

L'EVOLUZIONE QUALITATIVA DEL PAP TEST CERVICALE: DALLA SPATOLA DI AYRE ALL'EXACT TOUCH

Gerardo Guida, Domenico de Aloysio

Clinica Ostetrica e Ginecologica e Fisiopatologia Ginecologica della Terza Età – Università di Bologna

Indirizzo per corrispondenza: Dott. Gerardo Guida

Clinica Ostetrica e Ginecologica e Fisiopatologia Ginecologica della Terza Età

Via Massarenti 13 - 40138 Bologna

tel: +39 051 300071; fax: +39 051 302974; e-mail: aloysio@med.unibo.it

Il carcinoma della cervice uterina rappresenta ancora oggi una emergenza sanitaria globale: esso è infatti per frequenza la seconda neoplasia maligna nella donna, con un'incidenza di circa 500.000 nuovi casi/anno, ed occupa la terza posizione nella classifica delle cause neoplastiche di morte. Questa situazione, di per sé già drammatica, si aggrava nei Paesi in via di sviluppo, nei quali si concentra circa l'80% sia delle diagnosi che dei decessi dovuti alla malattia, sicché in questi Paesi il carcinoma della cervice sale al primo posto nelle cause neoplastiche di morte nella popolazione femminile. Per contro durante gli ultimi decenni del secolo scorso si è assistito nei Paesi occidentali ad un progressivo e rilevante calo del tasso di mortalità legato a questa malattia. L'andamento è stato attribuito alla progressiva introduzione dell'esame citologico che permette la valutazione delle cellule esfoliate dalla cervice uterina (universalmente conosciuto come "pap test"), come indagine di screening nella prevenzione del cervico-carcinoma.

Questa opportunità è resa possibile dalla facile accessibilità clinica della cervice uterina – che riduce l'invasività del prelievo del materiale biologico e lo rende accettabile dalla donna – nonché dalla storia naturale relativamente lunga della neoplasia cervicale, durante la quale la malattia attraversa un periodo di pre-invasività che rende possibile un rilevante aumento del tasso di guarigione, dopo adeguato trattamento, in caso di diagnosi tempestiva durante questa fase.

L'impiego della citologia cervicale ha ridotto l'incidenza e la mortalità del cervico-carcinoma ovunque sia stata avviata, con un successo direttamente proporzionale all'efficienza gestionale dei programmi di screening. E' stato infatti rilevato che la maggior parte delle donne che si ammala di carcinoma cervicale non ha beneficiato di un corretto programma di "depistage" citologico: almeno il 50% di esse non si è mai sottoposto ad un pap test, ed un ulteriore 10% non si è sottoposto a controlli nei cinque anni che precedono la diagnosi clinica.

La citologia esfoliativa cervico-vaginale trae origine dagli studi di George Papanicolaou, un professore statunitense di anatomia di origine greca, il quale nel 1917 scoprì che le cellule esfoliate

dalla vagina del maiale potevano essere utilizzate per predire l'epoca dell'ovulazione. Osservando la variabilità morfologica delle cellule vaginali suine, l'Autore ipotizzò che ciò potesse essere osservato anche nella specie umana, sicché persuase la moglie a sottoporsi al primo prelievo di cellule vaginali, al quale seguì una serie sistematica di prelievi citologici su altre donne finalizzati allo studio delle modificazioni cellulari indotte dagli ormoni sessuali. Nel 1925 Papanicolaou sottopose casualmente all'indagine una donna affetta da carcinoma della cervice uterina non ancora diagnosticato. Resosi conto dell'importanza del riconoscimento delle modificazioni morfologiche cellulari, l'Autore iniziò a reclutare altre donne affette da carcinoma cervicale per studiare e possibilmente classificare le alterazioni delle cellule cervicali e vaginali.¹

Pertanto, sulla base degli studi effettuati Papanicolaou mise a punto un test citologico finalizzato alla diagnosi precoce del cervico-carcinoma, e presentò il test ad un Convegno scientifico nel 1928, attirando tuttavia scarsi entusiasmi della comunità scientifica.²

E' interessante notare come fosse arrivato alle medesime conclusioni - in maniera del tutto indipendente - un patologo rumeno, Aureli A. Babes; egli aveva presentato le sue osservazioni nel 1927 alla Società di ginecologia a Bucarest e pubblicato i suoi dati su una rivista francese l'anno successivo. Babes raccoglieva le cellule della cervice uterina mediante un'ansa di platino, e, precorrendo i tempi, trovò che il campione così prelevato poteva essere utilizzato non solo per diagnosticare il cervico-carcinoma ad uno stadio precoce, ma anche nella fase pre-invasiva.³

Gli studi sulla citologia cervico-vaginale furono comunque ripresi da Papanicolaou e dal patologo Herbert Traut nel 1939, e culminarono con la pubblicazione sull'*American Journal of Obstetrics and Gynecology* nel 1941, corredata da fotografie di cellule normali e cancerose, nella quale Papanicolaou proponeva la sua tecnica come un test semplice e poco costoso, da somministrare ad un grande numero di donne per la diagnosi precoce del cervico-carcinoma.⁴

Infine i concetti espressi e la documentazione fotografica esibita nella pubblicazione furono ampliati e sistematizzati in una monografia data alle stampe nel 1943.⁵

Il campione di cellule cervico-vaginali da esaminare veniva prelevato dal fornice vaginale posteriore mediante l'utilizzo di una pipetta di vetro, la quale, introdotta in vagina senza l'ausilio di uno speculum, era provvista di un bulbo di gomma ad una estremità per ottenerne la suzione.

La modalità di prelievo venne perfezionata da un ginecologo canadese, Ernest J. Ayre, che propose nel 1944 l'utilizzo dello speculum e nel 1947 dimostrò che la raccolta delle cellule direttamente dalla cervice mediante una spatola di legno, successivamente strisciata su vetrino, aumentava notevolmente la sensibilità dell'esame.⁶

La pubblicazione della monografia di Papanicolaou e Traut nel 1943 ridiede slancio alla nuova tecnica, la quale venne promossa a partire dal 1945 dal National Cancer Institute e dalla American Cancer Society, che indisse nel 1948 la prima conferenza interdisciplinare per introdurre ufficialmente la metodica nella pratica clinica.

Tra la fine degli anni '40 e l'inizio degli anni '50 del secolo scorso furono intrapresi i primi studi di popolazione volti a saggiare l'efficacia e l'accettabilità del pap test, sia da parte di liberi professionisti che di Enti istituzionali negli Stati Uniti ed in Canada; le indagini dimostrarono ovunque la diminuzione di incidenza del cervico-carcinoma e la buona accettabilità dell'esame.^{7,8} Un ulteriore e notevole incremento dell'utilizzo del pap test fu indotto dall'introduzione, a partire dai primi anni '60, della contraccezione orale: la visita ginecologica necessaria per l'adozione di un metodo contraccettivo rappresentò una formidabile occasione di controllo preventivo cervico-vaginale.⁹ Come già detto, l'introduzione e la diffusione del pap test ha determinato in maniera incontrovertibile una diminuzione dell'incidenza e della mortalità legate al cervico-carcinoma, nonostante non sia mai stato provato il nesso di causa/effetto da studi controllati e randomizzati, di difficile esecuzione per motivi etici.

Il successo è direttamente proporzionale all'efficienza dei programmi di screening adottati nei vari Paesi, in termini di copertura della popolazione sottoposta al test, di frequenza dell'esecuzione dell'esame, di competenza del Personale dedicato, di efficienza/efficacia nella gestione dei casi dubbi o positivi, ed infine di diagnosi, di terapia e di follow-up delle pazienti.

Nonostante ciò, l'introduzione del pap test non ha purtroppo a tutt'oggi eradicato il cervico-carcinoma in nessuna delle popolazioni nelle quali la metodica sia stata applicata.^{10,11}

Anche se la maggior parte dei nuovi casi di neoplasia cervicale sia attribuibile ad inefficienze dei programmi di screening, una parte di responsabilità va anche imputata a carenze legate al pap test medesimo.

E' stato infatti calcolato che ogni anno negli Stati Uniti una quota che va dal 14% al 33% dei nuovi casi di cervico-carcinoma è legata al fallimento del pap test: in altre parole una patologia cervicale non riconosciuta è già presente al momento del prelievo citologico.

Il limite del pap test può essere legato a due fattori principali: 1) un errore di prelievo, tale per cui le cellule anomale non sono

presenti sul vetrino pur in presenza di una lesione, e 2) una mancata diagnosi, tale per cui le cellule anomale sono presenti sul vetrino ma non sono identificate dal citopatologo per vari motivi di natura tecnica (artefatti di fissazione/colorazione, eccessivo spessore dello spatolato, tappeto di eritrociti o granulociti, marcata infiammazione) od anche interpretativa.

E' stato rilevato in vari studi come nell'identificazione di lesioni CIN I + la sensibilità del pap test vari dal 30% all'87% e la specificità dall'86 % al 100%, e come nell'identificazione di lesioni più severe (CIN II +) la sensibilità mediamente aumenti (44% - 95%) e la specificità si riduca (91% - 98%).¹²

Il successo del pap test, nonostante i suoi limiti, è dovuto alla particolare storia naturale del cervico-carcinoma, che in genere, attraversa lentamente ed ordinatamente una lunga fase pre-invasiva, della durata di 10-20 anni, fase che peraltro può regredire spontaneamente, senza arrivare ad una condizione di invasività. Pertanto, è possibile che esami citologici ripetuti possano identificare una condizione patologica in una fase in cui sia ancora facilmente trattabile e guaribile.

Gli sforzi eseguiti fino ad ora per migliorare la qualità delle prestazioni del pap test - aumentandone la sensibilità (riducendo cioè i falsi negativi) e la specificità (riducendo cioè i falsi positivi), identificando il maggior numero possibile di lesioni squamose e ghiandolari ad elevato rischio di progressione verso forme invasive - sono stati rivolti alle modalità del prelievo ed all'accuratezza della lettura del preparato.

Per quanto concerne la modalità del prelievo, va sottolineato come lo scopo sia quello di raccogliere le cellule che provengono dalla zona di trasformazione della cervice uterina, ovvero da quell'area che si interpone tra l'epitelio squamoso e quello ghiandolare, in cui originano le lesioni squamose cervicali.¹³ Questa zona, che è facilmente raggiungibile nelle donne in età giovanile in quanto è generalmente esocervicale, tende a risalire all'interno del canale cervicale col progredire dell'età e della condizione postmenopausale. A partire dalla storica spatola di Ayre (idonea per il prelievo di cellule esocervicali), sono stati messi a punto altri strumenti per raccogliere un campione citologico il più possibile rappresentativo della zona di trasformazione. Sulla base di meta-analisi condotte su studi randomizzati, la modalità di prelievo citologico ritenuta più efficiente, e quindi più diffusa al giorno d'oggi, si avvale dell'utilizzo della spatola di Ayre, in legno o in plastica, opportunamente sagomata per il prelievo esocervicale e di una spazzolina con setole in plastica morbida (cytobrush), introdotta da Stormby nel 1981,^{14,15} per il prelievo endocervicale.

Gli elementi cellulari così prelevati vengono poi strisciati su uno o più vetrini (in caso si voglia differenziarne la sede di provenienza), fissati immediatamente ed inviati in laboratorio per la colorazione e la successiva lettura.

Una variante del pap test "convenzionale" appena descritto è la citologia cosiddetta in fase liquida. Con questa metodica le cellule vengono prelevate con la stessa modalità; ma successivamente la spatola e il cytobrush vengono immersi ed agitati in un liquido fissatore, nel quale le cellule eso- ed endocervicali prelevate rimangono così in sospensione.

In laboratorio si procede poi alla filtrazione del campione, alla separazione di detriti e di cellule ematiche dalla componente

SALUTE DONNA

citologica cervicale, che verrà poi distribuita in singolo strato su un vetrino, poi opportunamente colorato ed interpretato.

La metodica è stata studiata con l'intento di ottenere un campione rappresentativo della zona di trasformazione, la cui valutazione citologica sia meno gravata dagli errori diagnostici legati ai limiti di natura tecnica del pap test tradizionale già citati. Sono stati peraltro compiuti evidenti sforzi, basati sulla lettura ovvero rilettura automatizzata dei vetrini, tesi a ridurre gli errori di interpretazione citopatologica.

Un primo sistema consiste nella rilettura computerizzata di un campione precedentemente valutato come negativo da un citopatologo, mediante l'utilizzo di una tecnica cosiddetta "a rete neurale", che interpreta le immagini digitalizzate del vetrino. Il sistema identifica cellule od altro materiale che necessitano di un ricontrollo, creando una serie di immagini (fino a 128) che possono contenere delle anomalie citologiche. Queste immagini sono successivamente visionate da un citopatologo che può decidere di ricontrollo il vetrino originale al microscopio ottico.

Un altro sistema, basato su algoritmi matematici, identifica vetrini che eccedono di una probabilità selezionata (10%, 15%, 20%), di contenere cellule anormali.

L'introduzione della citologia in fase liquida e della lettura automatizzata dei vetrini ha generato nello scorso decennio un notevole interesse e grandi speranze di superare i limiti del pap test convenzionale. Tuttavia fino ad oggi mancano in letteratura dati che dimostrino una effettiva superiorità nelle qualità delle nuove tecniche, in termini di sensibilità, specificità e di riduzione del tasso di falsi positivi e negativi rispetto al pap test tradizionale in un sistema di screening basato su controlli ripetuti ad intervalli definiti.^{12,16,17,18}

Ancora va sottolineato come si sia cercato, su altri fronti, di migliorare l'adeguatezza e l'interpretabilità del pap test tradizionale. È stato già accennato come uno degli aspetti più importanti del campione citologico sia la sua rappresentatività: in altre parole, esso deve contenere cellule che provengono da quelle aree dalle quali origina il cervico-carcinoma, ovvero la zona di trasformazione ed il canale cervicale. Al riguardo, è stato rilevato come la presenza di elementi endocervicali nel pap test aumenti in maniera direttamente proporzionale la possibilità di reperire nello stesso preparato cellule anomale, sia squamose che ghiandolari, di grado tanto più severo all'aumentare del numero delle cellule endocervicali.¹⁹ La necessità di raccogliere elementi sia eso- che endocervicali - superando l'utilizzo esclusivo della spatola di Ayre - ha indotto alla progettazione di nuovi strumenti di prelievo citologico.^{13,15,19}

A tale scopo è stato messo a punto dall'anatomopatologo G. Saccomanno uno strumento, l'Exact Touch®,²⁰ atto ad ottenere nel contempo un campione citologico eso- ed endocervicale. Esso consiste in un dispositivo flessibile in materiale plastico, a T capovolta, il quale presenta sottilissime punte pieghevoli a guisa di pettine lungo i due lati del braccio verticale della T e lungo il margine superiore delle due braccia orizzontali, orientate in leggera flessione, in modo da aderire correttamente alla cervice (Fig. 1).

Il prelievo è di semplice esecuzione: una volta introdotto delicatamente il braccio lungo della T nel canale cervicale - previo posizionamento dello speculum in vagina - fino al contatto delle

Figura 1.



braccia corte con la cervice, il dispositivo viene fatto ruotare una o più volte di 360° senza esercitare pressione; questo movimento permette la raccolta contemporanea di abbondante materiale sia eso- che endocervicale che, una volta strisciato sul vetrino in maniera longitudinale, può essere fissato e quindi inviato in laboratorio per la colorazione e la lettura citologica. All'estremità opposta del dispositivo è presente una spatola di forma triangolare, per l'eventuale prelievo dai forni vaginali.

La metodica sembra offrire alcuni vantaggi rispetto a quella tradizionale: 1) il prelievo risulta più veloce, 2) l'acquisizione contemporanea eso-endocervicale di cellule riduce l'eventualità del sanguinamento dopo l'uso della spatola, che può ridurre l'adeguatezza del successivo prelievo endocervicale con cytobrush; 3) il materiale citologico ottenuto viene facilmente rilasciato sul vetrino per la scarsa adesività delle cellule alla plastica, evitando così l'effetto "intrappolamento" creato dal legno della spatola (in genere preferita a quella in plastica, più traumatica); 4) la collocazione pre-determinata delle braccia orizzontali esclude altresì con sicurezza la raccolta di materiale endocavitario; 5) la particolare modalità longitudinale dello striscio permette di ottenere tre distinte zone di distribuzione delle cellule: una centrale che contiene gli elementi endocervicali e due laterali che contengono quelli esocervicali; sicché viene evitata la formazione di alcuni artefatti, quali le aree di eccessivo spessore cellulare oppure la comparsa di zone ricche di bolle. Questi vantaggi infine - uniti all'assenza di dispersione di cellule ai margini del vetrino (che ostacolerebbe i meccanismi di messa a fuoco) - rendono possibile anche la eventuale valutazione del preparato con le metodiche automatizzate citate in precedenza.^{21,22}

BIBLIOGRAFIA

1. Waxman A.G. Guidelines for cervical cancer screening: history and scientific rationale. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 2005, Vol 48, Number 1: 77-97
2. Papanicolaou G.N.: *New cancer diagnosis, in Proceedings Third Race Betterment Conference. Battle Creek, Mich, Race Betterment Foundation, 1928, pp 528-534*
3. Babes A. *Diagnostique du cancer utérin par les frottis. Presse Med. 1928; 36:451-454*
4. Papanicolaou G.N., Traut H.F. *The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. Am. J. Obstet. Gynecol. 1941; 42: 193-206*
5. Papanicolaou G.N., Traut H.F. *Diagnosis of uterine cancer by vaginal smear. New York, The Commonwealth Fund, 1943*
6. Ayre J.E. *Selective cytology smear for diagnosis of cancer. Am. J. Obstet. Gynecol: 1947; 53: 609-617*
7. Burns E.L., Hammond E.C., Percy C.; et al. *Detection of uterine cancer. Results of a community program of 17 years. Cancer 1968; 22: 1108-1119*
8. Fidler H.K., Boyes D.A., Worth A.J. *Cervical cancer detection in British Columbia. J. Obstet. Gynaec. Br. Commonw. 1968; 75: 392-404*
9. Walton R.J., Blanchet M., Boyes D.A., et al. *Cervical cancer screening programs. Department of National Health and Welfare Task Force report. Can. Med. Assoc. J. 1976; 114: 1003-1033*
10. Koss L. *The Papanicolaou test for cervical cancer detection. A triumph and a tragedy. JAMA 1989; 261: 737-743*
11. Koss L. *Cervical (Pap) smear. New directions. Cancer 1993; 71:1406-12*
12. Hartmann K.E., Nanda K., Hall S., Myers E. *Technology advances for evaluation of cervical cytology: is newer better? Obstetrical and Gynecological Survey 2001, vol.56, n.12: 765-774*
13. Wied G.L. *Importance of the site from which vaginal cytologic smears are taken. Am. J. Clin. Pathol. 1955; 25: 742-750*
14. Boon M.E., Alons van Kordelaar J.J.M., Rietveld-Scheffers P.E.M. *Consequences of the introduction of combined spatula and cytobrush sampling for cervical cytology. Improvements in smear quality and detection rates. Acta Cytol. 1986; 30: 264-270*
15. Broso P., Garrone C., *Evoluzione nella forma dei dispositivi per prelievo citologico cervico-vaginale. Rivista di ostetricia e ginecologia pratica e medicina perinatale. Vol XIII n°1, 1998*
16. Herbert A., Johnson J. *Personal view. Is it reality or an illusion that liquid-based cytology is better than conventional cervical smear? Cytopathology 2001, 12, 383-389*
17. Moseley R.P., Paget S. *Liquid-based cytology: is this the way forward for cervical screening? Cytopathology 2002, 13, 71-82*
18. Dawey E., Barrat A., Irwig L., Chan S.F., Macaskill P., Mannes P., Saville A.M. *Effect of study design and quality on unsatisfactory rates, cytology classifications, and accuracy in liquid-based versus conventional cervical cytology: a systematic review. Lancet 2006; 367: 122-132*
19. Martin-Hirsch P., Jarvis G., Kitchener H., Lilford R. *Collection devices for obtaining cervical cytology samples. Cochrane Database of Systematic Reviews 2000, Issue 3.*
20. Cenci M., Midulla C., De Iorio P., Vecchione A. *Exact Touch: Exact Touch: A new single sampler for the uterine cervix. Acta Cytol. 1999; 43: 1192-1193*
21. De Palo G., Stefanon B., Alasio L., Pilotti S. *Exact Touch: a new device for cervical cytology. Comparison with Ayre spatula plus Cytobrush. Cytopathology 2000, 11, 322-325*
22. Cenci M., Vecchione A. *Usefulness of cervical collection by the Exact Touch, the Saccomanno single sampler, combined with automated primary screening. Diagnostic Cytopathology 2000; 23: 242-244*