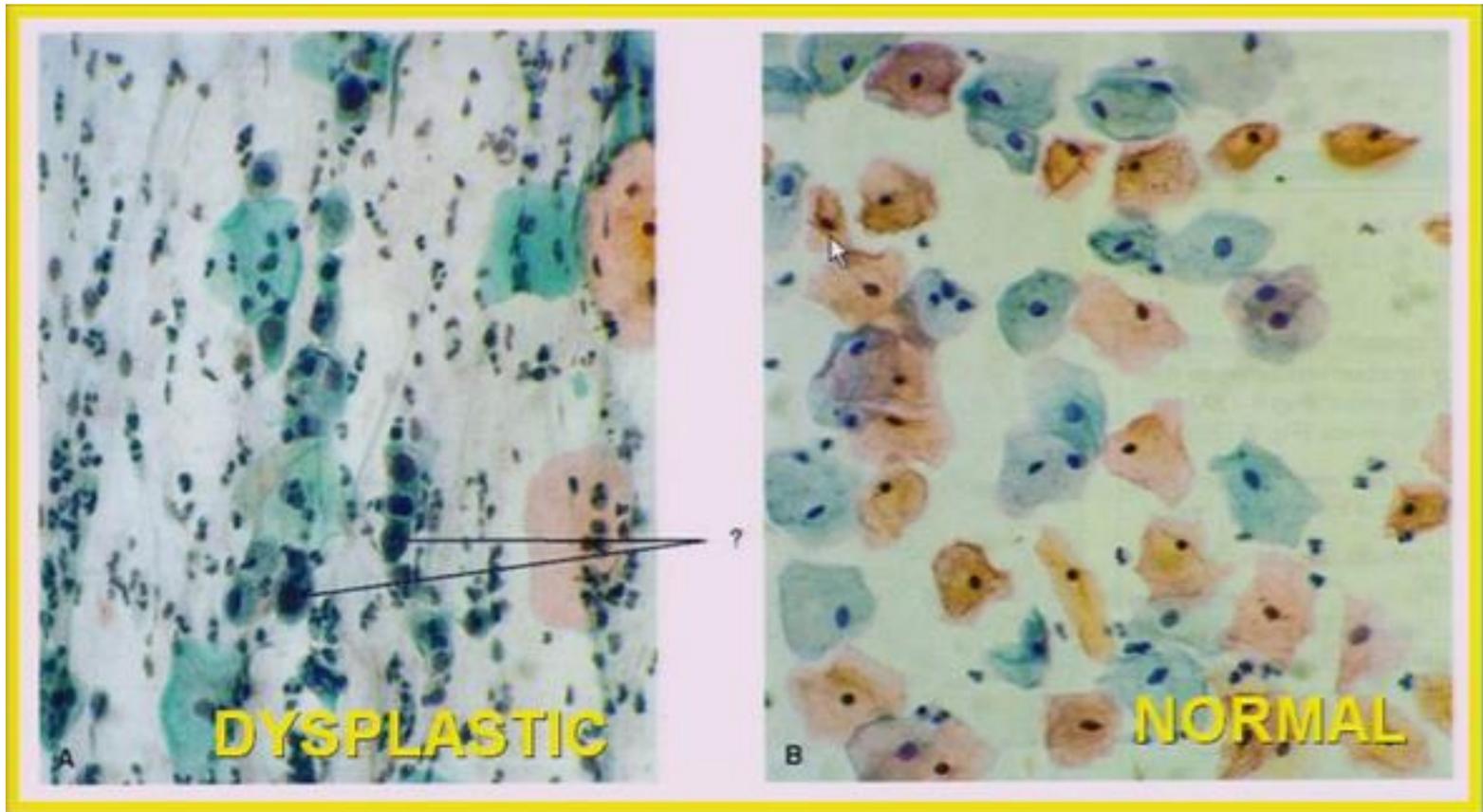


Test di Papanicolau (Pap test)

Ricerca di cellule epiteliali atipiche dal collo dell'utero, che possono essere associate con un aumentato rischio di cancro

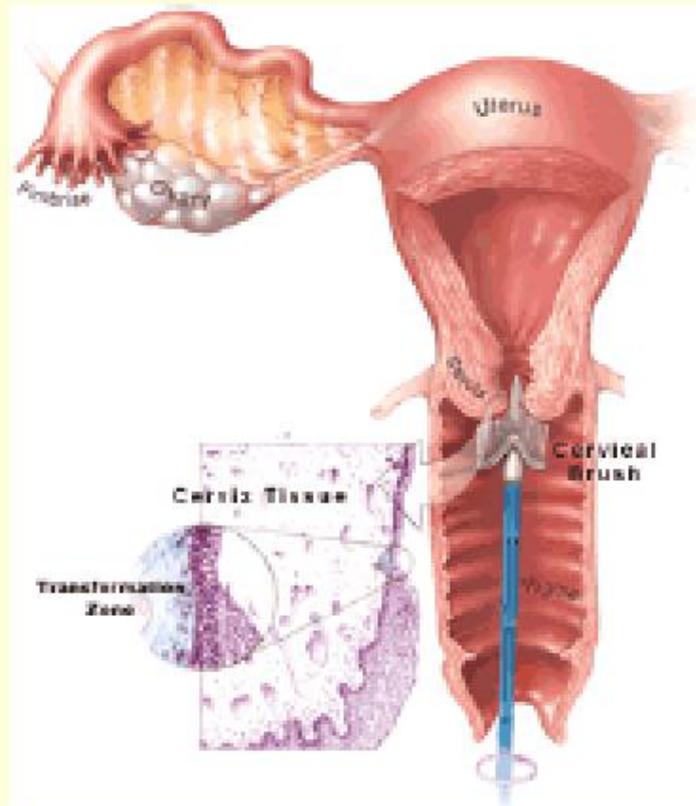


CITOLOGIA CERVICO-VAGINALE

- Sistema messo a punto per la prima volta nel 1943 da Papanicolaou
- Si basa sul concetto che la maggioranza delle neoplasie cervicali sono precedute da alterazioni “precancerose”

POSSIBILI QUADRI DIAGNOSTICI

- 1) Processi infiammatori
- 2) Processi metaplastici e displastici
- 3) Processi neoplastici



Si adopera un strumento, in genere la spatola di Eyre che consente di ottenere le cellule endocervicali

E' necessario ottenere le cellule endocervicali

Se queste sono assenti è corretto segnalarlo nel referto perché il ginecologo possa decidere sulla base dei dati del paziente già in suo possesso se ripetere il prelievo o accettare quel referto fino al prossimo esame citologico

La Citologia come test di screening – il Pap test

- Lo striscio cervicale, o Pap test, viene effettuato sfregando la superficie della cervice e prelevando un campione di cellule epiteliali usando una spatola, uno spazzolino o un altro mezzo di campionamento.
- In citologia convenzionale, le cellule sono direttamente trasferite dalla spatola o dallo spazzolino, al vetrino e poi fissate usando un fissativo spray o alcool.
- Attualmente si utilizza anche la **liquid-based cytology THIN PREP** come metodo preferenziale di raccolta del campione perchè permette al laboratorio di produrre i propri vetrini e avanzare del materiale per ulteriori test. a.

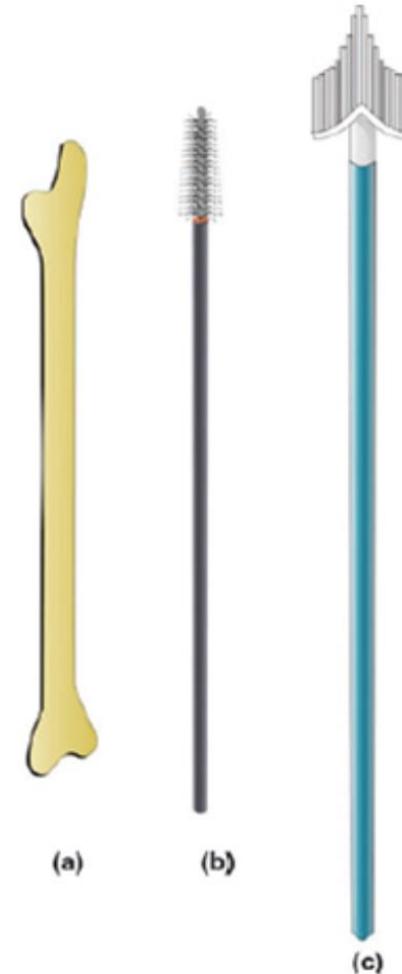


Figure 1. Sampling devices: (a) combined spatula with an *Aylesbury* end (extended tip) above and an *Ayre* end (below); (b) endocervical brush; (c) cervical broom.

Figura 1.2. Strumenti per il campionamento (da Arbyn et al. 2007: vedi Capitolo 8)

Prevenzione del carcinoma del collo dell'utero

- **Prevenzione primaria :**

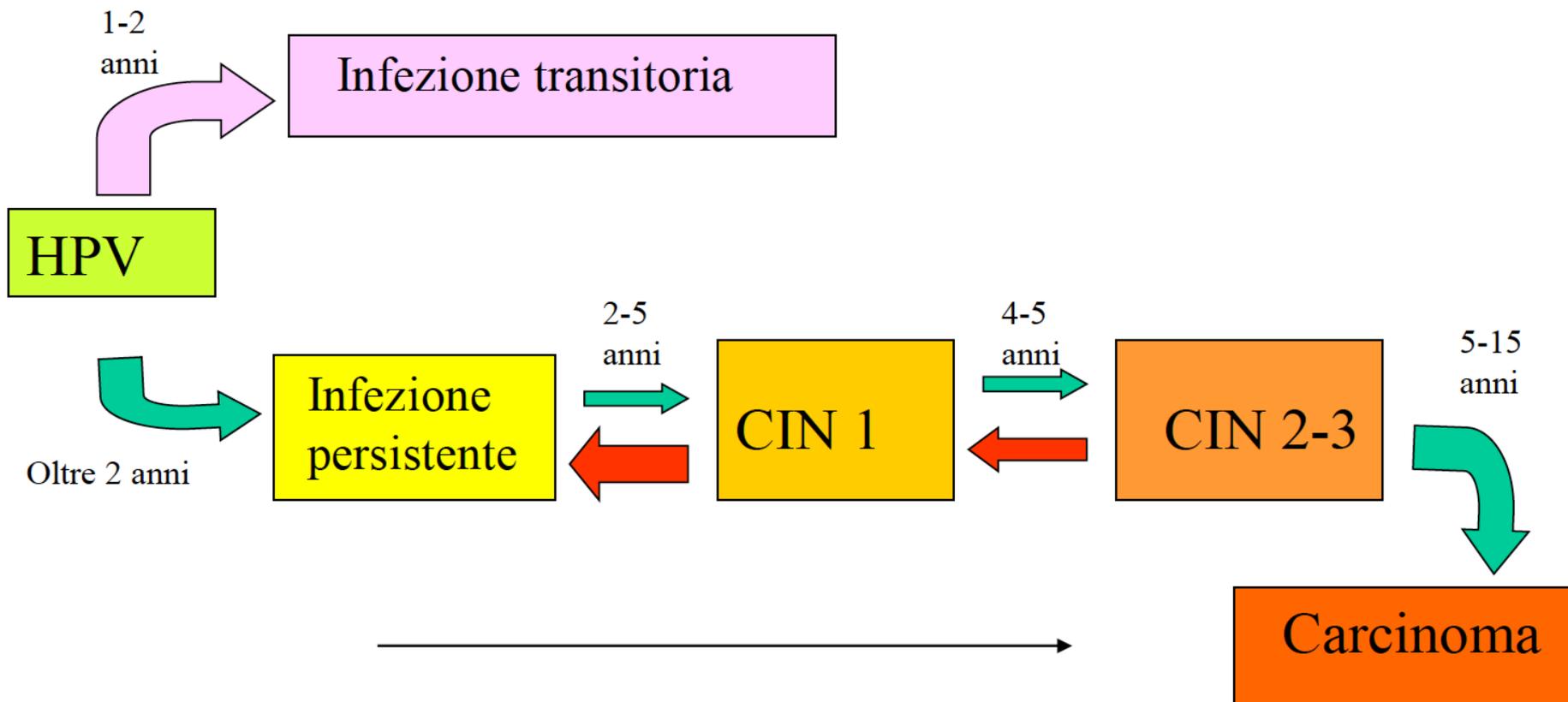
- agisce sulla causa del tumore (HPV alto rischio 16 e 18) e sui cofattori (stile di vita)

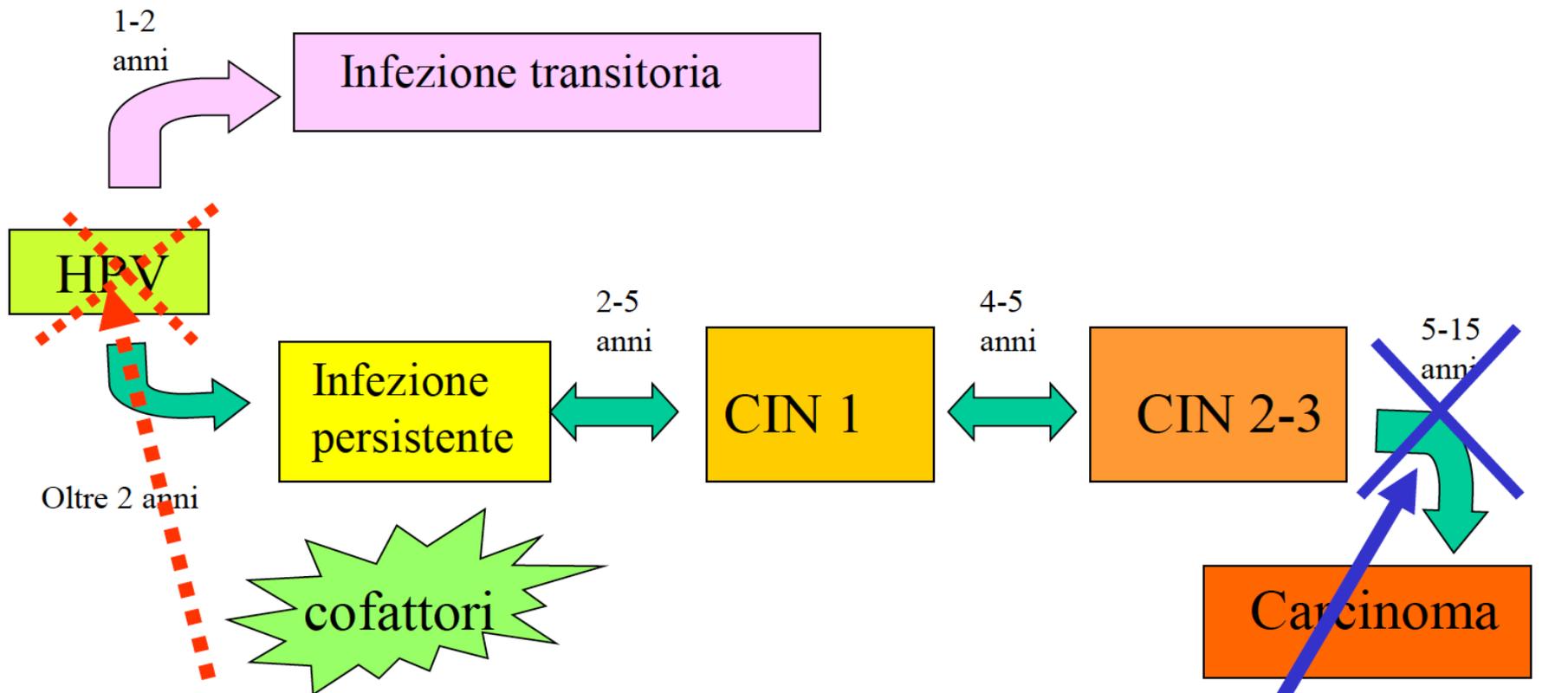
- Interviene su tutta la popolazione indistintamente

- **Prevenzione secondaria :**

- Ricerca lesioni pretumorali per evitare che si trasformino in tumore

- Interviene su un gruppo di persone a rischio perché hanno già sviluppato la malattia pretumorale





Prevenzione I

1. Stile di vita
2. Vaccino

Prevenzione II

Screening di popolazione

Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN)

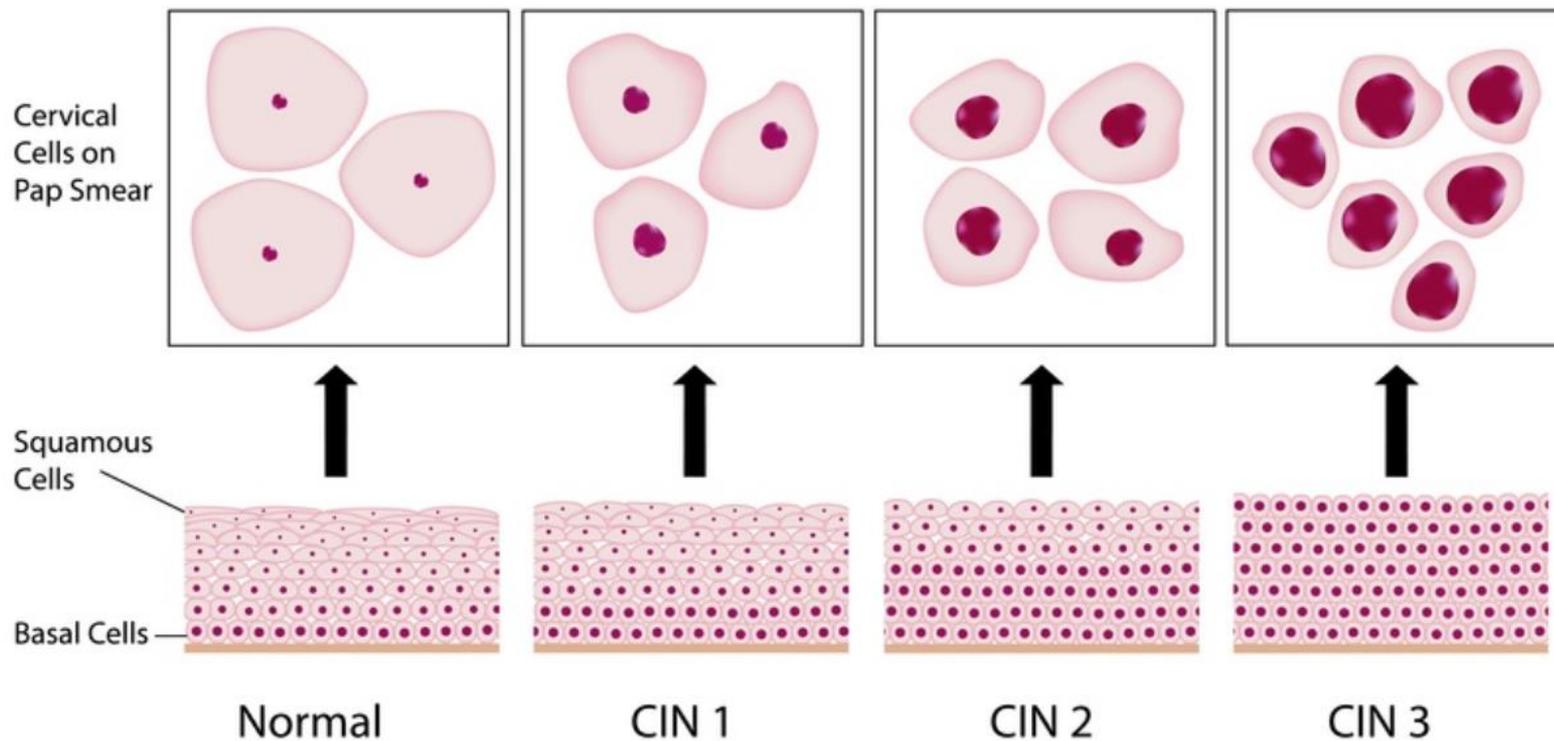


Figura 7 – Sviluppo progressivo del tumore del collo dell'utero

Il Pap test come parte di in programma di screening nazionale

Lo scopo primario del Pap test è quello di prevenire lo sviluppo di un tumore infiltrante tramite la scoperta di lesioni pre-cancerose conosciute come neoplasia intraepiteliale cervicale (CIN) nella cervice uterina, che di solito sono asintomatiche e individuate solo con lo screening.

Il trattamento conservativo della CIN con l'ablazione locale o la rimozione dell'epitelio anormale riduce in modo significativo il rischio di malattia infiltrante.

Prevenzione Secondaria :

Screening della popolazione femminile

Attraverso la diagnosi e la cura delle lesioni pre-neoplastiche si propone di **ridurre l'incidenza e la mortalità** dovuta al carcinoma

Come si esegue il Pap test

- Prelievo esocervicale- endocervicale
- Striscio su vetrino o in soluzione liquida (**Thin prep**) per tecnica su strato sottile
- Fissazione corretta
- Compilazione adeguata di scheda citologica per l'identificazione della paziente

Raccomandazioni

- Non perdite atipiche in atto (ematiche e flogosi)
- No lavande precedenti –no rapporti almeno il giorno prima

Tecnica di esecuzione del Pap test



Spatola di Ayre



+ Citobrush

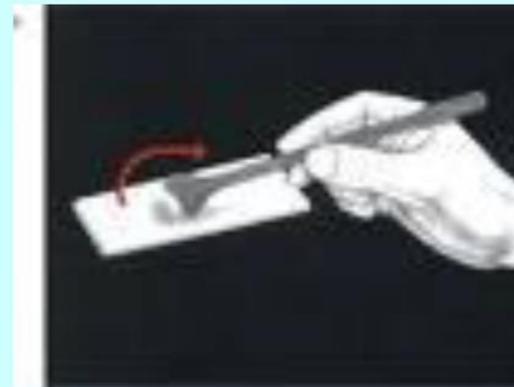


Cervex brush

Modalità di raccolta delle cellule cervicali

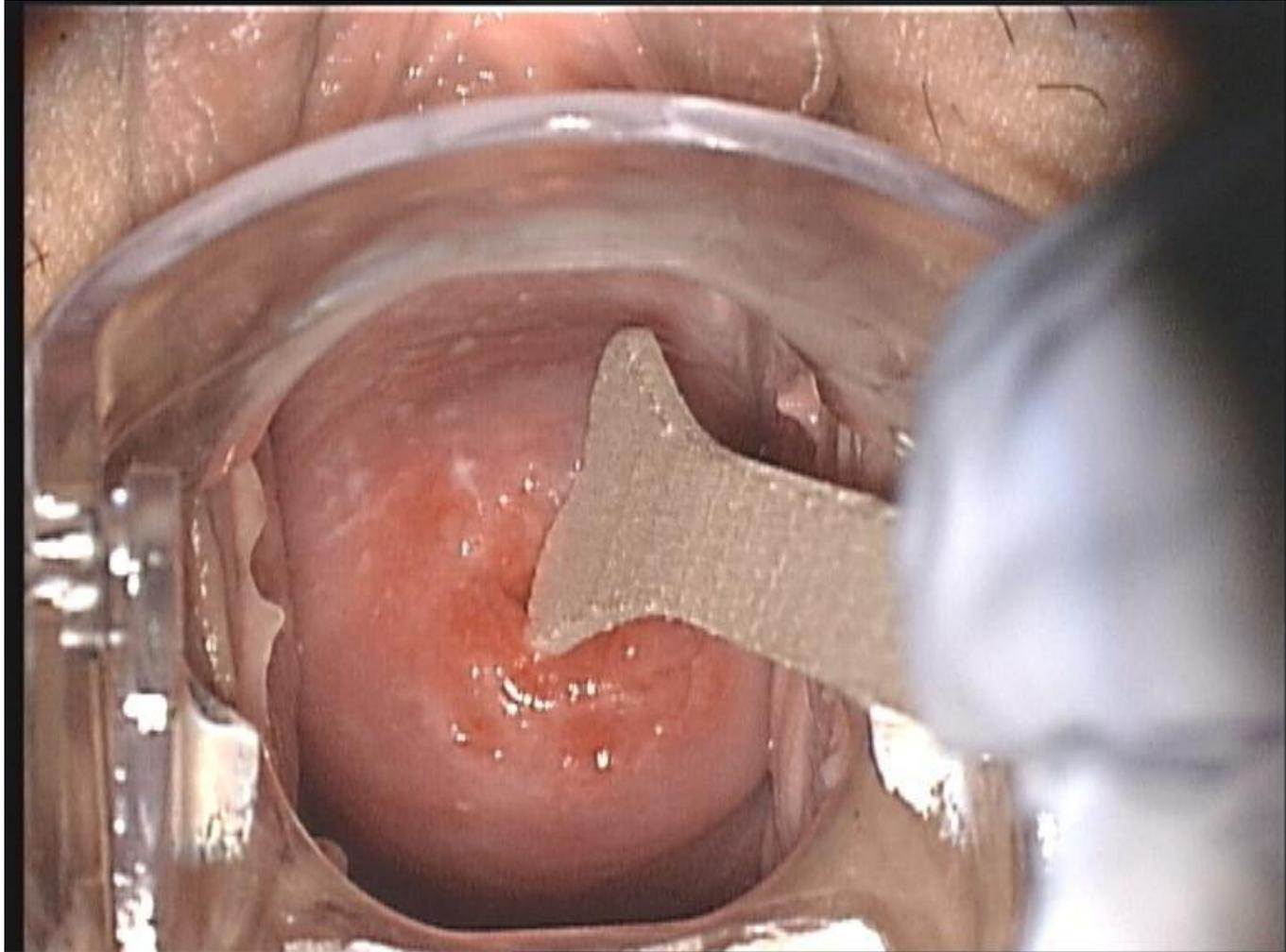


Mezzo liquido per lettura su strato sottile

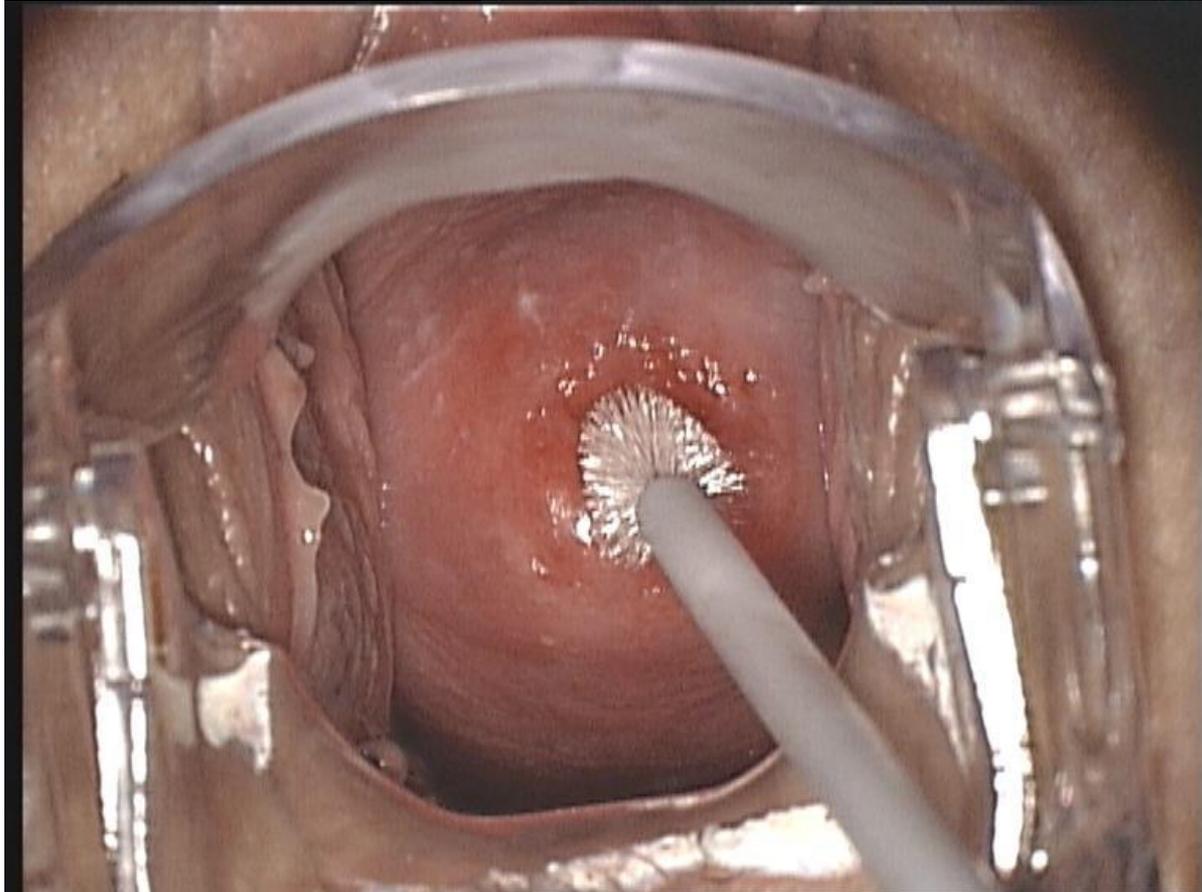


Striscio convenzionale

Il Pap test preleva le cellule dalla superficie del collo uterino ...

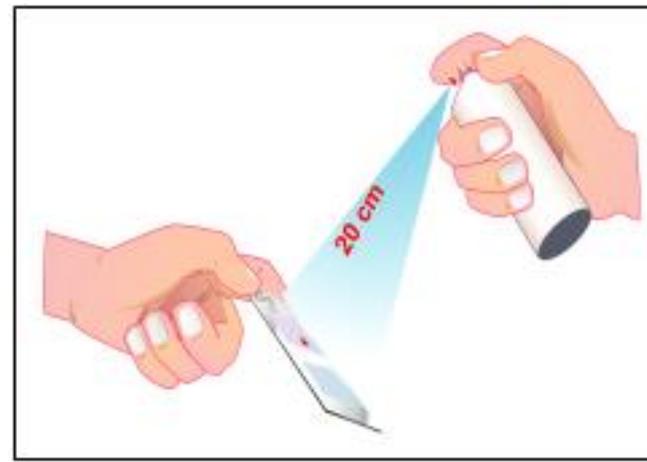
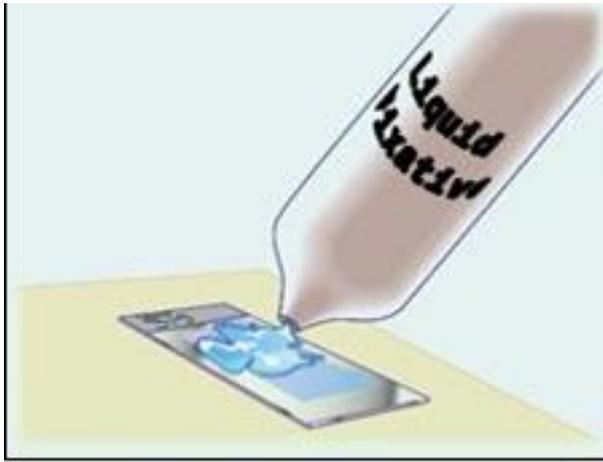


.....e dal canale cervicale



ESECUZIONE DEL PAP test

- Deve essere rappresentativo della cervice sia esocervice che endocervice per cui il prelievo deve raccogliere il maggior numero di cellule da
 - Zona di trasformazione
 - Giunzione squamo-colonnare
 - Endocervice



Fissazione di uno striscio convenzionale

Lo spray fissativo consiste di una base alcolica e carbowax (polietilene) che forma un sottile strato protettivo di cera sul vetrino.

Il carbowax va rimosso tramite l'immersione in alcol prima della colorazione

Preparazione dei vetrini per l'esame microscopico

- I vetrini per la citologia su strato liquido sono preparati usando gli strumenti automatici. I più usati sono **ThinPrep (Hologic)** e SurePath, i cui manuali dovrebbero essere tenuti in laboratorio e usati.
- Links per tutti gli strumenti e metodi per la raccolta dei campioni per ThinPrep si trovano sul sito principale: <http://www.thinprep.com/hcp/ifu/>
- Links a BD SurePath <http://www1.bd.com/anz/training/surepath>

Thin prep



Processo di preparazione del campione ThinPrep

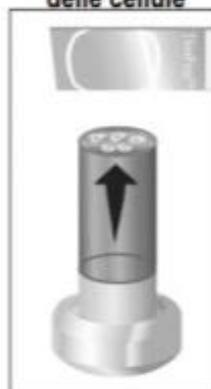
1. Dispersione



2. Raccolta delle cellule



3. Trasferimento delle cellule



(1) Dispersione

Il filtro ThinPrep Pap Test ruota all'interno della fiala contenente il campione, creando un moto vorticoso in grado di separare i detriti e di disperdere il muco, senza compromettere la morfologia delle cellule diagnostiche.

(2) Raccolta delle cellule

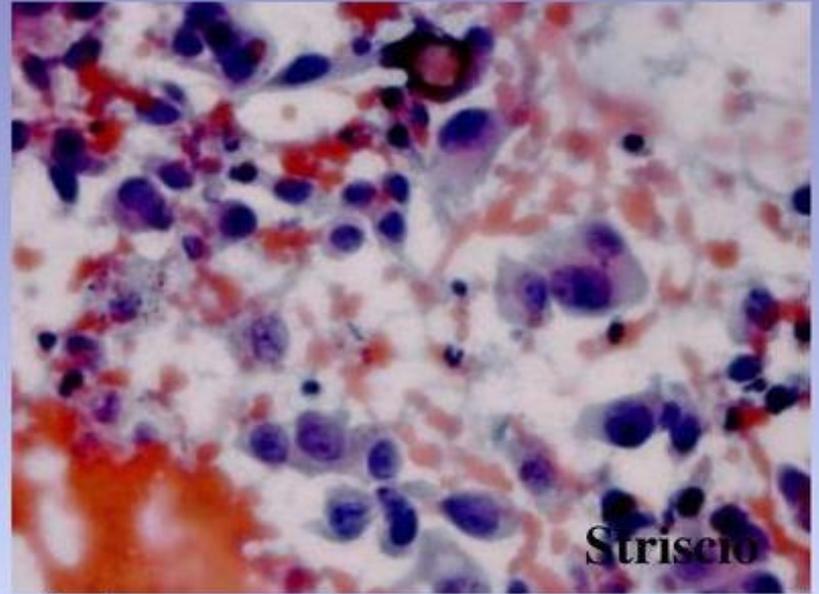
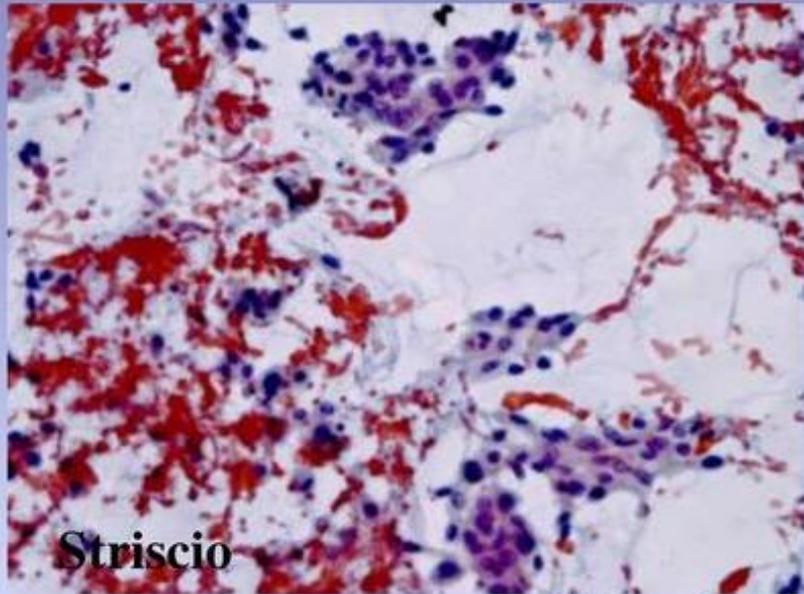
All'interno del filtro ThinPrep Pap Test si crea una lieve pressione negativa, tale da raccogliere le cellule sulla superficie esterna della membrana. La raccolta delle cellule è controllata dal software del sistema ThinPrep 2000 che regola il flusso che passa attraverso il filtro ThinPrep Pap Test.

(3) Trasferimento delle cellule

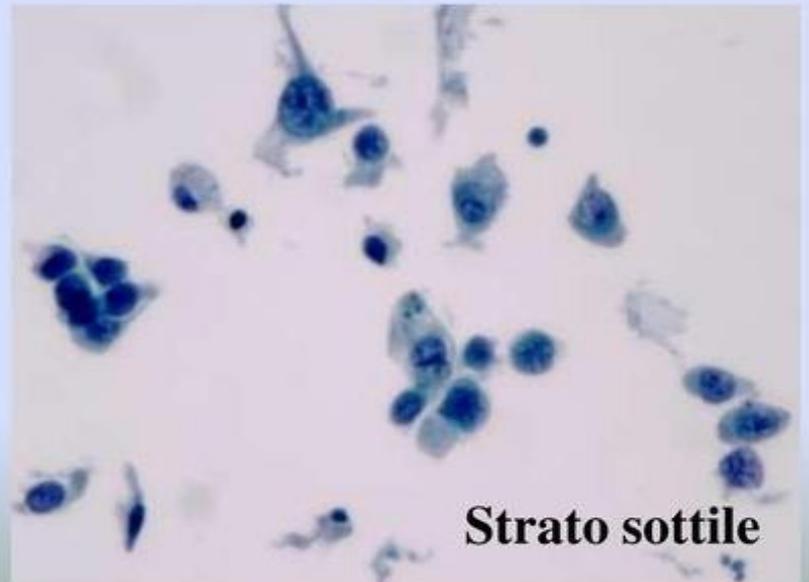
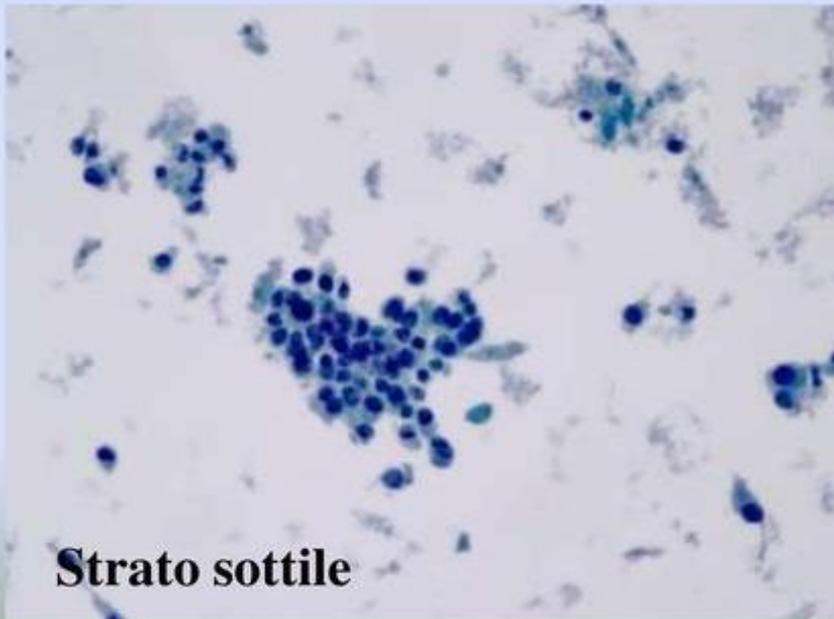
Dopo che le cellule sono state raccolte sulla superficie della membrana, il filtro ThinPrep Pap Test viene fatto ruotare e viene delicatamente appoggiato sul vetrino ThinPrep. Un fenomeno naturale di attrazione e una lieve pressione positiva fanno sì che le cellule aderiscano al vetrino e si dispongano in modo uniforme all'interno di una ben definita area circolare (spot).

I vantaggi della citologia su strato liquido (LBC)

- Chi raccoglie il campione non è tenuto a preparare strisci uniformi e a fissarli prima che si asciugano all'aria.
- Le preparazioni LBC sono fissate bene in modo uniforme
- Le cellule non sono oscurate da essudato o sangue
- Area è più piccola ed è più facile esaminarla.



Colorazione Papanicolaou



Condizioni cliniche richieste per la raccolta del campione

I campioni cervicali andrebbero raccolti a metà del ciclo: i campioni mestruali potrebbero essere oscurati dal sangue e dalla cellule endometriali sfaldatesi alcuni giorni prima o dopo la mestruazione e portare ad una errata interpretazione delle alterazioni cellulari.

L'informazione accurata sull'età e data di nascita della paziente, la data dell'ultima mestruazione, i sintomi, se presenti, e l'anamnesi dei precedenti screening dovrebbero essere forniti sulla richiesta e potrebbero essere rilevanti nell'interpretazione delle eventuali alterazioni citologiche o per una corretta indicazione del follow up.

Screening citologico

Il primo esame microscopico viene effettuato da un citotecnologo (screener primario) che è formato per identificare cellule anormali tra molte migliaia di cellule normali nello striscio o nella preparazione in fase liquida.

I campioni che contengono cellule patologiche sono passati ad un senior o a un patologo che grada le anomalie in base ad un sistema terminologico riconosciuto e fornisce raccomandazioni ai clinici sul management del paziente.

Colorazione usando il metodo Papanicolaou

La colorazione tricromica è la combinazione di:

- una colorazione nucleare, cioè l'ematossilina
- due controcolorazioni, OG-6 e EA-50.

OG-6 colora la cheratina

EA-50 (una doppia colorazione, eosina e azzurro) colora il citoplasma delle cellule squamose epiteliali, nucleoli e globuli rossi.

Metodo regressivo della colorazione di Papanicolaou (Colorazione automatica)

Stazione	Soluzione	Tempo (minuti)
1	95% Alcol	1:30
2	70% Alcol	1:30
3	Ematossilina	4:00
4	Acqua corrente	0:05
Lavaggio1	Acqua	Lavaggio
Lavaggio 2	Acqua	Lavaggio
Lavaggio 3	Acqua	Lavaggio
Lavaggio 4	Acqua	Lavaggio
5	70% Alcol	2:00
6	95% Alcol	1:00
7	OG6	2:00
8	95% Alcol	0:10
9	95% Alcol	0:10
10	EA50	6:00

Caratteristiche della colorazione di Papanicolaou

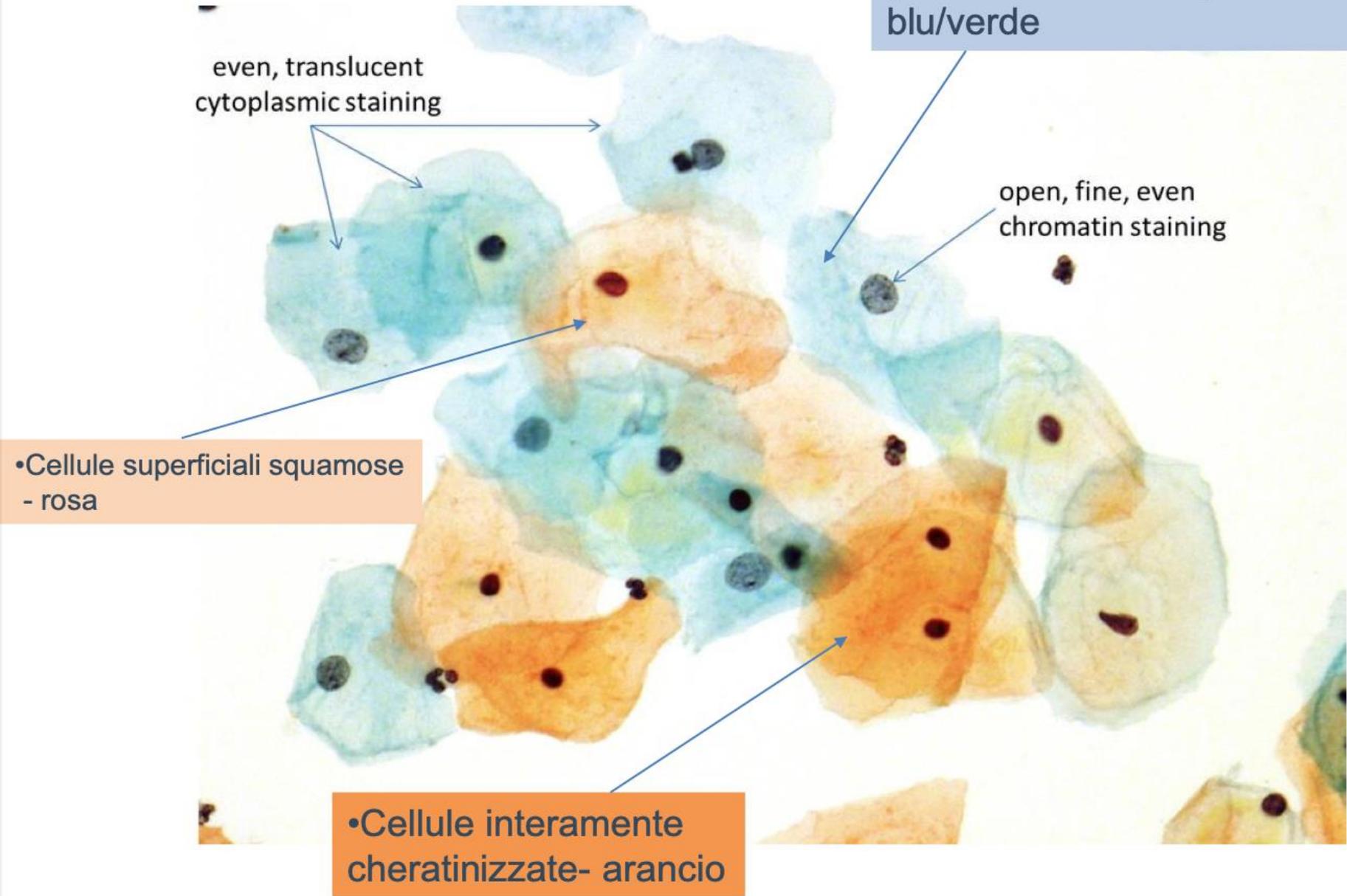
Nuclei singoli

- Chiaramente visibili a basso ingrandimento (obiettivo x10) e ad alto ingrandimento (obiettivo x40)
- Colore da blu/viola a nero
- Granulare e crespo (non indistinto)

Controcolorazioni (citoplasma)

- Cellule superficiali squamose - rosa
- Cellule meno mature (intermedie e metaplastiche)- blu/verde
- Cellule interamente cheratinizzate- arancio

colorazione di Papanicolaou



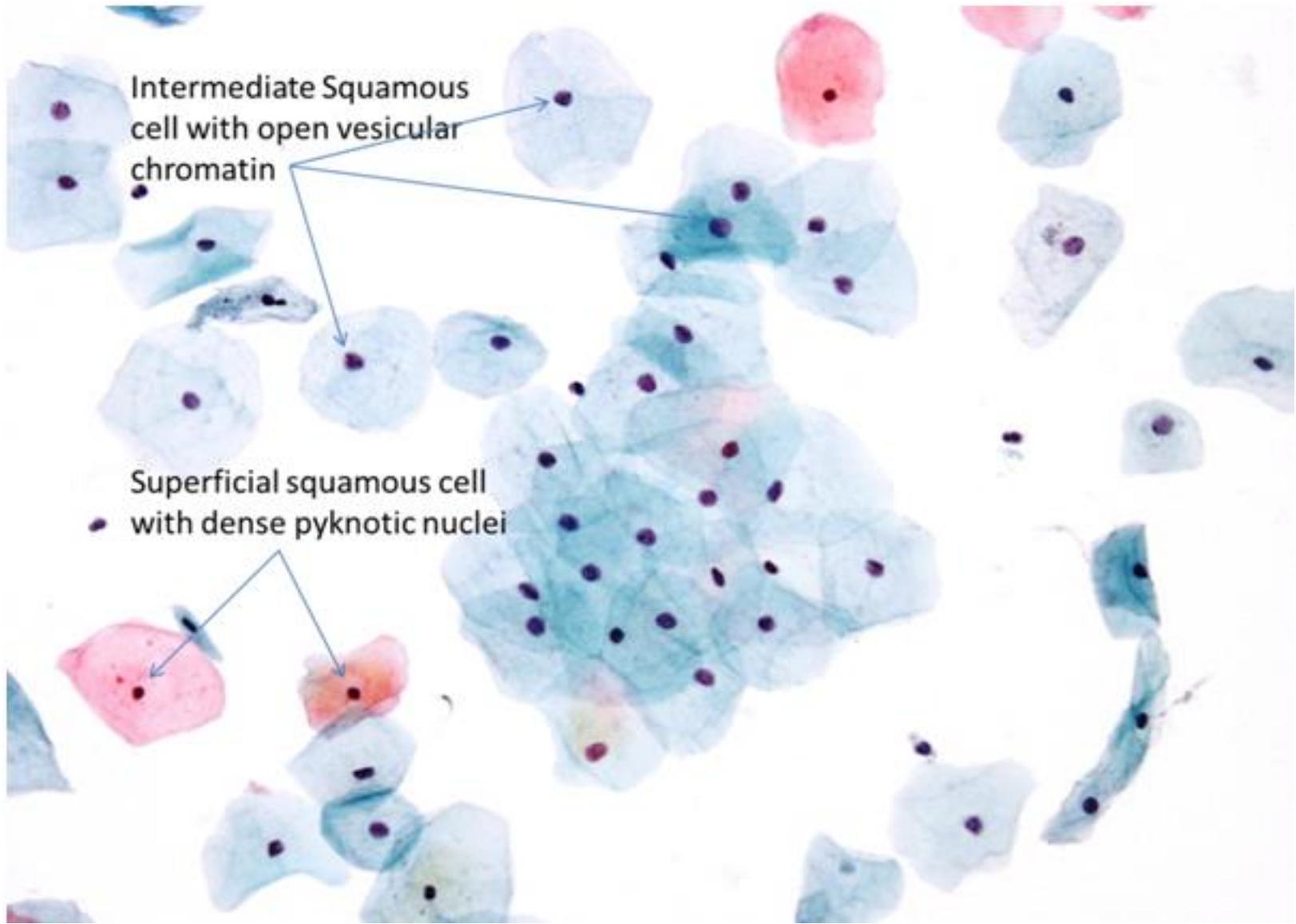
•Cellule meno mature (intermedie e metaplastiche)- blu/verde

even, translucent cytoplasmic staining

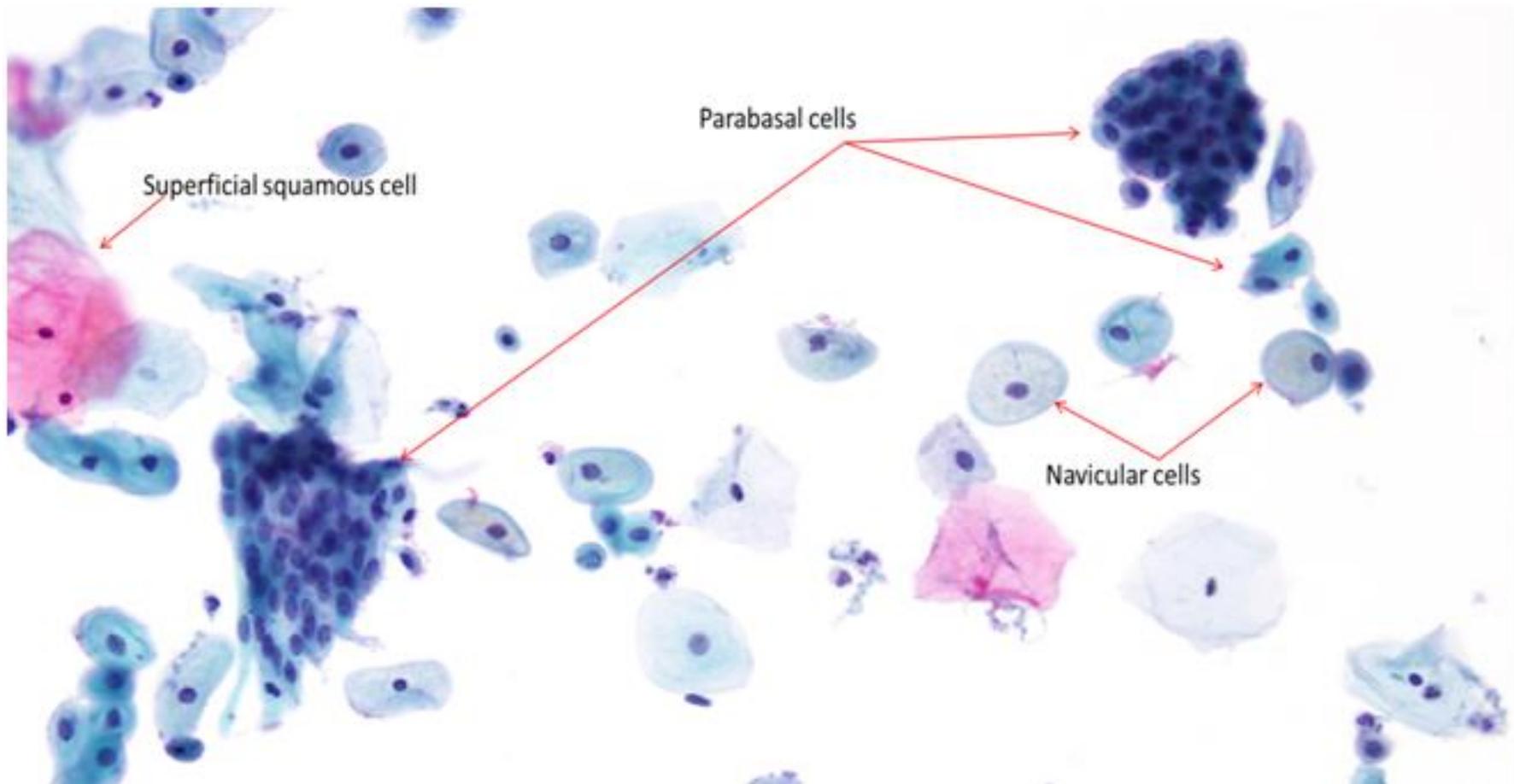
open, fine, even chromatin staining

•Cellule superficiali squamose - rosa

•Cellule interamente cheratinizzate- arancio



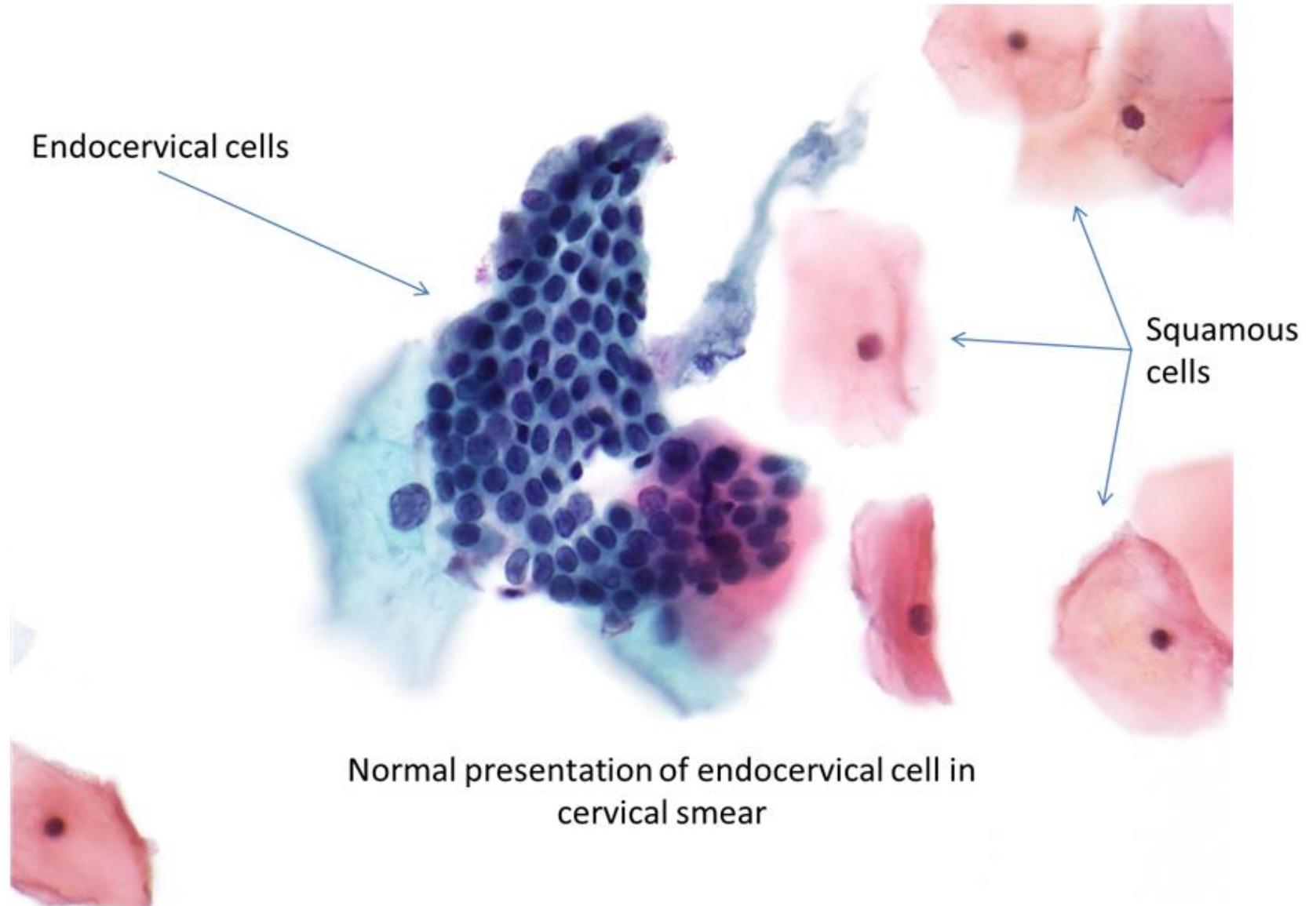
Citologia delle cellule squamose normali



Cellule squamose parabasali sono piccole cellule squamose immature tonde o ovali.

Le cellule hanno un grande nucleo centrale vescicoloso con una cromatina fine e uniforme e un citoplasma denso basofilo.

Le cellule possono presentarsi sia singole che in gruppi.



(a) Normal endocervical cells

Terminologia citologica

Classificazione secondo Bethesda

- ADEGUATEZZA del preparato
- CATEGORIE DIAGNOSTICHE
 - Normale
 - **Anormale: cellule squamose**
 - **ASC-US** cellule squamose atipiche di significato indeterminato
 - **ASC-H** cellule squamose atipiche non escluse lesioni di alto grado
 - **LSIL** lesione intraepiteliale squamosa di basso grado
(**compatibile** con HPV displasia lieve-CIN I)
 - **HSIL** lesione intraepiteliale di alto grado
(**compatibile** con Displasia moderata-grave –CIS-CIN 2-3)
 - HSIL probabile infiltrazione
 - **Cellule Tumorali Maligne**
 - **Anormale : cellule ghiandolari**
 - **AGC** cellule ghiandolari atipiche endocervicali-endometriali-NOS
 - AGC probabile neoplasia
 - **Adenocarcinoma in situ (AIS)**
 - **Adenocarcinoma infiltrante**
 - **Altre neoplasie**

Gestione del Pap test anormale “protocolli e linee guida”

- Tutti Pap test anormali vengono inviati in colposcopia
- Tranne la categoria *ASC-US* in cui si effettua il test HPV per inviare ad approfondimento (colposcopia) solo quelle con Test Positivo.

Infatti è una categoria citologica frequente ma solo nel 5-10 % dei casi sottintende una lesione significativa CIN

The Bethesda System TBS

Bethesda System Terminology

Bethesda System (TBS) for reporting cervical or vaginal cytologic diagnoses

The terminology of TBS 2001, includes revisions in statements of adequacy, general categorization, and interpretation and results of epithelial cell abnormalities

The 2001 Bethesda System for Reporting

Cervical Cytologic Diagnoses

- Specimen adequacy
- General categorization (optional)
- Interpretation/result
- Automated review and ancillary testing (include if appropriate)
- Educational notes and suggestions (optional)

Specimen adequacy

- **Satisfactory for evaluation**

Presence or absence of endocervical or transformation zone components or other quality indicators such as partially obscuring blood or inflammation

- **Unsatisfactory for evaluation (specify reason)**

Specimen rejected or not processed (specify reason)

Specimen processed and examined, but unsatisfactory for evaluation of epithelial abnormalities (specify reason)

- **Interpretation/result**

Negative for intraepithelial lesion or malignancy

Organisms

Trichomonas vaginalis

Fungal organisms morphologically consistent with Candida species

Shift in flora suggestive of bacterial vaginosis

Bacteria morphologically consistent with Actinomyces species

Cellular changes consistent with herpes simplex virus

Epithelial cell abnormalities

Squamous cell

Atypical squamous cells (ASC)

ASC of undetermined significance (ASC-US)

ASC, cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion (ASC-H)

Low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL)

Encompassing: human papillomavirus, mild dysplasia, and cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 1

High-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL)

Encompassing: moderate - severe dysplasia, carcinoma in situ, CIN 2, and CIN 3

Squamous cell carcinoma

Glandular cell

Epithelial cell abnormalities

Glandular cell

Atypical glandular cells (AGC)

Specify endocervical, endometrial, or glandular cells not otherwise specified

Atypical glandular cells, favor neoplastic

Specify endocervical or not otherwise specified

Endocervical adenocarcinoma in situ (AIS)

Adenocarcinoma

Other (list not comprehensive)

Endometrial cells in a women 40 years or older

ASCUS

ASC of undetermined significance (ASC-US)

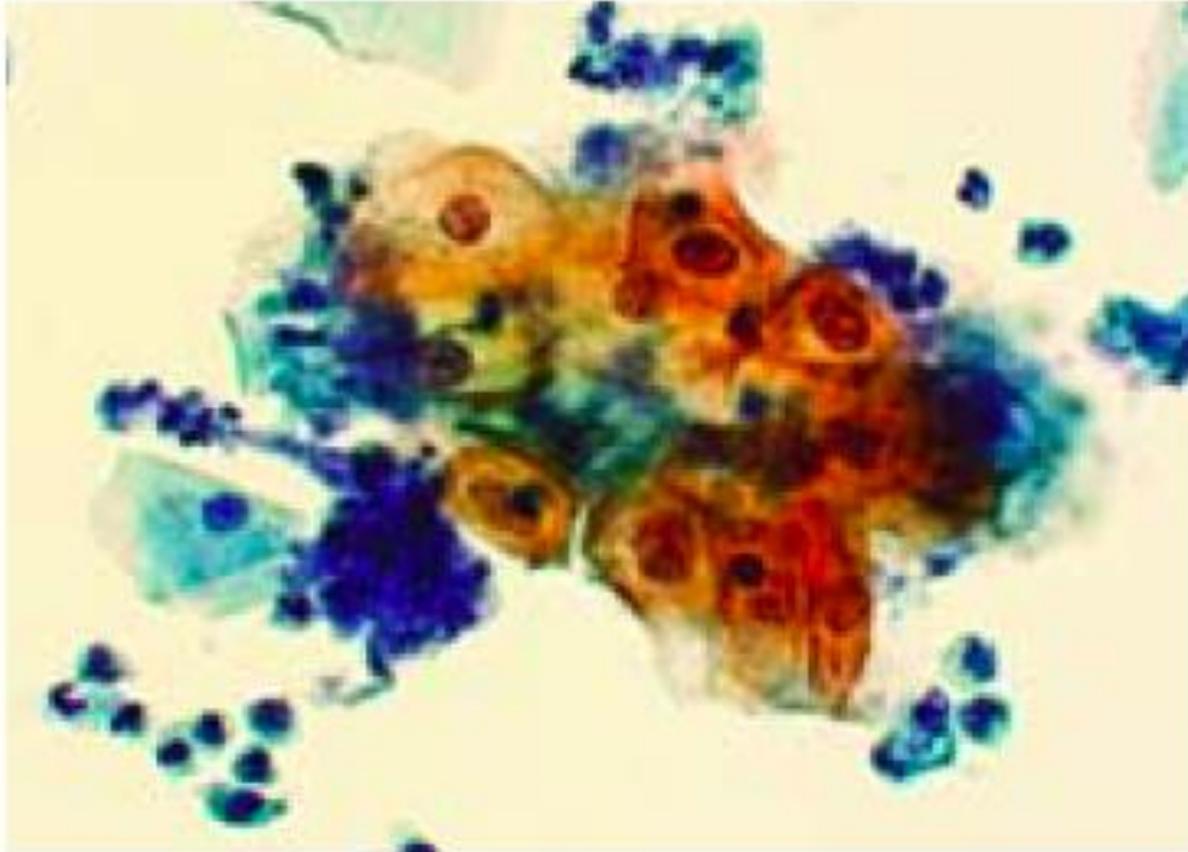


FIGURE 1. Cervical cytology specimen interpreted as atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US). In this specimen, the cytologic features are suggestive, but not diagnostic, of a low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL).

HSILs

High grade squamous intraepithelial lesion

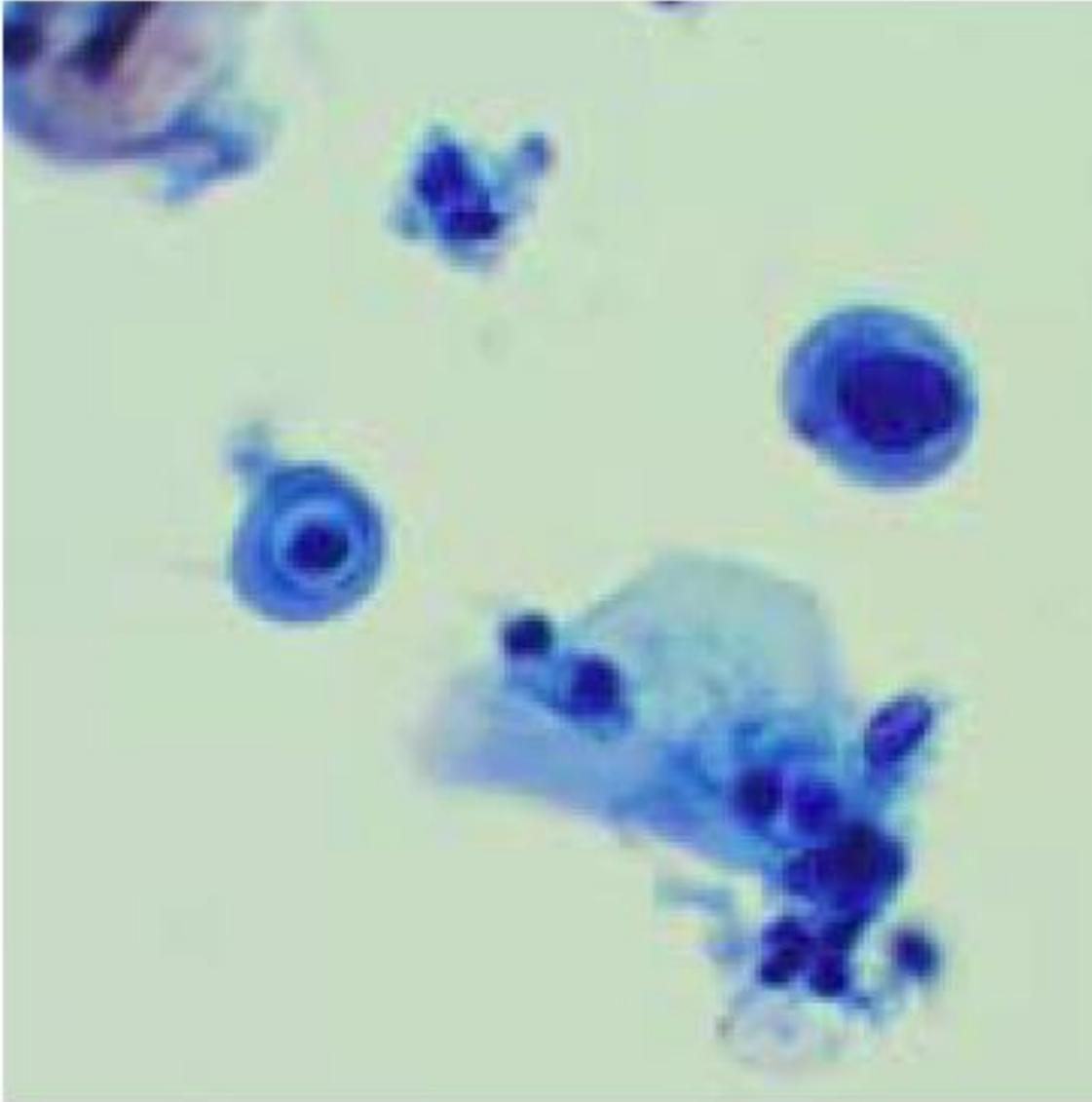


FIGURE 2. Liquid-based cytology specimen showing a single atypical parabasal cell. The cell has many of the cytologic features of high-grade squamous intraepithelial lesions (HSILs)—small cells with increased nuclear/cytoplasmic ratio—but because only a single abnormal cell was identified, the specimen was classified as atypical squamous cells, and cannot exclude HSIL (ASC-H).

HSIL



FIGURE 4. Cytologic features of enlarged nuclei and reduced cytoplasm resulting in a marked increase in the nuclear/cytoplasmic ratio, characteristic of a high-grade intraepithelial lesion (HSIL). The HSIL cell size is smaller than the cell size of a low-grade intraepithelial lesion (LSIL).

LSIL

Low grade squamous intraepithelial lesion

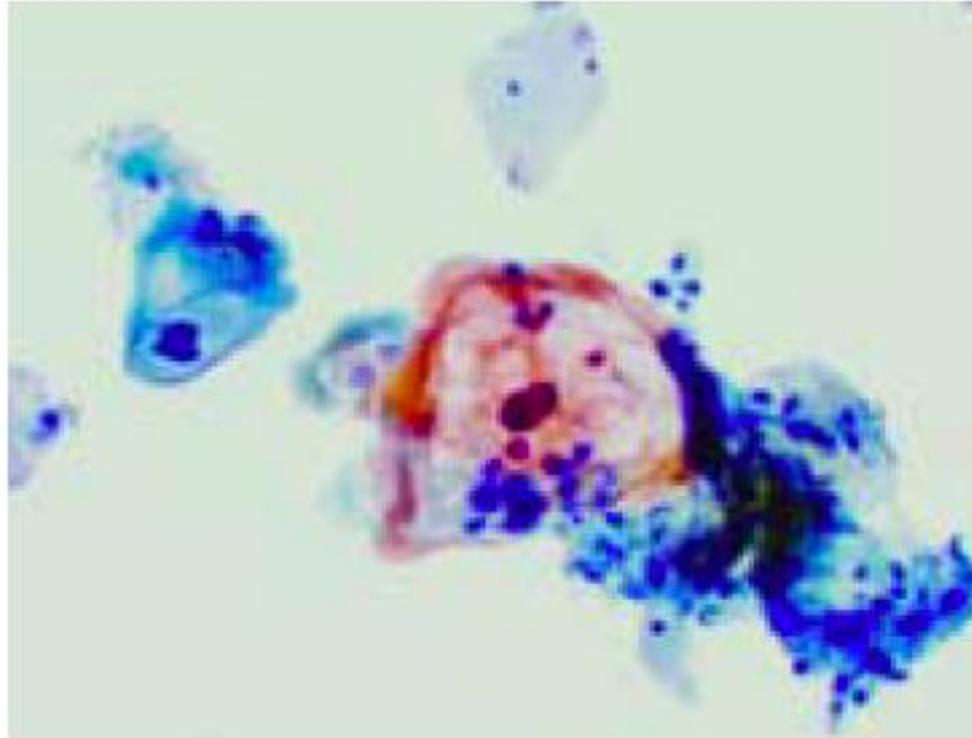


FIGURE 3. Cytopathic effects of human papillomavirus (HPV)—nuclear atypia and perinuclear cytoplasmic cavitation or "halo," the morphologic manifestation of a productive HPV infection of low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL). The nucleus is larger than the nucleus of a normal intermediate squamous cell.

AGC

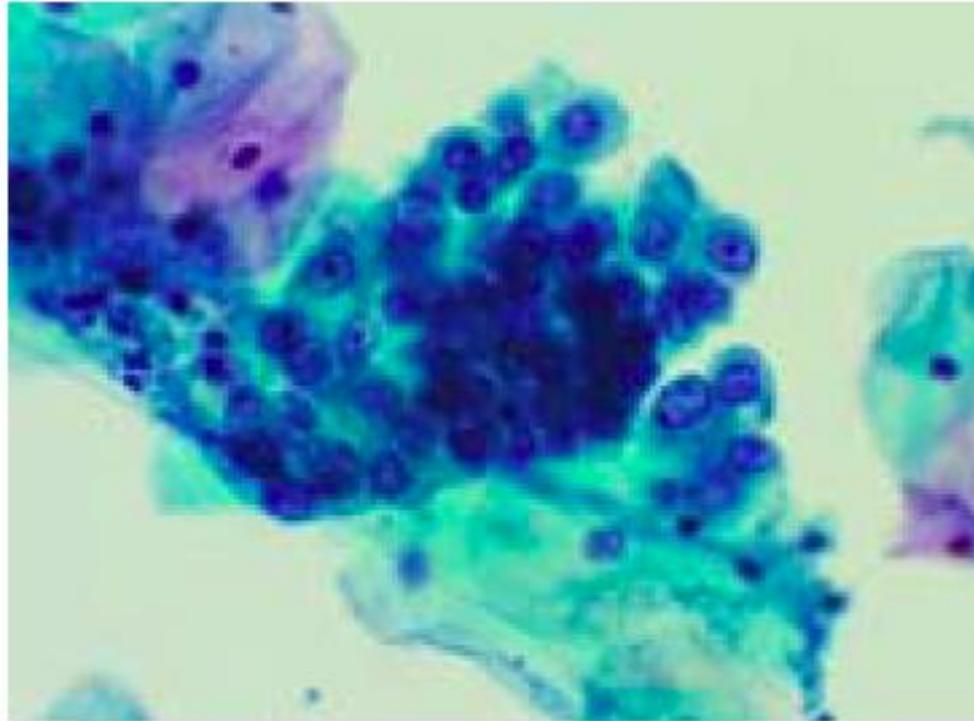


FIGURE 5. Liquid-based cytology specimen showing atypical glandular cells (AGC) of undetermined significance. The cells display nuclear atypia but lack unequivocal cytologic features of adenocarcinoma.