



Uloga citologije u otkrivanju preinvazivnih i invazivnih promjena stidnice ovisno o načinu uzimanja uzorka

The role of cytology in the detection of preinvasive and invasive vulvar changes depending of the sampling method

Ana Barišić¹, Joško Zekan², Vesna Mahovlić¹, Lada Škopljanac-Maćina¹, Sanda Rajhvajn¹, Danijela Jurić¹, Helena Lovrić², Joško Lešin², Damir Babić¹

¹Klinički zavod za patologiju i citologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Klinički bolnički centar Zagreb

²Klinika za ženske bolesti i porode, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Klinički bolnički centar Zagreb

Deskriptori

TUMORI STIDNICE – patologija;
STIDNICA – citologija, patologija; INTRAEPITELNE
PROMJENE PLOČASTOG EPITELA – patologija;
KARCINOM PLOČASTOG EPITELA – patologija;
PREKANCEROZNE PROMJENE – patologija;
OBRIKAK RODNICE – metode; CITOLOŠKE TEHNIKE

Descriptors

VULVAR NEOPLASMS – pathology;
VULVA – cytology, pathology; SQUAMOUS
INTRAEPITHELIAL LESIONS – pathology;
CARCINOMA, SQUAMOUS CELL – pathology;
PRECANCEROUS CONDITIONS – pathology;
VAGINAL SMEARS – instrumentation, methods;
CYTOLOGICAL TECHNIQUES

SAŽETAK. *Cilj:* Eksfolijativna citologija stidnice kao neinvazivna metoda koristi se u dijagnostici i praćenju promjena na stidnici, osobito onih kod kojih nije indicirana biopsija. Dosad se tradicionalno obrisak uzimao špatulom te su citološki uzorci često bili slabo celularni. Kako bi se poboljšala celularnost uveden je postupak uzimanja endocervikalnom četkicom. *Materijali i metode:* U retrospektivnoj studiji obuhvaćeno je 1866 uzoraka sa stidnice uzetih u razdoblju od 1. srpnja 2011. do 31. prosinca 2013. Analizirana je primjerenost uzoraka kao i omjer nalaza atipičnih pločastih stanica (ASC) prema nalazu pločaste intraepitelne lezije ili karcinoma (SIL+), ovisno o ambulanti u kojoj je uzorak uzet, te citohistološka korelacija. *Rezultati:* U onkološkoj ambulanti specijaliziranoj za bolesti stidnice u kojoj je većina uzoraka uzimana četkicom bilo je najmanje neprimjerenih uzoraka zbog oskudnosti (3,4%), kao i zadovoljavajućih, ali oskudnih uzoraka (5,6%), a najviše ovakvih uzoraka bilo je u ginekološkim ambulantom primarne zdravstvene zaštite (13,7% odnosno 25,3%) u kojima su obrisak uglavnom uzimani na tradicionalan način – špatulom. Usporedili smo omjer ASC:SIL+ nalaza kod potpuno zadovoljavajućih nalaza ovisno o ambulanti u kojoj su uzeti uzorci: u ambulanti specijaliziranoj za bolesti stidnice bio je 2,6:1, u ostalim onkološkim ambulantom 1,9:1, u ostalim ambulantom klinike 3,5:1, dok je u ambulantom primarne ginekologije bio 2,3:1. Kod zadovoljavajućih, ali oskudnih nalaza ovaj omjer ASC:SIL+ varirao je od 5:1 do 11:0 ovisno o ambulanti u kojoj su uzorci uzeti. Citohistološka korelacija 159 slučajeva pokazala je visoku osjetljivost u otkrivanju preinvazivnih (94,1%) i invazivnih (100,0%) promjena, ali nisku specifičnost (35,4%). *Zaključak:* Uzorci sa stidnice uzeti endocervikalnom četkicom značajno su celularniji od uzoraka uzetih špatulom i time bolji za citološku analizu te je manji omjer ASC:SIL+ nalaza. Citološka analiza uzoraka sa stidnice ne može zamijeniti biopsiju, ali kod klinički nejasnih lezija može pomoći u postavljanju indikacije za daljnji postupak, kao i u praćenju bolesnica sa potvrđenom bolesti.

SUMMARY. *Aim:* Exfoliative cytology of vulvar samples is used in diagnostics and follow up of vulvar changes, especially those in which biopsy is not indicated. Traditionally, samples were taken by spatula and the cellularity of the samples was low. To improve cellularity, taking samples by endocervical brush was introduced. *Material and methods:* In the retrospective study 1866 vulvar samples taken in the period from July 1, 2011 to December 31, 2013 were analyzed. Cellularity of the samples, as well as the atypical squamous cells (ASC) to squamous intraepithelial lesion or carcinoma (SIL+) ratio, and the cytohistologic correlation were analyzed. *Results:* In the vulvar disease specialized unit most samples were taken by endocervical brush, and the less unsatisfactory because of scantness samples (3.4%), as well as the satisfactory but scant samples (5.6%) were detected; the highest proportion of scant samples was detected in the outpatient gynaecology services (13.7% and 25.3%) where samples were taken traditionally by spatula. ASC:SIL+ ratio within fully satisfactory samples was the lowest in the other oncologic units (1.9:1), in the vulvar disease unit it was 2.6:1, in other clinic units it was 3.5:1, while in the outpatient gynaecology services it was 2.3:1. In the group of satisfactory but scant samples the ratio ASC:SIL+ was ranging from 5:1 to 11:0 depending of the infirmary in which the samples were taken. Cytohistologic correlation in 159 cases was high in the detection of the preinvasive (94.1%) and invasive (100.0%) lesions, but with low specificity (35.4%). *Conclusion:* Vulvar samples taken by endocervical brush are significantly more cellular than the spatula taken samples, and cytologic interpretation of these samples is more adequate with lower ASC:SIL ratio. Cytologic vulvar samples cannot replace biopsy, but can be helpful in the patients with indistinctive lesions, or in controlling patients with confirmed disease.

Karcinom stidnice je rijetka bolest i čini svega 5% tumora ženskoga spolnog sustava, a u 90% slučajeva radi se o pločastom karcinomu^{1,2,3}. U Hrvatskoj je u 2005. godini kod 68 žena otkriven karcinom stidnice⁴. Najmlađa bolesnica bila je u dobnoj skupini od 30 do 34 godine, 4,9% (3/61) ih je bilo mlađe od 50 godina,

Adresa za dopisivanje:

Prim. Ana Barišić, dr. med., <https://orcid.org/0000-0003-1419-6967>
Odjel za ginekološku citologiju, Klinički zavod za patologiju i citologiju,
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb, Petrova 13, 10000 Zagreb;
e-pošta: ana.ana.barisic@gmail.com

Primljeno 28. rujna 2020., prihvaćeno 13. listopada 2020.

dok je 74,1% (43/58) bilo starije od 70 godina⁴. Podatci za 2013. godinu zabrinjavaju, ne samo zbog većeg broja slučajeva (N=89), nego i zbog većeg udjela žena mlađih od 50 godina (5,6%; 5/89), dok je starijih od 70 godina bilo značajno manje (60,7%; 54/89)⁵. Prema najnovijim podacima broj novooboljelih u 2016. godini je sličan (N=91), s povećanjem udjela žena mlađih od 50 godina (7,7%; 7/91)⁶. Unatoč dostupnoj lokalizaciji ova bolest ima lošu prognozu, jer se bolesnice često jave liječniku tek u uznapredovaloj fazi bolesti¹. Ako je bolest rano dijagnosticirana, bolesnice se uspješno liječe, a preživljenje je 90% ako nisu zahvaćeni limfni čvorovi¹. Važno je prepoznati ovu bolest u što ranijem stadiju, jer ne postoji standardizirani test probira poput vaginalno-cervikalno-endocervikalnog (VCE) obriska za otkrivanje patoloških promjena na vratu maternice^{1,2,3}. Otkrivanje prisutnosti humanog papilloma virusa (HPV) visokog rizika (hrHPV) na ovoj lokalizaciji također je od manje vrijednosti nego na vratu maternice, jer karcinom stidnice ne mora biti povezan s ovom infekcijom^{1,2,3}. Uz pažljiv klinički pregled, citološki uzorak može pomoći u otkrivanju ovih promjena, ali ne može zamijeniti biopsiju^{2,3}. Citološki kriteriji slični su kao i za istovrsne promjene na vratu maternice, premda je dobro diferencirane maligne stanice karcinoma pločastih stanica ponekad teško razlikovati od benignih pločastih stanica^{2,3,7}. Orožnjeli sloj može prekrivati maligne stanice pa ih ponekad ne nalazimo u citološkom obrisku sa stidnice^{2,3,7}.

Intraepitelne promjene pločastog epitela stidnice tijekom zadnjih petnaestak godina dvaput su patohistološki značajno reklasificirane^{8,9,10,11}. Tradicionalno su bile definirane kao poremećaj sazrijevanja i stratifikacije pločastog epitela i dijelile su se, sukladno promjenama na vratu maternice, u tri stupnja vulvarne intraepitelne neoplazije (VIN): VIN1, VIN2 i VIN3⁸. Prema terminologiji ISSVD (engl. *International Society for the Study of Vulvovaginal Disease*) iz 2004. godine, kategorija VIN1 (ravni kondilom) je ukinuta zbog loše reproducibilnosti patohistološke dijagnoze (podudarnost 5%), a najčešće predstavlja prolaznu infekciju HPV-om, dok se VIN2 i VIN3 objedinjuju u jedinstvenu kategoriju VIN koja se dijeli na uobičajeni (boveoidni, engl. *usual* – uVIN) i diferencirani (simplex, engl. *differentiated* – dVIN) tip^{9,10,11}.

Uobičajeni VIN (uVIN) često je povezan s HPV infekcijom, javlja se u mlađih žena, a procjenjuje se da je progresija u karcinom manja od 10%. Multicentričnost je povezana s dobi te je u skupini žena od 20 do 34 godine prisutna u 59% slučajeva, odnosno 10% kod žena starijih od 50 godina^{11,12}. U lokaliziranju ovih promjena može se koristiti Collinsonov test vitalnog bojenja epitela: stidnica se premaže 2-postotnom otopinom toluidinskog modrila, nakon 2–3 minute ispere se višak boje s 3-postotnom octenom kiselinom te se

obriše suhim tupferom. Test se temelji na osobini epidermisa da u slučaju parakeratoze i/ili diskeratoze zadrži naneseu plavu boju¹³. Citološki kriteriji uVIN-a oslanjaju se na kriterije obriska vrata maternice, iako su manje pouzdani^{2,3,7,14}.

Diferencirani VIN (dVIN) ili VIN simplex je rijetka promjena (manje od 2–5% svih VIN-ova), obično se javlja kao solitarna promjena kod starijih žena, nije povezan s HPV infekcijom, češće progredira u karcinom nego uVIN, a u 80% slučajeva nalazi se u blizini invazivnog karcinoma^{9,12,15}. Collinsonov test se ne preporučuje za lociranje ovih promjena^{9,12,15}. Citološki kriteriji za ove promjene nisu jasno definirani^{2,3,7}, dok neki autori navode prisutnost pojedinačnih velikih atipičnih stanica s ekscentričnom jezgrom i istaknutim nukleolom, bez koilocitoze¹⁴.

Prema najnovijem nazivlju za pločaste promjene donjega anogenitalnog trakta (engl. *Lower Anogenital Squamous Terminology* – LAST), promjene na stidnici vezane uz HPV infekciju dijele se na intraepitelnu leziju niskog stupnja (engl. *low-grade squamous intraepithelial lesion* – LSIL) odnosno tradicionalni VIN1, intraepitelnu leziju visokog stupnja (engl. *high-grade squamous intraepithelial lesion* – HSIL) odnosno tradicionalni VIN2/VIN3 (uVIN), te dVIN (VIN simplex) koji nije povezan s HPV infekcijom^{16,17}.

Neneoplastične bolesti stidnice uključuju *lichen sclerosus* i druge dermatoze, a citološki kriteriji za prepoznavanje ovih promjena nisu dobro definirani. U obriscima sa stidnice mogu se naći anuklearne skvame i parakeratotične stanice, dok stanice pločastog epitela mogu biti reaktivno promijenjene s blagim povećanjem jezgre, ali obično bez značajnih atipija².

Za razliku od citoloških uzoraka vrata maternice, gdje se citologija koristi kao primarni probir za otkrivanje preinvazivnih i invazivnih promjena, citološka analiza uzorka sa stidnice je ciljana pretraga^{2,3,18,19}. Najčešće indikacije su subjektivni simptomi (svrbež, bol), klinički vidljive promjene, postojanje cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN), dokazana infekcija HPV-om koja je često multicentrična i praćenje bolesnica s histološki potvrđenim promjenama na stidnici^{2,3,18,19}. Eksfolijativna citologija stidnice može dati korisne podatke o vrsti lezije bez veće neugodnosti za bolesnicu, ali ne može zamijeniti biopsiju koja je zlatni standard dijagnostike^{1,2,3,7,18,19}.

Dobro uzet citološki uzorak sa stidnice omogućuje dobru primjerenost uzorka, što je preduvjet za pouzdanost citološkog nalaza^{19,20,21}. Opisani su različiti načini uzimanja uzoraka za citološku analizu^{2,3,18,21}. Drvenom ili metalnom špatulom namočenom u fiziološku otopinu ili direktnim dodirom stakalca na promjenu (osobito kod ulceriranih promjena) dobiveni materijali često su slabo celularni i s mnogo skvama (hiperkeratoza) jer višeslojni pločasti epitel stidnice orožnjava pa površinski slojevi mogu prikriti dublje

promjene^{2,18} te ih neki autori ne preporučuju²². Brisanjem promjene krpicom ili gazom namočenom u fiziološku otopinu skida se površinski keratinizirani sloj i smanjuje efekt sušenja uzorka na zraku te se dobivaju kvalitetniji uzorci^{2,3,7}. Skarifikacijom (koristeći skalpel, rub stakalca ili neki drugi instrument) ili još bolje sekundarnom skarifikacijom (stidnica se pret hodno obriše tkaninom natopljenom u fiziološkoj otopini, čime se ukloni gornji orožnjeli sloj), mogu se dobiti celularniji razmazi^{7,20,21,23,24}. Neki autori preporučuju uzimanje uzorka četkicom (*cytobrusher*) rotiranjem četkice preko stidnice, nakon čega se četkica stavi u kivetu s medijem, a uzorak se pripremi kao tekući uzorak²⁵. Postoje i posebne četkice za uzimanje uzoraka sa stidnice, a preporuka je da se uzorak obradi kao tekućinski uzorak¹⁴. Bez obzira na način uzimanja, obrisak treba odmah fiksirati u 95-postotnom etanolu da se spriječi sušenje na zraku^{21,23,26}.

Citološki nalazi obriska sa stidnice izdaju se prema terminologiji jedinstvenog obrasca baziranog na „Bethesda” sistemu („Zagreb 2002”, „Zagreb 2016”), koja se rabi uobičajeno za VCE obriske^{19,21,27,28,29,30}. Kod uzoraka sa stidnice također se ocjenjuje primjerenost, bilježi prisutnost mikroorganizama, druge neneoplastične promjene, kao i opća podjela na negativne, na intraepitelnu ili invazivnu leziju te na abnormalne nalaze^{27,28,29,30}. Celularnost uzoraka sa stidnice u literaturi uglavnom nije definirana te citolog po vlastitoj procjeni ocjenjuje celularnost uzorka^{18,19,21}, dok van den Einden i sur.¹⁴ koriste svoju modifikaciju baziranu na Bethesda sistemu za primjerenost tekućinskih uzoraka (engl. *liquid based cytology* – LBC), premda treba naglasiti da je celularnost uzoraka uzetih špatulom daleko manja.

Abnormalne pločaste stanice dijele se, kao i na vratu maternice, na atipične skvamozne stanice (ASC), skvamoznu intraepitelnu leziju (SIL) te karcinom pločastih stanica^{27,28,29,30}. Atipične skvamozne stanice – neodređenog značenja (ASC-US) predstavljaju citološku sumnju na LSIL, a preporuka je Collinsonov test^{13,18,19,26}. Pozitivan test nije specifičan, no negativan može s velikom sigurnošću isključiti prekancerozu uobičajenog tipa (uVIN) ili maligni proces, ali ne isključuje postojanje dVIN-a^{12,18,19,26}. Nalaz atipične skvamozne stanice – ne može se isključiti HSIL (ASC-H) predstavlja citološku sumnju na VIN (HSIL ili dVIN) i preporuka je vulvoskopija i/ili Collinsonov test^{13,18,19,26}. Nalaz atipične skvamozne stanice – ne može se isključiti invazija (ASC-inv) zahtijeva hitnu patohistološku potvrdu^{18,19}. SIL se dijele sukladno promjenama na vratu maternice te su uz Bethesda klasifikaciju uključene i starije klasifikacije za koje postoje citološki kriteriji za razlikovanje nalaza, a ove promjene zahtijevaju vulvoskopiju i/ili Collinsonov test^{13,18,19,26}. Citološki nalaz karcinoma pločastih stanica zahtijeva patohistološku potvrdu^{18,19,26}.

Materijali i metode

U svrhu dobivanja celularnijeg materijala uzoraka sa stidnice s ginekolozima – onkolozima u ambulanti specijaliziranoj za bolesti stidnice Klinike, a u kojoj se uzima najveći broj uzoraka sa stidnice, dogovorena je uporaba endocervikalne četkice za uzimanje uzoraka sa stidnice: nakon brisanja promjene tkaninom ili gazom natopljenom fiziološkom otopinom uzorak se uzme četkicom također natopljenom fiziološkom otopinom te razmaže po stakalcu i odmah fiksira u 95-postotnom etanolu. U ostalim onkološkim ambulantomani dio uzoraka uziman je na ovaj način, dok je u ostalim ambulantomani Klinike kao i u ambulantomani primarne ginekologije uzorak sa stidnice i dalje uziman špatulom ili direktnim dodirnom stakalca na promjenu.

Analizirani su citološki nalazi obriska sa stidnice u našem laboratoriju tijekom razdoblja od 1. srpnja 2011. do 31. prosinca 2013. Citološki nalazi izdavaju su na uputnici za PAPA nalaz²⁷. Korišteni su podatci iz Bolničkoga informatičkog sustava (BIS).

Citološki nalazi podijeljeni su u 4 skupine s obzirom na ambulante u kojima su uzeti: onkološka ambulanta specijalizirana za bolesti stidnice, ostale onkološke ambulante, ostale ambulante Klinike te ginekološke ambulante primarne zdravstvene zaštite.

S obzirom na primjerenost uzorka citološki nalazi su razvrstani u pet skupina: analizirani, ali zbog oskudnosti ne zadovoljavaju (preporučeno ponavljanje pretrage); nezadovoljavajući zbog drugih razloga (preporučeno ponavljanje pretrage); zadovoljavajući uz napomenu da su oskudni; zadovoljavajući uz neku drugu napomenu te potpuno zadovoljavajući (bez primjedbe o primjerenosti uzorka)^{27,29}. Uzorci u kojima su nađene abnormalne stanice uvijek se smatraju zadovoljavajućima (bez obzira na primjerenost uzorka)^{27,29}, a citološko mišljenje i preporuka daju se samo za zadovoljavajuće uzorke.

Ovisno o ambulanti u kojoj je uzorak uzet, zadovoljavajući uzorci za interpretaciju razmatrani su s obzirom na potpuno zadovoljavajuće i oskudne. Osim toga, uspoređeni su omjeri nalaza ASC prema SIL-u i invazivnom karcinomu (ASC:SIL+) ovisno o ambulanti uzimanja.

U istom vremenskom razdoblju uspoređeni su patohistološki nalazi (uređan višeslojni pločasti epitel, neneoplastične bolesti stidnice: *lichen simplex* i *lichen sclerosus*, boveoidni VIN, VIN simplex i invazivni karcinom pločastih stanica) s poznatim citološkim nalazima u vremenskom razdoblju do 6 mjeseci prije uzimanja biopsije.

Za analizu podataka upotrijebljen je računalni program za tabličnu pohranu i obradu podataka *Microsoft Excel 2010*.

Rezultati

Primjerenost uzoraka

Najmanje neprimjerenih uzoraka zbog oskudnosti (3,4%), kao i zadovoljavajućih, ali oskudnih (5,6%), bilo je u onkološkoj ambulanti Klinike specijaliziranoj za bolesti stidnice, a najviše u ginekološkim ambulantomama primarne zdravstvene zaštite (13,9% odnosno 25,3%). Potpuno zadovoljavajućih uzoraka bilo je najviše u onkološkoj ambulanti Klinike specijaliziranoj za bolesti stidnice (88,1%), a najmanje u ginekološkim ambulantomama primarne zdravstvene zaštite (55,3%). (tablica 1.) Dvosmjernim Fisherovim egzaktnim testom ispitana je povezanost između uzoraka nezadovoljavajućih zbog oskudnosti i zadovoljavajućih uzoraka s obzirom na ambulantu u kojoj je uzorak uzet. Usporedbom ambulante za bolesti stidnice s ostalim ambulantomama dobiveni su sljedeći rezultati: razlika nije bila signifikantna u usporedbi s ostalim onkološkim ambulantomama ($p=0,1891$), dok je bila signifikantna u usporedbi s ostalim ambulantomama Klinike ($p=0,0056$) i ginekološkim ambulantomama primarne zdravstvene zaštite ($p<0,00001$). Usporedbom zadovoljavajućih, ali oskudnih uzoraka s potpuno zadovoljavajućim uzorcima bez primjedbi nađena je statistički značajna razlika između ambulante za bolesti stidnice i svih ostalih ambulanti (za sve slučajeve $p<0,00001$), kao i između ostalih onkoloških ambulanti i ginekoloških ambulanti primarne zdravstvene zaštite ($p<0,00001$), dok ostale usporedbe nisu bile statistički značajne.

Abnormalni citološki nalazi

U ambulanti Klinike specijaliziranoj za bolesti stidnice u skupini potpuno zadovoljavajućih nalaza abnormalnih uzoraka je bilo 26,5% (167/630). Omjer ASC:SIL+ bio je 2,6:1. Među zadovoljavajućim, ali oskudnim uzorcima bilo je 25% (10/40) abnormalnih nalaza i svi su bili u skupini ASC. (tablica 2.)

U ostalim onkološkim ambulantomama u skupini potpuno zadovoljavajućih nalaza abnormalnih nalaza je bilo 40,6% (158/389), s omjerom ASC:SIL+ = 1,9:1. U skupini oskudnijih nalaza bilo je 37,9% (30/79) abnormalnih nalaza, s omjerom ASC:SIL+ = 5:1. (tablica 2.)

U ostalim ambulantomama Klinike u skupini potpuno zadovoljavajućih nalaza abnormalnih nalaza je bilo 36,9% (41/111), s omjerom ASC:SIL+ = 3,5:1. U skupini oskudnijih nalaza bilo je 29,7% (11/37) abnormalnih nalaza, i svi su bili ASC. (tablica 2.)

U ginekološkim ambulantomama primarne zdravstvene zaštite u skupini potpuno zadovoljavajućih uzoraka abnormalnih nalaza je bilo 47,8% (120/251), s omjerom ASC:SIL+ = 2,3:1. U skupini oskudnijih nalaza bilo je 35,7% (41/115) abnormalnih nalaza, s omjerom ASC:SIL+ = 19,5:1. (tablica 2.)

Ukupno je u svim ambulantomama od 1652 zadovoljavajućih i zadovoljavajućih, ali oskudnih nalaza, 578

(34,9%) ocijenjeno abnormalnima, s omjerom ASC:SIL+ = 2,8:1.

Dvosmjernim Fisherovim egzaktnim testom ispitana je povezanost između uzoraka nalaza atipičnih skvamoznih stanica (ASC) i skvamozne intraepitelne lezije (SIL) s obzirom na adekvatnost uzorka uspoređujući zadovoljavajuće, ali oskudne uzorke sa zadovoljavajućim uzorcima bez primjedbi u istoj ambulanti. Nađena je statistički značajna razlika ($p=0,0006$) u ginekološkim ambulantomama primarne zdravstvene zaštite, dok u ambulanti specijaliziranoj za bolesti stidnice ($p=0,0654$), u ostalim onkološkim ambulantomama ($p=0,0844$), kao i u ostalim ambulantomama Klinike ($p=0,1764$) nije bilo statistički značajne razlike.

Citohistološka korelacija

U analiziranom periodu bilo je 159 patohistoloških nalaza sa stidnice koji su prethodno u periodu do 6 mjeseci imali i citološki nalaz u našem laboratoriju.

Raspon dobi bolesnica s patohistološkim nalazom u kojem je opisan uredan višeslojni pločasti epitel bio je od 27 do 86 godina, s prosjekom 60,97 i medijanom 62 godine. Citološki nalazi bili su negativni u 35,4% (28/79) slučajeva. Od abnormalnih nalaza najviše je bilo ASC nalaza (ASC-H 32,9%; 26/79 i ASC-US 16,5%; 13/79). (tablica 3.)

Raspon dobi bolesnica s patohistološkom dijagnozom Lichena bio je od 35 do 81 godine, s prosjekom 64,37 i medijanom 64 godine. Citološki nalazi bili su negativni u 29,7% (11/37) slučajeva. Od abnormalnih nalaza najviše je bilo ASC nalaza (ASC-H 37,8%; 14/37 i ASC-US 21,6%; 8/37). (tablica 3.)

Raspon dobi bolesnica s patohistološkom dijagnozom VIN boveoidnog tipa (uVIN) bio je od 35 do 80 godina, s prosjekom 60,53 i medijanom 57 godina. Citološki nalaz bio je lažno negativan u jednom slučaju (7,7%; 1/13), a u 92,3% (12/13) abnormalan, od čega najviše ASC-H (46,2%; 6/13) i HSIL (23,1%; 3/13) nalaza. (tablica 3.)

Raspon dobi bolesnica s patohistološkom dijagnozom VIN simplex tipa (dVIN) bio je od 61 do 85 godina, s prosjekom 76,6 i medijanom 77 godina. Svi citološki nalazi bili su abnormalni, najčešće u smislu atipičnih pločastih stanica (ASC-US 25%; 1/4 i ASC-H 50%; 2/4), a u jednom slučaju citološki nalaz je bio pločasti karcinom (25%; 1/4). (tablica 3.)

Raspon dobi bolesnica s patohistološkom dijagnozom invazivnog pločastog karcinoma bio je od 34 do 86 godina, s prosjekom 65,42 i medijanom 68 godina. Samo 42,3% (11/26) bolesnica bilo je u dobnoj skupini 70 godina i starije, dok je čak 11,5% bolesnica (3/26) bilo mlađe od 50 godina. Svi citološki nalazi bili su u skupini abnormalnih, od čega najviše (53,8%; 14/26) nalaza karcinoma pločastih stanica i atipičnih pločastih stanica sa sumnjom na invazivni proces (15,4%; 4/26). (tablica 3.)

TABLICA 1. PRIMJERENOST UZORAKA S OBZIROM NA AMBULANTE U KOJIMA SU UZETI

TABLE 1. SPECIMEN ADEQUACY ACCORDING TO GYNAECOLOGY SERVICE

		Ambulanta za bolesti stidnice / Vulvar disease unit		Ostale onkološke ambulante / Other oncological units		Ostale ambulante Klinike / Other Clinical units		Ginekološke ambulante primarne zdravstvene zaštite / Outpatient gynaecology services		Ukupno / Total	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Ne zadovoljava / Unsatisfactory	Oskudan / scant	24	3,4	26	4,9	15	8,7	62	13,7	127	6,8
	Drugo / other	6	0,8	1	0,2	2	1,1	2	0,4	11	0,6
Ne zadovoljava ukupno / Unsatisfactory total		30	4,2	27	5,2	17	9,9	64	14,1	138	7,4
Zadovoljava / satisfactory	Oskudan / scant	40	5,6	79	15,1	37	21,5	115	25,3	271	14,5
	Ostalo / other	15	2,1	30	5,7	7	4,1	24	5,3	76	4,1
	Bez primjedbi / no remarks	630	88,1	389	74,1	111	64,5	251	55,3	1381	74,0
Zadovoljava ukupno / satisfactory total		685	95,8	498	94,8	155	90,1	390	85,9	1728	92,6
Ukupno / Total		715	100,0	525	100,0	172	100,0	454	100,0	1866	100,0

TABLICA 2. ZADOVOLJAVAJUĆI CITOLOŠKI NALAZI PREMA AMBULANTAMA U KOJIMA SU UZETI I OSKUDNOSTI UZORKA TE OMJER ASC:SIL

TABLE 2. SATISFACTORY SAMPLES ACCORDING TO GYNAECOLOGY SERVICES, SCANTYNESS AND ASC:SIL+ RATIO

	Ambulanta za bolesti stidnice / Vulvar disease unit				Ostale onkološke ambulante / Other oncological units				Ostale ambulante Klinike / Other clinical units				Ginekološke ambulante primarne zdravstvene zaštite / Outpatient gynaecology services			
	Zadovoljavajući / Satisfactory		Oskudan / Scant		Zadovoljavajući / Satisfactory		Oskudan (%) / Scant		Zadovoljavajući / Satisfactory		Oskudan (%) / Scant		Zadovoljavajući / Satisfactory		Oskudan (%) / Scant	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Negativni / Negative	463	73,5	30	75,0	231	59,4	49	62,1	70	63,1	26	70,3	131	52,2	74	64,3
ASC	121	19,2	10	25,0	104	26,7	25	31,6	32	28,8	11	29,7	84	33,5	39	33,9
SIL+	46	27,5	0	0,0	54	13,8	5	6,3	9	8,1	0	0,0	36	14,3	2	1,8
Abnormalni / Abnormal	167	26,5	10	25,0	158	40,6	30	37,9	41	36,9	11	29,7	120	47,8	41	35,7
Ukupno / Total	630	100,0	40	100,0	389	100,0	79	100,0	111	100,0	37	100,0	251	100,0	115	100,0
ASC:SIL	2,6:1		10:0		1,9:1		5:1		3,5:1		11:0		2,3:1		19,5:1	

ASC – atipične pločaste stanice / atypical squamous cells; SIL+ – pločasta intraepitelna lezija ili karcinom / squamous intraepithelial lesion or carcinoma

Osjetljivost citologije u otkrivanju pločastog karcinoma bila je 100%, a u otkrivanju pločastih intraepitelnih promjena (uVIN i dVIN) 94,1%, dok je specifičnost iznosila 35,4%.

Rasprava

Iako u svakom udžbeniku citologije postoji posebno poglavlje o citološkoj dijagnostici promjena na stidnici^{2,3,7}, u dostupnoj literaturi nalazi se malen broj radova o ovoj tematici, većinom objavljenih osamdesetih godina prošlog stoljeća (Dennerstein^{20,23,24}, Nauth^{31,32,33,34}, Kashomura³⁵) uključujući i nekoliko iz našeg laboratorija prije dvadesetak godina (Molnar^{18,19,26}).

U zadnjih petnaestak godina našli smo samo četiri rada o citologiji stidnice^{14,21,22,25}, od kojih su dva vezana uz primjenu novijih dijagnostičkih metoda (četkica za uzimanje uzoraka sa stidnice¹⁴ i tekućinski uzorak u citološkoj dijagnostici²⁵). U novije vrijeme objavljuju se uglavnom prikazi slučajeva koji potvrđuju da se citologija uzoraka sa stidnice koristi, ali ne daju uvid u točnost citologije^{36,37,38,39,40}. Unatoč uvriježenom mišljenju da je histopatologija zlatni standard za dijagnostiku bolesti stidnice, Levine i sur.²⁵ smatraju da dobro uzet citološki uzorak četkicom može biti čak i bolji od biopsije, jer se uzorak dobiva s veće površine te je manja mogućnost lažno negativnog nalaza (uzorak uzet s krivog mjesta).

TABLICA – TABLE 3. CITOHIŠTOLOŠKA KORELACIJA / CYTOHISTOLOGIC CORRELATION

Citološki nalaz / Cytology finding	Histološka dijagnoza / Histologic diagnosis					Ukupno / Total
	Višeslojni pločasti epitel / Squamous epithelium	Lichen	uVIN	dVIN	Pločasti karcinom / Squamous carcinoma	
Negativni / Negative	28	11	1			40
ASC-US	13	8		1	1	23
LSIL	2	2				4
ASC-H	26	14	6	2	3	51
HSIL	5	1	3		4	13
ASC-inv	4	1	1		4	10
CaPlano	1		2	1	14	18
Ukupno / Total	79	37	13	4	26	159

uVIN = vulvarna intraepitelna neoplazija uobičajenog tipa / usual type vulvar intraepithelial neoplasia; dVIN = vulvarna intraepitelna neoplazija diferenciranog tipa / differentiated vulvar intraepithelial neoplasia; ASC-US = atipične skvamozne stanice neodređenog značenja / atypical squamous cells of undetermined significance; LSIL = skvamozna intraepitelna lezija niskog stupnja / low grade squamous intraepithelial lesion; ASC-H atipične skvamozne stanice – ne može se isključiti SIL visokog stupnja / atypical squamous cells – cannot exclude HSIL; HSIL = / skvamozna intraepitelna lezija visokog stupnja / high grade squamous intraepithelial lesion; ASC-inv = atipične skvamozne stanice – ne može se isključiti invazija / atypical squamous cells – invasion cannot be excluded; CaPlano = pločasti karcinom / squamous cell carcinoma.

Adekvatnost uzoraka

Adekvatnost citoloških uzoraka sa stidnice, koja uključuje ocjenu celularnosti, nije dobro definirana i najčešće je prepuštena subjektivnoj procjeni citologa. Van den Einden i sur.¹⁴ u tekućinskim uzorcima uzetim posebnom četkicom za uzimanje uzoraka sa stidnice smatraju da je uzorak u potpunosti zadovoljavajući ukoliko sadrži više od 8000 stanica s jezgrom ili skvama, a suboptimalni su uzorci s 5000 do 8000 stanica s jezgrom ili skvama, dok većina ostalih autora ne navodi potrebnu celularnost uzorka. Levine i sur.²⁵ uzorke uzete špatulom smatraju neadekvatnima. U našem laboratoriju ranijih su godina većinom analizirani uzorci uzeti drvenom špatulom koji su najčešće bili izrazito slabo celularni, a citolozi su po slobodnoj procjeni kao nezadovoljavajuće, zbog oskudnosti, ocjenjivali uzorke koji su sadržavali vrlo mali broj pločastih stanica s jezgrom, dok su zadovoljavajući, ali oskudni bili i uzorci s malobrojnim stanicama pločastog epitela, a zadovoljavajući ostali^{18,19,26}.

Naši rezultati prikazuju veliku razliku u celularnosti uzoraka ovisno o ambulanti u kojoj su uzeti, odnosno načinu uzimanja uzorka. U onkološkoj ambulanti za bolesti stidnice Klinike uzorci su pretežno uzimani četkicom, nešto rjeđe u ostalim onkološkim ambulantomama, dok su u ostalim ambulantomama Klinike kao i u ginekološkim ambulantomama primarne zdravstvene zaštite uglavnom uzimani na klasičan način: drvenom špatulom ili direktnim dodiranjem stakalca na promjenu. Udio nezadovoljavajućih razmaza zbog oskudnosti linearno raste od ambulanti u kojima su uzorci uglavnom uzimani četkicom do onih u kojima se obrisak uzimao špatulom (3,4% do 13,7%; prosječno 6,8%). U analizi primjerenosti uzoraka našeg laboratorija iz 1995. godine bilo je nešto više nezadovoljavajućih uzoraka (8,7%)¹⁸ nego

u ovom istraživanju, a u periodu od 2000. do 2001. godine manje (3,7%)²⁶. U periodu od 2000. do 2001. godine analizirana je primjerenost uzorka ovisno o ambulanti uzimanja, ali budući da su uzorci uzimani na sličan način nije bilo značajnih razlika²⁶. Jiménez-Ayala i sur.²¹ u uzorcima uzetim skalpelom imaju svega 1,06% (6/563) nezadovoljavajućih uzoraka.

Udio zadovoljavajućih, ali oskudnih uzoraka također raste ovisno o ambulanti odnosno načinu uzimanja uzorka (5,6% do 25,3%; prosječno 14,5%). Prema podacima našeg laboratorija iz 1995., kada su uzorci uglavnom uzimani špatulom, ovakvih uzoraka bio je sličan omjer kao u ginekološkim ambulantomama primarne zdravstvene zaštite, odnosno više nego u našem istraživanju (25,6%; 44/172)¹⁸ kao i kod van den Einden i sur. (26,1%; 17/65)¹⁴, dok je u istraživanju našeg laboratorija za period od 2000. do 2001. bilo manje ovakvih uzoraka (8,6%; 51/595)¹⁹.

Udio uzoraka koji potpuno zadovoljavaju bio je najviši u onkološkoj ambulanti za bolesti stidnice, gdje je i najviše uzoraka uzeto četkicom. Važno je napomenuti da su uzorci uzeti u ostalim ambulantomama, osobito oni iz primarnih ginekoloških ambulantomama i ostalih ambulantomama Klinike, iako ocijenjeni potpuno zadovoljavajućima, uglavnom bili značajno oskudnije celularni od onih uzetih četkicom.

Zbog slabo definiranih kriterija i velike subjektivnosti procjene adekvatnosti uzorka sa stidnice teško je uspoređivati ove vrijednosti čak i u istom laboratoriju kroz različita vremenska razdoblja, premda su vrijednosti usporedive za isto razdoblje.

Abnormalni citološki nalazi

Citološki uzorci sa stidnice uzimaju se kod klinički vidljivih promjena i/ili smetnji i/ili uz pozitivan HPV

i/ili CIN u anamnezi te je očekivani broj abnormalnih nalaza veći nego u probiru na premaligne i maligne lezije vrata maternice. Ukupan broj abnormalnih citoloških nalaza u našem istraživanju (34,9%; 578/1652) usporediv je s rezultatima našeg laboratorija od prije dvadesetak godina (30,5%; 175/573)¹⁹, kao i u istraživanju Jiménez-Ayalae i sur. (36,4%; 203/557)²¹.

Kod oskudnih razmaza obriska sa stidnice često se nalaze i promjene na stanicama vezane uz lošu fiksaciju (najčešće zbog sušenja na zraku) kao i oštećenje na stanicama uzrokovano razmazivanjem²⁵. Ove promjene prema citološkim kriterijima nerijetko se ocjenjuju kao ASC-US, a ako se radi o starijim ženama s izraženim atrofično-degenerativnim promjenama na stanicama iz dubljeg sloja i kao ASC-H. U našem istraživanju zadovoljavajući, ali oskudni uzorci, ako su abnormalni, najčešće su ocijenjeni kao ASC (ASC-US ili ASC-H) zbog malog broja abnormalnih stanica.

Bethesda klasifikacija VCE obrisaka preporučuje omjer ASC:SIL do 1,5:1 u primarnom probiru, a kod rizične populacije dopušta omjer 3:1³⁰. Primijenjeno na stidnicu, kod potpuno zadovoljavajućih uzoraka ove kriterije zadovoljavaju sve ambulate osim „ostalih ambulanta Klinike”. Kod zadovoljavajućih, ali oskudnih uzoraka ovaj je omjer u ostalim onkološkim ambulantama Klinike bio 5,1:1, u ambulantama primarne ginekologije 19,5:1, dok su svi oskudni abnormalni nalazi u ambulanti specijaliziranoj za bolesti stidnice kao i u ostalim ambulantama Klinike bili u ASC skupini.

Citohistološka korelacija

Usporedbe citoloških i patohistoloških dijagnoza uzoraka sa stidnice u dostupnoj su literaturi malobrojne, često se zasnivaju na malom broju slučajeva, a najčešće se negativni nalazi uspoređuju s abnormalnima u koje su uključeni vulvarna intraepitelna neoplazija (VIN) i invazivni karcinom. Uglavnom su to radovi pisani prije prve Bethesda klasifikacije, odnosno prije uvođenja ASC kategorije u klasifikaciju citoloških nalaza^{27,28,29,30}.

Naši rezultati su nisko specifični za patohistološki nalaz urednoga pločastog epitela (35,4%; 28/79) kao i za lichen (29,7%; 11/37) kod kojega je pločasti epitel uredan, ali stanjen i ponekad parakeratotičan pa se može očekivati veći broj abnormalnih citoloških nalaza. Za patohistološki uredni pločasti epitel najčešći lažno pozitivni abnormalni citološki nalazi bili su ASC-H (32,9%; 26/79) i ASC-US (16,5%; 13/79), slično kao i za lichen: ASC-H (37,8%; 14/37) i ASC-US (21,6; 8/37). Dostupni radovi u literaturi uglavnom imaju višu specifičnost, ali u svojim nalazima ne koriste ASC terminologiju. Specifičnost se kreće od 60% (3/5) u radu van den Eindena¹⁴, potom u radu Jiménez-Ayalae 71,8% (28/39)²¹, Levinea 87,5% (14/16)²⁵ do 100% (11/11) (Molnar i sur.)¹⁸.

Naše istraživanje pokazalo je visoku osjetljivost u otkrivanju intraepitelnih abnormalnosti pločastog epitela (92,3%; 12/13) za uVIN sa samo jednim lažno negativnim nalazom te je viša od rezultata Jiménez-Ayalae i sur. (58,3%; 21/36)²¹ i van den Eindena i sur. (64,3%; 9/14)¹⁴, a sličnija rezultatima iz našeg laboratorija iz 1995. godine (100%; 7/7)¹⁸, kao i u razdoblju od 2000. do 2001. godine (100,0%; 5/5)²⁶ te rezultatu Levinea i sur. (100%; 3/3)²⁵, koji su imali manji broj slučajeva. Naši nalazi su upućivali na HSIL ili sumnju na njega (ASC-H) u 69,2% (9/13) slučajeva, dok smo u 23% (3/13) sumnjali na invazivni proces.

Osjetljivost za dVIN u našem istraživanju je 100,0% (4/4), veća nego kod van den Eindena i sur. (66,7%; 2/3)¹⁴. Naši nalazi su upućivali na HSIL (ASC-H) u 50% (2/4) slučajeva, dok je u jednom slučaju nalaz bio ASC-US te u jednom invazivni karcinom. Stariji radovi ne uključuju ovu dijagnozu jer je uvedena u klasifikaciju tek 1998. godine²⁹.

Osjetljivost u otkrivanju karcinoma pločastih stanica u našem istraživanju iznosi 100,0% (26/26), kao i kod van den Eindena (100%; (14/14)¹⁴ i kod Jiménez-Ayalae (100%; 56/56)²¹, dok je u našem laboratoriju 1995. bila 97,4% (76/78)¹⁸, a u periodu od 2000. do 2001. 90,2% (37/41)²⁶. Naši nalazi su upućivali na invazivni karcinom ili sumnju u 69,2% (18/26) slučajeva, dok smo u 26,9% (7/26) slučajeva sumnjali na intraepitelnu promjenu visokog stupnja (HSIL/ASC-H), a u jednom je slučaju naš nalaz bio ASC-US.

Zaključak

Rak stidnice je rijetka bolest pa nije opravdan citološki probir, već se ciljano uzimaju obrisci sa stidnice ženama s klinički vidljivim lezijama, subjektivnim smetnjama ili intraepitelnim lezijama te HPV infekcijom na vratu maternice i/ili rodnice. Citologija ne može zamijeniti histopatologiju u dijagnostici promjena na stidnici, ali može biti od pomoći u praćenju bolesnica s potvrđenom bolesti. Za otkrivanje ranih promjena važna je dobra suradnja između ginekologa, citologa i patologa. U slabo celularnim uzorcima sa stidnice često su istovremeno izražene promjene vezane uz slabu fiksaciju uzorka, koje je ponekad teško citološki razlikovati od abnormalnosti na pločastim stanicama. U celularnijim uzorcima ovaj je učinak manje izražen. S obzirom na slabije definirane citološke kriterije za uzorke sa stidnice, očekivan je veći omjer ASC:SIL+, ali uz celularnije uzorke taj se omjer smanjuje. Uzimanje uzorka sa stidnice endocervikalnom četkicom, koja je dostupna u svakoj ginekološkoj ambulanti, rezultira celularnijim uzorkom od onoga uzetog drvenom špatulom.

LITERATURA

1. Duong TH, Flowers LC. Vulvo-vaginal cancers: risks, evaluation, prevention and early detection. *Obstetr Gynecol Clin North Am* 2007;34:783–802.

2. *Abdul-Karim WF, Yang B.* Vulva, vagina and anus. U: Bibbo M, Wilbur D, ur. *Comprehensive cytopathology*, 4. izd. Philadelphia: Saunders company; 2014, str. 220–39.
3. *Koss LG.* Diseases of the vagina, vulva, perineum and anus. U: Koss LG, Melamed MR, ur. *Koss' diagnostic cytology and its histopathologic bases*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006, str. 466–90.
4. xxx. Incidencija raka u Hrvatskoj 2005. Bilten br. 30. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2007.
5. xxx. Incidencija raka u Hrvatskoj 2013. Bilten br. 38. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2015.
6. xxx. Incidencija raka u Hrvatskoj 2016. Bilten br. 41. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2019.
7. *Johnson J.* Tumors of the vulva and vagina. U: Gray W, McKeen GT, ur. *Diagnostic cytopathology*. Churchill Livingstone: Elsevier Science; 2003, str. 813–19.
8. *Prat J.* Pathology of vulvar intraepithelial lesions and early invasive carcinoma. *Hum Pathol* 1991;22:877–83.
9. *Preti M, Mezzetti M, Robertson C, Sideri M.* Inter-observer variation in histopathological diagnosis and grading of vulvar intraepithelial neoplasia: results of an European collaborative study. *Int J Obstetr Gynaecol* 2000;107:594–9.
10. *Sideri M, Jones RW, Wilkinson E i sur.* Squamous vulvar intraepithelial neoplasia: 2004 modified terminology, ISSVD Vulvar Oncology Subcommittee. *J Reprod Med* 2005;50:807–10.
11. *Preti M, Van Seters M, Sideri M, Van Beurden M.* Squamous vulvar intraepithelial neoplasia. *Clin Obstetr Gynecol* 2005;48:845–61.
12. *van de Nieuwenhof HP, van der Avoort IA, de Hullu JA.* Review of squamous premalignant vulvar lesions. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;68:131–56.
13. *Oreščanin M.* Collinson test u ranom otkrivanju karcinoma ženskih, vanjskih spolnih organa. U: *Prevenција i dijagnostika tumora ženskih spolnih organa*. Zagreb: Nakladni zavod Globus, Hrvatsko društvo ginekologa i opstetričara, Klinika za tumore, Hrvatska liga protiv raka; 1998, str. 171–3.
14. *Van den Einden LCG, Grefte JMM, van der Avoort IA i sur.* Cytology of the vulva: feasibility and preliminary results of a new brush. *Br J Cancer* 2012;106:269–73.
15. *Yang B, Hart WR.* Vulvar intraepithelial neoplasia of the simplex (differentiated) type: a clinicopathologic study including analysis of HPV and p53 expression. *Am J Surg Pathol* 2000;24:429–41.
16. *Waxman AG, Chelmsow D, Darragh TM, Lawson H, Moscicki AB.* Revised terminology for cervical histopathology and its implications for management of high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Obstetr Gynecol* 2012;120:1465–71.
17. *Bornstein J, Bogliatto F, Haefner HK i sur.* ISSVD Terminology Committee. The 2015 International Society for the Study of Vulvovaginal Disease (ISSVD) Terminology of Vulvar Squamous Intraepithelial Lesions. *Obstetr Gynecol* 2016;127:264–8.
18. *Molnar Stantić B, Audy-Jurković S.* Citologija vulve? Naravno, ali ciljano! U: Eljuga D, Dražančić A i sur. *Prevenција i dijagnostika tumora ženskih spolnih organa*. Zagreb: Nakladni zavod Globus, Hrvatsko društvo ginekologa i opstetričara, Klinika za tumore, Hrvatska liga protiv raka; 1998, str. 163–70.
19. *Molnar Stantić B.* Citologija preinvazivnih i ranih invazivnih lezija stidnice. U: Čorušić A, ur. *Dijagnostika, liječenje i prognoza preinvazivnih i ranih invazivnih neoplazija vulve, vagine i cerviksa*. Poslijediplomski tečaj stalnog medicinskog usavršavanja 1. kategorije. Zagreb: Fotosoft doo; 2005, str. 9–13.
20. *Dennerstein G.* Vulvar cytology: useful or not? *J Low Genit Tract Dis* 2009;13:192.
21. *Jiménez-Ayala M, Jiménez-Ayala B.* Terminology for vulvar cytology based on the Bethesda System. *Acta Cytol* 2002;46:645–50.
22. *Bae-Jump VL, Bauer M, Van Le L.* Cytological evaluation correlates poorly with histological diagnosis of vulvar neoplasias. *J Low Genit Tract Dis* 2007;11:8–11.
23. *Dennerstein GJ.* The cytology of the vulva. *J Obstetr Gynaecol* 1968;75:603–9.
24. *Dennerstein GJ.* Cytology of the vulva. *J Reprod Med* 1988;33:703–4.
25. *Levine TS, Rolfe KJ, Crow J i sur.* The use of cytospin monolayer technique in the cytological diagnosis of vulval and anal disease. *Cytopathology* 2001;12:297–305.
26. *Molnar Stantić B, Babić D.* Diferencijalnodijagnostički pristup preinvazivnim i invazivnim lezijama stidnice – pristup citologa i patologa. U: *Audy-Jurković S, ur. Ginekološka citologija u Hrvatskoj 50 godina poslije*. Prvi međunarodni znanstveni simpozij kliničke citologije „Jasna Ivić“. Zagreb: Denona doo; 2003, str. 65–73.
27. *Ovanin-Rakić A, Pajtler M, Stanković T i sur.* Klasifikacija citoloških nalaza vrata maternice „Zagreb 2002“. Modifikacija klasifikacija „Zagreb 1990“ i „NCI Bethesda system 2001“. *Gynaecol Perinatol* 2003;12:148–53.
28. *Mahovlić V, Vrdoljak-Mozetić D, Štemberger-Papić S, Barišić A, Verša-Ostojić D.* Zagreb 2016 classification of cervical cytology findings – modification of Zagreb 2002 and NCI Bethesda System 2014 classifications. *Gynaecol Perinatol* 2016;25:147–58.
29. *Solomon D, Davey D, Kurman R i sur.* The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002 24;287(16):2114–9.
30. *Nayar R, Wilbur DC, ur.* The Bethesda System for reporting cervical cytology. Definitions, criteria, and explanatory notes. 3. izd. New York: Springer; 2015.
31. *Nauth HF, Schilke E.* Cytology of the exfoliative layer in normal and diseased vulvar skin: correlation with histology. *Acta Cytol* 1982;26:269–83.
32. *Nauth HF, Böger A.* New aspects of vulvar cytology. *Acta Cytol* 1982;26:1–6.
33. *Nauth HF, Boon ME.* Significance of the morphology of anucleated squames in the cytologic diagnosis of vulvar lesions. A new approach in diagnostic cytology. *Acta Cytol* 1983;27:230–6.
34. *Nauth HF.* Current vulvar diagnostic methods, with special reference to vulvar cytology. *J Reprod Med* 1986;31:788–95.
35. *Kashimura M, Matsuura Y, Kawagoe T, Toki N, Sugihara K.* Cytology of vulvar squamous neoplasia. *Acta Cytol* 1993;37:871–5.
36. *Simon SK, Bolanca IK, Sentija K, Kukura V, Valetić J, Skrtić A.* Vulvar Paget's disease—a case report. *Coll Antropol* 2010;34(2):649–52.
37. *Klapsinou E, Terzakis E, Arnoigiannaki N, Daskalopoulou D.* Paget's disease of the vulva detected in vulvar and vaginal brushing smears: a case report. *Acta Cytol* 2010;54(Suppl 5):898–902.
38. *Tanaka Y, Kirihara T, Kitamura H, Kuriyama M, Hori H, Gorai I.* Cytologic detection of recurrence in extramammary Paget's disease of the vulva: a report of two cases. *Acta Cytol* 2010;54(Suppl 5):1007–12.
39. *Uke MS, Kulkarni MB, Ajit D, Gujral S.* Diagnosis of hidradenoma papilliferum of the vulva on cytologic smears: a case report. *Acta Cytol* 2010;54(Suppl 5):907–10.
40. *Gilliland K, Knapik J, Wilkinson EJ.* Cytology of vulvar/vaginal Paget disease: report of a case and review of the literature. *J Low Genit Tract Dis* 2013;17(4):e26–30.