

**La citologia in strato sottile nello
screening con test HPV:
l'importanza di un prelievo
corretto
e il significato del triage**

Sonia Prandi

Centro di citologia cervico vaginale di screening

Arcispedale S. Maria Nuova - IRCCS

Reggio Emilia

Prelievo in fase liquida

Con l'avvento dello screening con il test HPV come screening primario, il prelievo verrà effettuato in una sola modalità:

in fase liquida cioè le cellule raccolte dalla cervice uterina saranno messe in un bocchettino.

Da questo contenitore si potrà eseguire il test HPV e/o il pap test a seconda della procedura richiesta specificatamente dallo screening per ogni donna.

Per i prossimi 3 anni, visto il passaggio graduale della popolazione femminile al test HPV si avranno 2 modalità di prelievo:

- pap test convenzionale per una quota di donne che andrà sempre più a diminuire
- prelievo in fase liquida che servirà per il test HPV e il pap test in strato sottile

Le 2 diverse modalità di prelievo saranno gestite nelle singole Aziende Sanitarie secondo un calendario definito dai Centri Screening.

Che cos'è un prelievo in fase liquida

E' un prelievo in cui le cellule raccolte dalla cervice uterina secondo specifiche modalità vengono poste in un liquido di conservazione che ha la proprietà di non alterarne la struttura cellulare e soprattutto da la possibilità di effettuare indagini molecolari come rilevare la presenza di infezioni da virus HPV: cioè con un unico prelievo possiamo fare più indagini.

La citologia che deriva da questa modalità di prelievo si chiama citologia in fase liquida e i pap test saranno in strato sottile, non più strisciati / di tipo convenzionale

Che cos'è la citologia in strato sottile

E' denominata anche citologia in fase liquida (T P) perchè il mezzo di trasporto delle cellule non è più su un vetrino strisciato ma è in un liquido di conservazione delle cellule.

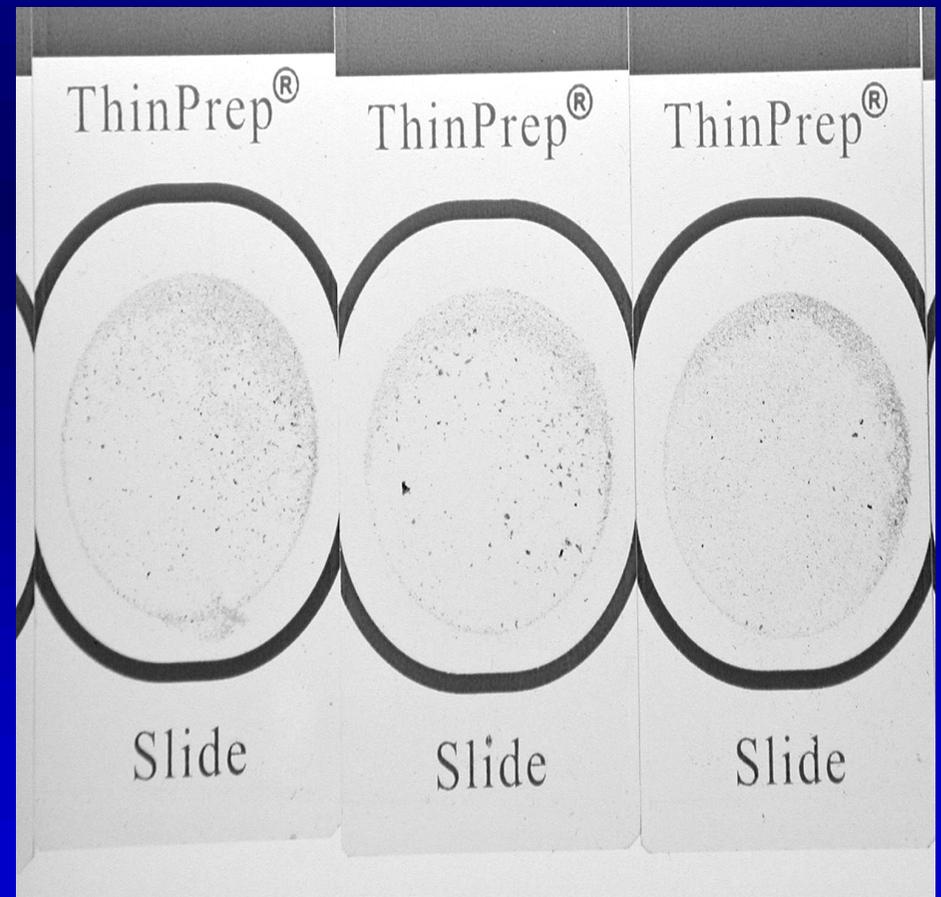


Lo strato sottile consiste di uno strato solo di cellule che vengono apposte sul vetrino tramite uno strumento automatico e non più strisciate.

Pap test convenzionale



Pap test in strato sottile



***Come si esegue il prelievo in
fase liquida
che servirà sia per il test HPV
che per il pap test***

N.B. in caso di test HPV + deve essere letto il pap test
e noi non sappiamo quali donne sono positive
pertanto già dal prelievo si devono considerare
entrambe le possibilità

Premessa: per eseguire un ottimo prelievo per lo strato sottile (test HPV + pap TP) è necessario mantenere le stesse regole del pap test convenzionale

- Fissare la data del prelievo almeno 3 giorni dopo la fine completa del ciclo mestruale.
- Non effettuare il test durante le mestruazioni
- Non devono essere assunti farmaci per via vaginale e lavande vaginali nelle 48 ore precedenti all'esame.
- Evitare rapporti sessuali la sera precedente all'esame

PERCHE' IL CITOLOGO CHIEDE DI SEGUIRE QUESTE INDICAZIONI

– *Perché fissare il prelievo dopo 3 giorni dalla fine del ciclo mestruale:*

la fase ormonale di metà ciclo permette una valutazione ottimale della cellularità pavimentosa al fine di individuare più chiaramente eventuali atipie citologiche.

• *Perché non eseguire il prelievo durante il ciclo mestruale:*

Un prelievo durante le mestruazioni fornirà un campione contaminato da materiale ematico e detriti cellulari; non si ha la garanzia di una maturazione ormonale ottimale per una valutazione microscopica delle cellule pavimentose

Le cellule endometriali possono creare problemi di diagnosi differenziale ad esempio con lesioni intraepiteliali squamose di alto grado

• *Perché non assumere farmaci vaginali ecc..*

La somministrazione di farmaci, ovuli e lavande per via vaginale può interferire con la valutazione microscopica delle cellule epiteliali; durante la valutazione microscopica si potranno rilevare residui di materiale amorfo.

PERCHE' IL CITOLOGO CHIEDE DI SEGUIRE QUESTE INDICAZIONI

- In caso di IUD l'esecuzione del prelievo sia per metodo convenzionale che in fase liquida non richiede la rimozione del dispositivo.
- In caso di Anello Anticoncezionale l'Ostetrica, non trova difficoltà ad eseguire il prelievo.
- *Perchè si raccomanda di evitare rapporti sessuali la sera precedente alla visita*

I rapporti sessuali a meno di 24 ore dal prelievo, con o senza il preservativo, causano alterazioni infiammatorie (da azione meccanica), alterazione della flora batterica, eventuale presenza di materiale amorfo esogeno.

L'eventuale presenza di spermatozoi, non interferisce con la valutazione delle cellule epiteliali.

Premessa all'esecuzione del prelievo

- 1 accoglienza (se si tratta del 1° pap test, spiegare come si esegue e cosa previene, spiegare che è nuovo tipo di prelievo),
- 2 verifica dei dati anagrafici,
- 3 compilazione dati anamnestici,
- 4 esecuzione del prelievo (che potrà servire per Test HPV, Test HPV + pap test, solo pap test),
- 5 compilazione obiettività,
- 6 counselling

Compilazione dati anamnestici

quali dati interessano per una diagnosi citologica

U.M. / Menopausa

Perdite ematiche intermestruali o in post menopausa

**Patologie pregresse / trattamenti alla cervice che non sono
contenute negli archivi dello screening**

Assunzione EP o Terapia Ormonale Sostitutiva

IUD

Stato di gravidanza / allattamento

**K della mammella con assunzione di farmaci es tamoxifene
o similari**

Radioterapia, chemioterapia, patologie oncologiche.

PER UN CORRETTO PRELIEVO

–INSERIRE LO SPECULUM

(accertarsi sempre che la paziente
non sia virgo!)

–VISUALIZZARE LA PORTIO

SEGUIRE QUESTE INDICAZIONI

- Non utilizzare gel lubrificanti prima del prelievo del campione cervicale
- Per lubrificare lo speculum può essere utilizzata dell'acqua
- E' importante ottenere un campione privo di sangue, muco o essudato infiammatorio
- Rimuovere l'eccesso di muco o altre secrezioni utilizzando prima una pinza portabatuffoli, poi un tampone di garza
- La cervice non va trattata con soluzione salina
- Effettuare il prelievo prima dell'eventuale applicazione di acido acetico se in colposcopia

RICORDIAMO PERCHE' IL CITOLOGO CHIEDE DI SEGUIRE QUESTE INDICAZIONI

- ***L'eventuale contaminazione del campione con gel lubrificate per l'introduzione dello speculum ne compromette la valutabilità e la significatività diagnostica. La presenza di gel oscura le cellule epiteliali e contamina anche il fondo del preparato. In TP il gel lubrificante non è solubile nella soluzione fissativa, altera i valori di aspirazione durante la filtrazione, ostacola il trasferimento del campione sul vetrino da parte dello strumento preparatore***
- ***La contaminazione con gel lubrificante interferisce con il test HPV determinando il rischio di falsi negativi.***
- **Per lubrificare lo speculum è indicata acqua tiepida perché aiuta ad attenuare il disagio delle pazienti.**

RICORDIAMO PERCHE' IL CITOLOGO CHIEDE DI SEGUIRE QUESTE INDICAZIONI

- In caso di cervice con un eccesso di muco, sangue, essudato infiammatorio, si deve pulire la cervice prima del prelievo utilizzando una pinza portabatuffoli per togliere il materiale in eccesso e poi un tampone di garza asciutta. Non utilizzare ovatta: lascia residui!!!!;
- Non lavare la cervice con un getto di acqua o soluzione salina: ***l'applicazione di soluzione salina altera l'equilibrio elettrochimico delle cellule causando degli aspetti artefattuali di rigonfiamento o rottura delle strutture cellulari che ne impediscono una corretta valutazione microscopica.***
- ***L'applicazione di acido acetico genera la comparsa di alterazioni morfologiche artefattuali che generano difficoltà nella valutazione microscopica ed in un corretto inquadramento diagnostico.***

Prelievo cervicale

Il prelievo del campione cervicale sia per pap test che per test HPV si esegue con la combinazione:

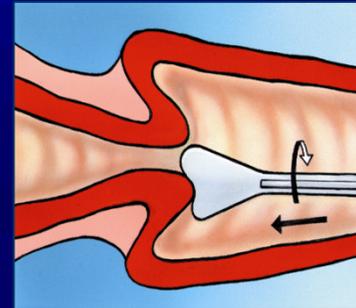
prelievo esocervicale con spatola di Ayre

+

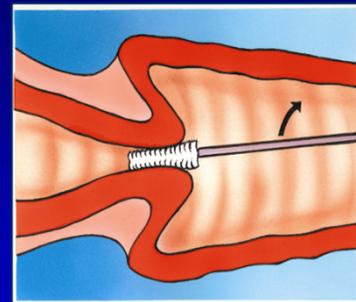
prelievo endocervicale con Cytobrush

Prelievo del campione cervicale

Spatola



Cytobrush



- La spatola di Ayre è sagomata sul profilo della cervice uterina e permette il prelievo dell'epitelio esocervicale.
- La spatola in dotazione per prelievo in fase liquida è in plastica monouso; *non si possono utilizzare le spatole in legno poiché tale materiale trattiene una porzione del campione cellulare e non permette un risciacquo completo delle cellule nella soluzione fissativa PreservCyt del boccettino.*
- Il campionamento va eseguito facendo aderire la spatola al profilo della cervice e ruotando lo strumento per almeno 360°, avendo cura di mantenere il contatto con la superficie epiteliale.

- Per il campionamento della cervice con la rotazione a 360°, posizionare lo strumento ad “ore 9” se si esegue il giro in senso orario, a “ore 3” se si esegue il giro in senso antiorario. Alla fine del giro a 360° la spatola si troverà in posizione orizzontale ed il materiale cellulare si troverà raccolto sulla porzione superiore della spatola che svolge così una funzione “cucchiaio”.
- La raccomandazione è di eseguire prima il campionamento esocervicale con la spatola, dopo il campionamento endocervicale con Cytobrush per la necessità di ridurre al minimo eventuale contaminazione ematica.
- Quindi è preferibile campionare:
prima l'esocervice con spatola
dopo l'endocervice con Cytobrush

Suggerimenti utili

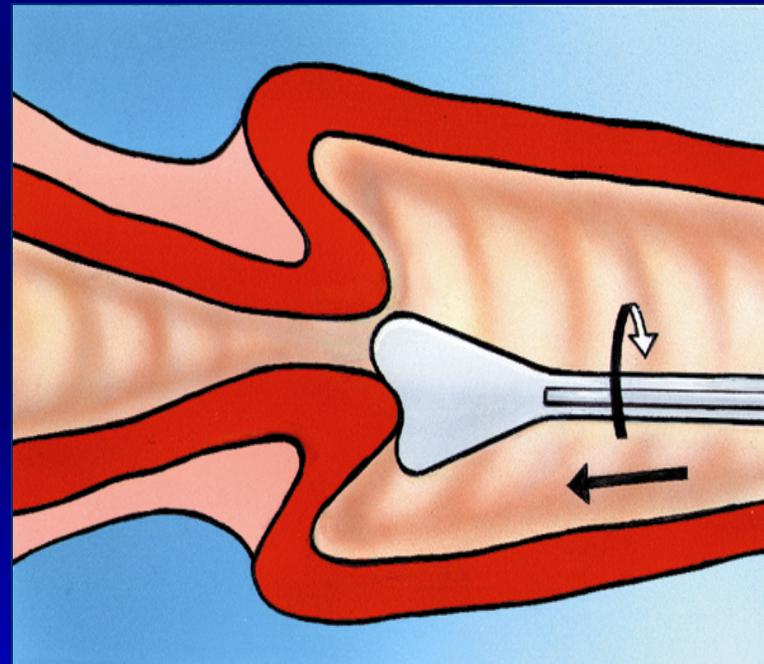
- In pazienti isterectomizzate cioè con cupola vaginale, il prelievo si esegue con l'estremità opposta a quella sagomata che ha un profilo arrotondato e si adatta al campionamento della cupola vaginale.
- In caso di pazienti vergini, il campionamento andrebbe eseguito comunque con gli strumenti validati: l'ostacolo principale è la mancata visualizzazione della cervice legata all'impossibilità di introdurre lo speculum.

Pertanto

nelle pazienti vergini non eseguire il prelievo! E' inutile perché non sono esposte al principale fattore di rischio oncogeno (infezioni HPV). Verranno dopo l'eventuale inizio dell'attività sessuale.

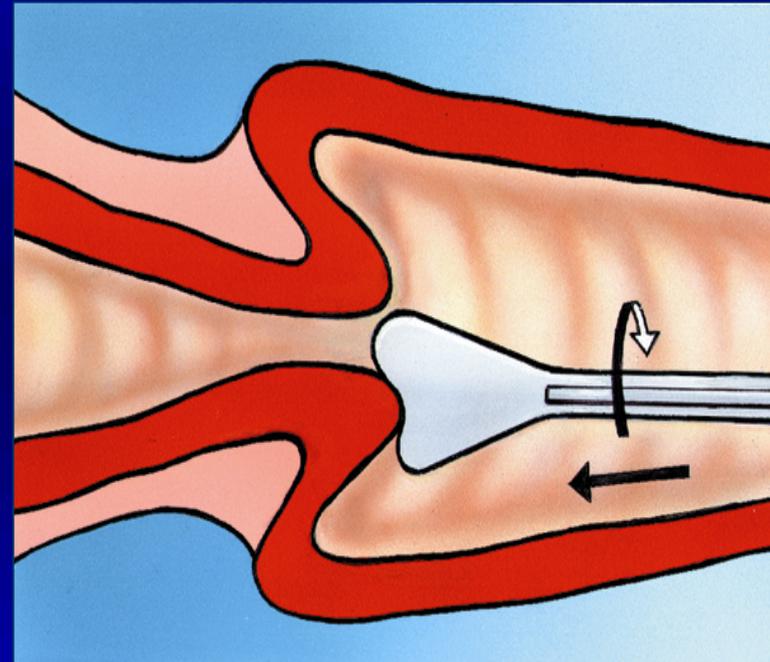
RIASSUMENDO: Spatola

- Prelevare il materiale cellulare dall'esocervice
- Utilizzare solo la spatola in plastica in dotazione
- Ruotare la spatola di almeno 360° mantenendo il contatto con la superficie epiteliale



Riassumendo: Spatola

- Effettuare una rotazione in senso orario che inizia e termina a “ore 9”
 - in senso anti-orario che inizia e termina a “ore 3”.
- In entrambi i casi il materiale raccolto verrà trattenuto sulla superficie orizzontale superiore della spatola nel momento in cui viene rimosso
- Si raccomanda di utilizzare la spatola prima del Cytobrush



**Iniziare la fase di
risciacquo**

FASE DI RISCIAACQUO: è importantissima!!!

Dopo ogni fase del prelievo, il momento del risciacquo nel liquido fissativo ricopre un'importanza fondamentale per il futuro pap test in TP.

Pertanto ci deve essere un rispetto scrupoloso delle indicazioni per garantire un corretto e completo trasferimento del campione cellulare nel liquido fissativo del bocchettino.

Eseguire un risciacquo scorretto condiziona negativamente la qualità del prelievo eseguito e compromette l'affidabilità delle fasi successive del test.

RISCIACQUO DELLA SPATOLA

Il risciacquo della spatola va eseguito **subito dopo** aver eseguito il prelievo **ruotando energicamente** la spatola immersa nel liquido fissativo PreservCyt del boccettino per almeno **10 volte.**

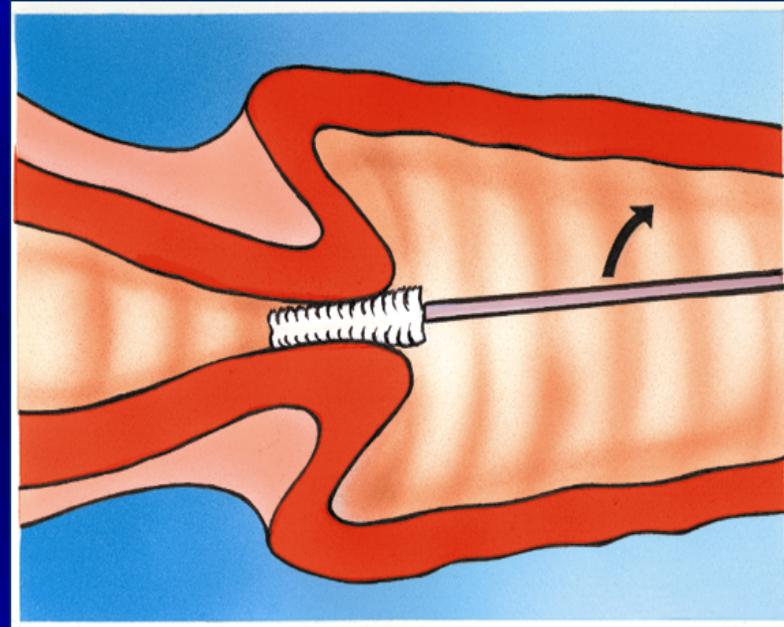
Le spatole sono monouso quindi appena finito il risciacquo, eliminare la spatola nel contenitore dei rifiuti

Non lasciare la spatola in immersione per eseguire il risciacquo in un secondo momento:

se il **materiale cellulare** prelevato dalla spatola, immerso nel boccettino PreservCyt non viene risciacquato subito, **subisce una coartazione in aggregati** artefattuali che in seguito impediscono una corretta valutazione microscopica.

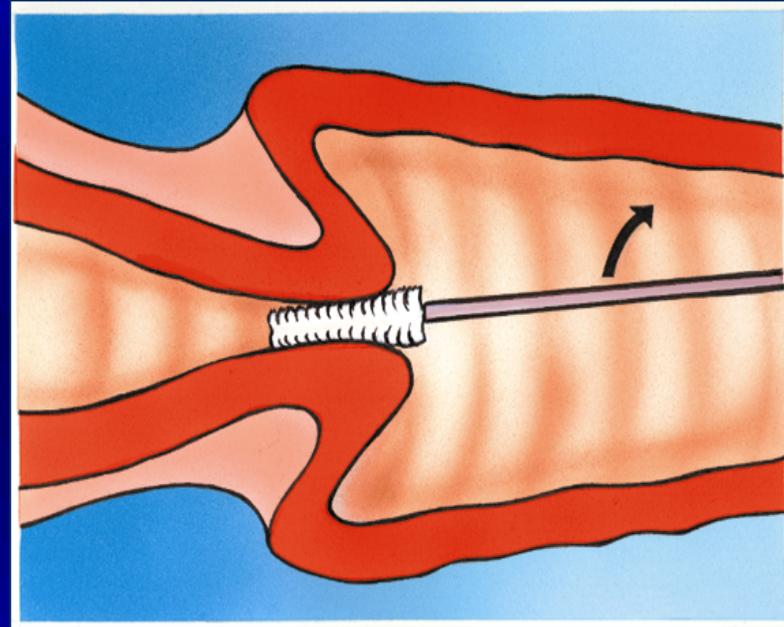
Cytobrush

- Inserire il Cytobrush nel canale cervicale
- Le ultime setole dovranno risultare ancora visibili; ciò minimizza il campionamento endometriale



Cytobrush

Applicando una lieve pressione, ruotare il brush di 90-180 (da $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ giro) per evitare il sanguinamento



Cytobrush

- Il campionamento dell'endocervice si esegue con una rotazione del Cytobrush di 90-180°. Ulteriore ruotazione del brush non migliora la rappresentatività del prelievo e può causare sanguinamento.
- Solo l'introduzione del Cytobrush, in quanto ricoperto di setole su tutta la sua circonferenza, fornisce un campionamento rappresentativo dell'intero canale endocervicale + la rotazione del Cytobrush fornisce un campionamento più "profondo" ma non deve superare i 180° perché troppo energico e causa di sanguinamento.

- Il Cytobrush permette il campionamento delle cellule ghiandolari dell'endocervice (canale cervicale o endocervice) + le cellule giunzionali in caso di risalita della GSC.
- Inserire il Cytobrush nel canale cervicale attraverso l'Orefizio Uterino Esterno = OUE sino a quando le ultime setole dello spazzolino risultano visibili; questo accorgimento limita il campionamento di cellule endometriali dell'istmo uterino.

Inserendo il Cytobrush troppo a fondo si rischia di prelevare delle cellule endometriali dell'istmo uterino che normalmente non dovrebbero essere presenti in un PapTest e che possono generare problemi di interpretazione diagnostica.

RISCIACQUO DEL CYTOBRUSH

Il risciacquo del Cytobrush va eseguito nella **stesso** boccettino **subito dopo** aver eseguito il prelievo del canale, immergendo il brush e ruotandolo con energia non meno di 10 volte, poi strofinando / stemperando le setole del brush contro le pareti in modo da far flettere le setole e rilasciare il materiale, poi di nuovo ruotare ulteriormente per risciacquare eventuale materiale residuo. Eliminare il Cytobrush monouso negli appositi contenitori per rifiuti

N.B.: non lasciare il Cytobrush in immersione per eseguire il risciacquo in un secondo momento

Il materiale cellulare prelevato dal Cytobrush, se viene immerso nel bocchettino, non viene risciacquato subito, subisce una coartazione in aggregati artefattuali che in seguito impediscono una corretta valutazione microscopica.

Importante

1 Non utilizzare la spatola per raschiare materiale dal Cytobrush

2 Il Cytobrush non va spremuto con le dita

Gli strumenti di prelievo non devono essere sottoposti a raschiamento:

non eseguire manovre di raschiamento,

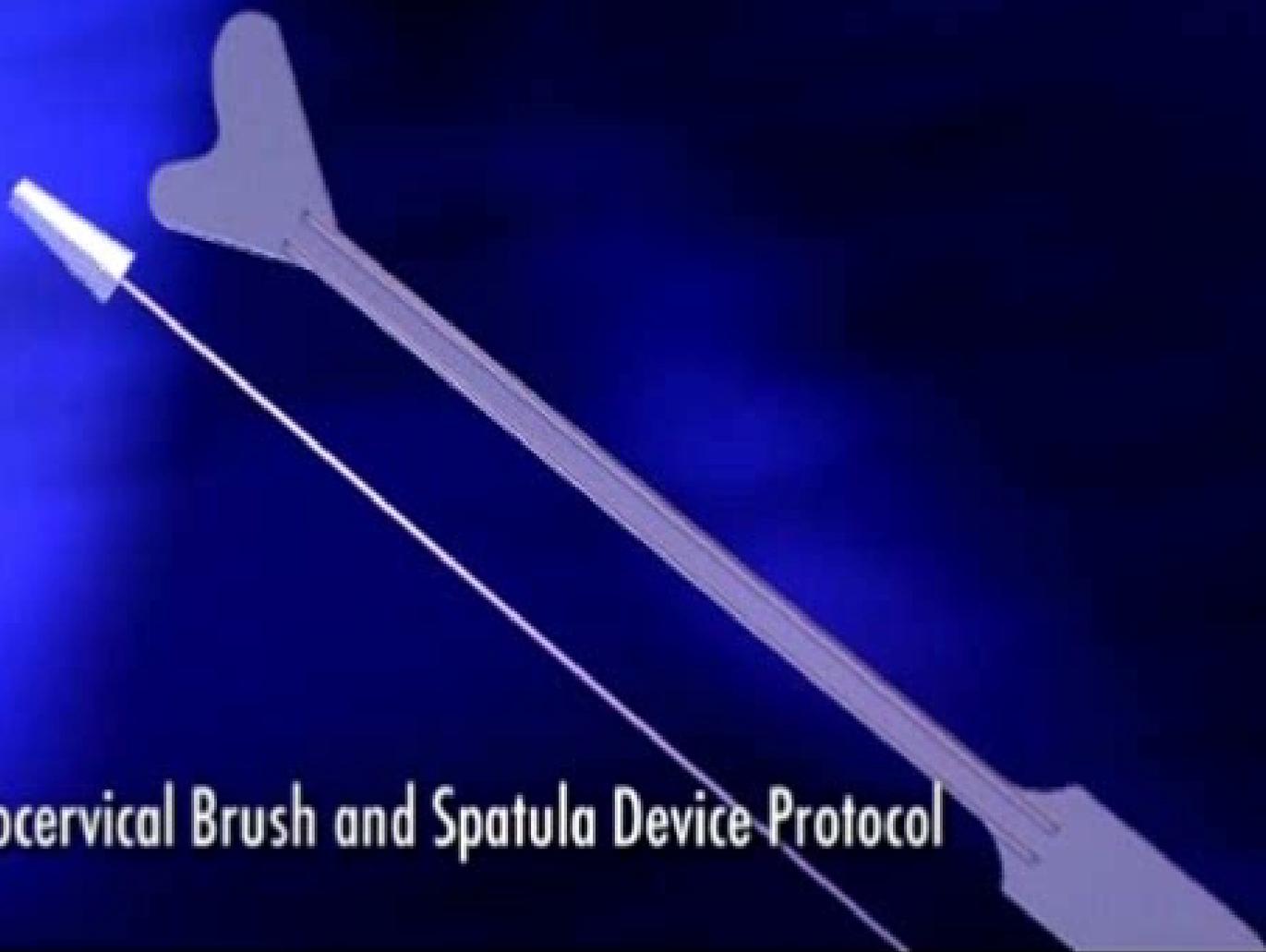
“spremitura” o altre modalità improprie per scaricare il materiale cellulare

Tutto ciò genera danneggiamento meccanico delle cellule e ne compromette l'integrità; gli effetti di danneggiamento cellulare per azioni meccaniche limitano la valutazione sulla morfologia cellulare

Importante

- Lasciare gli strumenti immersi nella fiala
- Raschiare
- Spremere
- Tutte queste “pratiche” possono portare a pap test inadeguati





Endocervical Brush and Spatula Device Protocol

CITOLOGIA DI TRIAGE

- **E' un pap test che funge da filtro tra il positivo ed il negativo e identifica il livello di gravità.**
- **Può essere fatto sia in pap convenzionale che in FL**
- **Viene applicata la classificazione S. BESTESDA 2001**

In che casi si effettua la citologia di triage

Se il test HPV è positivo nello screening primario, il pap test viene allestito dal bocchettino, che è stato conservato in attesa del risultato, in strato sottile e letto al microscopio

PERCHE SI LEGGE LA CITOLOGIA

Il test HPV è più sensibile del pap test ma ha bassa specificità, cioè identifica la presenza di infezione non di malattia.

Se inviassimo tutte le donne HPV + in colposcopia avremmo una diminuzione del valore predittivo positivo del test HPV. Il pap test in questo caso funge da filtro fra test HPV e la colposcopia riportando valori accettabili del test HPV.

***La logica è quella di eseguire
prima un test + sensibile = test HPV ,
poi un test più specifico = pap test***

La popolazione che esegue il test HPV è suddivisa:

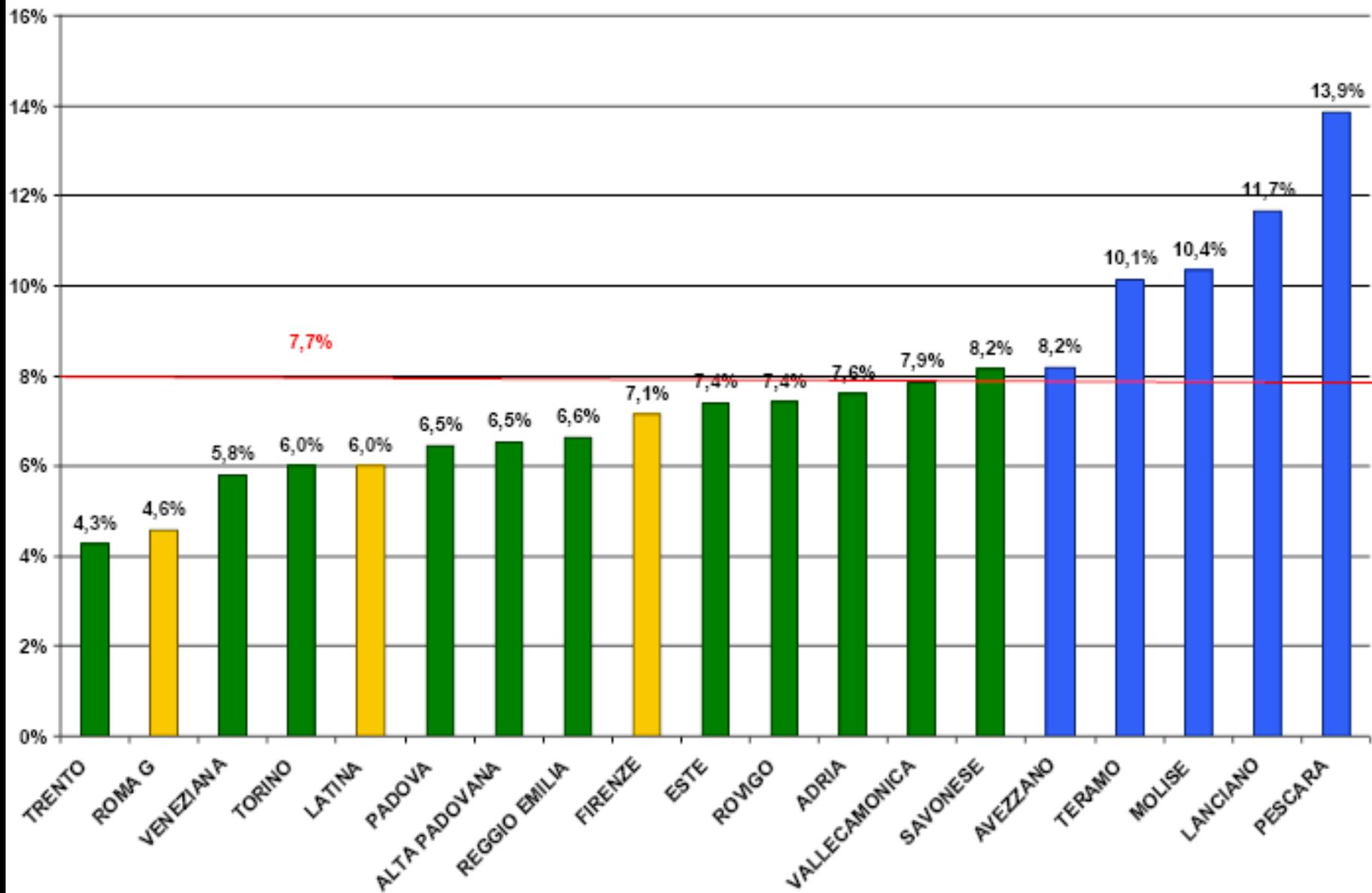
- ***Donne a bassissimo rischio di patologia = test HPV-***
- ***Donne a medio rischio di patologia = test HPV + e citologia negativa = ripetizione dopo 1 anno***
- ***Donne ad elevato rischio di patologia per test HPV + e citologia = ASC US o + = invio in colposcopia***

Il tasso di positività al test HPV è vario:

- In Italia varia dal 4,3 % al 14%, dipende dall'età d'invito es: 25- 64 a., 35-64 a..**
- A Reggio Emilia nello studio pilota, donne invitate fra i 35-64 anni, la positività è stata di circa il 6%, nel secondo passaggio dopo 3 anni la positività è del 3,6%.**

- NORD
- CENTRO
- SUD e ISOLE

% di donne POSITIVE al Test HPV
25-64 anni



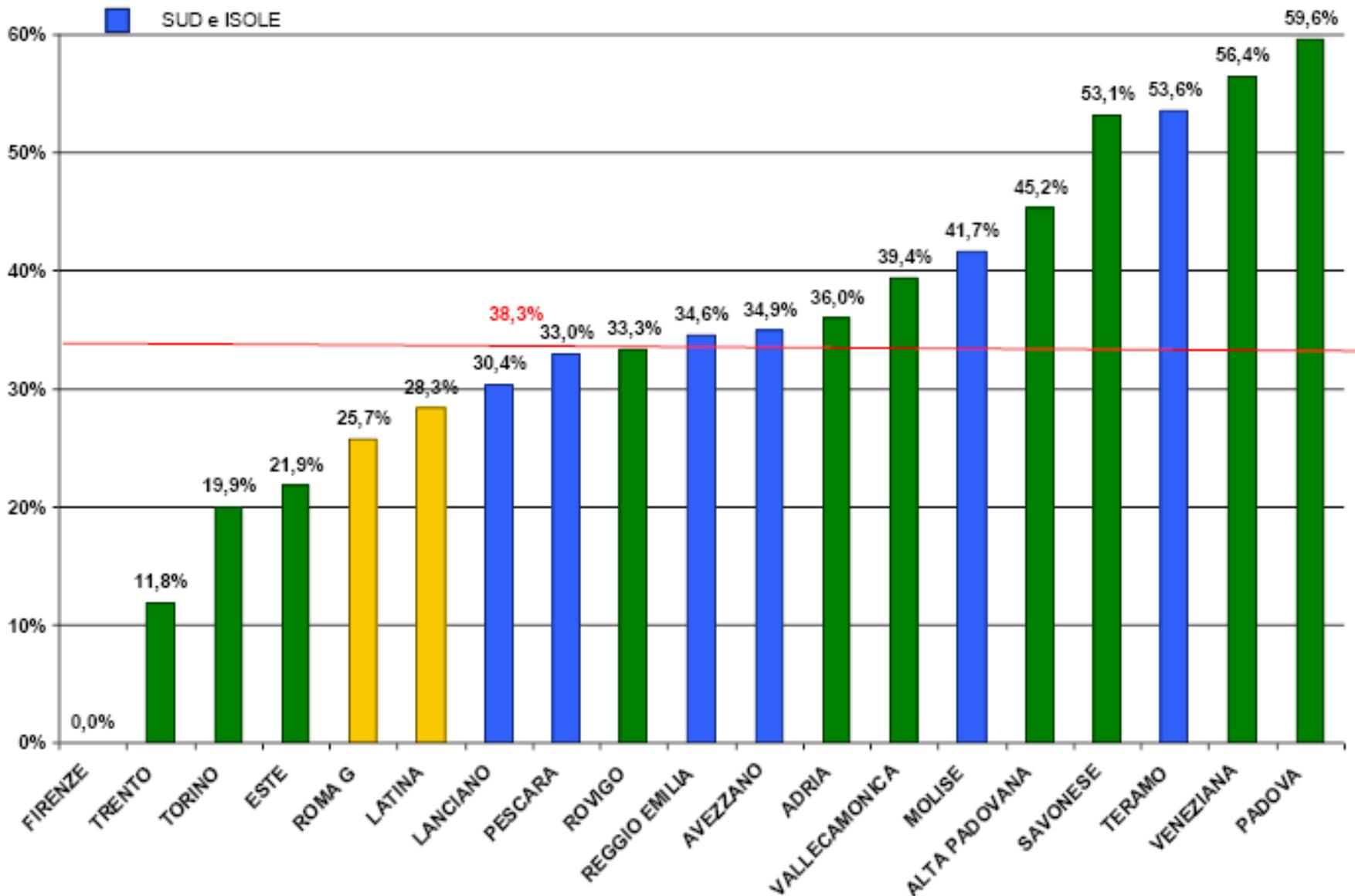
PROBLEMATICHE LEGATE ALLA DIAGNOSTICA CITOLOGICA DI TRIAGE

Il documento GISCI sulla citologia di triage ha
previsto che i casi d'invio al secondo livello
devono essere fra il 25 -35 % dei casi HPV positivi.

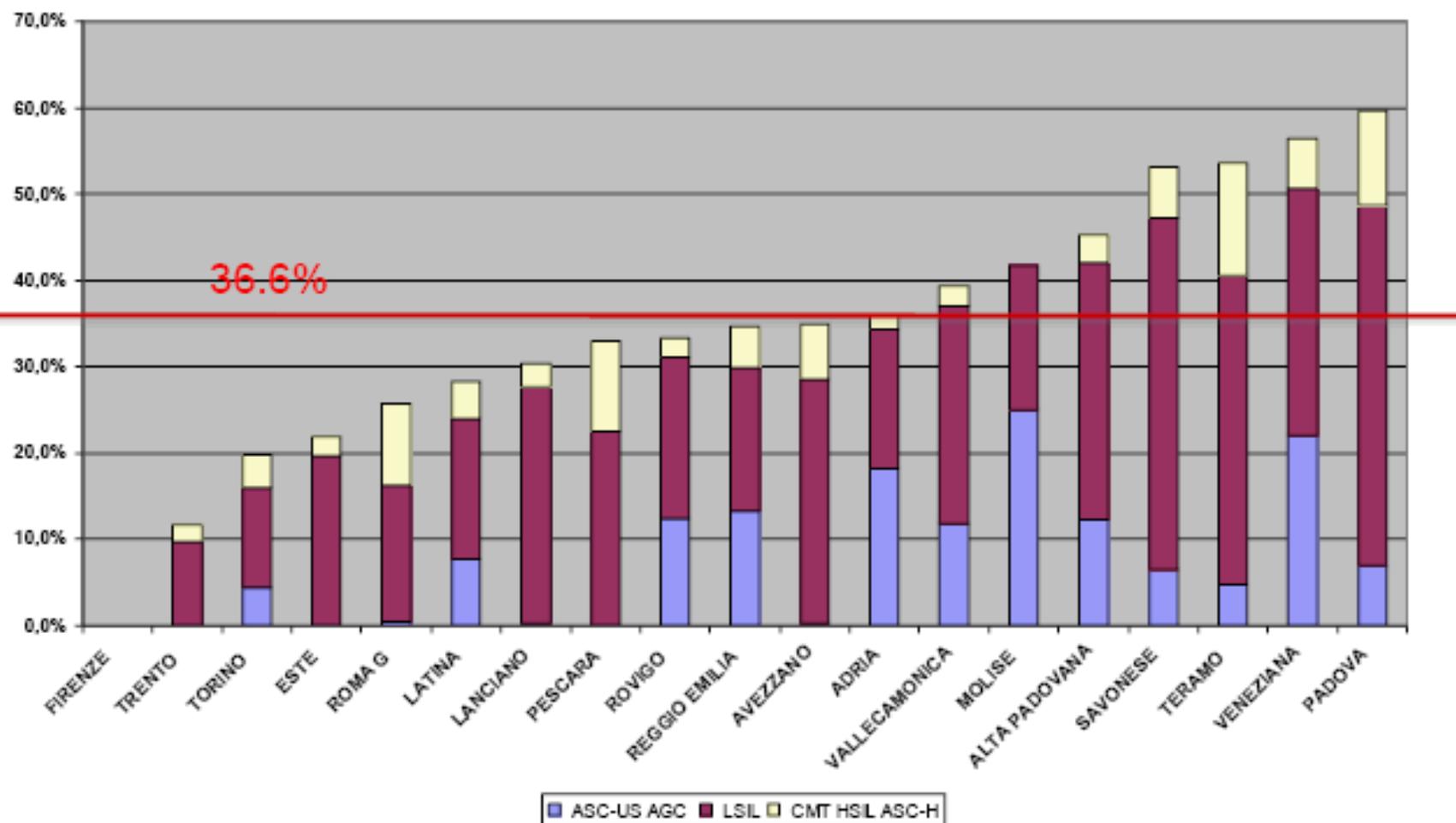
E' stata evidenziata una forte variazione fra i Centri
Italiani fra il 20 ed il 50% di invio in colposcopia.

- NORD
- CENTRO
- SUD e ISOLE

% di donne tutte le fasce d'età (HPV+) con citologia POSITIVA



Donne (tutte le fasce d'età) HPV+: distribuzione per citologia



PROBLEMATICHE LEGATE ALLA DIAGNOSTICA CITOLOGICA DI TRIAGE ESEGUITA CON PAP TEST CONVENZIONALE

Problematica delle categorie diagnostiche

- - ASC US dovrebbero diminuire (non scompaiono).
- - LSIL incrementano numericamente per inserimento anche di quelle modificazioni riferibili ad infezione virale prima interpretate come ASC US.
- - ASC H aumentano in rapporto alla diminuzione dell'ASC US e per inserimento in questa categoria delle cellule piccole displastiche.
- HSIL aumentano per una maggior attenzione nella lettura in caso di test HPV positivo.

PROBLEMATICHE LEGATE ALLA DIAGNOSTICA CITOLOGICA IN STRATO SOTTILE

Problematica delle categorie diagnostiche:

**Tutto quello che ho scritto
varrà anche per la citologia
in strato sottile???????**

PROBLEMATICHE LEGATE ALLA DIAGNOSTICA CITOLOGICA

Tempo di lettura pap test:

**Convenzionale: 8-10 vetrini ora; 40- 45 vetrini
al giorno; 7500- 9000 vetrini anno per
citolettore.**

**Convenzionale di triage: 15 minuti per vetrino
= 4 vetrini all'ora**

**Strato sottile di triage: ?? Tempo?? Da
verificare in quanto l'esperienza è stata
effettuata prevalentemente sui pap
convenzionale.**

Falsi negativi nella citologia di triage

Errore di prelievo:

E' l'errore più frequente. Dovuto alla mancata raccolta delle cellule patognomoniche della lesione.

Errore nella lettura :

dovrebbe in teoria essere quasi nullo in quanto legato all'errore di attenzione da parte del citologo.

Errore di interpretazione:

rimane una possibile causa di falsi negativi. La definizione di falso negativo come oggi intesa non è corretta (Pap test negativi precedenti di 3 anni una diagnosi istologica di CIN2+) ma si parla di falso negativo "temporale "intendendo i casi HPV+ cito - che al successivo controllo dopo 12 mesi, in quanto HPV persistenti, evidenziano una lesione CIN2+

Falsi positivi nella citologia di triage

Errori di interpretazione da parte del citologo che sovrastima gli aspetti morfologici in presenza di test HPV+

FUTURO

IDENTIFICAZIONE DI NUOVI INDICATORI NELLO SCREENING PER I PRELEVATORI PER I CITOLETTORI

Es:

- % TEST HPV INADEGUATI
- % PAP TEST INSODDISFACENTI
- % INVIO AL SECONDO LIVELLO...

**Per continuare ad offrire elevate
prestazioni di qualità alla popolazione
femminile della Regione Emilia
Romagna che da sempre accede
fiduciosa ai nostri servizi**