*, 4a ed., Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001; 2197-29.
10. Lowy DR, Howley PM. *Papillomaviruses*. In Fields Knipe BN, Howley DM, Fields PM. *Virology*, 4a ed., Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001; 2231-64.
11. Coglianò V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F. WHO International Agency for Research on Cancer. *Carcinogenicity of human papillomaviruses*. Lancet Oncol 2005; 6:204.

12. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, et al. *Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer*. N Engl J Med 2003;348:518-527.
13. Muñoz N, Bosch FX, Castellsague X, et al. *Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective*. Int J Cancer 2004;111:278-85.
14. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide*. J Pathol 1999;189:12-9.
15. IARC Working Group on the Evaluation of Cancer Preventive Strategies. *Human Papillomaviruses*. Vol. 90. Lyon: IARC Press, 2007.
16. De Palo G. *Neoplasie del tratto genitale inferiore femminile*. In: Bonadonna G, Robustelli della Cuna G, Valagussa P (Eds): "Medicina Oncologica", Settima Edizione, Casa Editrice Masson, 2006; 1192-1215.
17. Solomon D, Davey D, Kurman R, et al. *The 2001 Bethesda System. Terminology for reporting results of cervical cytology (Consensus Statement)*. JAMA 2002; 287(16):2114-2119.
18. Reagan JW, Seidemann IL, Saracusa Y. *The cellular morphology of carcinoma in situ and dysplasia or atypical hyperplasia of the uterine cervix*. Cancer 1953;6:224-34.
19. Richart RM. *Cervical intraepithelial neoplasia*. In Pathology annual. Edited by Sommers, New York, Appleton - Century - Crofts; 1973, 301.
20. National Cancer Institute Workshop. *The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses*. JAMA 1989; 262:931-4.

21. National Cancer Institute Workshop. *The revised Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses: report of the 1991 Bethesda Workshop*. Acta Cytol 1992;36:273-6.
22. Schiboni ML. *I sistemi di refertazione del Pap test*, Analysis – dal Pap test ai vaccini per il Papillomavirus anno XXIV – N. 1/2/3 Aprile 2008:15-19.
23. Solomon D, Nayar R. *Il Sistema Bethesda per refertare la citologia cervicale. Definizioni, criteri morfologici e note esplicative*. Roma, Seconda edizione, Editore Cic, 2004.
24. Giorgi Rossi P, Carozzi F, Collina G, et al. *HPV testing is an efficient management choice for women with inadequate liquid-based cytology in cervical cancer screening*. Am J Clin Pathol 2012;138:65-71.
25. La colposcopia in Italia, anno XXI – N.1 Dicembre 2006; capitolo III – *esame colposcopico e bioptico*: 7-9.
26. Gruppo comunicazione GISCi. *Utilizzo del test hr-HPV nel triage delle ASC-US e delle L-SIL in donne con più di 35 anni, nel follow-up delle donne con citologia ASC-US+ e dopo un approfondimento di secondo livello negativo per CIN2+ e nel follow-up dopo trattamento delle lesioni CIN2-3*. Documento approvato al Convegno Nazionale GISCi 2012.
27. Koss LG, Melamed MR. *Koss' diagnostic cytology and its histopatologic bases*. New York 2005, Edited by Koss LG, Fifth edition, volume one.
28. Solomon D, Frable WJ, Vooijs GP et al. *ASCUS and AGUS criteria. International Academy of Cytology Task Force summary. Diagnostic Cytology Towards the 21st Century: an International Expert Conference and Tutorial*. Acta Cytol 1998;42:16-24.

29. Bucchi L, Zani J, Pierri C et al. *Cervical screening behavior of women with atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS)*. *Diagn Cytopathol* 2001;24:21-27.
30. Kurman RJ, Solomon D. *The Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses. Definitions, criteria and planatory notes for terminology and specimen adequacy*. Springer Verlag, New York, 1994:30-43.
31. Iossa A, Visioli CB, Carozzi FM, et al. *I programmi di screening cervicale in Toscana. I programmi di screening della regione Toscana, tredicesimo rapporto annuale; risultati e attività di ricerca (dati 2012)*; 2013:37-64.
32. Ministero della Salute, Direzione Generale della Prevenzione: Screening oncologici. Raccomandazioni per la pianificazione e l'esecuzione degli screening di popolazione per la prevenzione del cancro della mammella, del cancro della cervice uterina e del cancro del colon-retto, 2006.
33. Confortini M, Carozzi F, Dalla Palma P, et al. *Interlaboratory reproducibility of atypical squamous cells of undetermined significance report: a national survey*. *Cytopathology* 2003;14:263-8.
34. Confortini M, Di Bonito L, Carozzi F, et al. *Interlaboratory reproducibility of atypical glandular cells of undetermined significance: a national survey*. *Cytopathology*. 2006 Dec;17:353-60.
35. Solomon D, Schiffman M. *Have we resolved how to triage equivocal cervical cytology?* *J Natl Cancer Inst* 2004;96:250-1.
36. Arbyn M, Buntinx F, Van Ranst M, Paraskevaidis E, Martin-Hirsch P, Dillner J. *Virologic versus cytologic triage of women with equivocal Pap smears: a meta-analysis of the accuracy to detect high-grade intraepithelial neoplasia*. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:280-93.

37. Carozzi F. *I test molecolari di screenening*. In: prevenzione del carcinoma della
cervice uterina: dal test HPV al vaccino Ed. Milano, Elsevier 2011:25-36.

38. www.gisci.it/survey.