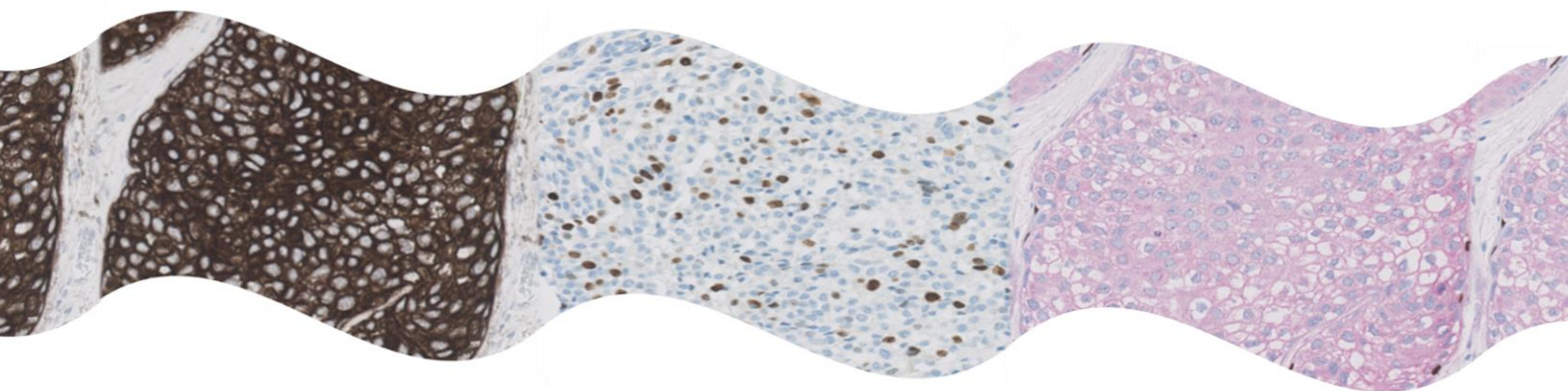


Professionsbachelorprojekt 2019

Digital billedanalyse af Ki67- proliferationsindeks på invasive duktale mammakarcinomer

Digital image analysis of Ki67-proliferation index of invasive
ductal mamma carcinoma



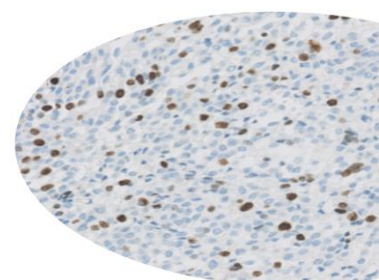
Danni Jakobsen (3010826), Kristian K. Jepsen (3004202) og Maximillian A. W. Moskov (3010883)

Klinisk vejleder Tove Lisbeth Baun og UC-vejleder Inge Marie Bayer

Patologisk afdeling, Sygehus Sønderjylland Sønderborg

UC SYD Esbjerg

Antal anslag: 95.012



Indholdsfortegnelse

Forord.....	3
Abstrakt.....	4
Introduktion	5
Problembaggrund.....	5
Formål	8
Problemformulering.....	8
Teori	9
Mamma histologi.....	9
Cancerudvikling	9
Præanalyse	9
Analyse	10
Postanalyse.....	16
Antistofferne og deres anvendelsesområde	16
Scanning	17
Digital Billedanalyse	18
Materiale og metode.....	21
Design	21
Metodologiske overvejelser	22
Fastsættelse af cut-off grænse.....	22
Inklusions- og eksklusionskriterier	23
Udvælgelse af undersøgelsesområder (ROI).....	24
Seriesnit.....	24
Anonymisering.....	25
Prøvemateriale	25
Materialer.....	27
Arbejdsmiljø	29
Dataindsamling.....	30
Mikrotomi.....	30
Immunhistokemisk analyse	32
Scanning	32
Omkørsel	33
Digital billedanalyse.....	33
Manuel vurdering.....	34
Kvalitetssikring	35
Databehandling	36

Litteratursøgning	36
Etiske overvejelser.....	37
Resultater	38
Kvalitetskontroller	38
Digital Billedanalyse	40
Immunhistokemiske analysemetoder	53
Diskussion.....	58
Vurdering af kontroller.....	58
Diskussion af resultater	58
Digital billedanalyse.....	58
Immunhistokemiske analysemetoder	63
Ekstern validitet.....	64
Intern validitet.....	66
Konklusion	69
Perspektivering.....	70
Litteraturliste.....	71
Bilag	76
Bilag 1 - Farveprotokol AE1/AE3	76
Bilag 2 - Farveprotokol Ki67	78
Bilag 3 - p63/CK8/18.....	81
Bilag 4 - Søgeprotokol	85

Forord

Dette professionsbachelorprojekt er udført af Danni Jakobsen, Kristian K. Jepsen, og Maximillian A.W. Mosskov, bioanalytikerstuderende på UC SYD Esbjerg. Det praktiske arbejde er udført på Patologisk afdeling, Sygehus Sønderjylland Sønderborg, efteråret 2019. Projektet henvender sig primært til Patologisk afdelings immunhistokemiske afsnit, samt bioanalytikere, afdelingsbioanalytikere, læger og andre med interesse for det patologiske område i forbindelse med digital billedanalyse.

Projektet er udarbejdet under vejledning af klinisk vejleder Tove Lisbeth Baun, samt UC-vejleder Inge Marie Bayer. En særlig stor tak skal lyde til dem for deres hjælpsomhed, engagement og støtte gennem hele projektet.

Al personale på Patologisk afdeling skal have tak for deres hjælpsomhed med arbejdet til projektet. Endnu en tak til Tove Lisbeth Baun for oplæring i indscanning med NDP.scan og digital billedanalyse i Visiopharm Oncotopix®.

Abstrakt

Digital billedanalyse af Ki67-proliferationsindeks på invasive ductale mammakarcinomer.

Jakobsen, Danni; Jepsen, Kristian Kirk; Mosskov, Maximillian Alexander Winther; Baun, Tove Lisbeth (KV); Bayer, Inge Marie (UCV). Patologisk afdeling, Sygehus Sønderjylland Sønderborg. UC Syd, Esbjerg.

Baggrund: Påvisning af Ki67 anvendes ved mamma-cancer til at beskrive proliferationsraten af invasive tumorer. Dette udtrykkes ved Ki67-proliferationsindeks (Ki67-PI), der anvendes til at skelne mellem subtyperne Luminal A og B med cut-off på $\geq 20\%$, som giver information om bl.a. aggressivitet og mulig behandling. Formålet med dette forsøg er at undersøge digital billedanalyse af Ki67-PI, og efterfølgende sammenligne med patologens manuelle estimering. Digital billedanalyse giver mulighed for større reproducerbarhed af Ki67 vurdering. Derudover sammenlignes visuelt to immunhistokemiske analysemetoder; Ki67/AE1/AE3 og Ki67/p63/CK8/18.

Metode: 40 præparater af invasiv ductal mammakarcinom mikrotomeres i 3 seriesnit af $2\mu\text{m}$ og påvises immunhistokemisk for hhv. AE1/AE3, Ki67 og p63/CK8/18. Hvert snit scannes og overføres til Visiopharm Oncotopix®, hvor virtuel dobbeltfarvning og digital billedanalyse udføres. Digital billedanalyse udføres ved tumorområder af 100%, 25% og hotspot.

Resultater: Digital billedanalyse af Ki67/AE1/AE3 giver lavere Ki67-PI med medianer på hhv. 9% for 100% og 25% af tumor, 21% for hotspot, mens patologens estimering har en median på 25%. Forskellen mellem digital billedanalyse er stigende i takt med øget Ki67-PI. Digital billedanalyse af hotspot varierer minimalt fra patologens estimering i intervallet 0-30% Ki67-PI. Denne områdestørrelse er ligeledes mest sammenlignelig med patologens estimering med en κ -koefficient på 0,7 (god overensstemmelse), mens 100% og 25% områdestørrelse opnår en κ -koefficient på 0,3 (nogenlunde overensstemmelse). Visuel sammenligning af AE1/AE3 og p63/CK8/18 giver ingen variation i Ki67-PI.

Konklusion: Tumorområdestørrelsen har stor betydning for Ki67-PI, hvor digital billedanalyse af hotspot er mest sammenlignelig med patologens estimering. Digital billedanalyse af hotspot varierer minimalt fra patologens estimering i området omkring den klinisk relevante cut-off grænse på $\geq 20\%$. p63/CK8/18 kan muligvis give variation i Ki67-PI ved digital billedanalyse.

Introduktion

Problembaggrund

Med 4600+ diagnoser årligt er mammacancer den hyppigste form for cancer blandt kvinder i Danmark, hvorudover der findes et fåtal af mandlige tilfælde. 99% af tilfældene af mammacancer udgøres af adenokarcinomer, som er betegnelsen for cancer opstået i kirtlepitelceller. Mammakarcinomer kan stamme fra forskellige områder af mamma, med den hyppigste form værende duktale karcinomer, som er cancer opstående i epitelet i udførselsgangene. Duktale mammakarcinomer forekommer i ca. 80%, af tilfældene. Derudover udgår canceren i ca. 10% af tilfældene fra mælkekirtlerne, hvilket betegnes som lobulært mammakarcinom. De resterende ca. 10% fordeler sig på flere forskellige typer. (1–3)

Mammacancer udgør en heterogen gruppe af sygdomme med forskellige molekulære udtryk. Ud fra genomiske undersøgelser er der blevet defineret fire vigtige subtyper; Luminal A, Luminal B, basal-like og HER2-styrede. Subtyperne blev oprindeligt fundet og defineret ved genekspressionsprofiler, og der er udviklet en 50-genprofil kaldet PAM50 til anvendelse på formalinfikseret tumorvæv. (4) Genekspressionsanalyser er dog ikke universelt tilgængelige i kliniske laboratorier, fordi de stadig er forholdsvist dyre og tidskrævende. Derfor anvendes i stedet immunhistokemiske (IH) analyser som stedfortrædende markører for de genekspressionsbaserede subtyper. På baggrund af international ekspertkonsensus anvendes der primært fire "biomarkører" i det patologiske rutinearbejde med mammakarcinomer; estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) og det proliferations-associerede nukleære protein Ki67. Disse farvninger anvendes i kombination til at definere, hvilken subtype en given mammacancer tilhører. Derved opnår man klinisk information omkring tumorens biologiske karakteristika og forventede reaktion på behandling. (5)

En af funktionerne af IH påvisning af Ki67 i denne sammenhæng er at skelne mellem typerne Luminal A og Luminal B. Tumorer af Luminal A typen er kendetegnet ved forholdsvis lav proliferation, mens Luminal B er kendetegnet ved høj proliferation. At skelne mellem disse to subtyper, kan ultimativt have betydning for, om en patient vurderes til at skulle modtage kemoterapi eller ej. Ki67-proliferationsindekset (Ki67-PI) er en beregning af hvor stor en andel af invasive tumorceller der udviser Ki67-positivitet. Indekset beregnes som Ki67-PI =

$$\frac{\text{totalt antal invasive tumorceller}}{\text{Ki67-positiv invasive tumorceller}} * 100.$$
 Denne værdi angives i procent, og har en cut-off grænse

som skelner høj og lav proliferation. I Danish Breast Cancer Cooperative Groups (DBCG) vejledning for patologi ved mammacancer, er der ingen fastsat cut-off grænse for Ki67-PI. Diverse opgørelser benytter forskellige værdier som cut-off, generelt ligger disse dog i intervallet 10-20%. Der er en række udfordringer ved den kliniske anvendelse af Ki67-påvisning til vurdering af Ki67-PI, pga. måden farvningen bliver tolket på. Ifølge DBCG skal der foretages et semikvantitativt skøn på de Ki67-farvede tumorsnit. Ud fra dette skøn angives en estimeret værdi for andelen af Ki67-positive tumorceller (proliferationsindeks) i den invasive tumorfront og hotspots, i forhold til antallet af invasive tumorceller. (3)

Dette betyder, at der for fastsættelse af Ki67-PI på mammakarcinomer er en meget lav grad af reproducerbarhed i den postanalytiske fase, fordi retningslinjerne for tolkningen er så løst defineret, at måden dette bliver udført på kan variere meget mellem forskellige patologer og laboratorier. Dette er af særlig interesse for bioanalytikere mht. kvalitetssikring. Kan reproducerbarheden øges og den interlaboratoriske variation mindskes, uden videre arbejdsmiljømæssige problemer, er dette ønskværdigt og kan føre til ændring af nuværende arbejdsgange. Jobglidning, ved overførsel af arbejdsopgaver fra patolog til bioanalytiker, kan endda være en fremtidig mulighed, og bioanalytikers kompetencer vil udvikles.

Muligheden for Digital Billedanalyse (DB) af IH farvninger med Visiopharm Oncotopix® software, præsenterer en mulighed for at øge standardiseringen af Ki67 postanalysen, og derved øge reproducerbarheden. Standardisering vil forbedre muligheden for, at resultater for Ki67-PI vil kunne anvendes og sammenlignes på tværs af laboratorier. Emnet er desuden interessant, da digitaliseringen af det patologiske område udvikles drastisk. Anvendelsen af digitaliserede løsninger vil derfor få stadigt stigende indflydelse på arbejdet med histologiske vævsprøver, og undersøgelsen af DB har derfor stor relevans for det klinisk patologiske speciale. (6,7)

Brugbarheden og den kliniske validitet af digital billedanalyse er blevet undersøgt i flere studier. Et studie af Stålhammar et al. (5) konkluderer, at DB er bedre til estimering af Ki67-PI, end patologer der udfører visuel estimering, ved sammenligning med genekspressionsprofiler ud fra PAM50.

På Patologisk afdeling, Sygehus Sønderjylland i Sønderborg (SHS) er nuværende praksis, at Ki67-PI estimeres af patologen. Dette gøres ud fra farvninger af seriesnit med henholdsvis Ki67 og AE1/AE3. Patologen estimerer manuelt et Ki67-PI ud fra disse to farvninger, dette gøres ud fra hotspots af 200-500 tumorceller ifølge afdelingens instruks. Patologen har dog også muligheden

for at få udført DB på en virtuel dobbeltfarvning. Afdelingen har DB fra Visiopharm tilgængelig, med APPs til genkendelse af tumorceller ud fra AE1/AE3 farvningen, og efterfølgende detektering af Ki67 positivitet hos disse celler. Arbejdsgangen ved DB er dog lang, fordi patologen først mikroskoperer snittene og udvælger relevante områder, hvorefter en bioanalytiker indscanner objektglassene og opsætter DB på områderne udvalgt af patologen. Det kunne derfor være interessant at undersøge, om udvælgelsen af relevante tumorområdestørrelser, også kaldet Regions of Interest (ROI), kan standardiseres og udføres af en bioanalytiker. Dette vil give mulighed for at spare tid på arbejdsgangen for både bioanalytiker og patolog, da vævssnittet ikke først skal mikroskoperes af en patolog. Derudover vil en mulig jobglidning heraf være, at bioanalytikere selvstændigt kan udvælge ROI og udføre DB. Dette skaber mulighed for øget opmærksomhed fra bioanalytikerens side omkring præanalyse og analysens betydning for det efterfølgende arbejde med tolkning af snittene. (8)

På patologisk afdeling SHS anvendes der IH påvisning af cytokeratin (CK) AE1/AE3 til genkendelse af tumorceller, i forbindelse med IH påvisning og vurdering af Ki67 på mammaparcinomer. Dette gøres for ikke at inkludere Ki67-positivitet fra celler der ikke stammer fra tumor. (9) På øvrige laboratorier anvendes andre primære antistoffer til IH påvisning af andre CK til genkendelse af tumorceller, hvilket betyder, at resultaterne mellem laboratorierne ikke nødvendigvis kan sammenlignes. På Odense Universitetshospital anvendes der i kombination med Ki67 en fysisk IH dobbeltfarvning af p63 samt CK8/18. (10) Det kunne derfor være relevant at undersøge, hvorledes Ki67-PI varierer afhængigt af disse farvemethoder. Dette vil skabe viden omkring, hvorvidt resultater fra de to laboratorier er sammenlignelige. Sammenlignelighed er relevant da bioanalytikere er bevidste om at opnå optimal behandling for hver enkelt patient. En variation i Ki67-PI på baggrund af forskellige farvemethoder brugt på laboratorierne, vil ultimativt kunne betyde en forskel i behandlingsstrategi. Ved variation mellem de to metoder, vil der være en mulighed for at standardisere IH metoderne på tværs af laboratorierne, så denne forskel udlignes. (11)

Formål

Formålet med dette projekt består i at vurdere Ki67-PI opnået ved DB. I forsøget er der fokus på at undersøge om udvælgelsen af områder til analyse, kan udføres af bioanalytiker i stedet for patolog. Dette vil kunne lette arbejdsgangen for DB på Patologi SHS, hvis bioanalytikere selvstændigt kan udvælge ROI, uden forudgående mikroskopering fra patologen.

Dette undersøges ved at vurdere, hvordan Ki67-PI påvirkes af forskellige ROI, udvalgt af bioanalytikerstuderende, bestående af hhv. hotspots, 25% af tumorområdet og hele tumorområdet, ved DB af duktale mammakarcinomer med Ki67/AE1/AE3 virtuel dobbeltfarvning. Efterfølgende sammenlignes resultaterne med patologens manuelle estimering.

Derudover sammenlignes to farvemethoder: Ki67/AE1/AE3, som anvendes på SHS, og Ki67/p63/CK8/18, som normalt anvendes på Odense Universitetshospital (OUH), og hvordan disse IH metoder påvirker Ki67-PI.

Problemformulering

Hvordan påvirkes Ki67-proliferationsindekset af udvalgte tumorområdestørrelser ved digital billedanalyse af Ki67/AE1/AE3-farvning på duktale mammakarcinomer, og hvilken sammenlignelighed har resultaterne med patologens estimering? Hvordan påvirker Ki67/p63/CK8/18 metoden Ki67-proliferationsindekset, sammenlignet med Ki67/AE1/AE3 metoden?

Teori

I dette afsnit beskrives relevant teori for projektet. Først beskrives mamma histologi og cancerudvikling kort. Herefter gennemgås principperne for den histologiske præanalyse, IH analyse samt postanalyse i form af kvalitetssikring, scanning og DB. Derudover præsenteres også antistofferne og deres anvendelsesområde.

Mamma histologi

Mammavæv består af fedtvæv, bindevæv, og indlejret i disse er brystkirtlen. Brystkirtlen består af 10-20 lobi, hver bestående af flere lobuli; grupper af alveoler beklædt med kubisk eller cylindrisk epitel. Et lag af myoepiteliale celler findes mellem kirtlepitelet og basalmembranen. Lobus indeholder altså en kirtel, hvis udførselsgang munder ud på papilla mammae. Ved udmundingen er udførselsgangen beklædt med flerlaget pladeepitel, som gradvist overgår til 2-laget kubisk eller cylindrisk epitel. Et histologisk snit af hvilende mamma vil domineres af tæt, interlobulært bindevæv. Spredt i vævet ses øer af epitelialet væv, bestående af en gruppe gange samt evt. løse, rudimentære alveoler. Derudover ses større eller mindre forgreninger af det interlobulære udførselsgangssystem. (12)

Cancerudvikling

Kirtelvævet er hyppigt genstand for patologiske forandringer. Næsten alle tilfælde af mammacancer opstår i parenchymet i den terminale duktolobulære enhed, udgjort af en terminal ductus med tilhørende lobulus. Der skelnes mellem invasiv duktal karcinom og duktal carcinoma in situ (DCIS), hvor en non-invasiv tumor opstår i det duktale epitelvæv. Tumoren bliver først invasiv i det øjeblik, hvor de dysplastiske celler bryder basalmembranen, og spreder sig til omkringliggende væv. (12,13)

Præanalyse

Fiksering

Paraffinsnit præpareres først ved fiksering af vævet. Fiksering betydende en kemisk behandling, som har til formål at immobilisere og stabilisere vævets og cellernes struktur og antigener, samt bevare antigenitet og permeabilitet for immunreagenser. Fiksativer kan inddeles i to hovedgrupper: gelerende (cross-linking) og koagulerende (non-cross-linking). I diagnostisk rutinesammenhæng er det foretrukne gelerende fiksativ 4% neutral buffet formaldehyd (NBF) med den foretrukne fikseringstid på 24-48 timer. Gelerende fiksativer som NBF fikserer proteinerne i vævet, ved at danner tværbroer mellem aminosyreradikaler i peptidkæderne mellem proteiner. Dette bevirker, at der dannes et netværk af fastlåste proteiner, hvilket også

betegnes som at proteinerne "gelerer". Gelerende fiksativer ændrer ikke strukturen af proteinerne der dannes tværbroer mellem, modsat koagulerende fiksativer, som fikserer ved en irreversibel denaturering. Det vides at NBF i et vist omfang bidrager til maskeringen af antigene epitoper i paraffinsnit. Antigener såsom Ki67, der lader sig påvise umiddelbart i både kryosnit og cytologisk materiale selv efter 6-24 timers fiksering i NBF, lader sig ej påvise i paraffinsnit af væv fikseret den samme tid i NBF uden forudgående demaskering. Dette skyldes, at tværbroerne der dannes mellem aminosyreradikalerne, blokerer for områder af proteinerne der kan indeholde epitoper. (14,15)

Præparering/vævsfremføring

Vævsfremføring til paraffin udføres på en Vacuum Infiltration Processor. Processen består af dehydrering, klaring og infiltration af paraffin i vævet. Formålet med vævspræpareringen er at stabilisere vævet frem mod mikrotomeringen. Dehydreringen anvender ethanol i stigende koncentrationer, hvorved der opnås en ekstraktion af vandet i vævet. Dehydreringstiden er vigtig, da en for kort tid medfører, at vævet ikke dehydreres tilstrækkeligt og derfor skrumper og hærder i paraffinblokken. Efterfølgende udføres en klaring af vævet, som er nødvendig fordi ethanol ikke er blandbart med paraffin. Hovedkravet til klaringsmidlet er derfor, at det både skal være blandbart med dehydreringsmidlet og indstøbningsmidlet. Klaringsmidlerne isopropanol og JFC anvendes typisk til denne proces. Derefter følger paraffininfiltration af vævet, som stabiliserer det, og vævet indstøbes efterfølgende i paraffinblokke. (14,15)

Mikrotomering

Ved mikrotomering skæres vævet i paraffinblokken i tynde snit til objektglas. Blokken grovtrimmes ved 20-30 µm, hvorefter der fintrimmes ved 2 µm. De endelige paraffinsnit skæres 2 µm tykke, strækkes ud i varmt vandbad (ca. 45°C) og monteres på Dako FLEX IHC objektglas. Anvendelsen af forbehandlede objektglas nedsætter drastisk risikoen for at miste snit under farvningsproceduren. Efter montering tørres snittene kort på varmeplade, hvorved bindingen til glasset forstærkes, forud for den egentlige tørring, samtidig med at vævet udstrækkes. (14,15)

Analyse

Tørring, afparaffinering og rehydrering

Tørring af vævssnittene foretages efter montering, for at fjerne vand under vævssnittene, og derved sikre god adhæsion til objektglasset. Efter tørring bliver vævssnittene afparaffineret, som er fjernelse af det infiltrerede og omkringliggende paraffin. Almindeligvis sker dette med

forskellige medier, som f.eks. xylene, Estisol. Til sidst foretages en rehydrering af vævssnittene med faldende koncentrationer af ethanol og rindende vand som det sidste. (15)

IH farveapparatur udfører automatisk afparaffinering vha. kommercielle afparaffineringopløsninger. Ventana Benchmark ULTRA anvender EZ Prep, som er en opvaskemiddelopløsning. EZ Prep anvendes i kombination med varme og hvirvelstrømsblanding. Herved smeltes paraffinen af varmen, mens EZ Prep nedsætter overfladespændingen og hjælper med at frigøre det smeltede paraffin fra glas og væv. Hvirvelstrømsblandingen forhindrer at paraffinen bliver på glasset, ved effektivt at skylle det af. Dako Omnis anvender Clearify Clearing agent til en tofaset afparaffinering. (14–17)

Epitop demaskering

I formalinfikserede snit bliver antigene epitoper maskeret under fikseringen. Dette bliver de bl.a. pga. tværbindingerne mellem aminosyreradikaler i vævets proteiner og kompleks. Disse epitoper kan dog demaskeres forud for IH påvisning. De to primære teknikker til dette er proteolytisk og varmeinduceret forbehandling. Alle farvemethoderne i dette forsøg anvender varmeinduceret epitop demaskering, også kaldet HIER (Heat-Induced Epitope Retrieval). Princippet bag denne metode er at opvarme rehydrerede snit i en bufferopløsning der bidrager til demaskeringen. Mekanismen er ikke klarlagt, men opvarmningen menes at have forskellige virkninger; brydning af formalininducerede methylenbroer, fjernelse af kompleksbundne calciumioner, rehydrering af vævet for forbedret penetration og en vis denaturering. (14,15) EnVision FLEX High pH (EF), OptiView DAB IHC Detection Kit (OV) og ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit (UV) anvender alle (hydroxymethyl)aminomethan(TRIS)-baserede buffere med basisk pH, EF's buffer indeholder også EDTA der bidrager til at fjerne kompleksbundne calciumioner. (18,19)

Blokering af endogen aktivitet

Mange IH detektionssystemer benytter enzymerne peroxidase og alkalisk phosphatase som enzymlabels. Da disse enzymer forekommer endogent i humant væv, er det en fordel at hæmme aktiviteten af disse, for at undgå uønsket enzymaktivitet. Farvemethoderne der benytter peroxidase i detektionssystemerne er hhv.; Ki67 og p63 med OV på Ventana Benchmark ULTRA og AE1/AE3 med EF på Dako Omnis. (19,20) De komplette farveprotokoller fra apparaturet kan ses på bilag 1-3. Peroxidaseaktivitet kan i vekslende grad ses hos granulocytter, monocytter og makrofager, mens erythrocytter indeholder pseudoperoxidaseaktivitet, som giver samme udfordringer. Ved formalinfikseret væv er den reelle peroxidaseaktivitet elimineret, mens

pseudoperoxidaseaktivitet i erythrocytterne forbliver. Derfor behandles snittene ved disse metoder med peroxidase inhibitor, inden inkubation med primært antistof. (14,19,20) Ved den fysiske dobbeltfarvning p63/CK8/18 benyttes alkalisk phosphatase med UV på Ventana Benchmark ULTRA til visualiseringen af CK8/18. Alkalisk phosphatase aktivitet forekommer ligeledes endogent i visse humane celler. Denne aktivitet kan hæmmes ved at tilføje enzymhæmmende levamisol til kromogen/substratopløsningen, eller ved at opvarme snittet til 65°C, hvilket vil udlette enzymaktiviteten. Protokollen for p63/CK8/18 viser, at snittet indledningsvist inkuberes i 32 minutter ved 75°C. (21)

Blokering af uspecifik antistofadhæsion

I visse tilfælde hvor det primære antistof har lav affinitet, for epitopen der ønskes visualiseret, kan der forekomme uspecifik farvning. Dette sker fordi den lave affinitet betyder, at antistoffet kan binde sig uspecifikt til andre vævsproteiner, primært vha. elektrostatiske tiltrækning og hydrofobisk interaktion. Dette giver ultimativt baggrundsfarvning, der kan være problematisk for tolkningen af snittet. Dette kan dog imødekommes ved at behandle snittene med et "blocking protein". Dette protein har til formål at binde de vævsproteiner der ellers binder antistoffet. Ud over eventuel forbehandling, tilsættes ofte 1% Bovin Serum Albumin (BSA) til opløsningsmidlet for det primære antistof. (14)

Primært antistof

Det primære antistof anvendes til detektion af den ønskede epitop. Disse antistoffer produceres af dyreceller, typisk mus eller kanin, og kan være både monoklonale og polyklonale. Monoklonale antistoffer er produceret ud fra en enkelt celle, mens polyklonale antistoffer er produceret ud fra flere celler fra samme dyr. Monoklonale antistoffer retter sig mod en specifik epitop, hvorfor de generelt har større affinitet end de polyklonale. Polyklonale antistoffer kan til gengæld binde flere forskellige epitoper, dog med lavere affinitet. (14)

Det er essentielt for antigenisiteten, at snittet ikke udtørres under farveprocessen. Derfor dannes der ved de fleste metoder en hydrofob barriere, der skal sikre at reagenserne ikke løber af glasset under farvningen, samt forhindrer fordampning. Ventana Benchmark ULTRA anvender f.eks. "Liquid Coverslip" som hydrofob barriere. (14,22)

Fortyndingsvæsken til det primære antistof bidrager med flere kvaliteter end blot koncentrationsregulering. Saltindhold og pH skal være passende, i forhold til at hæmme uspecifik adhæsion til vævsproteiner, og samtidig give optimale forhold for antigen binding. Derudover

bør væsken indeholde et carrierprotein, der sørger for, at antistofopløsninger med lavt indhold af protein ikke adsorberer til objektglassets overflade, eller danner antistofpolymerer. Denne effekt kan opnås ved tilsætning af 1% BSA, som ligeledes fungerer som "blocking protein". (14)

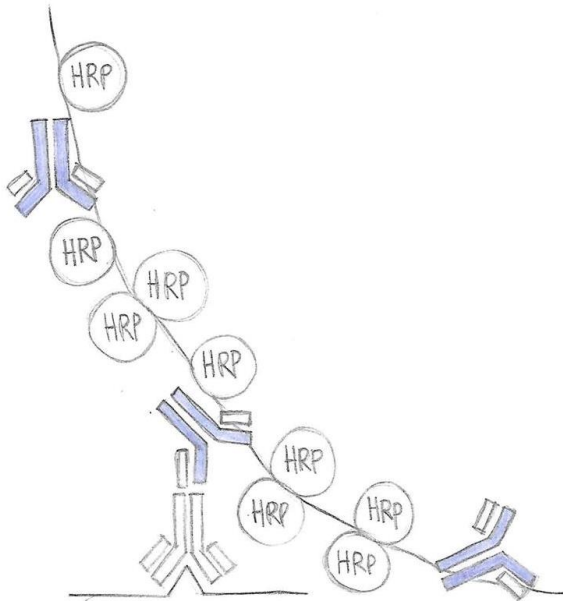
Skylleprocedure

Imellem farvetrin skylles snittene med skyllebuffer, for at fjerne overskydende reagenser og opretholde et stabilt hydrofilt miljø. EF, OV og UV benytter en TRIS-baseret saltvandsopløsning med detergent som skyllebuffer. (19,23) Tilsætningen af detergent bidrager til nedsat risiko for uspecifik antistofadhæsion, og øger permeabiliteten af vævet for reagenserne. (14)

Detektionssystem

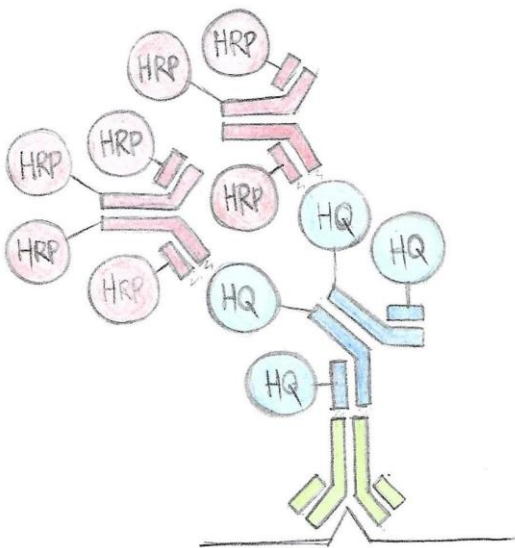
Detektionssystemerne for EF, OV og UV anvender alle indirekte teknikker i detektionssystemet. Princippet i de indirekte metoder bygger på anvendelsen af et umærket primært antistof, med signalforstærkning ved brug af mærkede sekundære og evt. tertiære antistoffer rettet mod immunglobuliner fra dyrearten, som det forudgående antistof er produceret af. Indirekte teknikker er mere sensitive end direkte teknikker, pga. signalamplifikation gennem de sekundære/tertiære reaktioner ud fra det primære antistof. Derudover er det også økonomisk sensibelt, da et mærket sekundært/tertiært antistof kan anvendes med mange primære antistoffer rettet mod forskellige antigener. (14)

EF anvender en indirekte polymerforstærkningsteknik ved navn EnVision, denne teknik er udviklet af Dako og bygger på polymerteknologi. I EnVision systemet inkuberes snittet, efter primært antistof, med en opløsning (EF HRP) indeholdende polymeren Dextran. Dextran er koblet med Horse Radish Peroxidase (HRP), samt sekundære gedeantistofmolekyler rettet mod kanin- og muse-immunglobuliner. Ved inkubation bindes det sekundære gedeantistof til det primære antistof, hvilket hæfter komplekset med dextran og peroxidmolekyler fast i områder med primært antistof. På figur 1 kan ses et eksempel, hvor et primært antistof er bundet til epitoper fra vævet. (14) Til dette primære antistof er bundet et af de sekundære antistoffer, der er tilkoblet et HRP-mærket dextranmolekyle. (14,19)



Figur 1 - EF's detektionssystems princip. HRP-mærket dextranmolekyle hvortil der er koblet sekundære gedeutistoffer, hvoraf en er bundet til et primært antistof, som er bundet til den ønskede antigenepitop.

OV benytter en særlig 3-lagsteknik til detektion af det primære antistof. Der inkuberes med en opløsning af sekundære gedeutistoffer (HQ Universal Linker) konjugeret med HQ-haptener, rettet mod primære kanin- og muse-antistoffer. Herefter inkuberes med en opløsning af tertiære museantistoffer konjugeret med HRP (HRP Multimer), som binder sig til HQ-haptenerne på det sekundære antistof. (19,24) En visuel repræsentation af dette detektionssystem kan ses på figur 2. (24)



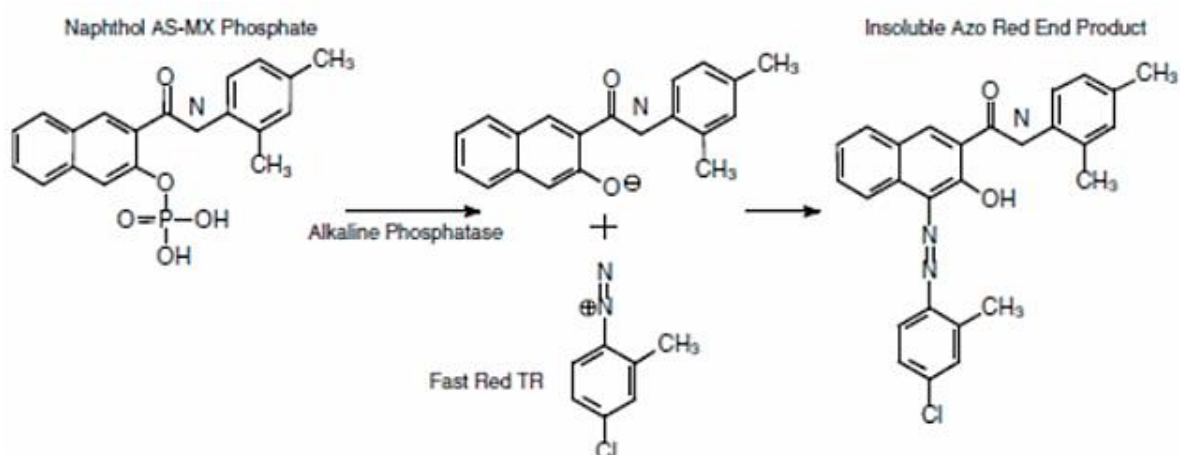
Figur 2 - OV detektionssystem. Det primære antistof (grøn) bindes til antigenet, det sekundære HQ-haptenmærkede antistof (blå) bindes til det primære. Det HRP-mærkede tertiære antistof (rød) bindes til HQ-haptener på det sekundære. Slutteligt visualiseres detektionen med DAB og H_2O_2 .

UV anvender en indirekte 2-lagsteknik, hvor snittet inkuberes med et sekundært antistof mærket med alkalisk phosphatase som enzymlabel (Universal AP Red Multimer). (21)

Visualisering

Efter detektionen skal reaktionen visualiseres. Alt efter hvilket visualiseringssystem de specifikke farvemetoder anvender, kan dette gøres på forskellige måder. EF og OV bruger HRP som enzymlabels på de hhv. sekundære og tertiære antistoffer. HRP er i sig selv farveløs, men kan visualiseres ved reaktion med brintperoxid (H_2O_2) som substrat og forskellige kromogener, EF og OV anvender begge 3,3'-diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) som kromogen. Ved visualiseringen inkuberes snittet med H_2O_2 og DAB, hvorved H_2O_2 vil blive reduceret af HRP, mens DAB fungerer som elektrondonor og derved bliver oxideret. DAB oxideres til et tungtopløseligt brunt farvet produkt, der udfælder i området ved reaktionen. Ved OV inkuberes der efterfølgende med 0,5% kobbersulfat, hvilket gør DAB-farvningen mere mørk og øger intensiteten heraf. (14,20)

UV anvender alkalisk phosphatase som enzymlabel på det sekundære antistof, hvorfor visualiseringen er anderledes for denne metode. Her inkuberes snittet med kromogenet Fast Red og en naphtholphosphatesterforbindelse som substrat. Alkalisk phosphatase katalyserer fraspaltning af fosfat fra naphtholphosphatesterforbindelsen, hvorefter naphthol kobles til Fast Red. Til reaktionen tilsættes også en TRIS-buffer med $MgCl_2$, da Mg^{2+} fungerer som aktivator for alkalisk phosphatases enzymatiske reaktion. Dette resulterer i et farvet produkt, som er tungtopløseligt i vandigt medie. (14) Reaktionen mellem kromogen og substrat er skitseret på figur 3. (21,25)



Figur 3 - Alkalisk phosphatase visualisering. Naphtholphosphatesterforbindelsen spaltes vha. Alkalisk phosphatase. Naphthol og Fast Red kobles sammen til det farvede produkt.

Kernefarvning

Kernefarvningen er sidste trin i IH farvningsprocessen, som giver et overblik over celler og vævsmorfologi i snittet, for både Ki67, AE1/AE3 og p63/CK8/18 farvningerne anvendes Aluminium Hæmatein (Al-Hæmatein) til dette formål. Al-Hæmatein er et positivt ladet metalkompleksfarvestof, som binder til negativt ladede phosphatradikaler i DNA og RNA. Farvningen efter denne reaktion er rødbrun, hvilket ændres ved at efterfølge med en såkaldt "blåning". Ved blåning inkuberes snittene med et reagens der øger pH-værdien i snittet, hvilket får Al-Hæmateinkomplekset til at skifte farve til blåviolet når snittet når ca. pH 7. (15)

Postanalyse

Intern kvalitetssikring

Den interne kvalitetssikring til IH farvninger i Patologisk afdeling SHS, foretages ved at have et kontrolsnit på alle objektglas sammen med patientvævet. Kontrolsnittet der medtages skal indeholde både positivt og negativt reagerende væv, for at undgå falsk positive og falsk negative reaktioner. De færdigfarvede væv mikroskoperes af bioanalytikere som sikrer at alle kontrolvæv reagerer korrekt. (14,26)

Ekstern kvalitetssikring

Den eksterne kvalitetssikring foretages ved at lave en IH farvning på prøvemateriale tilsendt af NordiQC. NordiQC sender vævssnit fra samme præparat til adskillige laboratorier i Danmark, som alle skal sende resultaterne og en beskrivelse af farvemethoden tilbage til dem. På denne måde kan laboratoriets egen kvalitetskontrol sammenlignes med andre laboratorier. NordiQC sammenligner alle resultaterne, og vurderer hvilken metode, som giver de mest korrekte resultater. Herved kan Patologisk afdeling korrigere deres protokoller, for at optimere IH farvningerne. (14,27)

Antistofferne og deres anvendelsesområde

I dette projekt anvendes primære IgG antistoffer til IH påvisning af markørantigener; Ki67, AE1/AE3, CK8/18 og p63. Til påvisning af Ki67 anvendes monoklonalt kaninantistof fra Ventana. Ki67-antigenet består af et nukleoprotein, som er specifikt for celledeling, da det kan påvises i samtlige stadier af celleproliferationscyklussen, men ikke er til stede i hvilefasen. Ki67 er en vigtig markør for tumorproliferation, hvor Ki67-PI anvendes til at beskrive vækstfraktionen af cellerne i tumor. Et højt Ki67-PI har vist sig i en meta-analyse af Azambuja et al. (28) at have sammenhæng med øget sandsynlighed for recidiv og nedsat overlevelse. IH reaktionen for Ki67 er lokaliseret i

tumorcellekernen. Farvningen er heterogen med det største antal Ki67-positive tumorcellekerner svarende til den invasive front af tumor. (8,14,29)

AE1/AE3 består af en cocktail af to monoklonale museantistoffer fremstillet af Dako, disse identificerer to forskellige epitoper hos epiteliale CK. CK er en samling af proteiner, der udgør en strukturel komponent i cytoplasma (intermediært filament), hos de celler hvori de findes. CK findes i alle epitelceller, mesotelceller, og i visse andre celletyper som f.eks. endotel i meget mindre omfang. AE1/AE3 påviser de fleste humane CK, som kan opdeles i to typer. AE1-antistof reagerer med en epitop der er fælles for de fleste CK af type A (CK 10, 13, 14, 15, 16 og 19), som udgøres af relativt sure CK. AE3-antistof reagerer med en fælles epitop for type B (CK 1-8), som består af relativt basiske CK. Klinisk anvendes påvisning af disse CK til at identificerer celler som værende af epitelial oprindelse. I denne sammenhæng betyder dette at skelne neoplastiske celler, stammende fra invasiv duktalt karcinom, fra normalt væv. (14,30)

Til påvisning af CK8/18 anvendes et monoklonalt kaninantistof fra Epitomics. Disse primære CK udtrykkes af simple epiteler, der primært består af sekretoriske epitelceller. Påvisning af disse CK anvendes derfor klinisk til identificering af celler, der stammer fra adenokarcinoma. (14,31)

Påvisning af p63 foretages med et monoklonalt museantistof fremstillet af Ventana. p63 er et nukleoprotein, som udgør en transkriptionsfaktor, samt fungerer som et stamcelleregulerende protein, der under embryogenesen er essentielt for udviklingen af de epiteler, som indeholder basalcellelag. p63 kan påvises i pladeepitel, samt basalceller i mamma, prostata, spyt- og svedkirtler. I kombination med påvisning af Ki67 og CK, anvendes p63 til at identificere basalceller i tumorområder, der kategoriseres som DCIS. (3,14,32,33)

Scanning

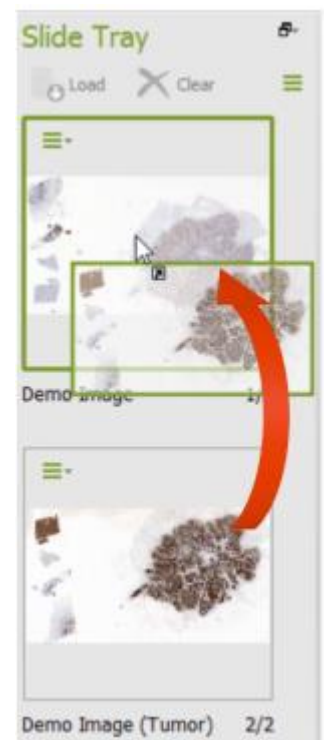
NanoZoomer 2.0 HT (C9600 series) er en objektglas scanner, med den tilhørende NDP.scan scanner control software til PC, begge udviklet af Hamamatsu. De samarbejder med VisioPharm Oncotopix® Scan, som gør det muligt at få de mest optimale billeder til brug i VisioPharms DB software.

Ved start af scanning indlæses stregkoderne, og der tages et sort og hvidt Macro oversigtsbillede, hvorfra der kan vælges det område, der skal scannes og fokuspunkterne placeres. Efter dette er valgt for alle billederne, starter scanningen. Hamamatsu Nanozoomer scannere anvender Time Delay Integration (TDI) "line scan". Dvs. at snittet scannes i lodrette

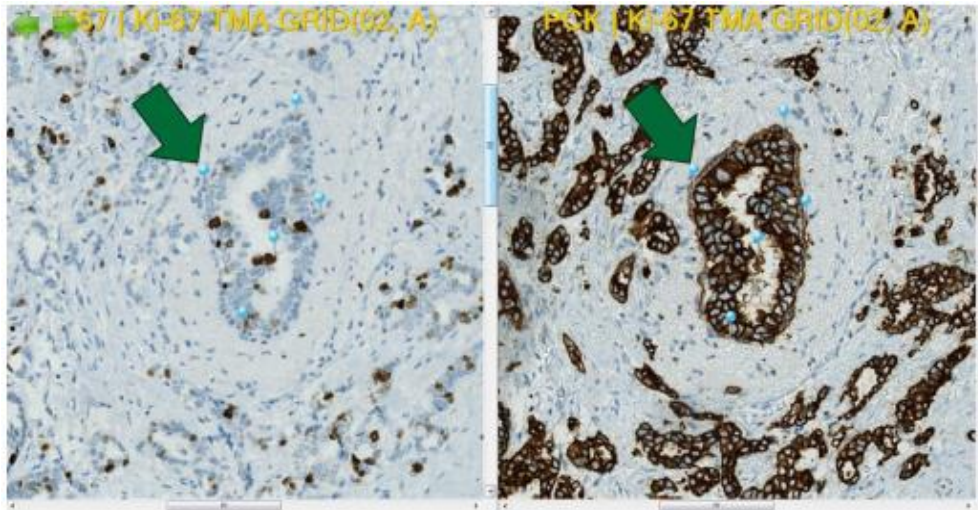
linjer i det valgte område, hvor TDI sensoren forstærker signalet ved hver linje. Snittet scannes i lodrette brudstykker, hvilket betyder at scanneren kun bevæger sig om én akse for hvert tile. De lodrette brudstykker af scanningen sammensættes til sidst til det færdige billede. Denne metode muliggør hurtigere scanninger i forhold til "tile scan", der foregår om to akser, hvorved sammensætningen af billederne er todimensionel, i stedet for endimensionel som ved "line scan". NanoZoomer scannere bruger et 3-chip TDI kamera som har røde, grønne og blå kanaler, og kan derved reproducere snittets farver i ét RGB (Red, Green, Blue) billede. De færdige billeder gemmes (NDPI format) i en valgt mappe på PC'en og kan åbnes i NDP.view, hvor billederne kan kontrolleres for eksempelvis skarpt fokus i tumorområderne, som skal bruges til DB i VisioPharm Oncotopix®. (34–36)

Digital Billedanalyse

VisioPharm tilbyder software, som både udfører virtuel dobbeltfarvning, samt DB. VisioPharms VirtualDoubleStaining™ er udviklet og valideret i samarbejde med NordiQC. Den virtuelle dobbeltfarvning udføres ved at aligne to seriesnit, farvet med hhv. tumormarkør og cancer biomarkør, dette foregår vha. modulet Tissuealign™. Ved alignment af seriesnit lægges billedet af snittet farvet med tumormarkør over det snit, som er farvet med den relevante biomarkør. Denne rækkefølge er vigtig, fordi det er billedet af farvningen med biomarkøren, den egentlige analyse bliver foretaget på. Et eksempel på, hvordan dette ser ud i programmet, kan ses på figur 4. (37) Herefter kan softwaren udføre en automatisk alignment af de to billeder. Ved utilstrækkelig alignment er det muligt at justere denne manuelt, ved at identificere strukturer som er genkendelige på begge snit. Disse strukturer kan markeres med pins på begge billeder, hvorudfra alignment kan justeres. Et eksempel på hvordan disse pins kan anvendes er vist på figur 5. (37)

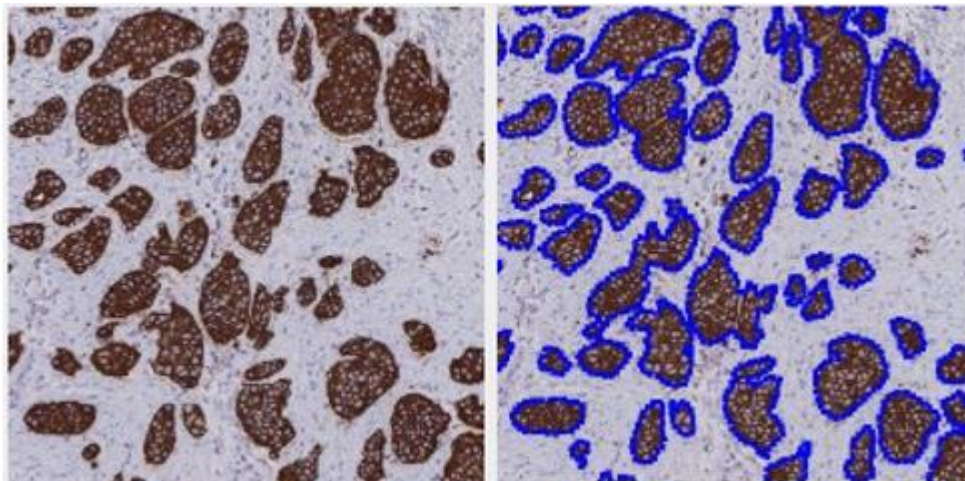


Figur 4 - Billedet af snit farvet med tumormarkør (AE1/AE3) trækkes ovenpå billedet af snit farvet med biomarkør (Ki67).



Figur 5 - Alignment med pins. Genkendelige strukturer markeres på begge billeder. Dette giver mulighed for at justere alignment manuelt.

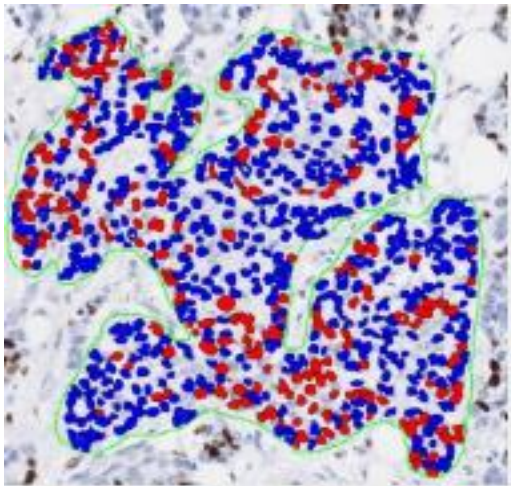
Efter fuldendt alignment skal ROI udvælges og markeres på billederne. Disse indtegnes manuelt på billederne, hvorefter de APPs der skal udføre den relevante DB vælges. For DB af virtuel dobbeltfarvning med Ki67 og AE1/AE3 anvendes '20002 - PCK VDS, Tumor Detection' og '90004 - Ki67 APP, Breast Cancer'. APP 20002 detekterer områder med tumorceller ud fra AE1/AE3 farvningen i de(t) udvalgte ROI og markerer disse områder, ligesom det kan ses på figur 6. (9)



Figur 6 - DAB farvede celler registreres som tumorområder. Disse områder markeres, og overlejres på Ki67 farvningen.

Disse områder bliver efterfølgende overlejret på farvningen med biomarkøren, i dette tilfælde Ki67. Herefter analyserer APP 90004 de overlejlrede områder. Denne APP segmenterer alle kerner i de overlejlrede tumorområder. Herefter registreres og klassificeres farvningen af hver enkelt celle. Celler farvet af DAB klassificeres som Ki67-positive, mens Hæmatoxylinfarvede celler klassificeres som Ki67-negative. Dette gøres ved først at opløse billedet i dets farvemæssige

bestanddele (RGB) for at afklare det og adskille DAB-farve fra hæmatoxylin-farve. Billedet inddeles i "unbiased counting frames", som er rammer hvori tiles bliver talt. Tælling i disse rammer inkluderer alle tiles, der ligger indenfor rammen og evt. berører nederste og venstre kant af rammen, men ekskluderer tiles der berører øverste og højre kant. Tællingen opsættes på denne måde, for at undgå dobbelttælling af tiles. Derefter opdeles billedet i "tiles" som består af flere pixels. Disse tiles er defineret ved en specifik størrelse, form og position i billedet. Hver tile tildeles en vægt ud fra RGB-sammensætningen, som anvendes til at klassificere tilen som positiv eller negativ. Det kvantitative output består af; totalt antal tumorceller, antal negative celler, antal positive celler og Ki67-PI. På figur 7 kan ses en visuel repræsentation af, hvordan softwaren opdeler cellerne i positive (røde) og negative (blå). (38,39)



Figur 7 - APPen registrerer DAB-farvede celler som positive, og disse markeres røde. Hæmatoxylin-farvede celler registreres som negative, og disse markeres blå.

Materiale og metode

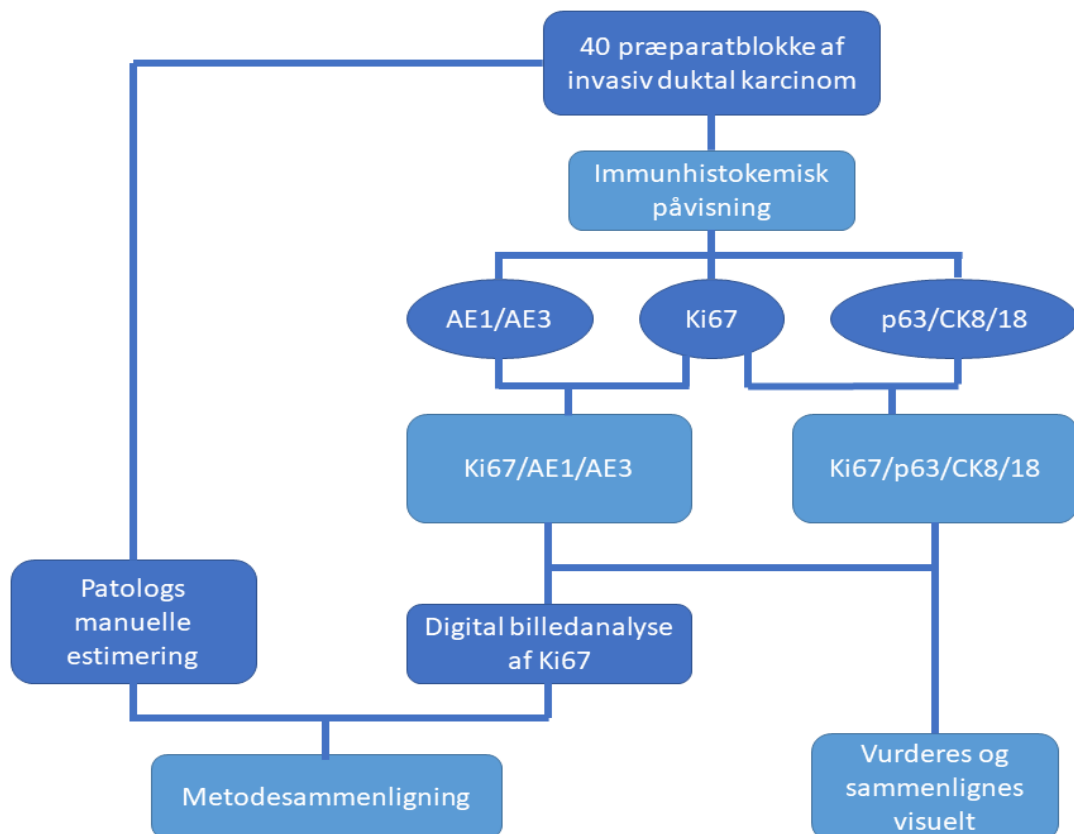
I følgende afsnit beskrives projektets design, opbygning og udførelse. De metodologiske og etiske overvejelser der er gjort forud for projektet gennemgås, og litteratursøgningsprocessen forklares. Derudover beskrives udvælgelsen af præparater til projektet og de anvendte materialer, apparatur og reagenser præsenteres.

Design

Projektet er en klinisk kvantitativ metodesammenligning af DB og manuel estimering af Ki67-PI på virtuel dobbeltfarvning Ki67/AE1/AE3 af histologiske præparater af invasive ductale mammaplacinomer. Derudover sammenlignes to forskellige farvemetoder; Ki67/AE1/AE3 og Ki67/p63/CK8/18. Begge metodesammenligninger foretages på det samme prøvemateriale.

Præparater af invasive ductale mammaplacinomer indhentes fra arkivet på Patologisk afdeling SHS, hvilket betyder at prøvematerialet på forhånd er indstøbt i paraffinblokke. Præparaterne mikrotomeres til snit af 2 µm tykkelse og placeres på Dako FLEX IHC Microscope Slides. Afparaffineret og IH analyse foretages på hhv. Dako Omnis og Ventana Benchmark ULTRA. Postanalytisk bliver de færdiganalyserede snit scannet på Hamamatsu NanoZoomer 2.0 HT, og slutteligt udføres DB af Ki67-PI på billeder fra Ki67/AE1/AE3 metoden med Visiopharm Oncotopix® software. Ki67-PI resultaterne fra hhv. patolog og DB sammenlignes statistisk ved hhv. Bland-Altman plot, Wilcoxon hypotesetest samt Cohens kappa.

Billeder af snit analyseret ved Ki67/p63/CK8/18 metoden gennemgår ikke DB med Visiopharm Oncotopix® software. Dette er ikke muligt, da APP til tumor detektion på fysisk dobbeltfarvning ikke er tilgængelig ved forsøgets udførelse. Disse billeder fortolkes derfor manuelt, tildeles en Ki67-PI værdi ud fra denne fortolkning, og sammenlignes kun visuelt uden statistiske test. På figur 8 kan ses et flowdiagram over forsøgets opbygning.



Figur 8 - Flowdiagram over forsøget. Efter IH farvningerne er forsøget delt op i metodesammenligningen mellem patologens manuelle estimering og DB af Ki67/AE1/AE3; og visuel vurdering og sammenligning af Ki67/AE1/AE3 og Ki67/AE1/AE3 og Ki67/p63/CK8/18.

Metodologiske overvejelser

Fastsættelse af cut-off grænse

For at gøre det muligt at lave statistiske beregninger på Ki67-PI data, der sammenligner de metoder som undersøges i dette projekt, vil det være fordelagtigt at fastsætte en cut-off grænse. Denne cut-off grænse vil bidrage til at skelne mellem høj og lav tumorproliferation ud fra Ki67-PI. DBCG retningslinjerne oplyser, at der ikke findes en fastlagt anerkendt cut-off grænse, men at forskellige opgørelser anvender forskellige værdier. Det oplyses dog, at værdierne der anvendes, typisk befinder sig i intervallet 10-20%. Patologisk afdelings instruks for mammapatologi på SHS definerer ligeledes ikke nogen værdi, til vurdering af niveauet af proliferation ud fra Ki67-PI. Ved forespørgsel til afdelingens patologer oplyses det, at de følger DBCG retningslinjerne, der siger 10-20%. Der anvendes på afdelingen således ikke en fast værdi til at skelne høj og lav proliferation, men Ki67-PI værdien indgår i en samlet vurdering med andre analyser. (3,8)

Ved St. Gallen International Breast Cancer Conference 2013 blev anvendelsen af IH påvisning af Ki67, til vurdering af tumorproliferation diskuteret, særligt med henblik på definition af subtypen

Luminal A. Størstedelen af ekspertpanelet stemte her for, at en grænse på $\geq 20\%$ Ki67-PI er indikativt for høj Ki67 status, hvilket vil sige høj proliferation. Ligeledes har flere studier, som undersøger anvendelsen af Ki67-PI, gjort brug af cut-off grænser på $\geq 20\%$. Cut-off grænsen for Ki67-PI fastsættes derfor som $\geq 20\%$ i dette projekt. (5,7,40–42)

Inklusions- og eksklusionskriterier

Der undersøges præparater af invasive ductale mammaplacinomer. Prøvemateriale med denne tumortype anvendes, fordi det er den hyppigste mammaplacercertype. Fremsøgning af en tilstrækkelig mængde relevant prøvemateriale, antages derfor at muliggøres bedst med præparater af denne tumortype. Det vælges at inkludere udelukkende én tumortype, da eventuel variation i sammenligneligheden af Ki67-PI på baggrund af forskel i tumortype ikke ønskes. (1)

Det er et kriterie, at prøvematerialet afdækker hele spektret af mulige Ki67-PI værdier. Dette er nødvendigt for at kunne påvise eventuelle variationer i sammenligneligheden mellem metoder, der måtte afhænge af størrelsen af Ki67-PI værdien. Derudover er det væsentligt, at en stor del af prøvematerialet har Ki67-PI værdier, der ligger omkring cut-off grænsen. Dette er fordi, værdier omkring denne grænse har den største kliniske relevans, hvor små forskelle i Ki67-PI på tværs af metoder kan udløse diagnostiske forskelle.

Projektet anvender forsøgsmateriale fra Patologisk afdeling SHS's arkiv. Arkiverede blokke mister dog med tiden deres antigenisitet, hvilket kan have betydning for sammenligneligheden af Ki67-PI resultater. Mængden af antigenisitets tab er biomarkørspecifik og bør betragtes som en vigtig variabel til undersøgelser, der bruger arkiverede væv. Estimeringen af Ki67-PI af patologen er foretaget ved analyse umiddelbart efter modtagelsen af vævet, hvorefter Ki67-PI ved DB baserer sig på analyse foretaget under projektperioden. Et tab af antigenisitet i prøvematerialet vil betyde, at Ki67-PI vil variere uafhængigt af metodeforskelle, og derved nedsætte værdien af en metodesammenligning. I et studie af Combs et al. (43) af mammaplacercancer kunne der påvises 10% signaltab af Ki67-ekspression på 4,5 år. Signifikansniveauet af den statistiske metode i studiet er 10%, og signaltabet skal derfor være $\geq 10\%$ før det kræves, at der skal korrigeres for tabet. I dette projekt anvendes prøvemateriale fra 2016, hvilket betyder at alderen af prøvematerialet ikke overstiger 4 år. Korrigering for tab af antigenisitet gør sig derfor ikke gældende i dette projekt.

Udvælgelse af undersøgelsesområder (ROI)

DB gør det muligt at undersøge større områder af tumor, end hvad der for en patolog er tidsmæssigt muligt. Det må derfor overvejes, hvilke ROI der vil være relevante at vurdere Ki67-PI ud fra.

DB på ROI af hele tumorområdet foretages, fordi dette giver det mest repræsentative billede af graden af tumorproliferation. Dette giver et Ki67-PI der beskriver hele tumorsnittet, i modsætning til hot-spots, der kun forholder sig til koncentrerede områder. Vurdering af hele tumorområdet anbefales derudover af den Internationale Ki67 Breast Cancer Working group. De påpeger derudover, at IH påvisningen af Ki67 fremstår heterogen ved mikroskopering. Her beskrives det, at intensiteten af den observerbare farvning stiger i områder af kanten af tumor, samt omkring hot-spots. (44)

ROI på 25% af tumorområdet foretages, fordi et studie af Stålhammar et. al. viser, at dette er den mest optimale størrelse i forhold til tidsforbrug uden betydelig kvalitetsnedsættelse. I studiet beskrives det, at en ROI på 25% af tumorområdet ved DB, havde et tidsforbrug på ca. 7 min. og opnåede en forklaringsgrad på 0,991 ved lineær sammenligning med en ROI på hele tumor. (5) I dette projekt udvælges de 25% af tumor, der udviser den største påvisning af Ki67. Dette gøres da sammenligningen af resultater foretages med Ki67-PI opnået ved patologens estimering, som er udført i hot-spots.

Hotspots af ca. 200-500 tumorceller med stærk Ki67 reaktion undersøges også, fordi dette er den ROI, der er mest tilsvarende metoden patologer anvender ved visuel vurdering. Ved visuel vurdering estimeres et proliferationsindeks semikvantitativt ud fra hotspots. I Patologi SHS's instrukser er det beskrevet, at Ki67-PI estimeres ved et semikvantitativt skøn, ligesom DBCG anbefaler. Dertil er det beskrevet, at der i hotspots skal tælles mellem 200-500 tumorceller. (3,8)

Seriesnit

Ved mikrotomering af snit til virtuel dobbeltfarvning, er det essentielt at være opmærksom på rækkefølgen hvorved snittene skæres. Afstanden mellem snittene har betydning for, hvorvidt snittene kan overlappes med hinanden ved DB. Et studie af Røge et al. (32) viser, at overensstemmelsen af Ki67-PI beregnet på to seriesnit er 91%, mens denne overensstemmelse falder til 82%, ved snit der ikke er taget i serie. Afstanden mellem snittene ved mikrotomering har altså betydning for beregning af Ki67-PI ved DB. Derfor mikrotomeres blokkene i dette

projekt med seriesnit, så både hhv. AE1/AE3 og p63/CK8/18 påvisning udføres på nabosnit til det snit der påvises Ki67 på.

Anonymisering

Præparaterne der anvendes i projektet anonymiseres ved tildeling af et fælles rekvisitionsnummer (19shs018838), som oprettes med fiktive persondata. Da prøvematerialet anonymiseres, skal projektet ikke anmeldes til National Videnskabsetisk Komité ifølge afsnit 3.1.1 af "Vejledning om brug af biologisk materiale i sundhedsvidenskabelige forskningsprojekter". (45) De yderligere etiske overvejelser i forbindelse med dette projekt omtales i afsnittet "Ethiske overvejelser".

Prøvemateriale

Der udvælges præparater af invasive ductale mammapcarinomer. Disse udvælges ud fra en liste af tilgængelige præparater, som er blevet fremsøgt af den kliniske vejleder på afdelingen Patologi SHS, og er blevet givet et rutinemæssigt uanvendt rekvisitionsnummer (19shs018838), som er fælles for alle præparater. Disse præparater er tidligere analyseret af en patolog for Ki67-PI, som derfor er kendt ved udvælgelsen. Der udvælges præparater med kendte værdier både under og over 20% Ki67-PI.

Mht. stikprøvestørrelse skal der ifølge retningslinjen for metodevalidering fra Sygehus Lillebælt bruges omkring 40-60 prøver til metodesammenligning. De udvalgte præparater til dette projekt tæller i alt 40. Til disse 40 præparater hører 15 præparater med Ki67-PI under 20%, 5 præparater med Ki67-PI på 20%, og 20 præparater med Ki67-PI over 20%. Denne udvælgelse foretages på baggrund af den tidligere beskrevne cut-off grænse, og med tilstræbelse på at dække et spektrum af Ki67-PI værdier både under, omkring og over denne grænse. (46)

Prøverne er derefter navngivet efter det fiktive rekvisitionsnummer og prøvenummer (som er 01 for alle præparater/blokke), bloknummer og glasnummer. Alle glas med glasnr. 1 vil være AE1/AE3 farvning, glasnr. 2 vil være Ki67, og glasnr. 9 vil være p63/CK8/18. For eksempel vil AE1/AE3 glasset til blok 1 hedde 19shs018838010101. I tabel 1 ses en samlet oversigt over de 40 udvalgte præparater.

Tabel 1 - Oversigt over udvalgte præparater, deres fælles rekvisition- og præparatnummer og individuelle bloknummer, med kendte Ki67-PI værdier, som er estimeret af patologen.

19shs01883801	Ki67-PI (%) (Patolog)
1	40
2	60
3	20
4	15
5	80
6	40
7	60
8	80
9	80
10	10
11	40
12	10
13	5
14	70
15	20
17	20
18	30
19	20
20	10
21	1
22	60
23	90
25	50
26	70
29	30
30	10
31	5
32	10
38	10
39	20
40	5
41	70
42	50
43	30
47	1
50	10
52	10
53	90
54	5
64	90

Materialer

Tabel 2 - Oversigt over anvendt apparatur, samt software til DB. For hvert apparatur er oplyst navnet på producenten og referencenummer for modellen.

Apparatur	Producent	Ref. Nr.
Microm HM 355 S-2 Automatic Microtome	Thermofischer Scientific	905120
Slædemikrotom - HM 450 Sliding Microtome	Thermofischer Scientific	910020
Varmeplade - Specimen Stage-stretching Table	Medax	17801
Benchmark ULTRA	Ventana	750-600
Omnis	Dako	GI100
Tissue-Tek Prisma-E2S	Sakura	Code 6133
Tissue-Tek Film-E2	Sakura	Code 4742
Nanozoomer 2.0 HT Oncotopix®	Hamamatsu	C9600-12
NDP.scan 2.5 (software)	Hamamatsu	
NDP.view 2 (software)	Hamamatsu	
2002 - PCK VDS, Tmor Detection APP	Visiopharm	
90004 - Ki-67 APP, Breast Cancer	Visiopharm	
Patologisystem	CGI	

Tabel 3 - Oversigt over anvendte materialer. For hvert materiale er der oplyst producent samt reference- og LOT nummer.

Materiale	Producent	Ref. Og LOT nr.
Feather Microtome blades S35 type	Feather	Ref: 02.075.00.000 LOT: 19040564P
Tissue-Tek Coverslipping Film	Sakura	Ref: 4770 LOT: 4680892
FLEX IHC Microscope Slides	Dako	Ref: K8020 LOT: 20181219

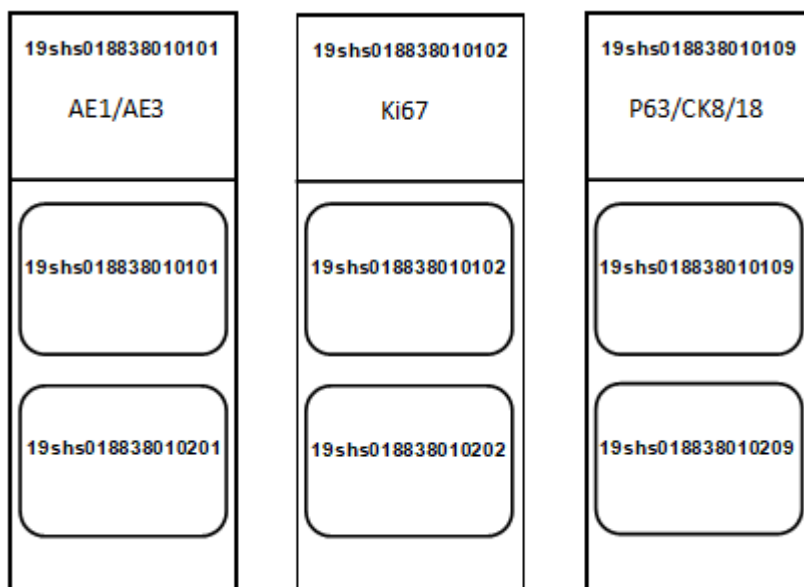
Tabel 4 - Oversigt over anvendte reagenser. For primære antistoffer er oplyst navnet på klonen samt producenten af denne klon. For de resterende reagenser er oplyst producent samt reference nummer.

Reagens		Producent	Klon
Primært antistof	Ki67	Ventana	Klon: 30-9
	Ck8/18	Epitomics	Klon: EP17/EP30
	P63	Ventana	Klon: 4A4
	AE1/AE3	Dako	Klon AE1/AE3
Reagens (Benchmark ULTRA)		Producent	Ref. Nr.
Bulkreagenser	EZ Prep	Ventana	950-102
	CC1	Ventana	950-224
	Reaction buffer	Ventana	950-300
OptiView DAB IHC Detection Kit	Peroxidase inhibitor	Ventana	760-700
	HQ UNIVERSAL LINKER	Ventana	760-700
	Horse Radish Peroxidase MULTIMER	Ventana	760-700
	H ₂ O ₂	Ventana	760-700
	DAB	Ventana	760-700
	Copper	Ventana	760-700
ultraView Universal Alkaline Phosphatase Detection Kit	UNIV MULT	Ventana	760-501
	Red Enhancer	Ventana	760-501
	Fast Red A	Ventana	760-501
	Fast Red B	Ventana	760-501
	Red Naphthol	Ventana	760-501
Øvrige	Hematoxylin II	Ventana	790-2208
	Bluing Reagent	Ventana	760-2037
Reagens (Dako Omnis)		Producent	Ref. nr.
Bulkreagenser	Wash buffer	Dako	GC807
	Clarify Clearing Reagent	Dako	GC810
EnVision™ FLEX, High pH (Dako Omnis)	EnVision FLEX Target Retrieval Solution, high pH (50x)	Dako	GV800/GV804 GV823/GV900
	Envision FLEX HRP	Dako	GV800 GV823 GV900
	EnVision FLEX Peroxidase Blocking Reagent	Dako	GV800 GV823 GV900
	EnVision FLEX DAB+ Chromogen	Dako	GV800 GV823 GV825
	EnVision FLEX Substrate Buffer	Dako	GV800 GV823 GV825 GV900 GV925
	EnVision FLEX+ Rabbit Linker	Dako	GV809
Øvrige	Hematoxylin	Dako	GC808

Dataindsamling

Mikrotomi

Der mikrotomeres 3 seriesnit på 2 μm , fra hver af de 40 blokke på slædemikrotomet ThermoFisher Scientific HM 450 Sliding Microtome. Snittene overføres fra mikrotom til vandbad, inden de placeres på objektglas (Dako FLEX IHC microscope slides). Efter mikrotomering placeres objektglassene på varmeplade ved 50°C, for at styrke paraffinsnittenes adhæsion til objektglasset. Da der til projektet er valgt at placere 2 snit på hvert glas, opsættes et system til identifikation af snittene, da objektglassets mærkat kun kan indeholde identifikation på ét snit. Hvert sæt af 3 objektglas påsættes snit til hhv. AE1/AE3, Ki67, og p63/CK8/18 påvisning fra to blokke. For systemets brugbarhed er det nødvendigt, at det øverste snit på objektglasset, svarer til glassets mærkat. På figur 9 kan ses hvordan dette ser ud for snit fra blok 1 og 2, som er placeret på ét sæt objektglas.



Figur 9 - Et sæt af 3 objektglas påsættes snit til de 3 IH analyser AE1/AE3, Ki67 og p63/CK8/18. Første snit fra hver blok placeres på glas 1 (AE1/AE3), andet snit på glas 2 (Ki67) og tredje snit på glas 3 (p63/CK8/18). Mærkatet indeholder information omkring det øverste snit på glasset.

Denne metode bruges til alle 40 blokke, således at der fremstilles 20 "sæt" glas. På tabel 6 kan det ses hvilke snit der placeres på samme objektglas, samt hvilket snits mærkat objektglasset er mærket med.

Tabel 6 - Oversigt over snittenes placering på objektglas. Venstre kolonne viser de udvalgte blokke, som der skæres 3 seriesnit af hver fra. De efterfølgende kolonner viser, hvilke snit der sættes på samme objektglas, samt hvilket mærkat glasset kan identificeres ved.

19shs01883801	AE1/AE3	Ki67	p63/CK8/18
1	19shs018838010101	19shs018838010102	19shs018838010109
2			
3	19shs018838010301	19shs018838010302	19shs018838010309
4			
5	19shs018838010501	19shs018838010502	19shs018838010509
6			
7	19shs018838010701	19shs018838010702	19shs018838010709
8			
9	19shs018838010901	19shs018838010902	19shs018838010909
10			
11	19shs018838011101	19shs018838011102	19shs018838011109
12			
13	19shs018838011301	19shs018838011302	19shs018838011309
14			
15	19shs018838011501	19shs018838011502	19shs018838011509
17			
18	19shs018838011801	19shs018838011802	19shs018838011809
19			
20	19shs018838012001	19shs018838012002	19shs018838012009
21			
22	19shs018838012201	19shs018838012202	19shs018838012209
23			
25	19shs018838012501	19shs018838012502	19shs018838012509
26			
29	19shs018838012901	19shs018838012902	19shs018838012909
30			
31	19shs018838013101	19shs018838013102	19shs018838013109
32			
38	19shs018838013801	19shs018838013802	19shs018838013809
39			
40	19shs018838014001	19shs018838014002	19shs018838014009
41			
42	19shs018838014201	19shs018838014202	19shs018838014209
43			
47	19shs018838014701	19shs018838014702	19shs018838014709
50			
52	19shs018838015201	19shs018838015202	19shs018838015209
53			
54	19shs018838015401	19shs018838015402	19shs018838015409
64			

Snittene fra samme blok placeres med samme orientering på de tre glas. Dette simplificerer "alignment" ved den virtuelle dobbeltfarvning, da snittene så kan tilpasses overfor hinanden,

uden at skulle vendes eller drejes digitalt. Objektglassene gennemgår IH analyse med mærkatet, som kan ses på tabel 6. Mærkaterne har henholdsvis QR- og strekkoder så Ventana Benchmark ULTRA kan registrere protokollerne for Ki67 og p63/CK8/18, og Dako Omnis kan registrere AE1/AE3 protokollen. De glas der analyseres på Ventana Benchmark ULTRA tildeles mærkater, hvorpå film sættes for at reagenset fordeles korrekt.

Udover snit fra prøvematerialet forberedes også kontroller, som skal følge hver kørsel på hvert apparatur. Der fremstilles ét kontrolsnit til hver kørsel på Ventana Benchmark ULTRA, det vil sige én Ki67 kontrol samt én p63/CK8/18 kontrol. Til AE1/AE3 på Dako Omnis fremstilles fem kontroller. Kontrollerne mikrotomeres fra kontrolblokken ELPT, der også anvendes i rutinen. Kontrolsnittene skæres på rotationsmikrotom (Microm HM 355 S-2 Automatic Microtome) med vandbad, med en snittykkelse på 2 µm ligesom selve præparatsnittene, og placeres på Dako FLEX IHC microscope slides. Efter mikrotomering placeres kontrolsnittene ligeledes på varmeplade ved 50°C.

Immunhistokemisk analyse

Når alle blokke er mikrotomeret, påbegyndes IH analysearbejdet. Glassene med snit, der analyseres for AE1/AE3, sættes i varmeskab i 30 minutter, inden analysen påbegyndes. Alle glas, der analyseres for Ki67 samt p63/CK8/18, loades på Ventana Benchmark ULTRA, mens glas til AE1/AE3 analyse loades på Dako Omnis. Efter endt analyse deloades alle objektglas til kuvetter, som skylles i et sæbevandskar med rindende vand, for at fjerne overskydende olie. Efterfølgende loades glassene på Sakura Tissue-Tek Prisma til dehydrering, og dækglas (film) monteres på Sakura Tissue-Tek Film.

Scanning

Objektglassene scannes derefter på Hamamatsu NanoZoomer 2.0 HT med programmet NDP Scan 2.0. I første batch scannes det øverste snit på hvert objektglas, ved at markere det manuelt, da dette tilhører mærkatet som objektglasset er blevet farvet med. Derefter påsættes mærkaterne der tilhører det nederste væv, dvs. mærkater fra blok 2, blok 4, blok 6, osv. Et eksempel for udskiftningen af mærkater kan ses i tabel 7.

Tabel 7 - Mærkatet på objektglasset udskiftes, så identifikation for det nederste snit på glasset kan indhentes af scanneren. Her ses udskiftningen af mærkat for glas med snit fra hhv. blok 1 og 2.

19shs01883801	AE1/AE3	Ki67	p63/CK8/18
1	19shs018838010101	19shs018838010102	19shs018838010109
2	↓	↓	↓
	19shs018838010201	19shs018838010202	19shs018838010209

Objektglassene scannes herefter i andet batch, hvor det nederste snit manuelt vælges. For at have en kopi af det indscannede væv til hvert af de 3 undersøgelsesområder, kopieres indscanningen af Ki67, så der er 3 billeder af den samme scanning. Billedfilerne kopieres og omdøbes til hhv. glas 4 og glas 6, som er blevet oprettet som Ki67-glas i CGI patologisystem. Alle billederne flyttes til "Transfer"-mappen, og derfra overføres billederne til CGI patologisystem.

Omkørsel

I CGI patologisystem åbnes det fiktive rekvisitionsnummer i funktionen Oversigt/Klarmeld.

Herefter vælges funktionen billeder, hvor en oversigt over alle overførte billeder på rekvisitionsnummeret kan ses. Fra oversigten grovsorteres billederne for artefakter, der vurderes at have betydning for, hvorvidt den virtuelle dobbeltfarvning samt digitale billedeanalyse kan udføres. Ved fejl på bare ét billede fra en gældende blok, vil snit til alle farvninger skulle reanalyseres, da det er nødvendigt med seriesnit for optimal digital billedeanalyse. Denne gennemgang blev udført to gange; første gang frasorteres 6 blokke; 19, 23, 42, 53, 54 og 64, anden gang frasorteres 3 blokke; 06, 14 og 26. Disse blokke findes frem til reanalysering, hvor alle ovenstående trin gentages for disse blokke. Dog med den variation, at der ved reanalysering bliver mikrotomeret på rotationsmikrotom (Microm HM 355 S-2 Automatic Microtome), og ikke ved slædemikrotom som i første omgang.

Digital billedanalyse

Fra CGI patologisystem åbnes alle Ki67 og AE1/AE3 billederne til analysering i VisioPharm Oncotopix® software. Her lægges AE1/AE3 billedet ovenpå de tre Ki67 billeder fra hver blok. Billederne alignes automatisk og billederne gennemgås, for at kontrollere korrekt alignment. Ved behov justeres alignment manuelt ved påsætning af pins i genkendelige områder. Herefter vælges ROI, 3 områder for hver virtuel dobbeltfarvning med AE1/AE3. For at bibeholde struktur i fremgangsmåden analyseres Ki67-billeder med samme nummer ved den samme ROI. Billeder nummereret som nr. 2 analyseres ved ROI på 100% tumor, nr. 4 ved ROI 25% og nr. 6 ved ROI hotspot. Eksempel for Ki67 billeder fra blok 1 kan ses i tabel 8.

Tabel 8 - Fordeling af ROI på Ki67 billederne, nummeret hhv. 2, 4 og 6.

19shs0188380101	19shs018838010102	19shs018838010104	19shs018838010106
ROI	100% tumor	25% tumor	Hotspot

ROI markeres for hver analyse med frihåndstegning. Farvemarkeringer fra udskæring samt skygger fra scanning og andre urenheder, der kan have en effekt på analysering udelukkes ved valg af områderne. Ved udvælgelse af hotspots forstørres billedet til x10 obj. ved hvert billede, for at standardisere denne proces mest muligt. Herefter vælges Analysis Protocol Packages (APPs); først vælges APP for tumormarkør (20002), derefter vælges Ki67 APP (90004). Ved afsluttet analyse noteres for hver virtuelle dobbeltfarvning; antal talte tumorceller, antal Ki67 positive celler og Ki67-PI.

Manuel vurdering

Ki67-PI ud fra dobbeltfarvning med p63/CK8/18 metoden vurderes ved manuel estimering i hotspots, som patologerne rutinemæssigt anvender. Denne metode anvendes, da APP til DB af p63/CK8/18 påvisning ikke er tilgængelig ved forsøgets udførelse. Snittene ønskes dog stadig vurderet og sammenlignes, derfor vurderes et nedsat antal billeder manuelt. For at kunne sammenligne farvningerne visuelt, estimeres Ki67 ud fra det samme område identificeret ved både AE1/AE3 og p63/CK8/18. I alt udvælges 11 blokke, som kan ses i tabel 9. Disse blokke er udvalgt på kriterierne tilsvarende dem for hele prøvemængde. Der inkluderes 5 præparater med kendte Ki67-PI på 20%, mens resten forsøges at dække hele spektret af mulige Ki67-PI værdier, disse går fra 5% til 80%. Denne vurdering foretages i NDP.view 2. Alle tre billeder sættes op overfor hinanden, områder med høj proliferation identificeres ved Ki67 påvisning, og tumorområder identificeres ud fra hhv. AE1/AE3 og CK8/18 påvisning. Tumorområder hvor der påvises p63 (DCIS) udelukkes fra vurderingen, da det kun er relevant at vurdere invasiv tumor. Hotspots udvælges ved forstørrelse x10 obj., og der estimeres en Ki67-PI værdi.

Tabel 9 - Oversigt over udvalgte blokke til manuel estimering af Ki67-PI.

19shs01883801	Ki67-PI (%) (Patolog)
1	40
2	60
3	20
6	40
7	60
8	80
13	5
15	20
17	20
19	20
39	20

Kvalitetssikring

For at kvalitetssikre IH påvisningen anvendes interne kontroller. Der bruges vævssnit fra multikontrol blokken ELPT (esophagus, lever, pancreas, tonsil) som kontrolsnit. Kontrolsnittet indeholder positive og negative kontroller for både AE1/AE3, p63/CK8/18, og Ki67 IH påvisning. ELPT medtages til samtlige farvninger for at udelukke falsk positive og falsk negative reaktioner.

Relevante kontrolvæv for primære antistoffer er beskrevet i afdelingens vejledning for primære antistoffer. Ud fra denne anvendes esophagus samt evt. lever og tonsil som positiv kontrol til AE1/AE3, til Ki67 anvendes tonsil som positiv og negativ kontrol, til p63 anvendes tonsil som positiv kontrol, og til CK8/18 anvendes lever samt evt. esophagus og tonsil som positiv kontrol.
(52)

Til AE1/AE3 fremstilles 5 kontrolsnit, som hver skal følge 4 AE1/AE3 glas. Dette er nødvendigt fordi Dako Omnis udfører farvninger på racks af 5 glas, hvilket betyder, at der skal være 4 præparatglas samt én kontrol i hvert rack, for at have en kontrol til at følge hvert rack. Til både Ki67 og p63/CK8/18 farvningerne fremstilles kun én enkelt kontrol. Dette gøres fordi disse farvninger alle udføres af én gang på Ventana Benchmark ULTRA, hvorved der kun kræves et enkelt kontrolglas til at følge hver kørsel.

Kontrolsnittet sættes altså på et enkelt glas der følger hver kørsel, i stedet for at have et kontrolsnit på hvert glas, som ellers er den rutinemæssige og mere korrekte metode. Dette er hovedsageligt af årsager såsom sparsommelighed mht. glas og tid til udførelse af projektet. Derudover indeholder hvert snit i sig selv en indbygget kontrol, da der forventes positiv reaktion i vævet for alle IH analyser.

Kontrolvævet vurderes ud fra de forventede reaktioner beskrevet i afdelingens vejledning for primære antistoffer. Derudover krydstjekkes med forventede reaktioner fra NordiQCs hjemmeside. Skulle de reagere inkorrekt vil det give anledning til renanalyse af de tilhørende prøver. (26,52–54)

Databehandling

Ki67-PI opnået ved DB af snit farvet ved påvisning af Ki67 og AE1/AE3 ved forskellige ROI, sammenlignes alle med det kendte resultat fra patologen som er opgivet ved udlevering af prøvematerialet. Ki67-PI værdierne undersøges først for normalfordeling med histogrammer. Data viser siger ikke at være normalfordelt, hvorfor der kun kan arbejdes med deskriptiv samt nonparametrisk konkluderende statistik. Den deskriptive statistik består af udregning af median, samt Bland-Altman plots til sammenligning af Ki67-PI ved DB med patologens estimering. Der anvendes også statistiske test til sammenligningen i form af Wilcoxon hypotesetest samt Cohens kappa. Beregningerne foretages i Microsoft 365 Excel.

Metodesammenligning af AE1/AE3 og p63/CK8/18 foretages vha. deskriptiv statistik på de estimerede Ki67-PI værdier. Ud fra disse værdier laves et Bland-Altman plot til visuel sammenligning af metoderne. Derudover inddrages billedeksempler, hvorudfra der kan diskuteres forskelle, som muligvis kan have betydning for Ki67-PI ved yderligere undersøgelser.

Litteratursøgning

Litteratursøgning tager først udgangspunkt i en bred søgning efter nøgleord fra projektets problemformulering. Nøgleord såsom Ki67, DB, makkarcinom etc. Informationskilder inkluderer databaser som PubMed, søgemaskiner som Google og diverse hjemmesider. Der vælges ud fra relevante søgeord, synonymer, og kontrollerede emneord mht. videnskabelige artikler, f.eks. MeSH termer såsom "Image Processing, Computer-Assisted". Kædesøgning tager udgangspunkt i en udleveret artikel; "Proliferation assessment in breast carcinomas using digital image analysis based on virtual Ki67/cytokeratin double staining", og nøgleord identificeres derudfra. Systematiseringen af disse nøgleord foretages som en bloksøgning med udgangspunkt i PICO modellen, som er vedlagt i bilag 4.

Anvendelsen af MeSH termerne "Breast Neoplasms"[Mesh] AND "Image Processing, Computer-Assisted"[Mesh] AND "Cell Proliferation"[Mesh] resulterer i alt i 72 artikler. 6 af de 72 artikler udvælges herefter på baggrund af de mest relevante overskrifter, og derefter de mest relevante abstracts. Der findes 8 yderligere artikler ud fra kædesøgning på de 6 udvalgte.

Etiske overvejelser

Patienter har ret til selvbestemmelse over biologisk materiale jævnfør sundhedsloven (§29 stk. 1, §32). Da der kun gøres brug af sundhedsdata til kvalitetsudvikling, som anonymiseres, tillader komitéloven imidlertid brug af biologisk materiale (§14 stk. 3). Både fortrolighed og privatliv sikres ved patientens anonymitet. Projektet udgør et kvalitetsudviklingsprojekt, og kræves derfor ikke anmeldt til National Videnskabetisk Komité. Der bruges endvidere kun anonymt biologisk materiale, hvilket også frafalder relevansen for anmeldelse til National Videnskabetisk Komité. (55–57)

Udover at være anonymt, udføres projektet på allerede diagnosticerede prøver. Skulle projektets resultater føre til nogen uoverensstemmelse med den allerede stillede diagnose, må patologen ses som ekspert, og dennes estimering anses for værende korrekt. Patologens estimering kan dog ej heller være uanfægtelig, da selv patologer kan tage fejl og et argument fra autoritet (*argumentum ab auctoritate*) kan være en logisk fejlslutning. Det er dog kendt inden for f.eks. lov og ret at "*Argumentum ab auctoritate fortissimum est in lege*", hvilket betyder at et argument fra autoritet er stærkest i lov. (58)

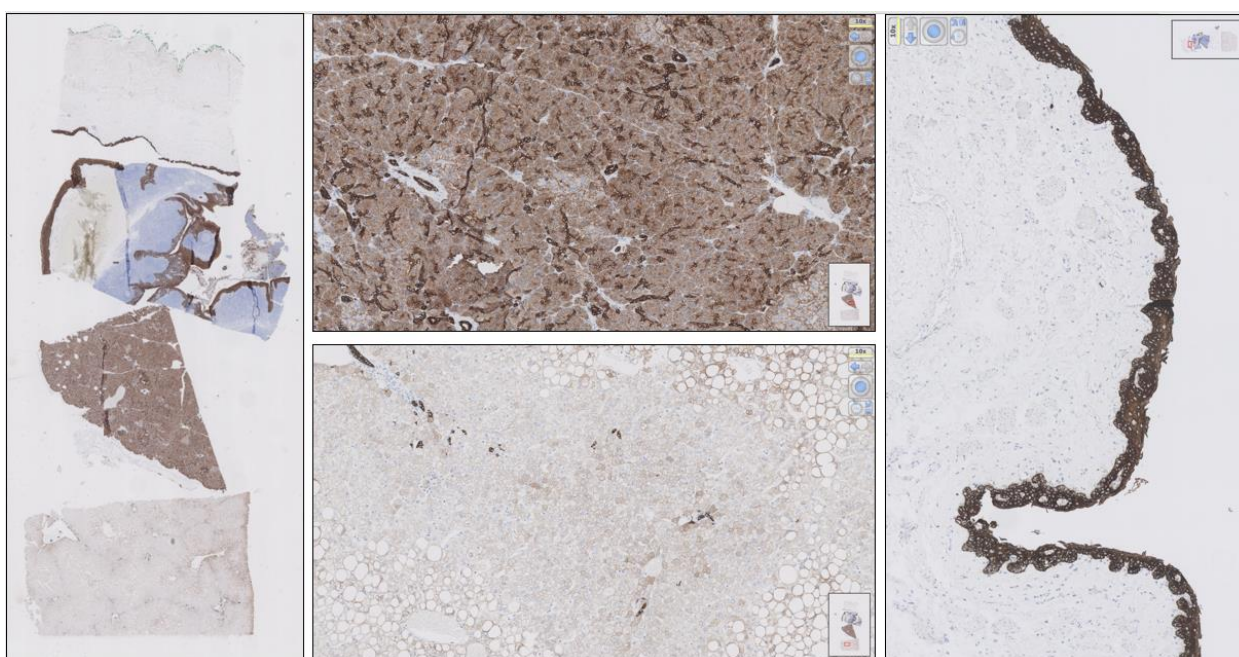
Skulle en sådan uoverensstemmelse alligevel hænde, må der stadig konfereres med mere erfarne fagfolk. En mulig forglemmelse fra patologens side kan tænkes måske at burde føre til en renanalyse, men at ændre den allerede stillede diagnose vil vanskeliggøres af anonymiseringen af patientmaterialet, hvorfor projektet ingen betydning vil have for patienten. Et etisk dilemma kan altså opstå, da softwaren bør være mere objektiv end en menneskelig observatør, men softwaren må anses som værende i nogen grad mangelfuld, da APP'en ej anvendes fast i rutinemæssig sammenhæng.

Resultater

I dette afsnit præsenteres projektets resultater. Eksempler på én kvalitetskontrol for hver IH analyse gennemgås. Ki67-PI værdier, relevant deskriptiv og konkluderende statistik samt billedeksempler fra DB præsenteres. Herefter fremvises vurderingsresultater, deskriptiv statistik samt billedeksempler fra den manuelle vurdering.

Kvalitetskontroller

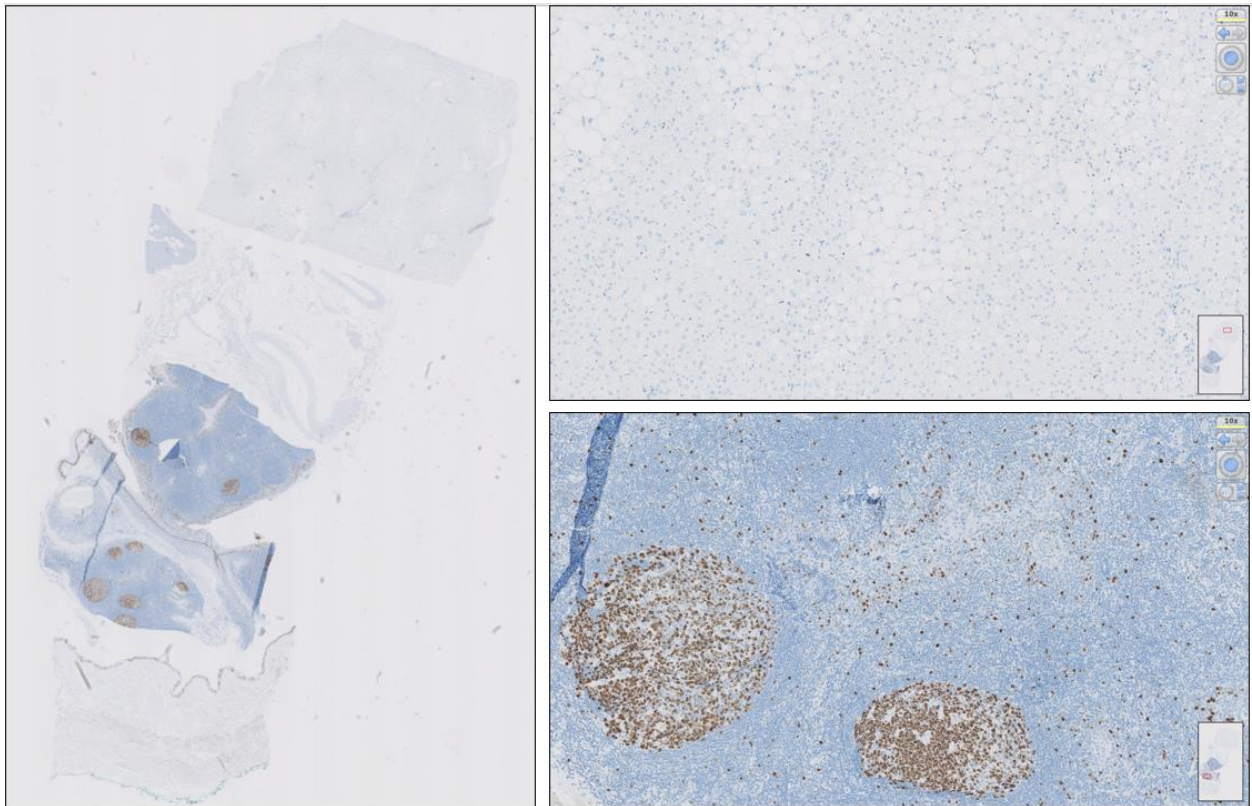
De forskellige kontrolsnit viser for hver IH analyse overensstemmende reaktionsmønstre. Derfor medtages kun ét eksempel på en kontrol for hver IH analyse, da denne er repræsentativ for alle kontrollerne.



Figur 10 - Eksempel på AE1/AE3 kontrol. Til venstre ses hele ELPT-snittet, øverst et forstørret billede af pancreas (10x obj.), nederst et forstørret billede af lever (10x obj.) og til højre ses et forstørret billede af esophagus (10x obj.).

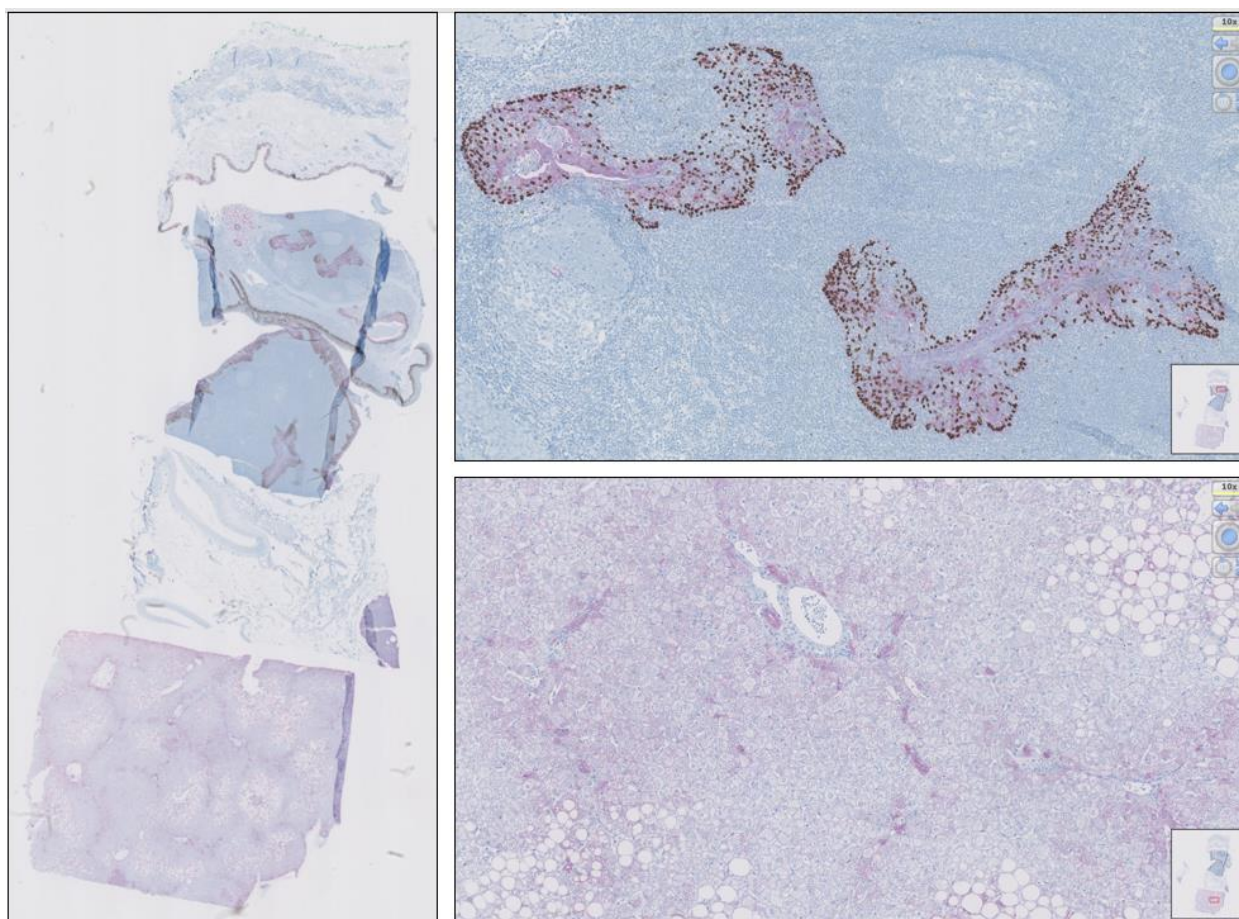
På figur 10 ses et eksempel på et kontrolsnit, der har fulgt snittene i IH AE1/AE3 analyse. Udover selve ELPT-snittet, ses på figuren forstørrede (10x obj.) eksempler fra pancreas, lever og esophagus vævet. Esophagus er den primære positive kontrol, og her ses tydelig positiv AE1/AE3 reaktion i det flerlagede pladeepitel, visualiseret ved den brune DAB-farvning. Pancreas og lever tjener som supplerende positive kontroller. I pancreas ses overordnet en meget kraftig DAB-farvning, som følge af den positive reaktion. NordiQC oplyser en forventet positiv reaktion, der kommer til udtryk ved en svag til moderat farvning af cylinderepitelet i udførselsgangene, primært relateret membranen. I levervævet ses en svag positiv reaktion i hele vævet, med en

kraftigere reaktion i galdegangenes epitel. Ifølge NordiQC udtrykker alle hepatocytter CK i lav grad. (26)



Figur 11 - Eksempel på Ki67 kontrol. Til venstre ses hele ELPT-snittet, øverst et forstørret billede af lever (10x obj.) og nederst et forstørret billede af tonsil (10x obj.).

På figur 11 ses et eksempel på et kontrolsnit, der har fulgt snittene i IH Ki67 analyse. Eksemplet indeholder et billede af hele ELPT-snittet, samt forstørrede (10x obj.) billeder af lever og tonsil. I tonsil ses en moderat positiv reaktion i B-lymfocytterne, koncentreret i kimcentrene, men ligeledes også i de spredte B-lymfocytter, mens resten af vævet fremstår uden reaktion. Ifølge NordiQC forventes en moderat til stærk farvning af B-lymfocytter i kimcentrene, mens der forventes en svag til moderat farvning af de spredte B-lymfocytter. Levervævet ses på billedet uden reaktion. I levervævet forventes det, at <1% af hepatocytter bør være positive. (53)



Figur 12 - Eksempel på p63/CK8/18 kontrol. Til venstre ses hele ELPT snittet, øverst et forstørret billede af tonsil (10x obj.) og nederst et forstørret billede af lever (10x obj.).

På figur 12 ses et eksempel på et kontrolsnit, der har fulgt snittene i IH analyse p63/CK8/18. De positive reaktioner i vævet er repræsenteret ved hhv. den røde Fast Red-farvning for CK8/18 og den brune DAB-farvning for p63. Til venstre ses hele ELPT snittet, mens der til højre er forstørrede (10x obj.) eksempler af tonsil og lever. I tonsil ses en moderat til kraftig positiv p63 reaktion i spredte lymfocytter, mens resten af vævet ikke udviser reaktion for p63. NordiQC oplyser for p63 en forventet svag til moderat nuklear farvning i spredte lymfocytter. I levervævet ses en svag positiv reaktion for CK8/18 i hele vævet, med en forstærket reaktion omkring galdegangene. (26,54)

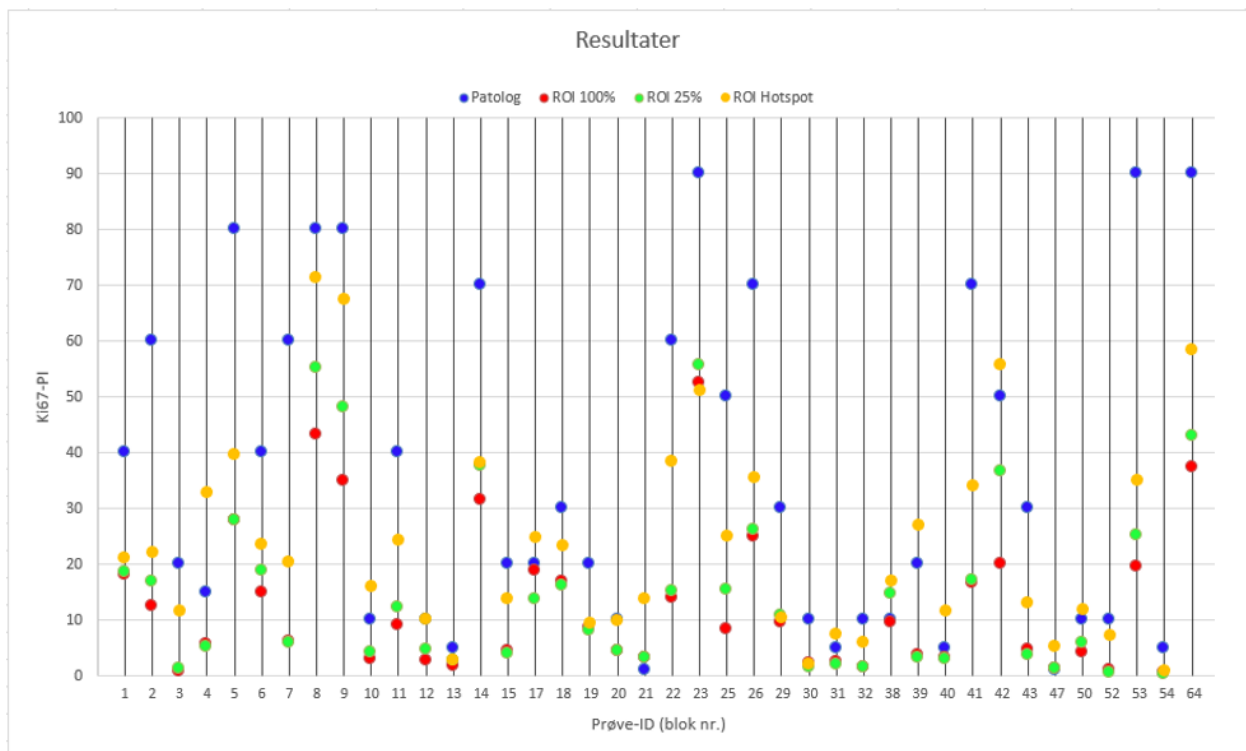
Digital Billedanalyse

Herunder præsenteres data til metodesammenligning af DB ved ROI 100%, 25% og hotspot med patologens manuelle estimering.

Tabel 10 - Tabel over Ki67-PI fra patologens manuelle estimering og fra DB på henholdsvis 100%, 25% og hotspots ROI. Medianen er udregnet for hver ROI.

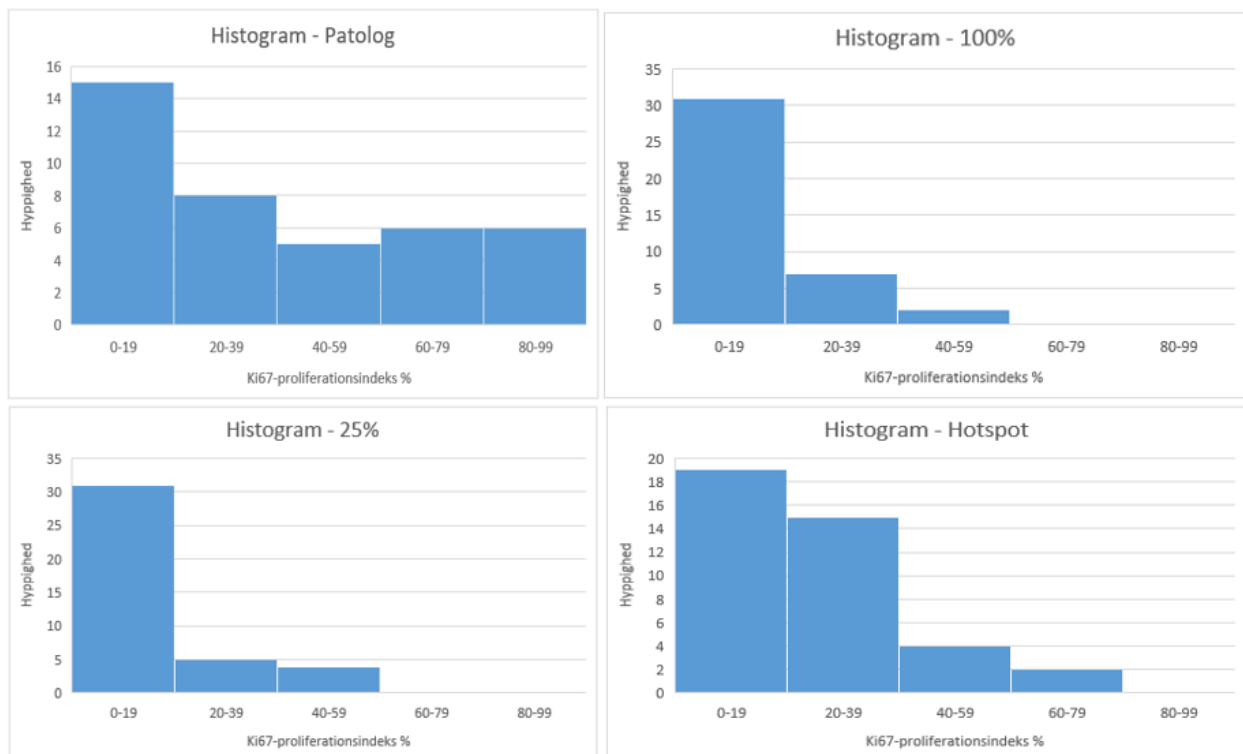
Prøve-ID	Patolog	100%	25%	Hotspot
19shs01883801	Ki67-PI (%)	Ki67-PI (%)	Ki67-PI (%)	Ki67-PI (%)
1	40	18	19	21
2	60	13	17	22
3	20	1	1	12
4	15	6	5	33
5	80	28	28	40
6	40	15	19	24
7	60	6	6	20
8	80	43	55	71
9	80	35	48	68
10	10	3	4	16
11	40	9	12	24
12	10	3	5	10
13	5	2	3	3
14	70	31	38	38
15	20	5	4	14
17	20	19	14	25
18	30	17	16	23
19	20	9	8	9
20	10	4	4	10
21	1	3	3	14
22	60	14	15	39
23	90	53	56	51
25	50	8	15	25
26	70	25	26	35
29	30	9	11	10
30	10	2	2	2
31	5	2	2	8
32	10	2	1	6
38	10	10	15	17
39	20	4	3	27
40	5	3	3	12
41	70	17	17	34
42	50	20	37	56
43	30	5	4	13
47	1	1	1	5
50	10	4	6	12
52	10	1	1	7
53	90	20	25	35
54	5	1	0	1
64	90	37	43	59
Median	25	9	9	21

Tabel 10 viser Ki67-PI for hver prøve, først estimeret af patolog og efterfølgende ved DB af de udvalgte ROI; 100%, 25% og hotspot. Hertil er der udregnet en median på 25% ved patologens estimering, 9% ved 100% ROI, 9% ved 25% ROI og 21% ved hotspot. Medianerne sammenlignes ved non-parametrisk Wilcoxon hypotesetest.



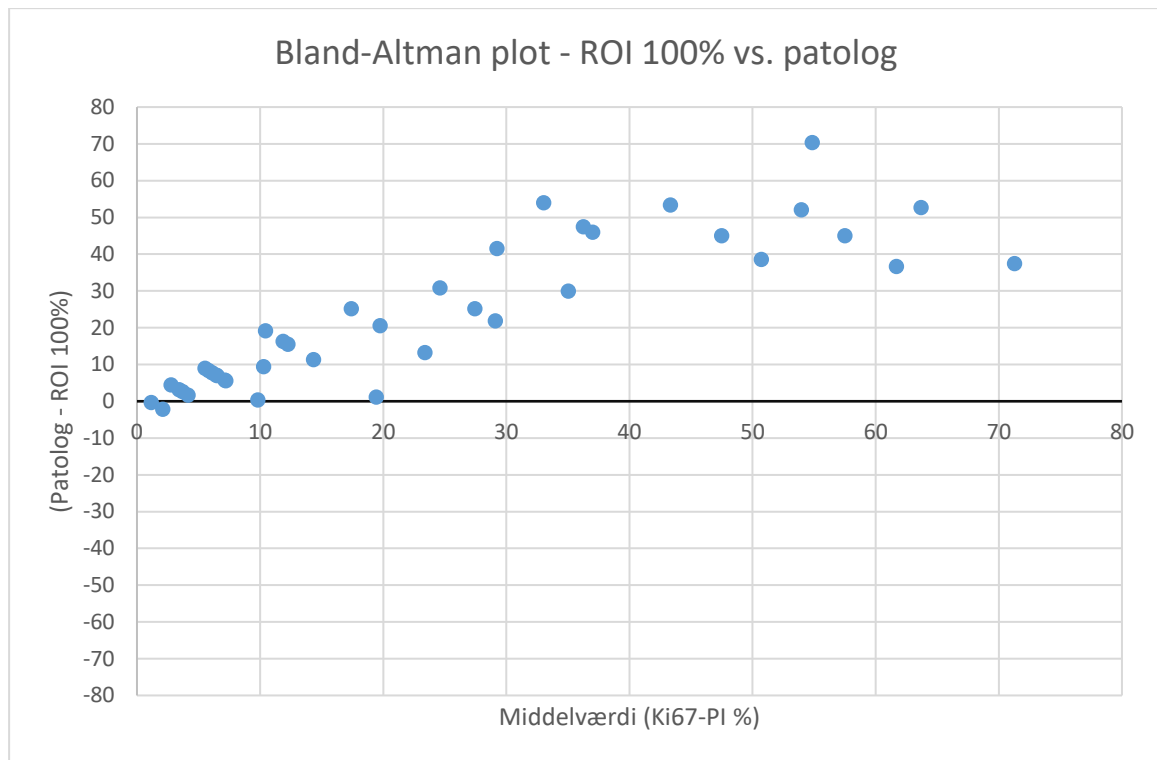
Figur 13 - Punktdiagram over indsamlet data. Ki67-PI værdierne er plottet som funktion af prøvernes bloknummer.

Punktdiagrammet på figur 13 giver et overblik over alle data i et samlet plot. Heri kan ses, hvordan Ki67-PI værdierne for hver metode placerer sig i forhold til hinanden for hver prøve. På diagrammet ses det, at Ki67-PI fra patologens estimering generelt ligger højest, med undtagelse af enkelte tilfælde hvor ROI hotspot er højest. ROI hotspot ligger for de fleste prøver mellem patologen og ROI 100% og 25%, mens punkterne for ROI 100% og 25% ligger lavest. Punkterne for ROI 100% og 25% ses ved visse prøver at ligge ovenpå hinanden, da Ki67-PI for disse prøver ligger tæt.



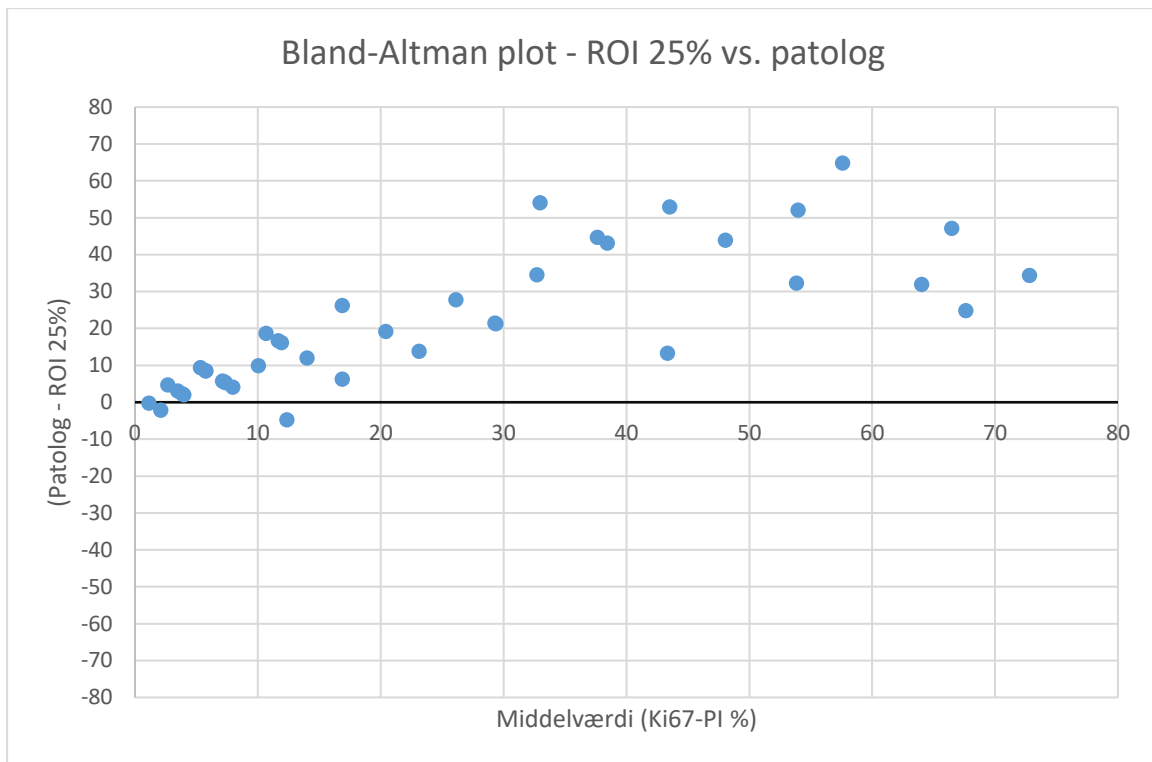
Figur 14 - Histogrammer over resultaterne fra patologen og fra 100%, 25% og hotspot ROI, som viser at alle resultaterne ikke er normalfordelt.

Histogrammerne på figur 14 viser, at resultaterne fra DB af de tre ROI og fra patologens estimering ikke er normalfordelt. For alle fire metoder ses en overvægt af prøver med Ki67-PI i intervallet 0-19%. For ROI hotspot ses en næsten tilsvarende prøvemængde i intervallet 20-39%, mens fordelingen for patologen er mere jævn i alle resterende intervaller. For alle fire datasæt ses en højreskæv fordeling.



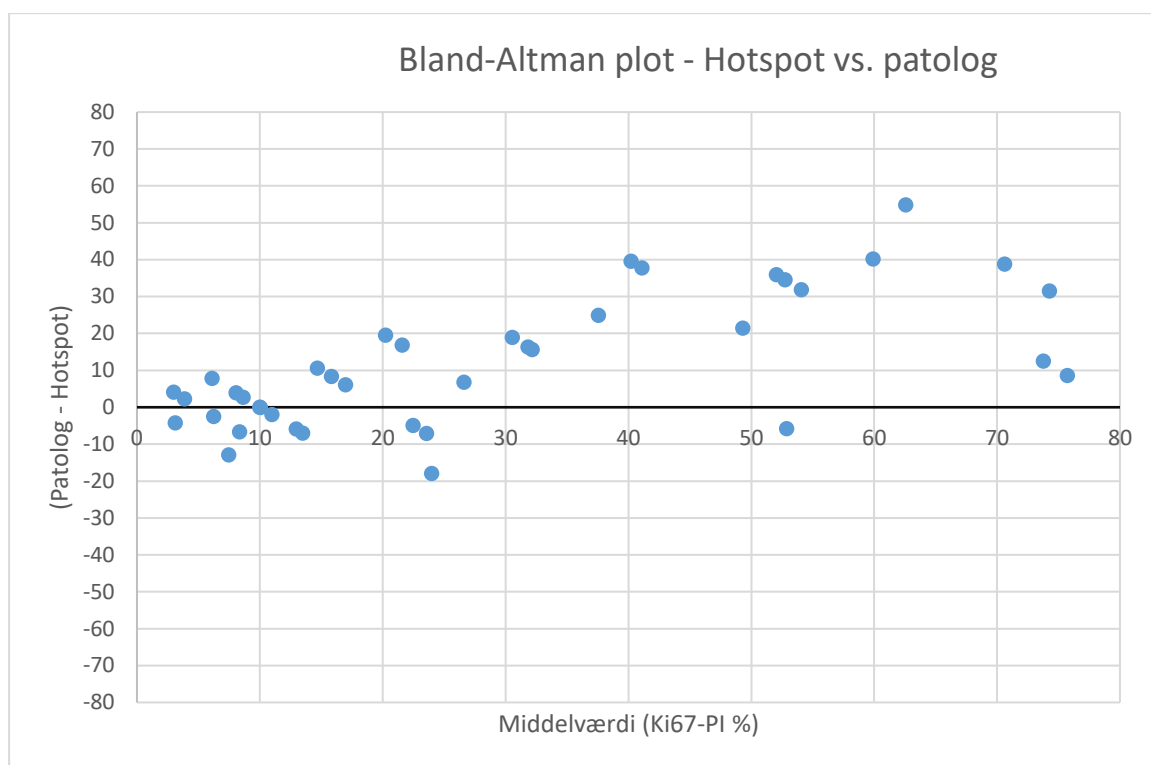
Figur 15 - Bland-Altman plot over differensen mellem Ki67-PI ved DB med ROI 100% og ved manuel estimering fra patolog.

Bland-Altman plottet på figur 15 viser differensen mellem Ki67-PI for hver prøve, vurderet ved 100% ROI med DB og patologens estimering. X-aksen indeholder middelværdien af begge metoders Ki67-PI for hver prøve. På Y-aksen ses differensen mellem Ki67-PI ved de to metoder, hvor værdier over 0 viser at patologens estimering er højere end DB ved 100% ROI, mens værdier under 0 viser det modsatte. Nuldifferenslinjen er præsenteret ved den sorte streg ud fra $y=0$. På dette plot ses samtlige punkter, på nær to, at ligge over nuldifferenslinjen. Afstanden fra punkterne til nuldifferenslinjen er stigende i takt med størrelsen af Ki67-PI middelværdien.



Figur 16 - Bland-Altman plot over differensen mellem Ki67-PI ved DB med ROI 25% og ved manuel estimering fra patolog.

Figur 16 viser et Bland-Altman plot over differensen af Ki67-PI for hver prøve analyseret ved 25% ROI med DB og patologens estimering. På dette plot ses samtlige punkter, på nær tre, at ligge over nul-differenslinjen. Her ses ligeledes at punkternes afstand til nul-differenslinjen stiger i takt med Ki67-PI, mens også afstanden mellem punkterne her er stigende.



Figur 17 - Bland-Altman plot over differensen mellem Ki67-PI ved DB med hotspots og ved manuel estimering fra patolog.

På Bland-Altman plottet i figur 17 ses differensen af Ki67-PI for hver prøve, ved DB af udvalgte hotspots og ved patologens manuelle estimering. Her ses punkterne at fordele sig jævnt omkring nul-differenslinjen i intervallet 0-30% Ki67-PI, hvorefter punkterne generelt ligger over nul-differenslinjen, med stigende afstand som følge af øget Ki67-PI. Her ses også en stigende afstand mellem punkterne.

Tabel 11 - P-værdierne fra den non-parametriske hypotesetest Wilcoxon. Ki67-PI værdier fra hver DB, er parret med resultaterne fra patologens manuelle estimering.

Wilcoxon test	100% ROI	25% ROI	Hotspot
P-Værdi	9,84E-08	1,10E-07	3,80E-04

Den non-parametriske hypotesetest Wilcoxon er brugt til at udregne p-værdierne, der ses på tabel 11. Ki67-PI værdierne fra DB ved hhv. 100% ROI, 25% ROI og hotspot, er parret med resultaterne fra patologens estimering. Hypotesen der afprøves for hver ROI sammenlignet med patologens Ki67-PI er: der er ingen forskel på medianerne af Ki67-PI mellem de to metoder.

Tabel 12 - Denne tabel viser overensstemmelsen mellem de to metoder: DB (ved ROI 100%, 25% og hotspot) og patologens estimering. Overensstemmelsen er beregnet i form af kappa-koefficient vha. Cohens kappa.

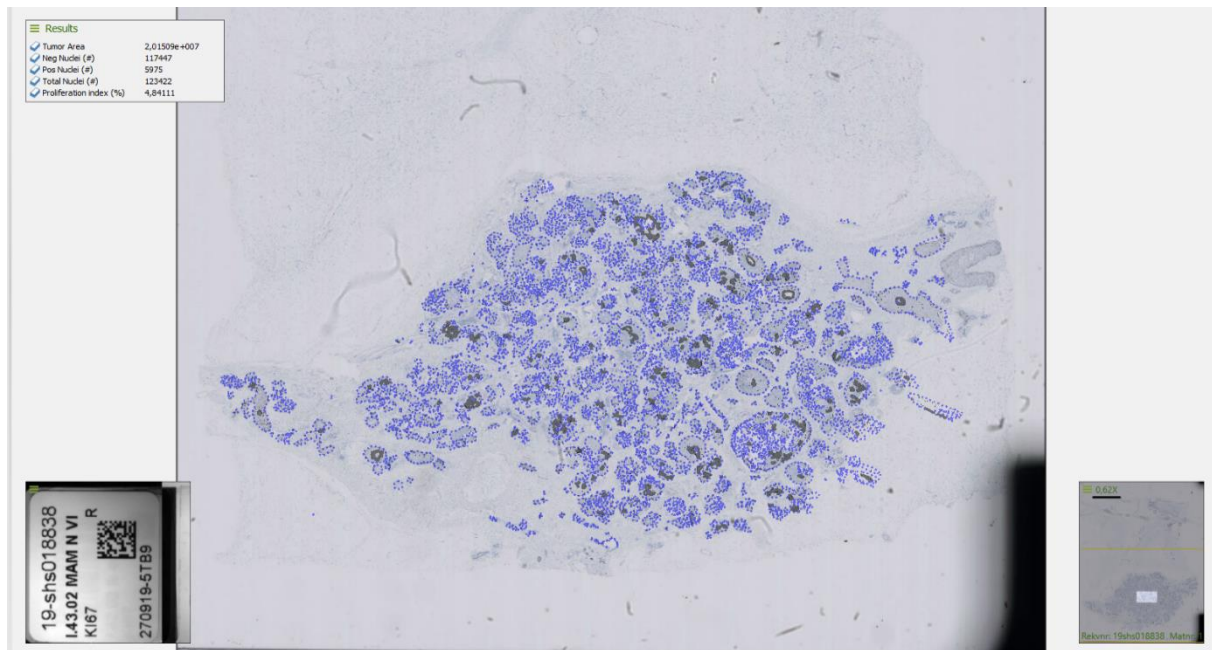
Cohens kappa		Patolog			Kappa-koefficient	
		< 20%	≥ 20%	i alt		
ROI 100%	< 20%	15	16	31	Kappa-koefficient	0,30
	≥ 20%	0	9	9		
	i alt	15	25	40		
		< 20%	≥ 20%	i alt		
ROI 25%	< 20%	15	16	31	Kappa-koefficient	0,30
	≥ 20%	0	9	9		
	i alt	15	25	40		
		< 20%	≥ 20%	i alt		
Hotspot	< 20%	14	5	19	Kappa-koefficient	0,70
	≥ 20%	1	20	21		
	i alt	15	25	40		

Tabel 12 viser Cohens kappa test for hver af de undersøgte ROI, holdt op mod patologens resultat. For hver ROI indeholder tabellen information omkring antallet af overensstemmende tilfælde markeret med grønt, samt tilfælde af uoverensstemmelse markeret med rødt. For hver ROI er beregnet en kappa-koefficient der beskriver graden af overensstemmelse med patologen. Kappa-koefficienterne vurderes ud fra skalaen i tabel 13, inspireret af Landis og Koch. (59)

Tabel 13 - Vurderingsskala for kappa-koefficienterne

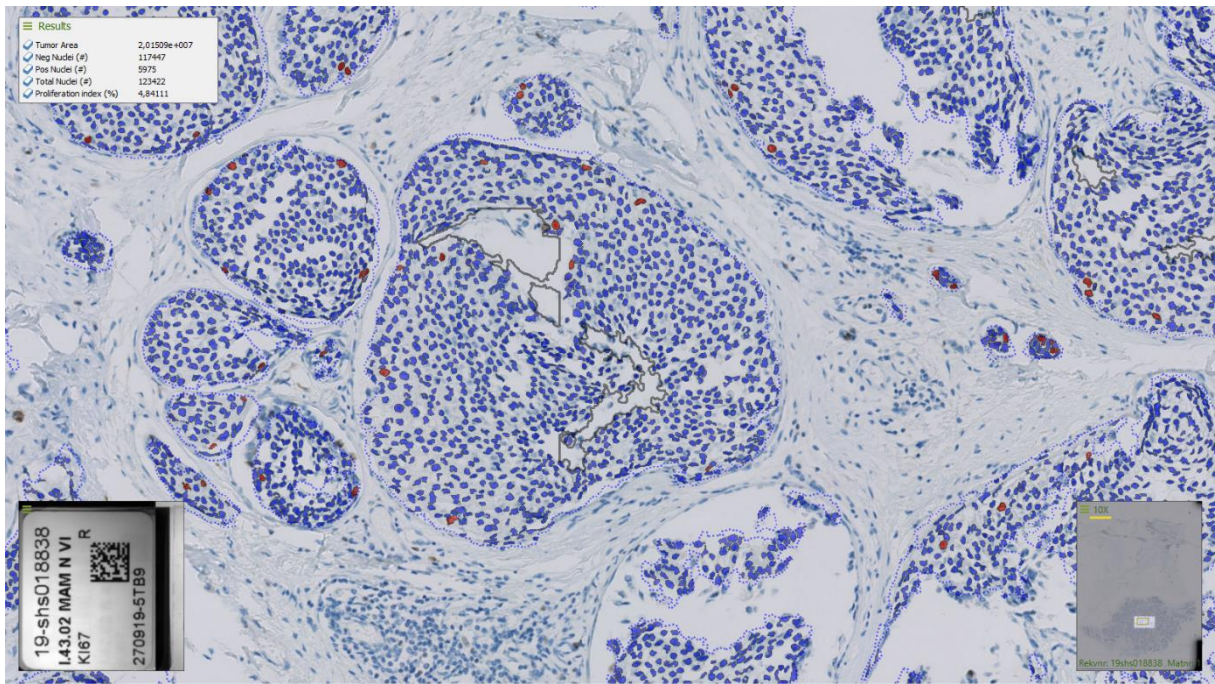
Kappa-koefficient	Grad af overensstemmelse
< 0	Ingen
0 - 0,2	Svag
0,2 - 0,4	Nogenlunde
0,4 - 0,6	Moderat
0,6 - 0,8	God
0,8 - 1	Næsten perfekt

Figur 18 til 24 viser eksempler af gennemførte DB i Visiopharm Oncotopix® software.



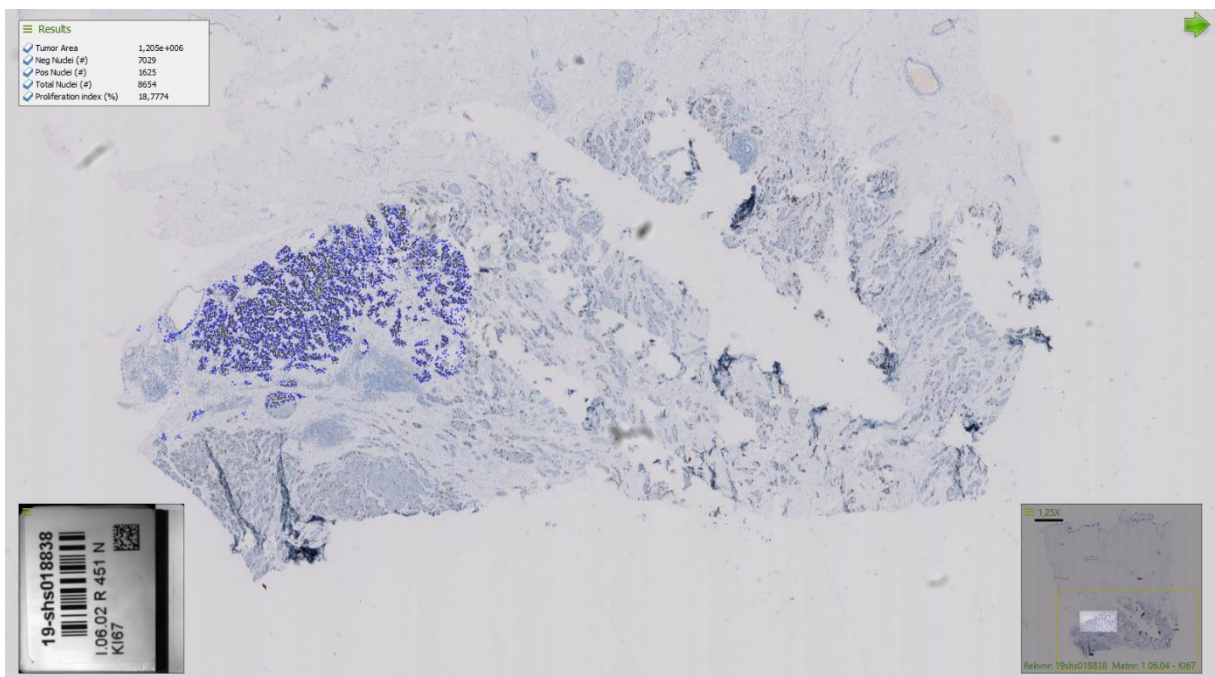
Figur 18 - Billede (0,62x obj.) af DB af prøve 43 ved ROI 100%. Tumorområderne er markeret med blå linjer, mens de grå linjer markerer områder der er udelukket fra analysen

Figur 18 viser et overblik (0,62x obj.) af DB af prøve 43 ved ROI 100%. På billedet ses det, at tumorområderne identificeret ud fra AE1/AE3-snittet markeres ved blå linjer. Inden i disse områder tælles tumorcellerne, som fremhæves med blå ved Ki67-negativitet og rød ved Ki67-positivitet.



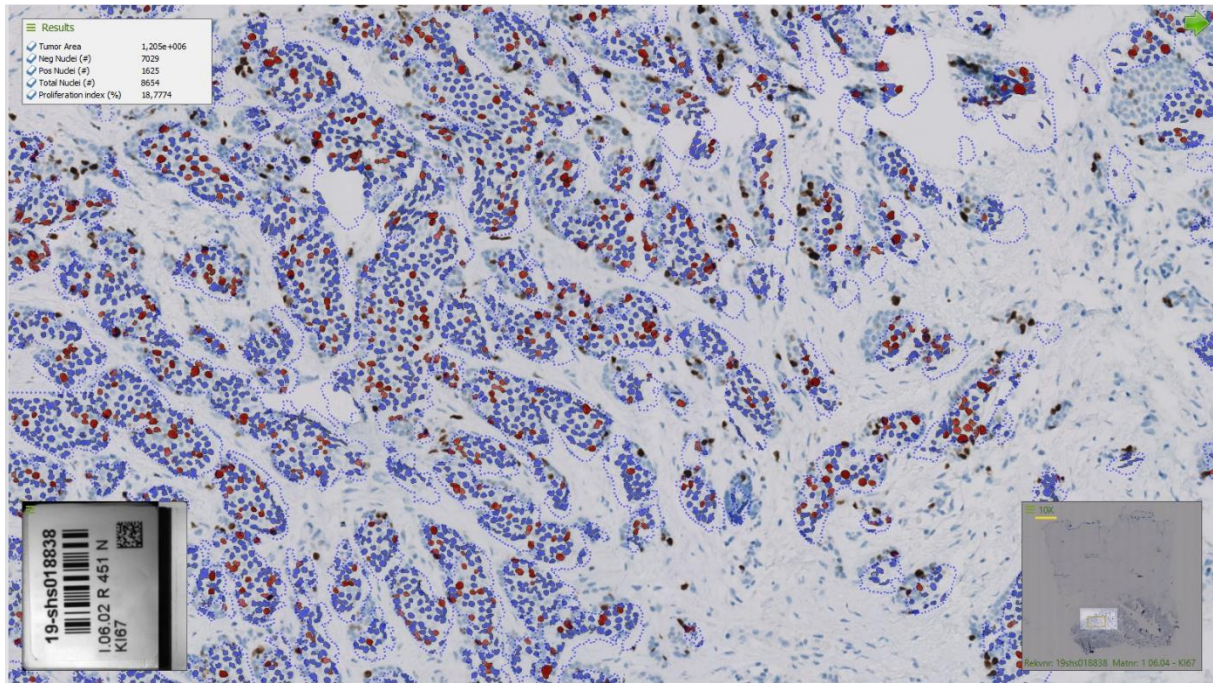
Figur 19 - Billede (10x obj.) af DB af prøve 43 ved ROI 100%. Tumorområderne er markeret med blå linjer, mens de grå linjer markerer områder der er udelukket fra analysen. Her ses celler der er registreret som Ki67-positive fremhævet med rød. Tumorcellerne som er Ki67-negative er fremhævet med blå.

Figur 19 viser et forstørret billede (10x obj.) af DB af prøve 43 ved ROI 100%. Her er opdelingen af områderne tydelig, med tumorområder indkapslet af blå linjer. Nogle områder indenfor tumorområderne indeholder ikke tumorceller, disse udelukkes fra analysen og markeres med grå linjer. De Ki67-positive celler fremhæves med rød, mens Ki67-negative celler fremhæves med blå.



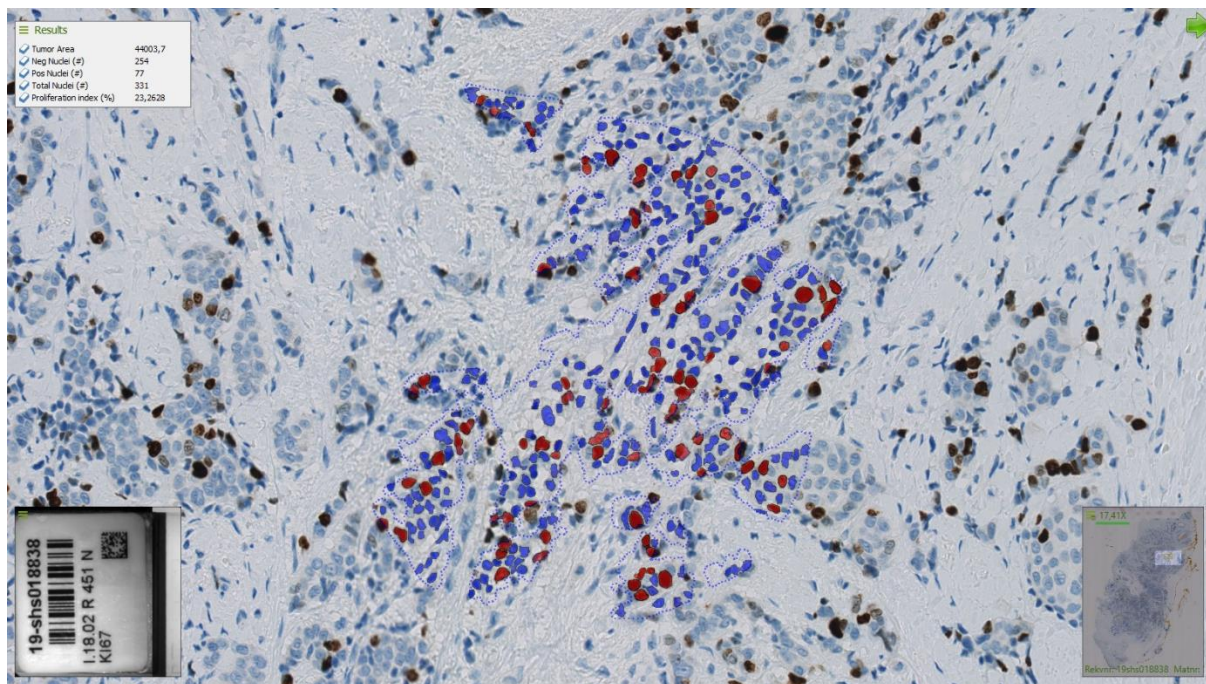
Figur 20 - Billede (1,25x obj.) af DB af prøve 6 ved ROI 25%. Tumorområderne er markeret med blå linjer.

På figur 20 ses DB af prøve 6 ved ROI 25%. Billedet (1,25x obj.) viser den del af snittet der er anvendt til DB, som er estimeret til ca. 25% af tumor. Tumorområderne inden for det valgte område markeres med blå linjer. Cellerne inden for disse områder fremhæves med rød for Ki67-positive celler og blå for Ki67-negative celler.



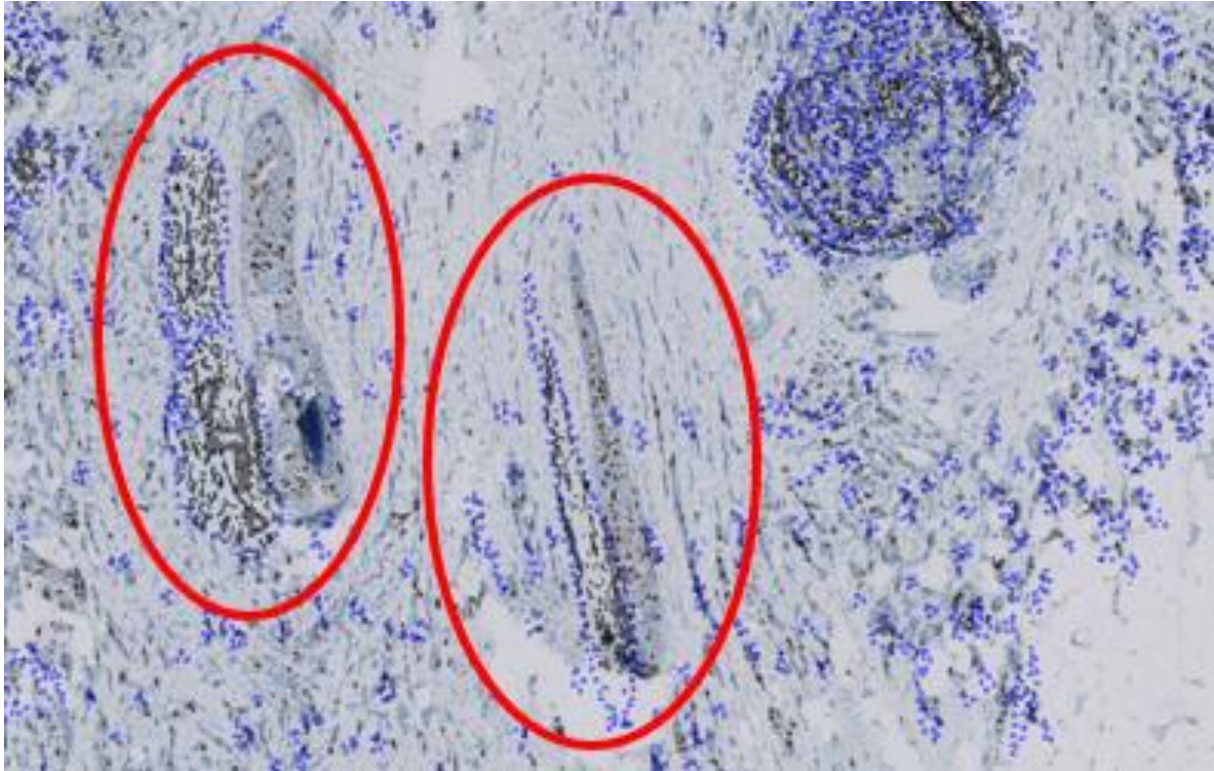
Figur 21 - Billede (10x obj.) af DB af prøve 6 ved ROI 25%. Tumorområderne er markeret med blå linjer. Her ses celler der er registreret som Ki67-positive fremhævet med rød. Tumorcellerne som er Ki67-negative er fremhævet med blå.

Figur 21 viser en forstørrelse (10x obj.) af DB af prøve 6 ved ROI 25%. Her ses inddelingen af snittet i tumorområder tydeligt, indrammet af blå linjer. Inden for tumorområderne tælles celler ud fra deres Ki67 reaktion, røde celler angiver Ki67-positivitet og blå celler angiver Ki67-negativitet. Der ses enkelte tumorceller indenfor ROI som ikke er inkluderet i analysen.



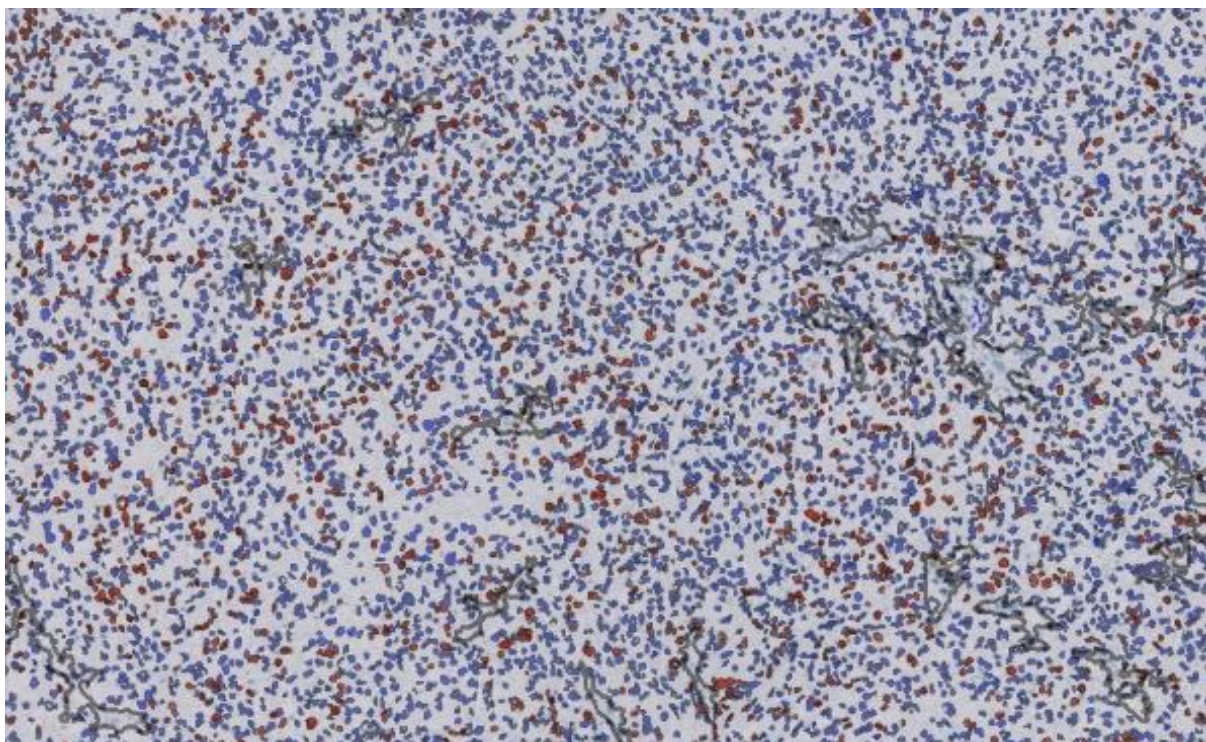
Figur 22 - Billede (17,41x obj.) af DB af prøve 18 ved ROI hotspot. Tumorområderne er markeret med blå linjer. Her ses celler der er registreret som Ki67-positive fremhævet med rød. Tumorcellerne som er Ki67-negative er fremhævet med blå.

På figur 22 ses DB for prøve 18 ved ROI hotspot. På billedet (17,47x obj.) ses det udvalgte hotspot, hvor tumorområderne inden for dette hotspot markeres ved blå linjer. De Ki67-positive celler inden for disse områder fremhæves med rød, mens de Ki67-negative celler fremhæves med blå. Der ses enkelte tumorceller indenfor ROI som ikke er inkluderet i analysen.



Figur 23 - Billede (1,65x obj.) af eksempel på fejlagtig alignment. De røde ellipser markerer områder, hvor forskydningen i alignment af tumorsnit (AE1/AE3) og markørsnit (Ki67) er særligt tydelig.

På figur 23 ses et eksempel på en DB baseret på en fejlagtig alignment. Tumorområderne som er registreret ud fra AE1/AE3 snittet er markeret med blå linjer. Områderne ligger dog forskudt i forhold til Ki67-snittet, og cellerne der inkluderes i analysen, er derfor ikke de korrekte. Som det ses i de røde ellipser, er tumorområderne forkert overløgt på Ki67-snittet, og de fleste tumorceller ekskluderes derfor i analysen.



Figur 24 - Billede (5x obj.) af eksempel på en god alignment. Blå celler udgør Ki67-negative tumorceller, røde celler udgør Ki67-positive celler, mens de grå områder er udelukket fra analysen.

På figur 24 ses et eksempel på en DB af en korrekt alignment. Her ses der næsten udelukkende celler, som er blevet identificeret og fremhævet med rød for Ki67-positive celler eller blå for Ki67-negative celler. Dette betyder, at alle cellerne inkluderes i analysen.

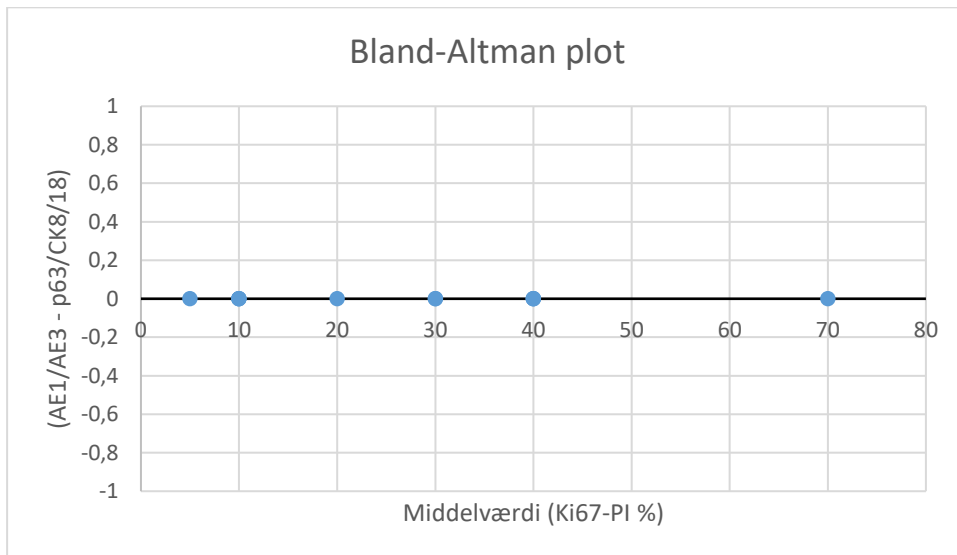
Immunhistokemiske analysemetoder

Herunder præsenteres resultater til sammenligning af to IH metoder; Ki67/AE1/AE3 og p63/CK8/18/Ki67.

Tabel 14 - Resultatskema for de 11 visuelt vurderede prøver. Vurderingen er foretaget i hotspots. For hver prøve er oplyst estimeret Ki67-PI.

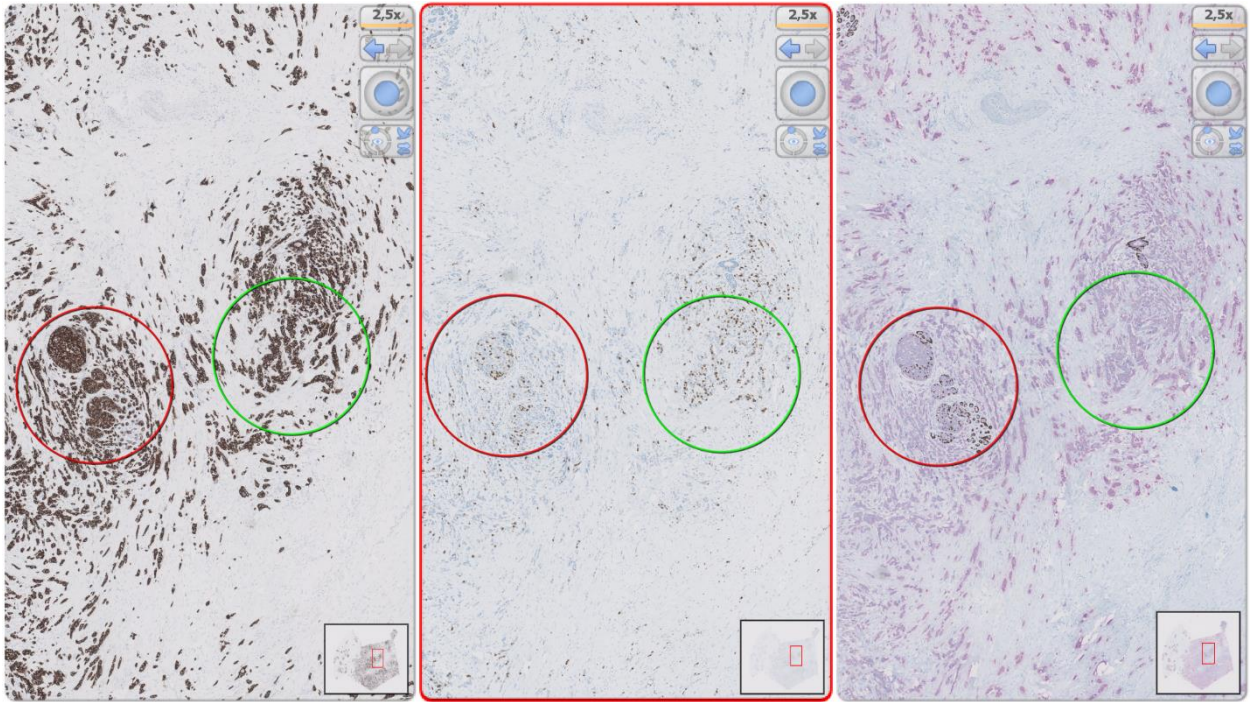
Prøve ID	Hotspots	
	AE1/AE3 Ki67-PI (%)	P63/CK8/18 Ki67-PI (%)
19shs01883801		
1	40	40
2	20	20
3	10	10
6	30	30
7	40	40
8	70	70
13	5	5
15	10	10
17	40	40
19	10	10
39	30	30

Tabel 14 indeholder en oversigt over de 11 prøver, der er udvalgt til manuel estimering af Ki67-PI. Snittene er vurderet for begge IH metoder i det samme hotspot, for hvilket den estimerede Ki67-PI er opgivet. Alle Ki67-PI værdierne er vurderet ens for begge IH metoder.



Figur 25 - Plot der beskriver differensen i Ki67-PI mellem de to IH metoder, som funktion af middelværdien af Ki67-PI for hver prøve.

Plottet på figur 25 viser differensen mellem den estimerede Ki67-PI værdi mellem metoderne Ki67/AE1/AE3 og Ki67/p63/CK8/18 for hver udvalgt prøve. Det ses at alle punkter ligger på nul-differenslinjen.

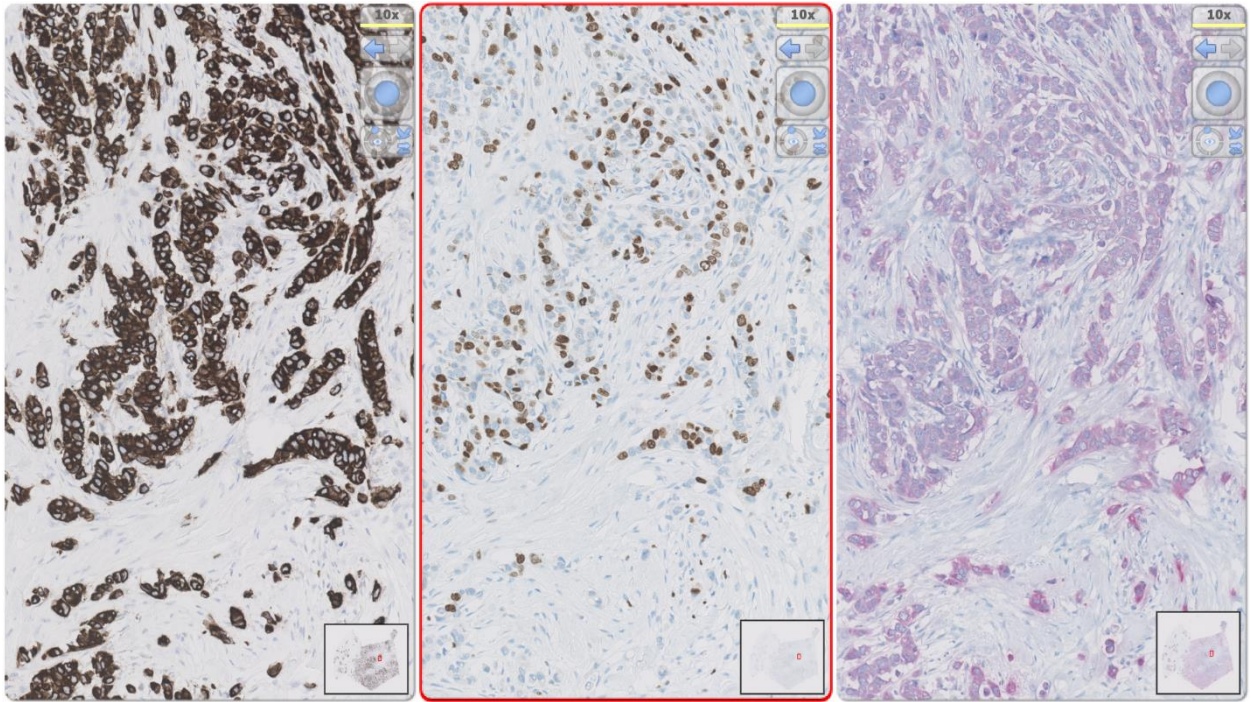


Figur 26 - Udvælgelse af hotspot for prøve 1. Fra venstre ses snittene; AE1/AE3, Ki67 og p63/CK8/18. Den røde cirkel markerer et udelukket tumorområde, mens den grønne cirkel markerer tumorområdet hvori hotspot vælges.

På figur 26 ses billeder (2,5x obj.) af hhv. AE1/AE3, Ki67 og p63/CK8/18 påvisning for prøve 1.

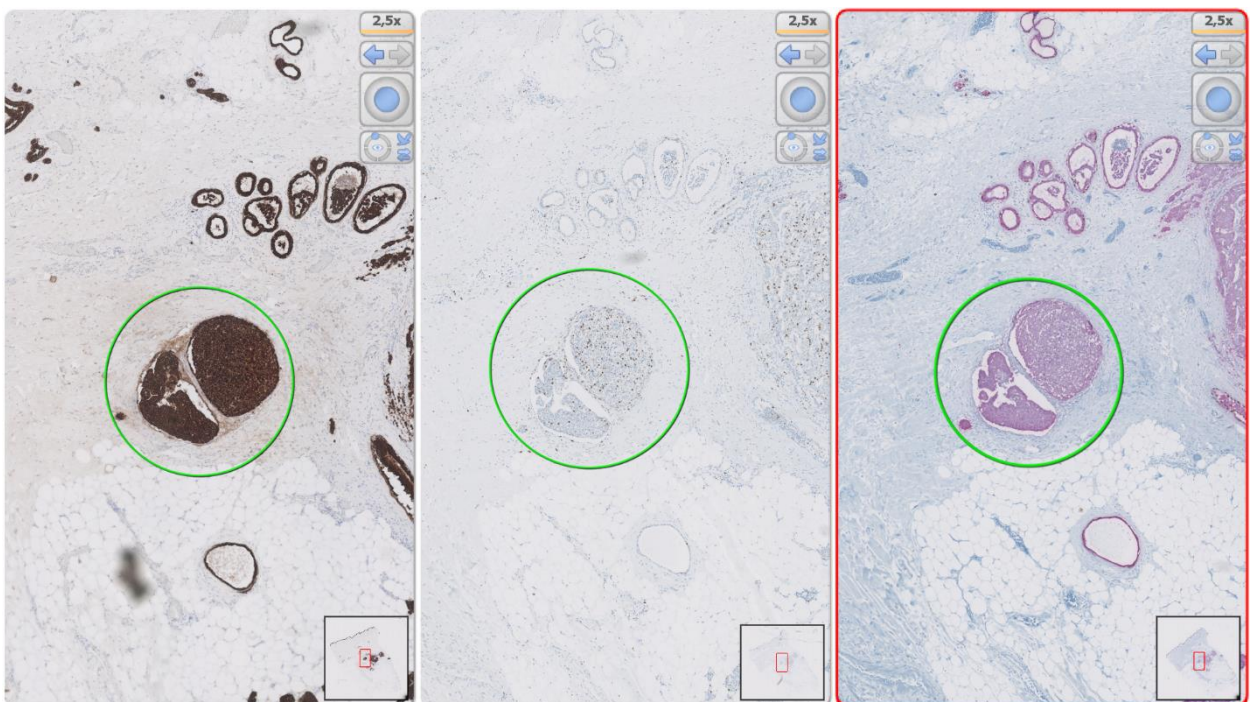
Tumorområdet i den røde cirkel viser p63-påvisning, og identificeres derfor som DCIS. DCIS er ikke relevant ved bestemmelse af Ki67-PI, hvorfor området udelukkes fra vurderingen.

Tumorområdet i den grønne cirkel anvendes til estimering af Ki67-PI, hotspottet der udvælges herfra ses på figur 27.



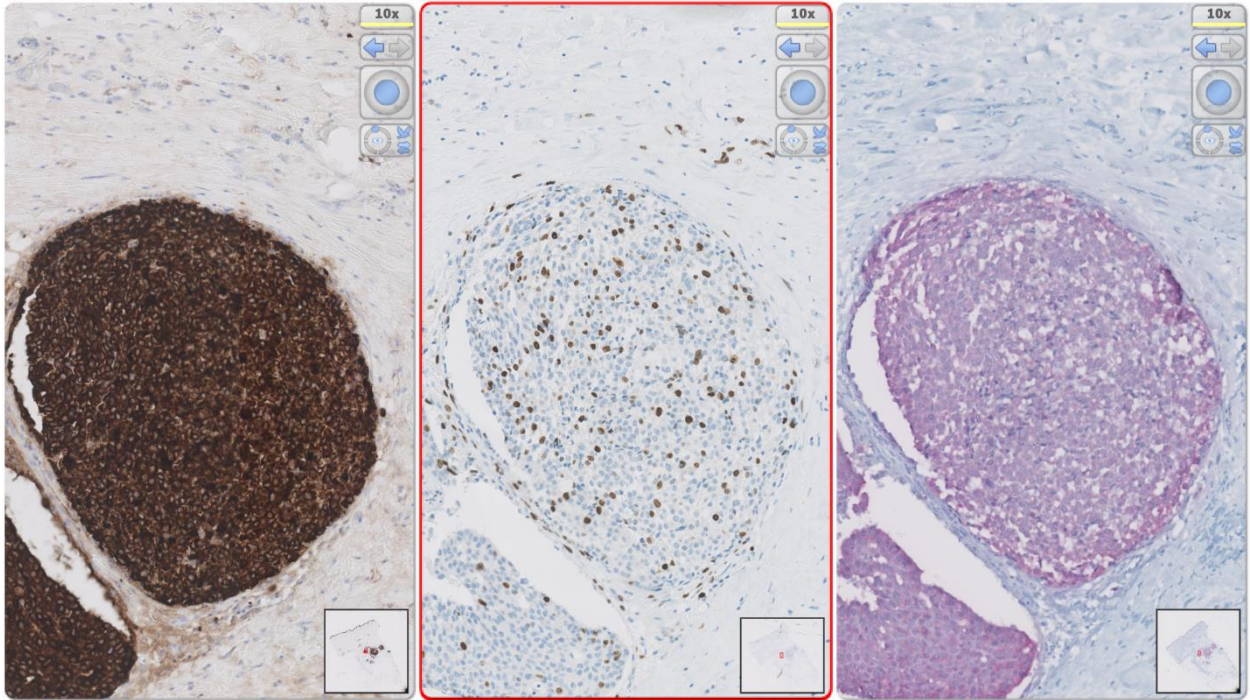
Figur 27 - Hotspot for prøve 1. Fra venstre ses snittene; AE1/AE3, Ki67 og p63/CK8/18. Indenfor dette område estimeres Ki67-PI.

Ud fra hotspottet på figur 27 estimeres Ki67-PI for prøve 1. Tumorområderne identificeres ud fra AE1/AE3 og CK8/18 påvisning, hvorefter andelen af Ki67-positive celler bestemmes indenfor disse områder i Ki67-snittet. Ki67-PI for prøve 1 estimeres til 40%.



Figur 28 - Udvælgelse af hotspot for prøve 2. Fra venstre ses snittene; AE1/AE3, Ki67 og p63/CK8/18. Den grønne cirkel markerer tumorområdet hvori hotspot vælges.

På figur 28 ses billeder (2,5x obj.) af hhv. AE1/AE3, Ki67 og p63/CK8/18 påvisning for prøve 2. Tumorområdet i den grønne cirkel anvendes til estimering af Ki67-PI, hotspottet der udvælges herfra ses på figur 29. For dette snit ses ingen p63-påvisning på p63/CK8/18-snittet, hvorfor udelukkelse af DCIS ikke foretages.



Figur 29 - Hotspot for prøve 2. Fra venstre ses snittene; AE1/AE3, Ki67 og p63/CK8/18. Indenfor dette område estimeres Ki67-PI.

Ud fra hotspottet på figur 29 estimeres Ki67-PI for prøve 01. Tumorområderne identificeres ud fra AE1/AE3 og CK8/18 påvisning, hvorefter andelen af Ki67-positive celler bestemmes indenfor disse områder i Ki67-snittet. Ki67-PI for prøve 2 estimeres til 20%.

Diskussion

I følgende afsnit fortolkes betydningen af resultaterne. Derefter diskuteres fundene i forhold til relevant teori, og efterfølgende sammenlignes med eksterne studiers fund, samt en intern metodekritik.

Vurdering af kontroller

Kontrollen for AE1/AE3 på figur 10 viser det for lever og esophagus forventede reaktionsmønster. Hepatocytterne er svagt farvede, hvilket stemmer overens med forventningen om at de udtrykker CK i lav grad. Esophagus viser en kraftig reaktion i det flerlagede pladeepitel. I pancreas ses dog en kraftigere reaktion end forventet. Den forventede reaktion er en svag til moderat farvning af cylinderepitel i udførselsgangene. På snittet ses dog en kraftig farvning i størstedelen af snittet, der ikke kun er relateret til udførselsgangene. Dette tyder på en overfarvning af pancreas med AE1/AE3. Da Visiopharm Oncotopix® software ikke tager farveintensiteten i betragtning, samtidigt med at lever og esophagus viser den forventede reaktion, antages dette dog ikke at have betydning for DB. Særligt den svage farvning af hepatocytter tyder på, at overfarvning ikke er et generelt billede for IH analysen.

Ki67 kontrollen på figur 11 reagerer fuldstændigt som forventet, idet der ses en moderat farvning af B-lymfocytter i kimcentrene, samt en tilsvarende moderat farvning af spredte B-lymfocytter i det øvrige tonsilvæv. Derudover ses et komplet fravær af reaktion i levervævet, hvor <1% af hepatocytter forventes at være positive.

Kontrollen af p63/CK8/18 på figur 12 viser ligeledes det forventede reaktionsmønster. Dette reaktionsmønster defineres ud fra den kraftige farvning med DAB i spredte lymfocytter i tonsillen, som følge af p63-påvisning. Endvidere ses en svag Fast Red farvning af hepatocytter i levervævet pga. CK8/18 påvisning. Derudover ses en forstærket CK8/18 reaktion i galdegangenes kubiske epitel, hvilket ikke er defineret af NordiQC, men som ikke er uventet ud fra teorien.

Diskussion af resultater

Digital billedanalyse

Ud fra værdierne listet i tabel 10, ses en tendens til, at patologens Ki67-PI med en median på 25% er højere, end de Ki67-PI fundet ved DB. Derudover ses det, at DB i hotspots giver højere Ki67-PI med en median på 21%, end Ki67-PI ud fra ROI på 100% og 25%, der begge har medianer på 9%.

Samme tendens ses på figur 13, hvor det kan ses, at patologens estimering af Ki67-PI ligger højest for størstedelen af prøverne. Derudover ligger Ki67-PI fra DB ved ROI 100% og 25% generelt lavest og i de fleste tilfælde tæt på hinanden. Ki67-PI fra DB af ROI hotspot befinder sig generelt mellem resultaterne fra patologens estimering og DB ved ROI 100% og 25%. På diagrammet ses en stor variation i hvilken analysemetode DB ved ROI hotspots ligger tættest på. I enkelte tilfælde ses det også, at dennes Ki67-PI overstiger det fra patologens estimering. Disse betragtninger bakkes op af medianerne for metoderne, der viser et lignende forhold mellem metodernes resultater.

På figur 14 viser histogrammer en tydelig højreskæv fordeling af Ki67-PI, som dog er mindre udtalt ved resultaterne fra patologen. Generelt ses en stor mængde af prøvernes Ki67-PI at befinde sig i intervallet 0-19%. Ved DB af hotspots ses en tilsvarende mængde af Ki67-PI i intervallet 20-39% som i intervallet 0-19%. Resultaterne fra patologen følger den generelle tendens, med størstedelen af Ki67-PI i intervallet 0-19%, dog er de yderligere resultater mere jævnt fordelt over intervallerne end ved DB. Da resultaterne ikke følger normalfordelingen, kan parametriske statistik ikke anvendes.

Bland-Altman plottet på figur 15 viser en tydelig systematisk variation mellem metoderne, hvor Ki67-PI i 38 ud af 40 tilfælde er højere ved patologens estimering, end ved DB af ROI 100%. Størrelsen af variationen synes også at afhænge af proliferationsniveauet, da differensen stiger i takt med Ki67-PI værdien. Derudover ses en mindre stigning i analyseusikkerheden, da punkterne ligger mere spredt ved de højere Ki67-PI værdier.

Bland-Altman plottet på figur 16 viser ligeledes en systematisk variation, hvor Ki67-PI estimeret af patologen er højere end for DB ved ROI 25%, hvilket her ses i 37 af 40 tilfælde. Variationen ses også for denne ROI at stige i takt med proliferationsniveauet. Ved DB for ROI 25% er stigningen i analyseusikkerheden mere udtalt end ved ROI 100%.

Bland-Altman plottet på figur 17 viser en anderledes tendens end ved de to andre DB ROI. Differensen mellem Ki67-PI for prøver med en middelværdi i intervallet 0-30% fordeler sig jævnt omkring linjen for nulldifferens, hvorfor der i dette interval ikke vurderes at være nogen klar variation. Dette har betydelig klinisk relevans, da det er i dette interval cut-off grænsen typisk defineres, og derfor er dette også intervallet med størst klinisk betydning. I intervallet for Ki67-PI værdi >30% ses dog en lignende tendens, som for DB af ROI 100% og 25%. For prøver med Ki67-

PI middelværdi >30%, er patologens estimering højere end DB i hotspots i 16 af 17 tilfælde, samtidigt med at både variationen og analyseusikkerheden også i dette tilfælde stiger sammen med proliferationsniveauet.

Generelt for alle DB ved forskellige ROI ses altså, at patologens estimering overordnet set giver højere resultater end DB, med undtagelse af DB af hotspots på prøver med Ki67-PI < 30%. For alle Bland-Altman plots viser variationen mellem metoderne sig ligeledes at stige i takt med proliferationsniveauet, samtidigt med at analyseusikkerheden også stiger på denne måde. Stigningen i analyseusikkerheden har dog ikke betydning for tolkningen af variationen mellem metoderne, da punkterne holder sig på samme side af y-aksen, samtidigt med at variationen viser sig stigende.

Med hensyn til klinisk betydning er variationen omkring den valgte cut-off grænse på 20% særligt relevant. Ved ROI på både 100% og 25% ses der allerede tydelige systematiske variationer fra patologens estimering omkring punkter med Ki67-PI værdier >10%, hvilket betyder at den systematiske variation tillægges en klinisk betydning. Dette gør sig dog ikke gældende for ROI hotspot, hvor Bland-Altman plottet først viser en klar systematisk variation ved punkter med Ki67-PI >30%. De to metoder kan derfor ikke konkluderes at have en klinisk betydende systematisk variation ud fra plottet på figur 17. Dog synes punkterne omkring Ki67-PI på 20%, at have en betydelig tilfældig variation, der resulterer i forskelle mellem metoderne på op til 20%.

Ud fra P-værdierne for hver ROI ved DB beregnet med den non-parametriske hypotesetest Wilcoxon i tabel 11, forkastes nulhypotesen for alle tre ROI. Dette er tilfældet, da alle P-værdierne er under 0,05, hvilket ved et signifikansniveau på 5%, betyder at nulhypoteserne ikke kan accepteres. Der er derfor ved Wilcoxon test påvist en signifikant forskel i medianen mellem patologens estimering og DB ved hver ROI. Dette bekræfter de variationer der ses i hhv. figur 13 og 15-17, hvor patologens estimering ses at give højere Ki67-PI end DB ved alle tre ROI.

Cohens kappa testen i tabel 12 giver ved sammenligning med patologens Ki67-PI følgende kappa-koefficienter ved DB; 0,30 for ROI 100%, 0,30 for ROI 25% og 0,70 for ROI hotspot. Kappa-koefficienten for DB i hotspots er altså betydeligt højere end koefficienten for ROI på 100% og 25%. Ud fra skalaen i tabel 13 har DB ved ROI på både 25% og 100% tumor en nogenlunde overensstemmelse med patologens estimering. Resultater fra DB i ROI hotspots har derimod en god overensstemmelse med patologens estimering. Tendensen til at patologens estimering af

Ki67-PI er højere end ved DB, afspejles også i kappa testen i tabel 12. For både ROI 100% og 25% vurderes 16 af de 40 prøver til at have Ki67-PI <20%, mens de af patologen vurderes til $\geq 20\%$. De resterende 24 prøver klassificeres ens af både DB og patolog. For DB ved ROI hotspot er denne forskel noget mindre udtalt, hvor kun 5 prøver vurderes til at have Ki67-PI $\geq 20\%$ af patologen og <20% af DB. For denne ROI ses tilmed også ét tilfælde, hvor en prøve vurderes til $\geq 20\%$ af DB men <20% af patologen. Dette betyder at DB for ROI hotspot og patologen klassificerer 34 af 40 prøver ens.

Den markante forskel der ses mellem Ki67-PI fra DB ved ROI 100% og 25% fra ROI hotspots er forventelig. Dette er det fordi hotspots bliver udvalgt på baggrund af en høj andel af Ki67-positive celler, hvorimod ROI 100% og 25% indeholder et heterogent udtryk af Ki67 som beskrevet af Dowsett et al. (44) Dette kan også forklare hvorfor DB af ROI hotspots er mest sammenlignelig med patologens estimering, da områder for disse to metoder er udvalgt ud fra de samme kriterier.

En mulig årsag til den observerede forskel mellem patologens estimering og DB, hvor patologens Ki67-PI generelt ligger højere, kan findes i alignmentprocessen af DB. Fejlagtig alignment kan forårsage forskydning af de relevante tumorområder, der bliver overlagt Ki67-snittet. Dette betyder, at det ikke er de rigtige celler der bliver registreret og talt ud fra Ki67-snittet. Et eksempel på en forskydning af tumorområder kan ses på figur 23. Her ses to områder af celler, der indeholder en betragtelig andel Ki67-positive celler. Disse vil dog ikke blive inkluderet i analysen, da tumorområderne, som er identificeret ud fra AE1/AE3 snittet, ligger forskudt fra det egentlige tumorområde på Ki67-snittet. Dette kan resultere i, at de forkerte celler bliver inkluderet i analysen og talt, eller at der slet ikke tælles nogen celler i områderne. Tælling af forkerte celler kan betyde et falskt lavt Ki67-PI, mens udelukkelse af områderne vil betyde et mindre antal talte tumorceller. Figur 24 viser modsat et eksempel på DB af en korrekt alignment, hvor alle celler er identificerede og markerede som positive eller negative. Billedeksemplerne på figur 18-22 viser alignment, der er næsten tilsvarende den på figur 24. På figur 21-22 ses dog enkelte tumorceller som ligger indenfor området, men ikke er inkluderet i analysen, på trods af god alignment. Dette kan skyldes mindre artefakter fra mikrotomering, eller uskarpheder fra scanningen.

Årsagen til en fejlagtig alignment kan, udover ved selve alignment i Visiopharm Oncotopix®, også findes under præanalysen. Som tidligere nævnt har anvendelsen af seriesnit betydning for, at

overensstemmelsen mellem cellernes placering i snittene bibeholdes. Hvis to snit der ikke er taget i serie anvendes til DB, vil alignment ikke kunne udføres optimalt pga. afstanden mellem snittene ved mikrotomering. Derudover har orienteringen på objektglasset også betydning for alignment. Forskelle i orientering bør dog kunne korrigeres ved manuel justering af alignment med pins, og vil derfor ikke have betydning for Ki67-PI.

En anden mulig forklaring på forskellen mellem patologen og DB kan opstå, hvis patologen i sin estimering af Ki67-PI inddrager baggrundsviden omkring patienten eller en forventet cancertype ud fra erfaring. Baggrundsviden omkring patienten kan spille en rolle, hvis patologen kender til øvrige analyseresultater for den specifikke patients sygdom. Derudover kan patologens erfaring spille ind i vurderingen af tumortypen. Hvis en prøve fra tumor udviser kendetegn, som for patologen er associeret med en bestemt tumortype, kan dette skabe en forventning omkring et bestemt proliferationsindeks. Skulle dette være tilfældet, kan det skabe variation fra resultatet i DB, fordi denne analyserer prøven med komplet objektivitet.

Derudfra kan det også diskuteres hvilken ROI der er mest korrekt ved beregning af Ki67-PI. Ki67-PI ud fra hele tumorområdet kan siges at være mest repræsentativt for tumorens sande Ki67-PI. Derudover anbefales det også af Dowsett et al. (44) at benytte en metode, der vurderer Ki67-PI ud fra hele tumorområdet og ikke blot i ét hotspot. Hvis der ses på retningslinjerne for tolkning af Ki67 samt området for cut-off grænser, opstår der imidlertid et billede af, at disse er defineret ud fra tolkning af hotspots. Retningslinjen fra DBCG (3) definerer ROI som den invasive tumorfront samt hotspots, det samme er gældende for instruksen på SHS. (8) Derfor antages det, at området for cut-off mellem høj og lav proliferationsrate er defineret ud fra vurdering af Ki67-PI i disse områder. Ki67-PI vurderet ud fra større og mere heterogene tumorområder, ligesom ROI 100% og 25% i dette projekt, vil derfor ikke kunne tolkes ud fra disse cut-off grænser. Her vil en revurdering af cut-off grænsen være nødvendig, for at sikre korrekt skelnen mellem høj og lav proliferationsrate.

Ved en eventuel implementering af digital billedanalyse, som erstatning for patologens manuelle vurdering, vil det være væsentligt at tage tidsforbruget i betragtning. Ud fra resultaterne i dette projekt, ses DB i ROI hotspots at være mest sammenlignelig med patologens estimering. Dette vil også være den mest tidsbesparende løsning, da DB i ROI hotspots kun tager op til ét minut for hver analyse. En tidsbesparelse afhænger dog også af, hvorvidt resultatet af DB skal kontrolleres. Hvis patologen skal kontrollere samtlige DB, bliver den tidsmæssige besparelse minimeret, fordi

prøven så skal vente på godkendelse fra patologens side. Der foreligger dog også muligheden for, at bioanalytikeren der udfører DB selv kan kontrollere resultaterne. En sådan kontrol vil primært bestå i at bekræfte, at de korrekte tumorområder er blevet analyseret, at disse er korrekt overlejet på Ki67-snittet, samt at cellerne inden for disse områder er blevet talt. Dette vil stadig give mulighed for en tidsbesparelse, da denne kontrol vil kunne udføres øjeblikkeligt efter DB. Dette vil skabe en jobglidning, hvor bioanalytikerne overtager noget arbejdsbyrde, der vil frafalde patologen. Bioanalytikeren vil dog ikke blive pålagt diagnostisk ansvar, da dette vil ligge hos DB. Kontrollen af DB kan sammenlignes med den der foretages for farvningen af kontroller efter IH analyse.

Immunhistokemiske analysemetoder

Herefter diskuteres resultaterne fra sammenligningen af IH analysemetoderne Ki67/AE1/AE3 og Ki67/p63/CK8/18. På tabel 14 ses det, at alle 11 visuelt vurderede prøver bliver tildelt ens Ki67-PI værdier for begge metoder. Denne sammenhæng er ydermere illustreret på figur 25, hvor alle punkter ligger på nulldifferenslinjen. Ud fra vurderingen af Ki67-PI ses altså ingen variation mellem de to metoder.

Den fraværende variation mellem metoderne kan også diskuteres ud fra eksempler af de billedsammensætninger, som vurderingen af Ki67-PI er foretaget ud fra. På figur 26 ses udvælgelsen af tumorområde for prøve 1, som er en af de prøver, hvor der er påvist p63. Ved udvælgelsen af tumorområde hvori hotspot kunne anvendes, er områder med p63-påvisning, som det der ses i den røde cirkel på figur 26, blevet udelukket. Disse områder er udelukket for begge metoder, fordi det ønskes at sammenligne tumorpåvisningen af de to metoder AE1/AE3 og p63/CK8/18 i det samme tumorområde. Dette bevirker, at denne sammenligning kun vil give variation i Ki67-PI, hvis der ses en forskel i tumorpåvisning mellem AE1/AE3 og CK8/18. På figur 27 ses hotspottet hvori Ki67-PI estimeres for prøve 1. Her ses ingen forskel i påvisningen af tumorområder mellem de to tumormarkører, hvorfor Ki67-PI estimeres ens for begge metoder, i dette tilfælde 40%.

På figur 28 ses udvælgelsen af tumorområde for prøve 2. Her ses ingen p63-påvisning, hvorfor det ikke er nødvendigt at udelukke DCIS områder. Igen vil en forskel i Ki67-PI afhænge af forskel i tumorpåvisning. Figur 29 viser det udvalgte hotspot for prøve 2. Her ses ligeledes ingen forskel i tumorområdet ud fra tumormarkørerne AE1/AE3 og CK8/18, hvilket er tilfældet for alle prøver

der er visuelt sammenlignet i dette projekt, hvorfor der ingen variation ses mellem metoderne. For prøve 2 er Ki67-PI estimeret til 20%.

Ved DB vil vurderingen af Ki67-PI dog ikke ske på samme måde, som ved denne visuelle vurdering. Her vil tumorområder identificeres ud fra AE1/AE3-påvisning, som det også er sket for sammenligningen mellem patolog og DB. Dette betyder, at de områder der er udelukket som DCIS på baggrund af p63-påvisning bliver inkluderet i DB af AE1/AE3. Ved DB af Ki67 med virtuel dobbeltfarvning af p63/CK8/18 vil disse områder dog blive udelukket. Dette kræver en anden APP, end de der var til rådighed ved projektets udførelse. Denne APP (20101 - Invasive Tumor Detection (PDS)) (60) identificerer tumorområder ud fra CK8/18-påvisning, men udelukker strukturer med p63-påvisning, ligesom det er gjort ved den visuelle vurdering i dette projekt. Derfor foreligger der mulighed for, at DB vil kunne påvise en forskel i Ki67-PI mellem disse to IH metoder, som ikke er påvist i dette projekt.

Ekstern validitet

En artikel af Zhong et. al fra 2016 (61) har sammenlignet manuel tælling med Ventanas DB. 155 præparater af invasiv mammacancer blev påvist med udelukkende Ki67. Manuel tælling og DB blev foretaget i to ROI; hotspots og mindre repræsentative områder. Resultaterne behandles ved intra class coefficients (ICC) som er lignende Cohens kappa, og ved Wilcoxon-test. ICC værdier på 0,974 i det repræsentative område og 0,957 i hotspots viser en næsten perfekt overensstemmelse mellem metoderne. Prøverne opdeles også i Ki67-PI kategorier ud fra den manuelle tælling; $\leq 10\%$, 11-30% og $>30\%$. Her bliver ICC værdierne 0,804 i repræsentative områder og 0,678 i hotspots i intervallet 11-30%, mens værdierne bliver 0,945 i repræsentative områder og 0,903 i hotspots for prøver med Ki67-PI $>30\%$. Der oplyses ingen værdi for $\leq 10\%$. p-værdien for Wilcoxon test bliver $<0,0001$ for begge ROI.

I en artikel fra 2016 af Røge et al. (32) er DB sammenlignet med manuel tælling på 140 patientprøver af forskellige typer mammacancer. Områder der indeholdt tumor, men ikke carcinoma in situ eller normalt epitelvæv, blev boret ud i 2 mm diameter cores til tissue microarrays (TMA). Antigener på TMA påvises med hhv. Ki67 og AE1/AE3. Ved manuel tælling er en systematisk metode anvendt, hvor et udvalgt område af mindst 200 tumorceller blev talt, og hver enkelt tumorcelle markeres som Ki67-positiv eller negativ. DB blev udført både på hele coren og i det samme område som manuel tælling. Resultaterne blev beskrevet ved Bland-Altman plots samt ICC. Der ses en god overensstemmelse mellem manuel tælling og DB både i

det udvalgte område og for hele coren, dog med en tendens til lavere Ki67-PI ved DB. ICC koefficienterne for det udvalgte område blev 0,98 og for hele coren 0,97.

Koopman et al. (7) har i en artikel fra 2018 sammenlignet to forskellige DB platforme med manuel tælling. Snit fra 154 prøver med invasiv mammapcarinom er farvet med hhv. Ki67 og CK8/18. Manuel tælling udføres i ROI, der repræsenterer hele snittet, som anbefalet af Dowsett et al. (44). DB udføres på hele snit af platformene fra hhv. Visiopharm og HALO, med udelukkelse af større områder af carcinoma in situ og normalt epitelvæv. Databehandling består af Bland-Altman plots og Spearmans test, som igen ligner Cohens kappa og ICC. Der ses en tendens til højere Ki67-PI værdier ved manuel tælling end DB, median 12,2-12,6% mod 13,5%. Spearmans koefficient bliver 0,93 for Visiopharms platform sammenlignet med manuel tælling.

Resultaterne fra dette projekt er ikke direkte sammenlignelige med fundene fra disse studier, da andre test end Cohens kappa anvendes. Tolkningen af testenes koefficienter svarer dog overens, hvorfor en vis grad af sammenlignelig kan opnås. Alle tre studier finder højere koefficienter ved sammenligning af DB og manuel tælling, end det er tilfældet i dette projekt. For Zhong et al. (61) ses overordnede ICC-værdier på over 0,9, hvorimod denne falder til 0,678 for hotspots ved prøver med Ki67-PI i intervallet 11-30%. Denne sammenhæng modstrider fundet i dette projekt, hvor sammenligneligheden ses at være bedst i intervallet 0-30% for hotspots, hvorefter variationen stiger. Metodevariationen for Zhong et al. (61) og dette forsøg er dog stor, da der i denne artikel ikke anvendes tumormarkør til virtuel dobbeltfarvning, samtidigt anvendes en anden DB platform. P-værdierne for Wilcoxon testen stemmer dog overens med fundene i dette projekt, da disse bliver $<0,0001$.

Artiklen af Røge et al. (32) beskriver det forsøg, der bedst kan sammenlignes med metoden i dette projekt. Her anvendes samme IH analyser og samme software til DB. I artiklen udregnes ICC-koefficienter på 0,97 for hele coren og 0,98 for udvalgte områder heri. Derudover ses en tendens, lignende hvad der findes i dette projekt, til at DB resulterer i lavere Ki67-PI end manuel tælling. Koefficienterne der beskriver sammenhængen mellem DB og manuel estimering er i denne artikel også betydeligt højere, end hvad der ses i dette projekt, hvor kappa-koefficienten i hotspots er 0,7. Denne forskel kan muligvis forklares ved metodeforskellene. Forsøget i artiklen anvender cores, hvor carcinoma in situ samt og normalt epitelvæv udelukkes, hvorimod der i dette projekt ikke er taget hensyn til DCIS. Derudover anvendes en systematisk metode til

manuel tælling af Ki67-PI, hvorimod Ki67-PI ved manuel estimering i dette projekt er opnået ved en semi-kvantitativ vurdering.

Koopman et al. (7) finder ligeledes en tendens til, at DB giver lavere Ki67 værdier end manuel tælling, ligesom der findes i dette projekt. Spearmans koefficient beregnes i artiklen til 0,96, hvilket viser en bedre sammenhæng mellem metoderne, end det er tilfældet i dette projekt. En væsentlig forskel mellem dette projekt og forsøget i artiklen består i, at artiklen anvender metoden til manuel tælling anbefalet af Dowsett et al. (44), som giver en Ki67-PI der er repræsentativ for hele snittet og ikke kun hotspots. Derfor sammenlignes den manuelle tælling i artiklen også kun med DB af hele tumorsnittet. Derudover er carcinoma in situ samt normalt epitelvæv udelukket i denne artikel, hvilket resulterer i et mere korrekt estimat af Ki67-PI, og muligvis også højere værdier ved DB.

Flere af fundene i dette projekt bekræftes af lignende fund i disse artikler. Både Røge et al. (32) og Koopman et al. (7) beskriver tendensen til at DB giver lavere Ki67-PI end manuel estimering, som det også ses i dette projekt. For alle studierne ses der højere korrelationskoefficienter mellem manuel tælling og DB end ved dette projekt. Dette ses muligvis som en konsekvens af forskelle i metoden for manuel estimering af Ki67-PI samt manglende udelukkelse af DCIS i dette projekt.

Intern validitet

Ved DB af den virtuelle dobbeltfarvning Ki67/AE1/AE3 er der ikke taget hensyn til DCIS. DCIS kan ved denne IH metode ikke identificeres ud fra farvningen af cellerne, men kunne eventuelt være identificeret ud fra struktur og morfologi, f.eks. ved at undersøge om basalmembranen i et tumorområde er brudt. Dette vil ikke kunne gøres for DB af ROI 100% og 25%, da disse ROI er for store til at kunne udelukke sådanne områder. Ved DB af hotspot kunne udvælgelsen af tumorområde til hotspot dog have inkluderet en undersøgelse af tumorområdets basalmembran. Dette betyder, at Ki67-PI ved DB af ROI hotspot for visse prøver kan være beregnet på baggrund af DCIS. DCIS er ikke relevant ved vurdering af Ki67-PI, da kun invasiv tumor ønskes vurderet. Ki67-PI beregnet ud fra DCIS kan variere fra den Ki67-PI, der ville være beregnet ud fra invasive tumorområder. Størrelsen af denne eventuelle variation er uvist, men det vides dog, at tumorsnit udviser et heterogent udtryk af Ki67, hvorfor en vis variation er sandsynlig. En variation vil kunne resultere i et falsk forhøjet eller nedsat Ki67-PI.

Til metodesammenligningen mellem p63/CK8/18 og AE1/AE3 er der valgt de samme områder til manuel estimering af Ki67-PI. Dette er fordi områder af DCIS udelukkes på baggrund af p63-påvisning i p63/CK8/18 snittet. For bedst mulig sammenligning af tumormarkørerne er det valgt, at disse DCIS områder også udelukkes fra AE1/AE3 snittet. Alternativt kunne DCIS områder have været udelukket kun for p63/CK8/18 snittet, således at tumorområder ud fra AE1/AE3 havde inkluderet disse. Dette ville dog betyde, at forskellige områder skulle anvendes til sammenligning. Dette kunne betyde, at Ki67-PI ville variere pga. andre faktorer end selve tumormarkøren, som f.eks. heterogent Ki67 udtryk. Derimod ville det have givet en bedre repræsentation af de forskelle, der kan opstå mellem metoderne når DB anvendes. Dog ville dette også være ukorrekt, da DCIS områder ikke burde tælles med i vurderingen af Ki67-PI.

Prøverne blev mikrotomeret på et slædemikrotom af en erfaren bioanalytiker. Dette var pga. travlhed i laboratoriet som betød at rotationsmikrotomerne var optagede. Kontrollerne og prøverne der skulle omkøres blev mikrotomeret på et rotationsmikrotom. Dette kan have haft betydning for alignment af snittene ved DB, da slædemikromet besværliggør fremstillingen af ensartede seriesnit i forhold til rotationsmikrotomet. Det optimale ville være udelukkende at have brugt rotationsmikrotomet, hvor det er lettere at fremstille seriesnit, samtidigt med at sikre ensartethed mellem snittene. Ved at mikrotomere alle prøver på ét type mikrotom ville der ydermere udelukkes en præanalytisk variationsfaktor.

Ydermere kunne alignment ved DB forbedres gennem en mere omfattende og systematisk gennemgang af den automatiske alignment. I dette projekt er den automatiske alignment kontrolleret makroskopisk ud fra karakteristiske strukturer. En metode med fastsat mikroskopisk gennemgang af flere strukturer og evt. celler, kunne muligvis resultere i en mere korrekt alignment og dermed også Ki67-PI.

En anden præanalytisk variationsfaktor er forskellen i den tid snittene tilbragte på varmepladen. Ved forsøgets udførelse har tiden varieret mellem 10-30 minutter. Længere tid vil resultere i bedre adhæsion, men for lang tid (oftest over 1 time ved 60°C) vil udtørre vævet og mindske antigenitet. En standardisering af denne tid ville udelukke eventuel variation som følge af forskellige tider på varmeplade. (14)

Valget om udelukkende at bruge duktale mammakarcinomer kan have begrænset projektets evne til at vurdere DB i forhold til estimering af Ki67-PI på andre typer mammakarcinomer.

Morfologiske forskelle i tumortyper, der eventuelt kan have betydning for DB's tolkning af Ki67-PI, bliver derfor ikke inkluderet i dette projekt. Det ses derudover, at studierne der inddrages i vurderingen af projektets eksterne validitet, alle medtager forskellige typer af mammakarcinomer.

Konklusion

Størrelsen af ROI ses at have stor betydning for Ki67-PI ved DB. Ki67-PI ud fra hotspots med en median på 21% bliver betydeligt højere end for ROI på 100% og 25%, begge med medianer på 9%. Patologens estimering af Ki67-PI er generelt højere end for DB uanset ROI, hvorfor DB ved ROI hotspot ses at have den bedste sammenlignelighed med patologen med en kappa-koefficient på 0,7, hvilket svarer til en god overensstemmelse. ROI på 100% og 25% ved DB resulterer i kappa-koefficienter på 0,3 hvilket svarer til en nogenlunde overensstemmelse. For DB af hotspot ses den bedste sammenlignelighed med patologens estimering at være i intervallet 0-30% Ki67-PI, hvilket typisk indeholder den kliniske cut-off grænse. For DB af ROI på 100% og 25% er patologens estimering konsekvent højere, samtidig med at forskellen stiger i takt med størrelsen af Ki67-PI. Dette er også tilfældet for ROI hotspot i intervallet Ki67-PI >30%.

Anvendelse af p63/CK8/18 som tumormarkør kan ikke vises at forårsage variation i Ki67-PI ud fra den visuelle vurdering i dette projekt, da alle Ki67-PI er blevet vurderet som fuldstændigt overensstemmende. Ved DB vurderes der at være mulighed for variation mellem metoderne, da tumorområderne her kan variere ved tilstedeværelse af DCIS.

Perspektivering

Det vil være relevant at undersøge hvordan IH analysen p63/CK8/18 påvirker Ki67-PI ved DB, i forhold til både DB af AE1/AE3 samt den manuelle vurdering heraf. Dette vil kræve adgang til APPen "20101 - Invasive Tumor Detection (PDS)", der kan identificere invasive tumorområder ud fra en fysisk dobbeltfarvning. Det er realistisk at antage, at patologen ved manuel estimering af Ki67-PI frasorterer strukturer der ligner DCIS. Denne egenskab har DB ikke med AE1/AE3 som tumormarkør. DB med p63/CK8/18 som tumormarkør kan formentlig give bedre mulighed for fuldstændigt automatiseret DB, fordi DCIS udelukkes ud fra p63-påvisning. En sådan metodesammenligning af forskellige IH metoder kan give svar på, om p63-påvisning har betydning for Ki67-PI ved DB. (60)

Litteraturliste

1. Brystkræft, Lægehåndbogen, sundhed.dk [Internet]. [henvist 4. november 2019]. Tilgængelig hos: <https://www.sundhed.dk/sundhedsfaglig/laegehaandbogen/brystsygdomme/tilstande-og-sygdomme/kvinder/brystkraeft/>
2. NORDCAN, Kræftstatistik: Nøgletal og figurer [Internet]. [henvist 4. november 2019]. Tilgængelig hos: <http://www-dep.iarc.fr/NORDCAN/DK/StatsFact.asp?cancer=200&country=208>
3. Christiansen P, Jylling AMB, Nielsen MH, Ejlersen B, Vejborg I, Gerdes A-M, m.fl. Kapitel 3. Patologi. [Internet]. Danish Breast Cancer Cooperative Group; [henvist 4. november 2019]. Tilgængelig hos: http://www.dbcg.dk/PDF%20Filer/Kap_3_Patologi_22_juni_2017.pdf
4. Kroman N, Knop AS. Tidlig opsporing og behandling af brystkræft. Ugeskr Læg. 12. november 2018;(180:V05180370):4.
5. Stålhammar G, Martinez NF, Lippert M, Tobin NP, Mølholm I, Kis L, m.fl. Digital image analysis outperforms manual biomarker assessment in breast cancer. Mod Pathol. april 2016;29(4):318–29.
6. Skeem M. Syddanske patienter kan se frem til hurtigere diagnoser [Internet]. Sundhedspolitisk Tidsskrift. [henvist 11. november 2019]. Tilgængelig hos: <https://sundhedspolitisktidsskrift.dk/nyheder/2493-sadan-digitaliserer-region-syddanmark-patologien.html>
7. Koopman T, Buikema HJ, Hollema H, de Bock GH, van der Vegt B. Digital image analysis of Ki67 proliferation index in breast cancer using virtual dual staining on whole tissue sections: clinical validation and inter-platform agreement. Breast Cancer Res Treat. 1. maj 2018;169(1):33–42.
8. Vouza E. Mammapatologi [Internet]. Patologisk Afdeling SHS; 2018 [henvist 11. november 2019]. Tilgængelig hos: DokumentID: 145291, ver. 2.3
9. 20002 - PCK VDS, Tumor Detection [Internet]. [henvist 4. november 2019]. Tilgængelig hos: <https://www.visiopharm.com/app-center/355-20002-pck-vds-tumor-detection>
10. Jylling AMB. Mamma [Internet]. OUH Patologi; 2019 [henvist 26. april 2019]. Tilgængelig hos: DokumentID: 1399
11. 1_bioanalytikernes_fagetiske_univers_-_pdf-pjece.pdf [Internet]. [henvist 6. november 2019]. Tilgængelig hos: http://www.dbio.dk/fag-og-viden/fagetik/Bioanalytikernes-fagetiske-univers/Documents/1_bioanalytikernes_fagetiske_univers_-_pdf-pjece.pdf
12. Brüel A. Genesers histologi. Kbh.: Munksgaard; 2016.
13. Marcussen N. Kompendium i patologi. Kbh.: FADL; 2012.
14. Vyberg M. Anvendt Immunhistokemi. 7. udgave. Kbh.: Bioanalytikeruddannelsen i København; 2007.
15. Jelsbak V, Hallager K. Farvning af celler og væv. 5. udgave. Århus: VIA University College Bioanalytikeruddannelsen; 2013.
16. PACKAGE INSERT, EZ PREP 10X CONCENTRATE, DANISH [Internet]. Ventana Medical System Inc.; 2012 [henvist 11. november 2019]. Tilgængelig hos: <http://reagent-catalog.roche.com/product/205?type=208>

17. Clearify™, to remove paraffin from tissue sections | Agilent [Internet]. [henvist 11. november 2019]. Tilgængelig hos: <https://www.agilent.com/en/product/dako-omnis-solution-for-ihc-ish/ihc-ancillaries-accessories/clearify-75889>
18. PACKAGE INSERT, CELL CONDITIONING SOLUTION (CC1), DANISH [Internet]. Ventana Medical System Inc.; 2010 [henvist 11. november 2019]. Tilgængelig hos: <http://reagent-catalog.roche.com/product/203?type=204>
19. Package Insert, EnVision FLEX, High pH (Dako Omnis) - DK [Internet]. Dako Denmark A/S; 2019 [henvist 11. november 2019]. Tilgængelig hos: https://www.agilent.com/cs/library/packageinsert/public/P04120DK_02.pdf
20. PKG INS OptiView DAB IHC Detection Kit, Danish [Internet]. Ventana Medical System Inc.; 2011 [henvist 11. november 2019]. Tilgængelig hos: <http://reagent-catalog.roche.com/product/1574?type=2037>
21. PKG INSERT, ULTRAVIEW ALKALINE PHOSPHATASE RED DETECTION KIT, DANISH [Internet]. Ventana Medical System Inc.; 2016 [henvist 11. november 2019]. Tilgængelig hos: <http://reagent-catalog.roche.com/product/192?type=185>
22. PACKAGE INSERT, LIQUID COVERSIP, LOW TEMPERATURE, DANISH [Internet]. Ventana Medical System Inc.; 2011. Tilgængelig hos: <http://reagent-catalog.roche.com/product/210?type=221>
23. PACKAGE INSERT, REACTION BUFFER CONCENTRATE (10X), DANISH [Internet]. Ventana Medical System Inc.; 2009 [henvist 11. november 2019]. Tilgængelig hos: <http://reagent-catalog.roche.com/product/207?type=212>
24. OptiView Detection Chemistry [Internet]. Ventana Medical System Inc.; 2011 [henvist 11. november 2019]. Tilgængelig hos: http://reagent-catalog.roche.com/documents/OptiView_F&B_Brochure.pdf
25. Colorimetric Alkaline Phosphatase and Peroxidase Substrate Detection Systems [Internet]. Sigma-Aldrich. [henvist 11. november 2019]. Tilgængelig hos: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/colorimetric-alkaline.html>
26. NordiQC - Immunohistochemical Quality Control [Internet]. [henvist 11. november 2019]. Tilgængelig hos: <https://www.nordiqc.org/epitope.php?id=78>
27. Bendsen T. Noter i statistik [Internet]. <http://statnoter.dk>. 2017 [henvist 3. oktober 2019]. Tilgængelig hos: <https://statnoter.dk/index.php?pageID=144>
28. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro Jr G, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, m.fl. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12 155 patients. *Br J Cancer*. maj 2007;96(10):1504–13.
29. CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) Rabbit Monoclonal Primary Antibody [Internet]. [henvist 11. november 2019]. Tilgængelig hos: <http://reagent-catalog.roche.com/product/114?type=108>
30. Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin Clones AE1/AE3 [Internet]. Dako Denmark A/S; [henvist 11. november 2019]. Tilgængelig hos: <https://www.agilent.com/cs/library/packageinsert/public/107609005.PDF>

31. CK8 & CK18 Cocktail (EP17/EP30) Rabbit Monoclonal Antibody [Internet]. [henvist 11. november 2019]. Tilgængelig hos: http://www.cellmarque.com/antibodies/EP/2575/CK8-CK18-Cocktail_EP17-EP30
32. Røge R, Riber-Hansen R, Nielsen S, Vyberg M. Proliferation assessment in breast carcinomas using digital image analysis based on virtual Ki67/cytokeratin double staining. *Breast Cancer Res Treat.* 1. juli 2016;158(1):11–9.
33. VENTANA anti-p63 (4A4) Mouse Monoclonal Primary Antibody [Internet]. [henvist 11. november 2019]. Tilgængelig hos: <http://reagent-catalog.roche.com/product/1529?type=1986>
34. NDP.scan U10074-01 Instruction Manual [Internet]. Hamamatsu; 2011 [henvist 11. november 2019]. Tilgængelig hos: <http://www3.unifr.ch/bioimage/wp-content/uploads/2013/09/NDPScan.pdf>
35. NanoZoomer series [Internet]. Hamamatsu; 2014 [henvist 18. november 2019]. Tilgængelig hos: http://www.hamamatsu.com.cn/UserFiles/DownFile/Product/SBIS0043E04_NanoZoomers.pdf?fbclid=IwAR2BZIMxQ0ItM-gOgkNPgyomGjtpM5nrSrq3Wr59Q79Ua6E97Mp6MP79nDo
36. Figure 3 (Left) Tile-based and (Middle) line-based scanning methods.... [Internet]. ResearchGate. [henvist 18. november 2019]. Tilgængelig hos: https://www.researchgate.net/figure/Left-Tile-based-and-Middle-line-based-scanning-methods-Right-Line-based-scanning_fig3_279231201
37. Visiopharm APP Betjeningsprocedure. Visiopharm A/S; 2018.
38. Boyce RW, Gundersen HJG. The Automatic Proportionator Estimator Is Highly Efficient for Estimation of Total Number of Sparse Cell Populations. *Front Neuroanat* [Internet]. 21. marts 2018 [henvist 18. november 2019];12. Tilgængelig hos: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5871675/>
39. 90004 - Ki-67 APP, Breast Cancer [Internet]. [henvist 11. november 2019]. Tilgængelig hos: <https://www.visiopharm.com/app-center/358-90004-ki-67-app-breast-cancer>
40. Thakur SS, Li H, Chan AMY, Tudor R, Bigras G, Morris D, m.fl. The use of automated Ki67 analysis to predict Oncotype DX risk-of-recurrence categories in early-stage breast cancer. *PLOS ONE.* 5. januar 2018;13(1):e0188983.
41. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, m.fl. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol.* september 2013;24(9):2206–23.
42. Yeo M-K, Kim HE, Kim SH, Chae BJ, Song BJ, Lee A. Clinical usefulness of the free web-based image analysis application ImmunoRatio for assessment of Ki-67 labelling index in breast cancer. *J Clin Pathol.* 1. august 2017;70(8):715–9.
43. Combs SE, Han G, Mani N, Beruti S, Nerenberg M, Rimm DL. Loss of antigenicity with tissue age in breast cancer. *Lab Invest.* marts 2016;96(3):264–9.
44. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, m.fl. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 16. november 2011;103(22):1656–64.

45. Vejledning om brug af biologisk materiale i sundhedsvidenskabelige forskningsprojekter [Internet]. [henvist 15. november 2019]. Tilgængelig hos: http://www.nvk.dk/emner/biobanker/vejledning-om-bio-mat#3.1.1_Anonymt_eller_fuldst%C3%A6ndigt_anonymiseret_materiale
46. TEN4UF. Validering af analysemetoder [Internet]. Sygehus Lillebælt; 2014 [henvist 15. november 2019]. Tilgængelig hos: 9616 ver. 1.1
47. Sikkerhedsdatablad Clearify Clearing Agent [Internet]. Dako Denmark A/S; 2017 [henvist 17. november 2019]. Tilgængelig hos: https://www.chem.agilent.com/cs/library/msds/SDS308_EUDanish.pdf
48. Ny faremærkning (CLP) - styrpaastofferne.dk [Internet]. [henvist 15. november 2019]. Tilgængelig hos: https://www.styrpaastofferne.dk/maerkning/ny_faremaerkning_clp#.WEre6rLhDIU
49. EnVision FLEX, High pH (Dako Omnis) [Internet]. Dako Denmark A/S; 2018 [henvist 17. november 2019]. Tilgængelig hos: https://www.agilent.com/cs/library/packageinsert/public/P04120DK_02.pdf
50. Safety Data Sheet OptiView DAB Detection Kit [Internet]. Roche; [henvist 17. november 2019]. Tilgængelig hos: https://pim-eservices.roche.com/eLD_SF/us/en/Documents/GetDocument?documentId=ff95d9a9-93ad-e811-b0ba-00215a9b3428
51. Safety Data Sheet 10X EZ PREP SOLUTION, 2L [Internet]. Roche; 2018 [henvist 17. november 2019]. Tilgængelig hos: https://pim-eservices.roche.com/eLD_SF/us/en/Documents/GetDocument?documentId=b71d319b-887d-e811-cb90-00215a9b3428
52. Ventana 2019. Klinisk Patologisk afdeling SHS; 2019.
53. NordiQC - Immunohistochemical Quality Control [Internet]. [henvist 17. november 2019]. Tilgængelig hos: <https://www.nordiqc.org/epitope.php?id=1>
54. NordiQC - Immunohistochemical Quality Control [Internet]. [henvist 17. november 2019]. Tilgængelig hos: <https://www.nordiqc.org/epitope.php?id=62>
55. Komitéloven - Bekendtgørelse af lov om videnskabsetisk behandling af sundhedsvidenskabelige forskningsprojekter - retsinformation.dk [Internet]. [henvist 17. november 2019]. Tilgængelig hos: <https://www.retsinformation.dk/Forms/r0710.aspx?id=192671>
56. Bekendtgørelse af sundhedsloven1) [Internet]. LBK nr 1286 nov 2, 2018. Tilgængelig hos: <https://www.retsinformation.dk/forms/R0710.aspx?id=203757#id37bb78bc-0e47-4abb-a980-29bbe7cfb6bd>
57. Hvad skal jeg anmelde? [Internet]. [henvist 17. november 2019]. Tilgængelig hos: <http://www.nvk.dk/forsker/naar-du-anmelder/hvilke-projekter-skal-jeg-anmelde>
58. What is ARGUMENTUM AB AUCTORITATE EST FOR- TISSIMNM IN LEGE? definition of ARGUMENTUM AB AUCTORITATE EST FOR- TISSIMNM IN LEGE (Black's Law Dictionary) [Internet]. The Law Dictionary. 2011 [henvist 17. november 2019]. Tilgængelig hos: <https://thelawdictionary.org/argumentum-ab-auctoritate-est-for-tissimnm-in-lege/>

59. Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*. marts 1977;33(1):159.
60. 20101 - Invasive Tumor Detection (PDS) [Internet]. [hent 2. december 2019]. Tilgængelig hos: <https://www.visiopharm.com/app-center/573-20101-invasive-tumor-detection-pds>
61. Zhong F, Bi R, Yu B, Yang F, Yang W, Shui R. A Comparison of Visual Assessment and Automated Digital Image Analysis of Ki67 Labeling Index in Breast Cancer. *PLOS ONE*. 29. februar 2016;11(2):e0150505.

Bilag

Bilag 1 - Farveprotokol AE1/AE3

Protokoloplysninger



Protokol - AE1/AE3

Version: 22-05-2019 10:47

Fjern voks					
Tofaset voksjernelse IHC					
Solvent	Transportvæske	Temperatur	Inkubation top	Inkubation bund	Cyklusser
Clearify Clearing Agent	DI Water	25 °C	10 s	1 min	1
Vask efter tofasets voksjernelse IHC					
Reagens	Inkubation	Cyklusser			
DI Water	5 s	1			
Epitop demaskering					
Epitop demaskering IHC					
Reagens	Temperatur	Inkubation	Kølevæske		
EnV FLEX TRS, High pH	97 °C	30 min	DI Water		
Vask uden target retrieval IHC					
Farvning					
Vask					
Reagens	Inkubation	Cyklusser			
Wash Buffer	2:40 min	2			
Enzymatisk forbehandling					
Vask					
Proteinblokker					
Primært antistof					
Reagens	Inkubation				
AE1/AE3 1+100	20 min				
Vask					
Reagens	Inkubation	Cyklusser			
Wash Buffer	2 min	10			
Endogen enzymblokker					
Reagens	Inkubation				
EnV FLEX Peroxidase-	3 min				

Udskrev 23-10-2019 13:26 af SHS

Side 1 af 3

Protokoloplysninger



Blocking Reagent					
Vask					
Reagens	Inkubation	Cyklusser			
Wash Buffer	2 min	10			
Sekundært reagens					
Vask					
Sekundært reagens					
Vask					
Mærket polymer					
Reagens	Inkubation				
EnV FLEX/HRP	20 min				
Vask					
Reagens	Inkubation	Cyklusser			
Wash Buffer	2 min	10			
Vask					
Reagens	Inkubation	Cyklusser			
Wash Buffer	2 min	10			
Vask					
Reagens	Inkubation	Cyklusser			
DI Water	15 min	1			
Vask					
Reagens	Inkubation	Cyklusser			
Wash Buffer	2 min	10			
Kromogent substrat					
Reagens	Inkubation				
EnV FLEX Substrate Working Solution	5 min				
Vask					
Reagens	Inkubation	Cyklusser			
Wash Buffer	2 min	10			
Vask					
Reagens	Inkubation	Cyklusser			
DI Water	31 s	1			

Udskrev 23-10-2019 13:26 af SHS

Side 2 af 3

Protokoloplysninger



Vask		
Reagens	Inkubation	Cyklusser
Wash Buffer	2 min	10
Modfarvning		
Kontrastfarve		
Reagens	Inkubation	
Hematoxylin	3 min	
Vask		
Reagens	Inkubation	Cyklusser
DI Water	2 min	10
Vask		
Reagens	Inkubation	Cyklusser
Wash Buffer	2 min	10

Protocol # 451 : KI67 (10/29/2019)

Procedure: U OptiView DAB IHC v6 (v1.00.0136)

BenchMark ULTRA IHC/ISH Staining Module

Ventana Medical Systems, Inc., 1910 Innovation Park Drive Tucson, Arizona USA

Step No	Procedure Step
1	Enable Mixers
2	Warmup Slide to [75 Deg C], and Incubate for [32 Minutes] (Baking)
3	Disable Mixers
4	[72°C is the standard temperature]
5	Warmup Slide to [75 Deg C] from Medium Temperatures (Deparaffinization)
6	Incubate for 4 Minutes
7	Apply EZPrep Volume Adjust
8	Rinse Slide With EZ Prep
9	Apply EZPrep Volume Adjust
10	Apply Coverslip
11	Rinse Slide With EZ Prep
12	Apply EZPrep Volume Adjust
13	Apply Coverslip
14	Rinse Slide With EZ Prep
15	Apply EZPrep Volume Adjust
16	Apply Coverslip
17	Rinse Slide With EZ Prep
18	Apply Depar Volume Adjust
19	Apply Coverslip
20	Enable Mixers
21	Disable Slide Heater
22	Pause Point (Landing Zone)
23	Rinse Slide With EZ Prep
24	Apply Long Cell Conditioner #1
25	Apply CC Coverslip Long
26	[100°C is the standard temperature]
27	Warmup Slide to [95 Deg C], and Incubate for 4 Minutes (Cell Conditioner #1)
28	Incubate for 4 Minutes
29	Incubate for 8 Minutes
30	Apply Cell Conditioner #1
31	Apply CC Medium Coverslip No BB
32	Incubate for 8 Minutes
33	Incubate for 8 Minutes
34	Apply Cell Conditioner #1
35	Apply CC Medium Coverslip No BB
36	Incubate for 8 Minutes
37	Apply Cell Conditioner #1
38	Apply CC Medium Coverslip No BB
39	Apply Cell Conditioner #1
40	Apply CC Medium Coverslip No BB
41	Apply Cell Conditioner #1
42	Apply CC Medium Coverslip No BB
43	Disable Slide Heater
44	Apply Cell Conditioner #1
45	Apply CC Medium Coverslip No BB

* one drop is one reagent dispense
Ventana Medical Systems, Inc., 1910 Innovation Park Drive Tucson, Arizona USA
VSS v12.3 Build 0055

Printed 11/13/2019 11:51:08 AM
Page 1 of 3

Protocol # 451 : KI67 (10/29/2019)

Procedure: U OptiView DAB IHC v6 (v1.00.0136)

BenchMark ULTRA IHC/ISH Staining Module

Ventana Medical Systems, Inc., 1910 Innovation Park Drive Tucson, Arizona USA

Step No	Procedure Step
46	Rinse Slide With Reaction Buffer
47	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
48	Apply Coverslip
49	Pause Point (Landing Zone)
50	Warmup Slide to 36 Deg C
51	Rinse Slide With Reaction Buffer
52	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
53	Apply One Drop of OV PEROX IHBTR, Apply Coverslip, and Incubate for 4 Minutes
54	Rinse Slide With Reaction Buffer
55	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
56	Apply Coverslip
57	[If not selected, temperature will default to 36°C.]
58	Warmup Slide to 36 Deg C
59	Rinse Slide With Reaction Buffer
60	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer With Label Blow Off
61	Apply Coverslip, One Drop of [KI-67 (30-9)] (Antibody), and Incubate for [0 Hr 16 Min]
62	[Titration will only happen if selected]
63	Warmup Slide to 36 Deg C
64	Rinse Slide With Reaction Buffer
65	Apply 230ul + VA Reaction Buffer
66	Apply Coverslip
67	Rinse Slide With Reaction Buffer
68	Apply 230ul + VA Reaction Buffer
69	Apply Coverslip
70	Rinse Slide With Reaction Buffer
71	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer With Label Blow Off
72	Apply Coverslip, One Drop of OV HQ UNIV LINKR, and Incubate for [8 Minutes]
73	Rinse Slide With Reaction Buffer
74	Apply 230ul + VA Reaction Buffer
75	Apply Coverslip
76	Rinse Slide With Reaction Buffer
77	Apply 230ul + VA Reaction Buffer
78	Apply Coverslip
79	Rinse Slide With Reaction Buffer
80	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer With Label Blow Off
81	Apply Coverslip, One Drop of OV HRP MULTIMER, and Incubate for [8 Minutes]
82	Rinse Slide With Reaction Buffer
83	Apply 230ul + VA Reaction Buffer
84	Apply Coverslip
85	Rinse Slide With Reaction Buffer
86	Apply 230ul + VA Reaction Buffer
87	Apply Coverslip
88	Rinse Slide With Reaction Buffer
89	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
90	Apply One Drop of OV H2O2 and One Drop of OV DAB, Apply Coverslip, Incubate for 8 Minutes

* one drop is one reagent dispense

Ventana Medical Systems, Inc., 1910 Innovation Park Drive Tucson, Arizona USA
VSS v12.3 Build 0055

Printed 11/13/2019 11:51:08 AM

Page 2 of 3

Protocol # 451 : KI67 (10/29/2019)

Procedure: U OptiView DAB IHC v6 (v1.00.0136)

BenchMark ULTRA IHC/ISH Staining Module

Ventana Medical Systems, Inc., 1910 Innovation Park Drive Tucson, Arizona USA

Step No	Procedure Step
91	Rinse Slide With Reaction Buffer
92	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
93	Apply One Drop of OV COPPER, Apply Coverslip, and Incubate for 4 Minutes
94	Rinse Slide With Reaction Buffer
95	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
96	Apply One Drop of [HEMATOXYLIN II] (Counterstain), Apply Coverslip, and Incubate for [8 Minutes]
97	Rinse Slide With Reaction Buffer
98	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
99	Apply Coverslip
100	Rinse Slide With Reaction Buffer
101	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
102	Apply One Drop of [BLUING REAGENT] (Post Counterstain), Apply Coverslip, and Incubate for [4 Minutes]
103	Rinse Slide With Reaction Buffer
104	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
105	Apply Coverslip
106	Disable Slide Heater
107	Rinse Slide With Reaction Buffer

Protocol # 260 : P63CK8 (10/08/2019)
Procedure: U IHC DS oDAB-uRed v5 (v1.01.0006)

BenchMark ULTRA IHC/ISH Staining Module
Ventana Medical Systems, Inc., 1910 Innovation Park Drive Tucson, Arizona USA

Step No	Procedure Step
1	Enable Mixers
2	Warmup Slide to [75 Deg C], and Incubate for [32 Minutes] (Baking)
3	Disable Mixers
4	[72°C is the standard temperature]
5	Warmup Slide to [75 Deg C] from Medium Temperatures (Deparaffinization)
6	Apply EZPrep Volume Adjust
7	Rinse Slide With EZ Prep
8	Apply EZPrep Volume Adjust
9	Apply Coverslip
10	Rinse Slide With EZ Prep
11	Apply EZPrep Volume Adjust
12	Apply Coverslip
13	Rinse Slide With EZ Prep
14	Apply EZPrep Volume Adjust
15	Apply Coverslip
16	Rinse Slide With EZ Prep
17	Apply Depar Volume Adjust
18	Apply Coverslip
19	Enable Mixers
20	Disable Slide Heater
21	Pause Point (Landing Zone)
22	Rinse Slide With EZ Prep
23	Apply Long Cell Conditioner #1
24	Apply CC Coverslip Long
25	[100°C is the standard temperature]
26	Warmup Slide to [95 Deg C], and Incubate for 4 Minutes (Cell Conditioner #1)
27	Incubate for 4 Minutes
28	Incubate for 8 Minutes
29	Apply Cell Conditioner #1
30	Apply CC Medium Coverslip No BB
31	Incubate for 8 Minutes
32	Apply Cell Conditioner #1
33	Apply CC Medium Coverslip No BB
34	Apply Cell Conditioner #1
35	Apply CC Medium Coverslip No BB
36	Apply Cell Conditioner #1
37	Apply CC Medium Coverslip No BB
38	Disable Slide Heater
39	Apply Cell Conditioner #1
40	Apply CC Medium Coverslip No BB
41	Rinse Slide With Reaction Buffer
42	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
43	Apply Coverslip
44	Pause Point (Landing Zone)
45	Warmup Slide to 36 Deg C

* one drop is one reagent dispense
Ventana Medical Systems, Inc., 1910 Innovation Park Drive Tucson, Arizona USA
VSS v12.3 Build 0055

Printed 11/13/2019 11:52:13 AM
Page 1 of 4

Protocol # 260 : P63CK8 (10/08/2019)
Procedure: U IHC DS oDAB-uRed v5 (v1.01.0006)

BenchMark ULTRA IHC/ISH Staining Module

Ventana Medical Systems, Inc., 1910 Innovation Park Drive Tucson, Arizona USA

Step No	Procedure Step
46	Rinse Slide With Reaction Buffer
47	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
48	Apply One Drop of OV PEROX IHBTR, Apply Coverslip, and Incubate for 4 Minutes
49	Rinse Slide With Reaction Buffer
50	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
51	Apply Coverslip
52	Rinse Slide With Reaction Buffer
53	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
54	Apply Coverslip
55	[If not selected, temperature will default to 36°C.]
56	Warmup Slide to 36 Deg C
57	Rinse Slide With Reaction Buffer
58	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
59	Apply Coverslip, One Drop of [anti-p63(4A4)] (Antibody), and Incubate for [0 Hr 32 Min]
60	[Titration will only happen if selected]
61	Warmup Slide to 36 Deg C
62	Rinse Slide With Reaction Buffer
63	Apply 230ul + VA Reaction Buffer
64	Apply Coverslip
65	Rinse Slide With Reaction Buffer
66	Apply 230ul + VA Reaction Buffer
67	Apply Coverslip
68	Rinse Slide With Reaction Buffer
69	[If not selected, HQ Universal Linker will dispense and incubate 8 min in normal slide volume.]
70	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
71	Apply Coverslip, One Drop of OV HQ UNIV LINKR, and Incubate for 8 Minutes
72	Rinse Slide With Reaction Buffer
73	Apply 230ul + VA Reaction Buffer
74	Apply Coverslip
75	Rinse Slide With Reaction Buffer
76	Apply 230ul + VA Reaction Buffer
77	Apply Coverslip
78	Rinse Slide With Reaction Buffer
79	[If not selected, HRP Multimer will dispense and incubate 8 min in normal slide volume.]
80	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
81	Apply Coverslip, One Drop of OV HRP MULTIMER, and Incubate for 8 Minutes
82	Rinse Slide With Reaction Buffer
83	Apply 230ul + VA Reaction Buffer
84	Apply Coverslip
85	Rinse Slide With Reaction Buffer
86	Apply 230ul + VA Reaction Buffer
87	Apply Coverslip
88	Rinse Slide With Reaction Buffer
89	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
90	Apply One Drop of OV H2O2 and One Drop of OV DAB, Apply Coverslip, Incubate for 8 Minutes

* one drop is one reagent dispense

Ventana Medical Systems, Inc., 1910 Innovation Park Drive Tucson, Arizona USA
VSS v12.3 Build 0055

Printed 11/13/2019 11:52:13 AM

Page 2 of 4

Protocol # 260 : P63CK8 (10/08/2019)
Procedure: U IHC DS oDAB-uRed v5 (v1.01.0006)

BenchMark ULTRA IHC/ISH Staining Module

Ventana Medical Systems, Inc., 1910 Innovation Park Drive Tucson, Arizona USA

Step No	Procedure Step
91	Rinse Slide With Reaction Buffer
92	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
93	Apply One Drop of OV COPPER, Apply Coverslip, and Incubate for 4 Minutes
94	Rinse Slide With Reaction Buffer
95	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
96	Apply Coverslip
97	Disable Slide Heater
98	Pause Point (Landing Zone)
99	Rinse Slide With Reaction Buffer
100	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
101	Apply Coverslip
102	Apply 900ul of Reaction Buffer
103	Warmup Slide to 90 Deg C, and Incubate for 4 Minutes
104	Apply 900ul of Reaction Buffer
105	Warmup Slide to 36 Deg C, and Incubate for 4 Minutes
106	Rinse Slide With Reaction Buffer
107	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
108	Apply Coverslip
109	Rinse Slide With Reaction Buffer
110	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
111	Apply Coverslip
112	Pause Point (Landing Zone)
113	Warmup Slide to 36 Deg C
114	Rinse Slide With Reaction Buffer
115	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
116	Apply Coverslip
117	[If not selected, temperature will default to 36°C.]
118	Warmup Slide to 36 Deg C
119	Rinse Slide With Reaction Buffer
120	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
121	Apply One Drop of [PREP KIT 18] (DS Antibody), Apply Coverslip, and Incubate for [1 Hr 4 Min]
122	[Titration will only happen if selected]
123	Warmup Slide to 36 Deg C
124	Rinse Slide With Reaction Buffer
125	Apply 100ul + VA Reaction Buffer
126	Apply One Drop of UV Red UNIV MULT, Apply Coverslip, and Incubate for 12 Minutes
127	Rinse Slide With Reaction Buffer
128	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
129	Apply Coverslip
130	Rinse Slide With Reaction Buffer
131	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
132	Apply Coverslip
133	Rinse Slide With Reaction Buffer
134	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
135	Apply One Drop of UV Red Enhancer, Apply Coverslip, and Incubate for 4 Minutes

* one drop is one reagent dispense
 Ventana Medical Systems, Inc., 1910 Innovation Park Drive Tucson, Arizona USA
 VSS v12.3 Build 0055

Printed 11/13/2019 11:52:13 AM
 Page 3 of 4

Protocol # 260 : P63CK8 (10/08/2019)
Procedure: U IHC DS oDAB-uRed v5 (v1.01.0006)

BenchMark ULTRA IHC/ISH Staining Module
Ventana Medical Systems, Inc., 1910 Innovation Park Drive Tucson, Arizona USA

Step No	Procedure Step
136	Apply One Drop of UV Fast Red A and One Drop of UV Red Naphthol, and Incubate for 8 Minutes
137	Apply One Drop of UV Fast Red B, and Incubate for 8 Minutes
138	Rinse Slide With Reaction Buffer
139	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
140	Apply One Drop of [HEMATOXYLIN II] (Counterstain), Apply Coverslip, and Incubate for [4 Minutes]
141	Rinse Slide With Reaction Buffer
142	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
143	Apply Coverslip
144	Rinse Slide With Reaction Buffer
145	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
146	Apply One Drop of [BLUING REAGENT] (Post Counterstain), Apply Coverslip, and Incubate for [4 Minutes]
147	Rinse Slide With Reaction Buffer
148	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
149	Apply Coverslip
150	Disable Slide Heater
151	Rinse Slide With Reaction Buffer

Søgeprotokol til systematisk litteratursøgning på Bioanalytikeruddannelsen UC SYD

1. Opgavens problemstilling i korte træk eller opgavens problemformulering

Sammenligning af digital analyse på forskellige områdestørrelser af den virtuelle dobbeltfarvning (Ki67/AE1/AE3) af duktale mammakariner med manuel analyse af sammes proliferationsindeks. Derudover undersøges også sammenhængen af proliferationsindekset mellem de to farvninger (Ki67/AE1/AE3) og (Ki67/(p63/CK8/18)). Farvemeterne er valgt fordi (Ki67/AE1/AE3) anvendes på patologisk SHS Sønderborg, denne ønskes sammenlignet med metoden der bruges i Odense (Ki67/(p63/CK8/18)).

2. Nøgleord med udgangspunkt i opgavens problemstilling og problemformulering

Kædesøgning fra udleveret artikel "Proliferation assessment in breast carcinomas using digital image analysis based on virtual Ki67/cytokeratin double staining".

Bred søgning på google og Pubmed med centrale begreber fra ovenstående artikel.

Nøgleord: Digital billedanalyse, virtuel dobbeltfarvning, mammakariner, Ki67, AE1/AE3, p63, ck8/18, cytokeratin, proliferation, duktal.

3. Systematisering af nøgleord

Lokaliser danske og/eller engelske søgeord og synonymer, og systematiser dem i nedenstående tabel i henhold til PICO/PICo modellen.

	P	I	Co
Søgeord	mammakariner, duktal	digital billedanalyse	Ki67, proliferation index
Engelske synonymer	mamma OR breast carcinoma, ductal, breast neoplasms	digital image analysis (DIA), automated image analysis, computer assisted image analysis (CAIA)	labeling index, proliferative activity index (PAI)

Kontrollerede emneord (Fx MeSH termer, Cinahl Headings o.l.)	"Carcinoma, Ductal, Breast"[Mesh] "Breast Neoplasms"[Mesh]	"Image Processing, Computer-Assisted"[Mesh] "Automation"[Mesh]	"Ki-67 Antigen"[Mesh] "Mitotic Index"[Mesh] "Cell Proliferation"[Mesh]
--	---	---	--

Bloksøgning

Database: Pubmed				
Dato for søgning: 10.10.2019				
Antal hits: 72				
Antal udvalgte artikler: 6				
	P	I	C / Co	O
Søgeord				
Kontrollerede emneord	"Breast Neoplasms"[Mesh]	"Image Processing, Computer-Assisted"[Mesh]	"Cell Proliferation"[Mesh]	

72 resultater, 6 artikler udvalgt efter mest relevante overskrifter, og derefter relevante abstracts.

Relationship between the Ki67 index and its area based approximation in breast cancer

<https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-018-4735-5>

Digital image analysis of Ki67 proliferation index in breast cancer using virtual dual staining on whole tissue sections: clinical validation and inter-platform agreement

<https://link-springer-com.ez-son.statsbiblioteket.dk:12048/article/10.1007%2Fs10549-018-4669-2>

The use of automated Ki67 analysis to predict Oncotype DX risk-of-recurrence categories in early-stage breast cancer

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0188983>

Reproducibility and Prognostic Potential of Ki-67 Proliferation Index when Comparing Digital-Image Analysis with Standard Semi-Quantitative Evaluation in Breast Cancer

<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12253-017-0220-8>

Proliferation assessment in breast carcinomas using digital image analysis based on virtual Ki67/cytokeratin double staining

<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10549-016-3852-6>

A methodology to ensure and improve accuracy of Ki67 labelling index estimation by automated digital image analysis in breast cancer tissue

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4053156/>

Kædesøgning på de fundne artikler:

Clinical usefulness of the free web-based image analysis application ImmunoRatio for assessment of Ki-67 labelling index in breast cancer.:

<https://www-ncbi-nlm-nih-gov.ez-son.statsbiblioteket.dk:12048/pubmed/28298390>

Digital image analysis outperforms manual biomarker assessment in breast cancer.:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26916072>

A Comparison of Visual Assessment and Automated Digital Image Analysis of Ki67 Labeling Index in Breast Cancer.:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26928407>.

Comparison of Ki-67 labeling index measurements using digital image analysis and scoring by pathologists

<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12282-018-0885-1>

An International Ki67 Reproducibility Study

<https://academic.oup.com/jnci/article/105/24/1897/2517589>

The Use of Digital Images Improves Reproducibility of the Ki-67 Labeling Index as a Proliferation Marker in Breast Cancer

<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12253-013-9708-z>

The region-of-interest size impacts on Ki67 quantification by computer-assisted image analysis in breast cancer

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0046817715001926?via%3Dihub>

The Gold Standard Paradox in Digital Image Analysis: Manual Versus Automated Scoring as Ground Truth.

https://www.archivesofpathology.org/doi/10.5858/arpa.2016-0386-RA?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed