



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA



Dottorato di Ricerca in
TECNOLOGIE AVANZATE IN CHIRURGIA (XXXI ciclo)
Coordinatore Ch.mo Prof. Vito D'Andrea

TESI DI DOTTORATO

(Curriculum: Tecnologie Avanzate in Chirurgia)

**Valutazione del ruolo e dell'efficacia dell'anoscopia ad alta risoluzione (HRA)
come strumento di screening delle precancerosi anali e di diagnosi precoce
del cancro anale nelle popolazioni ad alto rischio**

Relatore
Ch.mo Prof. Vito D'Andrea

Dottorando
Dr Manuel Giofrè

a.a. 2017/2018

INDICE

Introduzione

1. Il Carcinoma a Cellule Squamose dell'Ano.

1.1 Eziopatogenesi del cancro anale e popolazioni ad alto rischio

1.2 Le lesioni precancerose anali

1.3 Progressione AIN – SCC e diagnosi precoce

2. Metodologie di screening del cancro dell'ano

3.1 Esame digitale ano-rettale (DARE)

3.2 Pap-test anale

3.3 HPV-DNA test

3. Anoscopia ad alta risoluzione (High resolution anoscopy, HRA)

4.1 HRA – Procedura

4.2 HRA – Diagnosi e trattamento delle lesioni precancerose

4.3 HRA – Standard qualitativi

Standard di qualità dei servizi correlati non l'HRA

Criteri descrittivi per HRA

4. Materiali e Metodi

Reclutamento pazienti

Pap-test anale

HPV-test

Anoscopia ad alta risoluzione (HRA) con biopsia

Diagnosi istologica

Algoritmo di screening

5. Risultati

6. Discussione

7. Conclusioni

Figure

Bibliografia

Introduzione

Il cancro dell'ano (CA) comprende l'insieme delle patologie neoplastiche maligne derivanti dagli epitelii squamosi e ghiandolari dell'ano. La grande maggioranza è rappresentata da carcinomi a cellule squamose (*squamous cells carcinoma*, SCC). Nel corso della successiva trattazione si useranno i termini cancro dell'ano, o CA, e carcinoma a cellule squamose, o SCC, in maniera interscambiabile. Il CA viene considerato una neoplasia rara nella popolazione generale, ma ad esso sono associate elevata morbidità e pessima prognosi.

Storicamente il SCC ha ricevuto scarsa attenzione a causa della sua rarità. Si stima una incidenza di circa 1-2 nuovi casi su 100000 abitanti per anno nella popolazione generale (1). Il *National Cancer Institute* ha stimato negli Stati Uniti una incidenza annua pari a 1,8 casi/100000 abitanti (2) e una mortalità annuale di 0,3/100000 abitanti, con una sopravvivenza del 67,4% a 5 anni calcolata nel periodo 2008-2014 (2). I dati sono simili per il Regno Unito, dove il tasso di incidenza è pari a 1,4 casi/100.000 tra gli uomini e 2,4/100.000 tra le donne ogni anno (3). Il CA rappresenta tra l'1,5 e il 2,7% dei tumori maligni dell'apparato gastroenterico (4,5) e circa lo 0,4% di tutte le nuove diagnosi di cancro (2). Il tasso di incidenza del carcinoma anale invasivo negli Stati Uniti è, però, aumentato di circa 1,9 volte per gli uomini e di 1,5 volte per le donne confrontando i periodi 1973-1979 e 1994-2000 (6,7,8) e ha continuato ad aumentare ad un tasso del 2,9% annuo dal 1992-2001 (9). Attualmente si prevedono globalmente circa 20000 nuovi casi per anno, con distribuzione sovrapponibile per sesso (10) o, secondo alcune statistiche, con prevalenza nelle donne (2). In Europa sono diagnosticati circa 2000 nuovi casi nei maschi e 2300 nelle femmine ogni anno (3). Il CA è una neoplasia correlata al papilloma virus umano (HPV) la cui infezione, in presenza di determinate condizioni favorevoli, innesca un processo di trasformazione oncogenica e progressione neoplastica.

Il CA, sebbene raro nella popolazione generale, ha una incidenza drammaticamente elevata in specifiche popolazioni. Sono stati infatti individuati dei fattori di rischio che intervengono nella patogenesi in maniera determinante: la sieropositività per il virus dell'immunodeficienza acquisita (HIV), le condizioni di immunodepressione e le abitudini di sessualità promiscua, in particolare in relazioni ai rapporti anali passivi. Ne deriva che tra gli uomini omosessuali (*men who have sex with men*, MSM) e i pazienti HIV-positivi alberga il maggior rischio di sviluppare il SCC. L'incidenza è di 30 casi su 100000 abitanti tra le donne HIV-positive e negli MSM HIV-positivi è maggiore di 50-70 volte rispetto la popolazione generale raggiungendo i 131 casi su 100000 abitanti ogni anno (11).

Il CA condivide con il cancro della cervice uterina la correlazione con il papilloma virus e le tappe della progressione cito-istopatologica. La diagnosi precoce delle displasie precancerose è alla base dei successi ottenuti storicamente nel campo della prevenzione del cancro cervicale. Attingendo da questa esperienza scientifica e clinica sono stati ipotizzati ed elaborati dei programmi di screening delle lesioni precancerose del cancro dell'ano.

Attualmente non ci sono programmi di prevenzione del CA condivisi tra le società scientifiche. La rarità della neoplasia, e la necessità di lunghi tempi per raccogliere adeguati follow-up dei pazienti sottoposti a screening, non hanno permesso di disporre ancora di dati definitivi sull'efficacia delle metodologie proposte.

L'orientamento più diffuso e promettente è quello di applicare nelle popolazioni ad alto rischio un algoritmo che parta dall'esecuzione del pap-test anale per selezionare i pazienti a rischio di lesione squamosa. I pazienti con esame citologico positivo sono sottoposti ad anoscopia ad alta risoluzione (*high resolution anoscopy*, HRA), che rappresenta una applicazione della colposcopia all'ano. Attraverso la HRA è possibile identificare le lesioni squamose displastiche e trattarle precocemente.

L'obiettivo della ricerca analizzata in questa tesi è la valutazione del ruolo e dell'efficacia della HRA nello screening delle lesioni displastiche anali. In uno studio prospettico, presso il centro HIV/IST

dell'Istituto Dermatologico San Gallicano e la UOC Chirurgia Oncologica dell'Apparato Digerente e del Peritoneo dell'Istituto Regino Elena – IFO di Roma, per un periodo di 3 anni, tutti i pazienti appartenenti a popolazioni ad alto rischio per lo sviluppo del cancro anale (in particolare MSM e pazienti HIV-positivi) sono stati sottoposti ad esame citologico anale. I pazienti risultati non-negativi sono stati sottoposti ad anoscopia ad alta risoluzione e alle metodiche alternative proposte per il rilevamento delle precancerosi anali.

Analizzati i dati, è stata valutata l'accuratezza diagnostica della HRA e confrontata con le altre procedure.

Sono stati valutati i risultati ottenuti nel programma di screening e sono state analizzate le correlazioni tra le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti e il grado delle displasie identificate. Infine è stata analizzata l'evoluzione nel tempo delle diagnosi riscontrate al fine di valutare la curva di apprendimento dell'anoscopia ad alta risoluzione.

1. Il Carcinoma a Cellule Squamose dell'Ano.

1.1 Eziopatogenesi del cancro anale e popolazioni ad alto rischio

La conoscenza dell'eziopatogenesi del CA è necessaria per elaborare adeguati programmi di screening, scegliere i target di popolazione corretti ed eseguire e valutare le metodiche in studio come la anosopia ad alta risoluzione.

Il 90% dei casi di cancro dell'ano, in gran parte rappresentati da carcinomi squamosi, è legata all'infezione da papillomavirus umano (HPV) (12). Una indagine effettuata su casi raccolti da tutto il mondo ha evidenziato la presenza dell'HPV nell'84% dei campioni (13), e la presenza dell'HPV-16, il genotipo con il più elevato potenziale oncogeno, in circa l'81% dei campioni, seguito dall'HPV-18 (3,6%) (14).

I papillomavirus umani possono infettare l'epitelio di pelle e mucosa. Si verificano frequentemente infezioni da HPV nel tratto anogenitale e nella regione della testa e del collo. Tutte le abitudini di sessualità promiscua espongono ad infezioni ripetute di vari ceppi di HPV ed in particolare i rapporti sessuali anali passivi sono maggiormente a rischio per contrarre l'infezione e correlati alle relative manifestazioni cliniche. La popolazione più esposta allo sviluppo di precancerosi e neoplasie anali è quella rappresentata da maschi che hanno rapporti sessuali con altri maschi (*men who have sex with men*, MSM).

Alcuni tipi di HPV sono detti "ad alto rischio" (high grade HPV, HG-HPV), poiché posseggono la capacità di trasformare le cellule infettate; in una minoranza di persone con infezione da HPV si sviluppano lesioni precancerose o carcinomi invasivi nel corso della vita, anche dopo mesi o anni di esposizione persistente ad infezioni da HPV oncogeni.

La prevalenza di infezioni da HPV oncogeni nella popolazione adulta in Europa e nel Nord America è stimata nel 2% (orale), 13% (anale) e 15% (genitale) nelle donne e 6% (anale) e 7% (orale) al 12% (genitali) negli uomini (15), ma solo una parte delle infezioni persistenti progredisce attraverso diverse fasi verso la neoplasia (16).

Gli HPV oncogeni possono sussistere nell'epitelio in tre fasi principali di infezione che sono indicate come latente, permissiva (produttiva) e trasformante. Inizialmente il virus ha accesso alle cellule basali epiteliali attraverso piccole falle dell'epitelio. Durante lo stadio di infezione *latente*, l'attività virale sembra essere altamente limitata dal silenziamento epigenetico del genoma virale e, in genere, l'infezione rimane clinicamente non manifesta (17). Tuttavia questa situazione può spiegare la riattivazione clinicamente significativa di un HPV successivamente nella vita (anche a distanza di anni), ad esempio in circostanze di immunosoppressione (18).

Al contrario, lo stadio *permissivo* dell'infezione è caratterizzato da alta espressione genica virale, replicazione del virus e presenza del virus infettante sulla superficie epiteliale. Gli oncogeni dell'HPV E6 ed E7 si manifestano principalmente nelle cellule dello strato basale. La moltiplicazione delle cellule dell'ospite che portano il genoma virale e la successiva decomposizione delle cellule differenziate sulla superficie epiteliale induce il rilascio e la diffusione dei virus infettivi (18).

Il passaggio dalla modalità permissiva alla fase di *trasformazione* può verificarsi in una minoranza di infezioni da HPV con meccanismi non completamente chiariti. Lo stadio di trasformazione è caratterizzato da una sostanziale sovraregolazione dell'espressione degli oncogeni HPV E6 ed E7. Clinicamente e istologicamente, lo stadio di infezione HPV trasformante può presentarsi come neoplasia intraepiteliale di grado II o III o lesioni intraepiteliali squamose di alto grado (*high grade squamous intraepithelial lesion*, HSIL) (19).

Importanti fattori di rischio per l'acquisizione e la persistenza di un'infezione da HPV e il successivo sviluppo della neoplasia sono principalmente l'immunosoppressione e, in maniera minore, l'esposizione al fumo di tabacco, oltre all'età (20).

L'incidenza del CA può arrivare a 30 casi/100.000 tra le donne HIV-infette (11), ma aumenta ulteriormente in maschi omosessuali (MSM) HIV-positivi, che albergano il rischio più alto per lo sviluppo di questa neoplasia. Tra questi individui il tasso di incidenza può arrivare a 131 casi/100.000 l'anno (3).

Ad oggi, il CA costituisce uno dei più comuni tumori non-AIDS definenti nella popolazione HIV-positiva. Infatti, nonostante l'introduzione della terapia anti-retrovirale (*highly active antiretroviral therapy*, HAART) abbia avuto un impatto significativo sulla sopravvivenza delle persone con infezione da HIV, migliorando la funzione immunitaria e inducendo la riduzione dell'incidenza di alcuni tumori virus-correlati quali il sarcoma di Kaposi, il linfoma non-Hodgkin e il cancro della cervice uterina (21), non ha determinato alcuna riduzione nell'incidenza del CA. Al contrario, dopo l'avvento dell'HAART nel 1996, è stato osservato un aumento significativo nel tasso di incidenza di questa neoplasia (22). La prolungata sopravvivenza dei pazienti HIV-infetti in terapia può contribuire a spiegare tale fenomeno. La più lunga aspettativa di vita può avere infatti conferito al paziente con HIV il tempo sufficiente per lo sviluppo del CA, in precedenza raro a causa della ridotta aspettativa di vita nell'era pre-HAART. Sebbene i dati di letteratura siano ancora controversi, dal momento che alcuni studi hanno evidenziato un effetto protettivo della terapia HAART rispetto allo sviluppo del CA (23-25), altri indicano che il ripristino della funzionalità immunitaria non sia sufficiente a proteggere i pazienti HIV-positivi dal rischio di sviluppare lesioni pre-neoplastiche e neoplastiche a livello anale. In questi pazienti una bassa conta dei CD4 (26) e l'immunosoppressione nelle fasi precoci dell'infezione sembrano essere significative nello sviluppo del CA (27).

Allo stesso modo, altre popolazioni immunosopresse condividono una maggiore incidenza di cancro anale. Studi su pazienti sottoposti trapianto di rene (28-29) e di fegato (30) hanno evidenziato una aumentata incidenza del CA; in particolare il tasso di incidenza di patologia maligna ano-genitale dopo trapianto di rene è stimato tra 30 e 100 volte più alto rispetto alla popolazione generale (31).

In definitiva, coerentemente con quanto discusso sulla patogenesi del CA, è possibile identificare alcuni gruppi di popolazione altamente esposti allo sviluppo di questa neoplasia (tabella 1):

- MSM HIV positivi, nei quali si osserva la più alta incidenza in assoluto;
- pazienti immunodepressi;
- pazienti con storia di patologia correlata con HPV.

Pertanto il CA, benché raro nella popolazione generale, nelle popolazione ad alto rischio raggiunge tassi di incidenza che eguagliano o superano l'incidenza del cancro del colon, per il quale sono attuati programmi di screening in tutti i Paesi con alti standard medico-sanitari.

Tabella 1 - Incidenza del cancro anale

Popolazioni specifiche	n/100000 abitanti per anno
Popolazione generale	1,8 (2)
Popolazione generale, femmine	0,55 - 2,4 (32)
Femmine HIV positive	3,9 – 30 (32)
MSM HIV negativi	5,1 (22)
Pazienti sottoposti a trapianto d'organo	10 – 15 (33)
Pregressa neoplasia correlato con HPV	0,8 - 63,8 (32)
MSM HIV positivi	49,5 – 131 (22)
Cancro del colon nella popolazione generale	41 (34)

**rielaborata da Roberts (2017) (35)*

Le similitudini epidemiologiche, virologiche, citologiche ed istologiche tra il SCC ed il cancro della cervice uterina hanno suggerito la possibilità di introdurre specifici programmi di screening per il CA nelle popolazioni specifiche, con l'obiettivo di perseguire i successi della Sanità pubblica ottenuti per il cancro cervicale in termini di diagnosi precoce, riduzione dell'incidenza e prognosi.

1.2 Le lesioni precancerose anali

La comparsa di un CA è preceduto dalla progressiva trasformazione del tessuto anale che, a partire dall'iniziale infezione da HPV, evolve attraverso specifiche fasi di alterazione precancerose.

Le atipie delle cellule e dei tessuti nella regione anale sono chiamate lesioni intraepiteliali squamose anali (*anal squamous intraepithelial lesion*, ASIL) che, secondo il potenziale oncogenico del tipo di HPV residente, possono evolvere in cancro anale.

In Letteratura, le lesioni precoci vengono descritte con diversi schemi di classificazione, spesso di non univoca interpretazione, a causa delle continue acquisizioni sulla fisiopatologia di base. Inizialmente la displasia delle lesioni rinvenute nella regione anale veniva descritta dai patologi come "lieve", "moderata" e "severa". Nel tempo si stabilirono le correlazioni patogenetiche tra le displasie anali e l'infezione da HPV e si evidenziarono le similitudini con le lesioni della cervice uterina. Attingendo dall'esperienza ginecologica, sono stati sviluppati nuovi criteri classificativi.

L'infezione da HPV e lo sviluppo di lesioni precancerose cervicali si verificano generalmente nella zona di trasformazione (giunzione squamo-colonnare) della cervice uterina. Analogamente, la zona transizionale anale (*anal transitional zone*, ATZ) corrisponde alla giunzione dell'epitelio squamoso stratificato anale con l'epitelio ghiandolare del retto (Figura 1), l'area in cui, come precedentemente descritto, l'HPV infetta le cellule dello strato basale dell'epitelio attraverso microlesioni.

Le zone di trasformazione del canale anale e della cervice uterina sono caratterizzate fisiologicamente da un alto turnover dell'epitelio e si suppone che questa caratteristica le renda particolarmente vulnerabili all'induzione di alterazione genetiche.

Le prime descrizioni della patologia precancerosa e maligna dell'ano non facevano distinzione tra canale anale e regione perianale. Le lesioni identificate erano principalmente lesioni cutanee variamente descritte come malattia di Bowen e *carcinoma in situ*.

Nel 1962 Turell propose una distinzione tra tumori anali e perianali basata sulla diversa biologia ed evoluzione (36).

Nel 1971, Oriel e Whimster hanno suggerito la possibile origine virale della malattia di Bowen in uno studio sui carcinomi in situ adiacenti alle verruche anali (37). L'associazione tra HPV e cancro dell'ano divenne plausibile in seguito agli studi su HPV 16 e cancro della cervice uterina.

Nel 1981 Fenger e Nielsen pubblicarono il primo studio sulle displasie nel canale anale (38) e nel 1986 descrissero la presenza di displasia e carcinoma in situ adiacenti alla maggior parte dei carcinomi del canale

anale, dimostrando che le lesioni anali condividevano lo stessa progressione oncogenica HPV-associata osservata nella cervice e in altre aree della regione ano-genitale (39). Nello stesso anno, hanno introdotto la terminologia *neoplasia intraepiteliale del canale anale* (Anal Intraepithelial Neoplasia, AIN). Analogamente alla CIN (neoplasia intraepiteliale cervicale), la AIN è stata divisa in tre gradi: AIN1, AIN2 e AIN3.

Nel 1995 l'Agenzia internazionale per la ricerca sul Cancro (IARC) riconosce l'associazione tra HPV oncogeni e lesioni precancerose e cancerose (40).

Nel 1996, Northfelt ha introdotto il termine lesione intraepiteliale squamosa anale (Anal Squamous Intraepithelial Lesion, A-SIL) come alternativa alla definizione AIN, distinguendo tra lesione squamosa intraepiteliale di basso grado (*Low grade Squamous Intraepithelial Lesion, LSIL*), corrispondente alla AIN 1, e lesione squamosa intraepiteliale di alto grado (*High grade Squamous Intraepithelial Lesion, HSIL*), corrispondente alle AIN2 e alle AIN3 (41).

Nel 2001 viene formulato il "Sistema Bethesda" (TBS - The Bethesda System) per la compilazione standardizzata delle anomalie citologiche della cervice uterina e della vagina identificabili negli strisci

di Pap-test. Tale sistema identifica dei criteri classificativi ed introduce una comune terminologia per ogni lesione squamosa ano-genitale (42). La diffusione e implementazione del nuovo sistema in tutta la comunità scientifica ha condotto ad una migliore e più efficace comunicazione tra i vari specialisti coinvolti nella gestione della patologia HPV-associata. La classificazione delle anomalie citopatologiche comprende:

- cellule squamose atipiche;
 - cellule squamose atipiche di significato non determinato (ASC-US);
 - cellule squamose atipiche per le quali non si esclude HSIL (ASC-H);
- lesione intraepiteliale squamosa di basso grado (LGSIL o LSIL);
- lesione intraepiteliale squamosa di alto grado (HGSIL o HSIL).

Nel 2013 il *College of American Pathologists* (CAP) e l'*American Society for Colposcopy and Cervical Pathology* (ASCCP), alla luce delle acquisizioni sulla patologia neoplastica squamosa della regione ano-genitale e delle similitudini eziopatogenetiche, hanno avviato il progetto "*The Lower Anogenital Squamous Terminology (LAST)*" con l'obiettivo di unificare e standardizzare la terminologia e la classificazione delle lesioni HPV-associate. Tale progetto ha condotto alla promulgazione di un sistema classificativo semplificato, che suddivide le lesioni intraepiteliali squamose in due gruppi: basso grado (LSIL) e alto grado (HSIL) (43). Secondo questo sistema le lesioni condilomatose e la AIN 1 corrispondono alle LSIL che non sono considerate precancerose ma possono potenzialmente progredire a lesioni ad alto grado, e le AIN2-3 corrispondono alle HSIL che sono considerate precancerose (vedi tabella 2).

Tabella 2 – Classificazioni delle lesioni precancerose anali

LAST	Bethesda	AIN	Displasia
LSIL/AIN1	LSIL	Lesione condilomatosa AIN1	Displasia lieve
HSIL/AIN2–AIN3	HSIL	AIN 2	Displasia moderata
		AIN 3	Displasia severa <i>Carcinoma in situ</i>

AIN, Anal intra-epithelial neoplasia; LAST, Lower Anogenital Squamous Terminology; LSIL, Low-grade squamous intra-epithelial lesion; HSIL, High-grade squamous intra-epithelial lesion.

1.3 Progressione AIN – SCC e diagnosi precoce

La neoplasia intraepiteliale anale (AIN), dunque, è la lesione precancerosa del CA: alcuni casi di LSIL progrediscono in HSIL e poi in SCC (tabella 3). Tuttavia, la velocità e i fattori di rischio associati alla progressione della AIN, così come i fattori associati alla regressione, sono scarsamente caratterizzati. Diversi studi supportano il concetto secondo cui la AIN progredisca verso l'SCC (sequenza displasia-cancro). Storicamente l'incidenza della progressione da lesione precancerosa a cancro veniva riportata tra il 2 e il 9% (44-46). Studi più recenti si sono concentrati su popolazioni ad alto rischio, identificando incidenze di progressione tra il 13 e il 50% (47-48).

In uno studio retrospettivo del 2014 su pazienti affetti da CA, Berry et al. (2014) (49) hanno rilevato che in 27 individui su 138 (19,6%) era stata precedentemente documentata una HSIL, con un tempo medio di progressione da HSIL a cancro di 57 mesi.

Watson et al. (47) su una coorte di 72 pazienti arruolati in un programma di sorveglianza AIN hanno rilevato un tasso di progressione da AIN2 / 3 (HSIL) a SCC dell'11% in un periodo mediano di 42 mesi.

Circa un terzo di questa popolazione ha avuto invece una diminuzione dello stadio o una regressione della malattia.

Scholefield et al. (50) in uno studio su 35 pazienti con AIN 3 seguiti per 53 mesi hanno rilevato la progressione a SCC in 3 casi (8,6%).

Tong et al. (51) riportano una progressione da AIN 1 ad AIN 3 in 25 di 199 (12,6%) pazienti maschi ad alto rischio inseriti in un programma di screening del cancro anale, equivalente ad un tasso di 8,1 per 100 persone-anno. I pazienti HIV positivi erano a maggior rischio di progressione, con un rapporto di rischio di 2,8 per progressione da AIN 1 a 3. Questo studio ha anche riportato tassi di regressione spontanea di AIN 3 in 26 pazienti su 55 (47%), equivalente ad un'incidenza di 68,9 per 100 persone-anno. Tra i 26 pazienti che regredivano spontaneamente, 11 (42%) regredivano all'AIN 2, 11 (42%) regredivano all'AIN 1 e 4 (15%) regredivano a nessuna evidenza di malattia (biopsie negative).

Tassi di progressione simili sono stati descritti da Burgos et al. (52) con progressione registrata in 10,5 persone su 100 per anno, in una popolazione di 556 uomini con infezione da HIV.

Devaraj et al. hanno pubblicato uno studio su 98 pazienti HIV positivi, con 40 pazienti sottoposti ad un follow-up di più di un anno con una attenta gestione della displasia squamosa anale. In questo campione, in 28 su 40 pazienti è stata riscontrata una HSIL anale e tre di questi pazienti (11%) hanno sviluppato carcinoma invasivo sotto sorveglianza (53).

In uno studio di Sobhani et al. (54) su 38 che hanno sviluppato una HSIL anale, 7 (18%) hanno sviluppato un ASCC, da 13 a 108 mesi dopo il reclutamento nello studio.

La sopravvivenza da CA è marcatamente più alta se la neoplasia viene trattata in una fase iniziale. I dati dell' US National Cancer Institute su 6.411 pazienti hanno dimostrato che i tumori di meno di 2 cm al momento della diagnosi avevano una sopravvivenza dell'80% a cinque anni, rispetto al 45-65% per i tumori di diametro maggiore di 2 cm e del 20% per i tumori diagnosticati in fase metastatica (55).

Wexler et al. hanno pubblicato uno studio su 38 uomini sieropositivi affetti da CA: la sopravvivenza è risultata dell'85% a 5 anni per i tumori inferiori ai 3 cm rispetto allo zero per i tumori superiori ai 3 cm (56).

Smyczek et al. nel 2013 riportano una sopravvivenza a 5 anni del 100% per pazienti con CA inferiore ad 1 cm su un campione di 69 pazienti (57). In assenza di un programma di screening, la gran parte dei CA viene diagnosticato in fase sintomatica quando è localmente avanzato con un diametro di medio tra 3 e 4 cm (58-59).

L'analisi di questi dati non sempre risulta agevole, poiché le popolazioni osservate non sono omogenee e la scelta della classificazione stessa non è comune a tutti i Centri. I dati indicano comunque che, benché in molti individui nella popolazione generale si verifichi la regressione spontanea da HSIL a LSIL e da LSIL a normale, nelle popolazioni ad alto rischio la AIN può progredire verso l'SCC con tassi significativi, che autorizzano la messa in atto di idonee strategie di screening. Il principio di base per una efficace prevenzione è la precoce identificazione delle lesioni displastiche e il trattamento di quelle potenzialmente suscettibili di progressione. Tale strategia interrompe localmente la progressione verso il cancro squamoso, permettendo potenzialmente di ottenere un globale miglioramento prognostico e una significativa riduzione dell'incidenza e della morbidità associata al CA.

Tabella 3 – Progressione delle lesioni precancerose anali HPV-associate

Progressione	pz	Tasso di progressione	Tempo medio di progressione (mesi)	Rif.
HSIL – SCC	38	18%	13-108	Sobhani 2004 (54)
AIN III – SCC	35	8.6%	53	Scholefield, 2005 (50)
AIN II/III – SCC	72	11%	42	Watson, 2006 (47)
HSIL – SCC	28	11%	>12	Devaraj, 2006 (53)
AIN I - AIN III	199	12.6% (8.1/100 pers-anno)	18	Tong, 2013 (51)
HSIL – SCC	138	19.6%	57	Berry, 2014 (49)
ASCUS/AIN I - AIN II/III	556	24.5% (10.5/100 pers-anno)	36	Burgos, 2015 (52)

ASCUS: Atypical squamous cells of undetermined significance; LSIL: Low-grade squamous intraepithelial lesion; HSIL: High-grade squamous intraepithelial lesion; AIN: Anal intraepithelial neoplasia; SCC: Squamous cell carcinoma.

2. Metodologie di screening del cancro dell'ano

Il CA per lungo tempo è stato diagnosticato con ritardo. Gli studi storici riportavano un ritardo di diagnosi di più di 2 anni in oltre la metà dei pazienti (60); attualmente nel 45% dei casi la neoplasia si presenta già in fase disseminata con metastasi linfonodali o ematiche (2). Tale caratteristica epidemiologica è particolarmente preoccupante se si considera che il CA nelle fasi precoci ha una ottima risposta alle terapie: secondo i dati del SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results Program) del National Cancer Institute, nei tumori localizzati la sopravvivenza a 5 anni è dell'81,5% , mentre crolla drammaticamente al 29,8% per i tumori disseminati. Inoltre, nelle fasi avanzate, i trattamenti necessari, come la resezione addomino-perineale dell'ano-retto con confezionamento di stomia definitiva, sono gravati da elevata comorbidità e alterano significativamente la qualità di vita del paziente.

A causa della rarità di questa patologia nella popolazione generale, non sono stati sviluppati adeguati programmi di screening. Inoltre, dal 1997 l'*American Cancer Society* non considera più l'esplorazione digitale ano-rettale (DARE) come appropriato test di screening per il cancro colo-rettale, a favore delle procedure endoscopiche, eliminandola di fatto dall'utilizzo routinario nei programmi di prevenzione. Nel 2009 il ruolo della DARE è stato ridimensionato anche nelle procedure diagnostiche del cancro di prostata. Tali scelte hanno probabilmente inciso indirettamente sulla sorveglianza del CA, inducendo una riduzione delle possibili occasionali individuazioni e contribuendo a ritardarne la diagnosi.

Le notevoli similitudini in termini eziologici e patogenetici, già descritte in questa trattazione, hanno suggerito la possibilità di applicare i criteri di prevenzione utilizzati nel cancro della cervice uterina anche nel tumore dell'ano. L'incidenza del numero di casi di cancro cervicale è stata ridotta da 40/100.000 a 8/100.000 abitanti nei paesi in cui le lesioni precancerose del cancro cervicale sono monitorate di routine (61). Questo risultato è stato raggiunto, a partire dagli anni '70 del secolo

scorso, attuando uno screening citologico rigoroso delle lesioni di alto grado della cervice uterina impiegando il test di Papanicolaou (pap-test) nella popolazione generale.

Sebbene si stimi che il tasso di progressione da HSIL a carcinoma a cellule squamose sia più basso nell'ano rispetto alla cervice uterina (22, 62), la precoce, accurata e riproducibile identificazione delle HSIL può potenzialmente consentire la diagnosi ed il trattamento nelle fasi istopatologiche iniziali della neoplasia, con la concreta possibilità di ridurre il tasso di incidenza del CA nelle popolazioni ad alto rischio.

Attualmente, nessuna società nazionale o internazionale formalmente supporta lo screening di routine delle popolazioni a rischio per displasia anale. Questa mancanza di raccomandazione deriva dall'assenza di studi di alta qualità che dimostrino migliore morbilità e mortalità per chi è sottoposto a screening di routine. Tuttavia nella pratica clinica lo screening della displasia degli individui ad alto rischio sta diventando comune (63-64) e influenti società regionali come la *Health AIDS Institute* dello Stato di New York hanno iniziato a raccomandare l'annuale esame dell'ano di routine in tutti i pazienti con infezione da HIV ed l'esame citologico anale nei pazienti HIV-positivi ad alto rischio (MSM, pazienti con storia di patologia ano-genitale HPV-correlata) (65). Le *Linee Guida Italiane sull'utilizzo dei farmaci antiretrovirali e sulla gestione diagnostico-clinica delle persone con infezione da HIV-1* raccomandano lo screening per il tumore dell'ano nella popolazione HIV+ e identifica negli MSM, nei pazienti con storia di condilomi ano-genitali e nelle donne con istologia genitale patologica gli individui target. Le procedure di screening indicate sono costituite dall'esecuzione di un PAP test anale annuale e dell'anoscopia ad alta risoluzione (HRA) in caso di citologia anomala, per l'identificazione delle precancerosi anali (HSIL-AIN 2-3).

Le potenziali modalità di screening delle precancerosi anali includono l'esame ano-rettale digitale (DARE), il test Papanicolaou anale (Pap-test anale), l'HPV test e l'anoscopia ad alta risoluzione (High Resolution Anoscopy, HRA), ma esiste poco consenso tra gli specialisti sulle strategie da attuare.

2.1 Esame digitale ano-rettale (DARE)

L'esame anoretale digitale (DARE) è ampiamente considerato una componente essenziale ma non sufficiente di qualsiasi valutazione di screening del cancro anale. L'*American Society of Colon and Rectal Surgeons* benché non raccomandi formalmente uno screening di routine per il cancro anale, suggerisce l'esecuzione di esame ispettivo della cute perianale, DARE e anoscopia come percorso diagnostico iniziale per qualsiasi paziente con storia o sintomi riguardanti la patologia neoplastica anale (66). In caso di anomalie deve essere eseguita una biopsia.

Non ci sono evidenze che dimostrino un effettivo beneficio in termini di screening con l'esecuzione routinaria del DARE e gli studi storici di sorveglianza suggeriscono una bassa sensibilità della strategia. In effetti, l'esplorazione rettale permette di diagnosticare lesioni anali solo se eseguita da specialisti con una lunga pratica e notevole esperienza di patologia ano-rettale. Inoltre le HSIL nelle fasi precoci sono spesso asintomatiche e si presentano come lesioni piane con scarsa caratterizzazione semeiotica e quindi di difficile, se non impossibile, diagnosi alla palpazione digitale. Progressivamente con l'implementazione di altre procedure più idonee alla diagnosi delle displasie anali, l'adeguatezza del DARE come test di screening di primo livello sta diminuendo.

2.2 Pap-test anale

Il Pap-test cervicale fu introdotto negli anni '60 con il fine di aiutare a identificare la displasia cervicale premaligna e l'utilizzo nei programmi dei screening, come già descritto, ha coinciso con una sostanziale riduzione dell'incidenza di cancro della cervicale uterina. Il Pap-test applicato all'ano è stato introdotto più recentemente, negli anni '90 del secolo scorso, con una metodologia e uno schema di classificazione simili. Una revisione sistematica ha descritto che la citologia anale ha una

sensibilità dal 69% al 93% e una specificità dal 32% al 59% negli individui HIV-positivi, che è simile a quella riportata per lo screening del cancro cervicale (67). Le anomalie citologiche risultano altamente predittive di displasia anale istologica dopo biopsia; in uno studio di Cranston et al. del 2007 (68), il valore predittivo positivo delle anomalie citologiche anali per qualsiasi grado di displasia era del 95,7%. Sia la sensibilità che la specificità della citologia anale sono più elevate per le lesioni interne rispetto alle localizzazioni perianali (69). Una analisi retrospettiva su un grande database ha dimostrato che il ruolo del pap-test anale nella prevenzione del CA è sia efficace sia vantaggioso in termini di rapporto costo/efficacia.

Il pap-test anale è però gravato da alcuni limiti. La specificità nella diagnosi del corretto grado di displasia è poco accurata e, frequentemente, lesioni che all'esame istologico si rivelano essere HSIL, sono risultate al pap-test delle LSIL (70). Inoltre, la sensibilità diminuisce nei gruppi a più alto rischio. In coorti di MSM si sono registrati falsi negativi nel 23% dei pazienti HIV-negativi e nel 45% dei sieropositivi (71).

Tassi così significativi di diagnosi mancata, proprio in quelle popolazione che più necessitano di uno screening attento, hanno suggerito che il Pap-test anale da solo non rappresenta una metodica adeguata e che sia necessario associarlo ad una metodica di visione diretta dell'epitelio anale, come la HRA, per ottenere un programma di screening appropriato.

2.3 HPV-DNA test

Il test HPV viene generalmente eseguito come parte di un Pap-test. Con il Pap-test moderno, a base liquida, il campione ottenuto con lo stesso tampone può essere utilizzato sia per la citologia che per l'HPV-DNA test. Viene effettuato di routine per lo screening del cancro cervicale, essendo stata ormai acquisita la diretta correlazione eziologica tra HPV e displasia. Come già argomentato, il ruolo dell'HPV sembra essere altrettanto significativo nello sviluppo del carcinoma squamoso dell'ano.

Nonostante ciò, vari studi non hanno evidenziato alcun beneficio sulla prevenzione del CA dall'utilizzo del HPV-DNA test (70). Conseguentemente, nessuna linea-guida raccomanda formalmente il test HPV da solo o in combinazione con il Pap-test anale.

3. Anoscopia ad alta risoluzione (High resolution anoscopy, HRA)

L'anoscopia ad alta risoluzione rappresenta l'esame di secondo livello nello screening del cancro anale. La procedura è stata messa a punto applicando l'esperienza ginecologica nello screening delle lesioni squamose della cervice uterina con la colposcopia, di cui la HRA condivide il razionale e la metodologia, che verranno descritte dettagliatamente in seguito.

L'indicazione all'esecuzione viene data nei pazienti in cui l'esame citologico sia risultato anormale.

L'obiettivo è di identificare lesioni precoci che siano state causa delle atipie citologiche riscontrate.

L'HRA rappresenta l'applicazione della colposcopia al canale anale e alla regione perianale. Durante la HRA viene visualizzato il canale anale del paziente a diversi ingrandimenti attraverso l'utilizzo di un colposcopio o di un videoproctoscopio, consentendo il rilevamento di lesioni anali precancerose, che possono essere sottoposte a biopsia mirata ed eventualmente a trattamento ablativo, al fine di interrompere la progressione verso il cancro.

3.1 HRA – Procedura

La HRA è una procedura delicata e solo apparentemente di facile esecuzione. Se eseguita in modo superficiale e approssimativo non permette di ottenere le informazioni necessarie per un adeguato percorso di prevenzione, rischiando di esporre il paziente a manovre invasive e inutili e ritardando irrimediabilmente l'individuazione di lesioni potenzialmente fatali.

Può rivelarsi un esame tecnicamente e fisicamente impegnativo poiché è gravato da diverse difficoltà. Alcune sono legate alla procedura stessa:

- il medico deve tenere per tutto l'esame l'anoscopio in posizione, modificando la stessa e variando la focalizzazione ove necessario per visualizzare completamente le strutture;
- la visione attraverso il colposcopio richiede l'esecuzione di movimenti molto lenti onde evitare la perdita dell'asse ottico;
- l'ampia superficie di ATZ, canale anale e regione perianale, associata ad ostacoli anatomici, come le pieghe della mucosa e la presenza di papille, possono essere difficili da visualizzare completamente;
- le caratteristiche microscopiche che aiutano a identificare l'HSIL anale possono essere di piccole dimensioni e possono richiedere un ingrandimento maggiore rispetto a quanto necessario nella cervice.

Altre difficoltà sono legate alle caratteristiche fisiologiche e patologiche del paziente:

- spesso è presente una malattia diffusa e multifocale;
- spesso è presente una patologia coesistente, come condilomatosi, emorroidi, ragadi anali e fistole che devono essere ben conosciute per una diagnosi differenziale e possono complicare lo svolgimento dell'esame (figure 9-10);
- possono essere presenti alterazioni da tessuto cicatriziale correlato a precedenti trattamenti come stenosi, fibrosi, esiti post-attinici da pregressa radioterapia che aggiungono complessità all'interpretazione dei quadri osservati;
- alcune caratteristiche anatomiche, come l'obesità e l'ipertricosi, così come alcuni quadri morbosi come l'incontinenza fecale, possono limitare la possibilità di visualizzare il canale anale;
- lo stato psico-emotivo del paziente in esame può facilitare o rendere l'esame più impegnativo.

I requisiti strumentali minimi per eseguire una corretta HRA sono la disponibilità di un colposcopio (vedi figura 2) o un videoproctoscopio di buona qualità con illuminazione ed ingrandimento adeguati (fino a 25x), gli anoscopi monouso, campi chirurgici sterili con pinze da biopsia e un lettino ambulatoriale e una postazione dell'operatore che consentano di eseguire la procedura in posizioni comode ed ergonomiche per clinico e paziente.

L'HRA viene eseguita senza sedazione, con il paziente sveglio; richiede, pertanto, la completa collaborazione da parte del paziente che deve affrontare la procedura solo dopo una corretta e completa informazione sui fini e i benefici che si possono ottenere. Un buon rapporto fiduciario tra medico e paziente è alla base di un efficace percorso di screening che spesso prevede molteplici HRA anche a breve distanza di tempo.

La HRA deve prevedere la sistematica visualizzazione di tutte le regioni anali seguendo una procedura standardizzata (vedi figura 1):

- margine del retto distale;
- giunzione squamo-colonnare (squamocolumnar junction, SCJ), ovvero la giunzione in cui l'epitelio squamoso anale confina con l'epitelio colonnare colico;
- zona di trasformazione anale (AnTZ);
- linea dentata, o pettinata;
- canale distale;
- margine anale;
- regione perianale, che si estende per 5 cm distalmente al margine anale.

La posizione preferibile per eseguire una anoscopia ad alta risoluzione è il decubito laterale sinistro (posizione di Sims), poiché minimizza il fastidio per il paziente, che si trova in una postura relativamente comoda e sopportabile per un tempo che può protrarsi anche per 15 – 20 minuti, e la visibilità del canale anale per l'operatore è adeguata. E' opportuno disporre di un lettino mobile, per poter variare l'asse di visione anche durante la procedura evitando così di far muovere il paziente.

Il paziente viene posto nella posizione fetale, con i glutei sul bordo del lettino ambulatoriale. La preparazione dell'intestino non è necessaria ma può essere utile far eseguire un clistere evacuativo 1 ora prima della procedura.

La procedura inizia con una attenta ispezione della regione perianale con una adeguata illuminazione, eventualmente facilitata da una dilatazione dei glutei. In questa fase, si devono cercare eventuali lesioni HPV-associate nell'epitelio perianale quali condilomi esterni, lesioni bowenoidi, esiti cicatriziali di pregressi trattamenti e/o comorbidità spesso presenti. Non è infrequente il rilevamento di quadri emorroidari esterni, marische, fissurazioni e ragadi, dermatiti e anche quadri suppurativi, quali ascessi perianali e fistole. È indispensabile una profonda conoscenza delle possibili patologie proctologiche, al fine di poter effettuare diagnosi differenziali e decidere di rinviare la procedura dopo trattamento delle stesse, per evitare manovre dolorose o potenzialmente dannose. Già in questa fase può essere necessario eseguire delle biopsie mirate su lesioni dubbie o sospette (figure 11-14).

Si procede con una delicata esplorazione digitale con gel lubrificante in soluzione con anestetici locali. In questa fase si valuta lo stato del complesso sfinteriale e del muscolo pubo-rettale, chiedendo al paziente di contrarre lo sfintere e di ponzare; si valutano le caratteristiche di integrità della parete del canale anale e del retto, avendo la possibilità di apprezzare la presenza di lesioni di consistenza e caratteristiche morfologiche patologiche. La manovra permette inoltre di testare la capacità del paziente di collaborare con l'operatore e permette di eseguire una blanda divulsione per preparare le fasi successive. Normalmente se il paziente è stato adeguatamente preparato e l'esplorazione viene eseguita correttamente, non è una manovra dolorosa e, in assenza di comorbidità algogene, è ben tollerata.

Si procede con l'introduzione dell'anoscopio che deve avere un diametro adeguato alla completa visualizzazione a 360° del canale anale e all'esecuzione di eventuali manovre chirurgiche (figura 4). L'osservazione preliminare viene preferibilmente eseguita "a secco" (figura 5), ovvero senza applicazione di acido acetico. Viene utilizzato un colposcopio, o un videoproctoscopio, per esaminare

con ingrandimento tutto l'epitelio dal retto distale, alla regione transizionale fino alla cute del margine anale in modo sistematico. Successivamente viene applicata, su tutta la parete anale, la soluzione di acido acetico al 3% o al 5% (nel nostro Centro utilizziamo la concentrazione al 5%) che consentirà una migliore identificazione e caratterizzazione delle eventuali lesioni, poiché induce una reazione cromatica di "sbiancamento" (*whitening*) nelle aree interessate da displasia HPV-indotta (figura 6). La maggior parte dell'esame anale viene eseguita con ingrandimento 16×, una volta visualizzate specifiche aree di interesse, devono essere esaminate con ingrandimento 25× ed il margine anale è visualizzato con ingrandimento 10× (73). Dopo l'esame con acido acetico, si può applicare la soluzione di iodio di Lugol che può aiutare a distinguere l'HSIL dall'LSIL, e far decidere al clinico se e dove effettuare la biopsia, nonché a definire i margini della lesione (figura 7).

Le lesioni osservate durante l'HRA devono essere attentamente descritte segnalandone la localizzazione, i limiti, i margini, la colorazione indotta da acido acetico (*whitening*), la reazione alla colorazione di Lugol, il pattern epiteliale, il pattern vascolare (pattern a mosaico, puntatura, vasi serpiginosi, atipico ecc.).

Queste descrizioni aiuteranno a distinguere tra lesioni di basso grado e di alto grado e a confrontarne l'evoluzione nel tempo.

L'HSIL può presentarsi piatta o ispessita e spesso presenta alterazioni vascolari incluse la puntatura o un motivo a mosaico, presenta reazione di aceto-whitening ed una scarsa o assente captazione della soluzione di Lugol (figure 8-9).

Il valore predittivo positivo per HSIL è aumentato al 68,6% con la seguente combinazione di criteri: sbiancamento indotto da acido acetico, nessuna colorazione di Lugol, pattern epiteliale irregolare e alterazioni vascolari (74). Molte di queste lesioni anali sospette hanno aspetti simili a quelle descritte inizialmente nella colposcopia cervicale (75). I tumori, invece, si presentano frequentemente come lesioni rilevate, ispessite e friabili o ulcerate con vasi atipici. Qualsiasi lesione sospetta deve essere sottoposta a biopsia.

3.2 HRA – Diagnosi e trattamento delle lesioni precancerose

L'HRA rappresenta uno strumento fondamentale anche per il trattamento guidato di lesioni anali di alto grado. L'ablazione di HSIL anale sotto HRA può ridurre il tasso di incidenza di cancro anale (76). Precedenti studi hanno rivelato che prima che l'HRA venisse eseguita, veniva identificata solo una piccola percentuale di lesioni sospette. L'HRA è considerata superiore all'anoscopia standard nella diagnosi delle lesioni squamose del canale anale. A questo potenziale diagnostico si aggiunge la fondamentale possibilità di eseguire il trattamento delle lesioni identificate in maniera diretta e specifica.

Attraverso l'utilizzo della HRA si minimizzano i limiti e si riduce la morbidità dei trattamenti chirurgici standard. L'escissione ampia eseguita chirurgicamente per asportare in maniera completa le lesioni squamose, è una procedura che rimuove anche i tessuti sani per ottenere margini esenti da atipie. Tuttavia, anche dopo tale procedura permane il rischio di recidiva che è riportato tra il 9% e il 63% (77-78) non potendo, quindi, garantire una vera eradicazione della patologia. L'ablazione delle HSIL HRA-guidata ha numerosi vantaggi: consente una valutazione completa dell'anatomia anorettale, il rilevamento di lesioni non visibili senza ingrandimento e consente una terapia "mirata" evitando il coinvolgimento dei tessuti normali e garantendo minima morbidità e riduzione del rischio di stenosi anale (79).

L'HSIL cervicale viene solitamente trattata con la procedura di escissione elettrochirurgica ad anello, rimuovendo la zona di trasformazione squamo-colonnare in cui si sviluppa la maggior parte della displasia. Questo non è possibile per l'HSIL anale e il trattamento più spesso si basa sull'ablazione di singole lesioni con tecniche diverse: laser, elettrocauterizzazione (ECA) e coagulazione a infrarossi (IRC). Non vi è alcuna differenza significativa nel successo del trattamento tra IRC e ECA. Un recente studio di Goldstone et al. (76) ha dimostrato che i pazienti sottoposti ad ablazione dell'HSIL anale hanno un'alta recidiva, ma la probabilità di sviluppare un cancro anale è bassa. La recidiva 1 anno dopo la prima ablazione per i pazienti HIV positivi e negativi era rispettivamente del 53% e del 49%; a

2 e 3 anni, il tasso di recidiva era del 68% e del 77% per i pazienti sieropositivi e del 57% e del 66% per i pazienti HIV-negativi. La probabilità di cancro a 3 anni post-ablazione è stata dell'1,97%.

Le lesioni displastiche perianali di alto grado (malattia di Bowen) sono tradizionalmente trattate con mappatura (biopsie random) ed ampia escissione. Un recente studio di Johnstone et al. (80), ha dimostrato che anche la displasia perianale può essere trattata con successo con ablazione mirata con HRA (ECA, laser o IRC) senza alcuna morbidità, sebbene la recidiva rimanga elevata. Quasi tutti questi pazienti hanno contestualmente displasia del canale anale e i pazienti sieropositivi sono a maggior rischio di malattia e recidiva.

3.3 HRA – Standard qualitativi

L'HRA è attualmente il *gold standard* per la diagnosi delle HSIL. È stata sviluppata simultaneamente in diversi paesi per più di due decenni (64). Originariamente è stata utilizzata in Europa già nel 1989 (79), e successivamente è stata adottata, codificata e descritta presso l'Università della California-San Francisco all'inizio degli anni '90 dal gruppo di Palefsky (73). Tuttavia, la procedura non è standardizzata e le variazioni procedurali non sono ben documentate e non sono sempre completamente descritte nelle pubblicazioni, rendendo difficile il confronto tra le relazioni.

Sia per la colposcopia che per l'endoscopia sono stati stabiliti e validati degli standard di qualità, basati su una adeguata formazione e su criteri di qualità per gli operatori e per le strutture, che sono soggetti ad ispezione. Garantire uno standard delle procedure rappresenta una preziosa misura di garanzia della qualità, per l'accreditamento in programmi di screening volti a prevenire il cancro. In assenza di dati che indicano la pratica ottimale, anche per l'anoscopia ad alta risoluzione l'International Anal Neoplasia Society ha proposto dei criteri per stabilire degli standard minimi di qualità basati sull'esperienza maturata attualmente dagli esperti di HRA (82).

Standard di qualità dei servizi correlati non l'HRA

In merito ai servizi correlati con l'HRA, dovrebbero essere incluse le seguenti componenti:

- ✓ La stanza per lo svolgimento degli esami deve consentire un'adeguata privacy, riservatezza e dignità e servizi igienici nelle vicinanze.
- ✓ La posizione del paziente durante la procedura può essere laterale sinistra (o destra), prona o litotomica. Qualunque sia utilizzata, dovrebbe essere assicurato il confort del paziente durante l'esame.
- ✓ Dovrebbero essere prontamente disponibili adeguate strutture di rianimazione per overdose anestetico locale, reazioni vaso-vagali e reazioni allergiche.
- ✓ Dovrebbero essere disponibili attrezzature e personale competente per eseguire procedure di emostasi in caso di emorragia.
- ✓ Le informazioni al paziente devono essere fornite dettagliando la procedura prima dell'esame. Le informazioni dovrebbero delineare gli scopi dell'esame e le possibili sequele e/o complicanze (dolore, sanguinamento, etc.).
- ✓ Deve essere ottenuto un consenso scritto, come richiesto dalle normative locali, preceduto possibilmente dal pre-invio di un opuscolo informativo.
- ✓ I livelli di personale dovrebbero essere adeguati. Oltre al clinico che esegue l'HRA, è auspicabile la presenza di un professionista sanitario (un infermiere esperto o assistente medico).
- ✓ La pulizia della stanza tra le procedure deve essere conforme alle politiche di controllo delle infezioni locali. Sebbene l'HRA non sia una procedura sterile, è importante evitare la contaminazione incrociata
- ✓ E necessario disporre di materiale per biopsia o emostasi monouso o adeguatamente sterilizzato.

- ✓ I risultati di HRA devono essere accuratamente registrati utilizzando descrittori accettati e condivisi.
- ✓ Devono essere disponibili dei percorsi clinici che garantiscano adeguate informazioni ai pazienti in merito a referti, programmi di follow-up, canali chiari di accesso alle cure in caso di complicanze.
- ✓ Le informazioni sul follow-up devono essere richieste ai pazienti, per quanto riguarda le loro esperienze durante e dopo le procedure. Se questo non può essere fatto di routine, sarebbe utile per il servizio ottenere un feedback almeno una volta l'anno.
- ✓ È richiesta una stretta collaborazione con i colleghi chirurghi per la pronta gestione delle complicanze e dei casi complessi o avanzati.
- ✓ La diagnosi e il trattamento di HSIL anale e ASCC richiedono l'intervento di competenze multidisciplinari. È importante avere un approccio di squadra, con specialisti diversi che lavorano a stretto contatto. Le specialità potenzialmente coinvolte includono oncologi medici, chirurghi colo-rettali, infettivologi, radiologi, radioterapisti, patologi e citopatologi.

Criteri descrittivi per HRA

Al fine di eseguire esami confrontabili è indispensabile attenersi a procedure standardizzate e correttamente descritte. Dopo l'applicazione dell'acido acetico al 5% e della soluzione di Lugol è opportuno registrare le caratteristiche individuate nelle regioni osservate secondo quanto elencato nella tabella n. 4.

Tabella 4 - Descrittori Generali per Anoscopia ad Alta Risoluzione

Categorie	Caratteristiche
Valutazione generale	Adeguate o inadeguate con motivazione (ad es. SCJ coperta da emorroidi, pieghe della mucosa, infiammazione, sanguinamento, cicatrice) Visibilità della giunzione squamo-colonnare: completamente visibile, parzialmente visibile, non visibile o percentuale di SCJ visualizzata.
Caratteristiche normali	Epitelio squamoso originale Epitelio colonnare Epitelio squamoso metaplastico; orifizi ghiandolari
Caratteristiche anomale	Posizione della lesione in corrispondenza della SCJ o fuori dalla SCJ Posizione della lesione (anteriore / posteriore / a sinistra / a destra, prossimale / distale rispetto un repere anatomico) Dimensione della lesione: regione/i interessata/e dalla lesione Dimensione della lesione come percentuale del canale anale, come estensione da- a-, (ad esempio dalla linea dentata al canale distale) Colore: bianco, grigio-bianco, rosso Descrittori di lesioni (superficie, vascolarizzazione, margini, colorazione Lugol) I cambiamenti metaplastici indicativi delle lesioni possono includere caratteristiche metaplastiche atipiche come bordi spiculati, orifizi ghiandolari a grappolo Non specifiche: leucoplachia (cheratosi, ipercheratosi), erosione, ulcera
Sospetto di invasione	Vasi atipici Ulteriori segni: friabilità, superficie irregolare, lesione esofitica, necrosi, ulcerazione, neoformazione
Miscellanea	Condilomi, papille fisiologiche, polipo rettale (infiammazione, stenosi, anomalie congenite, esiti di pregressi trattamenti)

adattato da Hillmann et al (82)

La segnalazione standardizzata della localizzazione delle lesioni evidenziate è fondamentale per orientare eventuali trattamenti successivi o permettere la rivalutazione da parte di diversi operatori. I descrittori di posizione utilizzati devono essere indipendenti dalla posizione del paziente per non creare confusione. Viene inoltre sconsigliata la descrizione secondo le ore dell'orologio, che tuttavia rappresenta una modalità molto diffusa che permette una localizzazione precisa delle lesioni. Tale sistema può causare comunque delle incertezze, dovute alle diverse posizioni che vengono fatte assumere al paziente, secondo le necessità e/o la preferenza dell'operatore, e che fanno variare l'orientamento dell'ano rispetto alle "ore" dell'orologio. In genere comunque, indipendentemente dalla postura, si considerano posizionate anteriormente le ore 12, a sinistra le ore 3, in basso le ore 6 e a destra le ore 9.

Si consiglia invece di suddividere l'ano nella visione frontale che si offre al sanitario in ottavi, identificando conseguentemente 8 regioni: anteriore, antero-laterale sinistra, laterale sinistra, postero-laterale sinistra, posteriore, postero-laterale destra, laterale destra, antero-laterale destra.

La posizione della lesione può inoltre essere registrata nel canale anale rispetto alla sua estensione prossimale/distale, "a tot. mm da" / in prossimità di linea dentata, giunzione squamo-colonnare, canale anale distale, margine ano-cutaneo e regione perianale. Questa minuziosa descrizione permette di suddividere il canale anale in sezioni più piccole che possono aiutare la valutazione dell'entità e l'evoluzione della malattia. La documentazione fotografica può rappresentare un valido ausilio.

Come la colposcopia cervicale, l'HRA si basa sulla abilità del clinico di riconoscere anomalie nei pattern di colorazione dell'epitelio indotte dall'acido acetico e dal Lugol, cambiamenti nei pattern dei vasi e caratteristiche morfologiche come friabilità, ulcerazione ed effetto-massa. In questo modo, è possibile identificare e distinguere la presenza di potenziali HSIL e tumori precoci non palpabili da altre alterazioni benigne. È indispensabile, pertanto, osservare ogni lesione sospetta valutandone e registrando tutte le caratteristiche come elencato nella tabella 5.

Tabella 5 - Caratteristiche della lesione in corso di HRA

Categorie	Caratteristiche	Descrizione
Contorni	Piatti Esofitici	piani o ispessimento minimo, può essere irregolare o irregolare Esofitici, verrucosi, ispessiti, spesso in associazione con i cambiamenti papillari
Superficie	Liscia Granulare Papille Micropapille	Uniforme, non ispessita Irregolare, ispessita Sottili estroflessioni digitiforme, spesso con vasi avvolti da verruche Estroflessioni leggermente rialzate, simili alle papille ma meno ispessite, possono essere presenti piccoli vasi capillari
Vascolarizzazione	Puntatura Motivo a mosaico Vasi verrucosi	Capillari dilatati che creano un disegno punteggiato fine o grossolano Vasi connessi a formare tessere uniformi o irregolari, fini o grossolani e ispessiti Capillari serpiginosi spesso all'interno di papille o lesioni verrucose
Margini	Distinti Regolari Irregolari	Bordi ben demarcati, netti, possono avere margini interni Profilo simmetrico, lineare o dritto Sfumati, mal definibili
Lugol	Negativa Parziale Completa	Nessuna captazione, giallo Captazione parziale dello iodio, aspetto maculato di giallo e marrone Colorazione mogano, captazione uniforme

adattato da Jay et al.(83)

4. Materiali e Metodi

Reclutamento pazienti

Dal mese di giugno 2015 presso il centro HIV/IST dell'Istituto Dermatologico San Gallicano - IFO e la UOC Chirurgia Oncologica dell'Apparato Digerente e del Peritoneo dell'Istituto Regina Elena – IFO di Roma è stato avviato un programma di screening delle precancerosi anali dedicato ai pazienti appartenenti alle popolazioni ad alto rischio.

Nello screening sono stati inseriti:

- pazienti HIV-positivi;
- maschi omosessuali (MSM) afferenti ai progetti di screening per malattie sessualmente trasmesse;
- pazienti con storia di displasia e/o neoplasia squamosa ano-genitale.

Le caratteristiche dei pazienti sono elencati nella tabella 6.

Pap-test anale

Previo consenso informato scritto, ciascun partecipante è stato sottoposto alla raccolta di un campione citologico anale per la valutazione morfologica e il test HPV.

Il campione anale è stato raccolto mediante l'utilizzo di un tampone in Dacron, che è inserito nel canale anale per 3-5 cm e ruotato per 1 minuto in senso sia orario che anti-orario premendo contro le pareti della mucosa. Il campione di cellule così ottenuto è stato disperso in un mezzo per la citologia liquida e la conservazione degli acidi nucleici (PreservCyt, Hologic). Da questo campione è stata prelevata una aliquota per l'esecuzione del test HPV. Il resto è stato utilizzato per l'allestimento di un vetrino su strato sottile attraverso l'utilizzo del processatore ThinPrep2000 (Hologic). I preparati sono stati colorati con il metodo Papanicolaou secondo i protocolli standard. La morfologia è stata interpretata da un esperto citopatologo, che non disponeva di informazioni sullo stato clinico del

paziente né sulla eventuale presenza di HPV, secondo i criteri del sistema Bethesda utilizzati per la citologia cervico-vaginale. Il campione è stato classificato come di seguito specificato:

- negativo per lesione intraepiteliale o maligna (NILM);
- cellule squamose atipiche di significato indeterminato (ASC-US);
- cellule squamose atipiche-non si può escludere HSIL (ASC-H);
- lesione intra-epiteliale di basso grado (L-SIL);
- lesione intra-epiteliale di alto grado (H-SIL);
- carcinoma a cellule squamose (SCC).

HPV-test

L'infezione anale è stata identificata grazie all'utilizzo di un test per la simultanea ricerca e genotipizzazione del DNA di HPV (Linear Array HPV Genotyping test, Roche Diagnostics). Gli acidi nucleici totali sono stati estratti da 250ul del campione in PreservCyt utilizzando il kit Amplilute Liquid Media Extraction Kit (Roche Diagnostics). Il DNA virale è stato selettivamente amplificato in PCR mediante l'uso di oligonucleotidi specifici per la regione L1 del genoma virale per il gene della beta-globina come controllo interno dell'adeguatezza del campione. Gli eventuali ampliconi sono stati fatti ibridare su strip di nylon sensibilizzate con sonde specifiche per 37 diversi genotipi di HPV ano-genitali, sia a basso che ad alto rischio oncogeno.

Anoscopia ad alta risoluzione (HRA) con biopsia

Tutti i pazienti risultati non-negativi al pap-test anale, ovvero nei quali è stato riscontrato un esito tra ASCUS, ASCH, LSIL e HSIL sono stati informati sull'opportunità di eseguire una anoscopia ad alta risoluzione (HRA) come secondo livello del programma di screening ed è stato loro fornito un opuscolo informativo.

Il paziente sottoposto ad HRA ha eseguito preparazione rettale meccanica con clistere 1-2 ore prima della procedura. Al momento dell'esame il paziente è stato informato su ogni aspetto della

procedura, su rischi e benefici e ha firmato un consenso informato. È stata raccolta l'anamnesi patologica, con particolare riferimento a pregressi interventi proctologici e pregressi trattamenti per lesioni HPV-correlate.

Nella prima fase il paziente, in posizione di Sims, è stato sottoposto ad esplorazione digitale ano-rettale e, a seguire, è stata eseguita una anoscopia standard al fine di confrontare i dati ottenuti attraverso queste metodiche (DARE ed anoscopia) con l'HRA.

Successivamente è stata eseguita la HRA, secondo la procedura descritta nel precedente capitolo, utilizzando un anoscopio monouso Sapimed (A.4026ST per HRA) e un colposcopio modello ECLERIS C-100 con ottiche ad alta risoluzione.

La prima osservazione è stata fatta in assenza di tamponatura, poi è stato inserito per 1 minuto un tampone imbevuto con soluzione di acido acetico al 5%. Il canale anale è stato osservato in retrazione, completando se necessario la tamponatura con acido acetico ed applicando la soluzione di Lugol. Tutte le lesioni identificate come sospette, secondo le caratteristiche elencate nel precedente capitolo (tabelle 4 – 5), sono state sottoposte a biopsia per esame istologico. I pazienti sottoposti a biopsia, dopo tamponatura ed emostasi, sono stati tenuti in osservazione in ambiente protetto per il tempo necessario, prima di essere congedati.

Per ogni esame sono state registrate la procedura e le caratteristiche fisiologiche e patologiche identificate, in particolare in riferimento alle lesioni sottoposte a biopsia.

Ai pazienti è stato fornito un referto e le indicazioni per ritirare l'esame istologico.

Tutte le procedure sono state eseguite da un unico operatore, un chirurgo generale esperto di chirurgia oncologica e proctologica.

Diagnosi istologica

I campioni biotici sono stati fissati in formalina tamponata al 10% e processati secondo le procedure standard per l'allestimento di preparati istologici colorati con ematossilina-eosina. Questi sono stati

valutati da un anatomopatologo esperto di istopatologia del canale anale. La diagnosi istologica è stata effettuata secondo i criteri definiti nel 2012 dal Progetto LAST (Lower Anogenital Squamous Terminology), precedentemente descritta:

- negativo per lesione squamosa intra-epiteliale;
- L-SIL (AIN1), lesione squamosa intraepiteliale di basso grado;
- H-SIL (AIN2/AIN3), lesione squamosa intra-epiteliale di alto grado.

Algoritmo di screening

A seconda del risultato istologico il programma ha previsto le seguenti azioni secondo l'algoritmo elaborato a partire dalle indicazioni di Palefsky (figura 3).

In caso di esito negativo per lesione squamosa il programma di screening ha previsto l'esecuzione di nuovo pap-test a distanza di 12-24 mesi in funzione del quadro clinico dell'esito del precedente pap-test.

In caso di riscontro di L-SIL il paziente se sintomatico stato sottoposto a trattamento, se asintomatico è stato previsto nuovo pap-test a 6 mesi in caso di primo riscontro di lesione e a 12 mesi in caso di quadro stabile da 6 mesi (2 biopsie HRA-guidate successive).

In caso di riscontro di H-SIL il paziente è stato sottoposto a trattamento, ovvero ablazione con laser o APC e/o escissione chirurgica, seguiti da follo-up stretto con HRA a 4-6 mesi.

<i>Caratteristiche</i>	popolazione (346 pz) n(%)	HIV-positivi (257 pz) n(%)
<i>Anagrafiche</i>		
Sesso		
maschi	322(93,06)	251(97,67)
femmine	24(6,94)	6(2,33)
Età	42,81(20-64)	42,52(21-64)
<i>Patologiche</i>		
HIV+	257(74,28)	257(100)
Chirurgia ano-rettale	79(22,83)	51(19,84)
Pregresso lesione HPV	160(46,24)	107(41,63)
PAP TEST ANALE		
ASCUS	83(23,99)	52(24,46)
ASC-H	1(0,29)	1(0,39)
LSIL	171(49,42)	131(50,97)
HSIL	82(23,70)	71(27,63)
negativo	6(1,73)	1(0,39)
non noto	3(0,87)	1(0,39)
LESIONI IDENTIFICATE		
Metodica		
DARE	34(9,83)	30(11,37)
AS	62(17,92)	49(19,07)
HRA	195(56,36)	96(37,35)
Condilomi	62(17,91)	40(15,56)
Lesioni sospette (biopsia)	133(38,15)	96(37,35)
Esame istologico	133	
LSIL	100(75,19)	72(75)
HSIL	25(18,80)	23(23,96)
SCC	2(1,50)	1(1,04)
Flogosi	6(4,5)	0
TOT. SIL (condilomi + AIN)	192(55,49)	136(52,92)

5. Risultati

Da giugno 2015 ad ottobre 2018, nell'ambito del programma di screening per precancerosi anali presso il centro HIV/IST dell'Istituto Dermatologico San Gallicano e la UOC Chirurgia Oncologica dell'Apparato Digerente e del Peritoneo dell'Istituto Regino Elena – IFO di Roma, sono state eseguite 346 anoscopie ad alta risoluzione su pazienti appartenenti alle popolazioni a rischio (vedi tabella 6). Tutti i pazienti sono stati preventivamente sottoposti ad esplorazione ano-rettale digitale (DARE) e ad anoscopia standard.

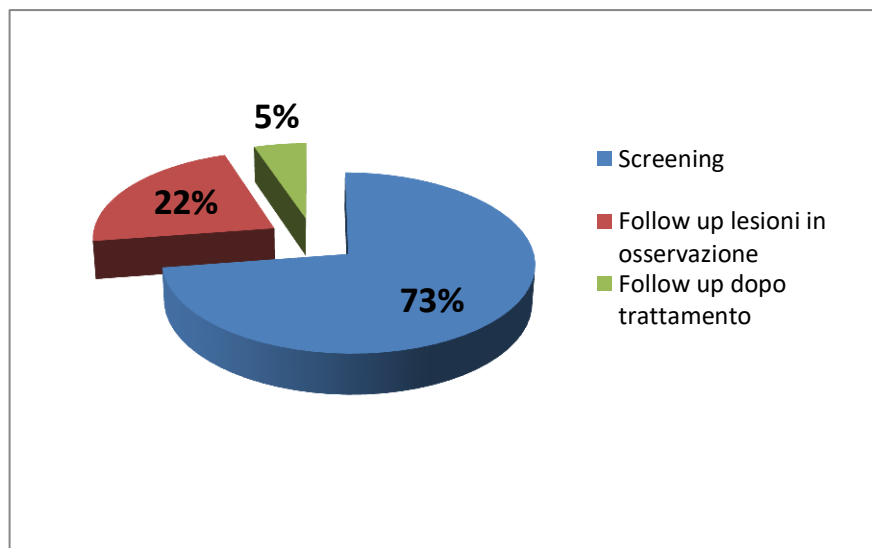
Nello specifico sono stati sottoposti alla procedura 322 uomini (93,06%) e 24 donne (6,94%), l'età media è stata di 41 anni con *range* da 20 a 64 anni.

I pazienti appartenevano almeno ad una delle seguenti popolazioni ad alto rischio per precancerosi anale:

- HIV positivi: 257 pazienti (74,28%)
- MSM ($\pm$ HIV positivi): 278 pazienti (80,35%)
- Pazienti con pregressa patologia HPV-associata: 160 (46,24%)

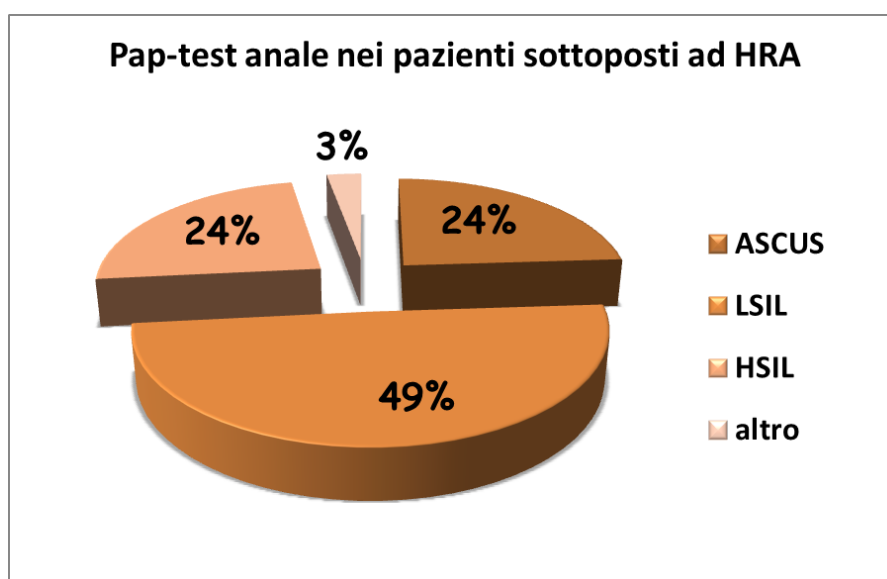
Le indicazioni alla HRA, coerentemente all'algoritmo di screening descritto nel precedente capitolo, sono state:

- 252 HRA di screening (72,55%), dopo primo riscontro di citologia anale non-negativa (ASCUS, ASC-H, LSIL, HSIL);
- 77 HRA di follow-up (22,25%), per precedente riscontro biptico di lesione HPV-associata;
- 18 HRA di controllo (5,210%), dopo pregresso trattamento di lesione precancerosa o cancro.



I risultati dei pap-test anali riscontrati nei pazienti reclutati erano i seguenti:

83 ASCUS (23,99%), 1 ASC-H (0,29%), 171 L-SIL (49,42%), 82 H-SIL (23,70%), 6 negativi (1,73), 3 non noti (0,87%). I 6 pazienti con pap-test negativo e i 3 con pap-test non noto sono stati sottoposti ad HRA per valutazione anale dopo pregressi trattamenti di lesioni displastiche di alto grado o neoplastiche anali.

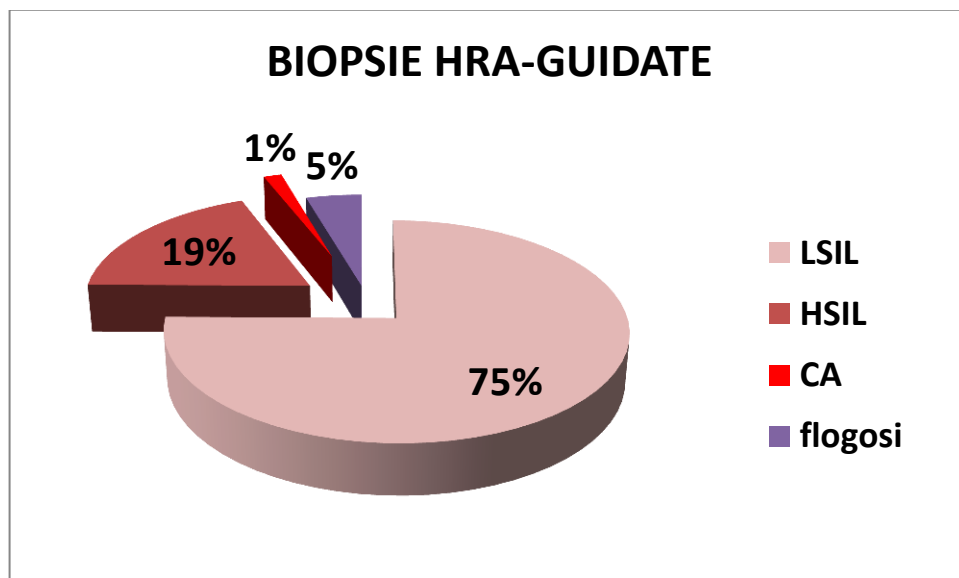


All'esplorazione digitale del retto (DARE) in 34 pazienti (9,83%) sono state apprezzate lesioni anali dubbie, 32 delle quali erano condilomi, mentre all'anoscopia standard sono state evidenziate lesioni HPV-associate in 62 casi (17,92%), di cui 55 condilomi.

All'anoscopia ad alta risoluzione sono state evidenziate lesioni con caratteristiche di sospetto in 195 pazienti (56,36%). In 62 (17,92%) si sono riscontrate formazioni condilomatose, mentre in 133 (38,44%) sono state evidenziate lesioni che sono state sottoposte a biopsia.

Gli esiti dell'esame istologico delle biopsie sono stati i seguenti:

- 100 L-SIL-AIN 1 (75,19% delle biopsie, 28,90 di tutte le HRA);
- 25 H-SIL-AIN 2,3 (18,80% delle biopsie, 7,8% di tutte le HRA);
- 2 carcinoma squamo-cellulare dell'ano (1,5% delle biopsie, 0,58 delle HRA)
- 6 flogosi cronica (4,5 delle biopsie, 4,55% delle HRA).



Con la HRA sono state diagnosticate lesioni associate ad HPV in 189 pazienti, ovvero nel 54,62% dei pazienti studiati. Con la DARE e l'anoscopia standard sono state individuate rispettivamente il 17,99% e il 32,80% di tutte le lesioni evidenziate con la HRA (tabella 7).

Tabella 7 – Lesioni evidenziate con le diverse metodiche (n=346)

	condilomi, n (%)	AIN, n (%)	SIL, n (%)
DARE	32 (9,25)	2 (0,58)	34 (9,83)
ANOSCOPIA STANDARD	55 (15,90)	7 (2,02)	62 (17,92)
HRA	62 (17,92)	127 (36,70)	189 (54,62)

*AIN: neoplasia intraepiteliale anale, SIL: lesione squamosa intraepiteliale, DARE: esplorazione digitale ano-rettale, HRA: anosopia ad alta risoluzione

È stata eseguita anche una analisi dei dati in funzione della positività al virus HIV (tabella 8).

I pazienti HIV positivi erano 257 (74,28%), di cui 251 maschi (97,67%) e 6 femmine (2,33%), con età media di 42,52 anni (range 21-64). In questo gruppo il 19,84% (51 pazienti) era stato precedentemente sottoposto a chirurgia anale e il 41,63% (107 pazienti) a trattamento per patologia ano-genitale associata ad HPV.

I pap-test in questi pazienti erano i seguenti: 52 ASCUS (24,46%), 1 ASC-H (0,39%), 131 L-SIL (50,97%), 71 H-SIL (27,63%), 1 negativo e 1 non noto. In 30 (11,37%) pazienti è stata apprezzata una lesione con esplorazione rettale digitale e in 49 (19,07%) con anosopia standard. Dopo HRA sono state individuate complessivamente 49 lesioni condilomatose (19,07%) e 96 lesioni con caratteristiche di sospetto che sono state biopsiate (37,35%).

All'esame istologico sono stati ottenuti i seguenti risultati:

- 72 L-SIL – AIN 1, pari al 75% delle biopsie e 28,02% di tutti i pazienti HIV+;
- 23 H-SIL – AIN 2-3, pari al 23,96% delle biopsie e 5,84 dei pazienti HIV+;
- 1 carcinoma a cellule squamose, pari al 1,04% delle biopsie e 0,39% dei pazienti HIV+;
- nessuna flogosi e/o biopsia negativa.

Con 96 biopsie positive su altrettante eseguite, la sensibilità per diagnosi di lesioni HPV-relate attraverso biopsia HRA-guidata nei pazienti HIV positivi è stata del 100%. Mentre con 127 biopsie positive su 133 la sensibilità della procedura in tutta la popolazione esaminata è stata del 95,49%.

Un'ulteriore analisi dei risultati è stata eseguita analizzando separatamente i risultati delle prime 100 anoscopie eseguite e quelli delle successive 246, al fine di evidenziare eventuali differenze dovute alla curva di apprendimento.

I primi 100 pazienti sottoposti ad HRA nel programma di screening erano così divisi: 97 maschi (97%) e 3 femmine (3%), età media 42,38 anni (range 25-59). I pazienti HIV positivi erano 73 (73%), 19 pazienti erano stati sottoposti a pregresso intervento per patologia anale (19%), 38 pazienti (38%) avevano in anamnesi un trattamento per patologia ano-genitale HPV-associata. I pap-test erano i seguenti: 20 ASCUS, 46 LSIL, 34 HSIL. In questa popolazione è stata evidenziata una lesione anale in 12 (12%) con l'esplorazione digitale ano-rettale e in 17 con l'anoscopia standard (17%). Con l'anoscopia ad alta risoluzione sono state individuate 16 lesioni sospette (16%) che sono state sottoposte a biopsia con il seguente esito: 13 LSIL-AIN 1 (81,25% delle biopsie, 13% delle HRA), 2 HSIL AIN2-3 (12,50% delle biopsie, 2% delle HRA), 1 flogosi (6,25 delle biopsie, 1% delle HRA), nessun carcinoma.

I successivi 246 pazienti sottoposti ad HRA nel programma di screening erano così divisi: 225 maschi (91,46%) e 21 femmine (8,54%), età media 42,95 anni (range 20-64). Pazienti HIV positivi 184 (74,80%), 60 pazienti sottoposti a pregresso intervento per patologia anale (24,39%), 122 pazienti (49,59%) sottoposti in passato a trattamento per patologia ano-genitale HPV-associata. I pap-test erano i seguenti: 63 ASCUS, 1 ASC-H, 125 LSIL, 48 HSIL, 6 negativi, 3 non noti. In questa popolazione è stata evidenziata una lesione anale in 22 pazienti (8,94%) con l'esplorazione digitale ano-rettale e in 45 con l'anoscopia standard (18,29%). Con l'anoscopia ad alta risoluzione sono state individuate 117 lesioni sospette (47,56%) che sono state sottoposte a biopsia con il seguente esito: 87 LSIL-AIN 1 (74,36% delle biopsie, 35,37% delle HRA), 23 HSIL AIN2-3 (19,66% delle biopsie, 9,35% delle HRA), 5

flogosi (4,27 delle biopsie, 2,03% delle HRA), 2 carcinomi a cellule squamose (1,71 delle biopsie, 0,81% delle HRA).

Tabella 8 - Popolazioni sottoposte ad HRA (prime 100 vs successive)

	Prime 100 HRA	Successive HRA (n=246)	<i>p-value</i>	<i>Significatività (p<0,01)</i>
Sesso				
M	97	225	0,72	<i>n.s.</i>
F	3	21	0,08	<i>n.s.</i>
Età	42,38	42,95		
HIV+	73	184		<i>n.s.</i>
PAP TEST ANALE				
ASCUS / ASCH	20	64	0,35	<i>n.s.</i>
LSIL	46	125	0,63	<i>n.s.</i>
HSIL	34	48	0,02	<i>n.s.</i>
LESIONI IDENTIFICATE				
Metodica				
DARE	12	22	0,43	<i>n.s.</i>
AS	17	45	0,81	<i>n.s.</i>
HRA	33	157	<0,01	<i>significativo</i>
Esame istologico biopsie HRA-guidate				
LSIL	13	87	0,05	<i>n.s.</i>
HSIL	2	23	0,34	<i>n.s.</i>
SCC	0	2	0,37	<i>n.s.</i>
Flogosi	1	5	0,51	<i>n.s.</i>
totali	15	112	<0,01	<i>significativo</i>

*HIV: human immunodeficiency virus; LSIL: lesione squamosa intraepiteliale di basso grado; HSIL: lesione squamosa intraepiteliale di alto grado; SCC: carcinoma a cellule squamose; AIN: neoplasia intraepiteliale anale; DARE: esplorazione digitale ano-rettale, HRA: anosopia ad alta risoluzione, AS: anosopia standard

Infine sono stati analizzati separatamente i pazienti che all'esame istologico definitivo dopo biopsia HRA-guidata sono risultati affetti da lesioni a displasia lieve (condilomi e LSIL-AIN1) e lesioni con displasia severa (HSIL-AIN e SCC) al fine di evidenziarne eventuali differenze (tabella 9). Il campione con displasia severa era rappresentato da 27 pazienti (2 SCC e 25 HSIL-AIN 2-3): 21 maschi (77,78%), 6 femmine (22,22%), con età media di 44,88 anni (23-63). Il 59,26% è risultato HIV positivo (16 pazienti), il 44,44% aveva già subito un intervento per patologia proctologia (12 pazienti) e il 62,96% era già stato trattato per patologia ano-genitale HPV-associata (19 pazienti). Al pap-test anale

risultavano i seguenti esiti: 4 ASCUS (14,81%), 8 LSIL (29,63%), 15 HSIL (55,55%). Il campione con displasia lieve era costituito da 162 pazienti, 62 condilomi e 100 LSIL-AIN1. 150 maschi (92,59%) e 12 femmine (7,41%), età media 43,58 anni (20-64). Il 77,78% era HIV-positivo (126 pazienti), il 23,46% era stato sottoposto ad intervento per patologia proctologica (38 pazienti) e il 48,77% era stato sottoposto a trattamento per patologia HPV-associata ano-genitale (79 pazienti). I risultati del pap-test anale erano i seguenti: 44 ASCUS (27,16%), 79 LSIL (48,77%), 31 HSIL (19,14%).

Nella seguente tabella sono stati confrontati i dati dei due gruppi per valutarne la significatività.

Tabella 9 – Confronto pazienti con LSIL e HSIL

	LSIL (condilomi, AIN1) totale=162 n (%)	HSIL (SCC, AIN2-3) totale=27 n (%)	p
HIV+	126 (77,78)	16 (59,26)	0,65
Pregressa patologia proctologica	38 (23,46)	12 (44,44)	0,1
Pregresso HPV ano-genitale	79 (48,77)	19 (70,37)	0,26
Pap-test anale			
ASCUS	44 (27,16)	4 (14,81)	0,27
LSIL	79 (48,77)	8 (29,63)	0,24
HSIL	31 (19,14)	15 (55,56)	<0,01

**HIV: human immunodeficiency virus; LSIL: low grade squamous intraepithelial lesion; HSIL: high grade squamous intraepithelial lesion; AIN: anal intraepithelial neoplasia; SCC: squamous cells carcinoma*

6. Discussione

Il carcinoma a cellule squamose dell'ano è una patologia rara ma in costante e progressivo aumento. L'elevata incidenza in gruppi di popolazione considerate ad alto rischio, impone l'attuazione di programmi di screening. Come discusso in precedenza, numerose evidenze identificano come popolazione a rischio i pazienti HIV positivi, i pazienti con pregressa neoplasia ano-genitale HPV-relata e i pazienti affetti da deficit immunitari. L'infezione da papilloma virus rappresenta il principale fattore di rischio per lo sviluppo di displasia anale. Pertanto, tutti i comportamenti che espongono al contatto con l'HPV, ed in particolare i rapporti anali e la promiscuità sessuale, aumentano il rischio di sviluppare infezioni con ceppi oncogeni. Nelle popolazioni di maschi omosessuali (MSM) HIV-positivi, sono stati riportati picchi di incidenza di 131 casi ogni 100000 abitanti per anno (2).

Identificati gli individui ad alto rischio, si è ampiamente discusso su quale sia la strategia più efficace per identificare precocemente lesioni displastiche.

Attualmente l'anoscopia ad alta risoluzione (HRA) è da considerarsi il gold standard nei programmi di prevenzione di cancro dell'ano. Le metodiche alternative proposte sono l'esplorazione digitale ano-rettale (DARE) e l'anoscopia standard.

La DARE ha i seguenti vantaggi:

- non necessita di strumentazione specifica;
- brevi tempi di esecuzione;
- relativamente ben tollerata dai pazienti.

Tuttavia, è gravata da scarsa sensibilità anche se eseguita da personale esperto. Attraverso questa metodica, infatti, è possibile identificare solo lesioni che abbiano dimensioni e caratteristiche morfologiche macroscopiche apprezzabili al tatto. Al contrario, le lesioni squamose, nelle fasi precoci dell'evoluzione fisiopatologica della displasia, non sono ispessite, conservano una superficie ancora

morbida e liscia e manifestano atipie vascolari percepibili solo visivamente. Conseguentemente possono rimanere misconosciute all'esplorazione digitale.

Nella nostra casistica la DARE è stata eseguita da un chirurgo proctologo. Attraverso questa metodica, sono state individuate complessivamente solo il 17,99% delle lesioni diagnosticate complessivamente con la HRA (vedi tabella 11). Ne è derivata una scarsa accuratezza diagnostica che, in assenza del riscontro con HRA, avrebbe causato una notevole perdita di efficacia del programma di screening. Inoltre, la gran parte delle lesioni identificate con la DARE (94,12%) era rappresentata da formazioni condilomatose, ovvero circa la metà di tutti i condilomi trovati successivamente con la HRA (51,61%). Questo perché, tipicamente, i condilomi acuminati si manifestano come estroflessioni del tessuto anale con consistenza fibrosa e sono facilmente apprezzabili all'esame proctologico. Al contrario, i condilomi piani non offrono le tipiche caratteristiche cliniche di struttura rilevata e superficie verrucosa, potendo facilmente sfuggire alla DARE. L'accuratezza diagnostica per le AIN è stata mediocre: solo l'1,57 delle lesioni squamose, complessivamente identificate con la HRA, è stato identificato con la DARE (vedi tabella 11) e, quindi, molte SIL sono sfuggite. Anche questo dato è spiegabile con la scarsa palpabilità delle lesioni squamose in fase precoce. A queste considerazioni, bisogna aggiungere che la regione anale è spesso affetta da comorbidità, che alterano le strutture anatomiche e le caratteristiche funzionali: la presenza di ragadi o fissurazioni con bordi rilevati, di gavoccioli emorroidari congesti, di tessuto cicatriziale esito di traumi o pregressi trattamenti tendono a mascherare la presenza di lesioni piccole e precoci.

Tabella 10 - Esplorazione ano-rettale digitale (DARE)

<i>Vantaggi</i>	<i>Limiti</i>
no strumentazione specifica brevi tempi di esecuzione buona tollerabilità	scarsa accuratezza per lesioni piane e piccole atipie cromatiche e/o vascolari non visibili comorbidità

In merito all'anoscopia standard (AS) è possibile trarre considerazioni diverse. L'esecuzione di questa procedura, a differenza della semplice esplorazione rettale, necessita di strumentario specifico: anoscopi e fonte di luce. Inoltre, a differenza della DARE, che spesso già fa parte del bagaglio professionale di molti medici, l'anoscopia può richiedere una lunga curva di apprendimento, soprattutto in relazione alle comorbidità proctologiche di frequente riscontro. Nella nostra casistica, ad esempio, il 59,84% dei pazienti era affetto da patologia ano-rettale, clinica o sub-clinica, al momento della visita di screening. Ulteriore considerazione sulla AS è che la tollerabilità da parte dei pazienti è inferiore, poiché viene percepito come esame "strumentale" e maggiormente "invasivo". Infine, rispetto alla DARE non è da sottovalutare la potenziale lesività della procedura, che viene eseguita con uno strumento rigido, e che può richiedere piccole manovre di emostasi e/o esitare in, seppur blandi, sanguinamenti o lieve dolore. Queste sequele possono indurre nel paziente scarsa aderenza ai programmi di screening. In merito alla sensibilità dell'anoscopia standard, nella nostra esperienza, l'utilizzo di questa metodica ha permesso l'identificazione di lesioni displastiche anali nel 17,92% dei pazienti; pertanto è stato diagnosticato solo il 32,80% delle lesioni successivamente trovate con la HRA. Delle 62 displasie evidenziate, l'88,71% erano condilomi, le restanti erano AIN. L'anoscopia ha una sensibilità maggiore della DARE nell'evidenziare lesioni condilomatose, essendone stato identificato l'88,7% di quelle trovate con l'HRA, rispettivamente 55 e 62, con $p=0,36$. L'anoscopia permette di aggiungere nella diagnostica il dato visivo, benché senza ingrandimento, e quindi di scoprire lesioni anche piane, con alterazioni cromatiche e/o vascolari, se sufficientemente grandi. Anche per l'anoscopia standard, però, si registra una scarsa sensibilità per le AIN, rilevate solo nel 2,02% delle procedure eseguite, corrispondenti al 5,51% delle AIN identificate con HRA (rispettivamente 7 e 127 con $p < 0,01$). Non si dispone in Letteratura di studi multicentrici di confronto tra le metodiche. In uno studio prospettico Camus et al. in una popolazione di 102 pazienti rilevano che solo il 38,7% delle lesioni identificate con HRA era visibile con l'anoscopia standard (74).

Tabella 11 - Anoscopia standard (AS)

<i>Vantaggi</i>	<i>Limiti</i>
lesioni discromiche lesioni ispessite	strumentario specifico curva di apprendimento possibili lesioni lesioni piccole non visibili (no ingrandimento)

La scarsa sensibilità delle procedure descritte, le rende a nostro parere inadeguate all'applicazione in programmi di screening.

Tabella 12 - Lesioni evidenziate con le diverse metodiche di screening (n=346)

	DARE	HRA	P	AS	HRA	p
<i>condilomi, n (%)</i>	32 (51,61)	62 (100)	<0,01	55 (88,71)	62 (100)	0,36
<i>AIN, n (%)</i>	2 (1,57)	127 (100)	<0,01	7 (5,51)	127 (100)	<0,01
<i>SIL, n (%)</i>	34 (17,99)	189 (100)	<0,01	62 (32,80)	189 (100)	<0,01
*AIN: neoplasia intraepiteliale anale, SIL: lesione squamosa intraepiteliale, DARE: esplorazione digitale ano-rettale, HRA: anoscopia ad alta risoluzione, AS: anoscopia standard						

La HRA, invece, ha dimostrato un elevato potenziale diagnostico. L'applicazione dell'acido acetico e della soluzione di Lugol, permettono di evidenziare aree ad alto rischio; l'utilizzo dell'ingrandimento fino a 25x consente di individuare lesioni anche molto piccole, con alterazioni sia strutturali, sia vascolari. Nella nostra casistica, in 189 su 346 HRA totali sono state identificate lesioni squamose intraepiteliali, (54,62%). La specificità della procedura risulta elevata: nella nostra esperienza, solo 6 biopsie sulle 133 eseguite su lesioni sospette, non hanno evidenziato una lesione HPV-relata (flogosi cronica), mentre nei rimanenti 127 casi pari al 95,49% è stata dimostrata una lesione intraepiteliale squamosa o, addirittura, un carcinoma squamoso.

Complessivamente il 20,45% delle lesioni identificate è risultata una HSIL. In Letteratura questi dati sono molto variabili. Lo studio APACHES che ha analizzato i dati di 7 diversi centri in Francia, ha

riportato prevalenza globale di HSIL del 10,4%, con valori dei singoli centri tra lo 0 e il 15,7% (84). Silvera riporta una prevalenza di HSIL del 33,8% in 391 pazienti con 1761 biopsie eseguite, proponendo l'esecuzione di biopsie random, da associarsi alle biopsie mirate, per ottenere una migliore accuratezza (85) Nello studio SPANC su 500 HRA eseguite su MSM, viene riportata un tasso di HSIL del 39,2% (86).

Nell'algoritmo di screening applicato presso il nostro Centro, la HRA viene utilizzata come procedura di secondo livello e riservata ai pazienti nei quali è stata diagnosticata una atipia anale. In quest'ottica, nell'ambito delle popolazioni ad alto rischio, l'identificazione di atipie cellulari con esame citologico (pap-test anale) rappresenta un adeguato strumento per identificare gli individui potenzialmente affetti da lesioni displastiche. La citologia anale ha una sensibilità dal 69% al 93% e una specificità dal 32% al 59% negli individui HIV-positivi. La non-negatività al pap-test anale richiede un approfondimento diagnostico, indipendentemente dal grado dell'atipia riscontrata. Nella nostra casistica i risultati dai pap-test erano: 83 ASCUS (23,99%), 1 ASC-H (0,29%), 171 L-SIL (49,42%), 82 H-SIL (23,70%), 6 negativi (1,73), 3 non noti (0,87%). I 6 pazienti con pap-test negativo e i 3 con pap-test non noto, sono stati comunque sottoposti ad HRA per follow-up dopo pregressi trattamenti di lesioni displastiche di alto grado o neoplastiche ano-genitali.

Attraverso l'analisi dei dati, si è cercato di evidenziare una correlazione tra grado di atipia cellulare (esito del pap-test anale) e grado di displasia anale (esame istologico su biopsia HRA-guidata). I pazienti con displasia di alto grado all'istologico avevano una HSIL al pap-test anale nel 55,56% dei casi, mentre quelli con displasia di basso grado avevano una HSIL al pap-test anale nel 19,14%. Questi dati risultano significativi al test chi-quadro, con un valore p inferiore a 0,01, e suggeriscono che ad una HSIL citologica possa frequentemente corrispondere un alto grado istologico. Naturalmente, tali risultati non autorizzano a restringere l'esecuzione della HRA solo ai pazienti con HSIL, ma possono rappresentare una preziosa indicazione, basata su evidenza e non solo sull'esperienza, a concentrare l'attenzione su tutte le lesioni evidenziabili in questi pazienti considerandole come potenzialmente positive.

Le ulteriori caratteristiche clinico-patologiche indagate in rapporto con la presenza di displasia nei pazienti sono state:

- sieropositività per il virus HIV;
- storia di patologia HPV-relata;
- patologia proctologica benigna.

Nel nostro studio, i pazienti HIV positivi erano 257 (74,28%), al pap-test si evidenziavano i seguenti esiti: 52 ASCUS (24,46%), 1 ASC-H (0,39%), 131 L-SIL (50,97%), 71 H-SIL (27,63%), 1 negativo e 1 non noto. Dopo HRA sono state individuate complessivamente 49 lesioni condilomatose (19,07%) e 96 lesioni con caratteristiche di sospetto che sono state biopsiate (37,35%). All'esame istologico sono risultati 72 L-SIL, pari al 75% delle biopsie e al 28,02% di tutti i pazienti HIV+, 23 H-SIL, pari al 23,96% delle biopsie e 5,84 dei pazienti HIV+; 1 carcinoma a cellule squamose, pari al 1,04% delle biopsie e allo 0,39% dei pazienti HIV+; nessuna flogosi e/o biopsia negativa. Complessivamente, nella popolazione HIV positiva (con citologico non negativo), la prevalenza di una lesione intraepiteliale squamosa è stata del 56,42% (145 SIL su 257 HRA eseguite) e risulta maggiore rispetto alla popolazione di pazienti sieronegativi (con citologico non negativo) dove è stata del 48,45%. Nei pazienti HIV-positivi, dunque, si è riscontrata una prevalenza di HSIL nel 23,96% delle lesioni sospette. Darwich e al. riportano una incidenza del 13,7% di HSIL su una popolazione di 146 pazienti HIV-positivi (87). Gaisa et al. in uno studio su 2075 pazienti HIV-positivo, hanno identificato 728 pazienti con atipie ASCUS+ al papt-test anale; in questa popolazione hanno evidenziato una prevalenza del 19,35% di HSIL (88). Frank et al. riportano, invece, i dati ottenuti dallo studio di 147 pazienti affetti da HIV in stadio avanzato: in questo campione la prevalenza di HSIL risulta significativamente più alta (62%) (89).

Per quanto riguarda le altre caratteristiche, nell'intera popolazione studiata il 19,84% era stato precedentemente sottoposto a trattamento per patologia benigna ano-rettale (emorroidi, prolasso

rettale, ragadi, patologia suppurativa), mentre nei pazienti con evidenza istologica di lesione squamosa l'incidenza sale al 28,28%. In Letteratura, la correlazione tra patologia benigna e lesioni squamose non è univoca: Gimenez et al. riferiscono che la presenza di affezioni benigne (emorroidi, papille ipertrofiche, fistole, ragadi, prurito anale e proctiti) non è significativa in una popolazione di 107 pazienti studiati (61); altri studi riportano una relazione significativa tra comorbidità proctologica e cancro dell'ano (Frisch et al.(90), Tseng et al.(91).

Per quanto riguarda la presenza di pregressa patologia ano-genitale HPV-relata, nella popolazione tale condizione era presente in anamnesi nel 41,63%; mentre nei pazienti affetti da HSIL tale caratteristica era presente nel 68% dei pazienti, confermando che l'infezione da HPV rappresenta un importante fattore di rischio, non solo per lo sviluppo di displasia anale, ma anche per la progressione verso l'alto grado. Tale dato concorda con quanto riportato negli studi APACHES (84) e SPANC (86).

Un'altra potenzialità della HRA è la possibilità di eseguire ed acquisire foto delle lesioni identificate. La costituzione di un archivio di immagini ha diversi vantaggi. Permette di verificare, nello stesso paziente, l'evoluzione nel tempo dei quadri riscontrati. Infatti, anche l'attenta e minuziosa descrizione delle lesioni sospette, può non essere sufficiente a "riconoscere" le stesse a distanza di tempo. Spesso infatti, la comparsa di affezioni proctologiche, gli esiti di eventuali biopsie eseguite, l'evoluzione delle lesioni stesse possono concorrere ad alterare in quadro globale. Indubbiamente, poter disporre di una documentazione fotografica è di grande ausilio per un migliore follow-up. La disponibilità di immagini può risultare essenziale, in particolare nelle situazioni in cui sono presenti molteplici lesioni, con caratteristiche sovrapponibili e localizzate nei medesimi quadranti del canale anale.

Ulteriore beneficio è la possibilità di avere le immagini a disposizione di altri operatori, al fine di ottenere delle indagini il più possibile standardizzate.

Infine il database di immagini che possano essere riviste e confrontate con le nuove, concorre a potenziare la capacità diagnostica dell'operatore di HRA e del Centro dove si svolge il programma di screening.

Una importante considerazione deve essere fatta sulla curva di apprendimento. La HRA è una procedura che deve essere eseguita in maniera metodica e sistematica. L'esperienza in campo proctologico o endoscopico rappresentano della basi tecniche necessarie per una adeguata esecuzione dell'esame. Naturalmente, il riconoscimento degli indicatori di sospetto di eventuali lesioni rappresenta la fase decisiva della metodologia. In quest'ottica, quindi, una approfondita conoscenza dell'anatomia del canale anale e della fisiopatologia delle lesioni HPV-relate sono un bagaglio irrinunciabile per approcciarsi correttamente alle sfide diagnostiche della HRA. La valutazione del canale anale deve essere attenta e minuziosa al fine di non misconoscere quelle lesioni (che spesso sono davvero di piccole dimensioni, anche nell'ordine di 1 mm di diametro), potenzialmente displastiche e meritevoli di approfondimento diagnostico con esame istologico.

Parallelamente, la procedura deve essere ben tollerata dal paziente, la cui aderenza al programma di prevenzione è indispensabile, considerando che potenzialmente può essere sottoposto all'esame varie volte e in tempi relativamente ravvicinati. Pertanto, esami inutilmente prolungati, se non in casi particolarmente ostici, vanno evitati. Nelle linee guida proposte dalla International Anal Neoplasia Society (IANS) (80), si raccomanda di eseguire HRA della durata inferiore ai 15 minuti nel 90% delle procedure e si auspica di mantenere l'incidenza di complicanze (dolore e sanguinamento) a meno del 10% dei casi.

In merito alla tecnica, molti studi concordano sulla necessità di eseguire un numero di procedure elevato prima di ottenere una adeguata capacità diagnostica. Nella nostra esperienza, si è osservata una notevole variazione dell'accuratezza diagnostica rispetto alle HSIL istologiche, confrontando le

HRA iniziali con le successive. Le prime 100 HRA sono state eseguite in un periodo di circa 18 mesi, mentre nei 18 mesi successivi sono state eseguite ulteriori 246 procedure. Le due popolazioni osservate sono state confrontate e sono risultate omogenee per età, sesso, sieropositività al virus HIV, pap-test anale (vedi tabella 7).

Le lesioni identificate attraverso le metodiche convenzionali, ovvero esplorazione ano-rettale digitale ed anosopia standard, sono risultate in percentuali sovrapponibili nel primo e nel secondo periodo. Invece, le lesioni individuate come potenzialmente positive (e quindi sottoposte a biopsia), sono notevolmente aumentate, dal 16% al 47,6%, in misura statisticamente significativa al test chi-quadro ($p<0,01$). In particolare è aumentata l'identificazione di lesioni ad alto grado, che sono passate dal 2% al 15,92% di tutte le HRA e dal 13,33% al 19,66 dei risultati degli esami istologici. Le lesioni biopsiate nel primo periodo hanno dato comunque esiti sovrapponibili ai quelli del secondo gruppo in termini di grado delle lesioni, mentre il numero di lesioni individuate è sensibilmente aumentato. Con il progredire della curva di apprendimento è, quindi, aumentato il valore predittivo positivo della procedura. Inoltre, l'aumento del numero di lesioni sospette identificate non è stato accompagnato da un aumento di falsi positivi. Tutte le biopsie risultate negative per displasia, erano comunque positive per flogosi cronica, e sono passate dal 6,25% (1 negativo su 16 biopsie) al 4,27% (5 negativi su 117 biopsie), testimoniando una elevata specificità della procedura se eseguita secondo i criteri descritti precedentemente e dopo un adeguato periodo di formazione.

Secondo le linee guida dell'IANS, per mantenere un elevato standard tecnico nell'individuazione di SIL con HRA devono essere eseguite almeno 50 procedure ogni anno e se ne raccomandano almeno 100, idealmente almeno 5 a settimana; devono essere eseguite almeno 50 biopsie per anno e se ne raccomandano almeno 100; devono essere identificate almeno 20 H-SIL e se ne raccomandano almeno 50. Non è sufficiente, quindi, raggiungere uno standard procedurale e diagnostico, ma deve essere mantenuto a livelli adeguati per garantire risultati efficaci in un programma di screening. I nostri dati suggeriscono che l'efficacia diagnostica della HRA possa ancora aumentare, ipotizzando idealmente le 500 HRA totali eseguite come raggiungimento di un plateau massimo di accuratezza, in

accordo con le considerazioni di Hillman (81). Nella nostra esperienza, i migliori risultati, in termini di capacità di riconoscere le potenziali displasie, sono stati ottenuti quando ci si è attestati sull'esecuzione di 4-7 procedure per settimana e circa 200 HRA annue. Questa tendenza deve essere confermata con la prosecuzione del progetto di screening nel lungo periodo. Indubbiamente, la continua acquisizione di esperienza, l'identificazione di nuove lesioni, la possibilità di osservarne l'andamento nel tempo e di confermarne la natura con l'esame istologico, sono favorite dal volume e dalla frequenza di esami eseguiti.

7. Conclusioni

L'aumento dei tassi di incidenza di cancro anale e la maggiore comprensione della storia naturale delle lesioni anali precancerose hanno spinto la comunità scientifica ad implementare programmi di screening sui pazienti ad alto rischio. Attualmente, non esistono linee guida condivise su un algoritmo diagnostico. Gli studi concordano sull'individuazione di popolazioni ad alto rischio, nelle quali l'incidenza del tumore supera quella del cancro del colon nella popolazione generale. Verso questi gruppi: pazienti HIV-positivi, pazienti con pregressa neoplasia HPV-relata, omosessuali maschi, deve concentrarsi l'attenzione epidemiologica e di medicina preventiva.

Il carcinoma a cellule squamose dell'ano condivide con il tumore della cervice uterina eziopatogenesi e fisiopatologia. La pluridecennale e proficua esperienza acquisita nella diagnosi secondaria di quest'ultima neoplasia, coronata da un'eccezionale riduzione dell'incidenza, ha spinto a sviluppare idonei programmi di screening per le lesioni displastiche anali che rappresentano i precursori del cancro dell'ano.

L'anoscopia ad alta risoluzione rappresenta il gold standard per la diagnosi delle lesioni squamose intraepiteliali. La nostra ricerca è stata condotta su una popolazione di pazienti appartenenti a popolazioni ad alto rischio per cancro anale (MSM, HIV+, pregressa neoplasia ano-genitale HPV-relata), risultati positivi al pap-test anale.

Nel nostro studio abbiamo evidenziato una prevalenza del 54,62% di lesioni squamose anali con HRA. Il 20,45% era rappresentato da lesioni di alto grado e quindi ad elevato rischio di trasformazione maligna.

Le metodiche alternative proposte sono l'esplorazione ano-rettale digitale e l'anoscopia standard, ma sono caratterizzate da scarsa sensibilità, soprattutto per le lesioni precoci. Nel nostro studio con la DARE è stato diagnosticato solo il 17,99 delle lesioni complessivamente individuato con la HRA e solo l'1,57 delle AIN. Con l'anoscopia standard è stato individuato solo il 32,80% delle lesioni trovate con la HRA e solo il 2,02% delle AIN. L'accuratezza diagnostica associata a queste due metodiche non permette di considerarle idonee per un programma di screening.

Le migliori potenzialità della HRA si ottengono inserendola in un algoritmo di screening dedicato agli individui ad alto rischio. I pazienti che manifestano atipie citologiche al pap-test anale (ASCUS+) devono essere studiati con anoscopia ad alta risoluzione. Attraverso questa metodica è possibile identificare efficacemente lesioni precancerose dell'ano che possono essere documentate e biopsiate. Le lesioni di basso grado vengono monitorate nel tempo. Le lesioni di alto grado, ad elevato rischio di trasformazione neoplastica, sono efficacemente trattate.

Nel nostro studio, abbiamo registrato una correlazione delle lesioni ad alto grado (HSIL) con le caratteristiche patologiche analizzate. Tra i pazienti HIV-positivi si è riscontrata una prevalenza di HSIL nel 23,46%. Il 28,28% di tutti gli individui affetti da lesione squamose era stato sottoposto a terapia chirurgica per patologia anale benigna. Infine il 68% dei pazienti con HSIL aveva in anamnesi pregresso trattamento per patologia associata ad HPV.

La HRA è una procedura di non semplice esecuzione a causa della complessa anatomia del canale anale, della frequente presenza di comorbidità e della difficoltà a riconoscere le lesioni displastiche. Per ottenere gli elevati standard diagnostici, indispensabili per attuare efficaci programmi di screening, sono necessari una lunga curva di apprendimento e adeguati volumi e frequenza delle procedure. Nella nostra esperienza, confrontando le prime 100 HRA eseguite con le successive, abbiamo evidenziato un notevole miglioramento dell'accuratezza diagnostica con la progressione della curva di apprendimento. Le lesioni evidenziate sono passate dal 16% al 47,6% e le lesioni di alto

grado sono state registrate nel 2% delle HRA nel primo periodo e nel 15,92% delle HRA nel periodo successivo.

Al momento attuale, non sono state diffuse delle linee guida condivise sui programmi di prevenzione del cancro dell'ano. Le esperienze cliniche, comunque, dimostrano che l'accuratezza diagnostica raggiungibile con la HRA sia elevata e suggeriscono che, in termini di prevenzione del carcinoma squamoso anale, si possano ottenere risultati simili a quelli del cancro cervicale.

Nell'immediato futuro, è auspicabile lo sviluppo di studi multicentrici e multinazionali, progettati per affrontare questo crescente problema clinico e fornire le prove scientifiche e cliniche per uno screening standardizzato e una adeguata gestione delle lesioni precancerose anali.

Figure

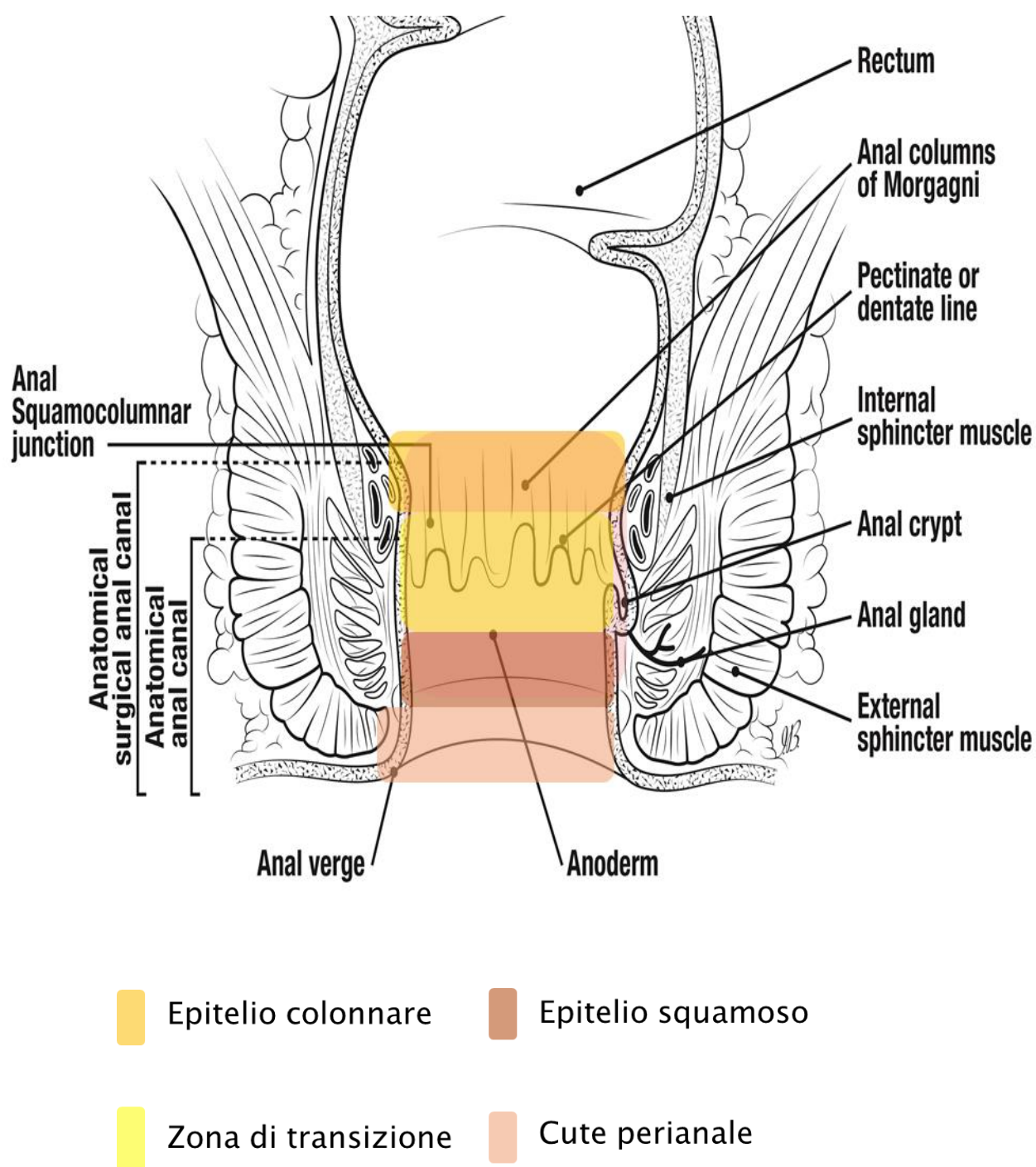


Figura 1 – Anatomia del canale anale (tavola elaborata da Ilaria Bondi)



Figura 2 - Colposcopio Ecleris C100F (dal sito www.ecleris.com)

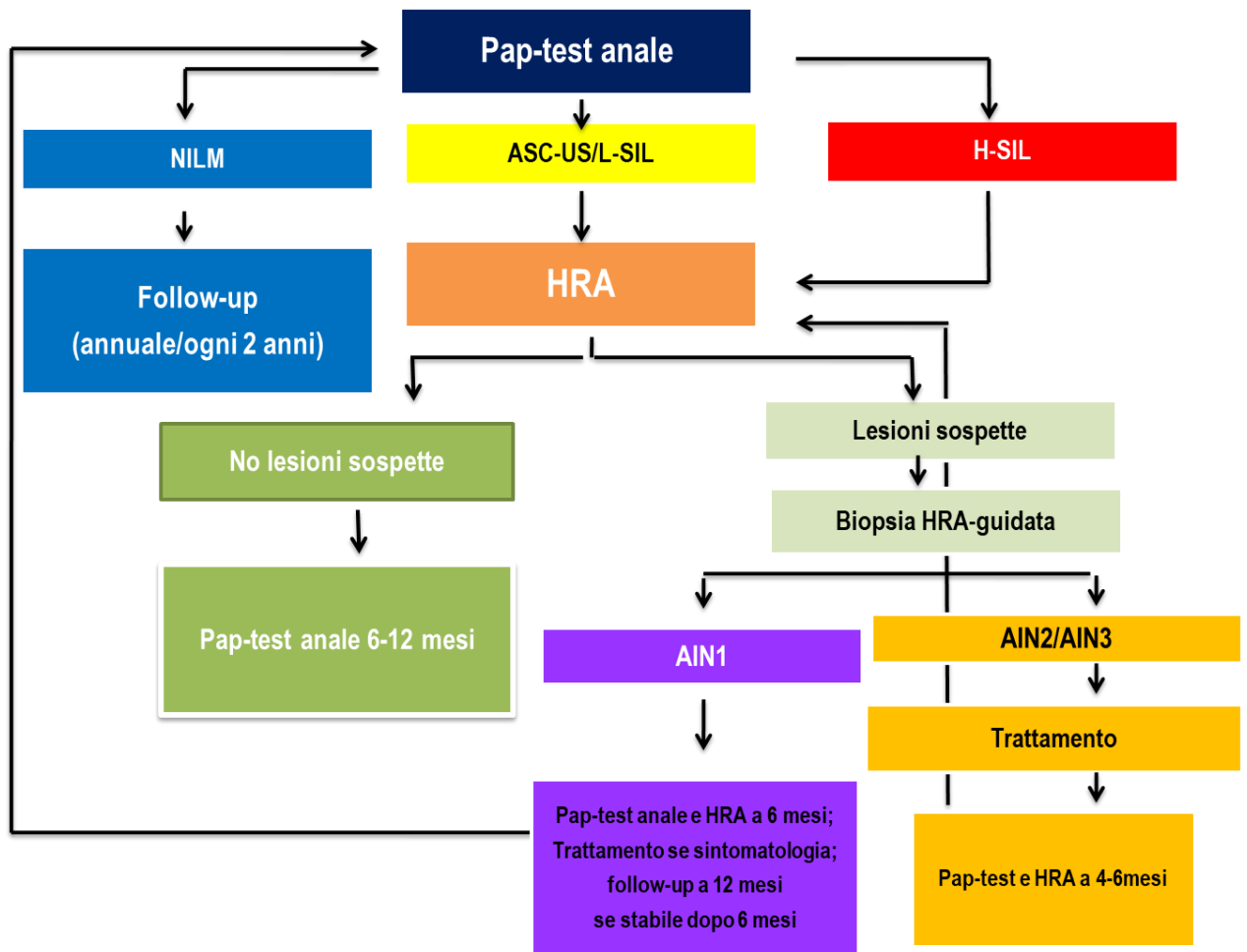


Figura 3 - Algoritmo per screening delle lesioni anali associate ad HPV



Figura 4 – Posizionamento anoscopio con paziente in posizione di Sims

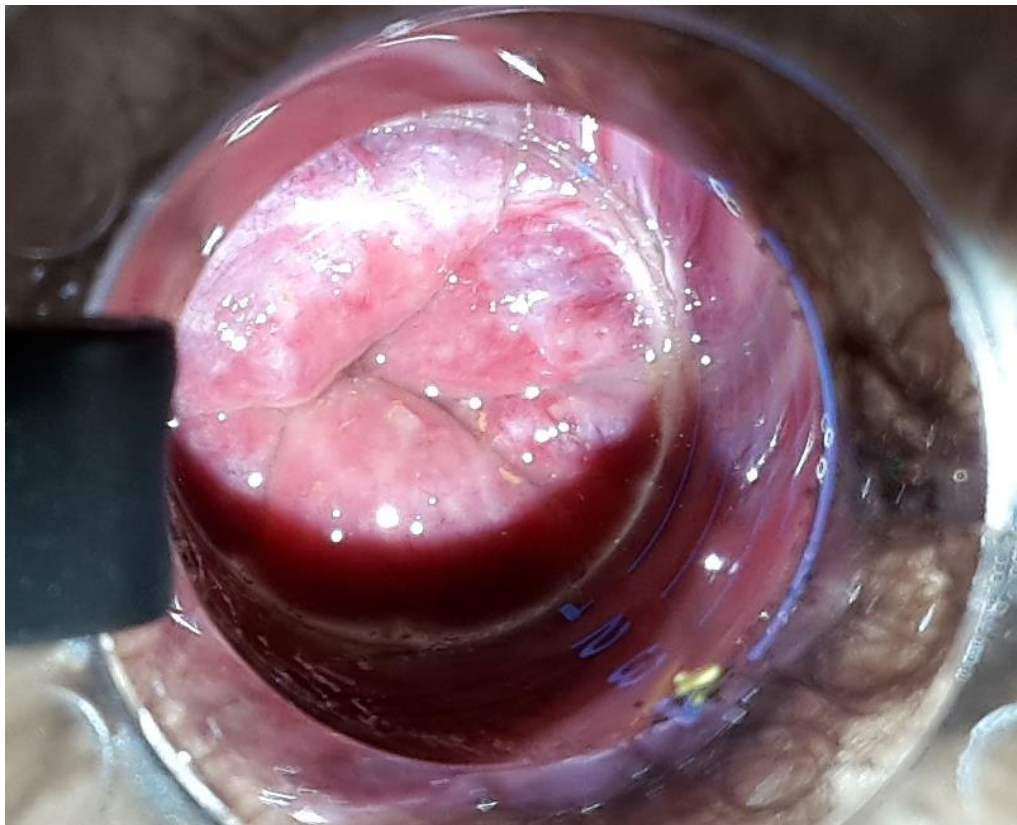


Figura 5 – Ispezione canale anale a secco



Figura 6 – Tamponatura con acido acetico: reazione di “whitening”



Figura 7 – Applicazione soluzione di Lugol



**Figura 8 – Area aceto-reattiva con “puntatura” in regione anteriore
(paziente in decubito laterale-sinistro, Sims)**



Figura 9 – neoformazione verrucosa in regione anale anteriore (all’EI: SCC)

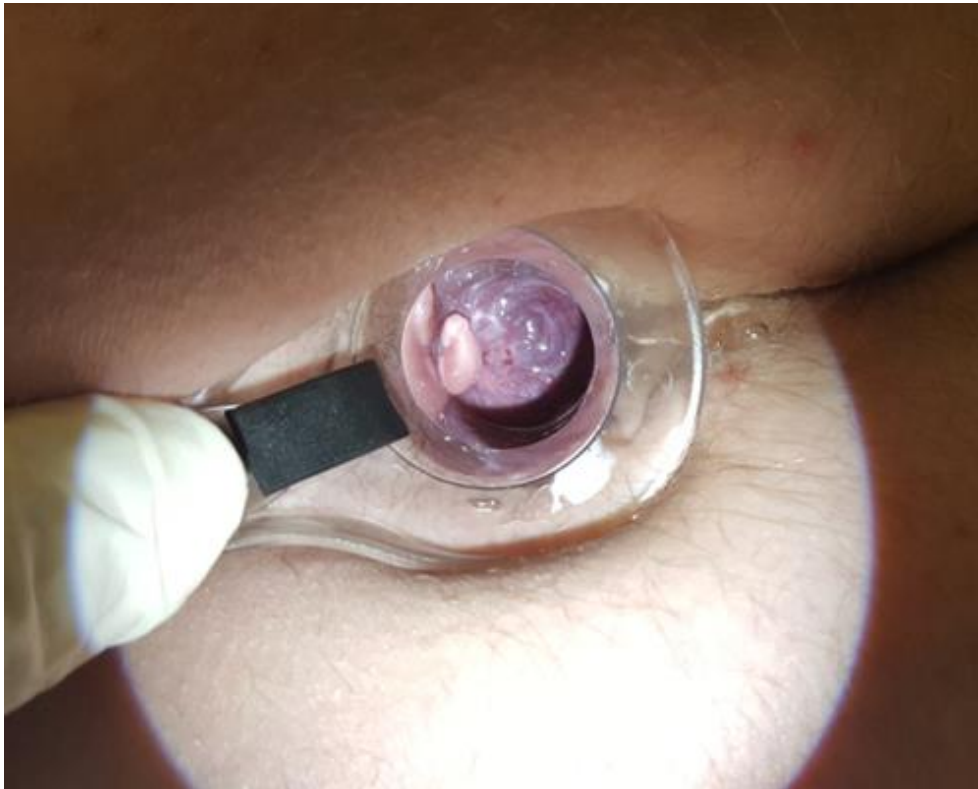
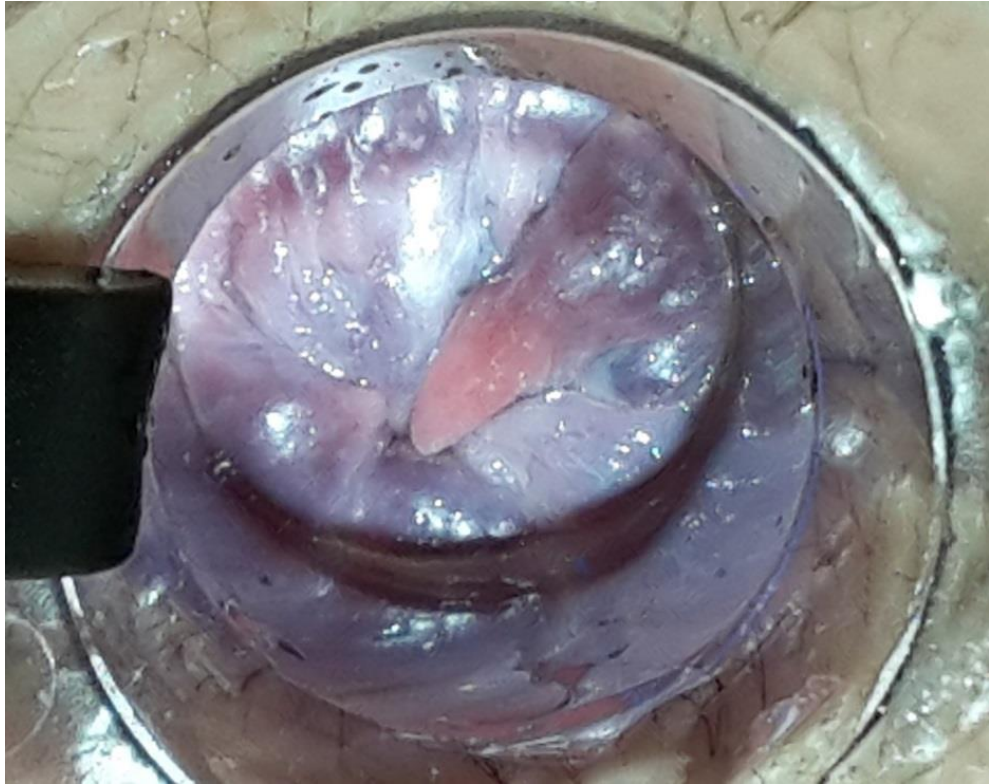


Figura 10 – displasie anali su gavoccioli emorroidari



Figura 11 – Tumore di Buschke-Löwenstein



Figura 12 – Papulosi bowenoide



Figura 13 – Carcinoma squamoso del margine anale



Figura 14 – Carcinoma squamoso della regione perianale



Figura 15 – Necrosi perineale post-attinica

Bibliografia

- (1) Grulich AE, Poynten IM, Machalek DA, Jin F, Templeton DJ, Hillman RJ. *The epidemiology of anal cancer*. Sex Health. 2012 Dec;9(6):504-8.
- (2) National Cancer Institute. SEER stat fact sheets: Anal cancer. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/anus.html>.
- (3) UK Cancer Research. Anal cancer incidence statistics. <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/analcancer/incidence>.
- (4) Ryan DP, Compton CC, Mayer RJ. *Carcinoma of the anal canal*. N Engl J Med. 2000;342:792-800.
- (5) Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *Cancer statistics, 2018*. CA Cancer J Clin. 2018 Jan;68(1):7-30.
- (6) Jemal A, Simard EP, Dorell C, et al. *Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2009, featuring the burden and trends in human papillomavirus (HPV)-associated cancers and HPV vaccination coverage levels*. J Natl Cancer Inst 2013;105:175–201.
- (7) Johnson LG, Madeleine MM, Newcomer LM, et al. *Anal cancer incidence and survival: the surveillance, epidemiology, and end results experience, 1973-2000*. Cancer 2004;101:281–288.
- (8) Nelson RA, Levine AM, Bernstein L, et al. *Changing patterns of anal canal carcinoma in the United States*. J Clin Oncol 2013;31:1569–1575.
- (9) Shiels MS, Kreimer AR, Coghill AE, et al. *Anal cancer incidence in the United States, 1977-2011: distinct patterns by histology and behavior*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2015;24:1548–1556.
- (10) GLOBOCAN 2012: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. <http://globocan.iarc.fr>.
- (11) Silverberg MJ, Lau B, Justice AC, et al. *Risk of anal cancer in HIV-infected and HIV-uninfected individuals in north america*. Clin Infect Dis. 2012;54(7):1026-1034.
- (12) de Martel C, Plummer M, Vignat J, Franceschi S. *Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type*. Int J Cancer. 2017;141:664–670.
- (13) Hoots BE, Palefsky JM, Pimenta JM, Smith JS. *Human papillomavirus type distribution in anal cancer and anal intraepithelial lesions*. Int J Cancer 2009; 124: 2375–83.
- (14) Alemany L, Saunier M, Alvarado-Cabrero I, et al. *Human papillomavirus DNA prevalence and type distribution in anal carcinomas worldwide*. International Journal of Cancer. 2015;136(1):98-107.
- (15) Giuliano AR, Nyitray AG, Kreimer AR, Pierce Campbell CM, Goodman MT, Sudenga SL, Monsonego J, Franceschi S. *EUROGIN 2014 roadmap: differences in human papillomavirus infection natural history, transmission and human papillomavirus-related cancer incidence by gender and anatomic site of infection*. Int J Cancer. 2015 Jun15;136(12):2752-60.
- (16) Moscicki AB, Ma Y, Farhat S, Jay J, Hanson E, Benningfield S, Jonte J, Godwin-Medina C, Wilson R, Shiboski S. *Natural history of anal human papillomavirus infection in heterosexual women and risks associated with persistence*. Clin Infect Dis. 2014 Mar;58(6):804-11.
- (17) Prigge ES, von Knebel Doeberitz M, Reuschenbach M. *Clinical relevance and implications of HPV-induced neoplasia in different anatomical locations*. Mutat Res Rev Mutat Res. 2017 Apr - Jun;772:51-66.

- (18) Maglennon GA, McIntosh PB, Doorbar J. *Immunosuppression facilitates the reactivation of latent papillomavirus infections*. J Virol. 2014 Jan;88(1):710-6.
- (19) Herfs M, Yamamoto Y, Laury A, Wang X, Nucci MR, McLaughlin-Drubin ME, Münger K, Feldman S, McKeon FD, Xian W, Crum CP. *A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Jun 26;109(26):10516-21.
- (20) Rositch AF, Koshiol J, Hudgens MG, Razzaghi H, Backes DM, Pimenta JM, Franco EL, Poole C, Smith JS. *Patterns of persistent genital human papillomavirus infection among women worldwide: a literature review and meta-analysis*. Int J Cancer. 2013 Sep 15;133(6):1271-85.
- (21) Robbins HA, Shiels MS, Pfeiffer RM, et al. *Epidemiologic contributions to recent cancer trends among HIV-infected people in the United States*. AIDS 28:881-890, 2014
- (22) Machalek DA, Poynten M, Jin F, et al. *Anal human papillomavirus infection and associated neoplastic lesions in men who have sex with men: A systematic review and meta-analysis*. Lancet Oncol. 2012;13:487-500.
- (23) de Pokomandy A, Rouleau D, Ghattas G, Trottier H, Vézina S, Côté P, Macleod J, Allaire G, Hadjeres R, Franco EL, Coutlée F. *HAART and progression to high-grade anal intraepithelial neoplasia in men who have sex with men and are infected with HIV*. Clin Infect Dis. 2011 May;52(9):1174-81.
- (24) Bertisch B, Franceschi S, Lise M, et al. *Risk factors for anal cancer in persons infected with HIV: A nested casecontrol study in the swiss HIV cohort study*. Am J Epidemiol. 2013;178(6):877-884.
- (25) van der Snoek EM, van der Ende ME, den Hollander JC, Schutten M, Neumann HA, van Doornum GJ. *Use of highly active antiretroviral therapy is associated with lower prevalence of anal intraepithelial neoplastic lesions and lower prevalence of human papillomavirus in HIV-infected men who have sex with men*. Sex Transm Dis. 2012;39(7):495-500.
- (26) Guiguet M, Boue' F, Cadranel J, et al. *Effect of immunodeficiency, HIV viral load, and antiretroviral therapy on the risk of individual malignancies (FHDHANRSCO4): A prospective cohort study*. Lancet Oncol 10:1152-1159, 2009
- (27) Shiels MS, Althoff KN, Pfeiffer RM, et al. *HIV Infection, immunosuppression, and age at diagnosis of non-AIDS-defining cancers*. Clin Infect Dis 64:468-475, 2017
- (28) Ogunbiyi OA, Scholefield JH, Raftery AT, Smith JH, Duffy S, Sharp F, Rogers K. *Prevalence of anal human papillomavirus infection and intraepithelial neoplasia in renal allograft recipients*. Br J Surg 1994; 81: 365-367
- (29) Sillman FH, Sentovich S, Shaffer D. *Ano-genital neoplasia in renal transplant patients*. Ann Transplant 1997; 2: 59-66
- (30) Albright JB, Bonatti H, Stauffer J, Dickson RC, Nguyen J, Harnois D, Jeanpierre C, Hinder R, Steers J, Chua H, Aranda-Michel J. *Colorectal and anal neoplasms following liver transplantation*. Colorectal Dis 2010; 12: 657-666
- (31) Euvrard S, Kanitakis J, Claudy A. *Skin cancers after organ transplantation*. N Engl J Med 2003; 348: 1681-1691
- (32) Holly EA, Ralston ML, Darragh TM, Greenblatt RM, Jay N, Palefsky JM. *Prevalence and risk factors for anal squamous intraepithelial lesions in women*. J Natl Cancer Inst 2001; 93:843-849
- (33) Madeleine MM, Finch JL, Lynch CF, Goodman MT, Engels EA. *HPV-related cancers after solid organ transplantation in the United States*. Am J Transplant 2013; 13: 3202-3209

- (34) SEER Cancer Statistics Factsheets: Colon and Rectum. National Cancer Institute. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html>
- (35) Roberts JR, Siekas LL, Kaz AM. *Anal intraepithelial neoplasia: A review of diagnosis and management*. World J Gastrointest Oncol. 2017 Feb 15;9(2):50-61.
- (36) Turell R. *Epidermoid squamous cell cancer of the perianus and anal canal*. Surg Clin North Am 1962;42:1235-41.
- (37) Oriel JD, Whimster IW. *Carcinoma in situ associated with virus-containing anal warts*. Br J Dermatol 1971;84:71-3.
- (38) Fenger C, Bichel P. *Flow cytometric DNA analysis of anal canal epithelium and ano-rectal tumours*. Acta Pathol Microbiol Scand A 1981;89:351-5.
- (39) Fenger C, Nielsen VT. *Intraepithelial neoplasia in the anal canal. The appearance and relation to genital neoplasia*. Acta Pathol Microbiol Scand A 1986;94:343-9.
- (40) IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Human Papillomaviruses. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 1995.
- (41) Northfelt DW, Swift PS, Palefsky JM. *Anal neoplasia. Pathogenesis, diagnosis, and management*. Hematol Oncol Clin North Am 1996;10:1177-87.
- (42) Solomon D, Davey D, Kurman R, et al. *The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology*. JAMA 2002;287:2114-9.
- (43) Darragh TM, Colgan TJ, Thomas Cox J, Heller DS, Henry MR, Luff RD, McCalmont T, Nayar R, Palefsky JM, Stoler MH et al. *The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization project for HPV-associated lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology*. Int J Gynecol Pathol. 2013;32:76-115.
- (44) Chin-Hong PV, Palefsky JM. *Natural history and clinical management of anal human papillomavirus disease in men and women infected with human immunodeficiency virus*. Clin Infect Dis 2002; 35: 1127-1134
- (45) Cleary RK, Schaldenbrand JD, Fowler JJ, Schuler JM, Lampman RM. *Perianal Bowen's disease and anal intraepithelial neoplasia: review of the literature*. Dis Colon Rectum 1999; 42: 945-951
- (46) Marfing TE, Abel ME, Gallagher DM. *Perianal Bowen's disease and associated malignancies. Results of a survey*. Dis Colon Rectum 1987; 30: 782-785
- (47) Watson AJ, Smith BB, Whitehead MR, Sykes PH, Frizelle FA. *Malignant progression of anal intra-epithelial neoplasia*. ANZ J Surg 2006; 76: 715-717
- (48) Crum-Cianflone NF, Hullsiek KH, Marconi VC, Ganesan A, Weintrob A, Barthel RV, Agan BK. *Anal cancers among HIVinfected persons: HAART is not slowing rising incidence*. AIDS 2010; 24: 535-543
- (49) Berry JM, Jay N, Cranston RD, Darragh TM, Holly EA, Welton ML, Palefsky JM. *Progression of anal high-grade squamous intraepithelial lesions to invasive anal cancer among HIV-infected men who have sex with men*. Int J Cancer. 2014;134:1147-1155.
- (50) Scholefield JH, Castle MT, Watson NF. *Malignant transformation of high-grade anal intraepithelial neoplasia*. Br J Surg. 2005;92:1133-1136.
- (51) Tong WW, Jin F, McHugh LC, Maher T, Sinclair B, Grulich AE, Hillman RJ, Carr A. *Progression to and spontaneous regression of high-grade anal squamous intraepithelial lesions in HIV-infected and uninfected men*. AIDS. 2013;27:2233-2243.

- (52) Burgos J, Curran A, Tallada N, Guelar A, Navarro J, Landolfi S, Villar J, Crespo M, Ribera E, Falcó V. *Risk of progression to high-grade anal intraepithelial neoplasia in HIV-infected MSM*. *AIDS* 2015; 29: 695-702
- (53) Devaraj B, Cosman BC. *Expectant management of anal squamous dysplasia in patients with HIV*. *Dis Colon Rectum* 2006; 49: 36-40.
- (54) Sobhani I, Walker F, Roudot-Thoraval F, Abramowitz L, Johanet H, Hénin D, Delchier JC, Soulé JC. *Anal carcinoma: incidence and effect of cumulative infections*. *AIDS* 2004; 18: 1561-1569
- (55) Madeleine MM. Cancer of the anus. In SEER Survival Monograph: Cancer survival among adults SEER Program, 1988–2001, Patient and Tumor Characteristics. Edited by Ries L. Bethesda: National Cancer Institute, SEER Program; 2007. vol. NIH Pub. 07-6215.
- (56) Wexler A, Berson AM, Goldstone SE, Waltzman R, Penzer J, Maisonet OG, McDermott B, Rescigno J. *Invasive anal squamous-cell carcinoma in the HIV-positive patient: outcome in the era of highly active antiretroviral therapy*. *Dis Colon Rectum* 2008, 51(1):73–81
- (57) Smyczek P, Singh A, Romanowski B. *Anal intraepithelial neoplasia: review and recommendations for screening and management*. *Int J STD AIDS* 2013, 24(11):843–851
- (58) Tomaszewski JM, Link E, Leong T, Heriot A, Vazquez M, Chander S, Chu J, Foo M, Lee MT, Lynch CA, Mackay J, Michael M, Tran P, Ngan SY. *Twenty-five-year experience with radical chemoradiation for anal cancer*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012, 83(2):552–558
- (59) Read T, Huson K, Millar J, Haydon A, Porter I, Grulich A, Hocking J, Chen M, Bradshaw C, Fairley C. *Size of anal squamous cell carcinomas at diagnosis: a retrospective case series*. *Int J STD AIDS* 2013, 24(11):879–882
- (60) Möller C, Saksela E. *Cancer of the anus and anal canal*. *Acta Chir Scand* 1970; 136: 340-348
- (61) Gimenez F, Costa-e-Silva IT, Dumas A, Araújo Jd, Medeiros SG, Ferreira L. *The value of high-resolution anoscopy in the diagnosis of anal cancer precursor lesions in HIV-positive patients*. *Arq Gastroenterol*. 2011 Apr-Jun;48(2):136-45.
- (62) Darragh TM, Winkler B. *Anal cancer and cervical cancer screening: key differences*. *Cancer Cytopathol* 2011;119:5–19.
- (63) Swedish KA, Lee EQ, Goldstone SE. *The changing picture of high-grade anal intraepithelial neoplasia in men who have sex with men: the effects of 10 years of experience performing high resolution anoscopy*. *Dis Colon Rectum* 2011; 54: 1003-1007
- (64) Patel J, Salit IE, Berry MJ, de Pokomandy A, Nathan M, Fishman F, Palefsky J, Tinmouth J. *Environmental scan of anal cancer screening practices: worldwide survey results*. *Cancer Med* 2014;3:1052-1061
- (65) New York State Department of Health AIDS Institute. HIV Clinical Resource: anal dysplasia and cancer. New York, NY: New York State Department of Health, 2007
- (66) Steele SR, Varma MG, Melton GB, Ross HM, Rafferty JF, Buie WD. *Practice parameters for anal squamous neoplasms*. *Dis Colon Rectum* 2012; 55: 735-749
- (67) Chiao EY, Giordano TP, Palefsky JM, Tyring S, El Serag H. *Screening HIV-infected individuals for anal cancer precursor lesions: a systematic review*. *Clin Infect Dis* 2006
- (68) Cranston RD, Hart SD, Gornbein JA, Hirschowitz SL, Cortina G, Moe AA. *The prevalence, and predictive value, of abnormal anal cytology to diagnose anal dysplasia in a population of HIV-positive men who have sex with men*. *Int J STD AIDS* 2007; 18: 77-80

- (69) Patel P, Hanson DL, Sullivan PS, Novak RM, Moorman AC, Tong TC, Holmberg SD, Brooks JT. *Incidence of types of cancer among HIV-infected persons compared with the general population in the United States, 1992-2003*. Ann Intern Med 2008; 148: 728-736
- (70) Betancourt EM, Wahbah MM, Been LC, Chiao EY, Citron DR, Laucirica R. *Anal cytology as a predictor of anal intraepithelial neoplasia in HIV-positive men and women*. Diagn Cytopathol 2013; 41: 697-702
- (71) Chin-Hong PV, Berry JM, Cheng SC, Catania JA, Da Costa M, Darragh TM, Fishman F, Jay N, Pollack LM, Palefsky JM. *Comparison of patient- and clinician-collected anal cytology samples to screen for human papillomavirus-associated anal intraepithelial neoplasia in men who have sex with men*. Ann Intern Med 2008; 149: 300-306
- (72) Cheng SH, Wang CC, Chang SL, Chu FY, Hsueh YM. *Oncogenic human papillomavirus is not helpful for cytology screening of the precursor lesions of anal cancers in Taiwanese men who are infected with human immunodeficiency virus*. Int J Clin Oncol 2015; 20: 943-951
- (73) Palefsky JM. *Practising high-resolution anoscopy*. Sex Health 2012; 9: 580-586.
- (74) Camus M, Lesage AC, Fléjou JF, Hoyer N, Atienza P, Etienney I. *Which lesions should be biopsied during high-resolution anoscopy? Prospective descriptive study of simple morphological criteria*. J Low Genit Tract Dis 2015; 19: 156-160.
- (75) Scholefield JH, Ogunbiyi OA, Smith JH, Rogers K, Sharp F. *Anal colposcopy and the diagnosis of anal intraepithelial neoplasia in high-risk gynecologic patients*. Int J Gynecol Cancer 1994; 4:119-126.
- (76) Goldstone SE, Johnstone AA, Moshier EL. *Long-term outcome of ablation of anal high-grade squamous intraepithelial lesions: recurrence and incidence of cancer*. Dis Colon Rectum 2014; 57: 316-323.
- (77) Long KC, Menon R, Bastawrous A, Billingham R. *Screening, Surveillance, and Treatment of Anal Intraepithelial Neoplasia*. Clin Colon Rectal Surg. 2016;29:57–64.
- (78) Marchesa P, Fazio VW, Oliart S, Goldblum JR, Lavery IC. *Perianal Bowen's disease: a clinicopathologic study of 47 patients*. Dis Colon Rectum. 1997;40:1286–1293.
- (79) Pineda CE, Welton ML. *Management of anal squamous intra-epithelial lesions*. Clin Colon Rectal Surg 2009; 22: 94-101.
- (80) Johnstone AA, Silvera R, Goldstone SE. *Targeted ablation of perianal high-grade dysplasia in men who have sex with men: an alternative to mapping and wide local excision*. Dis Colon Rectum 2015; 58: 45-52.
- (81) Scholefield JH, Sonnex C, Talbot IC, Palmer JG, Whatrup C, Mindel A, Northover JM. *Anal and cervical intraepithelial neoplasia: possible parallel*. Lancet 1989; 2: 765-769
- (82) Hillman RJ, Cuming T, Darragh T, Nathan M, Berry-Lawthorn M, Goldstone S, Law C, Palefsky J, Barroso LF, Stier EA, Bouchard C, Almada J, Jay N. *2016 IANS International Guidelines for Practice Standards in the Detection of Anal Cancer Precursors*. J Low Genit Tract Dis. 2016 Oct;20(4):283-91.
- (83) Jay N, Berry JM, Miaskowski C, et al. *Colposcopic characteristics and Lugol's staining differentiate anal high-grade and low-grade squamous intraepithelial lesions during high resolution anoscopy*. Papillomavirus Res 2015;1:101–8
- (84) Clifford GM, Siproudhis L, Piroth L, Poizot-Martin I, Radenne S, Reynes J, Lesage A, Heard I, Henno S, Fléjou JF, Marchand L, Combes JD, Etienney I. *ANRS EP57 APACHES Study group. Determinants of high-grade anal intraepithelial lesions in HIV-positive MSM*. AIDS. 2018 Oct 23;32(16):2363-2371.
- (85) Silvera R, Gaisa MM, Goldstone SE. *Random biopsy during high-resolution anoscopy increases diagnosis of anal high-grade squamous intraepithelial lesions*. J Acquir Immune Defic Syndr. 2014 Jan 1;65(1):65-71.

- (86) Jin F, Roberts JM, Grulich AE, Poynten IM, Machalek DA, Cornall A, Phillips S, Ekman D, McDonald RL, Hillman RJ, Templeton DJ, Farnsworth A, Garland SM, Fairley CK, Tabrizi SN. *SPANC Research Team. The performance of human papillomavirus biomarkers in predicting anal high-grade squamous intraepithelial lesions in gay and bisexual men.* AIDS. 2017 Jun 1;31(9):1303-1311.
- (87) Darwich L, Videla S, Cañadas MP, Piñol M, García-Cuyàs F, Vela S, Molina-López RA, Coll J, Sirera G, Clotet B; Can Ruti HIV-HPV Team. *Distribution of human papillomavirus genotypes in anal cytological and histological specimens from HIV-infected men who have sex with men and men who have sex with women.* Dis Colon Rectum. 2013 Sep;56(9):1043-52.
- (88) Gaisa M, Sigel K, Hand J, Goldstone S. *High rates of anal dysplasia in HIV-infected men who have sex with men, women, and heterosexual men.* AIDS. 2014 Jan 14;28(2):215-22.
- (89) Frank M, Lahiri CD, Nguyen ML, Mehta CC, Mosunjac M, Flowers L. *Factors Associated with High-Grade Anal Intraepithelial Lesion in HIV-Positive Men in a Southern U.S. City.* AIDS Res Hum Retroviruses. 2018 Jul;34(7):598-602.
- (90) Frisch M, Olsen JH, Bautz A, Melbey M. *Benign anal lesions and the risk of anal cancer.* N Engl J Med. 1994;331:300-2.
- (91) Tseng HF, Morgenstern H, Mack TM, Peters RK. *Risk factors for anal cancer: results of a population-based case-control study.* Cancer Causes Control. 2003;14:837-46.