

## *Commissione Citologia, Istologia e Citogenetica*

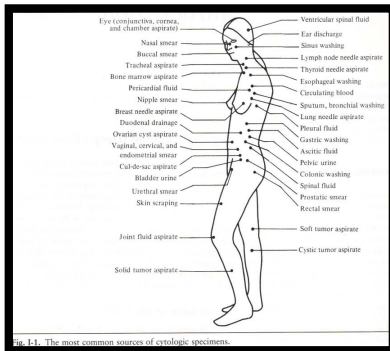
Referente: Massimo Confortini

Componenti: Girolama Casile, Francesca Melasi, Carla Petreschi, Maria Luisa Schiboni

# Il ruolo attuale e futuro della Citologia

La **Citologia** è il ramo della biologia che si occupa dello studio della struttura e delle funzioni delle cellule come unità individuali. Complementare all'istologia, che studia le cellule come componenti dei tessuti, la citologia si occupa della forma e del funzionamento delle varie parti della cellula, dei meccanismi della divisione cellulare e delle disfunzioni delle cellule che, ad esempio, si verificano nella cancerogenesi.

Per questo la citologia riveste un ruolo importante nella medicina moderna, soprattutto contribuendo alla diagnosi delle malattie tramite l'esame morfologico, al microscopio ottico, delle cellule prelevate da organi solidi o cavi mediante tecniche di agoaspirazione, lavaggio, spazzolamento o per esfoliazione.



**Leopold G. Koss** (1920-2012), uno dei padri fondatori della **citopatologia**, ricorda che il concetto di citologia diagnostica è stato grandemente influenzato dagli sforzi di **George N. Papanicolaou** (1883-1962), al quale il **Pap** test deve il suo nome: "... il suo contributo alla nostra conoscenza della presentazione citologica del cancro hanno cambiato lo stato della citologia da una disciplina largamente teorica ad una procedura di laboratorio universalmente accettata".



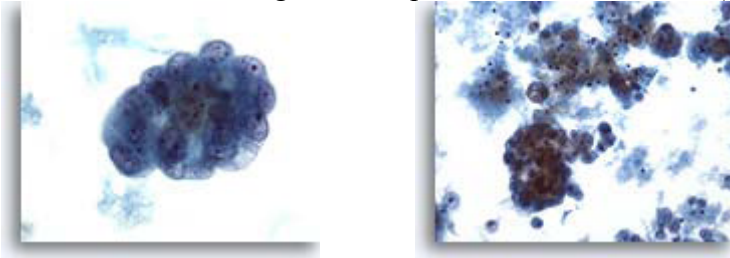
## Applicazioni della citodiagnostica

### - Nel primo inquadramento di condizioni patologiche accertate, ma di natura ancora da determinare

Utilizzata come test per la discriminazione tra “patologie neoplastiche /patologie non neoplastiche” in pazienti con sintomatologia aspecifica.

Esempi:

- esame citologico dei liquidi di versamento delle cavità sierose
- esame citologico del liquido cefalo-rachidiano (liquor)

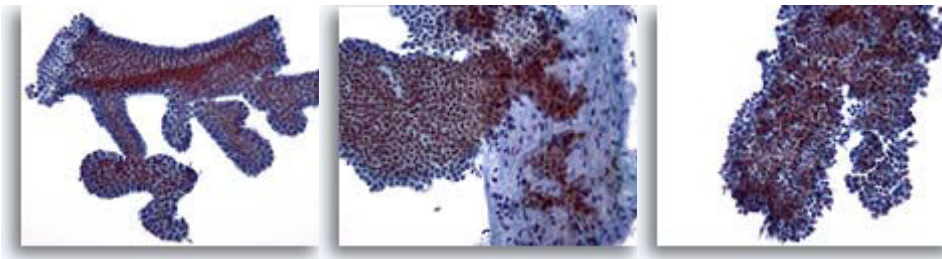


### - In un secondo livello diagnostico

Utilizzata come test per la definizione di lesioni già riconosciute clinicamente o per mezzo di “diagnostica per immagini” (RMN –TAC –RX –Ecografia).

Esempi:

- esame citologico del lavaggio bronchiale o bronchiolo-alveolare (BAL)
- citologia da agoaspirazione con ago sottile (FNAC) che, a differenza delle precedenti metodologie, presuppone un bersaglio. La puntura può essere effettuata su organi o lesioni superficiali e profonde, ma per le sedi profonde viene eseguita sotto monitoraggio radiologico (TAC o eco-guidata). Alcune sedi di prelievo più frequenti sono: mammella, tiroide, linfonodi, ghiandole salivari, noduli sottocutanei, fegato, polmone.

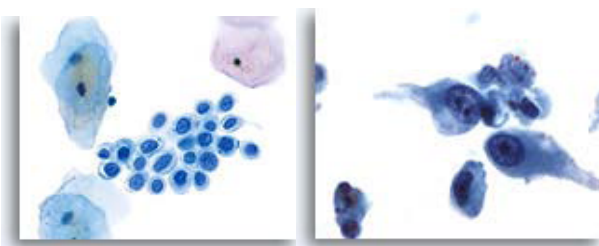


### - Nel follow-up di malattia

Utilizzata come indagine per il monitoraggio di pazienti affetti da una specifica patologia (analisi dell’evoluzione, post-trattamento o spontanea, della malattia).

Esempi:

- esame citologico di *brushing* di organi cavi
- esame citologico delle urine. Nel corso degli ultimi 20 anni la citologia urinaria è stata largamente utilizzata nella diagnosi e nel *follow-up* delle neoplasie vescicali ed è ancora considerata una delle più importanti metodiche diagnostiche in urologia oncologica, a patto che sia usata in modo appropriato dall’urologo, per ragioni ben definite, processata in laboratori adeguati ed interpretata da professionisti competenti nell’esame di tali campioni.



### - Negli screening di popolazione

Utilizzata in una popolazione apparentemente sana come test per l'identificazione di lesioni pre-neoplastiche o all'interno di un iter per la diagnosi precoce di una neoplasia.

Esempi:

- screening del carcinoma della cervice uterina
- screening del carcinoma mammario

### Vantaggi della citodiagnostica

- rapida esecuzione
- costi contenuti
- prelievi senza anestesia e facilmente ripetibili in caso di insuccesso
- metodica poco "fastidiosa" per il paziente
- elevata sensibilità e specificità in mani esperte
- minime complicanze

### Citologia esfoliativa

E' il tipo di citologia più immediata e di facile applicabilità per la semplicità di raccolta del materiale. La minore invasività di questo esame lo rende più tollerabile e quindi meglio accettato dal paziente.

L'esfoliazione delle cellule è un processo che avviene in continuazione, correlato al rinnovamento dei tessuti del corpo. La percentuale di cellule esfoliate varia a seconda dei tessuti, loro funzioni e metabolismo. In parte esfoliano fisiologicamente, in parte in condizioni patologiche.

Molte di queste si accumulano nelle cavità naturali; cellule esfoliate spontaneamente si ritrovano in:

- urine
- espettorato
- secrezioni
- versamenti (pleurico, cardiaco, ascitico, sinoviale)
- liquor (liquido cerebrospinale)

### Citologia per esfoliazione provocata

Cellule attivamente asportate dalla superficie di una mucosa o di una lesione.

Questa citologia è spesso legata all'uso di apparecchiature endoscopiche flessibili a fibre ottiche.

Esempi:

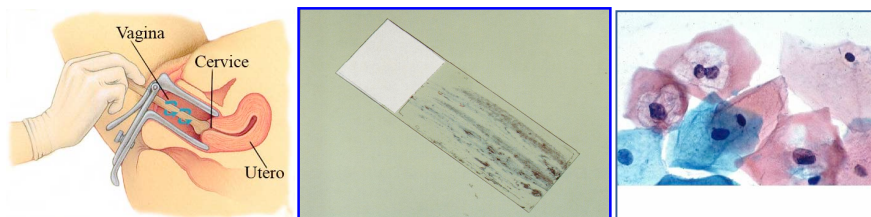
- **spazzolato o brushing**, metodica possibile in organi cavi o accessibili dall'esterno quali tubo digerente, trachea e bronchi
- **lavaggio o washing** di lesioni periferiche, metodica necessaria quando non sia possibile il *brushing* di lesioni distali dal punto di arresto dell'endoscopio o per campionare un'area vasta, ma periferica (ramo bronchiale e spazi bronchiolo-alveolari)
- **scraping** di organi accessibili dall'esterno (cervice uterina e vagina, lesioni cutanee, ecc.)

## Citologia esfoliativa ginecologica

La cervice uterina è la sede d'elezione per effettuare citologia esfoliativa ed il test utilizzato è il **Pap test**. E' una metodica impiegata da oltre 60 anni per prevenire il carcinoma del collo dell'utero, individuando precocemente le lesioni pretumorali.

La lunga storia naturale dei precursori del cancro invasivo consente infatti di trattare le lesioni intraepiteliali più gravi individuate, interrompendo così un'eventuale progressione neoplastica.

Il materiale ottenuto con il prelievo cervicale può essere strisciato direttamente sul vetrino portaoggetto, fissato, colorato e montato (striscio convenzionale), oppure raccolto in fase liquida per l'allestimento di vetrini in strato sottile. In questo caso, sul materiale residuo, possono essere eseguite eventuali indagini molecolari.



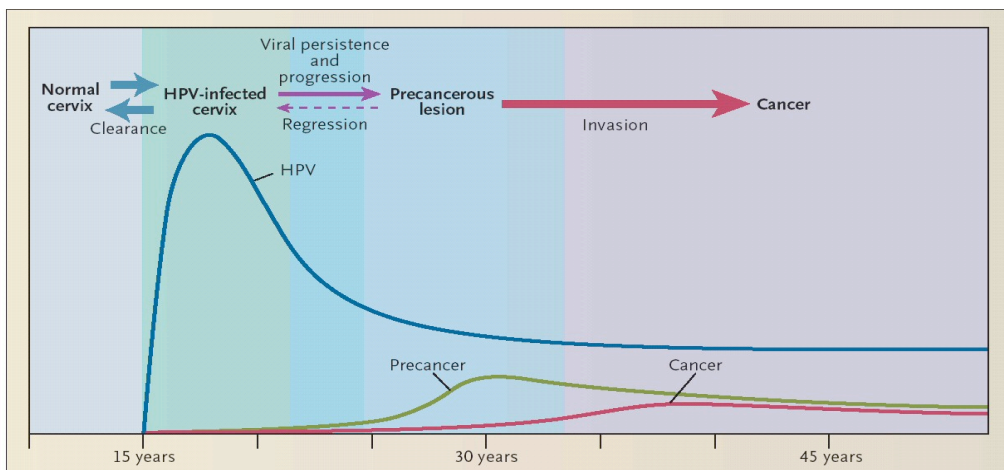
Nonostante alcuni limiti, tra i quali essere in parte operatore-dipendente, il Pap test risulta comunque un test molto efficace, soprattutto quando è inserito in un **Programma di Screening** organizzato che garantisce un monitoraggio continuo della sua qualità. Le attuali linee guida italiane sugli screening prevedono l'esecuzione di un Pap test con intervallo triennale nella fascia di età 25-64. Questo protocollo permette una forte protezione della popolazione, con un rischio di insorgenza di cancro invasivo ridotto dell'80% nelle donne che eseguono regolarmente l'esame.

## Sviluppi attuali e futuri della citologia cervicale

Numerosi studi epidemiologici e di biologia molecolare ormai hanno dimostrato, senza ombra di dubbio, che l'infezione da HPV è un passaggio essenziale per lo sviluppo sia delle lesioni preneoplastiche che neoplastiche della cervice uterina.

Le infezioni genitali da HPV sono molto più frequenti nella fascia di età 18-24 e la grande maggioranza delle infezioni si risolve spontaneamente. Solo donne con infezioni persistenti da HPV oncogeni sono a rischio di sviluppare una lesione pretumorale.

Il picco di infezione precede di 15-20 anni il picco di lesioni preneoplastiche.



## HPV e rischio oncogeno

Gruppo 1 (cancerogeni per l'uomo): 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59.

Gruppo 2A (probabilmente cancerogeni per l'uomo): 68.

Gruppo 2B (possono essere cancerogeni per l'uomo): 26, 53, 66, 67, 70, 73, 82.

Gruppo 2B (possono essere cancerogeni per l'uomo su base filogenetica): 30, 34, 69, 85 e 97.

Gruppo 3 (non classificabili per la loro cancerogenicità nell'uomo): 6 e 11

(Fonte: Monografia 100B IARC 2011)

Sulla base di queste conoscenze negli ultimi anni sono stati effettuati trial randomizzati, per la valutazione dell'uso del **test HPV** (che individua la presenza di DNA virale nelle cellule cervicali) come **test primario** di screening cervicale.

## Le ragioni di un cambiamento

Il test HPV ha una sensibilità nettamente superiore rispetto al Pap test. Gli studi hanno inoltre messo in evidenza che la maggiore sensibilità del test HPV si traduce in una maggiore prevenzione del cervicocarcinoma, ragionevolmente dovuta al trattamento di lesioni intraepiteliali di alto grado (CIN2/3) non altrimenti individuate dal Pap test.

I risultati degli studi sperimentali di efficacia dimostrano però che ad una maggior sensibilità del test molecolare, rispetto al Pap test, corrisponde invece una minore specificità. Quindi l'uso esclusivo del test HPV, con l'invio ad approfondimenti diagnostici (colposcopia e biopsia) dei casi HPV positivi, porterebbe ad una diminuzione del valore predittivo positivo del test di screening, con possibilità di sovradiagnosi.

Il riposizionamento del Pap test con funzione di **test filtro (triage)** fra HPV e colposcopia permette di riportare su valori accettabili la specificità. La logica è quella di rovesciare l'attuale algoritmo utilizzato nello Screening, cioè prima Pap Test, poi test HPV nei casi dubbi e successivo invio in colposcopia, eseguendo prima il test più sensibile (test HPV) e successivamente il test più specifico (Pap Test), nella fascia d'età 35-64, mantenendo l'attuale algoritmo nella fascia d'età 25-34, dove maggiore è la frequenza dell'infezione, ma più frequente è anche la *clearance* virale. Allo stato attuale questa è l'ipotesi più percorribile in attesa di dati più certi su numerosi biomarcatori molecolari di specificità (genotipizzazione, Proteina p16, overespressione di oncogeni).

Il nuovo algoritmo, utilizzato attualmente negli studi di fattibilità, permette di stratificare la popolazione di screening in tre fasce:

- popolazione a **bassissimo rischio** di patologia (donne con test HPV negativo) da richiamare al normale intervallo di screening, previsto a 5 anni, senza lettura del Pap test
- popolazione ad **alto rischio** di patologia (donne con test HPV positivo e Pap test positivo, cioè con diagnosi citologica di anormalità) da inviare a colposcopia
- popolazione a **medio rischio** di patologia (donne con test HPV positivo e Pap test negativo, cioè senza anormalità citologiche) da inviare a ripetizione del test HPV ad un anno.

Per questa nuova strategia di screening il prelievo può essere unico nel caso in cui si utilizzi il

contenitore con liquido preservante (*vial*) per la citologia in fase liquida, in modo da permettere sia la ricerca del papillomavirus sia la lettura della citologia in strato sottile, nel caso di test HPV positivo. Il prelievo deve essere doppio nel caso in cui non si utilizzi la citologia in fase liquida: un primo prelievo da strisciare e fissare per la citologia convenzionale (da colorare e leggere solo nel caso di test HPV positivo) ed un secondo prelievo per il test HPV. I vetrini strisciati di donne HPV negative non devono essere colorati o conservati. I Pap test di donne HPV positive devono, successivamente alla lettura, essere conservati secondo la normativa vigente.

## **Il Pap test di *triage***

Nella strategia basata sul test HPV come test primario di screening, questo test assume il ruolo di identificare nella popolazione sana le donne a maggior rischio di patologia cervicale. Alla citologia di *triage* viene chiesto di selezionare, fra le donne positive al test HPV, quelle che presentano anomalie citologiche da inviare ad approfondimenti diagnostici e fra le quali saranno trovate una parte consistente delle lesioni presenti nella popolazione. In questo contesto la citologia di *triage* dovrebbe migliorare la sua sensibilità in quanto l'errore di attenzione, causa non infrequente di falsi negativi con gli attuali carichi di lavoro, dovrebbe praticamente azzerarsi; il numero di Pap test da leggere sarà molto ridotto, visto che le donne con test HPV positivo rappresentano il 5-10 % del totale delle donne aderenti allo screening nella fascia 35-64. Rimangono altri due motivi di falsi negativi, legati all'errore di interpretazione o di prelievo; sul secondo il citologo non può influire, mentre l'errore di interpretazione, dovuto a due principali fattori quali esperienza e capacità, assume nella citologia di *triage* un ruolo fondamentale. Il termine "esperienza" significa avere la possibilità di leggere, giornalmente ed in modo sistematico nel tempo, un grande numero di citologie con quadri *borderline*, complessi o chiaramente riconducibili ad una lesione. Questo si traduce nella necessità di una forte centralizzazione della lettura dei Pap test di *triage*. Il termine "capacità" significa identificare con la maggiore precisione possibile (specificità) i quadri citologici anormali, fra le donne con test HPV positivo, e chiaramente deriva dall'esperienza, dalla piena adesione ad un sistema di refertazione comune e condiviso ed in ultimo dalla capacità del citologo di riposizionarsi in un ruolo nuovo rispetto al passato, che richiede l'assunzione di responsabilità diverse. In questo nuovo contesto la prevalenza di citologie anormali è alta e si stima che la frequenza di anomalie si attesti intorno al 30-50% dei casi esaminati. Tenendo conto che la media nazionale di invio al secondo livello colposcopico basata sulla survey nazionale del GISCi è circa il 2,4%, la possibilità di trovare anomalie nel *triage* è più che decuplicata. La lettura citologica deve basarsi su sistemi di refertazione riconosciuti quali il Sistema Bethesda 2001 (TBS 2001).

## **Il Controllo di Qualità**

Date le criticità di questa fase in cui il citologo si trova ad operare scelte diagnostiche in soggetti con rischio potenzialmente aumentato di patologia, vi è la imperante necessità di mirare il Controllo di Qualità della lettura del Pap test a questa nuova situazione, monitorando anche l'invio al secondo livello (approfondimenti) che potrebbe rivelarsi foriero di sovradiagnosi.

Il Controllo di Qualità deve essere indirizzato al monitoraggio della qualità, attraverso "lettura collegiale" dei casi dubbi e positivi, rescreening rapido dei casi negativi, valutazione della distribuzione delle diagnosi e della predittività delle diverse classi diagnostiche e all'implementazione di sistemi di refertazione uniformi, con utilizzo di criteri diagnostici condivisi, anche attraverso strumenti tecnologici adeguati quali l'uso delle immagini digitali.

## **Dalla citologia di screening alla citologia di *triage*: governare il cambiamento**

L'introduzione della nuova strategia di screening comporta, allo stato attuale, due diversi algoritmi: mantenimento del Pap test come test primario nella popolazione della fascia d'età 25-34 ed introduzione del test HPV come test primario nella fascia d'età 35-64, con il Pap test posizionato in funzione di *triage*. Si prevedono conseguenze importanti per un futuro prossimo, soprattutto una riduzione consistente del numero di citologi dedicati alla citologia di *triage* (che deriverà solo dal 5-10 % del totale delle donne aderenti allo screening nella fascia d'età 35-64). Governare questo cambiamento significa pianificare nell'arco di qualche anno questo passaggio, in modo da rendere meno traumatica la ricollocazione del personale. L'analisi dei costi della nuova strategia di screening è basata sulla differenza fra costi cessanti (personale) e costi emergenti (reattivi per test HPV) e soprattutto su una distribuzione del costo della nuova strategia in 5 anni, che è l'intervallo di screening previsto. I costi cessanti sono chiaramente legati ad una diminuzione del personale

dedicato alla citologia e questo è un passaggio cruciale, che richiede un'attenta analisi dei nuovi bisogni in considerazione di due aspetti principali:

- Il tempo di lettura di una citologia di *triage* è superiore alla citologia di screening, per l'alto numero di citologie anormali presenti
- Il mantenimento della citologia di screening nelle fasce giovanili permette di contenere il numero di citologi da ricollocare

L'adozione della nuova strategia di screening richiede una forte centralizzazione dell'attività, sia del test molecolare che morfologico, a livello di macroaree o addirittura regionale. Il Pap test di *triage* assume le caratteristiche di un test in grado di migliorare la specificità del test primario e questo significa l'assunzione di un ruolo della citologia completamente diverso rispetto al passato. Siamo davanti ad un cambiamento epocale e la nuova sfida richiede consapevolezza e responsabilità da parte dei citologi. Sono necessari una forte condivisione del sistema di refertazione e del Controllo di Qualità, con una rigida applicazione di criteri morfologici comuni in grado di limitare, se non annullare, categorie diagnostiche dubbie o *borderline*, proprio per affermare con forza il nuovo ruolo del Pap test, essenziale come test "filtro".

## Bibliografia

- Ronco G, Biggeri A, Confortini M, et al. Health Technology Assessment-Ricerca del DNA di papillomavirus umano (HPV) come test primario per lo screening dei precursori del cancro del collo uterino. *Epidemiol Prev* 2012; 36(3-4) suppl1
- Confortini M, Carozzi F, e coll. Prevenzione del carcinoma della cervice uterina, dal test HPV al vaccino. Elsevier 2012
- GISCI, Gruppo Italiano Screening del Cervicocarcinoma. La citologia di triage nei Programmi di Screening con HPV come test primario. 2013 [www.gisci.it](http://www.gisci.it)
- GISCI, Gruppo Italiano Screening del Cervicocarcinoma. Raccomandazioni sul test HR-HPV come test di screening primario e rivisitazione del ruolo del Pap test. 2010 [www.gisci.it](http://www.gisci.it)
- GISCI, Gruppo Italiano Screening del Cervicocarcinoma. Documento operativo per l'applicazione nei programmi di screening del Sistema Bethesda 2001. 2009 [www.gisci.it](http://www.gisci.it)
- Tinacci G, Biggeri A, Pellegrini A, Cariaggi MP, Schiboni ML, Confortini M, The use of digital images to evaluate the interobserver agreement on cervical smear readings in Italian cervical cancer screening. *Cytopathology*. 2010 May 12

- Solomon D, Davey D, Kurman R, et al. Terminology for reporting results of Cervical Cytology. JAMA;287(16):2114-9 2002
- Papanicolaou GN. Survey of actualities and potentialities of exfoliative cytology on cancer diagnosis. Ann Intern Med 1949;19:301-308
- Stoler MH. Human papilloma virus biology and cervical neoplasia: implications for diagnostic criteria and testing. Arch Path lab Med 2003 127(8): 935-9
- Koss LG. Koss' Diagnostic cytology and its Histopathologic bases. Fifth edition 2006