

UNIVERSITA' DI NAPOLI
"FEDERICO II"

Programma di Dottorato
"RIPRODUZIONE, SVILUPPO E ACCRESCIMENTO DELL'UOMO"

Direttore
Prof. Claudio Pignata

Tesi di Dottorato

*Lesioni preneoplastiche del tratto genitale
inferiore e nuove strategie diagnostiche*

Dottorando
Dott. Luigi Costagliola

Tutore
Prof. Costantino Di Carlo

Anno Accademico 2010-2011

INDICE

| | |
|--|---------------|
| 1. Lesioni preneoplastiche vulvari..... | pag 4 |
| 1.1 Pubblicazione..... | pag 6 |
| 2. Lesioni preneoplastiche della cervice uterina..... | pag 12 |
| 2.1 INTRODUZIONE..... | pag 12 |
| Il papilloma virus..... | pag 12 |
| Il carcinoma della cervice uterina..... | pag 18 |
| Screening e la prevenzione secondaria del cervicocarcinoma..... | pag 24 |
| Nuove tecniche diagnostiche:..... | pag 36 |
| a. Tipizzazione dell' HPV DNA..... | pag 36 |
| b. Endocervicoscopia..... | pag 42 |
| La prevenzione primaria: vaccinazione..... | pag 46 |
| 3. Genotipi virali e management delle lesioni di basso grado..... | pag 53 |
| 3.1 SCOPO DELLA RICERCA..... | pag 53 |
| 3.2 MATERIALI E METODI..... | pag 53 |
| 3.3 RISULTATI..... | pag 56 |
| 3.4 DISCUSSIONE..... | pag 69 |
| 3.5 BIBLIOGRAFIA..... | pag 77 |
| 4. Genotipi virali e recidiva delle lesioni di alto grado..... | pag 84 |
| 4.1 SCOPO DELLA RICERCA | pag 85 |
| 4.2 MATERIALI E METODI..... | pag 85 |
| 4.3 RISULTATI..... | pag 86 |
| 4.4 DISCUSSIONE..... | pag 87 |
| 4.5 BIBLIOGRAFIA..... | pag 90 |
| 5. Cancri rari della cervice uterina..... | pag 93 |
| 5.1 Pubblicazione..... | pag 94 |

| | |
|---|---------------|
| 6. Isteroscopia diagnostica e fistole del tratto genitale inferiore..... | pag 98 |
| 6.1 Pubblicazione..... | pag 99 |

1. Lesioni preneoplastiche della vulva

Il cancro della vulva è una rara neoplasia, rappresenta il 4% di tutti i cancri del tratto genitale femminile. Il più comune istotipo è il carcinoma a cellule squamose (SCC) che rappresenta il 90% dei cancri vulvari. L'incidenza del cancro vulvare in situ è più che raddoppiata negli ultimi venti anni mentre il tasso di cancro invasivo è rimasto invariato.

Nonostante il SCC vulvare si sviluppi tipicamente in donne anziane (70-80 anni), l'incidenza di SCC va progressivamente aumentando nelle donne di età inferiore ai 40 anni.

Due differenti eziologie possono essere riconosciute: nelle pazienti più giovani il cancro vulvare è correlato all'infezione da HPV ed al fumo e sono tipicamente lesioni basalioidi associate a neoplasia vulvare intraepiteliale (VIN). Nelle donne anziane, il cancro vulvare è invece generalmente associato con lesioni distrofiche come il lichen sclerosus. Comunque raramente anche nelle giovani donne il cancro vulvare può non essere associato all'infezione da HPV e al consumo di fumo. Presso la nostra unità di Colposcopia dell'Università "Federico II", abbiamo diagnosticato il primo caso di donna di 27 anni affetta da Lupus Erythematosus Sistemico (LES) associato a carcinoma SCC inizialmente invasivo sviluppatosi su Pemphigus Vulgaris (PV) della vulva. Diversamente da altri casi riportati in letteratura, la nostra paziente non presentava un'infezione da HPV, e nonostante la giovane età ha sviluppato una VIN a rapida progressione verso la malattia microinvasiva. La rapida progressione della VIN potrebbe essere correlata alla malattia autoimmune di base, all'uso sistemico di corticosteroidi e di farmaci immunosoppressori e conseguente disregolazione del sistema immune. Le malattie autoimmuni, infatti, possono essere considerate scatenanti dei processi infiammatori cronici che sono ritenuti essere determinanti nel promuovere lo sviluppo del cancro. Il nostro caso evidenzia come il PV sia da ritenere un'altra malattia infiammatoria cronica del tratto genitale inferiore che può predisporre all'insorgenza della VIN e quindi del cancro SCC. È quindi da raccomandare uno stretto controllo delle pazienti con malattia infiammatoria cronica specialmente in presenza di concomitanti malattie autoimmuni.

Considerate la possibilità dello svilupparsi di tumori, dovrebbe sempre essere eseguita una biopsia in presenza di una malattia infiammatoria cronica della vulva.

CASE REPORT

Open Access

Early invasive vulvar squamous cell carcinoma arising in a woman with vulvar pemphigus vulgaris and systemic lupus erythematosus

Giuseppe Bifulco¹, Vincenzo D Mandato*¹, Roberto Piccoli¹, Pierluigi Giampaolino¹, Chiara Mignogna², Michele D Mignogna³, Luigi Costagliola¹ and Carmine Nappi¹

Abstract

Background: Pemphigus vulgaris (PV) is an autoimmune blistering disease of the skin and mucous membranes. Genital involvement occurs when most other common sites are concurrently affected or are in remission. Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease that may affect many parts of the body and the skin with occasional bullous lesions. Pemphigus vulgaris and SLE may be associated, albeit rarely. Here, we report the first case of a woman affected with SLE presenting with early invasive squamous cell carcinoma (SCC) arising from Pemphigus Vulgaris of the vulva.

Case presentation: A 27-year-old Caucasian woman was admitted to our Gynaecology Unit for bleeding vegetant lesions of the vulva. Her history was characterized by systemic lupus erythematosus and PV. Biopsy showed concomitant PV and vulvar intraepithelial neoplasia (VIN) grade 3. One month later a new biopsy revealed progression from VIN 3 to early SCC. Despite chemotherapy, no remission of disease was observed. She died six months after diagnosis

Conclusion: Our case underlines PV as another chronic inflammatory disease of the lower genital tract predisposing to VIN-SCC. It suggests the need for careful follow-up of patients with chronic inflammatory disease, especially when concomitant autoimmune disorders are present. Moreover, a biopsy should be always performed if there are PV lesions because of the possibility of neoplastic disease.

Background

Pemphigus vulgaris (PV) is an autoimmune blistering disease of the skin and mucous membranes characterized by the presence of autoantibodies targeting desmoglein 3, a surface antigen of keratinocytes involved in maintaining cell-cell junctions [1]. Its incidence is 0.1-3.2 cases per 100,000 individuals per year. PV typically runs a chronic course, with blisters, painful erosions and ulcers on the mucosa and skin [2,3]. The sites most commonly involved are the oral mucosa, pharynx, larynx, oesophagus, conjunctiva and anal mucosa [1-4]. Involvement of the genital tract in women with PV has rarely been reported [5]. Usually, genital involvement occurs when most other

common sites are concurrently affected or are in remission [1,6].

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease that may affect many parts of the body and the skin with occasional bullous lesions. Pemphigus vulgaris may exceptionally be associated with other blistering diseases such as SLE [7].

Here, we report a rare case of a woman affected with SLE presenting with early invasive squamous cell carcinoma (SCC) arising from Pemphigus Vulgaris of the vulva.

Case presentation

A 27-year-old Caucasian woman was admitted to our Gynaecology Unit (February 2007) for bleeding vegetant lesions of the vulva. She had no family history of autoimmune disease. Her history was characterized by concomi-

* Correspondence: dariomandato@virgilio.it

¹ Department of Gynecology and Obstetrics, and Pathophysiology of Human Reproduction, University of Naples "Federico II", Italy
Full list of author information is available at the end of the article

tant SLE and recurrent blisters and erosions affecting the oral mucosa and skin diagnosed as severe PV. She had been treated with high and prolonged doses of both systemic corticosteroids and other immunosuppressive drugs (Prednisone 100 mg/day \times 69 months; Azathioprine 80 mg/day \times 51 months; Cyclophosphamide 83 mg/day \times 15 months; Cyclosporine 300 mg/day \times 2 months).

She had had necrosis of the femoral and humerus necks, osteoarthritis, arthritis, osteoporosis and recurrent infections. Most recently, at gynaecological examination a thick area associated with ulcerative necrotic areas, and atypical vessels were revealed. Vulvar biopsy diagnosed PV. The epidermis was arranged in a micropapillary pattern with combined aspects of acantholytic and atypical cells. Multiple areas of acantholytic clefts separated the upper part of the epidermis from the basal keratinocytes. Unusually, dysplastic cells with atypical mitoses were present (Figure 1). Because she was virgin, she never had a pap smear and we did not perform it.

On March 2007 the lesion had extended to the perineal and groin area (Figure 2). Biopsy revealed a vulvar intraepithelial neoplasia (VIN) grade 3 with microinvasive disease. The SCC vertical invasion of the stroma was less than 1 mm.

Hyperplastic epidermis was characterized by the formation of acantholytic clefts and the presence of dysplastic cells and mitotic activity. Focal infiltrative aspects were present (Figure 3).

Positron Emission Tomography (PET) and Magnetic Resonance Imaging (MRI) showed no metastatic disease.

Current therapy was based on High dose human immunoglobulins (IVIg).

IVIg 5% solution were infused intravenously with an electronic pumping device at a total dose of 2 g/kg per cycle divided into three equal doses, administered over 3 consecutive days. The infusion was administered slowly at not more than 50 mg/kg per hour.

The therapy improved the immunological PV but not the clinical PV. The antibody titer showed a progressive decrease (pre-IVIg titer was of 1:1280; during IVIg titer was of 1:640; post IVIg titer was of 1:80)

Based on biopsy findings, a wide and deep excision of the primary tumor was required but our patient was classified as ASA IV at preoperative evaluation. She presented a 25 kg weight loss, a worsening of the clinical conditions with a high risk of nonhealing wound and postoperative infection so combined chemotherapy was preferred to surgical approach. She received six cycles of cisplatin plus 5-fluorouracil. The doses and schedule was cisplatin 75 mg/m² on day 1 and 5-fluorouracil 800 mg/m² on day 2 to 5 every three weeks.

Despite the chemotherapy there was no remission of the lesion, though no local extension was observed (Fig-

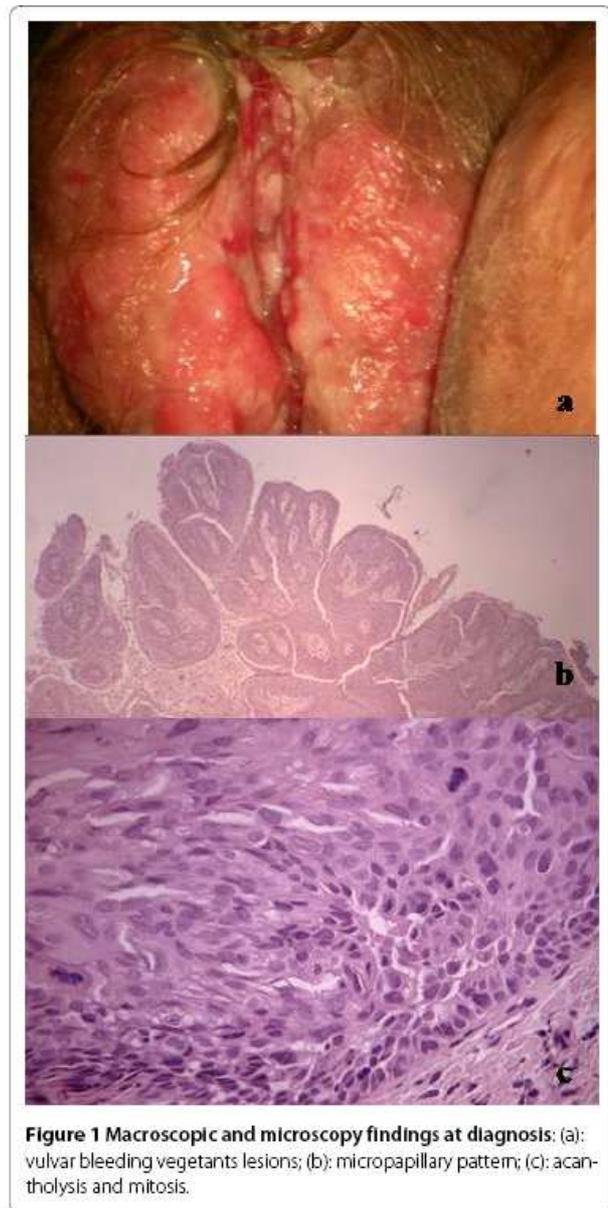
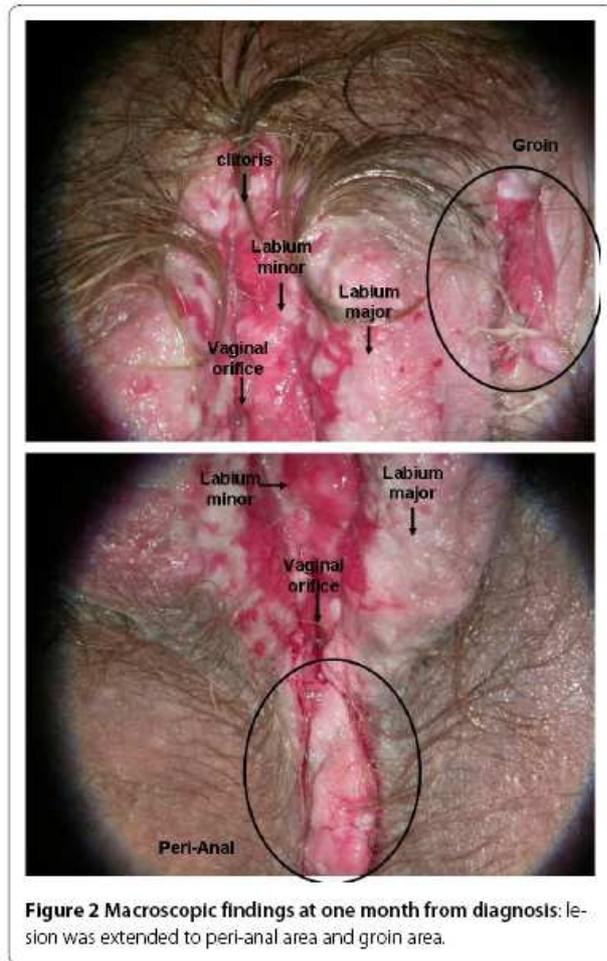


Figure 1 Macroscopic and microscopy findings at diagnosis: (a): vulvar bleeding vegetant lesions; (b): micropapillary pattern; (c): acantholysis and mitosis.

ure 4). A new biopsy (September 2007) revealed atypical and acantholytic cells dispersed into a neutrophil and red blood cell background (Figure 5). Two months later she died from cardiac arrest due to worsening of her general condition, but no post mortem examination was performed because her parents refused.

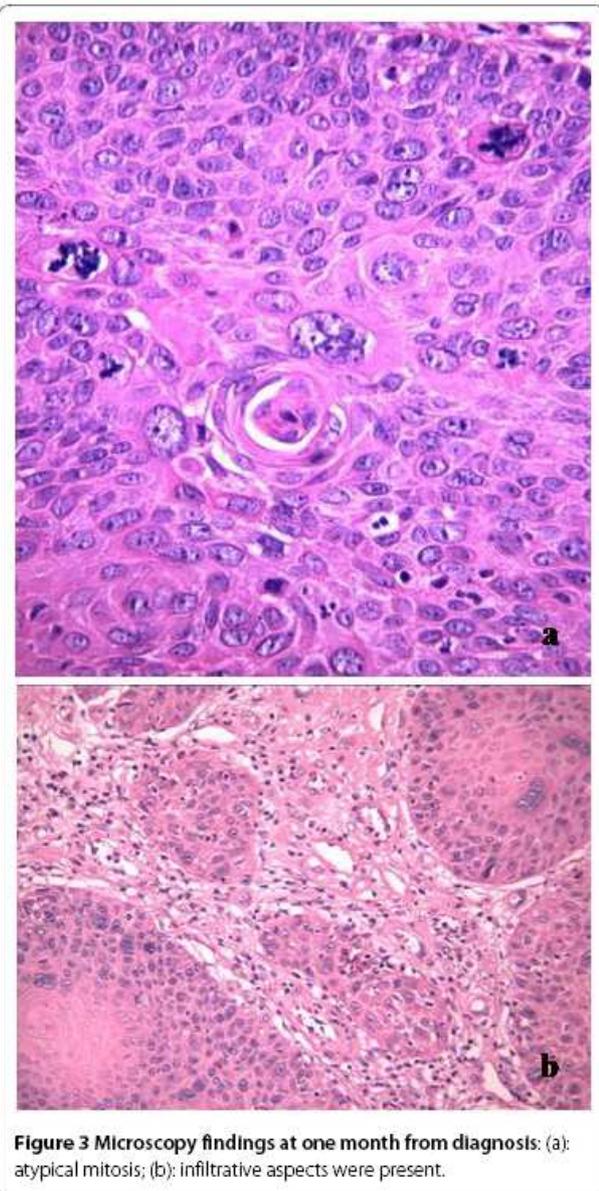
Discussion

Pemphigus vulgaris (PV) is a chronic autoimmune disease with a mortality rate less than 10% following treatment with systemic corticosteroids and immunosuppressive agents [8]. It mainly affects elderly persons. PV is diagnosed on the basis of clinical appear-



ance, histology, and immunofluorescence studies. Histology demonstrates loss of cell-cell adhesion (acantholysis) above the basal layer of the epidermis. Immunoglobulin G is detected on keratinocyte cell surfaces by direct immunofluorescence in nearly all patients, although sera from PV patients contain antibodies that bind to keratinocyte cell surface antigens on indirect immunofluorescence. The pathogenic antibodies are directed against the keratinocyte cell surface molecules desmoglein 1 and 3. An immunoblot assay or enzyme-linked immunosorbent assay may also be used to detect antibodies.

PV is rarely associated with SLE; the association has been reported in the literature in only 4 females [9-12] and 1 male [7]. This is the fifth case of PV associated with SLE. More common blistering skin lesions associated with SLE are paraneoplastic pemphigus, pemphigus erythematosus and drug-induced pemphigus. Paraneoplastic pemphigus consists of painful mucosal ulcerations and a polymorphic blistering eruption on the trunk and extremities, and a characteristic autoantibody pattern that usually resolves after tumour removal [13]. Pemphi-



gus erythematosus is characterized by facial eruption and bullous lesions on the chest, upper back and intertriginous areas with minimal SLE manifestations [14]. Drug-induced pemphigus has a course similar to PV but resolves after discontinuation of the associated drug and is histologically different. PV produces deeper vesicles as a result of the acantholysis in the suprabasal layer of the epidermis, whilst acantholysis in drug-induced pemphigus occurs in the corneal layer.

Therefore, we excluded pemphigus erythematosus because of the severe SLE manifestations in our patient; on the other hand, we excluded drug-induced pemphigus because histologically the epidermis was deeply affected,



Figure 4 Macroscopic findings after chemotherapy: persistent lesions.

and because the patient had been treated for several years with corticosteroids without similar signs prior to the diagnosis of PV; finally because she showed immunological improvement after increasing the corticosteroid dose. So we diagnosed our patient as affected by PV. As in three of the previously reported cases of PV associated with

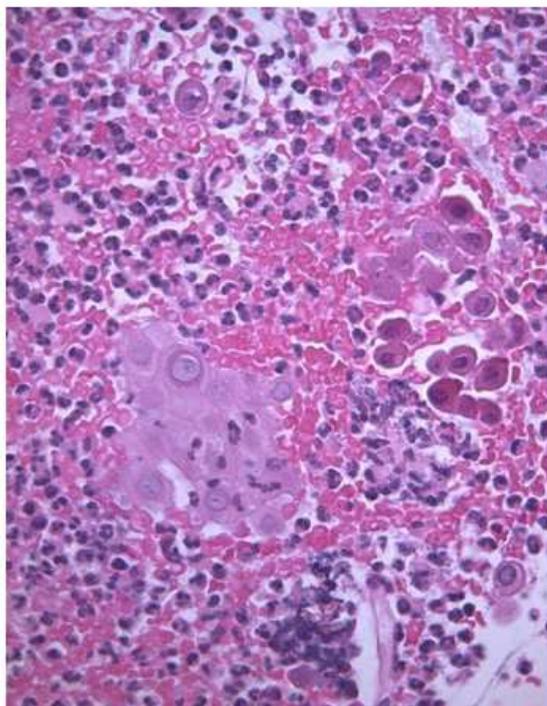


Figure 5 Microscopy findings after chemotherapy: atypical and acantolytic cells dispersed into a neutrophils and red blood cells background.

SLE [7,11,12], SLE presented before PV in our patient. However, in contrast to the other cases [7], PV persisted in our patient after the worsening of the SLE.

The most unusual feature of our patient was the rapid development of VIN 3 and early invasive squamous cell carcinoma (SCC) arising from PV of the vulva. Two different aetiologies of vulvar cancer are known. One type is mainly seen in younger patients (mean age 55 years), is related to HPV infection and smoking, and is commonly associated with basaloid or warty VIN. In contrast, the more common type is seen mainly in elderly patients (mean age 77 years), is unrelated to smoking or HPV infection, and is seldom associated with concurrent VIN, but there is a high incidence of dystrophic lesions (lichen sclerosus, epithelial hyperplasia, lichen planus) [15-21]. Age is the most important predisposing factor in progression from pre-existing VIN to SCC. The best treatment of VIN is conservative surgical excision and follow-up. In case of vertical invasion of the stroma less than 1 mm, a wide and deep excision of the primary tumor is required [22]. Female genital tract involvement in PV has been limited to a small number of case reports, and even rarer cases of female genital tract PV are associated with squamous cell carcinoma [23].

To our knowledge, no case of SCC arising from PV of the vulva has been reported in the literature.

Despite her young age, our patient presented a rapid progression of VIN to microinvasive disease.

In contrast to other cases reported in the literature, our patient did not present HPV infection. The pathogenic mechanism of VIN and its rapid progression to early SCC may be related to the autoimmune disease, to the use of systemic corticosteroids and immunosuppressive agents for therapy and the consequent deregulation of the immune system.

Autoimmune diseases are triggers of chronic inflammation that is a well known risk factor of developing various type of cancer. Since 1863 Virchow noted a connection between inflammation and cancer. He suggested that the "lymphoreticular infiltrate" reflected the origin of cancer at sites of chronic inflammation. The hallmark of cancer related inflammation include the presence of inflammatory cells and inflammatory mediators in tumor tissues, tissue remodelling and angiogenesis similar to that seen in chronic inflammatory responses and tissue repair [24]. There is strong clinical evidence for an association of chronic inflammation with SCC [25]. SCC can arise from a malignant transformation occurred within a chronic inflammatory focus of ulcerative and non healing wounds [26,27]. This association has been described for LES, epidermolysis bullosa, lichen planus, leg ulcerations [28-34]. Even areas of healed wounds are more susceptible to development SCC. Moreover, inflammation is not only associated with de novo development

of SCC but also play a role in his progression [25]. Probably in our patients both LES and PV played a pivotal role in the SCC development.

Conclusion

Our case underlines PV as another chronic inflammatory disease of the lower genital tract predisposing to VIN-SCC. It suggests the need for careful follow-up of patients with chronic inflammatory disease, especially when concomitant autoimmune disorders are present. Because of the possibility that neoplasms will develop, a biopsy should be always performed in order to prompt diagnosis and the best treatment.

Abbreviations

PV: Pemphigus vulgaris; SLE: Systemic lupus erythematosus; SCC: Squamous cell carcinoma; VIN: Vulvar intraepithelial neoplasia; PET: Positron Emission Tomography; MRI: Magnetic Resonance Imaging; IIVg: Human Immunoglobulins.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

GB revised the manuscript and performed follow-up. VDM conceived of the case report, reviewed the literature and wrote the manuscript. RP diagnosed the disease, performed the follow-up, conceived of the case report and revised the manuscript. PG reviewed the literature, obtained the pictures and collected data. CM performed the histological analysis and wrote the manuscript. MM performed the follow-up and revised the manuscript. LC: performed follow-up. CN revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

Written consent for publication was obtained from the patient

Author Details

¹Department of Gynecology and Obstetrics, and Pathophysiology of Human Reproduction, University of Naples "Federico II", Italy, ²Department of Biomorphological and Functional Sciences, Pathology Section, University of Naples "Federico II", Italy and ³Oral Medicine Unit, Department of Odontostomatologica and Maxillo-facial Science, University of Naples "Federico II", Italy

Received: 2 December 2009 Accepted: 23 June 2010

Published: 23 June 2010

References

1. Wojnarowska F, Venning VA, Burge SM: Immunobullous diseases. In *Rook's Textbook of Dermatology* 7th edition. Edited by: Burns T, Breathnach SM, Cox NH, Griffiths CEM. Oxford: Blackwell Publishing; 2004:10-41.
2. Chams-Davatchi C, Valikhani M, Daneshpazhooch M, Esmaili N, Balighi K, Hallaji Z, Barzegari M, Akhiani M, Ghodsi Z, Mortazavi H, Naraghi Z: Pemphigus: analysis of 1209 cases. *Int J Dermatol* 2005, 44:470-476.
3. Stanley JR: Pemphigus. In *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine* 6th edition. Edited by: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI. New York: McGraw-Hill; 2003:558.
4. Chan E, Thakur A, Farid L, Lessin S, Uberti-Benz M, James W: Pemphigus vulgaris of the cervix and upper vaginal vault: a cause of atypical Papanicolaou smears. *Arch Dermatol* 1998, 134:1485-1486.
5. Malik M, Ahmed A: Involvement of the female genital tract in Pemphigus vulgaris. *Obstet Gynecol* 2005, 106:1005-1012.
6. Batta K, Munday PE, Tatnall FM: Pemphigus vulgaris localized to the vagina presenting as chronic vaginal discharge. *Br J Dermatol* 1999, 140:945-947.

7. Hidalgo-Tenorio C, Sabio-Sánchez JM, Tercedor-Sánchez J, León-Ruiz L, Pérez-Alvarez F, Jiménez-Alonso J: Pemphigus vulgaris and systemic lupus erythematosus in a 46-y-old man. *Lupus* 2001, 10:824-826.
8. Robinson JC, Lozada-Nur F, Frieden I: Oral pemphigus vulgaris: a review of the literature and a report on the management of 12 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997, 84:349-355.
9. Nanda A, Kapoor MM, Dvorak R, Al-Sabah H, Alsaleh QA: Coexistence of pemphigus vulgaris with systemic lupus erythematosus. *Int J Dermatol* 2004, 43:393-4.
10. Kuchabal DS, Kuchabal SD, Pandit AM, Nashi HK: Pemphigus vulgaris associated with systemic lupus erythematosus. *Int J Dermatol* 1998, 37:636-8.
11. Fong PH, Chan HL: Systemic lupus erythematosus with pemphigus vulgaris. *Arch Dermatol* 1985, 121:26-7.
12. Somorin AO, Agbakwu SN, Nwaefuna A: Systemic lupus erythematosus and pemphigus vulgaris preceded by depressive psychosis. *Cent Afr J Med* 1981, 27:12-4.
13. Mascaró JM Jr, Ferrando J, Solé MT, Alsina M, Nousari HC, Anhalt GJ, Font J, Mascaró JM: Paraneoplastic pemphigus: a case of long-term survival associated with systemic lupus erythematosus and polymyositis. *Dermatology* 1999, 199:63-66.
14. Ngo AW, Straka C, Fretzin D: Pemphigus erythematosus: a unique association with systemic lupus erythematosus. *Cutis* 1986, 38:160-163.
15. Carlson JA, Ambros R, Malfetano J, Ross J, Grabowski R, Lamb P, Figge H, Mihm MC Jr: Vulvar lichen sclerosis and squamous cell carcinoma: a cohort, case control and investigational study with historical perspective; implications for chronic inflammation and sclerosis in the development of neoplasia. *Human Pathol* 1998, 29:932-938.
16. Herding U, Junge J, Daugaard S, Lundvall F, Poulsen H, Bock JE: Vulval squamous cell carcinoma and papillomaviruses: indications for 2 different aetiologies. *Gynecol Oncol* 1994, 52:241-246.
17. Carli P, Cattaneo A, De Magnis A, Biggeri A, Taddei G, Giannotti B: Squamous cell carcinoma arising in vulval lichen sclerosis: a longitudinal cohort study. *Eur J Cancer Prev* 1995, 4:491-495.
18. Byren I, Venning V, Edwards A: Carcinoma of the vulva and asymptomatic lichen sclerosis. *Genitourin Med* 1993, 69:323-324.
19. Gómez Rueda N, García A, Vighi S, Belardi MG, Cardinal L, di Paola G: Epithelial alterations adjacent to invasive squamous cell carcinoma of the vulva. *J Reprod Med* 1994, 39:526-530.
20. Lewis FM, Harrington CI: Squamous cell carcinoma arising in vulval lichen planus. *Br J Dermatol* 1994, 131:703-705.
21. Campagne G, Roca M, Martínez A: Successful treatment of a high-grade intraepithelial neoplasia with imiquimod, with vulvar pemphigus as a side effect. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003, 109:224-227.
22. Berek JS, Hacker NF: Vulvar Cancer. In *Practical Gynecologic Oncology* 4th edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia; 2005:543-583.
23. Hoareau F, Croue A, Marchetta J, Kettani S, Verret JL: Pemphigus vulgaris and intraepithelial neoplasia localized to the vagina. *Ann Dermatol Venerol* 2007, 134:564-566.
24. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F: Cancer-related inflammation. *Nature* 2008, 454:436-444.
25. Mueller MM: Inflammation in epithelial skin tumours: Old stories and new ideas. *EJC* 2006, 42:735-744.
26. Marjolin JN: Ulcere. *Dictionnaire de Médecine. Paris* 1828:31-50.
27. Clements B, Lewis H, McKinstrey S, Gray J, Bymes D: A late, fatal complication of a high energy thermal injury to the scalp. *Ann Plast Surg* 1995, 35:650-3.
28. Kaplan RP: Cancer complicating chronic ulcerative and scarring mucocutaneous disorders. *Adv Dermatol* 1987, 2:19-46.
29. Gur E, Neligan PC, Shafrir R, Reznick R, Cohen M, Shpitzer T: Squamous cell carcinoma in perineal inflammatory disease. *Ann Plast Surg* 1997, 38:653-7.
30. Sarani B, Orkin BA: Squamous cell carcinoma arising in an unhealed wound in Crohn's disease. *South Med J* 1997, 90:940-2.
31. Mayron R, Grimwood RE, Siegle RJ, Camisa C: Verrucous carcinoma arising in ulcerative lichen planus of the soles. *J Dermatol Surg Oncol* 1988, 14:547-51.
32. Yamada T, Suzuki M, Hiraga M, Toda S, Fujimoto M, Ohtsuki M, Kiyosawa T, Harada S, Nakagawa H: Squamous cell carcinoma arising on scars of epidermolysis bullosa acquisita. *Br J Dermatol* 2005, 152:588-90.

33. Mallipeddi R, Keane FM, McGrath JA, Mayou BJ, Eady RA: Increased risk of squamous cell carcinoma in junctional epidermolysis bullosa. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2004, **18**:521-6.
34. Goldberg GI, Eisen AZ, Bauer EA: Tissue stress and tumor promotion. Possible relevance to epidermolysis bullosa. *Arch Dermatol* 1988, **124**:737-41.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:
<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/10/324/prepub>

doi: 10.1186/1471-2407-10-324

Cite this article as: Bifulco *et al.*, Early invasive vulvar squamous cell carcinoma arising in a woman with vulvar pemphigus vulgaris and systemic lupus erythematosus *BMC Cancer* 2010, **10**:324

2. Lesioni preneoplastiche della cervice uterina

INTRODUZIONE

Il papillomavirus

I papillomavirus umani fanno parte di una famiglia di virus molto diffusa (ne sono stati descritti più di 100 diversi tipi): i *Papovaviridae*. Essi sono costituiti da un genoma a doppia elica e possono causare molteplici manifestazioni cliniche, da lesioni relativamente benigne (condilomi genitali) a lesioni maligne (carcinoma della cervice uterina).

Il cervicocarcinoma è causato da genotipi di HPV mucosali, filogeneticamente correlati tra loro, appartenenti alle specie alpha ad alto rischio oncogeno.

I genotipi della specie alpha che più frequentemente risultano associati al cervicocarcinoma sono HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 58 (1). Essi sono stati classificati dall'IARC Monograph Working Group in base alla loro capacità di determinare lo sviluppo del cervicocarcinoma (2). Il genotipo a più alto rischio oncogeno è l'HPV 16, seguito dai genotipi 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 per i quali sussistono sufficienti evidenze riguardo la loro correlazione con lo sviluppo del cervicocarcinoma. L'HPV 68, appartenente sempre alla specie alpha, è classificato, invece, come "probabile" agente cancerogeno poiché risultano limitate le evidenze riguardo al suo ruolo oncogenico nell'uomo. Tutti gli altri tipi di HPV specie alpha sono classificati come "possibili" agenti cancerogeni ad eccezione di HPV 6 e 11, i quali sono ritenuti "non cancerogeni" per l'uomo sulla base di evidenze epidemiologiche non sufficienti e assenza di potenziale cancerogeno evidenziato da studi molecolari (3).

Nel mondo la prevalenza dell'infezione da HPV in donne con normale citologia è approssimativamente del 10%; ciò sta ad indicare che HPV è uno delle più comuni infezioni trasmesse per via sessuale. La prevalenza dell'HPV è più alta nei paesi in via di sviluppo (13,4%) rispetto a quella presente nei paesi industrializzati (8,4%). Le donne africane (22,1%), in particolare le donne dell'Africa orientale, presentano una più alta prevalenza dell'infezione (31,6%) a

differenza delle donne del Sud-est asiatico che presentano la più bassa prevalenza (6,2%). In tutti i continenti, HPV 16 è il genotipo più comune con una prevalenza mondiale del 2,6%, nel Nord America del 3,5% e in Europa del 2,3%. L'HPV 18, dopo HPV 16, è il secondo per prevalenza nel mondo, in Europa, in Centro e Sud America. In Africa, HPV 52 è il secondo genotipo più frequente e HPV 18 il terzo. In Asia, HPV 18 è solo il quarto genotipo più frequente dopo HPV 16, 52 e 58. In Nord America, HPV 18 è solo il quarto genotipo più comune dopo HPV 16, 53 e 52 (tabella 1).

Tabella 1: ranking di prevalenza dei genotipi di HPV in donne con normale citologia nei diversi continenti.

| Continente | Ranking | Genotipi HPV |
|--------------------|---------|--------------|
| AFRICA | 1 st | HPV 16 |
| | 2nd | HPV 52 |
| | 3rd | HPV 18 |
| | 4th | HPV 58 |
| | 5 th | HPV 31 |
| ASIA | 1 st | HPV 16 |
| | 2nd | HPV 52 |
| | 3rd | HPV 58 |
| | 4th | HPV 18 |
| | 5 th | HPV 56 |
| NORD AMERICA | 1 st | HPV 16 |
| | 2nd | HPV 53 |
| | 3rd | HPV 52 |
| | 4th | HPV 18 |
| | 5 th | HPV 39 |
| CENTRO-SUD AMERICA | 1 st | HPV 16 |
| | 2nd | HPV 18 |
| | 3rd | HPV 61 |
| | 4th | HPV 71 |
| | 5 th | HPV 58 |
| EUROPA | 1 st | HPV 16 |
| | 2 nd | HPV 18 |
| | 3 rd | HPV 31 |
| | 4 th | HPV 33 |
| | 5 th | HPV 58 |

La prevalenza dell'infezione da HPV in donne *con lesioni intraepiteliali squamose di alto grado (H-SIL)* è approssimativamente dell'85%. Questo è evidente soprattutto in caso di CIN III, mentre questa correlazione è meno chiara in caso di CIN II, che presenta una sostanziale variabilità sia nell'ambito della diagnosi che della prognosi. L'HPV 16 è il genotipo maggiormente correlato a

H-SIL con una prevalenza che oscilla tra il 51,8% in Europa e il 33,3% in Oceania. La stima mondiale mostra che HPV 16 è associato nel 45,4 % a lesioni di alto grado. Nel mondo, in Europa e in Africa, HPV 31 e 33 sono i secondi e i terzi genotipi più comuni, mentre in America Latina e nei Caraibi queste posizioni spettano rispettivamente all'HPV 58 e 18; in Nord America all'HPV 6 e 18; in Asia all'HPV 58 e 52; in Oceania all'HPV 31 e 18 (tabella 2).

La prevalenza dell'infezione da HPV in donne affette *da cervicocarcinoma* è pari circa al 100%. L'HPV 16 è il genotipo a maggiore prevalenza nel mondo seguito in ordine decrescente da HPV 18, 33, 45, 31, 58, 52 e 35. Solo in Asia il terzo, quarto e quinto posto sono occupati rispettivamente da HPV 58, 33 e 52 (tabella 3).

L'HPV 18 è il secondo genotipo predominante in tutte le lesioni cervicali e sembra essere maggiormente correlato allo sviluppo dell'adenocarcinoma. L'adenocarcinoma comprende, infatti, circa il 16% di tutte le neoplasie della cervice uterina e nei paesi industrializzati, dove vengono attuati programmi di screening, è riportato addirittura un aumento della sua incidenza al di sopra del 20%.

Tabella 2: ranking di prevalenza dei genotipi di HPV in donne con diagnosi citologica di H-SIL nei diversi continenti.

| Continente | Ranking | Genotipi HPV |
|--------------------|---------|--------------|
| AFRICA | 1 st | HPV 16 |
| | 2nd | HPV 33 |
| | 3rd | HPV 31 |
| | 4th | HPV 18 |
| | 5 th | HPV 52 |
| ASIA | 1 st | HPV 16 |
| | 2nd | HPV 58 |
| | 3rd | HPV 52 |
| | 4th | HPV 18 |
| | 5 th | HPV 33 |
| NORD AMERICA | 1 st | HPV 16 |
| | 2nd | HPV 6 |
| | 3rd | HPV 18 |
| | 4th | HPV 31 |
| | 5 th | HPV 58 |
| CENTRO-SUD AMERICA | 1 st | HPV 16 |
| | 2nd | HPV 58 |
| | 3rd | HPV 18 |
| | 4th | HPV 31 |
| | 5 th | HPV 33 |

| | | |
|---------|------|--------|
| EUROPA | 1 st | HPV 16 |
| | 2 nd | HPV 31 |
| | 3 rd | HPV 33 |
| | 4 th | HPV 18 |
| | 5 th | HPV 52 |
| OCEANIA | 1 st | HPV 16 |
| | 2 nd | HPV 18 |
| | 3 rd | HPV 31 |
| | 4 th | HPV 58 |
| | 5 th | HPV 33 |

Nell'ambito del cervicocarcinoma, comunque, il primato spetta all'HPV 16 il quale contribuisce, nel 50-55% dei casi, allo sviluppo del cervicocarcinoma. Ciò sta a significare che questo genotipo virale ha un vantaggio biologico per quanto concerne la trasmissione, la persistenza e la capacità di indurre trasformazione neoplastica.

Tabella 3: ranking di prevalenza dei genotipi di HPV in donne con diagnosi di cervicocarcinoma nei diversi continenti.

| Continente | Ranking | Genotipi HPV |
|--------------------|---------|--------------|
| AFRICA | 1 st | HPV 16 |
| | 2nd | HPV 18 |
| | 3rd | HPV 33 |
| | 4th | HPV 45 |
| | 5 th | HPV 35 |
| ASIA | 1 st | HPV 16 |
| | 2nd | HPV 18 |
| | 3rd | HPV 58 |
| | 4th | HPV 33 |
| | 5 th | HPV 52 |
| NORD AMERICA | 1 st | HPV 16 |
| | 2nd | HPV 18 |
| | 3rd | HPV 31 |
| | 4th | HPV 33 |
| | 5 th | HPV 45 |
| CENTRO-SUD AMERICA | 1 st | HPV 16 |
| | 2nd | HPV 18 |
| | 3rd | HPV 31 |
| | 4th | HPV 45 |
| | 5 th | HPV 33 |
| EUROPA | 1 st | HPV 16 |
| | 2 nd | HPV 18 |
| | 3 rd | HPV 33 |
| | 4 th | HPV 31 |
| | 5 th | HPV 45 |
| OCEANIA | 1 st | HPV 16 |
| | 2 nd | HPV18 |
| | 3 rd | HPV 45 |
| | 4 th | HPV 31 |
| | 5 th | HPV 35 |

In Italia, il cervicocarcinoma presenta un'incidenza di circa 3000 - 3500 nuovi casi l'anno, al quinto posto come causa di tumore nella donna dopo colon, mammella, polmone, utero.

Il tasso di incidenza è di 10-11/100.000 donne, con una mortalità di 1000 - 1200 decessi l'anno (tasso di mortalità: 4/100.000 donne). La sopravvivenza media a 5 anni dalla diagnosi è in leggero aumento in Italia: da 60% per i casi diagnosticati nel 1983-85 a 67% per i casi del 1992- 94.

L'incremento del ricorso al Pap-test come esame di screening ha permesso, negli ultimi anni, una diminuzione della incidenza e mortalità da carcinoma del collo dell'utero (4).

Attualmente si ritiene che l'incidenza di infezione da papillomavirus sia intorno ai 900.000 nuovi casi per anno, anche se verosimilmente se ne verificano molti di più, dato che generalmente il decorso di questa infezione è asintomatico. Si stima, inoltre, che attualmente siano affette circa 269 milioni di donne nel mondo. Tuttavia queste cifre sono probabilmente sottostimate, poiché le procedure di screening del carcinoma cervicale variano enormemente da un Paese all'altro e presumibilmente il numero di donne affette è significativamente più elevato.

È stato stimato che per la donna il rischio di contrarre un'infezione da HPV durante il corso della vita è del 79%, e la prevalenza nei due sessi è simile (5).

Il rapporto sessuale costituisce la principale modalità di trasmissione del papillomavirus, anche se è possibile che si verifichi il contagio da contatto, perinatale o secondario a manovre chirurgiche.

È stato evidenziato che nelle giovani donne la prevalenza dell'infezione da HPV, spesso caratterizzata dalla coinfezione da parte di genotipi diversi, è superiore rispetto alle altre fasce di età (> 30%). Ciò sembra essere dovuto al fatto che l'età media del primo rapporto sessuale si è notevolmente ridotta.

Si assiste poi ad una rapida riduzione della prevalenza dell'infezione da HPV nei range di età successivi. Sorprendentemente questo trend è interrotto da picchi di prevalenza in donne tra 35 e 44 anni e 45 e 54 anni. Attualmente si ritiene che una combinazione di 3 fattori possa spiegare questo fenomeno: 1) nuove infezioni da HPV in donne di mezza età dovute a modificazioni del

comportamento sessuale; 2) riattivazione di infezioni latenti dovuta ad una alterata risposta immune conseguente all'invecchiamento; 3) effetto della prolungata esposizione all'HPV durante tutta la vita.

Nell'infezione da HPV, inoltre, l'uso del profilattico sembra ridurre il rischio di trasmissione dell'infezione anche se solo parzialmente. Oggi, grazie allo sviluppo dei vaccini contro l'HPV, abbiamo a disposizione un'ulteriore e più potente arma per la prevenzione primaria del cervicocarcinoma. Questi vaccini, infatti, inducendo anticorpi neutralizzanti, determinano di fatto l'instaurarsi di una barriera protettiva in grado di bloccare l'attecchimento degli agenti patogeni alle cellule bersaglio.

I principali fattori di rischio di contrarre questa infezione sono le abitudini sessuali (numero di partner sessuali, partner già affetto), l'età (inferiore ai 25 anni) e lo stato immunitario. Infatti, i soggetti immunodepressi (HIV positivi, i trapiantati, diabetici, pazienti sottoposti a chemioterapia, le donne gravide) presentano un'incidenza significativamente maggiore di HPV (6). Inoltre, le donne fumatrici e quelle che assumono contraccettivi orali hanno un rischio leggermente maggiore di sviluppare lesioni della cervice HPV correlate.

La maggior parte delle infezioni da HPV è asintomatica. Circa il 90% delle infezioni è transitoria; la *clearance* si verifica generalmente entro 12 mesi.

La risposta immunitaria, indotta nel sito di infezione, coinvolge l'immunità innata, cellulo-mediata ed anticorpale secondo meccanismi non ancora del tutto compresi. La risposta immunitaria innata induce la lisi della cellula infettata e la produzione di citochine. Le cellule T, attivate dal riconoscimento di proteine virali, inducono la crescita e la maturazione delle cellule B. Sia la risposta cellulo-mediata che quella anticorpale sono necessarie per assicurare una efficace protezione contro il virus. L'induzione di anticorpi neutralizzanti specifici per L1 ed L2, proteine del capsido virale, è critica per impedire l'instaurarsi dell'infezione e l'ingresso del virus nella cellula.

La risposta immunitaria naturale può essere insufficiente, non consentendo la risoluzione

dell'infezione e risulta generalmente attenuata. Il virus non causa viremia, né infezione sistemica. L'assenza del virus nel distretto ematico e la sua caratteristica replicazione intracellulare, che non si accompagna a lisi cellulare, implicano l'impossibilità del sistema immunitario di creare una risposta anticorpale forte o di indurre quadri infiammatori accentuati. Il virus infetta i cheratinociti basali che maturano verticalmente. I virioni maturi sono prodotti solo negli strati più superficiali dell'epitelio, e vengono rilasciati nell'ambiente circostante tramite la desquamazione cellulare (7).

L'infezione da HPV ad alto rischio induce sierconversione solo nel 54-59% dei casi entro i 18 mesi (8). La sierconversione, inoltre, è lenta e solo una infezione persistente può indurre la produzione di un livello sufficiente di anticorpi. Contrarre l'infezione, e manifestare sierconversione, non impediscono una re-infezione futura anche con i medesimi genotipi di HPV.

Il carcinoma della cervice uterina

Il carcinoma della cervice uterina continua ad essere una delle principali cause di morte delle donne nel mondo, soprattutto nei paesi sottosviluppati. Rappresenta, infatti, nella popolazione femminile, il secondo cancro per incidenza, dopo il carcinoma mammario (9).

Ogni anno vengono diagnosticati circa 500.000 nuovi casi. Nei Paesi sviluppati le donne sono state "educate" ad aderire a programmi di screening mediante pap-test, con una diminuzione della mortalità di circa il 70% (10). Nei Paesi sviluppati, per le donne che non aderiscono ai programmi di screening, l'incidenza della neoplasia cervicale uterina è massima intorno ai 50 anni, ed è circa di 30 casi su 100.000 donne. Nei Paesi in via di sviluppo l'incidenza è di 2-5 volte superiore, rappresentando la maggiore causa di mortalità femminile nell'Africa Sub-sahariana, nell'Africa Centrale, nel Sudafrica e in India. In Europa l'incidenza più alta di cancro cervicale è osservata in Portogallo (19 su 100.000) e la più bassa in Lussemburgo (4 su 100.000). La mortalità più alta si riscontra in Danimarca, Austria e Portogallo (6-7 su 100.000) mentre la più bassa si registra in Lussemburgo e in Finlandia (1 su 100.000) (11).

I fattori di rischio sono: il precoce inizio dell'attività sessuale, l'elevato numero di partner sessuali, l'età della prima gravidanza e le infezioni genitali a trasmissione sessuale, in particolare l'infezione da Human Papilloma Virus (HPV), soprattutto dei sottotipi 16 e 18, sono stati associati all'insorgenza di carcinoma della cervice. L'HPV, in particolare, è stato identificato in circa il 90% dei carcinomi invasivi di tipo squamoso con maggiore prevalenza, in ordine decrescente, dei genotipi di HPV 16, 18, 33, e 45 (12), e nel 50% dei casi di adenocarcinoma del canale cervicale (13,14) con maggiore prevalenza dei genotipi di HPV 18 e 16 (12). Altri agenti infettivi come l'Herpes Virus 2 (HSV 2), stati di immunodepressione congenita o acquisita (infezione da HIV) possono essere considerati possibili cofattori.

Il 90% delle neoplasie cervicali origina a livello della zona di trasformazione dell'esocervice, mentre il rimanente 10% insorge a livello del canale endocervicale.

L'infezione cronica con genotipi ad alto rischio, insieme ad altri fattori di rischio minori, determinano l'insorgenza di lesioni cosiddette precancerose (CIN/AIS).

La maggior parte dei tumori invasivi sono preceduti, infatti, da neoplasie intraepiteliali cervicali (CIN), che possono persistere come tali anche per lungo tempo, e che sono suscettibili di trattamenti conservativi, capaci di impedirne nella quasi totalità dei casi la progressione verso forme invasive. Queste lesioni sono delle vere e proprie displasie, termine che significa letteralmente proliferazione disordinata, caratterizzate da una varietà di modificazioni che comprendono la perdita di uniformità dell'aspetto delle singole cellule e del loro orientamento nell'architettura del tessuto. Di fondamentale importanza, nella definizione di displasia, è la presenza di figure mitotiche più numerose rispetto alla norma con localizzazioni anomale all'interno dell'epitelio. Infatti, negli epiteli squamosi stratificati displastici le mitosi non sono confinate allo strato basale, ma possono apparire a tutti i livelli, anche tra le cellule più superficiali.

Normalmente le cellule alte dello strato basale maturano progressivamente, trasformandosi in cellule piatte nello strato superficiale. Nella displasia, questa organizzazione può essere perduta e sostituita da ammassi disordinati di cellule simili a quelle basali. Quando la displasia è marcata e

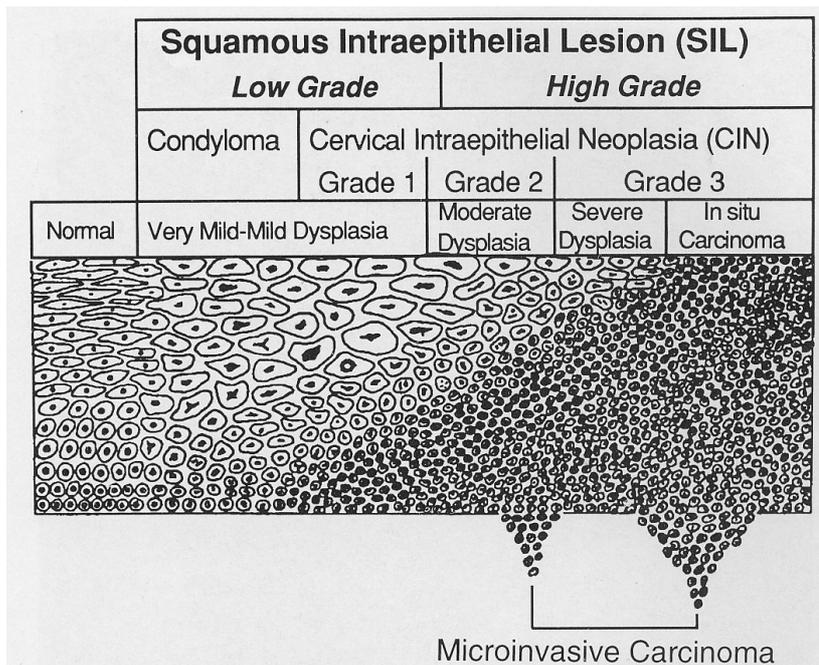
coinvolge l'intero spessore dell'epitelio, la lesione viene considerata come una forma di neoplasia pre-invasiva, definita carcinoma in situ, in quanto non vi è il superamento della membrana basale.

Si definiscono lesioni preneoplastiche (CIN) dell'esocervice tutte quelle condizioni caratterizzate da graduale proliferazione di cellule atipiche con variabile potenzialità evolutiva verso il carcinoma invasivo della cervice uterina. Lo spettro delle alterazioni della CIN comprende: modificazioni citologiche quali alterazione del rapporto nucleo/citoplasma per ingrandimento del nucleo; atipie nucleari quali cromatina irregolarmente distribuita, membrana nucleare irregolare, presenza di nucleoli; alterazione del numero delle cellule e modificazioni architetturali dell'epitelio squamoso pluristratificato quali alterazioni della polarità e della differenziazione cellulare; la ploidia cellulare, cioè il contenuto in DNA della cellula.

Sono stati identificati tre gradi di precursori del carcinoma cervicale: CIN 1, 2 e 3. I primi due corrispondono rispettivamente alla displasia lieve e moderata, il terzo alla displasia grave e al carcinoma in situ (figura 1). Più precisamente, nell'ambito delle CIN 1 rientrano le lesioni che mostrano solo atipia coilocitica (effetto citopatico virale) e cellule atipiche negli strati epiteliali più superficiali. Il successivo grado, CIN 2, consiste nella comparsa di cellule atipiche negli strati più bassi dell'epitelio che, tuttavia, mostra normale maturazione e cheratinizzazione progredendo verso la superficie. Quando tutto lo spessore dell'epitelio è sostituito da cellule atipiche immature, senza differenziazione superficiale, l'alterazione è denominata CIN 3 o carcinoma in situ (15).

In ambito citologico, tale terminologia è stata modificata nel 2001 dall'introduzione della classificazione citologica del Bethesda System che definisce due livelli di alterazione delle lesioni squamose (SIL): quelle di basso grado (Low-SIL) e quelle di alto grado (High-SIL). La CIN 1, pertanto, corrisponde alla L-SIL, mentre le CIN 2-3 rientrano nel novero delle H-SIL. Questa nuova classificazione, inoltre, tenendo conto del fatto che l'infezione da HPV è fondamentale nella cancerogenesi cervicale, include anche le alterazioni citopatiche da virus (coilocitosi) nelle lesioni squamose di basso grado (L-SIL) (16).

Figura 1: Classificazione delle lesioni CIN.



Per quanto riguarda l'evoluzione di tali lesioni in assenza di trattamento, la CIN 1 e la coilocitosi vanno incontro a regressione spontanea nel 60% dei casi; persistenza nel 30%; progressione a CIN 2-3 nel 7-33% dei casi con intervallo di tempo medio pari a 11-24 mesi; circa 1/3 delle displasie di alto grado progredirà nell'arco di 10 anni verso forme di neoplasia invasiva, pertanto risulta di fondamentale importanza lo screening delle lesioni precancerose. La displasia di alto grado, inoltre, insorge in media 26 mesi dopo l'infezione da HPV ad elevato rischio oncogeno anche se la progressione sembra essere correlata al virotipo ed all'attiva proliferazione ed integrazione del DNA virale nella cellula ospite. Infatti, molti studi hanno dimostrato che l'identificazione dell'HPV 16 in donne con lesioni citologiche di basso grado determina la progressione verso la CIN 3 in circa il 60% delle donne entro 14 mesi, mentre in donne con HPV 6 la progressione si verifica solo nel 5% dei casi. In genere, il rischio di progressione a carcinoma invasivo cresce con il grado della CIN, mentre le lesioni di più basso grado hanno maggiore probabilità di regressione, anche se il comportamento di ogni specifica lesione non è prevedibile.

Infine, la displasia di basso grado ha un picco di incidenza nella seconda decade di vita, mentre la displasia di alto grado presenta un picco nella terza decade. Il carcinoma invasivo della cervice è, invece, più spesso riscontrato dopo i 40 anni (17).

Un fattore prognostico che condiziona la progressione verso lesioni a più alto grado è la ploidia: si è evidenziato che più dell'85% delle lesioni da HPV e di CIN che regrediscono presenta un pattern di crescita diploide o poliploide, mentre il 95% delle CIN persistenti o che progrediscono presentano aneuploidia (16).

Bisogna, infine, tenere sempre presente che tumori invasivi possono insorgere ab initio senza essere preceduti da una fase intraepiteliale, anche se questa evenienza risulta essere abbastanza rara.

Le lesioni preneoplastiche dell'endocervice, invece, precedono lo sviluppo dell'adenocarcinoma cervicale che origina dalle cellule ghiandolari endocervicali produttori muco.

E' possibile definire due gradi di lesioni preinvasive endocervicali: l'iperplasia ghiandolare atipica, che a sua volta si distingue in basso e di alto grado, e la neoplasia cervicale intraghiandolare o adenocarcinoma in situ.

Dal punto di vista microscopico, i principali tipi istologici di carcinoma della cervice sono:

- *carcinoma squamoso*, che rappresenta l'istotipo più frequente, circa l'80% dei casi. Origina a livello della giunzione squamo-colonnare. Se ne distinguono 3 sottotipi, a seconda delle cellule che lo compongono: A grandi cellule cheratinizzanti (ben differenziato), A grandi cellule non cheratinizzanti (moderatamente differenziato); A piccole cellule non cheratinizzanti (molto rari, scarsamente differenziato).
- *adenocarcinoma*, che si riscontra nel 15-20% dei casi, origina dal canale cervicale e presenta numerose varianti:
 - endometriode: insorge presumibilmente dalle ghiandole endocervicali presentando una struttura simile all'adenocarcinoma endometriale, da cui è difficile differenziarlo. Sia come aspetto clinico che come comportamento biologico è simile al carcinoma squamoso e può essere anch'esso associato all'infezione da HPV tipo 18, tuttavia si manifesta in donne più anziane;
 - mucinoso

- sieroso-papillifero
 - adenosquamoso: presenta entrambe le differenziazioni, squamosa e adenocarcinomatosa, e si ritiene derivi dalle cellule di riserva, presenti nello strato basale delle ghiandole endocervicali. Questa forma ha, a parità di stadio, una prognosi peggiore rispetto al carcinoma squamoso e a quello endometrioidale.
 - adenoma maligno: è una particolare variante altamente differenziata ma caratterizzata da un andamento clinico particolarmente aggressivo. Spesso si associa alla sindrome di Peutz-Jeghers, caratterizzata da pigmentazione muco-cutanea, polipi amartomatosi del canale intestinale e tumori mucinosi dell'ovaio.
- Altri tumori epiteliali, da ricordare, per l'elevata capacità metastatica, è il *carcinoma a piccole cellule*. Esso è correlato, infatti, ad una prognosi molto severa, con precoce disseminazione metastatica, sia per via linfatica che per via ematogena.

Dal punto di vista macroscopico, invece, il carcinoma invasivo della cervice si rende evidente con tre tipi di crescita: vegetante (o esofitico), ulcerato e infiltrativo. La variante più comune è quella vegetante, che si manifesta come una massa che protrude dalla superficie mucosa e la cui natura neoplastica è di facile individuazione (15).

Screening e la prevenzione secondaria del cervicocarcinoma

Studi epidemiologici ed anatomopatologici hanno dimostrato con sempre maggiore evidenza che la maggior parte dei tumori invasivi della cervice sono preceduti da lesioni displasiche di vario grado (lieve, moderato e severo) confinate nel contesto dell'epitelio squamoso dell'esocervice o dell'epitelio ghiandolare dell'endocervice, che possono persistere come tali anche per lungo tempo e che sono suscettibili di trattamenti conservativi, capaci di impedirne nella quasi totalità dei casi la progressione verso forme invasive.

Su tale base è nato e si è diffuso nel mondo (in Finlandia nel 1965, negli USA nel 1970, in Gran Bretagna nel 1987, etc.) lo screening del cervicocarcinoma, che coinvolge la popolazione femminile sessualmente attiva, in una fascia di età compresa tra i 25 ed i 64 anni, volto ad identificare le lesioni preneoplastiche della cervice utilizzando una metodica di facile esecuzione e di basso costo comunemente conosciuta come citologia cervico-vaginale o, meglio, pap-test, ideata nel 1945 da George Papanicolau (figura 2).

Figura 2: George Papanicolau.



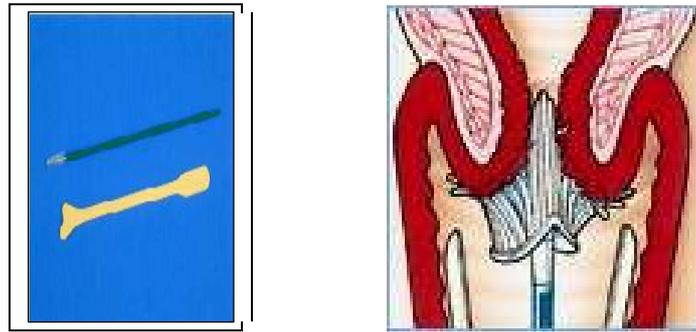
Oggi, però, si discute molto sulla necessità di includere nello screening anche donne di età

inferiore ai 25 anni, in quanto è stato evidenziato un aumento dell'incidenza di lesioni precancerose, ed anche francamente cancerose, a livello del collo dell'utero in donne appartenenti a fasce di età sempre più giovani. Ciò sarebbe dovuto alla maggiore permissività in campo sessuale e conseguente maggiore diffusione dell'HPV. Pertanto si consiglia l'effettuazione del primo pap-test 12 mesi dopo il primo rapporto sessuale.

In Italia, la diagnosi precoce del cancro della cervice uterina si è basata per molti anni sull'iniziativa spontanea delle donne. Ciò ha condotto ad una copertura incompleta della popolazione femminile (meno del 50%) per la quale lo screening è indicato. Nel 1996 è nato il Gruppo Italiano Screening del Cervico Carcinoma (GISCi), un'Associazione senza scopi di lucro che si propone la promozione e qualificazione dell'attività di screening organizzato del cancro del collo dell'utero. Pertanto è solo a partire dal 1996 che in Italia è raccomandata l'attivazione di programmi di screening organizzato del cancro cervicale su base regionale (18, 19). Tali raccomandazioni, largamente basate sulle linee guida europee (20, 21), includono gli inviti personali (attraverso lettera, con appuntamento prefissato) alle donne di età compresa tra i 25 e 64 anni per eseguire un pap-test ogni 3 anni. Secondo le ultime rilevazione dell'Osservatorio Nazionale di Screening (dati del 2004) oggi sono più di 10 milioni le donne che hanno effettuato un pap-test nell'ambito di un programma di screening organizzato.

L'affidabilità di tale screening è legata all'accuratezza del prelievo. È, infatti, necessario un campione cellulare rappresentativo da sottoporre all'esame citologico (figura 3).

Figura 3: prelievo citologico.



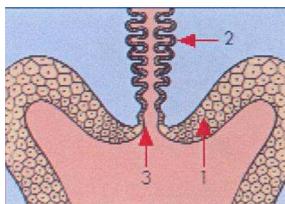
Più precisamente, il pap-test deve contenere cellule provenienti dall'esocervice, dall'endocervice e dalla zona di trasformazione. In quest'ultima zona, appunto, si sviluppano le lesioni squamose intraepiteliali (SIL), ovvero le lesioni preneoplastiche dell'esocervice, e le lesioni ghiandolari (AGC).

Non è sempre agevole identificare tale zona di trasformazione, in quanto la sua localizzazione cambia nel corso della vita, a seconda dell'età e delle varie fasi della vita riproduttiva (figura 4). Infatti, il prelievo potrà risultare inadeguato soprattutto in peri e post- menopausa, quando la giunzione squamo-colonnare (GSC) è fisiologicamente risalita nel canale cervicale o vi è stenosi dell'orificio uterino esterno.

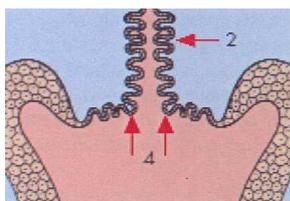
Questo ed altri fattori, come scarsità del materiale, spiccata flogosi, eritrociti che oscurano il materiale cellulare, errori di allestimento del vetrino, possono essere alla base di risultati falsamente negativi al pap-test.

Come suggerito da un'ampia revisione della letteratura, la percentuale di falsi negativi riscontrabili al pap-test è molto variabile (dal 2 al 65% circa) ed è correlata, in particolare, alla ridotta sensibilità del test nel riconoscimento di lesioni di basso grado (CIN 1 e CIN 2) e di quelle associate ad infezione da HPV (22-24).

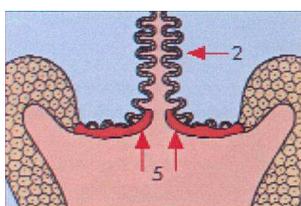
Figura 4: localizzazione della GSC in rapporto all'età e alle varie fasi della vita riproduttiva.



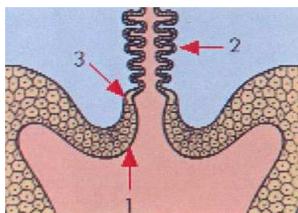
Dopo la pubertà, nel periodo della maturità sessuale, la “giunzione squamocolonnare” può coincidere con l’orifizio uterino esterno od essere esterna ad esso



Modificazioni ormonali durante la pubertà e la gravidanza possono determinare l’eversione dell’epitelio cilindrico nell’esocervice con spostamento della giunzione squamocolonnare sul versante vaginale della cervice



L’epitelio cilindrico della mucosa endocervicale everso nell’esocervice subisce modificazioni metaplasiche e gradualmente si trasforma in epitelio squamoso. Questa zona di epitelio squamoso metaplasico è detta “zona di trasformazione”



Nelle donne in postmenopausa, la giunzione squamocolonnare o zona di trasformazione, risale nel canale endocervicale

Questo problema è stato in parte risolto con l’adozione della nuova classificazione citologica secondo Bethesda (25) che mira ad escludere i falsi negativi dovuti a prelievo inidoneo o a un non corretto allestimento del preparato (tabella 4).

Tabella 4: Bethesda System 2001.

| |
|--|
| <p>Tipo di campione: specificare se pap test convenzionale, in fase liquida o altro</p> <p>ADEGUATEZZA DEL CAMPIONE</p> <ul style="list-style-type: none"> - soddisfacente per la valutazione (presenza di cellule cilindriche endocervicali e di componenti della zona di trasformazione); - insoddisfacente per la valutazione (presenza di sangue parzialmente oscurante, infiammazione, ecc); - rifiutato non processato (specificare la ragione); - processato ed esaminato ma non soddisfacente per valutare anomalità |
|--|

| |
|--|
| di cellule epiteliali (specificare la ragione). |
| INTERPRETAZIONE DEL RISULTATO |
| Negativo per lesioni intraepiteliali o di malignità |
| <ul style="list-style-type: none"> - organismi: Trichomonas vaginalis, microrganismi fungini, Gardnerella vaginalis, Actynomices, modificazioni suggestive per Herpes simplex; - modificazioni non neoplastiche: cellule reattive associate a infiammazione (inclusa la riparazione tipica), terapia radiante, IUD, cellule ghiandolari in paziente isterectomizzata, atrofia. - Altro: cellule endometriali in donne di 40 anni o più . |
| Anormalità delle cellule epiteliali |
| Cellule squamose |
| <ul style="list-style-type: none"> - cellule squamose atipiche (ASC), di incerto significato (ASC-US) o che non possono eludere H-SIL (ASC-H); - lesione intraepiteliale di basso grado (L-SIL) comprendente HPV, displasia lieve, CIN 1; - lesioni intraepiteliali di alto grado (H-SIL) comprendente displasia moderata e grave, carcinoma in situ, CIN 2, CIN 3, CIS; - quadri sospetti per invasione; - carcinoma squamoso. |
| Cellule ghiandolari |
| <ul style="list-style-type: none"> - cellule ghiandolari atipiche (AGC), endometriali o endocervicali, non altrimenti specificate (AGC-NOS), o suggestive di neoplasia (AGC vs. neoplasia); - adenocarcinoma endocervicale in situ (AIS); - adenocarcinoma endocervicale, endometriale, extrauterino o non altrimenti specificato (NOS). |
| Altre neoplasie maligne |

Recentemente, inoltre, l'utilizzo della citologia su strato sottile (figura 5) ha ulteriormente contribuito a facilitare l'individuazione di lesioni preneoplastiche rispetto allo striscio convenzionale ed ha ridotto ulteriormente l'incidenza di falsi negativi.

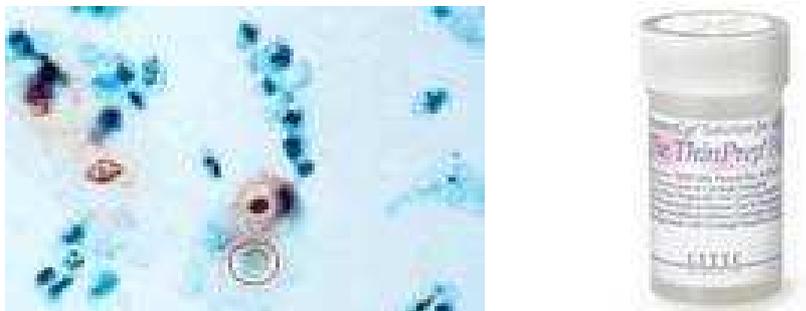
Il THIN PREP (citologia basata su fase liquida) è una tecnica basata sulla sospensione di tutto il materiale raccolto in un fluido, creando quindi una sospensione cellulare. Le cellule in sospensione restano preservate per diverse settimane a temperatura ambiente. La sospensione può essere trattata per rimuovere l'eccesso di sangue e di essudato infiammatorio, una piccola quota rappresentativa viene strisciata su di un vetrino. Questa tecnica consente l'allestimento dei preparati in maniera automatica e semiautomatica. Questa strumentazione è rappresentata da un tubo di

plastica con un filtro ad una estremità. Il materiale viene raccolto con una spatola corta e larga di plastica che viene poi immerso in un contenitore contenente il liquido e fatto ruotare in modo che le cellule raccolte restino in sospensione. Nel processo ci sono 3 step fondamentali:

1. Dispersione. La spatola è introdotta in una provetta detta vial, che si fa girare vorticosamente per mettere il muco e le cellule in sospensione.
2. Raccolta delle cellule. Viene prodotta nel tubo una pressione negativa che spinge il fluido attraverso il filtro. Le maglie di questo filtro trattengono le cellule e fanno passare attraverso i pori le emazie, i polimorfonucleati e i detriti cellulari. Quindi, sul filtro non restano elementi di disturbo. Il flusso di sospensione è mantenuto e controllato in modo ottimizzato per la raccolta di cellule.
3. Trasferimento. Il filtro che contiene le cellule viene rovesciato e messo delicatamente in contatto con il vetrino caricato elettronicamente. Le cellule così passano sul vetrino che successivamente viene fissato immediatamente.

La tecnica consente di ottenere uno strato di cellule solo in corrispondenza del filtro con fondo pulito ed assenza di interferenze nella lettura. In un'area di 1,9 cm si distribuiscono circa 100.000 cellule, i cui aggregati sono più piccoli; inoltre in un unico strato (monolayer) si osservano meglio anche i nuclei e la colorazione risulta più uniforme. Il materiale residuo può essere utilizzato per studi successivi (per controllo di qualità o per immunocistochimica).

Figura 5: citologia su strato sottile.



Nell'ambito degli screening organizzati, la colposcopia rappresenta un' esame di II livello. La funzione è stata ben espressa dalla Task Force Canadese (2° Rapporto Walton del 1982): “La citologia evidenzia la neoplasia preclinica e clinica cervicale. La colposcopia valuta la cervice uterina con citologia anormale e permette la localizzazione della zona della portio ove eseguire la biopsia per l'esame istologico. La colposcopia non deve essere considerata una tecnica di screening, ma un importante ausilio per la localizzazione e la delimitazione dei precursori e del cancro già invasivo e microinvasivo della cervice uterina nelle donne con esame citologico cervico-vaginale anormale” (26).

La colposcopia nasce ad Amburgo tra il 1922 ed il 1925, con lo scopo di effettuare una diagnosi precoce di cervicocarcinoma tramite l'accurata osservazione della morfologia della cervice uterina. In quegli anni, infatti, il Dott. Hans Hinselmann creò il primo colposcopio da un microscopio dissezzatore, con la ferma convinzione di riuscire in tal modo ad evidenziare lesioni precursori di neoplasie, altrimenti non evidenziabili ad occhio nudo. Oggi, a quasi un secolo di distanza, la colposcopia rappresenta non solo l'esame di secondo livello nella diagnosi di neoplasia della cervice uterina, ma anche un'indispensabile tecnica diagnostica nel campo della patologia cervico-vaginale, vulvare e del pene (figura 6).

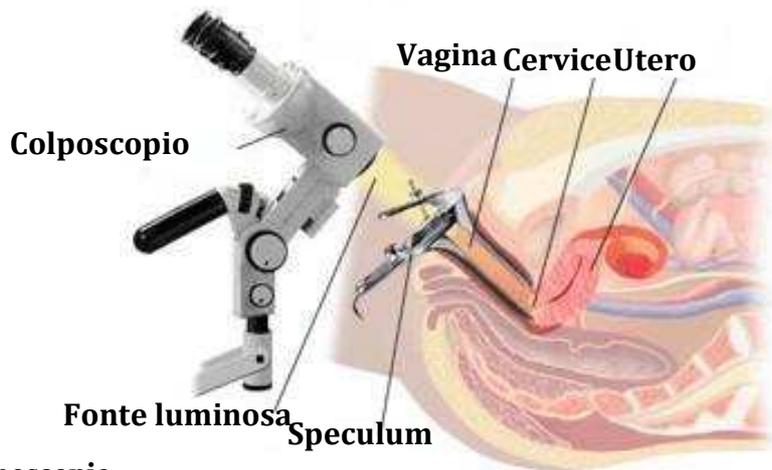


Figura 6: colposcopio.

Dopo aver introdotto lo speculum si procede alla detersione della portio con soluzione fisiologica e alla visualizzazione della stessa a basso ingrandimento. Successivamente si applica sulla cervice uterina acido acetico al 3% o al 5%; questo determina, dopo circa 15 secondi, un rigonfiamento tissutale dovuto alla coagulazione delle proteine intracellulari. L'epitelio squamoso fisiologico non subisce alterazioni rilevanti; invece, i villi di quello ghiandolare presentano un aspetto ad "acino d'uva" ed assumono colore bianco. E' quindi possibile evidenziare tra i due epiteli una linea di transizione bianca che rappresenta la giunzione squamo-colonnare. Un esame colposcopico si definisce soddisfacente solo quando quest'ultima è interamente visibile. Nelle donne fertili la giunzione squamo-colonnare è evidenziabile colposcopicamente nell'85-90% dei casi, anche grazie alle pinze di Kogan. In menopausa, invece, si verifica frequentemente una risalita nel canale cervicale dovuta alla riduzione delle concentrazioni di estrogeni. In queste pazienti è necessario un accurato studio del canale cervicale, come in tutte le donne che abbiano un pap-test anormale e in cui non sia visibile la giunzione squamo-colonnare.

Nel caso in cui sia presente un epitelio anormale, si verifica una reazione aceto bianca (figura 7) dovuta all'elevata densità nucleare ed alla maggiore concentrazione di proteine. Queste ultime, quando vengono a contatto con l'acido acetico, subiscono un agglutinamento impedendo il passaggio della luce. Questa reazione generalmente si verifica dopo circa un minuto e persiste per 1-2 minuti. L'intensità e la durata sono direttamente proporzionali al grado di atipia cellulare

presente.

Figura 7: reazione aceto bianca di un epitelio anormale.



Per effettuare il test di Schiller è necessario applicare sulla cervice la soluzione iodata di Lugol. Lo iodio, infatti, viene assorbito dall'epitelio squamoso contenente glicogeno e determina una colorazione marrone scuro della superficie. Questa soluzione, dunque, rende evidenti aree iodonegative come l'epitelio colonnare, quello atrofico e le aree di metaplasia squamosa, ma soprattutto mette in risalto l'eventuale presenza di zone di trasformazione atipiche che assumono invece un caratteristico colore giallo canarino. Pur essendo attualmente un test molto discusso, rappresenta indubbiamente un esame in grado di fornire dati aggiuntivi nella valutazione colposcopica e un valido ausilio durante l'effettuazione di trattamenti chirurgici della cervice.

Dunque, in presenza di uno striscio anormale, prima di scegliere uno schema terapeutico, è necessario determinare la localizzazione della lesione da cui provengono le cellule anormali, valutarne l'estensione e avere una diagnosi istopatologica sulla base di biopsie mirate eseguite sotto guida colposcopica in uno o più settori. Una biopsia cervicale effettuata senza guida colposcopica, in assenza di una lesione visibile, comporta il rischio di una diagnosi istologica falsamente negativa in oltre il 20% dei casi.

L'accuratezza diagnostica della combinazione citologia-colposcopia è risultata, fin dagli anni '60, assai vicina al 100% (27).

La classificazione colposcopica internazionale, approvata a Roma nel 1990 al 7° Congresso

Mondiale di Patologia Cervicale e Colposcopia della International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy (28), ha introdotto la definizione di “trasformazione anormale”, distinguendo due diversi gradi di anormalità sulla base delle caratteristiche morfologiche delle immagini colposcopiche. Questa suddivisione (TAG 1- Trasformazione Anormale grado 1 e TAG 2- Trasformazione Anormale di grado 2), consente, inoltre, di stabilire il management terapeutico delle pazienti. La classificazione attualmente in uso è quella redatta dall’IFCPC (International Federation of Cervical Pathology and Colposcopy) (29) presentata al congresso mondiale tenutosi a Barcellona nel 2002 (tabella 5) che ha sostituito, apportando piccole modifiche, la classificazione del 1990.

Tabella 5: Classificazione Colposcopica Internazionale IFCPC 2002.

| |
|--|
| REPERTI COLPOSCOPICI NORMALI (fig.8) |
| <ul style="list-style-type: none"> - Epitelio pavimentoso originario - Epitelio cilindrico - Zona di trasformazione normale |
| REPERTI COLPOSCOPICI ANORMALI |
| Trasformazione anormale grado 1 (TA-G1) (fig.9) |
| <ul style="list-style-type: none"> - epitelio aceto-bianco sottile piatto - mosaico regolare - puntato regolare - area parzialmente iodocaptante |
| trasformazione anormale grado 2 (TA-G2) (fig.10) |
| <ul style="list-style-type: none"> - epitelio aceto-bianco ispessito - mosaico irregolare - puntato irregolare - area iodonegativa - vasi atipici |
| QUADRO COLPOSCOPICO SUGGERISTIVO PER CARCINOMA INVASIVO (fig.11) |
| COLPOSCOPIA INSODDISFACENTE (fig.12) |

Figura 8: colposcopia normale.

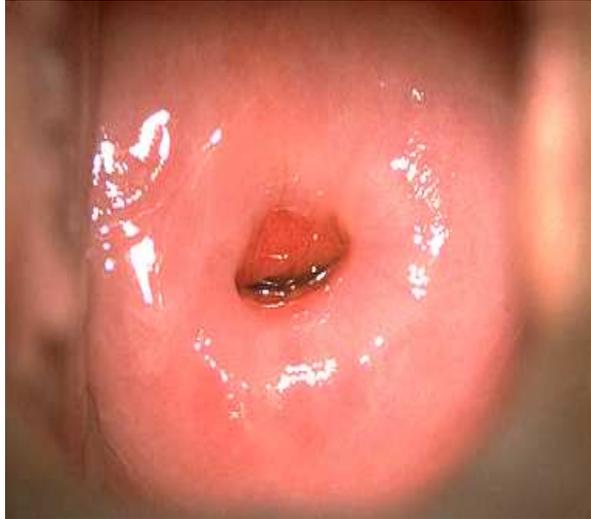


Figura 9: ZTAG 1.



Figura 10: ZTAG 2.

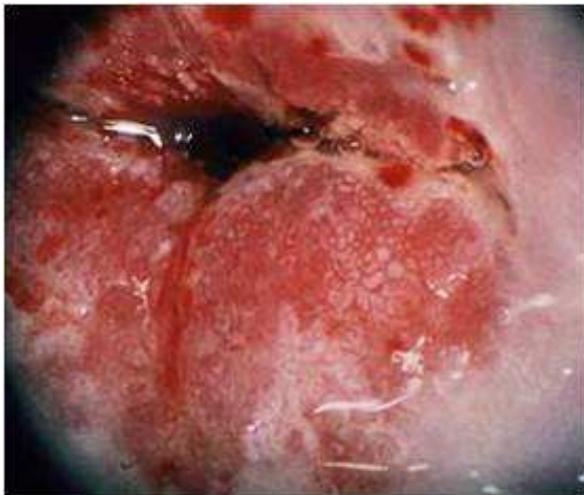


Figura 11: sospetto carcinoma invasivo.

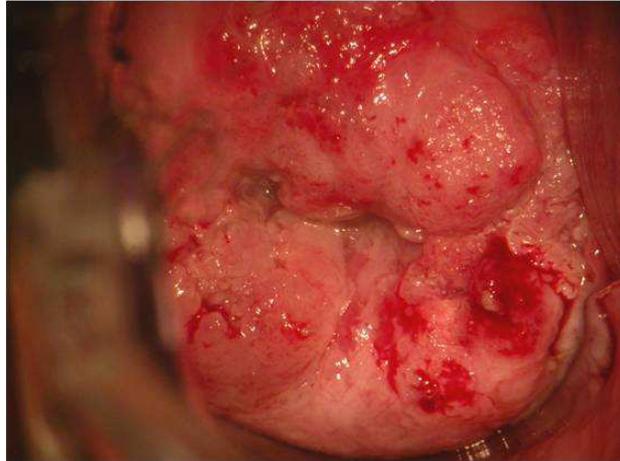
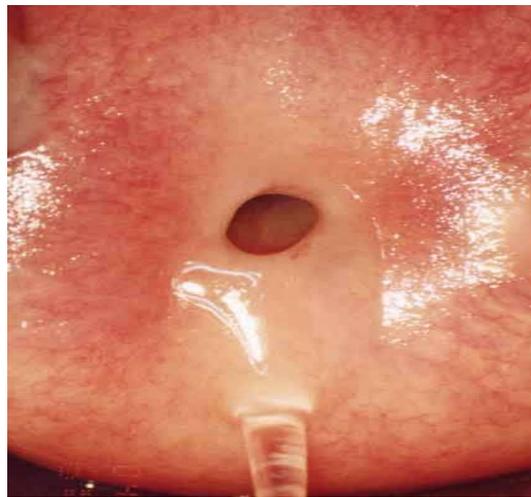


Figura 12: colposcopia insoddisfacente.



La colposcopia presenta tuttavia dei limiti diagnostici. Il principale è costituito dall'impossibilità di valutare il canale cervicale. Risulterà pertanto inconclusiva ed insufficiente quando la lesione esocervicale risale nel canale cervicale, o quando la giunzione squamo-colonnare non è visibile, ed inadeguata se la lesione è in sede esclusivamente endocervicale. Nelle donne in età fertile e in premenopausa il problema non è in realtà molto frequente dato che la giunzione squamo-colonnare risulta visibile nell'80-90% dei casi. Dopo la menopausa, invece, dato che la giunzione squamo-colonnare risale verso l'interno, il valore della colposcopia diminuisce. Pertanto, in queste pazienti ed in tutte le pazienti con pap-test anormale in cui non è visibile la giunzione squamo-colonnare, si rende necessaria l'integrazione diagnostica con accurato studio del canale cervicale.

Nuove tecniche diagnostiche

a. Tipizzazione HPV-DNA

Fin dai primi anni '70 i ricercatori hanno utilizzato le tecniche di rivelazione degli acidi nucleici per identificare sia geni che microrganismi specifici. Le prime metodiche di rivelazione si basavano sulla radioattività, ed erano di lunghissima esecuzione, manualmente impegnative, piuttosto elaborate dal punto di vista tecnico e solo moderatamente sensibili, e non potevano quindi essere utilizzate per l'esecuzione di dosaggi clinici di routine (30). I primi sistemi non radioattivi, sviluppati verso la fine degli anni '70, erano abbastanza specifici, ma non erano sensibili quanto i loro corrispondenti radioattivi (31). Al fine di aumentare la sensibilità sono state sviluppate delle metodiche di amplificazione, adattate poi ai dosaggi di tipo non radioattivo per la rivelazione degli acidi nucleici.

Con l'avvento di tecniche di amplificazione più sofisticate, la sensibilità, la facilità d'uso ed i tempi di esecuzione dei dosaggi non radioattivi per la rivelazione degli acidi nucleici sono notevolmente migliorati.

Attualmente esistono due metodiche per la determinazione della presenza del papilloma virus sulla cervice uterina: L'Hybrid capture II (HCII) (Digene) e Amplicor Human Papilloma Virus (HPV) Test.

L'Hybrid capture II è un test di ibridazione in fase liquida che utilizza pool di sonde a RNA in grado di riconoscere e distinguere tra:

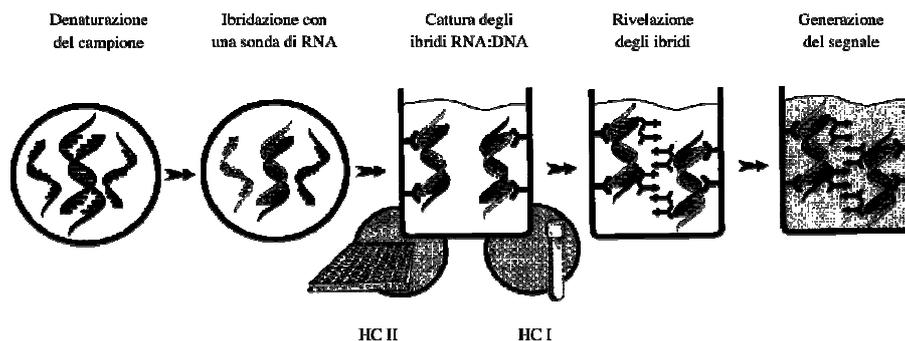
- HPV a basso rischio (6, 11, 42, 43, 44)
- HPV ad alto/moderato rischio (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68)

Il sistema combina le tecniche di ibridazione degli acidi nucleici ben note ai ricercatori con la facilità di manipolazione del campione propria dei dosaggi immunologici tradizionali. L'HCS è una metodica sensibile e non radioattiva di amplificazione del segnale basata sugli acidi nucleici. Questa tecnologia offre uno strumento efficiente, accurato e standardizzato per la rivelazione degli

agenti patogeni tra cui il papillomavirus umano (HPV).

Questa tecnica prevede l'impiego di lunghe sonde genomiche ed anticorpi specifici per gli ibridi DNA:RNA allo scopo di ottenere una forte amplificazione del segnale, sfruttando il fatto che ciascuna copia del bersaglio può legare centinaia o migliaia di marcatori enzimatici (figura 13).

Figura 13: principio di funzionamento del sistema Hybrid Capture®: Il DNA del campione viene denaturato ed è quindi ibridato in soluzione con delle sonde di RNA genomico che formano ibridi DNA:RNA. Gli ibridi sono catturati su una fase solida rivestita con anticorpi, e vengono quindi fatti reagire con un anticorpo coniugato con fosfatasi alcalina. L'enzima agisce su un substrato diossietanico, generando un'emissione luminosa rilevata tramite un luminometro.



Dopo un semplice passaggio in cui il campione è velocemente trasformato in una sospensione di acido nucleico, le sonde di RNA sono ibridate in soluzione con il bersaglio specifico. La reazione di ibridazione è quindi trasferita in una provetta rivestita con anticorpi (HC I) o in una micropiastra (HC II), in cui sono catturati gli ibridi DNA:RNA. L'anticorpo di cattura è un reagente policlonale universale che riconosce in modo specifico gli ibridi DNA:RNA, indipendentemente dalla loro sequenza. Questo anticorpo non reagisce con il DNA a singolo filamento, con l'RNA o con altre specie ibride (come DNA:DNA o RNA:RNA). Grazie a regioni di riconoscimento multiple, le molecole dell'anticorpo di cattura sono in grado di immobilizzare

rapidamente ed efficientemente gli ibridi DNA:RNA. Gli ibridi immobilizzati sono successivamente fatti reagire con un anticorpo secondario coniugato con fosfatasi alcalina, anch'esso specifico per gli ibridi DNA:RNA. A ciascun ibrido catturato si legano diversi anticorpi coniugati, determinando un aumento proporzionale del numero di marcatori enzimatici presenti nel complesso. Queste proprietà sono alla base della sensibilità del sistema Hybrid Capture. La rivelazione degli ibridi è eseguita in chemiluminescenza utilizzando substrati diossietanici. Le molecole coniugate di fosfatasi alcalina operano la degradazione di più molecole di substrato, e il segnale luminoso emesso ha caratteristiche di durata e stabilità che consentono l'ottenimento del risultato in tempi brevi. La reazione è quantificata tramite un luminometro, e le unità di luce relative (RLU) emesse nel tempo sono proporzionali alla quantità di acido nucleico bersaglio presente nel campione originale.

L'Amplificor Human Papilloma Virus (HPV) è un metodo qualitativo in PCR per la rivelazione dei 13 principali genotipi ad alto rischio del Papilloma Virus Umano (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68) in campioni cervicali per citologia liquida. Il test consiste in quattro fasi: preparazione dei campioni, amplificazione in PCR, ibridazione dei prodotti amplificati con sonde specifiche e rivelazione colorimetrica dell'amplificato in micropiastra.

Come controllo di adeguatezza del campione e di tutto il processo analitico viene contemporaneamente amplificata e rivelata la beta-globina umana (controllo cellulare). La Master Mix contiene coppie di primers per il DNA dei 13 genotipi di HPV ad alto rischio e per il DNA beta-globina. La rivelazione viene eseguita con sonde codificanti le specifiche. La prima fase prevede la preparazione dei campioni con lisi delle cellule cervicali, purificazione su colonna ed eluizione. La seconda fase prevede l'amplificazione genica in PCR: un cocktail di primers biotinilati specifici permette l'amplificazione selettiva del DNA target dei genotipi di HPV ad alto rischio e del gene umano della beta-globina (controllo). Successivamente l'amplificato viene trasferito in micropiastra per l'ibridizzazione con sonde specifiche per HPV ad alto rischio e per la beta-globina. L'amplificato legato alle sonde viene marcato con un coniugato (avidina-perossidasi)

e successivamente rivelato mediante reazione colorimetrica con tetrametil-benzidina (TMB). La metodica è validata per campioni cervicali da citologia liquida raccolti con i sistemi di prelievo PreservCyt® (Cytoc Co.) o SurePath® (TriPath Imaging Inc.). La sensibilità clinica del test Linear Array HPV Genotyping è pari al 96%, mentre la specificità clinica è del 99%.

Il ruolo e l'importanza dell'introduzione delle metodiche di identificazione dell'HPV nel triage della patologia preneoplastica cervicale sono oggi ritenuti ausili di prioritaria utilità.

Recenti evoluzioni, in termini di metodica, applicabilità e riproducibilità, hanno progressivamente spostato l'utilizzo di questa metodologia dall'iniziale ambito puramente speculativo e di ricerca ad una più ampia e diffusa pratica quotidiana sul piano clinico (32).

Molte delle iniziali diffidenze e dei giustificati scetticismi circa la reale dimensione dell'utilità di queste metodiche sono state ridimensionate da innumerevoli dati della recente letteratura.

Numerose sono le evidenze pubblicate negli ultimi anni che dimostrano come, in relazione ai vari utilizzi del test, i costi sociali di questa strategia, pur ovviamente incrementati se considerati singolarmente, in termini di valore aggiunto non risultano significativamente aumentati.

Uno degli studi più autorevoli, pubblicato recentemente dal Dipartimento di Politica Sanitaria dell'Università di Harvard (33), prendendo in considerazione due modalità di utilizzo del test per l'HPV – screening primario e triage della citologia borderline – in Gran Bretagna, Francia, Paesi Bassi e Italia, conclude che entrambe le scelte in tutti questi Paesi presentano vantaggi in termini di salute pubblica a fronte di costi accettabili, in confronto con le attuali strategie adottate nei singoli paesi. Questi dati, evidentemente non conclusivi, anche se altamente significativi, indicano che il problema dei costi non appare più, attualmente, motivo di prioritaria esclusione del HPV-DNA test dai programmi clinici.

Poiché oltre il 97% dei carcinomi cervicali riconosce la presenza di HPV ad alto rischio (HPV-HR), il rationale per l'introduzione dell'HPV-DNA test nello screening primario viene riconosciuto nell'alto Valore Predittivo Negativo (NPV) di questo test in associazione alla citologia

tradizionale (99.7-100%). Ad oggi sono stati pubblicati numerosi studi di screening primario in cui il test per L'HPV è stato utilizzato da solo o in associazione al pap-test, per un totale di circa 80.000 casi distribuiti in 11 paesi di 4 continenti. La sensibilità dell'associazione HPV test – pap-test è sempre risultata maggiore a quella di ciascun test considerato singolarmente e, come era attendibile, il NPV dell'associazione dei test è risultata nella maggior parte dei casi del 100% (34).

Questi risultati sono estremamente interessanti e indicativi della tendenza attuale. Ovviamente le realtà locali sono enormemente diversificate, i programmi di screening non sono tutti identici e di conseguenza questi dati non possono essere assimilati ovunque nello stesso modo; per questo motivo appare ancora prematuro codificare ufficialmente l'utilizzo dell'HPV test in uno screening primario; si aprono tuttavia interessanti scenari in prospettiva, l'elemento predominante dei quali è sicuramente la garanzia della negatività dello screening con l'associazione dei due test (32).

La gestione del pap-test ASC-US e ASC-H e delle L-SIL citologiche è stata recentemente oggetto di un notevole interesse a livello internazionale, e numerosi studi clinici hanno affrontato la questione nelle sue varie sfumature. La problematica emergente è stata sicuramente quella relativa a quale deve essere, in questi casi, la più opportuna delle scelte di triage diagnostico. Come sappiamo, tradizionalmente le opzioni in questi casi prevedono principalmente l'invio diretto alla colposcopia oppure, in alcune circostanze, la ripetizione dell'esame citologico. Ovviamente, a monte di tutto il problema, sta l'indicazione perentoria, ormai fatta propria da tutte le Società di Colposcopia, che la prevalenza di refertazione citologica ASC debba essere il più possibile contenuta entro percentuali ridotte, con il limite ottimale del 2%, circa, per un buon centro di citodiagnostica.

Il triage del pap-test dubbio è sicuramente uno degli argomenti in cui l'introduzione dell'HPVDNA test ha ottimizzato le scelte di gestione clinica.

Infatti il suo utilizzo in questi casi viene attualmente riconosciuto in molte Linee Guida internazionali. A questo proposito è d'obbligo fare riferimento ai risultati dello studio ALTS (ASCUS Low SIL Triage Study) (35).

A questo sono seguiti altri studi analoghi che ne hanno ricalcato il disegno, giungendo a

risultati sovrapponibili. L'unicità dello studio ALTS sta nel fatto di essere l'unico studio clinico controllato randomizzato, che ha reclutato 3488 pazienti, suddivise nei tre bracci di trattamento: colposcopia immediata, ripetizione della citologia in fase liquida e HPV-DNA test. Considerando globalmente i risultati degli 8 studi pubblicati ad oggi, si conclude che la sensibilità e specificità dell'HPV-DNA test vs. CIN2-3 (96.3% e 49%) sono superiori a sensibilità e specificità della ripetizione citologica su fase liquida (85.3% e 45%). I risultati longitudinali dello studio ALTS (36) dopo 2 anni di follow-up indicano la superiorità in termini di sensibilità dell'HPVDNA test anche nei confronti della colposcopia.

Sulla base di questi dati, negli Stati Uniti, l'American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, indica oggi l'HPV-DNA test come opzione ottimale per il triage del pap-test ASCUS.

Il razionale circa l'utilizzo dell'HPV-DNA test come test di cura nel follow-up dei casi sottoposti a trattamento escissionale di lesioni di alto grado (CIN 2-3) per determinare il rischio di persistenza o di recidiva della CIN, è riconducibile all'evidenza che in assenza di HPV-DNA identificabile esiste un rischio quasi nullo di presenza di CIN 3. Questa ipotesi è stata pressoché completamente confermata dai risultati di circa 10 studi pubblicati negli ultimi anni. Considerando infatti globalmente i risultati di questi studi, il 97% dei casi di CIN 2-3 identificati nel corso del follow up post trattamento risultavano HPV-positivi. La sensibilità e il NPV complessivi dell'HPV-DNA test sono risultati del 96.5% e del 98.8% rispettivamente, in tutti gli studi superiori a quelle della citologia in fase liquida. In quest'ottica appare giustificato affermare che l'associazione dell'HPV-DNA test alla citologia nel follow-up post trattamento delle lesioni di alto grado presenta un significativo vantaggio in termini di sensibilità e di esclusione della persistenza/recidiva della malattia (32). In un prossimo futuro risulterà interessante valutare il ruolo del test per HPV E6/E7 mRNA e p16, con alta sensibilità e specificità nell'individuare pazienti con attiva espressione oncogenica (37).

b. Endocervicoscopia

Il canale cervicale ha la forma di un cilindro irregolare la cui lunghezza varia tra i 22 ed i 30 mm, rivestito da un epitelio cilindrico monostratificato, mucosecernente.

La cervice uterina è sede di una doppia giunzione istologica:

- giunzione squamo-colonnare (GSC), situata tra l'epitelio squamoso multistratificato dell'esocervice e l'epitelio cilindrico monostratificato dell'endocervice.

- giunzione colonno-colonnare, situata tra l'epitelio cilindrico monostratificato dell'endocervice e quello dell'endometrio.

Per eseguire l'endocervicoscopia si utilizza: un isteroscopio diagnostico dotato di ottica con visione foro-obliqua a 30° e camicia operativa a flusso continuo, di profilo ovalare, con diametro massimo di 4 mm; una fonte luminosa; una telecamera con monitor televisivo ed un sistema di video registrazione e ripresa fotografica.

Come mezzo di distensione viene utilizzata la soluzione fisiologica (38) che, oltre ad ottenere una buona distensione, permette di ottimizzare la visione allontanando i muchi ed eventuale sangue, evento tutt'altro che infrequente e causa di notevole intralcio all'esame. I mezzi di distensione di tipo gassoso (CO₂), invece, sono oggi poco utilizzati, in quanto consentono una visione di buona efficacia, non modificando la colorazione e la vascolarizzazione, ma presentano il grosso inconveniente di produrre bolle di gas che disturbano notevolmente l'esame soprattutto quando il muco cervicale è molto abbondante.

Figura 14: isteroscopia diagnostico.

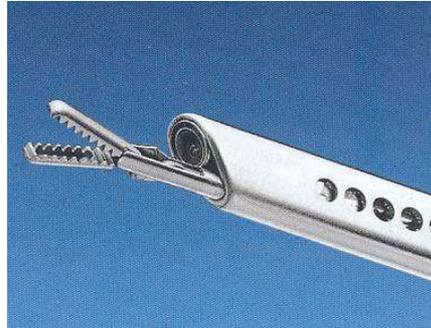
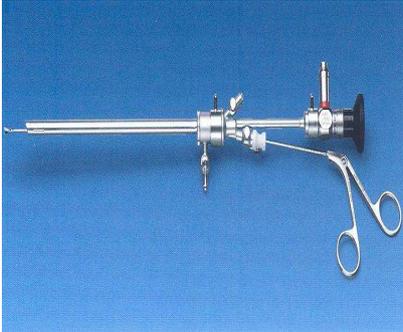


Figura 15: fonte luminosa; telecamera digitale con monitor televisivo ad alta risoluzione; sistema di videoregistrazione; pompa elettronica di aspirazione ed irrigazione (Endomat di Hamou); mezzo di distensione (soluzione fisiologica NaCl 0,9%); unità per elettrochirurgia (Versapoint).



L'endocervicoscopia dovrebbe essere eseguita con approccio vaginoscopico per creare minor disagio alla paziente (39).

Prima di iniziare la valutazione, il tessuto da esaminare va preparato con acido acetico al 5%. A tal proposito è possibile impiegare due diversi approcci per l'applicazione del colorante. Un approccio tradizionale, che comporta l'uso dello speculum e quindi l'acido acetico al 5% viene applicato sulla portio, utilizzando tamponi montati su pinze, e iniettato nell'endocervice, adoperando una siringa da insulina (1 ml) cui è stato tolto l'ago, imprimendo solo una leggera pressione sullo stantuffo dopo che la porzione terminale della siringa è stata inserita nell'orificio

uterino esterno (OUE).

Al termine di questa fase, viene rimosso lo speculum e la valutazione endoscopica avviene con approccio vaginoscopico.

In alternativa, al fine di migliorare la compliance delle pazienti, è possibile iniziare l'esame direttamente con l'approccio vaginoscopico applicando l'acido acetico mediante lo stesso isteroscopio. Più precisamente, una volta visualizzata la portio con l'isteroscopio, in approccio vaginoscopico, posizioniamo lo strumento all'OUE e interrompiamo l'erogazione di soluzione fisiologica, a questo punto, rimuoviamo il collegamento dell'acqua in entrata ed iniettiamo 2 ml di soluzione di acido acetico al 5% attraverso il canale dell'inflow.

In questo modo anche l'applicazione del colorante vitale avviene sotto diretta visione endoscopica. Basta far trascorrere uno o due minuti, il tempo di ricostituire il collegamento con il mezzo di distensione, e poi riprendere l'erogazione della soluzione fisiologica.

Al fine di garantire una corretta e quanto più fedele valutazione della cervice e, soprattutto, dell'endocervice è fondamentale adoperare pressioni di erogazione del mezzo di distensione comprese tra 30 e 50 mmHg. Pressioni più elevate comporterebbero alterazioni della morfologia, colorazione e vascolarizzazione tessutale.

Inoltre, essendo il canale cervicale una cavità di piccolo calibro, è necessario ridurre al minimo l'intensità della fonte luminosa per evitare l'inconveniente della riflessione che potrebbe impedire di riconoscere aree acetobianche.

L'esame inizia con la visualizzazione, in panoramica, della cervice e valutazione della zona di trasformazione con criteri di tipo colposcopico. Deve essere, quindi, visualizzata completamente la giunzione squamo colonnare (GSC), definita la sua sede ed il suo decorso. Devono essere valutate eventuali lesioni benigne come polipi e cisti di Naboth e aree di trasformazione normale, precisando la loro dislocazione nel canale cervicale. Deve essere valutato il trofismo, la vascolarizzazione e la morfologia della mucosa endocervicale, con particolare riferimento alle possibili variazioni in base all'epoca del ciclo e dell'età della paziente (40).

L'esame, infatti, presenta un certo grado di variabilità a seconda della fase pre o post ovulatoria del ciclo mestruale e, a seconda del periodo di vita della donna, ovvero, età fertile, peri o post menopausa. Nel caso si tratti di donna in età fertile è preferibile effettuare l'esame in fase preovulatoria, quando il muco cervicale è più scarso, poiché una sua eccessiva presenza disturberebbe l'esame. Le immagini sono abbastanza caratteristiche: si osservano le colonne mucose anteriori e posteriori, con il loro aspetto pseudopolipoide e le cripte ghiandolari disposte lateralmente. È tipico il disegno dell'Arbor Vitae che si prolunga in alto, verso l'orificio uterino interno (OUI). In fase post ovulatoria il muco è più abbondante, ma il canale si distende più facilmente e l'orificio uterino interno viene valicato con minore difficoltà. Nella premenopausa si verifica precocemente un'atrofia dell'Arbor Vitae fino alla scomparsa pressoché totale delle pliche mucose; le cripte ghiandolari appaiono assottigliate e fibrose. Il muco cervicale è scarso e lo spessore della mucosa è molto ridotto, per cui, a causa della maggiore trasparenza del tessuto fibroso sottostante, le superfici sono più riflettenti ed è più frequente un sanguinamento al passaggio dello strumento. È frequente, inoltre, in quest'epoca, una stenosi serrata dell'OUI che appare difficilmente valicabile. Va ricordato che l'età perimenopausale e postmenopausale è quella più importante per l'esame del canale cervicale visto che la risalita fisiologica della GSC rende, il più delle volte l'indagine colposcopica insoddisfacente.

Infine, naturalmente, devono essere descritte le aree di trasformazione atipica, precisando la loro topografia nel canale cervicale in relazione alla GSC e all'OUE. In accordo con l'International Federation of Cervical Pathology and Colposcopy le lesioni visualizzate vengono classificate sulla base dei caratteri delle diverse immagini e suddivise in lesioni di Grado 1 e Grado 2 (TAG1-TAG2), evocanti substrati istologici a diversa gravità (41).

Al fine di uniformare la terminologia descrittiva è conveniente suddividere idealmente il canale cervicale in tre porzioni: 1/3 inferiore; 1/3 medio ed 1/3 superiore.

Il terzo superiore presenta spesso un fisiologico restringimento e quindi può essere necessario, per superarlo, elevare la pressione di erogazione del mezzo di distensione, fino ad

arrivare ai 60-70 mmHg necessari per una corretta valutazione della cavità uterina. Infatti, l'endocervicoscopia viene sempre completata con un esame isteroscopico.

Questa tecnica impone lo studio del canale cervicale in entrata al fine di evitare che il traumatismo dovuto al passaggio dello strumento possa essere causa di un mancato riconoscimento della lesione.

Occorre sempre rammentare, ai fini di una corretta osservazione, che l'isteroscopia ha un'ottica angolata di circa 30° rispetto al piano operativo. Inoltre, la punta dell'endoscopio deve essere mantenuta ad una distanza di pochi millimetri dalla superficie del tessuto da esaminare ed avvicinandosi o allontanandosi da esso si può ottenere un maggiore o un minore ingrandimento. Il movimento di scorrimento longitudinale, in senso craniale, consente di osservare la cervice per tutta la sua lunghezza, mentre i movimenti rotatori dell'ottica permettono di osservare le pareti laterali, in modo da evidenziare eventuali lesioni.

Il tempo richiesto per l'esame varia a seconda dell'esperienza dell'operatore e delle condizioni anatomiche della cervice, ma è quasi sempre breve: la sua durata oscilla, in genere, tra i 2 ed i 7 minuti, cui va aggiunto il tempo necessario per effettuare l'isteroscopia.

Nel corso dell'esame è possibile praticare un prelievo bioptico mirato con pinze apposite molto sottili (5 Fr). In alternativa, quando ciò non è possibile, è consigliabile eseguire, almeno, una biopsia orientata utilizzando una sonda di Novak o una piccola curette.

La prevenzione primaria: vaccinazione

A partire dagli anni 90, vari gruppi di ricercatori si sono concentrati sullo sviluppo di un vaccino in grado di prevenire l'infezione da HPV e le patologie ad essa correlate. Questo perché, purtroppo, anche nei Paesi Occidentali molte donne non hanno la possibilità di accedere ai programmi di screening per problemi di ordine socio-culturale o geografico: nel nostro Paese, ad esempio, a fronte di Regioni come l'Emilia Romagna e la Toscana, dove lo screening organizzato è

attivo pressoché al 100%, ve ne sono altre come la Liguria o la Puglia in cui di fatto tale programma non è ancora partito.

La sfida era quella di poter affiancare un valido strumento di prevenzione primaria alle strategie di prevenzione secondaria già esistenti, in modo da poter ulteriormente ridurre il peso socio-sanitario derivante dalle patologie HPV correlate.

Il concreto sviluppo dei vaccini anti-HPV e la conferma sperimentale della loro efficacia hanno aperto un nuovo capitolo nella prevenzione del cervico-carcinoma, offrendo opportunità e speranze fin ora sconosciute sia per gli operatori sanitari che per le donne (42).

Sono stati messi a punto, ed attualmente sono presenti in commercio in Italia, due vaccini profilattici verso l'HPV: un vaccino bivalente (Cervarix) contenente L1-VLPs verso HPV 16 e 18, adiuvato con AS04 (idrossido di alluminio e monofosforil-lipide A) ed un vaccino tetravalente (Gardasil) contenente L1-VLPs verso gli HPV16,18, 6 e 11, adiuvato con alluminio idrossifosfato solfato (tabella 6).

Tabella 6: composizione dei due vaccini.

| | VLPs | Adiuvante |
|-----------------|---|---|
| Gardasil | 40 mcg HPV 16 20 mcg HPV 18 20 mcg HPV 6 40 mcg HPV 11 | Il solfato idrossifosfato di alluminio amorfo |
| Cervarix | 20 mcg HPV 16 20 mcg HPV 18 | L'idrossido di alluminio 50 mcg combinato con 20 mcg di 3-deacilato monofosforil lipide A, costituiscono un composto che rappresenta un nuovo adiuvante, denominato AS04 (Adjuvant System 04) |

Entrambi i vaccini, quindi, sono costituiti da Virus-Like Particles (VLPs), ovvero particelle simil-virali costruite in laboratorio in cui le proteine capsidiche L1 si auto assemblano a formare un "guscio" vuoto che mima perfettamente il virione dal punto di vista strutturale e morfologico.

Da un lato, le VLPs sono sicure in quanto non oncogeniche né infettanti, essendo prive del genoma virale, dall'altro, l'iperespressione della proteina L1 conferisce loro un'elevata immunogenicità (43).

Entrambi i vaccini, inoltre, sulla base di importanti evidenze scientifiche ed epidemiologiche, hanno mostrato la capacità di indurre cross-protezione contro alcuni genotipi di HPV. La cross-protezione può essere definita come una protezione addizionale offerta dai vaccini su tipi virali *non target* della vaccinazione. Essendo filogeneticamente correlati, i genotipi di HPV, appartenenti alle specie alpha (44) ad alto rischio oncogeno, condividono gli epitopi del capsido, i quali possono pertanto elicitare una risposta immune cross-reattiva. La popolazione anticorpale indotta dal vaccino in realtà è specifica e lega ad alta affinità gli antigeni contro cui è indotta, ma anticorpi cross-neutralizzanti sono presenti come sottopopolazioni e sono alla base della cross-protezione. Entrambi i vaccini dimostrano cross-protezione contro HPV 31, 33, 52, 58; solo Cervarix è in grado di dare cross-protezione contro HPV 45.

La cross-reattività sierologica è stata dimostrata in studi epidemiologici per donne naturalmente infettate dal virus HPV con e senza lesioni. La cross-protezione a 5 anni dalla vaccinazione mostra un'efficacia contro CIN 2 del 68% circa.

La risposta immunitaria indotta dal vaccino è molto differente da quella naturale. I vaccini inducono la produzione di anticorpi neutralizzanti genotipo specifici. Questi passano, tramite i meccanismi di trasudazione o di essudazione, dal siero al muco cervicale dove impediscono nuove infezioni da HPV o lo stabilizzarsi in altri siti di una infezione corrente, riducendo la carica virale, dopo il rilascio di nuove particelle virali. Anche la memoria immunitaria è importante per assicurare una risposta efficace e duratura.

I due vaccini inducono una sieroconversione del 100% ad un mese dalla somministrazione delle 3 dosi vaccinali. Il picco di risposta anticorpale alla vaccinazione è decisamente più alto (100-200 volte maggiore) rispetto a quello indotto dall'infezione naturale.

È importante segnalare che i livelli anticorpali sono inversamente proporzionali all'età dei

soggetti vaccinati: nelle bambine e nelle pre-adolescenti la risposta immunitaria è più vivace di quella osservata ad esempio nelle donne tra i 26 ed i 55 anni (45).

Va inoltre sottolineato che, al momento, non è noto il livello anticorpale protettivo minimo: per determinarlo sarà indispensabile il follow-up a lungo termine dei soggetti vaccinati (45).

Entrambi i vaccini devono essere somministrati per via intra-muscolare in 3 dosi distinte nell'arco di 6 mesi: per il vaccino bivalente la schedula vaccinale prevede una prima dose al tempo 0, la seconda dose a 1 mese e la terza a 6 mesi; mentre per il vaccino tetravalente le 3 somministrazioni sono previste a 0, 2 e 6 mesi.

Va ribadito che entrambi i vaccini in commercio sono di tipo profilattico e pertanto non trovano alcuna applicazione nel trattamento delle lesioni HPV-correlate.

Per entrambi i vaccini i profili di efficacia e di sicurezza sono stati valutati nel corso di trials clinici di fase II e III randomizzati placebo-controllo, condotti in doppio cieco.

I risultati preliminari, desunti dalle analisi dei dati raccolti negli studi di fase III di entrambi i vaccini, sono più che incoraggianti: entrambi i vaccini si sono dimostrati altamente efficaci nel prevenire le infezioni persistenti e le lesioni CIN2 causate dagli HPV contenuti nel cocktail vaccinale e, al contempo, si sono dimostrati sicuri e ben tollerati.

La designazione dell'efficacia nei confronti di lesioni CIN2 come end-point primario è stata fatta in primo luogo alla luce di considerazioni etiche e, secondariamente, prendendo in considerazione la storia naturale dell'infezione (46).

L'efficacia dei vaccini, sia tetravalente che bivalente, è risultata massima (>90%) nelle donne "naive" al momento della vaccinazione, cioè in quelle donne che non erano mai state infettate dagli HPV contenuti nel cocktail vaccinale. Nelle donne "non-naive" al momento della vaccinazione, l'efficacia è risultata comunque elevata, sebbene inferiore rispetto al gruppo "naive", poiché il vaccino era protettivo nei confronti degli HPV contenuti nel cocktail vaccinale e da cui la donna non era infettata: infatti è estremamente raro che un soggetto sia infettato sia dall'HPV 16 che dal 18 (42,45). Pertanto non vi sono indicazioni per eseguire l'HPV-DNA test prima di

sottoporre la ragazza o la donna a vaccinazione (42).

Nella definizione della popolazione target a cui somministrare il vaccino profilattico, i fattori da prendere in esame sono: età di maggior efficacia del vaccino, durata della protezione conferita e possibilità di realizzare un buon piano di distribuzione. Non va poi dimenticato che l'infezione da HPV generalmente viene acquisita poco dopo l'inizio dell'attività sessuale e che, in linea teorica, il vaccino dovrebbe essere somministrato prima di tale momento, cioè prima dell'esposizione al virus (46).

Le attuali licenze commerciali in vigore nel nostro Paese, così come negli USA e in altri Paesi Europei, prevedono la somministrazione del vaccino in ragazze e giovani donne di età compresa tra i 9 ed i 26 anni, per il vaccino tetravalente, e, tra i 10 e 25 anni per il bivalente.

In base alla storia naturale e all'epidemiologia dell'infezione e ai dati di efficacia e sicurezza del vaccino sia la WHO che il Consiglio Superiore di Sanità (CSS), hanno individuato come target primario di popolazione le ragazze di età compresa tra i 9 e i 13 anni di età, mentre le ragazze e le giovani donne tra i 14 ed i 26 anni rappresentano il target secondario. La scelta delle pre-adolescenti come target primario è stata presa alla luce del fatto che in questa fascia di età il rischio di esposizione al virus è estremamente basso e che la risposta immunitaria al vaccino risulta particolarmente vivace, come confermato dai dati degli studi di fase III (45).

In Italia il Ministero della Salute, in linea con quanto deliberato dal CSS e in accordo con la conferenze Stato-Regioni, ha posto in essere che a partire dal 2008 la vaccinazione verso l'HPV venga offerta gratuitamente ed attivamente alle ragazze nel 12° anno di vita. L'estensione della vaccinazione ad altre fasce di età (14-18 anni, 25-26 anni) verrà valutata in base alla disponibilità delle risorse finanziarie e all'impatto della vaccinazione nelle pre-adolescenti.

Secondo le attuali raccomandazioni la vaccinazione è rivolta solo a soggetti di sesso femminile, non vi sono infatti dati a supporto di una reale efficacia in termini di costo-efficacia nell'estendere la vaccinazione alla popolazione maschile (45,46). Potenzialmente la vaccinazione di soggetti di sesso maschile potrebbe determinare sia effetti diretti (riduzione nell'incidenza di

condilomi e neoplasie del pene e dell'ano) che indiretti (riduzione della trasmissione dell'HPV alla popolazione femminile). Tuttavia dati preliminari, emersi da studi condotti in Finlandia coinvolgendo anche i maschi, mostrano che, laddove la copertura vaccinale della popolazione femminile è elevata, il beneficio che si ottiene vaccinando i maschi è marginale a fronte di un incremento della spesa sanitaria (46).

Per quanto riguarda le donne in gravidanza, al momento non è nota la sicurezza del vaccino e pertanto ne è sconsigliata la somministrazione (45). Il vaccino può essere somministrato durante l'allattamento e la contraccezione ormonale.

Non vi sono dati pubblicati sull'efficacia e sicurezza della vaccinazione in soggetti HIV-positivi, sebbene siano in corso studi clinici proprio in questo target di popolazione; in ogni caso, al momento la somministrazione nelle persone sieropositive non è raccomandata (45).

Come chiaramente indicato nella guida pubblicata dalla WHO e come ribadito dal Ministero della Salute, la campagna vaccinale verso l'HPV deve essere considerata come un aspetto di un più ampio progetto di prevenzione del cervico-carcinoma, che comprende anche i programmi di prevenzione secondaria: pensare ad una strategia vaccinale completamente slegata dalle campagne di screening esistenti è assolutamente errato, al contrario sarà auspicabile promuovere e rafforzare l'integrazione tra queste due realtà (46, 47).

Si suppone che i vaccini in commercio saranno in grado di prevenire circa il 70% dei casi di cervico-carcinoma (cioè quelli ascrivibili agli HPV 16 e 18), mentre non saranno protettivi verso il rimanente 30% dei casi, causato da HPV ad alto rischio non contenuti nel cocktail vaccinale.

Pertanto sarà essenziale fare adeguate campagne informative allo scopo di esortare le donne vaccinate ad aderire comunque alle campagne di screening, secondo le linee guida locali. Da parte degli operatori sanitari, ed in particolare da parte dei ginecologi, non deve partire il messaggio che la vaccinazione andrà a sostituire lo screening e che quest'ultimo, nel futuro, non sarà di alcuna utilità nella prevenzione del cervico-carcinoma.

Al contrario, vaccinazione e screening devono essere presentati come due realtà

complementari, entrambe con la finalità di prevenire il cervico-carcinoma (45, 46).

Se le donne vaccinate non aderiranno alla campagna di screening, ritenendo erroneamente di essere totalmente protette dal rischio di neoplasia cervicale, i casi di cervico-carcinoma paradossalmente potrebbero registrare un incremento anziché una riduzione.

Affinchè la prevenzione della patologia cervico-vaginale sia realmente efficace in tutti i suoi strumenti (screening, vaccinazione) è fondamentale l'integrazione del lavoro svolto dai vari operatori sanitari che vi prendono parte (servizi vaccinali, consultori, medici di medicina generale, pediatri di libera scelta). In tal senso sarà fondamentale fornire alle varie categorie professionali occasioni di formazione allo scopo di migliorare le conoscenze scientifiche e le capacità operative (46).

Al momento, in base a modelli matematici che tengono conto dell'efficacia del vaccino, la strategia che sembra maggiormente cost-effective prevede la vaccinazione alle pre-adolescenti nel 12° anno di vita con prima chiamata allo screening al 25° anno e successivi controlli triennali.

Genotipi virali e management delle lesioni di basso grado

SCOPO DELLA RICERCA

Attualmente, è presente un ampio dibattito riguardo la gestione delle pazienti con lesioni preneoplastiche della cervice uterina; infatti, le molteplici evidenze scientifiche, pubblicate negli ultimi anni, riguardo il rischio di progressione/regressione di tali lesioni, ed il contributo delle nuove tecniche diagnostiche attualmente disponibili, hanno condizionato gli orientamenti diagnostici e terapeutici delle società scientifiche di colposcopia nazionali ed internazionali.

Alla luce di queste considerazioni, lo scopo dello studio è stato quello di valutare se l'identificazione dei genotipi virali, eseguita in corrispondenza dell'esame colposcopico positivo, possa modificare il management terapeutico di pazienti affette da lesioni di basso grado (CIN 1). Inoltre si è voluto analizzare la rilevanza della presenza di co-infezione riguardo la storia clinica di queste lesioni, e della loro gestione.

MATERIALI E METODI

Nel periodo compreso da gennaio 2007 a marzo 2008, presso l'Ambulatorio di Colposcopia e Patologia Cervico-vaginale dell'Università di Napoli Federico II, sono state arruolate 264 pazienti con manifestazioni cliniche HPV correlate.

I criteri d'inclusione sono stati i seguenti:

- Presenza di condilomatosi genitale;
- Positività all'esame citologico e/o colposcopico per lesioni HPV-correlate.
- Presenza di lesioni preneoplastiche della cervice uterina diagnosticate all'esame istologico.

Non sono state arruolate, in questo studio, pazienti negative all'esame colposcopico, pur in presenza di citologia positiva; donne gravide, immunodepresse o con infezione da virus dell'immunodeficienza umana (HIV-positive).

L'età delle pazienti era compresa tra i 16 ed i 69 anni, con una media di $34 \pm 8,3$ anni ed una mediana di 33 anni.

Tutte le pazienti arruolate erano sessualmente attive ed hanno espresso un consenso informato per l'adesione allo studio; inoltre, come previsto dalle linee guida della Società Italiana di Colposcopia e Patologia Cervico Vaginale, è stato richiesto il consenso per sottoporsi a procedure diagnostiche ambulatoriali.

Tutte le pazienti sono state sottoposte a colposcopia ed a prelievo cervicale con esecuzione di genotipizzazione virale.

Le cellule cervicali sono state raccolte in soluzione PreservCyt[®] (fiala pre-rempita ThinPrep[®]) della Cytec Corporation (Marlborough, Massachusetts) con apposita spatola in plastica. I campioni sono stati preservati a temperatura di 2-8°C per un massimo di 12 settimane e poi processati.

Il test impiegato è stato il "Linear Array HPV genotyping Test" (Roche Diagnostics, USA), esso si basa sull'amplificazione del DNA bersaglio mediante reazione PCR e sull'ibridazione dell'acido nucleico e consente di determinare 37 genotipi di DNA dell'HPV (6, 11, 26, 31, 33,35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, IS39, CP108) nelle cellule cervicali.

Il test consta di quattro fasi.

La preparazione dei campioni (fase 1) ha previsto l'impiego del prodotto AmpliLute Liquid Media Extraction Kit; esso ha consentito di ottenere DNA bersaglio dell'HPV e DNA genomici umani idonei all'amplificazione con PCR.

Il Master Mix e l'AmpliTaq[®] Gold DNA Polymerase, sono stati impiegati, invece, rispettivamente, per la selezione e l'amplificazione del bersaglio (fase 2). Il Master Mix è formulato specificatamente per amplificare in modo selettivo, i 37 genotipi di HPV identificabili dal test, esso contiene un pool di primer biotinilati per definire una sequenza di nucleotidi nell'ambito della regione L1 polimorfica del genoma dell'HPV.

Per quanto riguarda la rivelazione e la determinazione del genotipo (fase 3 e 4) si sono impiegate sonde oligonucleotidiche che consentono l'identificazione indipendente dei singoli genotipi dell'HPV previsti nel kit.

Le pazienti con lesione cervicale evidente di basso (ZTAG1) o di alto grado (ZTAG2) sono state sottoposte a biopsia mirata.

Le pazienti che presentavano lesioni preneoplastiche di basso grado (CIN 1) hanno eseguito follow-up colposcopico e citologico per 1 anno ad intervalli semestrali. Allo scadere di questo termine, le pazienti con persistente lesione colposcopica sono state sottoposte ad ulteriore esame biotico mirato; quelle che presentavano persistenza della lesione istologica sono state trattate con terapia distruttiva presso il nostro ambulatorio di laserchirurgia, e seguite con follow-up citologico e colposcopico, trimestrale e poi semestrale, per 1 anno.

Le pazienti che presentavano una zona di trasformazione anormale (ZTA), ma biopsia negativa, sono state sottoposte comunque a follow-up colposcopico e citologico semestrale per un anno, e in caso di persistenza dell'alterazione evidenziata colposcopicamente a ripetizione della biopsia mirata al controllo annuale.

Le pazienti che presentavano condilomatosi florida sono state sottoposte a trattamento tramite laserchirurgia e successivo follow-up per 1 anno, con tempi e modalità analoghe a quelle descritte.

In caso di diagnosi istologica di lesioni di grado moderato o severo (CIN 2 e CIN 3) le pazienti sono state sottoposte direttamente a trattamento escissionale con ansa diatermica (*Loop*

Electrosurgical Excision Procedure – LEEP) o conizzazione chirurgica a lama fredda, in relazione al quadro colposcopico e clinico, come previsto dalle linee guida nazionali ed internazionali.

Tutte le colposcopie, i pap-test, le biopsie e i trattamenti (laservaporizzazioni, LEEP e conizzazioni) sono stati eseguiti dalla nostra equipe.

Analisi statistica

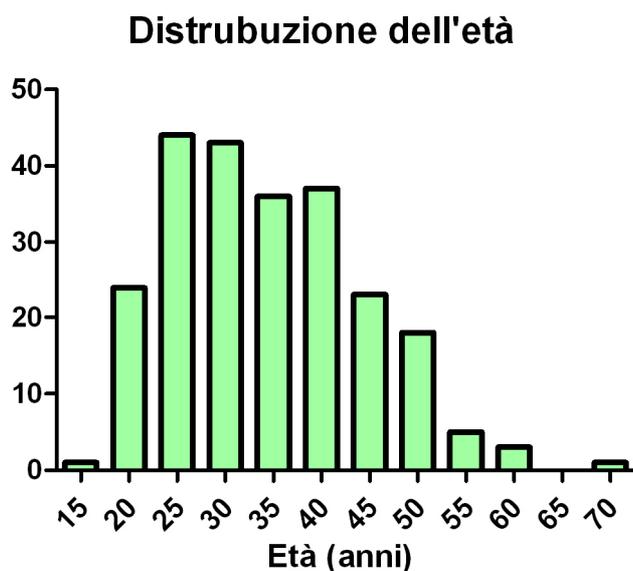
L'analisi statistica dei dati è stata elaborata con il software SPSS 15.0 (SPSS Inc.; Chicago, IL, USA).

Per valutare la distribuzione dei dati (età) è stato utilizzato il test di Shapiro Wilks. L'analisi dei dati è stata fatta utilizzando il χ^2 test e, quando appropriato, il test esatto di Fisher è stato impiegato per calcolare la significatività (valore di p) della differenza tra i gruppi in studio. Tabelle di contingenza sono state realizzate per valutare la correlazione tra infezione singola, multipla o genotipo virale e progressione o regressione di lesione, nel gruppo di pazienti con diagnosi istologica di CIN 1. Valori con $p < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

RISULTATI

Le 264 pazienti selezionate hanno presentato un'età compresa tra i 16 ed i 69 anni (mediana: 33 anni). L'età delle pazienti non ha presentato una distribuzione normale; le fasce di età più rappresentate nel nostro campione sono state quelle comprese tra i 25 ed i 35 anni e tra i 35 ed i 40 anni (fig. 16).

Figura 16. Distribuzione per frequenza dell'età delle 264 pazienti in studio.



La genotipizzazione virale, ha dato risultato positivo per infezione da singolo genotipo HPV per 100 pazienti (37.9%), 79 pazienti (29.9%) sono, invece, risultate positive ad infezione multipla e 78 pazienti (29.5%) sono risultate negative al test per i genotipi virali presenti nel kit utilizzato (6, 11, 26, 31, 33,35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, IS39, CP108) (tab.7). Sette campioni analizzati, sul totale dei campioni raccolti (2.6%), sono risultati inadeguati; queste pazienti sono state escluse dal gruppo in studio.

All'esame istologico, eseguito dopo biopsia mirata, 116 pazienti (43.9%) hanno presentato una lesione precancerosa di basso grado (CIN 1); 19 (7.2%) una lesione di grado moderato (CIN 2) e 49 una lesione di grado severo (CIN 3); Infine, 35 (13.3%) pazienti hanno avuto una diagnosi istologica negativa e 38 pazienti (14.4%) hanno avuto diagnosi colposcopica di lesione condilomatosa e non sono state sottoposte a biopsia (tab. 7).

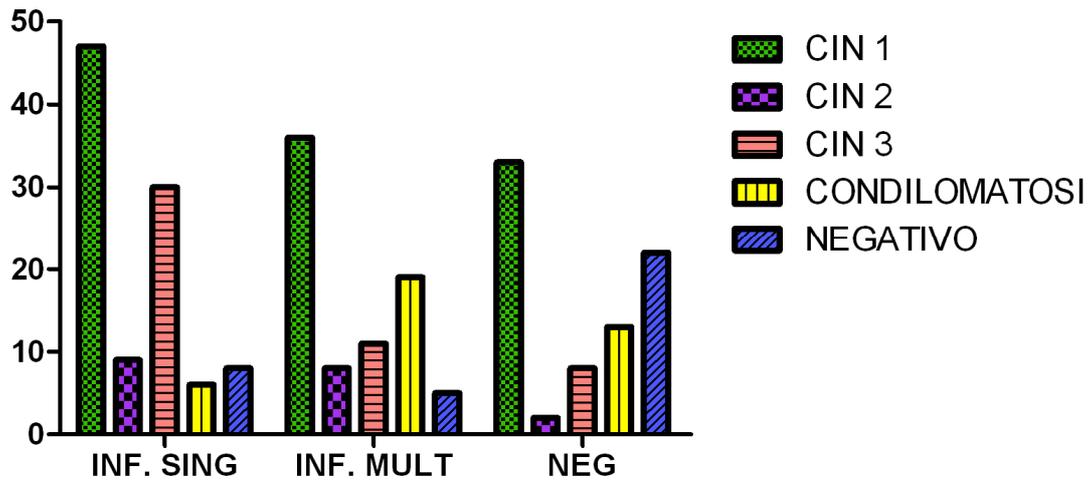
Tabella 7. Prevalenza (%) dei referti istologici e dei risultati alla genotipizzazione virale del gruppo di pazienti in studio.

| | CIN 1 | CIN 2 | CIN 3 | CONDILOMATOSI | BIOPSIE NEGATIVE |
|-----------------------|--------------------|------------------|-------------------|-------------------|---------------------|
| INFEZIONI SINGOLE | 47 (40.5%) | 9 (47.4%) | 30 (61.2%) | 6 (15.8%) | 8 (22.8%) |
| INFEZIONI MULTIPLE | 36 (31.0%) | 8 (42.1%) | 11 (22.4%) | 19 (50%) | 5 (14.3%) |
| NEGATIVI | 33 (28.4%) | 2 (10.5%) | 8 (16.3%) | 13 (34.2%) | 22 (62%) |
| Totale | 116 (43.9%) | 19 (7.2%) | 49 (18.6%) | 38 (14.4%) | 35 (13.3%) |

La presenza di infezione singola o multipla non è indipendente dal grado e dal tipo di lesione. Le lesioni preneoplastiche di grado basso, moderato e severo, infatti, sono risultate più frequentemente associate ad infezioni singole, rispetto alle lesioni condilomatose che, al contrario, sono risultate più frequentemente associate ad infezione da parte di multipli genotipi ($p < 0.005$) (fig.17). Delle pazienti con diagnosi istologica di lesione CIN 1, infatti, 47 (40.5%) erano positive per infezione singola, mentre 36 (31%) sono risultate positive per infezione multipla; con simile prevalenza, delle pazienti con diagnosi istologica di lesione CIN 2 e CIN 3, rispettivamente, 9 (47.4%) e 30 (61.2%) sono risultate positive per infezione singola mentre 8 (42.1%) e 11 (22.4%) sono risultate positive per infezione multipla. La maggior parte delle pazienti che ha presentato condilomatosi genitale (14.4%), invece, è risultata positiva ad infezione multipla, arrivando a costituire il 50% del totale dei casi (tab.7).

Nel gruppo di pazienti con diagnosi di condilomatosi genitale, inoltre, il numero di negativi è stato elevato (34.2%) rispetto al numero di campioni negativi dimostrato per lesioni CIN, ciò è verosimilmente da attribuire al fatto che non tutte le pazienti presentavano condilomi anche a livello della cervice uterina.

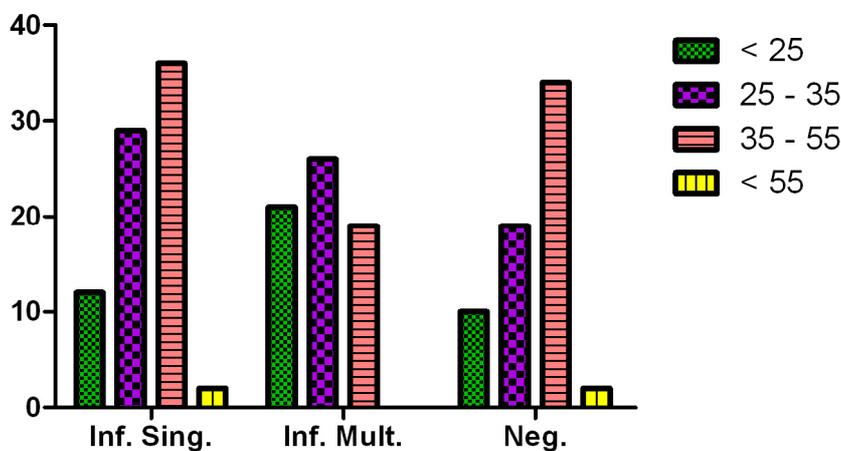
Figura 17. Relazione tra infezione singola, multipla o tipizzazione virale negativa e tipo e grado di lesione nel gruppo di pazienti in studio.



Tra le pazienti in cui era presente una zona di trasformazione anormale (ZTA) e la cui biopsia è risultata negativa (13.3%), il 62% è risultato negativo alla tipizzazione virale, confermando dunque il referto istologico della biopsia. Delle pazienti invece positive alla genotipizzazione il 22.9% ha presentato infezione singola ed il 14.3% infezione multipla, anche in questo gruppo di pazienti, quindi, le infezioni singole si sono dimostrate più frequenti delle infezioni multiple.

La fascia d'età più rappresentativa tra le pazienti affette da infezione singola, è quella caratterizzata da donne comprese tra i 35 ed i 55 anni.

Figura 18. Distribuzione dell'età delle 257 pazienti nell'ambito delle infezioni singole o multiple da HPV ($p < 0.05$).

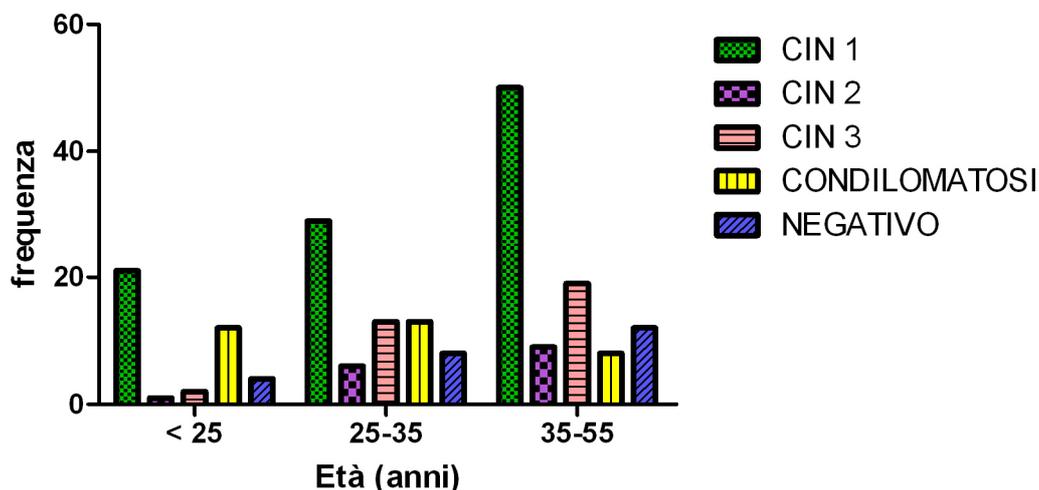


Per quanto riguarda le pazienti affette da infezioni multiple, invece, le fasce d'età più colpite

sono state quelle di pazienti più giovani, la differenza è risultata statisticamente significativa ($p < 0.05$) (fig.18).

È dimostrata, inoltre, una differenza statisticamente significativa per tipo e grado di lesione nelle diverse fasce di età. Infatti, mentre la frequenza delle lesioni condilomatose non differisce per età, sia le lesioni di basso grado (CIN1) sia le lesioni di grado moderato/severo (CIN2-3), nel nostro gruppo di pazienti, risultano più frequenti nella fascia di età compresa tra i 35 ed i 55 anni ($p < 0.05$) (fig. 19).

Figura 19. Distribuzione dell'età in relazione al tipo ed al grado di lesione nel gruppo di pazienti in studio.



Non sono state dimostrate differenze significative nell'età delle pazienti in relazione alla presenza dei genotipi 16 o 18 o da altri genotipi sia nell'abito delle infezioni singole sia nelle infezioni multiple (fig. 20, 21).

Figura 20. Distribuzione dell'età in relazione alla presenza di infezioni singole da genotipi 16 o 18 o da infezioni singole da altri genotipi.

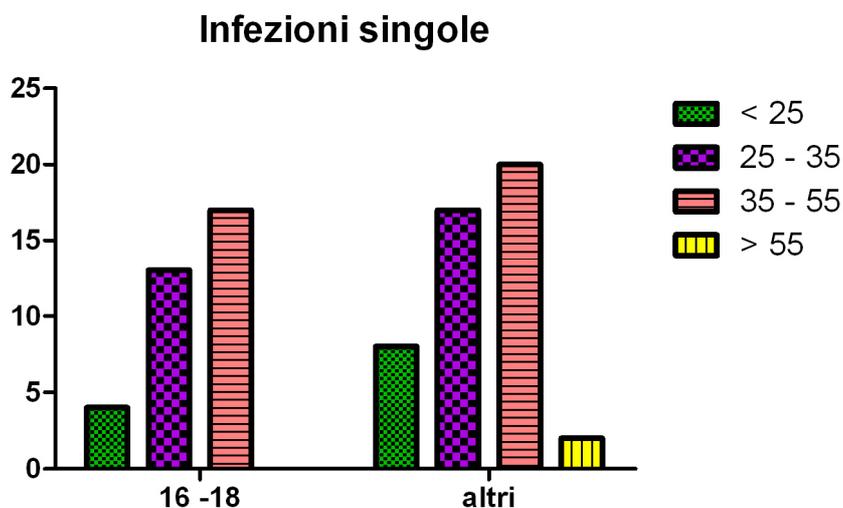
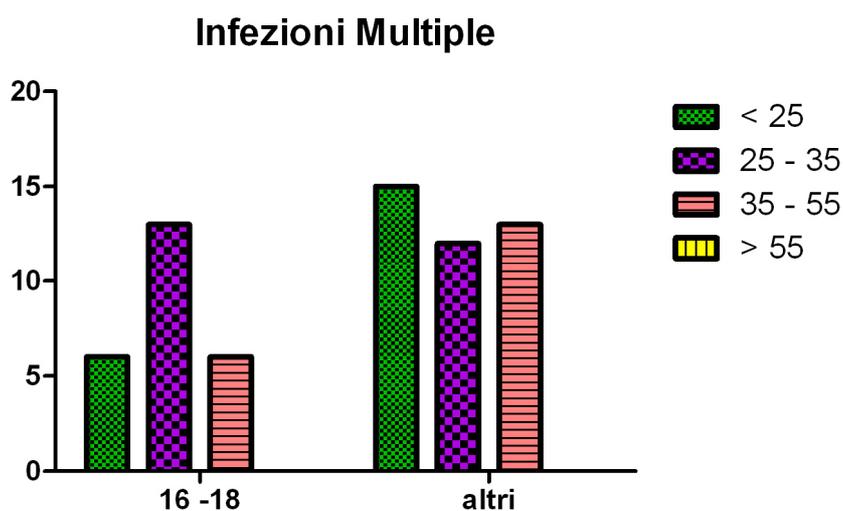


Figura 21. Distribuzione dell'età in relazione alla presenza di infezioni multiple da genotipi 16 o 18 o da infezioni multiple da altri genotipi.

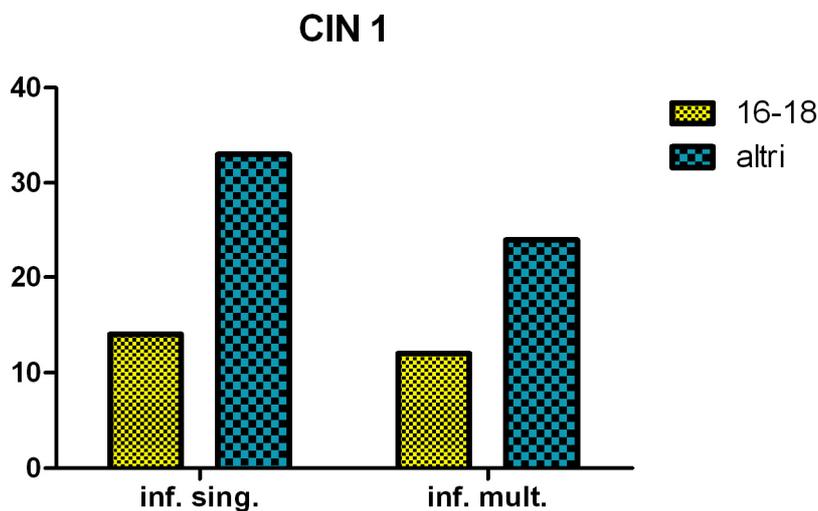


Allo stesso modo lo specifico genotipo virale non incide sulla presenza di infezione multipla o singola. Infatti, nell'ambito delle lesioni condilomatose o di lesioni di grado basso o moderato (CIN 1/ CIN 2) la presenza di un genotipo virale differente dal 16 e dal 18 ha mostrato una prevalenza maggiore della presenza di infezione da parte di questi genotipi, sia nelle infezioni multiple che nelle infezioni singole.

Infatti, delle 47 pazienti affette da lesioni CIN 1 e risultate positive per infezione singola, il 30% ha presentato i genotipi 16 o 18 ed il 70% ha dimostrato infezione per altri genotipi diversi

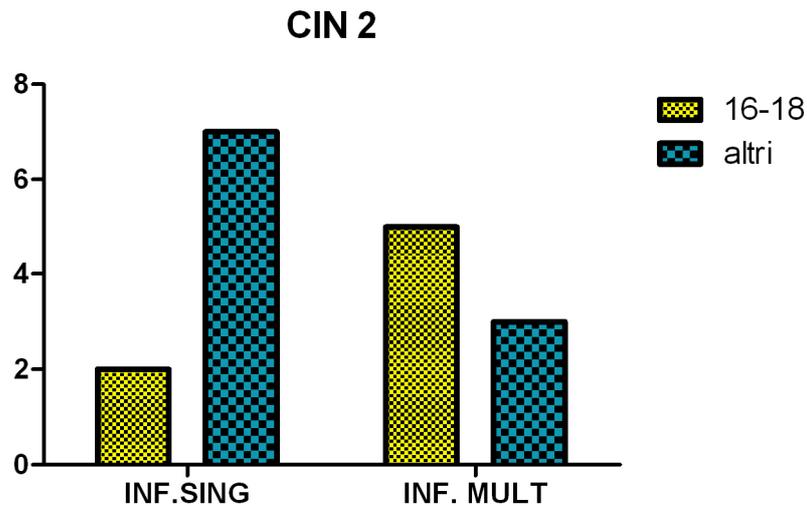
dal 16 e 18; delle 36 pazienti con infezione multipla, il 33% ha dimostrato presenza di più genotipi virali associati al 16 o 18, mentre il 66% ha evidenziato infezione multipla da genotipi diversi dal 16 o dal 18 (Fig. 22, Tab.8).

Figura 22. Relazione tra infezione singola e multipla e presenza di genotipo 16 o 18 o altri genotipi, nel gruppo di pazienti con lesione preneoplastica di basso grado (CIN 1).



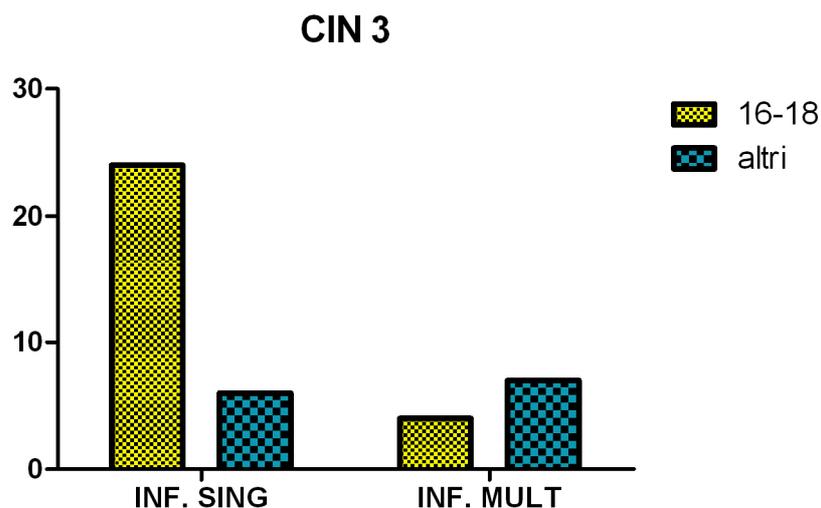
Con prevalenze simili, nelle pazienti con lesioni di grado moderato (CIN 2) la classe più numerosa è rappresentata dalle pazienti con un singolo genotipo virale diverso dal 16 e dal 18 (36.8%), ed il gruppo di pazienti con singola infezione e genotipo virale 16 o 18 rappresenta solo il 10.5%. Così come, delle pazienti con CIN 2 e infezione multipla nel 26.3% dei campioni sono stati identificati i ceppi 16 o 18, mentre nel 15.7% questi non erano presenti (fig.23, tab. 8).

Figura 23. Relazione tra infezione singola e multipla e presenza di genotipo 16 o 18 o altri genotipi, nel gruppo di pazienti con lesione preneoplastica di grado moderato (CIN 2).



Solo nelle lesioni di grado severo, (CIN 3) il singolo genotipo virale è stato riscontrato con proporzioni opposte nelle infezioni singole rispetto alle infezioni multiple. Le infezioni singole, infatti, sono risultate più frequentemente infezioni da HPV 16 o 18 (49% vs 12.3%), mentre le infezioni multiple sono risultate più frequentemente infezioni da altri genotipi (8.2% vs 14.3%) ($p < 0.05$) (fig.24).

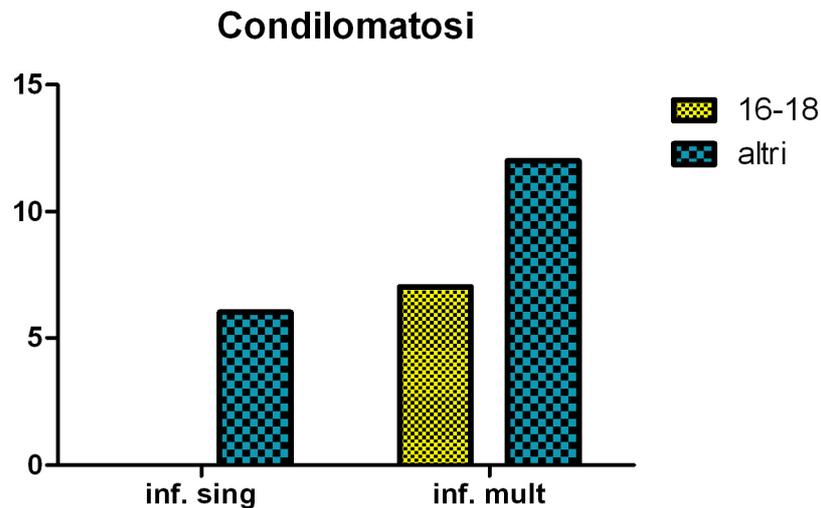
Figura 24. Relazione tra infezione singola e multipla e presenza di genotipo 16 o 18 o altri genotipi, nel gruppo di pazienti con lesione preneoplastica di grado severo (CIN 3).



Delle pazienti affette da condilomatosi genitali ed infezione multipla, il 31.6%, apparteneva al gruppo di pazienti in cui non erano presenti i genotipi 16 e 18, mentre nel 18.4% dei casi sono

stati ritrovati tali genotipi virali (fig. 25). Inoltre, le infezioni singole in pazienti con condilomatosi hanno costituito il 15.8% dei casi, e nessuna di questa ha presentato positività per i genotipi 16 o 18 (Tab. 8).

Figura 25. Relazione tra infezione singola e multipla e presenza di genotipo 16 o 18 o altri genotipi, nel gruppo di pazienti con lesioni condilomatose.



Tra le pazienti in cui era presente una zona di trasformazione anormale (ZTA) e la cui biopsia è risultata negativa, nel gruppo di pazienti con infezione singola, solo una paziente ha presentato i genotipi 16 o 18, mentre nel 20% dei casi è stato dimostrato un genotipo differente. Tra le pazienti affette da infezione multipla, solo 2 sono risultate positive per i genotipi 16 o 18 e 3 pazienti hanno presentato genotipi differenti (Tab.8).

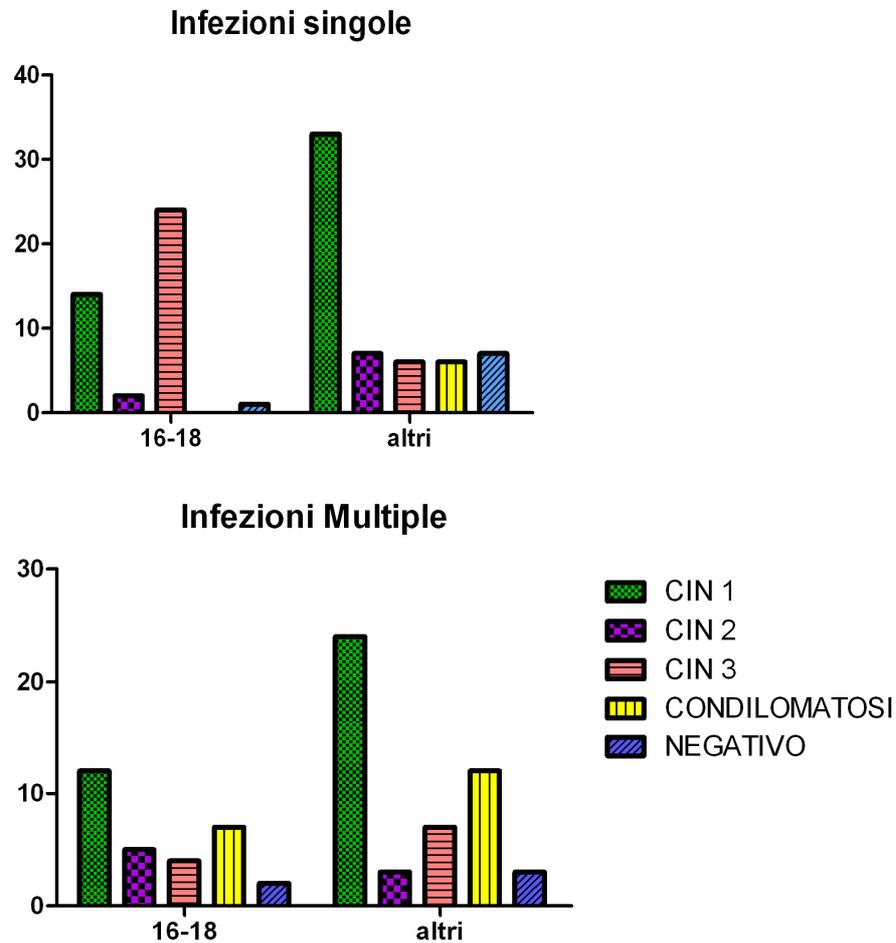
Tabella 8. Prevalenza (%) dei referti istologici e degli esiti della genotipizzazione, classificati per genotipo (presenza di 16/18 o altri genotipi) e per numero (infezione da singolo genotipo o multipla) nel gruppo in studio.

| | CIN 1 | CIN 2 | CIN 3 | CONDILOMATOSI | BIOPSIE NEGATIVE |
|-------------------------------------|------------|-----------|-----------|---------------|------------------|
| HPV 16 o 18 | 14 (12%) | 2 (10.5%) | 24 (49%) | 0 (0%) | 1 (2.9%) |
| SINGOLO GENOTIPO DIVERSO DA 16 E 18 | 33 (28.4%) | 7 (36.8%) | 6 (14.3%) | 6 (15.8%) | 7 (20%) |
| HPV 16 O 18 + ALTRI GENOTIPI | 12 (10.3%) | 5 (26.3%) | 4 (8.2%) | 7 (18.4%) | 2 (5.7%) |
| INFEZIONE MULTIPLAS ENZA 16 E 18 | 24 (20.6%) | 3 (15.7%) | 7 (14.3%) | 12 (31.6%) | 3 (8.5%) |

È stata dimostrata una differenza statisticamente significativa anche tra il grado o il tipo di lesione e la presenza di infezione da parte di specifici genotipi (16 o 18 versus altri).

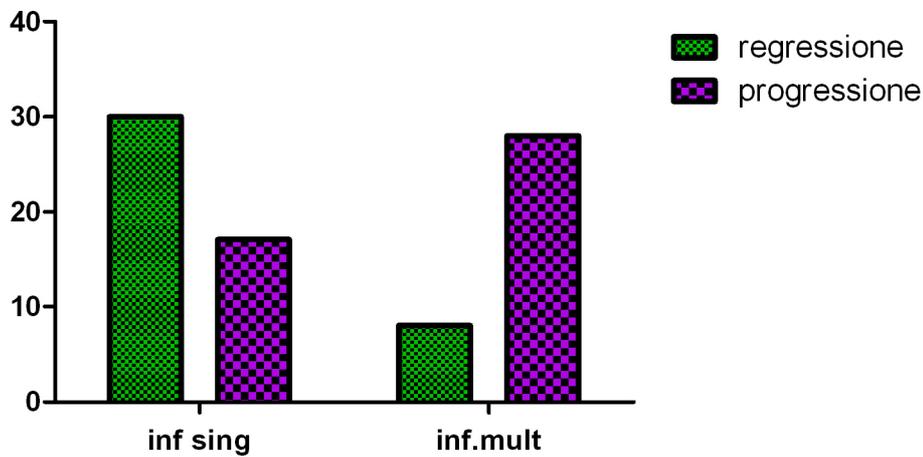
Infatti, nell'ambito delle infezioni da singolo genotipo, si è osservato che le lesioni condilomatose e le lesione di grado basso o moderato sono state associate più frequentemente ad infezione da parte di genotipi differenti dal 16 o dal 18, mentre le lesioni di grado severo sono state associate, più frequentemente, alla presenza di genotipi 16 o 18 ($p < 0.0001$) (fig. 26). Nell'ambito delle infezioni multiple, questo non si verifica e la prevalenza di infezioni da altri genotipi rispetto alla prevalenza di lesioni attribuibili ad HPV 16 o 18 è elevata sia in lesioni di basso che in lesioni di alto grado (fig. 26).

Figura 26. Relazione tra grado e tipo di lesione e presenza di infezione da genotipo 16 o 18 o da altri genotipi, nell'ambito delle infezioni singole e multiple nel gruppo di pazienti con lesioni condilomatose.



Al termine del follow-up eseguito nel gruppo di pazienti con diagnosi istologica di CIN 1 previsto dal nostro protocollo, è emerso che pazienti con infezione multipla da HPV presentano una prevalenza di regressione inferiore rispetto a pazienti con infezione da singolo genotipo (rispettivamente 22.2% vs 63.8%; $p < 0.0005$) (fig. 27).

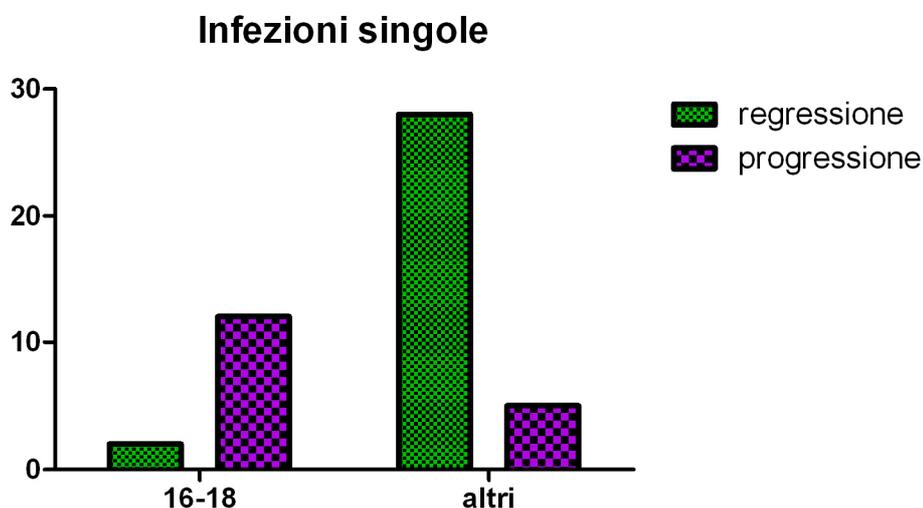
Figura 27. Relazione tra infezione da singolo genotipo o da infezione multipla e persistenza o progressione della lesione nel gruppo di pazienti affette da lesione di basso grado dopo 12 mesi di follow up.



Inoltre, è stato dimostrato che in pazienti affette da singola infezione da genotipo 16 o 18, la regressione della lesione si è verificata solo in 2 pazienti (4.2%); mentre si è determinata persistenza o progressione delle lesione nel 25.3% dei casi.

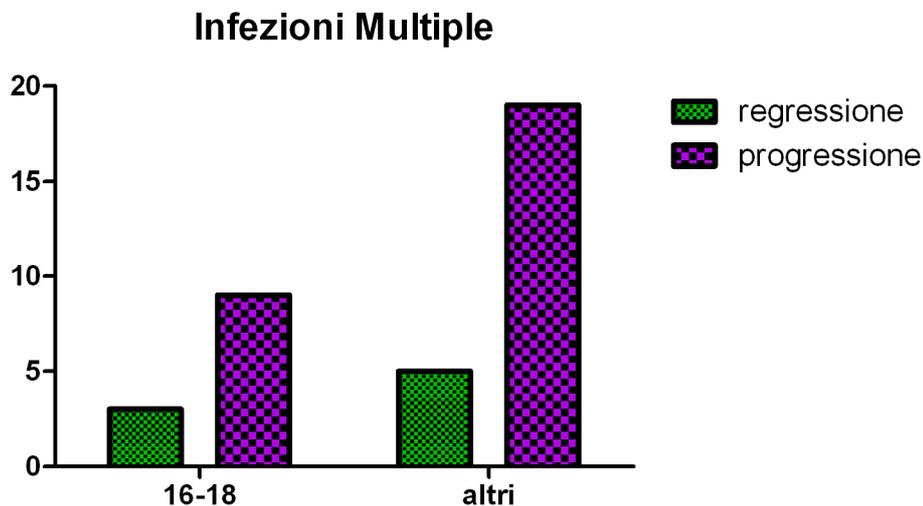
Invece, nelle pazienti con infezione singola da genotipi diversi dal 16 o dal 18 la regressione è avvenuta nel 59.6% dei casi, con una percentuale di persistenza o progressione del 10.6% ($p < 0.0001$) (fig. 28).

Figura 28. Relazione tra infezione da genotipo 16 o 18 o da altri genotipi e persistenza o progressione della lesione nel gruppo di pazienti affette da lesione di basso grado e da infezione da singolo genotipo dopo 12 mesi di follow up.



Al contrario, nelle pazienti affette da infezioni multiple, la percentuale di regressione/persistenza è risultata indipendente dal genotipo virale presente. Infatti, nelle pazienti con positività ai genotipi 16 o 18, la regressione è avvenuta nell'8.3% dei casi, mentre la persistenza o progressione si è verificata nel 25% delle lesioni; e con proporzione analoga, nel gruppo di pazienti con infezioni multiple da genotipi differenti dal 16 o 18, si è verificata regressione nel 13.9% dei casi e persistenza o progressione nel 52.8% (fig. 29).

Figura 29. Relazione tra infezione da genotipo 16 o 18 o da altri genotipi e persistenza o progressione della lesione nel gruppo di pazienti affette da lesione di basso grado e da infezione da multipli genotipi dopo 12 mesi di follow up.



DISCUSSIONE

L'infezione persistente da HPV ad alto rischio è stata definita come il *primum movens* nell'insorgenza del cancro della cervice uterina (48, 49, 50). Per questo motivo, è aumentato l'interesse riguardo l'impiego dell'HPV-DNA test nello screening primario di questa patologia (51, 52, 53).

Attualmente, sono conosciuti approssimativamente 40 diversi tipi di papillomavirus umano associati al cancro cervicale (48).

La comprensione del rapporto tra HPV e lo sviluppo di lesioni preneoplastiche è fondamentale al fine di migliorare la gestione delle pazienti con questo tipo di patologie e l'efficacia dello screening del cancro della cervice uterina.

Gli elementi ancora oggetto di dibattito sono: i tempi di progressione, gli effetti determinati dall'infezione multipla o da genotipi virali ancora definiti a "rischio indeterminato" ed il ruolo svolto dalle difese immunitarie locali in risposta all'infezione da papillomavirus.

Analizzando gli studi di follow-up longitudinali, non c'è consenso unanime per quanto riguarda la persistenza o la progressione delle alterazioni che si verificano nell'epitelio cervicale, causate da molti tipi oncogeni di HPV.

Circa il 50% di tutte le infezioni da HPV persiste a 6 mesi, il 33% a 12 mesi, ed il 9-19% a 24 mesi (51, 52) e, mentre la maggior parte delle infezioni da papillomavirus provoca lesioni di basso grado solo transitorie e con regressione spontanea, in alcuni casi si assiste alla persistenza ed alla progressione verso lesioni squamose intraepiteliali di alto grado (H-SIL).

La percentuale di regressione delle lesioni di basso grado è elevata, circa il 50%, e si verifica soprattutto nelle giovani donne; mentre solo nel 10% dei casi tali lesioni progrediscono in un intervallo di tempo medio pari a 11-24 mesi (54).

Il genotipo virale ha un ruolo fondamentale nel determinare l'eventuale sviluppo e progressione di tali lesioni; in relazione a tale capacità, i ceppi virali vengono comunemente suddivisi in classi di rischio oncogenico (basso, alto e indeterminato).

Spesso l'infezione da papillomavirus è caratterizzata dalla coesistenza di più genotipi virali contemporaneamente. Attualmente, sono presenti in letteratura dati discordanti riguardo la frequenza e le conseguenze delle infezioni multiple da HPV (55). In particolare, la prevalenza varia dal 17,5%, in una popolazione clinica ginecologica (56), al 46% in biopsie di pazienti affette da cancro della cervice uterina (57) e 58,9% in donne con displasia di basso grado (58).

Le pazienti affette dal virus dell'immunodeficienza umana (HIV) spesso presentano infezioni multiple, con cifre che si distaccano ampiamente da quelle riportate per la popolazione generale (fino all'80%) (59), suggerendo un possibile ruolo dell'immunodeficienza sistemica come fattore determinante lo sviluppo di infezioni multiple da papillomavirus. L'individuazione di infezioni multiple è stata anche proposta da Weiland et al. come indicatore prognostico per le lesioni di alto grado in donne con infezione da HIV (60).

Molti autori hanno rilevato che le infezioni multiple da HPV sono associate ad un rischio significativamente maggiore di sviluppare neoplasie di alto grado rispetto alle infezioni caratterizzate da un singolo genotipo. Questo fenomeno potrebbe anche essere la conseguenza di una condizione d'immunodepressione locale che ne faciliterebbe l'acquisizione. Fife KH et al. (61) hanno evidenziato una media di circa tre differenti tipi di HPV nella displasia cervicale, rispetto ad un singolo tipo di HPV in campioni con citologia normale. Questi risultati supportano un possibile ruolo delle infezioni multiple da HPV nello sviluppo della displasia cervicale; sono stati confermati da Becker et al., che hanno studiato la presenza di infezioni multiple da papillomavirus in donne immunocompetenti, dimostrando che tali infezioni sono associate ad un maggior rischio di displasia, secondo solo alla positività per l'HPV-16 (62). È stato inoltre ipotizzato che diversi tipi di HPV agiscano in modo cooperativo nella trasformazione neoplastica (63). Rousseau et al., invece, hanno suggerito che la persistenza dell'infezione da papillomavirus può essere indipendente dalla presenza di più genotipi virali (64), a conferma di questo, Cuschieri et al. hanno individuato l'elevata prevalenza di più tipi di HPV ad alto rischio in tutti i gradi di neoplasia cervicale sottolineando la mancanza di un rapporto cooperativo tra le coppie di cancerogeni o gruppi di tipi di

HPV ad alto rischio (65). Rolòn et al. non hanno trovato un rischio significativamente più elevato di carcinoma in donne con infezioni multiple da HPV rispetto a quelle affette da un singolo genotipo virale (66).

Nel nostro studio, la prevalenza di infezioni multiple è stata del 31% nelle pazienti con CIN 1 e del 22.4% in quelle affette da CIN 3; la maggior prevalenza d'infezioni multiple si è verificata nel gruppo di pazienti con condilomatosi (50%).

Questi dati sembrano confermare che le infezioni multiple non sono correlate al grado di displasia; infatti, la frequenza di infezioni multiple nelle pazienti con lesioni di basso grado è sovrapponibile a quella presente nelle pazienti con lesioni di alto grado. Al contrario, la frequenza di infezioni multiple è particolarmente elevata nelle lesioni condilomatose.

Tuttavia, abbiamo osservato nel gruppo di pazienti con CIN 1 ed infezione multipla una regressione spontanea di lesione nel 22.2% dei casi rispetto al 63.8% nel gruppo di pazienti con CIN 1 ed infezione singola; tale differenza risulta statisticamente significativa ($p < 0.0005$; fig. 27).

La persistenza delle lesioni indotte da infezioni multiple conferma che fattori immunitari cervicali locali potrebbero influenzare la *clearance* spontanea virale facilitando quindi non solo l'acquisizione dell'infezione, ma anche l'eventuale persistenza o progressione della lesione.

È ormai noto che la persistenza di specifici genotipi virali è associata ad un rischio maggiore di sviluppo di lesioni di grado elevato. In particolare, l'infezione persistente da HPV 16 è conosciuta come il fattore prognostico indipendente più significativo nella progressione delle lesioni cervicali. Altri genotipi che potenzialmente promuovono lo sviluppo di H-SIL sono: l'HPV 18, il 52 ed il 58 (67).

I nostri dati confermano che la prevalenza di infezione singola da HPV 16 o 18 presenta un'incidenza correlata al grado di displasia cervicale, verificandosi solo nel 12% di donne con CIN 1 e nel 49% nel gruppo con CIN 3, ed in nessuna paziente con condilomatosi.

Emerge, inoltre, che lesioni di basso grado in pazienti con infezione da HPV 16 o 18, persistono più frequentemente a 12 mesi rispetto a quelle presenti in pazienti con infezione da altri

genotipi virali; tuttavia, ciò si verifica solo in caso di singola infezione ($p < 0.0001$) (fig. 28). La frequenza di persistenza di lesioni con infezione multipla, infatti, risulta non significativamente differente tra i gruppi con infezione da HPV 16 o 18 o da altri genotipi; delle 24 pazienti con CIN 1 ed infezione da genotipi multipli diversi dal 16 e dal 18, solo 5 sono andate incontro a regressione. Questi dati supportano l'ipotesi che sia le infezioni multiple che le infezioni da genotipo 16 o 18, singole o multiple, comportano un rischio maggiore di progressione/persistenza di lesione.

Di particolare interesse è la percentuale di regressione ad un anno delle lesioni di basso grado nelle pazienti con singole infezioni di HPV diverse dal genotipo 16 o 18 (84.8%). Questo dato è di gran lunga superiore al tasso di regressione spontanea riportato in letteratura. Si evidenzia, infatti, una regressione delle CIN 1 nel 45.8% dei casi, che stratificata per genotipo virale, risulta di gran lunga inferiore nelle altre classi.

Non deve stupire che il 33% delle pazienti con CIN 1 sia risultata negativa alla genotipizzazione virale, perché è probabile che siano pazienti positive a ceppi per i quali i kit utilizzati non sono sensibili. Considerato che le pazienti in questione non sono risultate positive per i genotipi 16 e 18, questo dato rafforzerebbe i numeri delle classi in cui non sono presenti questi genotipi virali.

Ad ogni modo risultati falsamente negativi (FN) possono dipendere dallo stadio dell'infezione o essere attribuiti anche al metodo di prelievo del campione; è stato, infatti, dimostrato che i campioni contenenti una quantità di sangue superiore al 3.5% inibiscono l'amplificazione PCR e possono produrre FN.

Le linee guida della Società Italiana di Colposcopia e Patologia Cervico-Vaginale del 2006 mettono in evidenza che in letteratura non ci sono differenze significative nell'incidenza di carcinomi invasivi cervicali insorti in pazienti con diagnosi di CIN 1 trattate, rispetto a pazienti in cui si è scelto di eseguire follow-up, in virtù della alta probabilità di regressione spontanea di tali lesioni. Questi dati condizionano il management terapeutico delle pazienti che presentano lesioni di basso grado, infatti, le linee guida suggeriscono di effettuare controlli periodici in attesa di

remissione spontanea in pazienti al di sotto dei 35 anni; mentre, al di sopra di questa età, è indicato preferenzialmente il trattamento soprattutto in caso di lesioni persistenti, di lesioni colposcopiche ampie, ed in ogni caso di bassa *compliance* socio-economica al follow-up (68).

Attualmente è stato proposto anche l'impiego della tipizzazione virale nel follow-up di pazienti positive per CIN 1. Le linee guida del 2010 della National Comprehensive Cancer Network, infatti, affermano che in caso di paziente con CIN 1, l'iter da seguire è quello di effettuare un HPV-DNA test dopo 12 mesi o, in alternativa, ripetere il pap-test dopo 6 mesi(69).

I dati emersi in rapporto alle diverse fasce di età, sono in accordo con la letteratura internazionale; infatti, si evidenzia un'alta frequenza di infezioni multiple nei gruppi di donne più giovani ed un'elevata frequenza di infezioni singole nelle donne di età compresa tra i 35 ed i 55 anni (fig. 18).

La prevalenza di coinfezione da parte di genotipi diversi nelle giovani donne, sembra essere dovuta al fatto che l'età media del primo rapporto sessuale si è notevolmente ridotta. Al contrario, si ritiene che la maggiore prevalenza di infezione da singolo genotipo, osservata nelle pazienti con età compresa tra i 35 ed i 55 anni, possa essere attribuita ad una combinazione di vari fattori; tra questi si annoverano: la possibilità di nuove infezioni da HPV in donne di mezza età dovute a variazioni del comportamento sessuale, la riattivazione di infezioni latenti dovuta ad una alterata risposta immune conseguente all'invecchiamento, l'effetto della prolungata esposizione all'HPV durante tutta la vita.

La displasia di alto grado insorge in media 26 mesi dopo l'infezione da HPV ad elevato rischio oncogeno, anche se è dimostrato che la velocità di progressione sembra essere correlata proprio al virotipo ed all'attiva proliferazione ed integrazione del DNA virale nella cellula ospite. Molti studi hanno dimostrato che la presenza di HPV 16 in donne con lesioni citologiche di basso grado determina la progressione verso la CIN 3 in tempi più brevi; in circa il 60% dei casi ciò accade entro 14 mesi.

Dal nostro studio emerge che nella maggior parte delle pazienti con CIN 1 e tipizzazione

virale positiva per i ceppi 16 o 18, o per infezioni multiple, si verifica persistenza o progressione della lesione a distanza di un anno. Invece, nel gruppo di pazienti con CIN 1 ed infezione da singolo genotipo virale diverso dal 16 e dal 18, si riscontra nella quasi totalità dei casi regressione della lesione nell'arco di 12 mesi.

Ciò che si evince dai nostri dati, dunque, è la possibilità di utilizzare la tipizzazione virale come strumento per stabilire il management terapeutico delle pazienti affette da lesioni di basso grado. Grazie alla tipizzazione virale, infatti, è possibile identificare le pazienti con lesioni di basso grado che, a differenza di altre, necessitano di trattamento per l'elevata probabilità che la lesione non regredisca.

Le pazienti che presentano lesioni precancerose di grado moderato o severo (CIN 2 o CIN 3) sono state sottoposte a trattamento chirurgico escissionale senza periodi di attesa in accordo con le linee guida della Società Italiana di Colposcopia e Patologia Cervico Vaginale del 2006. Questo management terapeutico è indicato perché, per questo tipo di lesioni, la probabilità di progressione a carcinoma invasivo è sicuramente maggiore rispetto alle lesioni di basso grado, anche se per motivazioni etiche non se ne conosce l'esatta percentuale. La letteratura, infatti, riporta dati molto controversi sulla storia clinica della CIN 3: in alcuni studi è stata descritta una regressione spontanea di queste lesioni nel 32% dei casi, ed una progressione a carcinoma invasivo in più del 12%. Altri autori, invece, osservando periodi di follow-up più lunghi, hanno riportato percentuali di progressione vicine al 100% (16).

Ciò che proponiamo alla luce dei risultati ottenuti, è di sottoporre tutte le pazienti che presentano lesioni preneoplastiche di basso grado ad HPV-DNA test e di trattare solo quelle con tipizzazione positiva per i ceppi 16 e 18 o in caso di infezione multipla.

Nelle pazienti in cui è presente un solo genotipo virale diverso dal 16 e dal 18 sarebbe utile eseguire un attento follow-up citologico e colposcopico semestrale per 1 anno, al termine del quale, se la lesione non è regredita e viene confermata all'esame istologico, si potrà procedere al trattamento.

Questo protocollo di gestione potrebbe consentire una riduzione sensibile del numero dei trattamenti effettuati in caso di CIN 1.

I benefici diretti di tale gestione sarebbero, un minore discomfort per la paziente, che eviterebbe di esporsi al rischio di eventi avversi intra-operatori o a lungo termine, seppure rari, che possono derivare dall'intervento chirurgico, e la riduzione dei costi socio-sanitari relativi ai trattamenti che questo tipo di patologie implicano.

Ciò che emerso nel corso della ricerca è la scarsa conoscenza delle pazienti nei confronti dell'infezione contratta. Si è riscontrata, infatti, la necessità di eseguire un attento counseling per far comprendere la storia naturale del virus ed il basso rischio di progressione tipico delle lesioni CIN 1.

Risulta evidente che in presenza di genotipizzazione virale positiva per un singolo virus diverso del 16 e 18, alla luce dei risultati ottenuti, il carico di ansia delle pazienti potrebbe ridursi notevolmente; questo è di fondamentale importanza considerando lo stato d'animo delle pazienti che sviluppano lesioni HPV correlate.

Un dato da prendere in considerazione è l'elevata prevalenza nel gruppo di pazienti con CIN 1, di genotipi virali diversi da quelli presenti nei vaccini in commercio.

Infatti, dalla ricerca emerge che il 49% delle pazienti con lesioni preneoplastiche di basso grado, presentavano genotipi virali ad alto rischio diversi dal 16 e 18. Inoltre, abbiamo osservato che tali genotipi sono spesso differenti da quelli delle famiglie α -7 (HPV-18, -39, -45, -59, -68 -70 and -85) o α -9 (HPV-16, -31, -33, -35, -52, -58) per i quali si verifica cross-protezione in caso di vaccinazione, prevalentemente dimostrata per i genotipi di HPV 45, 31 e 33; ovvero una protezione addizionale su tipi virali *non target* dei due vaccini.

Questo dato ribadisce la necessità, per donne vaccinate, di eseguire comunque un adeguato screening citologico previsto dalle linee guida pur essendo protette per i ceppi virali presenti nel vaccino. Va sottolineato, infatti, che il vaccino è uno strumento che consentirà la progressiva diminuzione dell'incidenza del cancro della cervice uterina solo se adeguatamente affiancato da

un adeguato programma di screening sul territorio.

La prevalenza dei diversi genotipi virali presenta, inoltre, notevoli differenze nei vari continenti e l'incremento dei flussi migratori internazionali porterà inevitabilmente ad un continuo e costante incremento della diversificazione dei genotipi virali presenti nel nostro Paese.

BIBLIOGRAFIA

1. F. Xavier Bosch, Ann N. Burchell, Mark Schiffman, Anna R. Giuliano, Silvia de Sanjose, Laia Bruni, Guillermo Tortolero-Luna, Susanne Kruger Kjaer, Nubia Munoz: Epidemiology and Natural History of Human Papillomavirus Infections and Type-Specific Implications in Cervical Neoplasia. *Vaccine* 26S K1–K16 2008.
2. Castellsague X, de Sanjose S, Aguado T, Louie KS, Bruni L, Muñoz J, et al. HPV and Cervical Cancer in the World. 2007 Report. WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). *Vaccine* 2007; 25(Suppl 3).
3. IARC upcoming meetings: Lifestyle Factors; Special report: policy: A review of human carcinogens—Part B: biological agents. May 2009.
4. GLOBOCAN 2002; AIRT (Associazione italiana registri tumori) 2006.
5. Syrjanen KJ. Human papilloma virus lesion in association with cervical dysplasia and neoplasias. *Obstet Gynecol* 62: 617-624; 1983.
6. Maiman M. Management of cervical neoplasia in human immunodeficiency virus-infected women. *J Natl Cancer Inst Monogr* 23: 43-49; 1998.
7. Schwarz TF, Leo O.: Immune response to human papillomavirus after prophylactic vaccination with AS04-adjuvanted HPV-16/18 vaccine: Improving upon nature, *Gynecol Oncol* 2008.
8. Carter JJ, Koutsky LA et al. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis* 181(6):1911; 2000.
9. Hanselaar A, Task force n°12. Features of successful organized screening programs. International Consensus Conference on Fight Against Cervical Cancer, Chicago, march 18-22, 2000.
10. ACOG Committee Opinion. New Pap test screening techniques. N 206, august 1998.
11. Boyle P, Leon ME, Maisonneuve P, Autier P. Cancer control in women, update 2003. *Int J*

- Gynecol Obstet, 83 (suppl 1) :179; 2003.
12. F. Xavier Bosch, Ann N. Burchell, Mark Schiffman et al. Epidemiology and Natural History of Human Papillomavirus Infections and Type-Specific Implications in Cervical Neoplasia. Vaccine 26S K1–K16; 2008.
 13. Cox JT. Epidemiology of cervical intraepithelial neoplasia: the role of human papillomavirus. Bailliere's Clin Obstet Gynaecol, 9: 121; 1995.
 14. Orlandi C et al. Cervical pathology and viruses. Europ J Gynaecol Oncol, 8: 135; 1987.
 15. Cotran, Kumar, Collins. Robbins: le basi patologiche delle malattie. VI Edizione.
 16. Nappi C. et al. Ostetricia e Ginecologia. Idelson-Gnocchi Edizione 2005.
 17. William J. Hoskins et al. Principles and practice of Gynecologic Oncology. Lippincott Williams & Wilkins Fourth Edition.
 18. Commissione Oncologica Nazionale: proposte operative in tema di prevenzione secondaria del cervico-carcinoma uterino. In Linee Guida elaborate dalla Commissione oncologica nazionale, in applicazione di quanto previsto dal Piano Sanitario Nazionale per il triennio 1994-96, relativo all'azione programmata « Prevenzione e cura delle malattie oncologiche », concernenti l'organizzazione della prevenzione e dell'assistenza in oncologia. Supplemento ordinario della Gazzetta Ufficiale n 127 del 1° giugno 1996.
 19. Conferenza permanente per i rapporti tra lo Stato e le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano. Provvedimento 8 marzo 2001. Accordo tra il ministero della Sanità e le regioni e province autonome di Trento e Bolzano sulle linee-guida concernenti la prevenzione, la diagnostica e l'assistenza in oncologia. Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, 2 maggio 2001.
 20. Coleman D, Day N, Douglas G, Formery E, Lynge E, Phillip J, Segnan N. European Guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. Europ J Cancer, 29A (4) : S1-S38; 1993.
 21. The Council of the European Union. Council Recommendation of 2 december on cancer

- screening. *J Eur Unon*, 878: 34-8; 2003.
22. Bucchi L, Serafini M. *Tumori*, 78: 239; 1992.
 23. Andersen W, Frierson H, Barber S, Tabbarah S, Taylor P, Underwood P. Sensitivity and specificity of endocervical curettage and the endocervical brush for the evaluation of the endocervical canal. *Am J Obstet Gynecol*, 159 (3): 702-7; 1988.
 24. Bamford PH, Beilby J, et al. The natural history from cervical intraepithelial neoplasia as determined by cytology and colposcopic biopsy. *Acta Cytol*, 27: 482; 1983.
 25. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright TJr, Young N. The 2001 Bethesda System terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*, 287: 2114-19; 2002.
 26. Walton RJ: Report of Task Force Reconvened by the Health Service Directorate (Health Service and Promotion Branch, Government of Canada); cervical cancer screening programs, 1982. Ottawa, Canada, Minister of National Health and Welfare 1982.
 27. De Palo G. *Manuale di colposcopia e patologia dei tumori del tratto genitale inferiore*. II Edizione, Masson, Milano; 1993.
 28. Stafl A, Wilbanks G. international terminology of colposcopy. *The Cervix*, 9: 91; 1991.
 29. Walker P, Dexeus S, De Palo G, Barrasso R, Champion M, Giardi F, Jakob C, Roy M. International terminology of colposcopy: an update report from international federation for cervical pathology and colposcopy. *Obstet Gynecol*, 101: 175-77; 2003.
 30. Origoni M. HPV-Test percorso diagnostico-terapeutico. Atti Corso "Linee guida per la gestione della paziente con pap-test anormale" Milano 9 settembre 2005.
 31. Kim JJ, Wright TC, Goldie SJ. Cost-effectiveness of human Papillomavirus DNA testing in the United Kingdom, The Netherlands, France and Italy. *J Natl Cancer Inst*, 97(12):888-895; 2005.
 32. National Cancer Institute Workshop. The 1988 Bethesda System for reporting cervical / vaginal cytologic diagnoses. *JAMA*, 262: 931, 1989.

33. The 1991 Bethesda System for reporting cervical / vaginal cytologic diagnoses: report of the 1991 Bethesda Workshop. *JAMA*, 267: 1892, 1992.
34. The 2001 Bethesda System. Terminology for reporting results of Cervical Cytology. *JAMA*, 287: 2114, 2002.
35. Mitchell M.F., Tortolero- Luna G., Wright T., et al.: Cervical human papillomavirus infection and intraepithelial neoplasia: a review. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 21: 17, 1996.
36. Robertson A.J., Anderson J.M., Beck J.S., et al.: Observer variability in histopathological reporting of cervical biopsy specimens. *J. Clin. Pathol.* 42: 231, 1989.
37. Genest D.R., Stein L., Cibas E., et al.: A binary (Bethesda) system for classifying cervical cancer precursors: criteria, reproducibility, and viral correlates. *Hum. Pathol.* 24: 730, 1993.
38. Pellicano M, Guida M, Zullo F, Lavitola G, Cirillo D, Nappi C. Carbon dioxide versus normal saline as a uterine distension medium for diagnostic vaginoscopic hysteroscopy in infertile patients: a prospective, randomized, multicenter study. *Fertility and Sterility*, 79 (2): 418-21; 2003.
39. Guida M, Di Spiezio Sardo A, Acunzo G, Sparice S, Bramante S, Piccoli R, Bifulco G, Cirillo D, Pellicano M, Nappi C. Vaginoscopic versus traditional office hysteroscopy: a randomized controlled study. *Hum Reprod*, Jul 22; 2006.
40. Izzo S, Negrotti S, Stanco D, Ardivino I. L'esame dell'endocervice: la colposcopia dell'endocollo, ovvero l'endocervicoscopia. In *Patologia cervicovaginale: dal laboratorio alla clinica*. Atti del XVII Congresso della SICPCV, Vecchione A, Villani C, Frega A. Eds, Masson Ed, Roma, pp 119-30; 2002.
41. Walzer P, Dexeus S, De Palo G, Barrasso R, Campion M, Girardi F, Jakob C, Roy M. International terminology of colposcopy: an update report from international federation for cervical pathology and colposcopy. *Obstet Gynecol*, 101: 175-7; 2003.
42. Paavonen J et al. "Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like particle vaccine against infection with HPV16 e 18 in young women: an *Lancet*, Vol369, Issue

- 9580,pp2161-2170, June-July up from a randomized control trial” *Lancet*, 367:1247-1255; 2006.
43. Brown DR., Kjaer SK., Sigurdsson K , et al.: The Impact of Quadrivalent Human Papillomavirus (HPV; Types 6, 11, 16, and 18) L1 Virus-Like Particle Vaccine on Infection and Disease Due to Oncogenic Nonvaccine HPV Types in Generally HPV-Naive Women Aged 16–26 Years. *The Journal of Infectious Diseases*, 199:xxx; 2009.
 44. Herrero R.: Human Papillomavirus (HPV) Vaccines: Limited Cross-Protection against Additional HPV Types. *The Journal of Infectious Diseases*, 199:919 –22; 2009.
 45. WHO/UNPFA “Preparing for the introduction of HPV vaccines; policy and programme guidance for Countries” World Health Organization 2006.
 46. American Cancer Society Guidelines for HPV vaccine use to prevent cervical cancer and its precursors *Cancer J Clin*, 57:7-28; 2007.
 47. Consiglio Superiore di Sanità Sessione XLVI, sezioni congiunte II e III, seduta dell’11 Gennaio 2007.
 48. Devilliers EM. Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J Virol*. 63: 4898–903; 1989.
 49. Meijer CJLM, Helmerhorst TJM, Rozendaal L, van der Linden JC, Voorhorst FJ, Walboomers JMM. Human papillomavirus typing or testing in gynecopathology: has the time come? *Histopathology*, 33:83–6; 1998.
 50. Nobbenhuis MAE, Walboomers JMM, Helmerhorst TJM, et al. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet*, 354:20–5; 1999.
 51. Bulkman NW, Berkhof J, Rozendaal L et al. Human papillomavirus DNA testing for the detection of cervical intraepithelial neoplasias grade 3 and cancer: 5-year follow-up of a randomised controlled implementation trial. *Lancet*, 370: 1764–1772; 2007.
 52. Cuzick J, Arbyn M, Sankaranarayanan R et al. Overview of human papillomavirus-based

- and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. *Vaccine*, 26: 29–41; 2008.
53. Szarewski A, Ambroisine L, Cadman L et al. Comparison of predictors for high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with abnormal smears. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 17: 3033–3042; 2008.
- 54.** Surgery for cervical intraepithelial neoplasia (Review) Martin-Hirsch PPL, Paraskeva E, Bryant A, Dickinson HO, Keep SL *The Cochrane Library* 2010, Issue 6.)
55. Fife KH, Cramer HM, Schroeder JM, Brown DR. Detection of multiple human papillomavirus types in the lower genital tract correlates with cervical dysplasia.
56. Peyton CL, Gravitt PE, Hunt WC, et al. Determinants of genital human papillomavirus detection in a US population. *J Infect Dis*. 183:1554–64; 2001.
57. Bachtary B, Obermair A, Dreier, et al. Impact of multiple infection on response to treatment and survival in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer. *Int J Cancer*. 102:237–43; 2002.
58. ALTS Group. Human papillomavirus testing for triage of women with cytologic evidence of low-grade squamous intraepithelial lesions: baseline data from a randomised trial. *J Natl Cancer Inst*. 92:397–402; 2000.
- 59.** Levi JE, Kleter B, Quint WG, et al. High prevalence of human papillomavirus (HPV) infections and high frequency of multiple HPV genotypes in human immunodeficiency virus-infected women in Brazil. *J Clin Microbiol*. 9:3341–5; 2002.
60. U Weiland et al. Genital infections with multiple HPV types are frequent, are more associated with SIL and are more prevalent in HIV positive patients. Abstracts of the 20th International Papillomavirus Conference, Paris, France, 2002.
61. Fife KH, Cramer HM, Schroeder JM, Brown DR. Detection of multiple human papillomavirus types in the lower genital tract correlates with cervical dysplasia. *J Med Virol*. 64:550–9; 2001.

62. Becker TM, Wheeler CM, McGrouh NS, et al. Sexually transmitted diseases and other risk factors for cervical dysplasia among Southwestern Hispanic and non-Hispanic white women. *JAMA*, 271:1181–8; 1994.
63. Chaouki N, Bosch FX, Muñoz N, et al. The viral origin of cervical cancer in Rabat, Morocco. *Int J Cancer*, 75:546–55; 1998.
64. Rousseau MC, Pereira JS, Prado JCM, et al. Cervical coinfection with human papillomavirus types as a predictor of acquisition and persistence of HPV infection. *J Infect Dis*. 184:1508–17; 2001.
65. K S Cuschieri, H A Cubie, M W Whitley, A L Seagar, M J Arends, C Moore, G Gilkisson, E McGooganJ. Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. *Clin Pathol*. 57:68–72; 2004.
66. Rolo´n PA, Smith JS, Muñoz N, et al. Human papillomavirus infection and invasive cervical cancer in Paraguay. *Int J Cancer*, 85:486–91; 2000.
67. Hee Jung Ana, Ji Min Sungb, Ae Ran Parkb, Ki Jun Songb, Young Nam Leec, Young Tae Kimd, Yoon Jin Cha e, Suki Kang f, Nam Hoon Cho e,f,g. Prospective evaluation of longitudinal changes in human papillomavirus genotype and phylogenetic clade associated with cervical disease progression. Article in press. *Gynecologic Oncology*, 7; 4C; 2010.
68. Gestione della paziente con pap test anormale. Linee Guida Edizione 2006. Anno XXI – N.1 Dicembre 2006.
69. The NCCN Guidelines. National Comprehensive Cancer Network, Inc. 2010.

Genotipi virali e recidiva delle lesioni di alto grado

Alla luce dei dati emersi dai primi anni di ricerca, cioè che i genotipi HPV 16 e HPV 18 rivestono un ruolo predominante nella persistenza e nell'evoluzione delle lesioni di basso grado verso lesioni di alto grado, abbiamo voluto porre la nostra attenzione all'utilizzo della genotipizzazione virale nel predire la recidiva delle lesioni di alto grado dopo trattamento escissionale. Dagli studi presenti in letteratura è emerso che il genotipo HPV 16 è associato ad un maggior tasso di recidiva post conizzazione di lesioni CIN 3 rispetto agli altri genotipi. Sia nello studio ASC-US LSIL triage (ALTS trial) (1) che nel più recente studio di Heymans et al (2), le pazienti con HPV 16 sono state identificate come ad alto rischio di recidiva e pertanto sono state indirizzate ad un follow-up più stretto (3,4) .

Sulla base di questi dati, nel nostro studio abbiamo voluto indagare se il genotipo HPV 16 potesse rappresentare un fattore di rischio rispetto agli altri genotipi nella recidiva delle lesioni di alto grado dopo trattamento escissionale.

Non è da trascurare il dato di persistenza e recidiva delle lesioni della cervice uterina riscontrate nelle nostre pazienti. Queste lesioni possono portare donne, anche giovani, ad affrontare interventi demolitivi talvolta per la sola patologia preneoplastica, con notevoli implicazioni legate alla fertilità. La possibilità che una donna venga sottoposta a più di un intervento escissionale conservativo (conizzazione) può essere conseguenza di:

- a) Persistenza di lesioni sui margini di escissione.
- b) Presenza di lesioni a salto (lesioni separate da una zona di mucosa indenne).
- c) Possibilità di reinfezione da parte di istotipi virali ad alto rischio.

A tal proposito negli ultimi anni sono state sviluppate nuove tecniche per migliorare la diagnosi di quelle lesioni localizzate all'interno del canale cervicale, al fine di garantirne una corretta e completa escissione, e sono state impiegate tecniche molecolari (HPV-DNA test) che consentono di identificare la presenza dei genotipi virali nell'ambiente vaginale al fine di eseguire un follow up più appropriato e di confermare la completa clearance virale post-trattamento.

SCOPO DELLO STUDIO

Il nostro studio prospettico osservazionale si propone di valutare la possibile correlazione esistente tra l'insorgenza di lesioni recidivanti di alto grado ed il genotipo virale 16 .

MATERIALI E METODI

Abbiamo reclutato dal'aprile 2008 all'aprile 2011, 310 pazienti, presso l'ambulatorio di patologia cervico-vaginale del nostro Dipartimento di Ginecologia, Ostetricia e Fisiopatologia della

Riproduzione umana, secondo i seguenti criteri di inclusione:

- a) Pazienti con diagnosi istologica di H-SIL.
- b) Tutti i margini dei campioni istologici devono essere liberi da lesioni.

Sono state escluse tutte le pazienti con sospetto di patologia neoplastica infiltrante.

Ciascuna paziente ha eseguito prima dell'intervento chirurgico: esame colposcopico, esame biotipico, tipizzazione virale (HPV-DNA test) ed endocervicoscopia, al fine di caratterizzare con precisione la topografia della lesione e la sua estensione endocervicale. Le pazienti sono state sottoposte ad trattamento ablativo o escissionale (intervento di LEEP o di Conizzazione a lama fredda) secondo le linee guida internazionali. Il follow up è stato eseguito con controlli periodici consistenti in colposcopia e pap-test a 3-6-12-24 mesi e tipizzazione virale a 6 mesi (ed eventuale ripetizione in caso di positività all'esame colposcopio e/o pap-test) dall'intervento per valutare una completa clearance virale post-trattamento.

Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati è stata elaborata con il software SPSS 15.0 (SPSS Inc.; Chicago, IL, US). Abbiamo selezionato le pazienti trattate per H-SIL HPV 16 correlato e le pazienti con H-SIL correlato ad altri genotipi HPV ad alto rischio e le abbiamo comparate ai corrispondenti gruppi H-

SIL pretrattamento. Nell'ambito delle infezioni HPV 16 correlate abbiamo individuato due sottogruppi di pazienti, quelle con HSIL dovute solo ad HPV 16 (*infezioni singole*) e quelle con HSIL dovute ad HPV 16 in associazione ad altri genotipi (*infezioni multiple*). La valutazione dei tassi di recidiva di H-SIL post trattamento è stata corretta per la perdita di pazienti al follow-up.

RISULTATI

Delle 310 donne, 214 avevano un HPV test alto rischio positivo e diagnosi istologica di CIN 3 pretrattamento. Dei restanti 96, 84 avevano un HPV test alto rischio positivo e diagnosi istologica di CIN 2, 12 avevano un HPV test negativo. La tabella 1 mostra i tassi di CIN3 post-trattamento genotipo specifico, analizzando le infezioni HPV 16 come singole e totali (multiple+single).

Delle 214 pazienti HPV test positive, 141 erano positive all' HPV 16 di cui 126 in forma singola e 15 in forma multipla. Le restanti 73 pazienti erano affette da genotipi differenti dal 16.

Il tasso crudo di CIN 3 post trattamento (tabella 1) è stato del 21% (30 pz) nelle donne con infezione HPV 16 (*singola + multipla*) e 7% (5 pz) per le donne con infezioni da altri genotipi.

Il tasso corretto di CIN 3 post trattamento (tabella 1) è stato del 27% nelle donne con infezione HPV 16 (*singola + multipla*) e 7% per le donne con infezioni da altri genotipi. Queste differenze sono risultate statisticamente significative ($p < 0.05$). Risultati statisticamente significativi si sono avuti anche confrontando il tasso delle recidive di CIN 3 correlate ad infezione *singola* HPV 16 con quelle avutosi da *altri genotipi* ($p < 0.05$). Delle 12 pazienti negative all'HPV test nessuna ha presentato recidiva.

Risultati sovrapponibili si sono avuti per le pazienti con CIN 2 correlato ad HPV 16 (tabella 1).

Tabella 1: tasso di recidiva post trattamento di lesioni CIN 3 nelle donne con CIN 3 correlato ad un'infezione primaria da HPV ad alto rischio

| Genotipo hrHPV | Numero totale | Tasso crudo di recidiva (%) | Tasso corretto di recidiva (%) |
|--|----------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| <i>Infezione multipla ed infezione singola</i> | | | |
| 16 vs. altri genotipi hrHPV | 141 vs.73 | 21 vs.7* | 27 vs.7* |
| <i>Infezione singola</i> | | | |
| 16 vs. altri genotipi hrHPV | 126 vs.59 | 23 vs.7* | 28 vs.7* |

*P<0.05

DISCUSSIONE

Le lesioni di alto grado CIN2/CIN3 si associano ad un rischio significativo di sviluppare carcinoma invasivo se non tempestivamente diagnosticate e trattate (5). La diagnosi precoce, consente un trattamento conservativo mediante escissione della zona di trasformazione con ansa diatermica (LEEP) o conizzazione a lama fredda. Il rischio di malattia residua o recidivante è del 10% circa e si verifica nei primi 2 anni post-trattamento (6). Pertanto, riveste importanza il follow-up delle pazienti trattate per poter reintervenire al ripresentarsi della lesione.

Il follow-up post trattamento prevede, nella maggioranza dei paesi occidentali, un pap test a 6-12-24 mesi (7). Diversi studi hanno provato ad identificare i fattori predisponenti alla recidiva:

L'estensione della lesione; il grado di displasia; l'età della paziente; la rimozione incompleta; la terapia immunosoppressiva. (8-9-10-11).

Dal nostro precedente studio si è evinto che i genotipi HPV 16 e HPV 18 rivestono un ruolo predominante nella persistenza e nell'evoluzione delle lesioni di basso grado verso lesioni di alto grado. Abbiamo quindi voluto indagare se il genotipo HPV 16 incrementi il rischio di recidiva dopo trattamento di lesioni di alto grado.

Nel nostro studio il tasso di recidive di CIN 3 nelle donne con CIN 3 HPV 16 correlato, è risultato significativamente più elevato rispetto agli altri genotipi HPV.

Questo è probabilmente dovuto al fatto che l'HPV 16 ha una clearance più bassa rispetto agli altri genotipi HPV e mostra un incrementato rischio di lesioni CIN 2-3 (12-14,15)

Il tasso di recidive di delle nostre pazienti è stato del 27% sovrapponibile a quello dello studio di WU et al, (16) (26.3%) ma superiore al quelli riportati negli studi di Paraskevaidis et al (4.9%) (17) e di Ghaem-Mghami et al (3%) (18).

Alla luce dei dati della letteratura, l'HPV test è stato inserito nelle linee guida europee nella valutazione pre e post trattamento (19). In studi retrospettivi il genotipo HPV è risultato il principale fattore predittivo di recidiva (2), nello studio di Heymans quando la paziente risultava positiva dopo 6 mesi dal trattamento per lo stesso genotipo presente prima della conizzazione, la probabilità di sviluppare una recidiva di lesione di alto grado era molto alta (potere predittivo positivo del 100% e specificità del 79% per lesioni CIN II/CIN III). Quando comparato l'HPV dna test ai risultati della citologia eseguita durante il follow-up nelle stesse pazienti, sia la sensibilità che la specificità risultavano più alte (ratio 1.31, IC:1.11-1.54) e (ratio 1.22, IC:1.14-1.36). D'altra parte, un HPV test negativo dopo conizzazione offre l'opportunità di allungare l'intervallo di follow-up a 18 mesi (20,21,22) . Comunque alcune lesioni possono recidivare anche in presenza di HPV test negativo e possono essere diagnosticate solo dalla citologia (23).

Una recente meta-analisi ha concluso che nonostante l'utilizzo diffuso nella pratica clinica routinaria del HPV test, non esistono ancora evidenze scientifiche che indichino la corretta strategia

di impiego (24).

L'HPV 16 è responsabile della maggioranza delle infezioni anche nei carcinomi HPV correlati in siti diversi della cervice uterina (25) rivelandosi il genotipo più oncogenico tra gli HPV. In accordo con i precedenti studi anche nelle nostre pazienti l'HPV test è risultato affidabile nel predire il rischio di recidiva di lesioni di alto grado quando impiegato nel follow-up delle pazienti trattate. Dai nostri risultati si deduce che lesioni correlate ad HPV 16 dovrebbero essere monitorate in maniera più intensa non con la sola citologia ma anche con l'HPV test.

Nonostante il nostro e i precedenti studi riportati in letteratura mostrino incoraggianti risultati, solo uno studio randomizzato controllato può identificare le strategie più idonee per l'impiego del test.

BIBLIOGRAFIA

1. ALTS Group. Human papillomavirus testing for triage of women with cytologic evidence of low-grade squamous intraepithelial lesions: baseline data from a randomised trial. *J Natl Cancer Inst.* 92:397–402; 2000.
2. Heimans J.; Benoy I.H.; Poppe W. Et al.: Type-specific HPV geno-Typing improves detection of recurrent high-grade cervical neoplasia after conisation. *Int. J. Cancer.* 2011;129,903-909.
3. Kreimer AR, Guido RS, Solomon D, Schiffman M, Wacholder S, Jeronimo J, Wheeler CM, Castle PE. Human papillomavirus testing following loop electrosurgical excision procedure identifies women at risk for posttreatment cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 disease. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:908–14.
4. Go'k M, Coupe' VMH, Berkhof J, Verheijen RHM, Helmerhorst TJM, Hogewoning CJA, Snijders PJF, Meijer CJLM. HPV16 and increased risk of recurrence after treatment for CIN. *Gynecol Oncol* 2007;104:273–5.
5. Holowaty P, Miller AB, Rohan T, To T. Natural history of dysplasia of the uterine cervix. *J Natl Cancer Inst* 1999;91: 252–8.
6. Arbyn M, Sasieni P, Meijer CJ, Clavel C, Koliopoulos G, Dillner J. Chapter 9: clinical applications o HPV testing: a summary of meta-analyses. *Vaccine* 2006; 24:78–89.
7. <http://www.colposcopiaitaliana.it/pdf07/Linee-Guida-2006.pdf>
8. Nobbenhuis MA, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, Rozendaal L, Remmink AJ, Risse EK, van der Linden HC, Voorhorst FJ, Kenemans P, Meijer CJ. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet* 1999;354:20–5.
9. Arbyn M, Paraskevaidis E, Martin-Hirsch P, Prendiville W, Dillner J. Clinical utility of HPV DNA detection: triage of minor cervical lesions, follow-up of women treated for high-grade CIN. An update of pooled evidence. *Gynecol Oncol* 2005;99:7–11.

10. Chew GK, Jandial L, Paraskevaidis E, Kitchener HC. Pattern of CIN recurrence following laser ablation treatment: longterm follow-up. *Int J Gynecol Cancer* 1999; 9:487–90.
11. Verguts J, Bronselaer B, Donders G, Arbyn M, Van Eldere J, Drijkoningen, Poppe W. Prediction of recurrence after treatment for high-grade cervical intraepithelial neoplasia: the role of humanpapilloma virus testing And age at conisation. *BJOG* 2006;113: 1303–7.
12. Bulkman NW, Bleeker MC, Berkhof J, Voorhorst FJ, Snijders PJ, Meijer CJ. Prevalence of types 16 and 33 is increased in high-risk human papillomavirus positive women with cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or worse. *Int J Cancer* 2005;117:177–81.
13. Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1066–71.
14. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1072–9.
15. Bulk S, Berkhof J, Bulkman NW, Zielinski GD, Rozendaal L, van Kemenade FJ, et al. Preferential risk of HPV16 for squamous cell carcinoma and of HPV18 for adenocarcinoma of the cervix compared to women with normal cytology in The Netherlands. *Br J Cancer* 2006;94(1):171–5.
16. Wu D; Zheng Y., Chen W; Guo C.; Yu J.; Chen G.; Huang Y. Prediction of residual/recurrent disease by HPV Genotype after loop excision procedure for high grade cervical intraepithelial neoplasia with negative margins . *ANZJOG* 2011; 51:114-118
17. Paraskevaidis E, Lolis ED, Koliopoulos G et al. Cervical intraepithelial neoplasia outcomes after large loop excision with clear margins. *Obstet Gynecol* 2000; 95: 828–831.
18. Ghaem-Maghami S, Sagi S, Majeed G, Soutter WP. Incomplete excision of cervical intraepithelial neoplasia and risk of treatment failure: a meta-analysis. *Lancet Oncol* 2007; 8: 985–

993.

19. Jordan J, Martin-Hirsch P, Arbyn M, Schenck U, Baldauf JJ, Da Silva D, Anttila A, Nieminen P, Prendiville W. European guidelines for clinical management of abnormal cervical cytology, part 2. *Cytopathology* 2009;20:5–16.
20. Chua K-L, Hjerpe A. Human papillomavirus analysis as a prognostic marker following conisation of the cervix uteri. *Gynecol Oncol* 1997;66:108–13.
21. Bollen Liesbeth JM, Tjong-A-Hung, Steven P, van der Velden Jacobus, Mol Ben-Willem, ten Kate Fiebo WJ, ter Schegget Jan-Bleker, Otto P. Prediction of recurrent and residual cervical dysplasia by human papillomavirus detection among patients with abnormal cytology. *Gynecol Oncol* 1999;72:199–201.
22. Nagai Y, Maehama T, Asato T, Kanazawa K. Persistence of human papillomavirus infection after therapeutic conisation for CIN 3: is it an alarm for disease recurrence? *Gynecol Oncol* 2000;79:294-9.
23. Nobbenhuis MAE, Meijer CJLM, Brule AJC, van den Rozendaal L, Voorhorst FJ, Risse EKJ, Verheijen RHM, Helmerhorst TJM. Addition of high-risk HPV testing improves the current guidelines on followup after treatment for cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 2001; 84:769–801
24. Chan B. K.S., Melnikow J, Christina A. Slee, Arellanes R., Sawaia G.F.. Post-treatment human papillomavirus testing for recurrent cervical intraepithelial neoplasia: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol.* 2009; 20:422-9.
25. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1772–83.

Cancri rari della cervice uterina

Melanoma maligno della cervice uterina

Il melanoma maligno (MM) della cervice uterine è un tumore molto raro, rappresenta il 3% dei cancri che colpiscono le donne ed è responsabile di meno dell'1% delle morti per cancro. Per la sua diagnosi va prima di tutto esclusa una sua localizzazione in altri distretti per escludere una localizzazione metastatica a livello della cervice uterine.

Generalmente il MM viene diagnosticato in donne anziane tra i 70 e gli 80 anni. I tumori si presentano per lo più come masse polipoidi fortemente pigmentate, ad uno stadio FIGO I – II. La sopravvivenza a 5 anni è però rara e non supera il 40% per lo stadio I ed il 14% nello stadio II.

Durante la nostra attività abbiamo trattato un caso di melanoma amelanotico primario della cervice uterine, caratterizzato dalla difficoltà incontrate nella sua diagnosi e dal lungo follow-up della paziente (10 anni). Il MM della cervice è caratterizzato dalla sua variabilità clinica e dal comportamento biologico imprevedibile. In letteratura sono stati riportati meno di 10 casi di melanoma maligno amelanotico (MMA) della cervice.

Amelanotic malignant melanoma of the uterine cervix with ten-year follow-up

V.D. Mandato¹, M.D.; B. Kobal¹, M.D., Ph.D.; A. Di Stefano¹, Ph.D.; J. Sinkovec², M.D.;
A. Levicnik², M.D.; S. Rakar¹ M.D., Ph.D.; L. Costagliola³, M.D.

¹Division of Gynecology, ²Pathology Unit, Department of Obstetrics and Gynecology,
University Medical Centre Ljubljana, Ljubljana (Slovenia)

³Department of Obstetrics and Gynecology, University "Federico II", Naples (Italy)

Summary

Background: Malignant melanoma (MM) accounts for 3% of cancers that affect women and results in less than 1% of cancer deaths. It is characterized by clinical variability and unpredictable biological behavior. Fewer than ten cases of amelanotic MM (AMM) have been reported in literature. **Case:** A 61-year-old woman was admitted for vaginal spotting. A huge, soft cervix with an exophytic lesion was biopsied. A clear cell carcinoma, FIGO Stage IB1, was diagnosed and radically treated. The final pathology showed an AMM of the cervix positive for PAS and HMB 45. The patient is clinically free of disease ten years postoperatively. **Conclusion:** Malignant melanoma of the cervix is often misdiagnosed because of non discriminatory features and the capacity to mimic other tumors. Malignant melanoma of the cervix needs to be diagnosed as quickly as possible because a timely therapy and a long and careful follow-up might result in better survival.

Key words: Malignant melanoma; Cervix; Diagnosis; Treatment.

Introduction

Melanoma is a malignant neoplasm of neuroectodermal origin characterized by melanin production that usually affects the skin, adrenal glands and ocular choroid. It is characterized by clinical variability and unpredictable biological behavior, with long remissions and relapses that develop rapidly. Metastases to the lungs and liver are the most common cause of death.

Malignant melanoma (MM) accounts for only 3% of cancers that affect female patients and results in less than 1% of cancer deaths [1]. However, over the last years its incidence has been increasing. Primary MM of the reproductive tract usually arises from the vulva (3-7% of MM) [2, 3], and secondary or primary melanomas of the upper genital tract are very rare [4].

In this report we describe the clinical aspects and the histopathological features of the amelanotic variant of MM of the cervix treated at the Department of Obstetrics and Gynecology of the University Medical Centre of Ljubljana. To our knowledge, this is the eighth case of amelanotic MM of the cervix (3rd case of primary amelanotic MM) reported in the English literature (Table 1) [4-10].

Case Report

A 61-year-old postmenopausal woman was admitted to our Gynecology Unit (May 1998) for vaginal spotting lasting for some weeks. Her history was unremarkable. On gynecological examination a huge, smooth, soft cervix with an exophytic

lesion was detected and biopsied; histopathology revealed clear cell carcinoma. Preoperative examination detected a tumor confined to the cervix and staged as FIGO IB1; the patient was therefore submitted to type III radical hysterectomy with bilateral salpingo-oophorectomy and pelvic lymphadenectomy.

Microscopic examinations revealed cervical MM (Figure 1a) with evident angio-invasion (Figure 1b), extensive necrosis of the mass and deep infiltration of the cervical wall (up to 3 mm sub-serosa). Immunohistochemical staining was negative for actin, vimentin, keratin, desmin, Kreyberg and S-100, however, it revealed PAS and HMB 45 positivity (Figure 1c).

The uterine corpus, parametrium, ovaries, vaginal cuff and all 38 examined lymph nodes (LN) did not present histological features of malignancy. The final pathology showed an amelanotic MM of the cervix.

No adjuvant therapy was prescribed and the patient is clinically free of disease ten years postoperatively.

Discussion

Although the involvement of primary and metastatic melanoma in the female reproductive tract is reported in literature, MM of the upper genital tract is rare. Metastases to the female genital tract from extra-genital cancers are uncommon. Metastatic malignant cutaneous melanoma accounts for only 2.5% of cases. The uterus is affected in less than 10% of the cases [11]. Since primary MM of the genital tract is very rare, it is important to exclude the presence of other neoplastic sites, because metastatic lesions are more common in cases of multi-organ dissemination of the skin or eye melanoma.

Primary MM of the cervix usually occurs in the seventh and eighth decades of life [12], whereas the median age for secondary melanoma of the cervix is 40 years [6]. The most common symptom of cervical melanoma is irregu-

Revised manuscript accepted for publication April 21, 2008

Table 1. — Comparison of patient characteristics of amelanotic malignant melanoma between our case and the literature.

| Cases | Age | Preoperative diagnosis | Final diagnosis | Symptoms | FIGO Stage | Acceptable as primary | Treatment | IHC positivity | Survival |
|------------------------|-----|--|---|---|------------|-----------------------|--|----------------------|----------------------|
| Index case, 2006 | 61 | Clear cell carcinoma | Amelanotic Epithelioid malignant melanoma | Spotting | IB1 | Yes | Radical TAH-BSO with pelvic LFN | HMB 45 PAS | FOD 120 months later |
| Furuya M., 2001 | 33 | Clear cell carcinoma | Amelanotic Clear cell melanoma | Genital discharge and lower back pain | IIB | Yes | Radical TAH-BSO with pelvic LFN | HMB 45 Melan-A S-100 | FOD 6 months later |
| Clark, 1999 | 63 | High grade endometrial stromal sarcoma | Amelanotic epithelioid and spindle malignant melanoma | Vaginal bleeding | IB1 | Yes | TAH-BSO+ four course of Cisplatin Dacarbazine | HMB 45 S-100 | DOD 10 months later |
| Ishikura H., 1998 | 51 | — | Desmoplastic malignant melanoma | Genital bleeding | — | — | Cyclophosphamide Adriamycin Cysplatinum | S100 | DOD 13 months later |
| Miyagi Y., 1997 | 57 | — | Amelanotic epithelioid and spindle malignant melanoma | — | IIA | No | Radical TAH-BSO+ combination chemotherapy | S100 | DOD 18 months later |
| Kristiansen S.B., 1992 | 72 | Malignant melanoma | Amelanotic epithelioid malignant melanoma | Post menopausal bleeding | IV | No | XRT, Single agent therapy + XRT + Simple TAH-BSO | HMB 45 | DOD 12 months later |
| Yu H.C., 1987 | 51 | Malignant melanoma | Amelanotic epithelioid malignant melanoma | Right hemiparesis, enlarged lymph nodes | IV | No | XRT | S-100 | DOD |
| Genton, 1981 | 45 | — | Amelanotic epithelioid malignant melanoma | Spotting | IIA | No | Radical TAH-BSO + vaginectomy | — | — |

DOD: died of the disease; FOD: free of disease IHC: immunohistochemical; TAH-BSO: total abdominal hysterectomy with bilateral salpingo-oophorectomy; LFN: lymphadenectomy; XRT: external beam radiotherapy.

lar vaginal bleeding and the cervix can present with polypoid masses with or without melanin. The histological diagnosis consists of a proliferation of atypical melanocytes in the epithelium bordering on change in junctional activity. In metastatic melanoma, the neoplastic cells are localized below the basement membrane and the junctional activity is not observed [5, 13]. However, in some cases the diagnosis of primary MM has been reported without the presence of junctional activity but based only on the lack of other primary sites [7-9, 14-21]. On the other hand, the possibility of metastatic malignant melanoma (MMM) cannot be completely excluded, considering the occasional spontaneous regression of primary MM [22].

Despite the fact that 25% of primary melanomas are amelanotic [6], this is to our knowledge the eighth case of amelanotic malignant melanoma of the uterine cervix reported in the English literature (Table 1). In AMM, immunohistochemistry and electron microscopy are essential. Positive stainings for antigen HMB 45 and protein S-100 are considered immunohistochemical markers for malignant melanoma, but in some cases they may provide negative results (Table 1) [5]. In our case, the tumor cells stained intensely only with anti-HMB 45.

On the other hand, electron microscopy reveals the presence of melanosomes and premelanosomes in the cellular cytoplasm [13].

In the diagnosis of primary melanoma of the cervix, also desmoplastic malignant melanoma (DMM), a rare variant of malignant melanoma, should be considered. Its pathological features are ill-defined cervical sclerosis with diffuse proliferation of spindle cells with hyperchromasia, associated with marked desmoplasia, positive neoplastic cells for S100 and negative for HMB 45, and the presence of lentigo maligna or pigmented tumor cells in some, but not all lesions [10].

In some cases magnetic resonance imaging (MRI) can predict the histopathologic features of MM. MRI characteristics of melanoma consist of high signal intensity on both T1-weighted and T2-weighted images [23]. T1 shortening is attributed to either the paramagnetic effects of stable free radicals within melanin granules or the methemoglobin within the intratumoral hemorrhage. However, MM may have different signal intensity characteristics according to the melanin concentration and the presence of hemorrhage [24, 25]. Malignant melanoma with rich melanocytes is expected to be hyperintense on T1-weighted images; this might be a suggestive finding for melanoma.

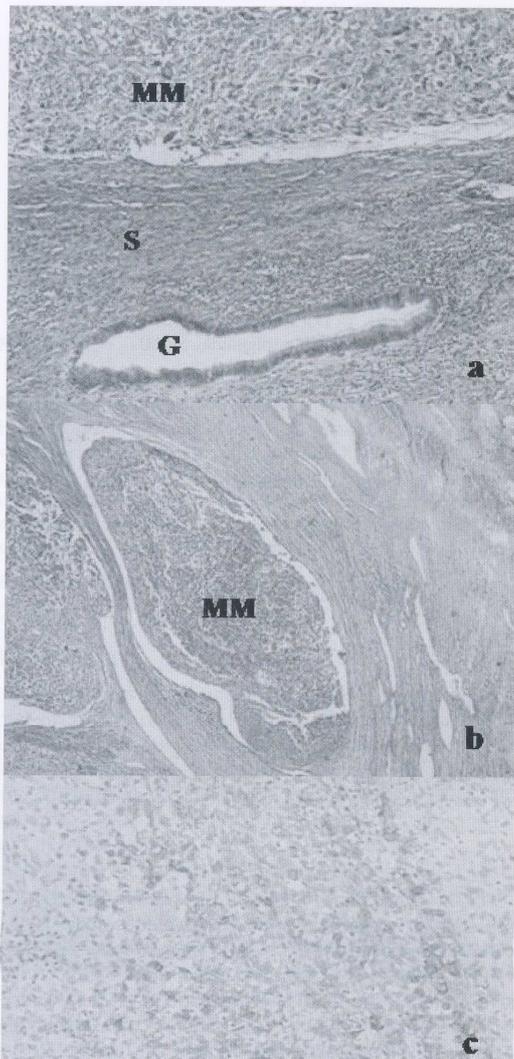


Figure 1a. — Primary malignant melanoma of the cervix. Cervical gland (G) with stroma (S) and malignant melanoma (MM) cells. 1b: MM metastasis in the vascular space. 1c: Tumor cells have intracytoplasmic melanin granules and are immunoreactive for HMB-45.

Some controversies exist regarding staging of the cervical melanoma. Some authors [26] argued that a staging system should be based on the thickness of the primary lesion as in primary cutaneous melanoma, while Mordel proposed that cervical melanoma staging be based on the FIGO system [15]. Considering that this tumor is very rare, there is no standard therapy, however the most common treatment is a type III radical hysterectomy with or without pelvic lymphadenectomy and adequate length of the vaginal excision.

Adjuvant therapy is not defined, but radiation may improve local control if the surgical margins are close. Although primary cervical melanoma is a less ominous disease than secondary cervical melanoma [6], the 5-year survival rate does not exceed 40% for Stage I disease, and reaches only 14% in Stage II [6, 15]. Today, our patient is still free of relapse after ten years, and presents one of the longest survivals reported in the literature (Table 1) [6].

Conclusion

Although melanomas of the upper female genital tract are very rare, it is important for the gynecologist to suspect a melanoma of the genital tract when the patient with a history of a previous malignant melanoma (cutaneous, mucosal) has symptoms such as bleeding, pain, swelling, and abdominal mass. Also primary MM of the cervix should be considered, especially when clear cell carcinoma is suspected [7, 26-28].

Malignant melanoma, as a primary or secondary tumor, represents several diagnostic problems. It is often misdiagnosed because of non discriminatory symptoms, normal levels of tumor markers, non characteristic imaging findings and the capacity (especially in amelanotic presentation) to mimic other tumors. Malignant melanoma needs to be diagnosed as quickly as possible because it requires different therapy and has a significantly worse prognosis than other more common carcinomas. Despite the previous considerations, an adequate and timely therapy might result in better survival, but long and careful follow-up is necessary.

Acknowledgments

We gratefully appreciate the help of the Cancer Registry of Slovenia for data about the patient's survival.

References

- [1] Landis S.H., Murray T., Bolden S., Wingo P.A.: "Cancer statistics". *CA Cancer J. Clin.*, 1998, 48, 6.
- [2] Irvin W.P., Legallo R.L., Stoler M.H., Rice L.W., Taylor P.T., Andersen W.A.: "Vulvar melanoma: a retrospective analysis and literature review". *Gynecol. Oncol.*, 2001, 83, 457.
- [3] Lotem M., Anteby S., Peretz T., Ingber A., Avinoach I., Prus D.: "Mucosal melanoma of the female genital tract is a multifocal disorder". *Gynecol. Oncol.*, 2003, 88, 45.
- [4] Ariel I.M.: "Malignant melanoma of the female genital system: a report of 48 patients and review of the literature". *J. Surg. Oncol.*, 1981, 16, 371.
- [5] Furuya M., Shimizu M., Nishihara H., Ito T., Sakuragi N., Ishikura H. *et al.*: "Clear cell variant of malignant melanoma of the uterine cervix: a case report and review of the literature". *Gynecol. Oncol.*, 2001, 80, 409.
- [6] Clark K.C., Butz W.R., Hapke M.R.: "Primary malignant melanoma of the uterine cervix: case report with world literature review". *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 1999, 18, 265.
- [7] Kristiansen S.B., Anderson R., Cohen D.M.: "Primary malignant melanoma of the cervix and review of the literature". *Gynecol. Oncol.*, 1992, 47, 398.
- [8] Miyagi Y., Yamada S., Miyagi Y., Yamamoto J., Kawanishi K., Yoshinouchi M. *et al.*: "Malignant melanoma of the uterine cervix". *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, 1997, 23, 511.
- [9] Yu H.C., Ketabchi M.: "Detection of malignant melanoma of the uterine cervix from Papanicolaou smears". *Acta Cytol.*, 1987, 31, 73.

- [0] Ishikura H., Kojo T., Ichimura H., Yoshiki T.: "Desmoplastic malignant melanoma of the uterine cervix: a rare primary malignancy in the uterus mimicking a sarcoma". *Histopathology*, 1998, 33, 87.
- [1] Walfisch S., Lapid O., Yanai-Inbar I., Piura B.: "Sigmoid colon carcinoma metastatic to the myometrium". *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 1999, 86, 65.
- [2] Berek J.S., Hacker N.F.: "Practical Gynecologic Oncology". Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2005, 379.
- [3] Boldt C., Lehmann R., Osmers R., Burrig K.F.: "Primares malignes melanom der cervix uteri". *Pathologie*, 2003, 24, 226.
- [4] Puri S., Yoonessi M., Romney S.L.: "Malignant melanoma of the cervix uteri". *Obstet. Gynecol.*, 1976, 47, 459.
- [5] Mordel N., Mor-Yosef S., Ben-Baruch N., Anteby S.O.: "Malignant melanoma of the uterine cervix". *Gynecol. Oncol.*, 1989, 32, 375.
- [6] Holmquist N.D., Torres J.: "Malignant melanoma of the cervix". *Acta Cytol.*, 1988, 32, 252.
- [7] Owens O.J., Pollard K., Khoury G.G., Dyson J.E.D., Jarvis G.J., Joslin C.A.F.: "Primary malignant melanoma of the uterine cervix". *Clin. Radiol.*, 1988, 39, 336.
- [8] Sloan D.: "Diagnosis of a tumor with an unusual presentation in the pelvis". *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1988, 159, 826.
- [9] Chua S., Viegas O.A.C., Wee A., Ratnam S.S.: "Malignant melanoma of the cervix". *Gynecol. Obstet. Invest.*, 1989, 27, 107.
- [0] Pinedo F., Ingelmo J.M., Miranda P., Garzon A., Lopez J.I.: "Primary malignant melanoma of the uterine cervix". *Gynecol. Obstet. Invest.*, 1991, 31, 121.
- [1] Takehara M., Ito E., Saito T., Nishioka Y., Kudo R.: "Primary malignant melanoma of the uterine cervix". *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, 1999, 25, 129.
- [22] Avril M.F., Charpentier P., Margulis A., Guillaume J.C.: "Regression of primary malignant melanoma with metastasis". *Cancer*, 1992, 69, 1377.
- [23] Peyman G.A., Mafee M.F.: "Uveal melanoma and similar lesions: the role of magnetic resonance imaging and computed tomography". *Radiol. Clin. North Am.*, 1987, 25, 471.
- [24] Atlas S.W., Grossman R.J., Gomori J.N. *et al.*: "MR imaging of intracranial metastatic melanoma". *J. Comput. Assist. Tomogr.*, 1987, 11, 577.
- [25] Woodruff W.W. Jr, Djang W.T., McLendon R.E., Heinz R.E., Voorhees D.R.: "Intracerebral malignant melanoma: high-field strength MR imaging". *Radiology*, 1987, 165, 209.
- [26] Morrow C.P., DiSaia P.J.: "Malignant melanoma of the female genitalia: a clinical analysis". *Obstet. Gynecol. Surv.*, 1976, 31, 233.
- [27] Gupta D., Deavers M.T., Silva E.G., Malpica A.: "Malignant melanoma involving the ovary: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 23 cases". *Am. J. Surg. Pathol.*, 2004, 28, 771.
- [28] Deavers M.T., Malpica A., Ordenez N.G., Silva E.G.: "Ovarian steroid cell tumors: an immunohistochemical study including a comparison of calretinin with inhibin". *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 2003, 22, 162.

Address reprint requests to:
V.D. MANDATO, M.D.
Via Madonna del Pantano 170,
Giugliano, Naples (Italy)
e-mail: dariomandato@virgilio.it

Nell'ambito dello studio isteroscopico del tratto genitale inferiore, è stato possibile eseguire una rara diagnosi di fistola colon istmo uterino in una donna portatrice di malattia diverticolare. L'isteroscopia è anche in questo caso risultata una metodica affidabile, economica, indolore e sicura nell'investigare le perdite vaginali atipiche e le patologie del tratto genitale inferiore.



ELSEVIER

THE JOURNAL OF
MINIMALLY INVASIVE
GYNECOLOGY

1 Case Report

2 Colouterine Fistula Complicating Diverticulitis Diagnosed at 3 Hysteroscopy: Case Report 4

5 Vincenzo Dario Mandato, PhD*, Martino Abrate, MD, Francesco Sandonà, MD,
6
7 Luigi Costagliola, MD, Alfredo Gastaldi, MD, and Giovanni Battista La Sala, MD

8 *From the Departments of Obstetrics and Gynecology (Drs. Mandato, Abrate, Costagliola, and Battista La Sala), General Surgery (Dr. Sandonà), and
9 Radiology (Dr. Gastaldi), Arcispedale S. Maria Nuova, Reggio Emilia, Italy.*

10 **Q2 ABSTRACT** Since Noecker first reported a colouterine fistula secondary to diverticulitis in 1929, about 20 cases have been reported in the
11 literature. Methods for diagnosis have yet to be established. Herein we report the first case of a colouterine fistula at the level of
12 the isthmus diagnosed at hysteroscopy. A 62-year-old woman with spotting, vaginal discharge, and recurrent vaginitis was
13 referred to our department. Her history was unremarkable. Diagnostic hysteroscopy revealed a normal vagina, cervix, and
14 uterine cavity; and a fecaloid flow from the isthmus was noted. At follow-up of the fecaloid flow, a colouterine fistula was
15 detected. Results of transvaginal ultrasound, computed tomography, and colonoscopy were inconclusive, and the diagnosis
16 was confirmed only at Gastrograffin enema. Laparotomy revealed a sigmoid diverticulum interposed between the uterus
17 and the bladder, with a fistula formation between the sigmoid colon and isthmus. En bloc resection of the sigmoid colon
18 and uterus was performed, as well as side-to-end colorectal anastomosis. The final pathology report confirmed a colouterine
19 fistula secondary to diverticulitis. Diagnostic hysteroscopy enabled rapid diagnosis of the colouterine fistula. Diagnostic
20 hysteroscopy is the first-choice diagnostic tool for investigation of any abnormal vaginal discharge such as blood or stool be-
21 cause it enables direct vision and biopsy of the lesions of the lower genital tract quickly and at low cost. Journal of Minimally
22 Invasive Gynecology (2011) ■, ■–■ © 2011 AAGL. All rights reserved.

23 **Keywords:** Colouterine fistula; Diagnostic hysteroscopy; Diverticulitis; Vaginal discharge

24 **DISCUSS** You can discuss this article with its authors and with other AAGL members at
25 <http://www.AAGL.org/jmig-19-1-11-00218>



Use your Smartphone
to scan this QR code
and connect to the
discussion forum for
this article now*

* Download a free QR Code scanner by searching for "QR scanner" in your smartphone's app store or app marketplace.

26 Diverticulosis, the most common disease of the colon,
27 affects as many as 30% of patients by age 60 years, with
28 up to 25% having diverticulitis rarely complicated by a fis-
29 tula. A colouterine fistula of diverticular origin is extremely
30 rare because of resistance of the uterine tissue. Since
31 Noecker first reported a colouterine fistula secondary to di-
32 verticulitis in 1929, about 20 cases have been reported in
33 the literature [1–11]. Methods for diagnosis have yet to be

34 established. Herein we report the first case of a colouterine
35 fistula at the level of the isthmus diagnosed at hysteroscopy.

36 Case Report

37 A 62-year-old woman, para 1, was referred to our depart-
38 ment because of spotting, vaginal discharge, and recurrent
39 vaginitis lasting 3 months. Her history was unremarkable.
40 Diagnostic hysteroscopy revealed a normal vagina, cervix,
41 and uterine cavity, and a fecaloid flow from the isthmus
42 was noted. At follow-up of the fecaloid flow, a colouterine
43 fistula was detected (Fig. 1). Cystoscopy was performed at
44 the time of diagnostic hysteroscopy, and bladder mucosa in-
45 volvement was excluded. Transvaginal ultrasound and com-
46 puted tomography yielded normal findings. At colonoscopy,
47 a benign colon polyp was diagnosed. Gastrograffin enema
48 confirmed the diagnosis (Fig. 2). Laparotomy revealed a sig-
49 moid diverticulum interposed between the uterus and the

50 The authors have no commercial, proprietary, or financial interest in the
51 products or companies described in this article.

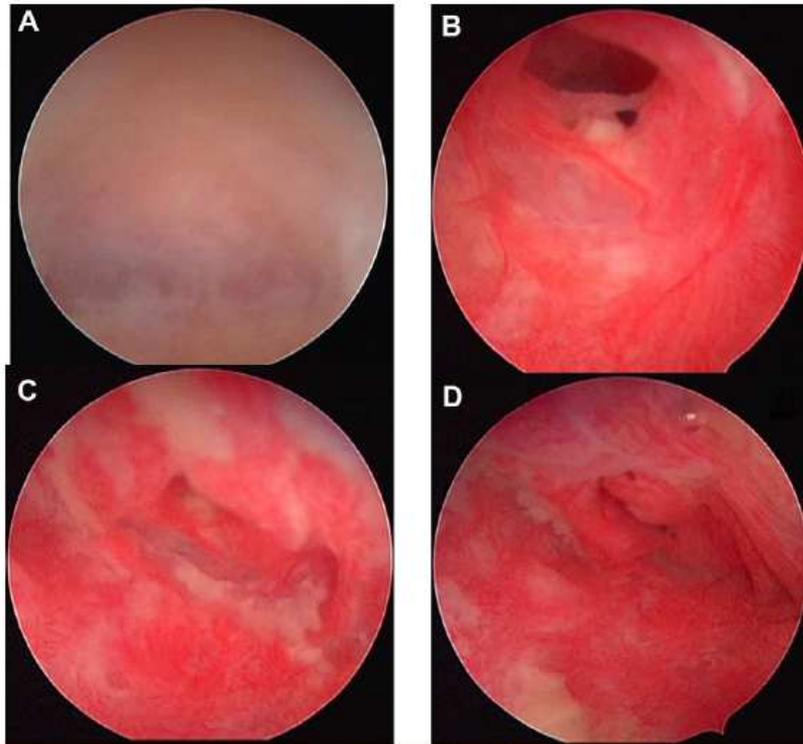
52 Corresponding author: Vincenzo Dario Mandato, PhD, Department of
53 Obstetrics and Gynecology, Arcispedale S. Maria Nuova di Reggio Emilia,
54 Viale Risorgimento 80, Reggio Emilia, Italy.
55 E-mail: VincenzoDario.Mandato@asmn.re.it

56 Submitted May 9, 2011. Accepted for publication August 24, 2011.
57 Available at www.sciencedirect.com and www.jmig.org

58 1553-4650/\$ - see front matter © 2011 AAGL. All rights reserved.
59 doi:10.1016/j.jmig.2011.08.725

Fig. 1

Diagnostic hysteroscopy revealed a regular uterine cavity (A) and an extra opening in the isthmus (B) connecting to a fistula tract (C) that ended in a cavity lined with intestinal mucosa (D).



bladder, with a fistula formation between the sigmoid colon and isthmus (Figs. 3 and 4) definitely confirmed. En bloc resection of the sigmoid colon and uterus and the adnexae was performed, as well as a side-to-end colorectal anastomosis. The final pathology report confirmed the colouterine

fistula secondary to diverticulitis. The patient's hospital stay was uneventful, and she was discharged.

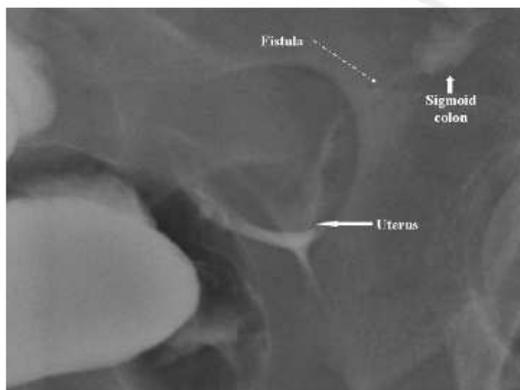
Discussion

A fistula is an abnormal passageway between organs or vessels that normally are not connected. Colouterine fistulas can have a surgical, malignant, radiotherapeutic, or inflammatory origin or can be caused by a foreign body in the uterus [1–14]. Inflammatory adhesions of the bowel wall to the uterus can occur during acute episodes of diverticulitis, resulting in necrosis and subsequent formation of a fistula. Fistulas may also develop after localized perforations of diverticulas and development of a pericolic abscess [3].

Penetration of the sigmoid colon into the wall of the uterus is the first step in formation of a colouterine fistula. Fistulas from mobile bowel (ileum and sigmoid) in the genital tract are uncommon and are normally closed through the posterior fornix into the vagina. Uterodigestive fistulas are even more uncommon; probably because the thickness of the uterine wall offers greater protection than other surrounding organs such as the bladder or vagina. Moreover, the myometrium functionally closes the fistula, thereby preventing communication between the bowel and uterus. In

Fig. 2

Gastrograffin enema confirmed a colouterine fistula.



References

1. Noecker CB. Perforation of sigmoid and small bowels into the uterus secondary to diverticulitis of the sigmoid. *Penn Med J*. 1929;32:496.
2. Clay AC, Tierney NA. One-stage en bloc resection for colonic-uterine fistula caused by diverticulitis. *JAMA*. 1969;207:555-557.
3. Chaikof EL, Cambria RP, Warsaw AL. Colouterine fistula secondary to diverticulitis. *Dis Colon Rectum*. 1985;28:358-360.
4. Huettner PC, Finkler NJ, Welch WR. Colouterine fistula complicating diverticulitis: charcoal challenge test aids in diagnosis. *Obstet Gynecol*. 1992;80:550-552.
5. Davis AG, Posniak HV, Cooper RA. Colouterine fistula: computed tomography and vaginography findings. *Can Assoc Radiol J*. 1996;47:186-188.
6. Nistri R, Basili G, Vitali A, et al. Colo-uterine fistula, a complication of sigma diverticulitis. *Minerva Chir*. 1998;53:827-830.
7. Kiyokawa K. A case of sigmoidouterine fistula detected by transvaginal ultrasonography. *J Med Ultrasonics*. 2001;28:71-75.
8. Sentilhes L, Foulatier O, Verspyck E, et al. Colouterine fistula complicating diverticulitis: a case report and review of the literature. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003;110:107-110.
9. Takada T, Nakagawa S, Hashimoto K, et al. Preoperative diagnosis of colouterine fistula secondary to diverticulitis by sonohysterography with contrast medium. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2004;24:682-683.
10. Petignat P, Billieux MH, Bianchi Demicheli F, et al. Silent colo-uterine fistula in an elderly woman. *J Am Geriatr Soc*. 2004;52:1965-1966.
11. Kassab A, El-Bialy G, Hashesh H, et al. Magnetic resonance imaging and hysteroscopy to diagnose colo-uterine fistula: a rare complication of diverticulitis. *J Obstet Gynaecol Res*. 2008;34:117-120.
12. Larkin JO, Walsh TJ, Wallis F, Waldron DJ. Pyometrium secondary to diverticular colouterine fistula. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2011;156:234-235.
13. Halevy A, Bracha M, Jeroukhimov I, Schneider D, Nesterenko V. En bloc resection for malignant colouterine fistula. *Tech Coloproctol*. 2010;14:37-39.
14. Dadhwal V, Ghosh B, Jindal VL, Vaid A, Agarwal S, Mittal S. A case of colouterine fistula managed laparoscopically. *J Minim Invasive Gynecol*. 2008;15:652-654.
15. Myers E, Hurley M, O'Sullivan GC, Kavanagh D, Wilson I, Winter DC. Laparoscopic peritoneal lavage for generalised peritonitis due to perforated diverticulitis. *Br J Surg*. 2008;95:97-101.

