

## SOCIETA' ITALIANA DI CITOLOGIA

### Commissione Qualità e Certificazione

# Documento sull'applicazione di nuovi sistemi automatici nella fase preanalitica e di lettura della citologia cervico-vaginale.

8 aprile, 2002

A cura di:

Massimo Confortini  
Clelia Magnarini  
Maria Luisa Schiboni  
Maria Filomena Tetesi  
Valeria Cocchi  
Catia Sintoni

Hanno collaborato: Marisa Ferrari, Elisa Feudale, Dino Della Giustina, Manila Martelli, Giovanna Migliore, Antonella Pellegrini, Luisa Rossi.

In questi ultimi anni si è assistito ad un crescente utilizzo di sistemi automatici in citologia cervico-vaginale. Il loro impiego in routine è ancor oggi subordinato al loro costo ed alla ragionevole certezza che i risultati ottenuti con questi strumenti siano in grado di migliorare l'accuratezza del Pap test.

Questo gruppo di lavoro ha analizzato sull'argomento una serie di punti relativi alla posizione della Commissione Oncologica Nazionale, alle condizioni operative degli strumenti, al training necessario, ai dati pubblicati in letteratura, alle sperimentazioni concluse o in atto in Italia ed al loro utilizzo sulla base delle raccomandazioni del Bethesda 2001.

Questo al fine di arrivare ad una prima indicazione sull'impiego di queste nuove tecnologie nella lettura del Pap test.

### **Commissione Oncologica Nazionale-Linee Guida**

La commissione Oncologica Nazionale ha preso in esame (Gazzetta Ufficiale 3/5/2001) l'utilizzo dei Sistemi automatici esprimendo in merito la seguente opinione:

".....partendo dal presupposto che questi sistemi hanno dimostrato una sensibilità uguale o superiore alla citologia convenzionale e che per alcuni vi è anche una approvazione FDA, si suggerisce di promuovere un'attività di *technology assessment*. Questo permetterà di determinare il rapporto costi benefici al fine di pervenire a raccomandazioni sulla loro introduzione o meno in programmi organizzati di screening del cervico-carcinoma ...".

Rispetto al passato si può sottolineare che, sulla base dei concetti sopra espressi, è ipotizzabile l'uso in routine dei sistemi automatici all'interno di sperimentazioni controllate propedeutiche al loro utilizzo per la routine.

## Dati di letteratura

### Citologia in fase liquida

L'outcome di riferimento per la valutazione di una nuova metodologia di screening dovrebbe essere la riduzione di incidenza, morbilità e mortalità del cancro della cervice.

Questi parametri sono difficili da studiare in quanto richiedono tempi lunghi; generalmente si ricorre quindi a parametri più semplici da studiare ed in grado comunque di valutare l'applicabilità di una nuova metodica e l'attendibilità dei risultati ottenibili

Nella valutazione dello strato sottile, i risultati degli studi cercano di evidenziare ad esempio:

1. la sensibilità del test nell'identificare lesioni di alto grado (si deve comunque tener conto che non è scontato che questo aumento di sensibilità abbia come conseguenza una diminuzione dell'incidenza di cancri invasivi);
2. la specificità in termini di riduzione di approfondimenti non necessari;
3. la proporzione di Pap test inadeguati;
4. i tempi di lettura;
5. i costi aggiuntivi.

Sull'argomento strato sottile la letteratura, pur essendo ampia, non permette di giungere a evidenze conclusive per i seguenti motivi:

- scarsa qualità dei disegni degli studi;
- mancanza di confronti con standard di riferimento come l'istologia.

La maggior parte riporta risultati estremamente positivi, come quelli evidenziati nelle tabelle 1 e 2. Senza voler mettere in dubbio la validità di questi dati si deve sottolineare che questi studi spesso si basano su un confronto fra citologia convenzionale e strato sottile, senza prendere come riferimento anche l'istologia.

Tabella 1: DETECTION RATE OF CERVICAL LESIONS

	ThinPrep		Conventional smears		TP%increase
Diagnosi	N=9.583	%	N=5.423	%	
ASCUS/LSIL	326	3.4	110	2.0	70 p<0.01
LSIL	348	3.6	53	0.98	267 p<0.01
HSIL	100	1.0	17	0.3	233 p<0.01
CARCINOMA	7	0.07	0	0.0	

Da B.J.Guidos Diagn Cytopath 1999.

**Tabella 2: CONVENTIONAL CERVICAL SMEARS vs LIQUID BASED PREPARATION  
DETECTION RATES FOR HSIL+**

Investigator	Conventional	AutoCyte PREP	%Change
Vassilakos 1998	0.29	0.64	120.69
Suarel 1998	0.41	0.68	65.85
Rondez 1998	0.36	0.88	144.44
Total	0.38	0.68	78.95

Più stringenti risultano alcuni report che analizzano in maniera sistematica la letteratura esistente con opportuni filtri per selezionare la qualità degli articoli.

Le conclusioni a cui arrivano questi report evidenziano in modo più obbiettivo i possibili vantaggi di questa tecnologia, anche in relazione alla sua applicabilità in programmi di screening.

#### **AUSTRALIAN HEALTH TECHNOLOGY ADVISORY COMMITTEE REPORT**

- può aumentare la diagnosi di lesioni cervicali di alto grado, trovate istologicamente, del 5-6%;
- riduce la percentuale di strisci inconclusivi;
- riduce il tempo di lettura.

#### **CANADIAN CO-ORDINATING OFFICE FOR HEALTH TECHNOLOGY ASSESSMENT**

- la concordanza fra citologia convenzionale e strato sottile è alta (88-99%);
- permette una più facile lettura del preparato;
- riduce il numero totale di cellule da leggere;
- aumenta le diagnosi di lesioni squamose di basso ed alto grado.

#### **AHCPR**

- le informazioni esistenti non permettono di avere una stima accurata di specificità;
- l'unico studio preso in considerazione che ha come riferimento l'istologia non evidenzia valori di accuratezza superiori alla citologia convenzionale;
- quando si prende come riferimento la citologia convenzionale si ha un notevole aumento di sensibilità.

La situazione italiana presenta in generale un buon livello di affidabilità e su questo livello è stato importante effettuare una serie di studi di confronto.

### Sistemi di lettura computer assistita

Dall'esame di numerosi lavori pubblicati dal 1997 ad oggi, si evince chiaramente che c'è una crescente consapevolezza che ormai anche in citologia non si potrà fare a meno dell'automazione: si tratta perciò di farsi parte attiva e di governarla, stabilendo tempi e modi di un suo corretto utilizzo (diverso a seconda delle realtà), pretendendo dalle ditte costruttrici una sempre migliore *performance*.

Sembra anche chiaro comunque che qualsiasi sua utilizzazione sia concepibile solo per laboratori di grandi dimensioni e quindi con notevoli carichi di lavoro, oltre che in zone del mondo dove la difficoltà di reclutamento di personale professionalmente preparato sia un punto critico dello screening. Taluni autori inoltre sostengono che l'automazione, permettendo un aumento di produttività, possa dare la possibilità ai programmi organizzati di screening di raggiungere un maggior numero di donne.

Per quanto riguarda l' utilizzo dell'AutoPap nel controllo di qualità (CDQ), ci sono studi anche meno recenti che ne evidenziano l'utilità, soprattutto tenendo conto del fatto che non esiste una modalità di rescreeing dei casi negativi, fatta manualmente, che sia priva di difetti.

Per lo screening primario le conclusioni a cui arrivano i diversi autori di uso sono invece non unanimi o quantomeno più modulate.

Molto interessante è un articolo, pubblicato da Bartels e coll. (Acta Cytol. 1999) che riassume con un'analisi equilibrata vantaggi e svantaggi del sistema:

- **Problema del campionamento.** Occorre un accurato training degli operatori per ottimizzare il prelievo di un congruo numero di cellule che venga anche strisciato omogeneamente e ben colorato; l'AutoPap, infatti, non legge strisci troppo spessi, colorati con gradi di tonalità non uniformi tra i vari campioni ed ha notevoli difficoltà nell'identificare cellule atipiche quando queste siano rappresentate da pochi elementi.
- **Tasso di falsi negativi.** Non è etico, si dice nell'articolo, che esista una certa taratura che prevede un tasso programmato di falsi negativi (perché le cellule atipiche presenti sono troppo poche). Un errore programmato, anche se raro, è accettabile in altri campi dell'automazione, ma non dove si coinvolgano vite umane.
- **Miglioramento dell'accuratezza diagnostica del laboratorio.** Gli autori negano un'evidenza scientifica, basata su studi indipendenti, che la sola automazione garantisca un elevato livello di accuratezza diagnostica. Se un laboratorio ha già

un'elevata capacità, si possono avere dubbi sulla certezza che l'automazione possa migliorarla ulteriormente.

- **Problema dei costi.** Se si arrivasse a maggiori evidenze sulla migliore accuratezza diagnostica dovuta all'automazione, si potrebbe aumentare l'intervallo di screening; quindi, per valutare i costi, bisogna ragionare con una visione macroeconomia, che prenda in considerazione non soltanto il confronto con il costo del Pap test, ma anche intervalli maggiori ed un eventuale minore ricorso al secondo livello (meno falsi positivi).
- **Ricaduta sui posti di lavoro.** Servirà personale più specializzato ed esperto di quello utilizzato strettamente per lo screening primario, ma potrebbero essere eliminate alcune fasi noiose del lavoro del citologo.

Numerosi studi hanno comunque riportato maggiori evidenze sull'effettivo miglioramento dell'accuratezza e per la maggior parte di essi, l'uso dell'AutoPap determina un aumento sia di sensibilità che di specificità o quantomeno un'equivalenza nel confronto con la lettura convenzionale. In un studio multicentrico effettuato per conto della Neopath e pubblicato nel 1999 si sono esaminati 25.124 strisci prendendo in considerazione sia la capacità di identificare lesioni HSIL+, che infezioni e BCC. (Wilbur e coll. Diagn. Cytopath. 1999; Wilbur e coll. Cancer 1999)

Analoghi e incoraggianti risultati si apprendono da un lavoro di Bibbo e coll. (Acta Cytol. 1999), che hanno valutato inoltre l'utilità della suddivisione in quintili da parte dello strumento. La distribuzione dei Pap Review nei 5 gruppi riflette una sempre maggiore possibilità di presenza di atipie e conseguentemente, secondo l'autrice, rappresenta un valido ausilio alla diagnosi del citologo in quanto diminuisce l'errore di screening.

Il primo studio italiano sull'argomento, effettuato presso l'Istituto Tumori di Milano e su un campione di 14.779 Pap test, ha confermato una collocazione di oltre il 90% delle anomalie trovate con la citologia convenzionale nei quintili primo e secondo. Lo studio ha inoltre evidenziato l'assenza di lesioni significative nei casi *No Further Review* (NFR).

Una nota a parte merita la precisazione di alcuni autori riguardo il **significato dell'approvazione da parte della FDA** dei sistemi automatici come l'AutoPap, utilizzati nello screening primario. Si sottolinea infatti che negli Stati Uniti la FDA approva sistemi che dimostrano performance al livello affermato dalla ditta costruttrice: si tratta quindi di una certificazione di congruenza tra le caratteristiche dichiarate e quelle realmente accertate e niente di più. In pratica si potrebbe dire che è l'industria che decide i propri standard. In realtà, dicono gli autori, dovrebbe essere il direttore di ciascun laboratorio a decidere se il livello di prestazione di un determinato strumento è adatto o no alle proprie esigenze.

Proprio cogliendo questa riflessione, si potrebbe allora concludere che sono **necessari ulteriori studi condotti in laboratori italiani** che valutino, in modo indipendente, alcuni parametri:

- Miglioramento statisticamente apprezzabile prevedibile dal passaggio all'AutoPap come screening primario, partendo però da una valutazione degli standard di accuratezza già esistenti nei nostri laboratori (sicuramente più elevati di quelli americani o inglesi, da tempo alle prese con il problema di una bassa sensibilità in citologia).
- Effettiva diminuzione dei carichi di lavoro individuali e quindi maggiore disponibilità ad esaminare un numero più elevato di casi e/o ad occuparsi di altre tematiche affini (biologia molecolare...).
- Valutazione accurata dei costi in rapporto alle scarse risorse esistenti per la maggior parte dei programmi di screening italiani (è l'automazione una priorità?).
- Volume attuale di lavoro dei laboratori italiani, considerando il fatto che la maggior parte sono medio-piccoli: tutti gli autori che hanno pubblicato sull'argomento sono concordi nel prevedere l'automazione solo per grandi centri di lettura (eventuale necessità di accorpamenti?).

Per quanto riguarda una **possibile utilizzazione italiana dell'AutoPap per il rescreening** dei negativi, è da ritenersi poco utile e comunque non risolutiva per il miglioramento della *performance* dei nostri laboratori. Considerando anche l'inevitabile aumento di costi, non bilanciato dai vantaggi descritti per lo screening primario, sembrerebbe anche una sottoutilizzazione dello strumento.

## SPERIMENTAZIONI EFFETTUATE O IN CORSO IN ITALIA

### Sistemi di lettura computer assistita

**STUDIO N.1** Come sopra ricordato, è stato recentemente pubblicato il primo studio italiano sull'automazione in citologia cervico-vaginale, condotto presso il Dipartimento di Patologia dell'Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori di Milano.

Questi primi risultati sono incoraggianti, confermano l'efficacia dello strumento nell'isolare una percentuale di casi (NFR) dove non si ritrovano lesioni importanti (leggi CIN 2+) e l'importanza per la rilettura delle zone individuate dalla macchina e della distribuzione in quintili .

Al di là dei risultati di accuratezza soddisfacenti, si deve sottolineare la presenza di circa il 10% di strisci non processati (Process review/rerun).

Abbastanza vicina ad una situazione ottimale è la percentuale di NFR che rappresentano, in questa casistica, circa il 22% dei casi processati dalla macchina, o circa il 20% dei casi sottoposti alla macchina.

**STUDIO N.2** Il programma di screening citologico di Firenze (Laboratorio di Citopatologia del CSPO) ha effettuato uno studio caso-controllo per valutare l'accuratezza del sistema di lettura AutoPap (Tripath) nello screening primario.

Lo studio ha inoltre preso in considerazione la riduzione dei tempi di lettura legati alla mappatura dei vetri, ai carichi di lavoro per la preparazione dei casi da processare con AutoPap e alla percentuale dei vetrini indicati dalla macchina come *No Further Review* (NFR).

I casi analizzati in cieco sono stati 14.145.

Il confronto citologia convenzionale lettura computer assistita ha evidenziato livelli di accuratezza sovrapponibili.

Circa il 20 % è risultato, alla lettura automatica, NFR.

Orientativamente la lettura automatica ha permesso un risparmio di tempo quantizzabile in circa il 30%

**STUDIO N.3** All'interno del programma di screening di Torino è stato condotto, in un periodo precedente a quello di Firenze, uno studio simile su un campione di 4.856 casi. Lo studio ha evidenziato risultati di accuratezza sovrapponibili; tutte le lesioni CIN2+ istologiche sono state individuate dopo lettura computer assistita.

Nell'ambito dello stesso programma è stato condotto l'unico studio italiano con preparatore in strato sottile Autocyte.

Il campione è stato di 7.380 citologie in strato sottile relativi a 6.995 donne. Il numero di inadeguati è risultato inferiore rispetto al convenzionale del 15%. Le diagnosi di ASCUS ed HSIL (9%) sono risultate leggermente superiori rispetto al convenzionale, ma non in modo significativo mentre le LSIL sono diminuite del 6%.



La detection rate di casi istologicamente CIN2+ è risultata leggermente aumentata, ma non in modo significativo.

**STUDIO N.4** La Regione Abruzzo ha utilizzato fino al Settembre 2001 l'AutoPap Screening System per uno studio sperimentale multicentrico di applicazione nello screening primario.

Nell'anno 2000-2001 sono stati letti 11.059 strisci cervico-vaginali con lettura convenzionale e con sistema AutoPap. Di questi ne sono stati classificati 7.968, suddivisi in 1.522 NFR (17%), 6.446 Review (72%). Sono risultati rispettivamente Process Review, Rerun e Scant cellularity 821, 576 e 147 casi, pari al 13,9%.

**STUDIO N.5** Presso il Servizio di Citodiagnostica di Lanciano, nell'ambito del programma di screening per la prevenzione del cervico-carcinoma delle Regione Abruzzo, è stato condotto uno studio pilota di valutazione del sistema LGS (*Location Guided Screening*) con stazione di revisione SW (*Slide Wizard*).

Lo studio ha previsto un confronto in cieco tra casi letti con la citologia convenzionale e con il sistema LGS.

Sono stati aggiunti a 3.129 vetrini, che provenivano dalla routine, 87 strisci cervico vaginali con diagnosi citologica LSIL+ confermata istologicamente.

I 3.216 Pap test sono stati inviati all'Ospedale di Atri per la lettura automatica con l'AutoPap System ed i dati sono stati restituiti su supporto di memoria insieme ai vetrini per la revisione con LGS.

La correlazione fra citologia convenzionale e Revisione con SW ha evidenziato una concordanza grezza oltre il 90%. Sono state correlate anche le diagnosi convenzionali e con SW per 49 casi risultati all'istologia CIN 2+. E' stato calcolato il valore predittivo positivo per CIN2 + delle varie categorie diagnostiche. Le diagnosi citologiche ASCUS ed LSIL su convenzionale sono risultate lievemente più predittive rispetto alla citologia con LGS. Sono risultate invece più predittive le diagnosi HSIL identificate con il Sistema LGS.

Sono stati infine analizzati i tempi operativi di lettura con il sistema automatico su 1.000 vetrini e questi tempi sono stati confrontati con quelli della lettura convenzionale. Si è visto che con il sistema LGS si ha una riduzione del tempo per lo screening del 53%.

## Citologia in fase liquida

**STUDIO N.6** Presso il laboratorio di Citopatologia del C.S.P.O. di Firenze è stato condotto uno studio di confronto su uno stesso campione di pazienti tra citologia convenzionale e strato sottile.

A 99 pazienti con citologia ASCUS + è stato effettuato un prelievo in fase liquida prima dell'esame colposcopico. Nello studio sono stati inclusi anche alcuni casi con citologia negativa.

Al follow-up sono stati identificati 22 casi CIN 2 +.

La sensibilità per lesioni CIN2+ della citologia convenzionale e della citologia in fase liquida è stata rispettivamente dell'86% e 91%.

**STUDIO N.7** Nell'ambito del programma di screening per la prevenzione del cervico carcinoma della Regione Abruzzo è stato avviato uno studio annuale multicentrico, atto a valutare la performance del preparato su strato sottile *ThinPrep* (TP) vs il preparato convenzionale.

Sono state coinvolte nel progetto donne di età compresa tra 25 e 45 anni, residenti nelle 6 ASL Abruzzesi (Totale 18.000 donne arruolate a settimane alterne da esaminare; 9.000 con TP, dopo accettazione su modulo di consenso informato e 9.000 con preparato tradizionale).

Alla fine dello studio saranno valutate, per ciascun gruppo randomizzato, la sensibilità, la specificità, i VPP delle varie classi diagnostiche, il tasso di prelievi inadeguati ed il costo medio per vetrino.

Saranno inoltre riletti in cieco da 5 supervisor i vetrini con diagnosi citologica ASCUS+ ottenuti con i due sistemi.

Dai dati preliminari di un campione di 3.002 esami citologici con TP e 4.689 con prelievo convenzionale risulta una distribuzione delle diagnosi come in tabella 3.

**Tabella 3: CONFRONTO TRA FREQUENZE DIAGNOSTICHE SU STRATO SOTTILE (TP) VS CONVENZIONALE (CONV)**

	<b>TP</b>	<b>CONV</b>
<b>NEG</b>	2.670 (88,05%)	4.223 (90,06%)
<b>ASCUS / AGUS</b>	110 (3,66%)	152 (3,24%)
<b>LSIL</b>	80 (2,66%)	51 (1,09%)
<b>HSIL</b>	10 (0,33%)	11 (0,24%)
<b>CA</b>	1 (0,03%)	0 (0,00%)
<b>INADEGUATI</b>	131 (4,37%)	252 (5,37%)
<b>Totale</b>	3.002	4.689

## RACCOMANDAZIONI SU DIAGNOSI COMPUTER-ASSISTITA

### Workshop Bethesda 2001

Durante il forum precedente il Workshop di Bethesda sono state poste numerose domande sulle problematiche inerenti l'uso dei sistemi automatici in citologia.

Da esse sono scaturite le seguenti raccomandazioni:

- **Il *report* di citologia cervicale** dovrebbe chiaramente indicare le modalità con le quali il laboratorio ha esaminato il campione, inclusa la strumentazione usata. Non ci dovrebbe essere ambiguità riguardo l'uso di tecnologia da screening automatica.
- **Per i campioni esaminati soltanto in modo automatico** dovrebbe essere indicato il tipo di strumentazione usata, senza alcuna firma. L'apposizione di un nome potrebbe far credere erroneamente che sia stata effettuata una revisione al microscopio. Bisogna tener presente comunque che, anche in assenza di firma, il direttore del laboratorio è sempre responsabile dell'utilizzazione di strumenti e dei risultati da essi ottenuti.
- **Per i campioni che non possono essere processati** da uno strumento automatico per varie cause (vetrino rotto e riparato, materiale troppo spesso...) dovrebbe esserne indicata la ragione sul *report*. Va quindi incluso il nome del lettore che ha poi manualmente esaminato il caso.
- **Per i campioni che, dopo la processazione da parte dello strumento automatico, hanno richiesto l'intervento manuale** (i casi *Review*), dovrebbero essere indicati chiaramente: il tipo di strumento usato ed il nome di colui che ha completato la valutazione al microscopio.
- **Nel *report* non andrebbero incluse le informazioni date dallo strumento automatico** (percentuale di oscuramento, stato del processo...), perché non hanno valore diagnostico.

Il contenuto delle informazioni finali da dare dovrebbe essere stabilito dal citologo che deve coniugare i dati automatici alle notizie e alla storia clinica della donna.

- **Nel caso in cui non sia stata richiesta la revisione manuale**, il citologo dovrebbe comunque verificare i dati generati dal computer ed il corrispondente *report* citologico finale. Questa verifica dovrebbe includere anche la conoscenza di notizie cliniche che potrebbero portare ad una revisione manuale del campione, anche se non richiesta in precedenza dalla macchina.
- **Il laboratorio deve conservare una registrazione interna** di chi esegue ciascuna verifica, come si registra qualsiasi altro controllo di qualità.

## CONSIDERAZIONI FINALI E PROPOSTE OPERATIVE

I dati riportati in letteratura e l'approvazione ricevuta dall'FDA sia per i sistemi in fase liquida che per la lettura automatica sono stati propedeutici ad una serie di sperimentazione che sono state eseguiti negli ultimi anni in Italia.

I dati soprariportati evidenziano per lo strato sottile risultati di accuratezza sovrapponibili o migliori rispetto al convenzionale.

Si ritiene che le sperimentazioni in atto siano ormai sufficienti per confermare l'impiego di questi sistemi nella preparazione dei Pap test. Vi è da aggiungere che è in atto uno studio multicentrico caso-controllo su 100.000 donne che prevede il confronto della citologia convenzionale e lo strato sottile. Lo studio ha come "end point" l'istologia e quindi porterà sicuramente ulteriori e più probanti elementi per un possibile utilizzo di questa nuova tecnologia all'interno di programmi di screening.

Il possibile utilizzo dello stesso vial può inoltre permettere la ricerca del virus HPV senza dover richiamare la paziente e quindi un miglior utilizzo di protocolli di follow-up basati sul triage delle lesioni borderline.

Si deve sottolineare che il passaggio fondamentale per l'introduzione di queste metodiche sia la revisione delle tariffe. La tariffa prevista attualmente dal Nomenclatore Nazionale è chiaramente insufficiente.

L'utilizzo della citologia in strato sottile deve essere prevista come esame specifico ed il calcolo della relativa tariffa dovrà tener conto del costo aggiuntivo dei conservanti e dell'altro materiale necessario e del risparmio dei tempi di lettura.

La qualità del sistema giustifica ampiamente una tariffa più alta rispetto al Pap test convenzionale.

Vi è da sottolineare che l'attuale tariffa del Pap test è ampiamente sottostimata e necessita di una rapida revisione che tenga conto degli aumenti del costo personale e reattivi e soprattutto sia comprensiva di una serie di procedure di controllo di qualità indispensabile per questo test.

Più complessa appare la possibilità di introdurre sistemi automatici di lettura.

In termini di accuratezza anche questi sistemi hanno dimostrato valori sovrapponibili al convenzionale.

I costi aggiuntivi dei sistemi automatici devono essere compensati da chiari risparmi in termini di personale.

Le percentuali di NFR indicate sembrano ancora leggermente sovrastimate e il numero di vetrini da rivedere completamente risulta in alcuni studi particolarmente alto.

Promettente sembra l'impiego del sistema "Location guide screening" con stazione di revisione "Slide Wizard" che dovrebbe permettere una marcata riduzione dei tempi di lettura.

I risultati preliminari di alcuni studi confermano la possibile importanza di questo sistema, anche se vi è la necessità di conferme su casistiche più ampie.

Per i sistemi automatici si ritiene che si debba procedere ad ulteriori valutazioni in particolare relativi ai possibili vantaggi del sistema LGS e ad un miglioramento delle condizioni operative dello stesso.

## **BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE**

### A) Sistemi di lettura assistiti

1. Alasio LM, Alphandery C, Grassi P, Ruggeri M, De Palo G, Pilotti S: Performance of the AutoPap Primary Screening System in the detection of high-risk cases in cervicovaginal smears. *Acta Cytol* 2001; 45(5):704-708.
2. Austin RM: Who should decide how effective cervical cancer screening will be?. *Acta Cytol* 1999; 43(1):4-6.
3. Bartels PH, Vooijs GP: Automation of primary screening for cervical cancer. Sooner or later? *Acta cytol* 1999; 43(1):7-12.
4. Bartels PH: Automated primary screening devices: Expectations for the next generation. *Acta Cytol* 2000; 44(5):703-708.
5. Bibbo M: Computers or Cytotechnologists? An editorial revisited. *Acta Cytol* 1999; 43(1):1.
6. Bibbo M, Hawthorne C: Performance of the AutoPap Primary Screening System at Jefferson University Hospital. *Acta Cytol* 1999; 43(1):29-29.
7. Bibbo M, Hawthorne C, Zimmerman B: Does use of the AutoPap assisted primary screener improve cytologic diagnosis? *Acta Cytol* 1999; 43(1):23-26.
8. Brown AD, Garber AM: Cost-effectiveness of 3 methods to enhance the sensitivity of Papanicolau testing. *JAMA* 1999; 281(4):347-353.
9. Cenci M, Giovagnoli MR, Olla SV, Drusco A, Vecchione A: Automation of cytological analysis of cervical smears. *Minerva Ginecol* 1999; 51(7-8):291-298.

10. Colgan TJ, Bon N, Lee JS, Patten SF Jr: AutoPap 300 QC system scoring of cervical smears without "epithelial cell abnormalities". *Acta Cytol* 1997; 41(1):45-49.
11. Colgan TJ, Smith J, Patten SF Jr, Lee JS: Enhancing the performance of the AutoPap 300 QC system with optimal staining and presentation of cervical smears. *Acta Cytol* 1997; 41(1):50-55.
12. Confortini M, Ciatto S, Bonardi L, Bulgaresi P, Cariaggi MP, Cecchini S, Cipparrone I, Galanti I, Maddau C, Matucci M, Rubeca T, Troni MG, Turco P, Carozzi F: A feasibility study of the use of the AutoPap system as primary screening and location guided rescreening device. Submitted to *Cancer Cytopathology*.
13. Fetterman B, Pawlick G, Koo H, Hartinger J, Gilbert C, Connell S: Determinating the utility and effectiveness of the Neopath AutoPap 300 QC System used routinely. *Acta Cytol* 1999; 43(1):13-22.
14. Lee JS, Kuan L, Oh S, Patten FW, Wilbur DC: A feasibility study of the AutoPap system location-guided screening. *Acta Cytol* 1998;42(1): 221-226.
15. Lee JS, Wilhelm P, Kuan L, Ellison DG, Lei X, Oh S, Patten SF Jr: AutoPap system performance in screening for low prevalence and small cell abnormalities. *Acta Cytol* 1997; 41(1):56-64.
16. McQuarrie HG, Ogden J, Costa M: Understanding the financial impact of covering new screening technologies. The case of automated Pap smears. *J Reprod Med* 2000; 45(11):898-906.
17. Patten SF Jr, Lee JS, Wilbur DC, Bonfiglio TA, Colgan TJ, Richart RT, Cramer H, Moinuddin S: The AutoPap 300 QC System multicenter clinical trials for in quality control rescreening of cervical smears: I. A prospective intended use study. *Cancer* 1997; 81(6):337-342.

18. Patten SF Jr, Lee JS, Wilbur DC, Bonfiglio TA, Colgan TJ, Richart RT, Cramer H, Moinuddin S: The AutoPap 300 QC System multicenter clinical trials for in quality control rescreening of cervical smears: II. Prospective and archival sensitivity studies. *Cancer* 1997; 81(6):343-347.
19. Stevens MW, Milne AJ, James KA, Brancheau D, Ellison D: Effectiveness of automated cervical cytology rescreening using AutoPap 300 QC System. *Diagn Cytopathol* 1997; 16(6):505-512.
20. Wilbur DC, Prey MU, Miller WM, Pawlick GF, Colgan TJ: The AutoPap system for primary screening in cervical cytology. Comparing the results of a prospective, intended-use study routine manual practice. *Acta Cytol* 1998;42(1):214-220.
21. Wilbur DC, Prey MU, Miller WM, Pawlick GF, Colgan TJ: AutoPap system detection of infections and benign cellular changes: results from primary screener clinical trials. *Diagn Cytopathol* 1999; 21(5):355-358.
22. Wilbur DC, Prey MU, Miller WM, Pawlick GF, Colgan TJ: Detection of high grade squamous intraepithelial lesions and tumors using the AutoPap System: results of a primary screening clinical trial. *Cancer* 1999; 87(6):354-358.

#### B) Citologia in fase liquida

1. Ashfaq R A, Gibbons D, Vela C, Saboorian M H, Iliya F: ThinPrep Pap Test. Accuracy for glandular disease. *Acta Cytol* 1999;43:81-85.
2. Bernstein SJ, Sanchez-Ramos L, Ndubisi B: Liquid-based cervical cytologic smear study and conventional Papanicolaou smears: A metaanalysis of prospective studies comparing cytologic diagnosis and sample adequacy. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185:308-317
3. Broadstok M: Liquid-based cytology-an alternative international view. *Cytopathology* 2001;12:141-143.

4. Confortini M, Bulgaresi P, Cariaggi MP, Carozzi MF, Cecchini S, Cipparrone I, Maddau C, Rossi R, Troni FM, Zappa M: Conventional Pap smears and liquid-based cervical cytology smear comparison from the same patient: preliminary results. *Tumori* (In press).
5. Hoerl H D, Shalkham J E, Cheung K, Hurlbert S D, Inhorn SL, Kurtycz FI: Screening parameters for ThinPrep and conventional gynecologic cytology via automated monitoring. *Acta Cytol* 2000; 44:618-624.
6. Hutchinson ML, Zahniser D J, Sherman M E, Herrero R, Alfaro M, Bratti MC, Hildesheim a, Lorincz AT, Greenberg M D, Morales J, Schiffman M: Utility of liquid-based cytology for cervical carcinoma screening. Results of population-based study conducted in a region of Costa Rica with a high incidence of cervical carcinoma. *Cancer* 1999; 87:48-55.
7. Hutchinson ML, Isenstein LM, Goodman A, Hurley A A, Douglass KL, Mui KK, Patten FW, Zahniser DJ: Homogeneous sampling accounts for the increased diagnostic accuracy using ThinPrep processor. *Am J Clin Pathol* 1994; 101:215-219.
8. Lee KR, Darragh TM, Joste N E, Krane JF, Sherman ME, Hurley LB, Allred EM, Manos MM: Atypical glandular cells of undetermined significance (AGUS): Interobserver reproducibility in cervical smears and corresponding thin-layer preparations. *Am J Clin Pathol* 2002; 117:96-102.
9. Papillo J C, Zarka M A, St.John T L: Evaluation of the ThinPrep Pap test in clinical Practice. A seven-Month, 16,314-case experience in Northern Vermont. *Acta Cytol* 1998; 42:203-213.
10. Austin RM: Implementing Liquid-based gynecologic cytology. Balancing marketing, financial and scientific issues. *Cancer Cytopathol* 1998; 4:193-196.
11. Carpenter AB, Davey DD: ThinPrep Pap Test: performance and biopsy follow-up in a university hospital. *Cancer* 1999; 87:105-112.
12. Dupree WB, Suprun HZ, Beckwith DG, Shane JJ, Lucente V: The promise and risk of a new technology: The Lehigh Valley Hospital's experience with liquid-based cervical cytology. *Cancer* 1998; 84:202-207.
13. Kline TS, Davey TS: Liquid-Based Cytology: Where Do We Go from here? *Diagn Cytopathol* 1999; 21:79-80.



## ALLEGATO 1

### Sistemi automatici per la preparazione in strato sottile

#### **Caratteristiche degli strumenti, condizioni operative e costi**

Sono attualmente presenti in Italia tre sistemi automatici per la citologia in fase liquida:

- AutoCytePREP ®
- ThinPrep ®
- CytoSlide ®

#### **Modalità di lavoro**

##### AutocytePREP®

Il prelievo avviene con apposito strumento, la cui punta viene separata dallo stelo e immersa nel fluido conservante.

La conseguente processazione del materiale avviene in tre fasi distinte:

##### **Fase 1 Arricchimento cellulare**

Il processo di arricchimento cellulare combina quello di dispersione per gravità con una centrifugazione, per separare sangue, muco ed altri detriti.

##### **Fase 2 Trasferimento automatico su vetrino**

Il sistema è dotato di una serie di micropipette che trasferiscono una aliquota del materiale da ciascun tubo da centrifuga su appositi vetrini pretrattati.

##### **Fase 3 Colorazione automatica**

Una volta ottenuto sul vetrino lo strato sottile, lo strumento continua il processo in quanto contiene al suo interno i coloranti necessari per la colorazione Papanicolaou.

##### ThinPrep®

Il processo inizia con il prelievo del campione ginecologico da parte del clinico, utilizzando l'apposito dispositivo (Cervex Brush o combinazione spatola di plastica e Cytobrush), che viene immerso e risciacquato in una fiala pre riempita con la soluzione PreservCyt.

Il campione ThinPrep viene quindi chiuso, etichettato ed inviato ad un laboratorio equipaggiato con un processore TP 2000\* o TP 3000\*\*.

In laboratorio, il campione PreservCyt viene inserito nel processore dove viene sottoposto alle seguenti fasi:

### **Fase 1 Dispersione**

Il filtro TransCyt ruota all'interno della fiala campione, creando nel fluido delle correnti in grado di separare i detriti, di disperdere il muco, senza provocare effetti negativi sullo stato delle cellule.

### **Fase 2 Raccolta**

Una lieve pressione negativa è creata all'interno del filtro TransCyt, tale da raccogliere cellule sulla faccia esterna della membrana.

La raccolta delle cellule è controllata dal software del processore che controlla il flusso attraverso il filtro TransCyt.

### **Fase 3 Trasferimento**

Dopo che le cellule sono state raccolte sulla superficie della membrana, il filtro TransCyt viene capovolto e lievemente pressato contro il vetrino.

Un fenomeno naturale di attrazione ed una lieve pressione fanno sì che le cellule aderiscano al vetrino in modo uniforme all'interno di una ben definita area circolare (spot).

### **CytoSlide®**

Commercializzato anche coi nomi *CytoSlip®* o *CytoLab®*

Anche in questo caso i campioni vengono preparati in fase liquida ed inviati al laboratorio. Il sistema non richiede alcuna centrifugazione preparativa e prevede i seguenti passaggi:

- 1) Il filtro viene bloccato su una apposita torretta di filtrazione, tramite un bicchiere di plastica mono o pluriuso.
- 2) La sospensione col campione viene agitata e versata in parte nel bicchiere.
- 3) Viene attivata una filtrazione controllata elettronicamente, al termine della quale il bicchiere viene sbloccato, liberando il filtro.
- 4) Il filtro viene capovolto sul vetrino e vi vengono aggiunte tre gocce di fissativo,
- 5) Sul filtro viene stesa una speciale "blotting paper".
- 6) Il preparato viene lasciato asciugare oppure pressato per 10 sec in una piccola pressa citologica ed immerso nel fissativo.

### \*CARATTERISTICHE PROCESSORE THINPREP 2000®

Il processore ThinPrep 2000 è uno strumento per l'allestimento automatico dei vetrini ThinPrep Pap Test.

Il processore consiste di quattro componenti principali:

- Un sistema meccanico di precisione per i movimenti di fiala campione, filtro e vetrino.
- Un sistema pneumatico per generare una pressione negativa e positiva.
- Una componente elettronica che alimenta motori, valvole e sensori dei sistemi meccanico e pneumatico.
- Un software che, tramite microprocessori, controlla l'intero processo.

L'operatore carica il processore con fiala, vetrino e filtro e avvia lo strumento; il software gestisce automaticamente il processo ed avverte quando il vetrino è pronto.

Il ThinPrep 2000 è inoltre in grado di allestire campioni non-ginecologici quali liquidi pleurici, espettorati, urine, agoaspirati tiroidei e mammari.

Capacità operativa: il ThinPrep 2000 è in grado di processare circa 25 campioni all'ora e, considerando un turno di 8 ore, fino a 50.000 l'anno.

Dimensioni: 46 cm x 38 cm x 50 cm

Peso: 18,6 kg

### \*CARATTERISTICHE PROCESSORE THINPREP 3000®

Il processore ThinPrep 3000 è uno strumento completamente automatico per l'allestimento dei vetrini ThinPrep Pap Test.

Rispetto al modello ThinPrep 2000 questo processore presenta le seguenti caratteristiche:

- Aumento della produttività, grazie alla considerevole riduzione dei tempi di processazione;
- completa automazione, che permette all'operatore di essere impiegato in altre attività;
- controllo automatico dell'abbinamento campione-paziente.

Capacità operativa: il ThinPrep 3000 è in grado di processare 4 lotti da 80 vetrini in un turno di 8 ore e quindi fino ad 80.000 l'anno

Dimensioni: 122 cm x 71 cm x 158 cm

Peso: 254 kg

Lo strato sottile necessita di un adeguato training per il citopatologo, in quanto questo tipo di processazione modifica i parametri citologici e le caratteristiche del fondo dei vetrini, aspetto di grande interesse e rilevanza. Generalmente con un corso teorico-pratico full immersion di tre giorni vengono acquisite le caratteristiche essenziali proprie della citologia in fase liquida.

Il passaggio dalla citologia convenzionale alla citologia in strato sottile richiede comunque una fase di ulteriore training al fine di focalizzare alcune differenze fondamentali legate alla qualità e quantità di cellule, al tipo di aggregazione, al fondo del preparato ecc. Numerosi centri di citopatologia hanno affrontato questo aspetto con la lettura in doppio per i primi 6 mesi.

Lo strato sottile può aumentare il costo del vetrino, fino a 5,2 Euro (circa 10.000 lire), a cui vanno sottratti i costi dei dispositivi di prelievo, perchè a disposizione col contenitore di prelievo. Il tempo necessario per l'allestimento dei preparati è chiaramente superiore al convenzionale e dipende dal tipo di strumento utilizzato.

Il ThinPrep 2000 ed il CytoSlide, ad esempio, richiedono la presenza di un tecnico di laboratorio durante le fasi di allestimento. Lo strato sottile riduce nettamente il numero dei vetrini inadeguati per prelievi particolarmente flogistici od ematici. Durante la processazione vengono, infatti, allontanati quasi completamente gli elementi oscuranti, per cui il vetrino risulta quasi sempre leggibile. Nella pratica comune di un laboratorio di citopatologia, generalmente circa il 5-7% di vetrini risulta inadeguato alla lettura perchè ricoperto da elementi oscuranti. La citologia in strato sottile riduce questa percentuale sotto l'1%, abbattendo quindi i costi iniziali della ripetizione del prelievo, della ricolorazione e riletture del vetrino. Da considerare nella valutazione dei costi è che il citopatologo dovrà leggere con lo strato sottile solo una zona concentrata in un cerchio o in un rettangolo di cellule priva di elementi oscuranti e con cellule ben conservate che mettono perfettamente in evidenza le caratteristiche morfologiche. Questo permette una riduzione nei tempi di lettura rispetto alla lettura del vetrino allestito nella maniera tradizionale.

## SISTEMI AUTOMATICI DI LETTURA

### Caratteristiche degli strumenti, condizioni operative e costi

#### AutoPap

Il sistema AutoPap analizza vetrini di Pap test cervico-vaginali preparati convenzionalmente. Recentemente l'FDA ha approvato la lettura automatica di Pap test in strato sottile preparati con procedure Autocyte.

Il sistema AutoPap acquisisce immagini all'interno di una stretta finestra di spettro a banda larga compreso tra 560 nm e 580 nm. E' quindi molto importante che il voltaggio venga mantenuto costante.

\*La temperatura ambientale deve essere mantenuta costante e in ogni caso inferiore ai 30 gradi.

\*L'ambiente di lavoro deve essere pulito e privo di polvere che può danneggiare l'apparecchio e/o inficiare la corretta lettura.

Per essere processato con successo uno striscio deve soddisfare certi requisiti fisici e di colorazione.

#### Requisiti fisici:

	LUNGHEZZA	LARGHEZZA	SPESSORE
VETRINO PORTAOGGETTI	74.7-76.5	24.7-.26.5	0.85-1.2
VETRINO COPRIOGGETTI	38.7-61.3	21.5-26.5	0.14-0.25

Requisiti di colorazione: Il sistema AutoPap è un sistema di screening citologico automatico che esamina strisci cervico-vaginali colorati con la tecnica Papanicolaou. Sebbene il sistema AutoPap sia compatibile con un ampio numero di procedure di colorazione, non è compatibile con tutti i metodi di colorazione in uso correntemente. Una certa variabilità nella colorazione dei vetrini è legata alla preparazione e alla tecnica di colorazione. In un recente studio (Colgan T.J. et al) si è dimostrato che ottimizzando la procedura di colorazione di Papanicolaou, cioè utilizzando un doppio tempo di colorazione con ematossilina e utilizzando ematossilina di Gill, si può ridurre il numero di vetrini non letti per difetti nella colorazione dal 7% al 2%.

Montaggio: Il montaggio deve essere preferibilmente fatto a mano, utilizzando un coprioggetto di vetro e un montante con un indice di rifrazione di circa 1,5255.

Pulizia dei vetrini: Come dimostrato dall'articolo di Colgan et al una delle principali cause della mancata lettura da parte dell'apparecchio è la presenza di sporcizia o polvere sul vetrino; è quindi molto importante accertarsi che i vetrini non presentino polvere o sporcizia sulla superficie prima della lettura.

### Problematiche:

- IL bordo del coprioggetto può originare interferenze ottiche con la lettura dell'apparecchio. Per evitare queste interferenze, il sistema AutoPap inizia la lettura 1.3 mm dal bordo del coprioggetto stesso.
- E' opportuno evitare la formazione di bolle durante la fase di montaggio del vetrino. Le bolle e uno spessore eccessivo del mezzo montante possono inficiare la lettura.
- La presenza di polvere nell'ambiente o sul vetrino può invalidare la corretta lettura.

### TEMPI DI LETTURA, ANALISI CARICHI DI LAVORO E TRAINING NECESSARIO PER OPERARE IN ROUTINE)

Lo strumento opera in completa automazione ed autonomia, 24 ore su 24. L'intervento umano consiste nel mettere i vetrini nell'apposito contenitore da 8 (36 supporti). Fatto ciò, l'AutoPap si avvia automaticamente e termina l'analisi di 288 vetrini nell'arco di circa 30 ore.

In dotazione con lo strumento ci sono 36 vassoi per un totale di 288 vetrini. Questi possono essere caricati nello strumento tutti insieme.

Per caricare i vetrini nei 36 vassoi sono necessarie due ore lavorative. L'operatore una volta inseriti i vetrini nei vassoi deve assicurarsi che aderiscano perfettamente all'alloggiamento sfiorando il vassoio al termine del caricamento e ripulendolo perfettamente con un pennellino in dotazione. Questo permette di non sporcare le lenti del microscopio. Sono necessarie altre due ore lavorative per scaricare i vetrini dai vassoi. I vetrini da non rivedere devono essere separati dai vetrini da mappare. Mappandoli sulla base della stampa eseguita dall'apparecchio, si ridisegnano sul vetrino i campi cerchiati rilevati (altre 2 ore lavorative). I vetrini riposti sui fogli di mappa vengono così passati al citopatologo per la lettura. Per la preparazione dei vetrini serve in definitiva un operatore dedicato, che necessita del training di una giornata lavorativa.

In linea teorica un lettore automatico esamina 230 vetrini in 24 ore, cioè circa 66.000 per 6 giorni lavorativi. In condizioni ottimali ne seleziona il 25% da non rivedere pari a 16.500 vetrini. I restanti 49.500 sono da rileggere dal citopatologo con i campi cerchiati ed un quintile di riferimento da 5 a 1 a seconda della gravità selezionata dall'apparecchio. Il quintile 1 corrisponde al grado maggiore di gravità. Inoltre tra i vetrini da rivedere c'è un 10% di vetrini QC Review cioè sono i vetrini con la maggiore probabilità di anomalie. Questi vetrini sostituiscono il 10% random del tradizionale CDQ obbligatorio negli Stati Uniti.

La lettura dei soli i campi cerchiati è sufficiente quando non si rilevano atipie. In questo caso l'assenza di atipie all'interno dei cerchi viene considerata come

garanzia di assenza in tutto il vetrino. Nel caso in cui sia presente anche una sola cellula che pone un minimo dubbio diagnostico il vetrino deve essere letto per intero. Il risparmio di tempo dipende chiaramente dal numero di casi che devono essere riletti completamente. Supponendo quindi che ci sia un 25% di NFR, con un risparmio del 50% nella lettura delle sole mappe e che a regime siano riletti completamente il 20% dei casi, il risparmio complessivo nella lettura è quantizzabile in circa il 50% del tempo lavoro.

Deve essere sottolineato che questo non rappresenta un risparmio del 50% del tempo lavoro di un citologo, in quanto esso comprende una serie di attività quali ad esempio CDQ o valutazione degli atti pregressi o comunque tempo dedicato all'analisi del caso, che sono identici sia in lettura convenzionale che automatica.

L'introduzione dello *Slide Wizard*, cioè della STAZIONE DI REVISIONE, può ulteriormente ridurre i tempi di lettura.

Lo *Slide Wizard* è composto da un server (database) collegato all'AutoPap, una o più STAZIONI di REVISIONE (*Slide Wizard*) collegate al server in rete oppure via modem. La lettura dei dati può avvenire anche tramite FD o CD. Tali caratteristiche permettono un uso flessibile ed ampiamente adattabile ad ogni tipo di esigenza, soprattutto nei casi in cui lo strumento di lettura (AutoPap) serve più laboratori di citopatologia. Questo permette anche di inviare e discutere le immagini a distanza con la possibilità di organizzare un CDQ a distanza.

Prendendo in considerazione la possibilità di servirsi del lettore (AutoPap) a distanza, il fruitore del servizio invierà i vetrini al laboratorio ove è installato l'AutoPap, che gli verranno restituiti con allegato il supporto di memoria in cui sono registrati i dati di ciascun vetrino (dati acquisibili anche via modem), che potranno essere rivisti sulla stazione di revisione (sia al microscopio sia su monitor).

In questo caso valgono le stesse considerazioni fatte a proposito dell'utilità del sistema inserito in programmi di screening su area medio-vasta. In questo caso risulta evidente il vantaggio derivante dalla possibilità di collegare i vari Centri coinvolti nel programma per un controllo di qualità a distanza, pur lasciando la necessaria autonomia diagnostica agli stessi, agevolando la lettura finale dei test, sia in termini di velocità che di precisione.