

Determinazione delle infezioni cervicovaginali nelle pazienti con colpocitologia anormale: correlazione con i quadri colposcopici

C. Canzio, C. Franco, A. Lukic, M. Moscarini

Il Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Roma "La Sapienza", Ospedale Sant'Andrea

La Colposcopia in Italia Anno XIX – N. 3 pagg. 21-24

Introduzione

Il Papilloma Virus Umano (HPV) è uno dei più comuni patogeni sessualmente trasmessi ed è fortemente associato con lesioni preneoplastiche e neoplastiche della cervice uterina. È stato proposto che la sola infezione da HPV potrebbe non essere sufficiente per la completa induzione della carcinogenesi cervicale e che altri co-fattori potrebbero essere coinvolti, quali il fumo di sigaretta, i contraccettivi orali, l'immunosoppressione, il deficit di vitamine, le altre malattie sessualmente trasmesse e il fattore maschile (Bornstein J et al., 1995). Molti agenti patogeni sono stati studiati sia come fattore di rischio che come co-fattori di HPV nello sviluppo delle lesioni precancerose e cancerose della cervice uterina, con la conclusione che alcuni agenti sessualmente trasmessi potrebbero essere responsabili dello sviluppo di lesioni cervicali sia direttamente, sia mediante la produzione di metaboliti o altre sostanze carcinogenetiche, sia aumentando la suscettibilità dell'epitelio infiammato (Bornstein J et al., 1995). Se Herpes Simplex Virus (HSV) sia implicato nello sviluppo delle lesioni cervicali è stato per lungo tempo oggetto di discussione; i più recenti studi molecolari non sono riusciti a dimostrare in maniera convincente l'associazione tra infezione da HSV e lesioni cervicali (Vecchione A et al., 1994; Koffa M et al., 1995). Non esiste alcuna evidenza in letteratura che suggerisca una correlazione tra la *Neisseria Gonorrhoeae* (NG) e le anomalie citologiche cervicali (Boyle DCM et al., 1999). La possibile associazione del *Trichomonas Vaginalis* (TV) con le lesioni cervicali è stata studiata a partire dagli anni '50.

Zhang e Begg (1994) hanno mostrato un rischio relativo (RR) pari a 1.93, indicando un rischio doppio di sviluppare lesioni intraepiteliali in presenza di TV. Nonostante ciò il meccanismo esatto con il quale il TV esercita la sua influenza è ancora oscuro (Boyle DCM et al., 1999). Il ruolo dell'infezione da *Chlamydia Trachomatis* (CT) come fattore di rischio nello sviluppo delle lesioni cervicali è piuttosto controverso. Una forte evidenza epidemiologica suggerisce che l'infezione combinata di HPV e CT gioca un ruolo centrale nell'eziologia delle lesioni intraepiteliali della cervice uterina e rappresenta un rischio per il successivo sviluppo della neoplasia cervicale invasiva quando associata con altri fattori, quali fumo di sigaretta e promiscuità sessuale (Smith JS et al., 2002). Altri autori suggeriscono invece che l'infezione da HPV o da CT siano fattori che si verificano indipendentemente e che non vi sia alcuna associazione tra i due nella patogenesi delle lesioni intraepiteliali della cervice (Edelman M et al., 2000). La possibile correlazione tra la Vaginosi Batterica (VB) e le lesioni intraepiteliali della cervice è stata postulata sin dagli anni '70. Platz-Christensen et al. (1994) nel 5% delle donne con VB e nell'1.4% delle donne senza VB, con un RR pari a 8.0. Eltabbakh GH et al. (1995) hanno trovato che il 50% delle donne che presentavano anomalie cervicali al Pap-test avevano una infezione cervico-vaginale, il 28% delle quali erano vaginosi batteriche. Peters N et al. (1995) non hanno trovato invece alcuna correlazione tra VB e lesioni intraepiteliali. In particolare i risultati ottenuti da alcuni autori (Guijon FB et al., 1992; Pisani S et al., 1998) hanno dimostrato che le donne con anomalie citologiche cervicali presentavano con maggior frequenza infezione da *Mycoplasma Hominis* e *Ureaplasma Urealyticum*. Alla luce di queste evidenze sarebbe opportuno sottoporre le pazienti che presentano PAP test anormale ad indagine microbiologica cervico-vaginale per la ricerca di germi potenzialmente patogeni. Inoltre, tale procedura dovrebbe essere a nostro avviso sempre effettuata

prima di ogni trattamento delle SIL, ma ancora di più nei casi di persistenza o recidiva del Papillomavirus. Scopo di questo lavoro è valutare l'esistenza di una correlazione tra infezioni cervicovaginali e lesioni preneoplastiche della cervice uterina, mediante la determinazione della prevalenza dei singoli microrganismi nei vari gruppi citologici.

Materiale e metodi

Tra le pazienti afferite all'ambulatorio di Colposcopia e Patologia Cervico-vaginale dell'Ospedale Sant'Andrea, II Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli studi di Roma "La Sapienza", nel periodo Marzo 2003 - Settembre 2003, è stato selezionato un campione di 73 pazienti con colpocitologia anormale, sessualmente attive, asintomatiche, di età compresa tra 18 e 65 anni, non in gravidanza e negative per HIV, non in terapia antibiotica e/o terapia topica da almeno un mese. Consenso informato è stato ottenuto da tutte le donne partecipanti allo studio. Le pazienti sono state suddivise, a seconda del referto citologico, in 3 gruppi di studio: 14 presentavano Cellule Squamose Atipiche di Significato Indeterminato (ASCUS), 48 Lesione Intraepiteliale Squamosa di Basso Grado (L-SIL), 11 Lesione Intraepiteliale Squamosa di Alto Grado (H-SIL). Tutte le pazienti sono state sottoposte ad esame colposcopico e prelievo esoendocervicale e vaginale per analisi molecolare e microbiologica. In particolare è stata effettuata la ricerca di HPV-DNA, di Mycoplasmi, di Chlamydia Trachomatis, di miceti e di germi comuni nel secreto cervico-vaginale. In tutti i casi l'esame colposcopico è stato effettuato dallo stesso operatore che ha valutato, prima di effettuare i prelievi per tamponi cervicovaginali, la presenza dei segni colposcopici di flogosi. Per l'esecuzione dell'esame colposcopico sono state impiegate nell'ordine soluzione fisiologica, soluzione di acido acetico al 3% e soluzione iodo-iodurata di Lugol per il Test di Schiller. I quadri colposcopici sono stati classificati in conformità con l'ultima Classificazione Colposcopica Internazionale IFCPC 2002 (Walker P et al., 2003) e hanno permesso di identificare 3 sottogruppi di pazienti:

- 1 Quadro colposcopico normale (epitelio squamoso nativo, ectropion, zona di trasformazione normale) con o senza segni colposcopici di flogosi (leucoxantorrea; all'applicazione di acido acetico corion congesto, epitelio sottile, eritematoso, vasi dilatati a grossi punti rossi; al Test di Schiller portio a pelle di leopardo);
- 2 Quadro colposcopico anormale di grado 1 (G1) con o senza segni colposcopici di flogosi;
- 3 Quadro colposcopico anormale di grado 2 (G2) con o senza segni colposcopici di flogosi.

La ricerca del DNA del Papillomavirus umano è stata referata come negativa o positiva per HPV a Basso Rischio

(virotipi 6, 11, 42, 43, 44, 53 e 54) e ad Alto Rischio oncogenico (virotipi 16, 18, 31, 33, 35, 39, 51, 52,) ed è stata eseguita mediante Polymerase Chain Reaction (PCR). La tecnica (Diatech HPV STAR BLOT) si basa sulla reazione di ibridazione di un amplificato con sonde oligonucleotidiche sequenza-specifiche (SSOP). Il materiale biologico per l'analisi molecolare è stato prelevato con la spatola di Ayre per il campionamento dell'esocervice ed il cytobrush per il campionamento dell'endocervice. La ricerca di Mycoplasma Hominis/Ureaplasma Urealyticum è stata effettuata mediante esame colturale del materiale raccolto. Il prelievo è stato effettuato sia a livello endocervicale, inserendo un tampone nell'endocervice per circa 1 cm che a livello esocervicale. Per la ricerca di Chlamydia Trachomatis è stato utilizzato l'apposito vetrino per l'esecuzione dell'Immunofluorescenza diretta con anticorpi monoclonali marcati con fluoresceina (IFD). Il prelievo è stato effettuato a livello endocervicale, inserendo il tampone oltre la giunzione squamocolumnare. La ricerca di Miceti e Germi comuni è stata realizzata mediante esame colturale del materiale raccolto, mentre la ricerca di Trichomonas Vaginalis è stata realizzata mediante osservazione microscopica a fresco del secreto cervicovaginale, raccolto dal fornice posteriore vaginale mediante tamponi sterili.

Risultati

Del gruppo "ASCUS" 71,4% delle pazienti presentavano colposcopia negativa, di cui il 50% con segni di flogosi, mentre il restante 28,6% era positivo per trasformazione anormale (ANTZ)-G1; la ricerca dell'HPV-DNA del secreto eso-endocervicale è risultata negativa nel 64,3% dei casi con ASCUS, positiva per HPV-DNA basso rischio nel 21,4% e positiva per HPV alto rischio nel 14,3% (Figura 1); l'esame microbiologico del secreto cervico-vaginale positivo per Mycoplasmi nel 14,5%, per miceti nel 7,4%, per Streptococcus Agalactiae nel 20,5%, per Enterococchi nel 14,5% dei casi, per infezione multipla (Chlamydia Trachomatis + Streptococcus Agalactiae; Mycoplasmi + Candida) nel 14,5% e negativo per infezioni cervicovaginali nel 28,6% dei casi con PAP test deponente per ASCUS (Figura 2).

Delle 48 pazienti con citologia deponente per L-SIL all'esame colposcopico il 29,2% presentava un quadro normale, di cui il 12,5% con segni di flogosi, il 60,4% ANTZ-G1, il 6,3% ANTZ-G1 con segni di flogosi, il 4,1% ANTZ-G2; la ricerca del DNA virale è risultata negativa per HPV-DNA nel 35,2% dei casi, positiva per HPV-DNA basso rischio nel 6,5%, positiva per HPV-DNA alto rischio nel 37,5%, positiva per HPV-DNA basso e alto rischio nel 20,8% (Figura 1), positiva per Mycoplasmi nel 25%, per

Figura 1 - Correlazione tra referti citologici e genotipi di HPV

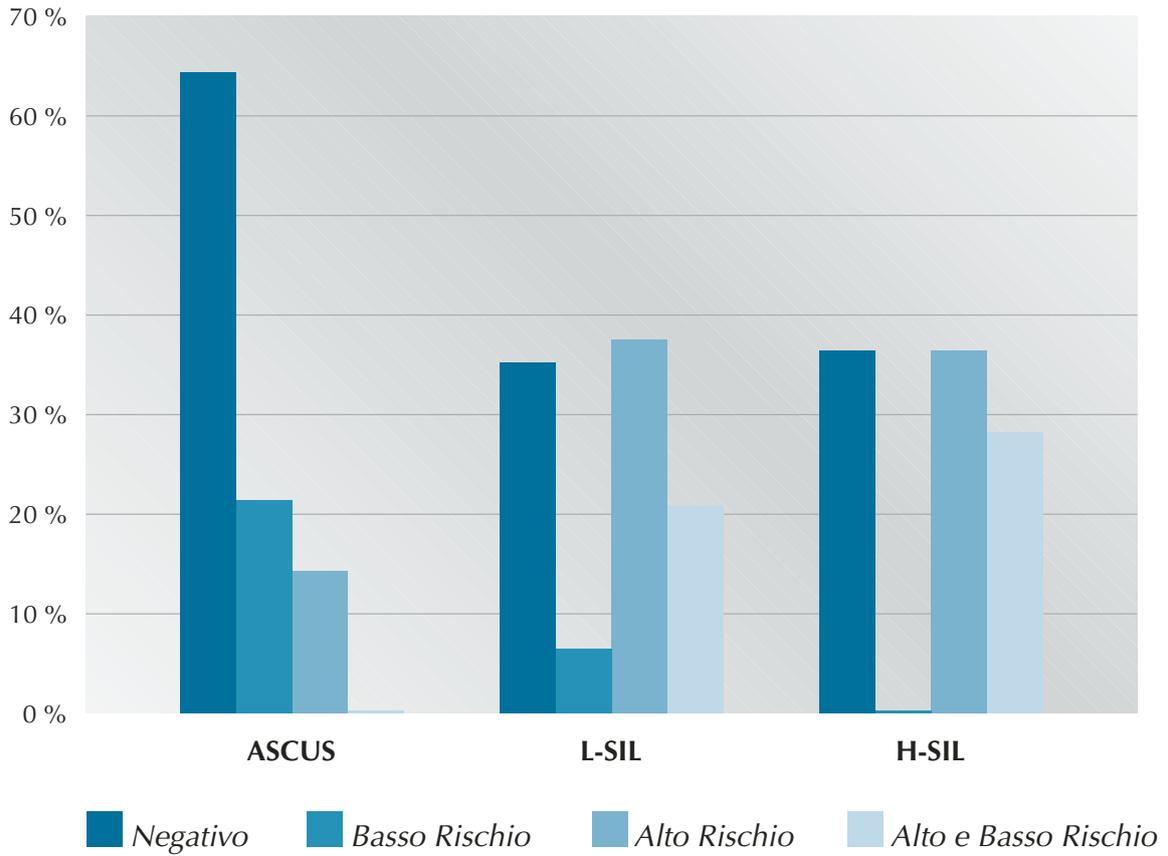
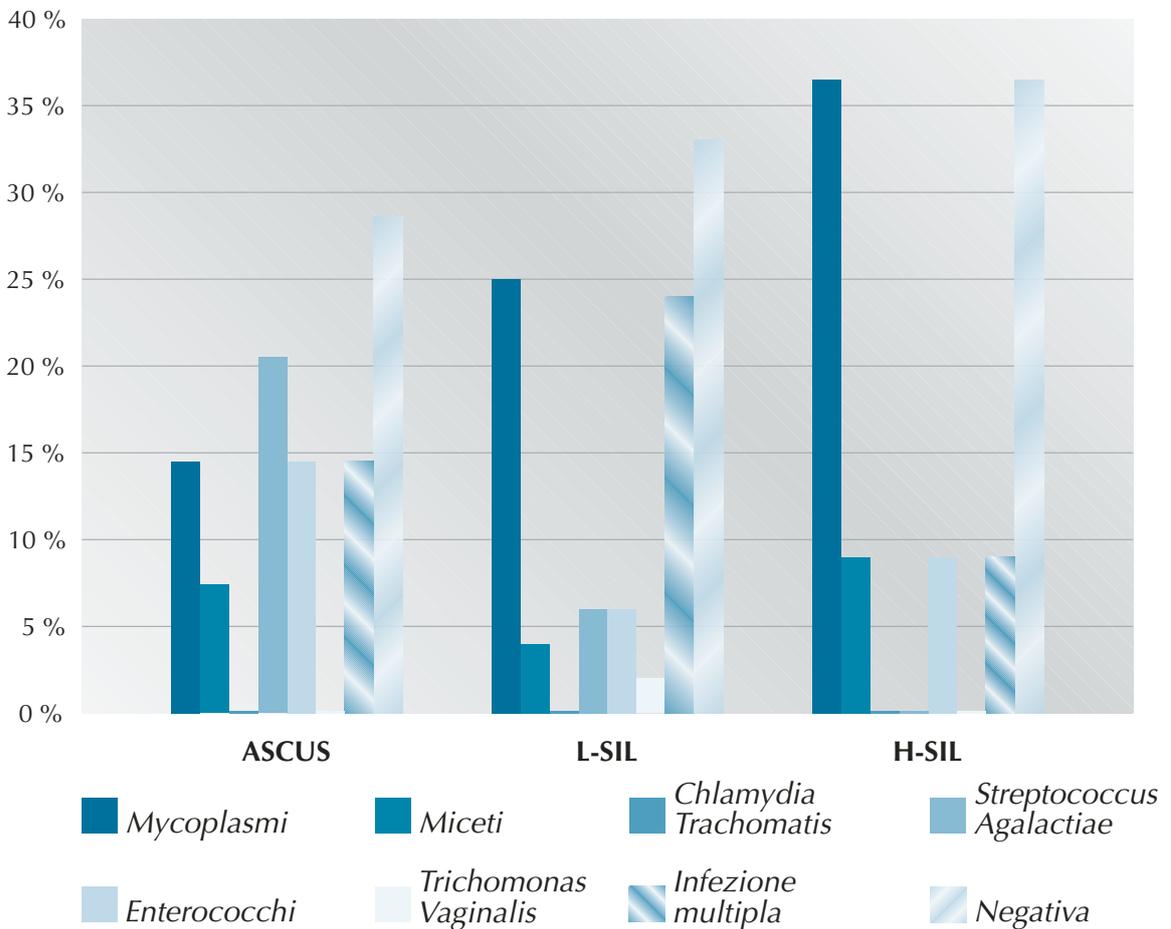


Figura 2 - Correlazione tra referti citologici e microrganismi isolati



miceti nel 4%, per Streptococcus Agalactiae nel 6%, per Enterococchi nel 6%, per Trichomonas Vaginalis nel 2%, per infezione multipla (Mycoplasmi + Chlamydia Trachomatis + Trichomonas Vaginalis; Mycoplasmi + Chlamydia Trachomatis + Enterococchi; Mycoplasmi + Chlamydia Trachomatis; Mycoplasmi + Miceti; Mycoplasmi + Streptococcus Agalactiae) nel 24% e negativa per infezioni cervicovaginali nel 33% dei casi con referto citologico di L-SIL (Figura 2).

Del gruppo H-SIL il 18.2% delle pazienti presentava un quadro normale, tutte con segni di flogosi, il 27.3% ANTZ-G1 e 54.5% ANTZ-G2 senza segni di flogosi; la ricerca del DNA virale è risultata negativa per HPV-DNA nel 36.4%, positiva per HPV-DNA alto rischio nel 36.4%, positiva per HPV-DNA basso e alto rischio nel 28.2% delle pazienti (Figura 1), positiva per Mycoplasmi nel 36.5%, per miceti nel 9%, per Enterococchi sempre nel 9%, per infezione multipla (Mycoplasmi + Miceti) nel 9% e negativa per infezioni cervico-vaginali nel 36,5% delle colposcopie richieste per referto citologico di H-SIL (Figura 2).

Discussione e conclusione

I nostri dati relativi alla correlazione citologia-colposcopia mettono in evidenza che circa il 71.4% dei casi di ASCUS presenta un quadro colposcopico normale con o senza segni di flogosi, percentuale significativamente superiore a quella osservata nel gruppo L-SIL (29.2%) e H-SIL (18.2%). L'elevata percentuale di quadri colposcopici "normali" con flogosi (18.2%) tra le pazienti con citologia deponente per SIL di alto grado è dovuta ad un quadro colposcopico insoddisfacente. Inoltre il 27.3% del gruppo H-SIL citologico presenta quadri di ANTZ-G1 dovuto all'estensione topografica delle lesioni che risultano tutte endo-

esocervicali.

La correlazione tra i referti citologici e la ricerca microbiologica ci permette di osservare che la percentuale di negatività di HPV-DNA dei casi con ASCUS (64%) risulta nettamente superiore a quella osservata per il gruppo L-SIL (35%) e H-SIL (36%) e che in nessun caso di ASCUS si riscontra la presenza contemporanea di HPV-DNA alto e basso rischio oncogenico, riscontrata invece nel 20% dei casi di L-SIL e nel 28% dei casi di H-SIL. La percentuale di positività di HPV-DNA a basso rischio oncogenico decresce nei tre gruppi citologici, passando da 21% per ASCUS al 6% per L-SIL e allo 0% per H-SIL, mentre si osserva un andamento inverso per la positività dell'HPV-DNA ad alto rischio oncogenico (dal 14% nell'ASCUS al 37% e 36% rispettivamente nel L-SIL e H-SIL). Nel 71% dei casi con ASCUS, nel 67% con L-SIL e nel 63% con H-SIL è stata osservata la presenza patologica di almeno un microorganismo nel prelievo cervicovaginale. Il germe più frequentemente isolato nei gruppi H-SIL e L-SIL è Mycoplasma, mentre nel gruppo ASCUS è Streptococcus Agalactiae. Tra le infezioni miste il 67% dei casi di ASCUS riguarda la contemporanea presenza di HPV con due o più germi (infezione multipla); il 46% di L-SIL e il 75% di H-SIL presenta una significativa associazione tra HPV e Mycoplasmi; il 36% di L-SIL e 25% di H-SIL presenta più frequentemente i Mycoplasmi tra i patogeni isolati nelle infezioni multiple.

In conclusione, l'associazione di microrganismi più frequentemente riscontrata tra le pazienti con PAP test anormale riguarda HPV e Mycoplasmi (il 33% dei casi di ASCUS; il 46% di L-SIL e il 75% di H-SIL). Tale associazione va intesa come risultato di una infezione da Mycoplasmi in presenza di una lesione cervicale HPV-correlata. Questo dato concorda con i dati della letteratura (Guijon FB et al., 1992; Pisani S et al., 1998).

Bibliografia

- Bornstein J., Rahat M.A., Abramovici H. Etiology of cervical cancer: current concepts. *Obstet Gynecol Surv*, 1995; 60: 146-154.
- Vecchione A., Cermele C., Giovagnoli M. p53 expression and genetic evidence for viral infection in intraepithelial neoplasia of the uterine cervix. *Gynecol Oncol*, 1994; 55: 343-348.
- Boyle D.C.M., Smith J.R. Infection and cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Cancer*, 1999; 9: 177-186.
- Zhang Z., Begg C. Is *Trichomonas vaginalis* a cause of cervical intraepithelial neoplasia? Results from a combined analysis of 24 studies. *Int J Epidemiol*, 1994; 23: 682-690.
- Smith J.S., Munoz N., Herrero R. et al. Evidence for *Chlamydia trachomatis* as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. *J Infect Dis*, 2002; 185: 324-331.
- Edelman M., Fox A., Alderman E., et al. Cervical papanicolaou smear abnormalities and *Chlamydia trachomatis* in sexually active adolescent females. *J Pediatr Adolesc Gynecol*, 2000; 13: 65-69.
- Platz-Christensen J., Sundstrom E., Larsson P. Bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1994; 73: 586-588.
- Eltabbakh G.H., Eltabbakh G.D., Broekhuizen F.F., et al. Value of wet mount and cervical cultures at the time of cervical cytology in asymptomatic women. *Obstet Gynecol*, 1995; 85: 499-503.
- Peters N., Van Leeuwen A.M., Pieters W.J.L.M., et al. Bacterial vaginosis is not important in the etiology of cervical neoplasia: a survey on women with dyscaryotic smears. *Sex Transm Dis*, 1995; 22: 296-302.
- Guijon F., Paraskevas M., Rand F., et al. Vaginal microbial flora as a cofactor in the pathogenesis of uterine cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Obstet*, 1993; 37: 185-191.
- Pisani S., Gallinelli C., Seganti A., et al. Detection of viral and bacterial infections in women with normal and abnormal colposcopy. *Eur J Gynecol Oncol*, 1999; 20: 69-73.
- Walker P., Dexeus M.S., De Palo G., et al. International terminology of colposcopy: an updated report from the International Federation for cervical pathology and colposcopy. *Obstet Gynecol*, 2003; 101: 75-77.