

Påvisning af p16 på celleblokke fra cervixcytologisk materiale

p16-immunfarvning er et velegnet supplement til på et tidligere stadie at finde de kvinder, der i første omgang behøver henvisning til gynækologisk speciallæge

I screeningsprogrammet for forstadier til cervixcancer henvises kvinder, der ved PAP-smear har fået diagnosen atypical squamous cells – cannot exclude HSIL (ASC-H), til gynækolog for videre udredning af sværhedsgraden af celleforandringer. Hos gynækologen bliver der foretaget kolposkopi, biopsi og cervixskrab (KBC) fra livmoderhalsen. Biopsien bliver på patologiafdelingen præpareret, og snit fra biopsien oversigtsfarves med HE og immunfarves med p16.

Der er en formodning om, at der er en stor grad af overdiagnosticering og overbehandling af lettere celleforandringer i screeningsprogrammet. Mange kvinder har ved biopsi kun lette celleforandringer og kunne måske have ventet med at blive henvist til gynækolog, til næste opfølgning viser celleforandringer.

At få foretaget biopsi fra livmoderhalsen kan give anledning til komplikationer i forbindelse med graviditet i form af spontan abort og for tidlig fødsel.

Ved den histologiske opfølgning kan det be- eller afkræftes, hvorvidt der er tale om dysplastiske celleforandringer, og det viser sig ofte, at mange af de kvinder, der bliver henvist til gynækolog med henblik på at få foretaget KBC, ikke har dysplastiske celleforandringer (1).

Især diagnosen ASC-H volder problemer. Oftest viser det sig, at der ikke er dysplastiske celler ved immunfarvning med p16 på vævssnit fra biopsien, men i de tilfælde hvor der er dysplastiske celler, vil det ofte være af en grad svarende til high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL), der er det sidste stadie inden carcinom in situ, for cytologisk materiale (2).

Det er derfor oplagt at undersøge, hvorvidt der kan indføres en teknik, der dels anvender det materiale, der allerede er udtaget, dels på et tidligere tidspunkt kan udelukke, hvilke kvinder der i første omgang ikke behøver henvisning til gynækologisk undersøgelse.

At udføre immunfarvning med p16 på celleblokke fremstillet af cervixcytologisk restmateriale kan måske hjælpe til at be- eller afkræfte diagnosen ASC-H fra PAP-smear hurtigere. Immun-

farvning med p16 på celleblokke kan derfor være en god indikator for, om patientens diagnose ASC-H skyldes dysplastiske forandringer (2).

Metoderne, der i dag anvendes til primær screening for cervixcancer, har stadig en høj rate af falsk positive og falsk negative diagnoser, og der er derfor stor interesse for at udvikle metodens validitet (2).

Immunfarvning med p16 er en sensitiv markør for celler med dysplastiske forandringer, afhængig af hvor fremskredne forandringerne er (2).

Anvendeligheden af p16-immunfarvning på celleblokke fremstillet af cervixcytologisk materiale med diagnosen ASC-H blev undersøgt i dette professionsbachelorprojekt.

ASC-H

ASC-H betegner atypiske pladeepitelceller – kan ikke udelukke HSIL og anvendes ved tvivl om sværhedsgraden af de cytologiske forandringer. Ved ASC-H ligner cellerne umodne parabasale celler eller umodne metaplastiske celler med ændret kernemorfologi og forstørret kerne/cytoplasma ratio.

ASC-H-celler kan ligge i små grupper, i mikrobiopsier med kerneoverlap eller være enkeltliggende. Når diagnosen ASC-H gives, er det, fordi de cytologiske forandringer ikke helt opfylder kriterierne ved HSIL.

p16

p16^{INK4a} findes i normale celler i lav koncentration. Celleforandringer, der kan føre til cervixcancer, skyldes overvejende infektion med HPV. Celler med højrisiko-HPV-typer inficeret i værtscellens DNA har en høj koncentration af E7, der hæmmer Rb. Rb virker regulerende på p16^{INK4a}, og celler inficeret med HPV vil derfor udtrykke meget p16^{INK4a}.

p16^{INK4a} kan påvises immunhistokemisk og viser, om der er en persisterende infektion med HPV.

Figur 1 viser de normale cellecyklusmekanismer og mekanismerne ved overekspression af p16^{INK4a} i forstadier til cervixcancer og ved cervixcancer ved integration af HPV i cervixceller.

Ud over dysplastiske pladeepitelceller, der udtrykker p16^{INK4a}, kan immunfarvning med p16 også ses positiv i inflammatoriske celler. p16^{INK4a} kan desuden udtrykkes i atypiske cervikale cylinderepitelceller, og der ses ofte uspecifik positiv reaktion i normale metaplastiske og parabasale pladeepitelceller, når markøren anvendes direkte på cytologisk materiale (4).



Af bioanalytiker //
Marie Kjøller-Hansen
 Klinisk Biokemisk Afdeling
 Roskilde Sygehus

Projektet er udført i samarbejde med medstuderende Anne Obling Madsen. Vejledere: Marianne Brandt, bioanalytikerunderviser, Patologisk Afdeling, Hillerød Hospital. Susanne Wahl, lektor, Bioanalytikeruddannelsen København.

Metode

Der blev anvendt 27 celleprøver fra det væskebaserede Sure-Path-system. Celleblokkene blev fremstillet ved at centrifugere celleprøverne og derefter hælde supernatanten fra.

Cellematerialet fra hver enkelt prøve blev blandet med 6 dråber plasma og 2 dråber CaCl₂. Efter henstand i 20 minutter blev cellekoaglet pakket i biopsiposer og kapsler og derefter præpareret til celleblok som histologisk materiale.

Snit fra celleblokkene blev hhv. farvet med HE for at vurdere celletætheden og immunfarvet med p16.

Analyseprincip for p16(JC8)-immunfarvning på Leica Bond

Analyseprincippet i den anvendte p16-immunhistokemiske farvning er en indirekte 3-lags-teknik. Det første trin i immunfarvning er dewax, hvor infiltreret paraffin i snittet og omkring snittet smeltes af. Den anvendte immunfarvningsprotokol er opsat efter histologisk materiale på afdelingen, hvor projektet blev udført.

Epitop-demaskering

Varmeinduceret epitop-demaskering blotlægger antigene epitoper, der ved fiksering kan være blevet maskerede, så de atter er immunreaktive. Dette foregår ved, at glassene, der skal immunfarves med fx p16(JC8), opvarmes på "kogeplader" i immunfarvningsmaskinen, samtidig med at der tilsættes et kogemedie (5). Efter epitop-demaskering er der en række vasketrin, inden det primære antistof tilsættes.

Primært antistof

Det primære antistof tilsættes og inkuberes i 15 minutter, så antistoffet kan binde sig til de demaskerede epitoper. Efter inkubationen med antistoffet er der en række vasketrin, hvor overskydende antistof skylles af.

Blokering af endogen aktivitet

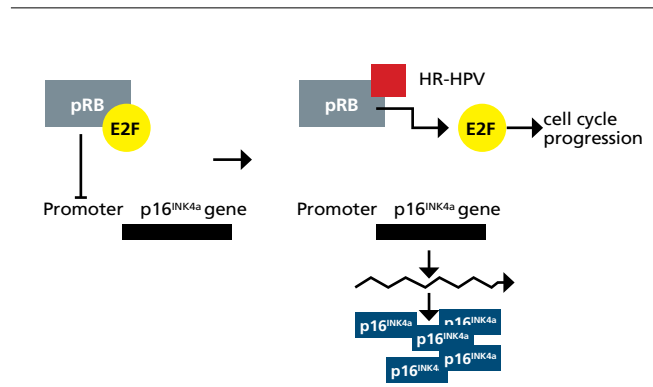
Det næste trin i immunfarvningen er blokering af endogen aktivitet. Dette sker ved, at der tilsættes H₂O₂, som derved blokerer fx granulocytters peroxidase aktivitet og erythrocytters pseudoperoxidase aktivitet. Den endogene aktivitet blokeres for at minimere falsk positiv reaktion, da detektionssystemet anvender peroxidase (5). Overskydende H₂O₂ skylles af ved vasketrin.

Post primary

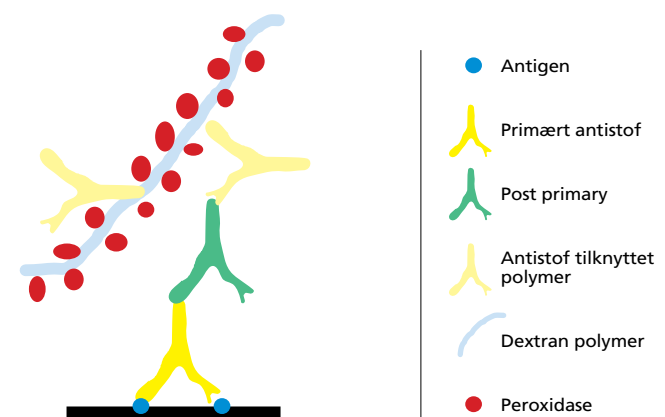
Det sekundære antistof, post primary, er rettet mod det primære antistof. Ved den anvendte p16(JC8)-immunfarvning er post primary kanin-anti-mus IgG (6). Overskydende post primary skylles af ved vasketrin.

Polymer/detektionssystem

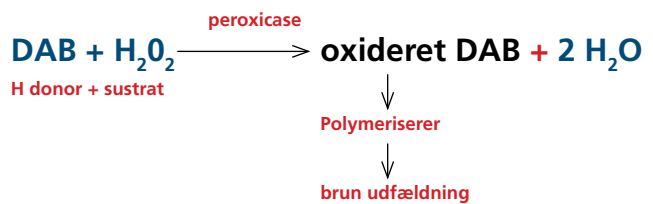
Detektionssystemet, der anvendes, er en indirekte 3-lags-teknik. Polymeren er anti-kanin poly-HRP IgG (6), og til dextran polymerkæden er altså tilknyttet et tertiært antistof rettet mod det sekundære. At anvende indirekte 3-lags-teknik er med til at øge sensitiviteten (5). Ved denne teknik er det primære antistof umærket, men dextran polymerkæden er mærket med horse-radish peroxidase for at forstærke reaktionen



FIGUR 1 Mekanismer ved overekspression af p16^{INK4a} (3). http://mtmlabs.com/eu/index.php?option=com_content&view=article&id



FIGUR 2 viser antigen-antistof-reaktionen og detektionssystemet ved den anvendte immunfarvning. Tegnet efter EnVision+ figur fra forelæsningsnoter (7).



FIGUR 3 viser visualisering med DAB (7).

yderligere. Der kan derved anvendes en mindre mængde antistof, da signalet er kraftigere, og metoden er mere sensitiv på grund af mærkning med flere peroxidase enzymer (5). Overskydende polymer skylles af.

På figur 2 ses antigen-antistof-reaktionen ved den anvendte immunfarvningsprotokol.

Visualiseringssystem

Visualiseringssystemet er chromogenet DAB. Ved tilsætning fungerer DAB som H-donor og reagerer med H₂O₂. Denne reaktion oxiderer DAB, som polymeriserer, og der opnås en brun udfældning. Overskydende DAB skylles af med deioniseret vand, inden der kernefarves med hæmatoxylin og monteres med dækglas (5).

Visualiseringsreaktionen med DAB kan ses på figur 3.

Bedømmelseskriterier

For at vurdere en prøve p16-positiv blev der taget udgangspunkt i bedømmelseskriterierne i artiklerne af Yu et al. (8) og Meyer et al. (9):

- Der skal være brunfarvning af kernen eller kerne og cytoplasma for at udelukke uspecifik baggrundsfarvning. Cytoplasmafarvning alene vil være udtryk for uspecifik baggrundsfarvning.
- Farveintensiteten vurderes som 0, + eller ++.
- Antal p16-positive celler vurderes til * < 3, ** ≥ 3 - ≤ 10, *** > 10.
- For at en celle kan tælles med som p16-positiv, skal det være en pladeepitelcelle med morfologiske kerneforandringer.

TABEL 1

Positiv (P)	Negativ (N)
+ og ***	0 og *
++ og ***	0 og **
++ og **	0 og ***
	+ og *
	+ og **
	++ og *

Tabel 1 viser de opstillede kriterier for, hvornår en prøve vurderes p16-positiv og p16-negativ.

På de prøver, hvor det var muligt, blev resultatet af immunfarvningen med p16(JC8) på celleblokken holdt op mod efterfølgende diagnose på histologiske snit fra biopsi fra samme patient, for at undersøge hvorvidt resultaterne af p16-immunfarvning på celleblokke stemte overens med den histologiske opfølgning. Den histologiske diagnose blev derfor anvendt som gylden standard for diagnosen.

For at vurdere anvendeligheden af p16-immunfarvning på celleblokke fremstillet af cervixcytologisk materiale blev den diagnostiske sensitivitet og specificitet beregnet. Der blev desuden beregnet overensstemmelse ved hjælp af kappa-statistik.

Resultater

p16-immunfarvning på snit fra celleblokkene gav 15 p16-positive prøver og 12 p16-negative prøver. Ud af de 27 patientprøver, der blev anvendt i forsøget, var det muligt at få histologisk opfølgning på 20 af prøverne med diagnosen ASC-H ved den cytologiske test.

Nedenstående tabel 2 viser hhv. sandt positive, sandt negative, falsk positive og falsk negative resultater for de 20 prøver med histologisk opfølgning, når p16-immunfarvning på snit fra cervixbiopsier anvendes som gylden standard for diagnosen.

TABEL 2

Prøver med histologisk opfølgning	
Sandt positive	10
Sandt negative	5
Falsk positive	1
Falsk negative	4

Den diagnostiske sensitivitet og specificitet blev beregnet ud fra resultater i tabel 2.

$$\text{Diagnostisk sensitivitet} = \frac{10}{10 + 4} = 71,43 \%$$

$$\text{Diagnostisk specificitet} = \frac{5}{5 + 1} = 83,33 \%$$

Overensstemmelsen for hhv. p16-immunfarvning af celleblokke fremstillet af cervixcytologisk materiale og p16-immunfarvning af vævsbiopsier fra cervix gav en kappa-værdi på 0,85, hvilket ifølge teorien (10) giver meget god overensstemmelse mellem de to metoder.

Diskussion og konklusion

Formålet med professionsbachelorprojektet var at undersøge, hvilken betydning p16-immunfarvning på celleblokke fremstillet af cervixcytologisk restmateriale fra SurePath ville have på den diagnostiske sensitivitet og specificitet i forhold til diagnosen ASC-H, og hvilken betydning det ville have på opfølgningen ved diagnosen ASC-H.

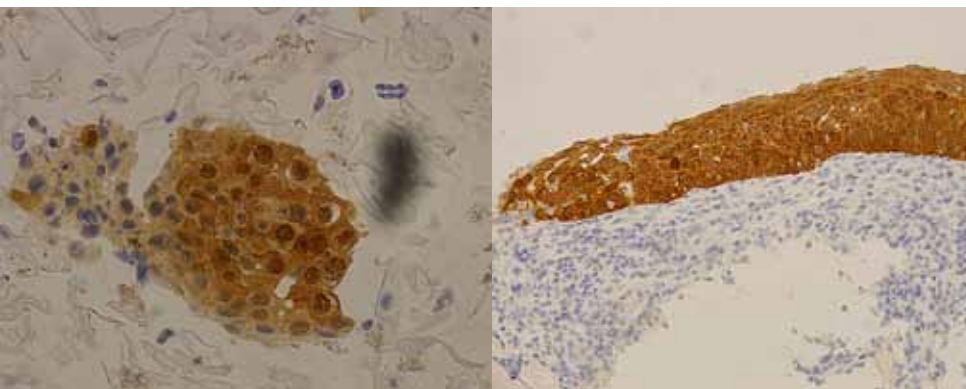
Hvis man ser på det samlede prøvemateriale og ser bort fra den histologiske opfølgning, kom jeg frem til, at 15 ud af de 27 undersøgte kvinder ville blive henvist til gynækologisk speciallæge med henblik på KBC til videre udredning af celleforandringer, idet 15 af prøverne var p16-positive ved immunfarvningen. Dette er 12 færre, end der vil blive henvist til gynækolog i forhold til Sundhedsstyrelsens nuværende retningslinjer for screening for cervixcancer, da alle kvinder, der er diagnosticeret ASC-H, henvises til gynækolog (1). De 12 kvinder med negativ p16-immunfarvning vil blive indkaldt til ny cytologisk prøve efter 12 måneder. At indføre p16-immunfarvning på celleblokke vil derved spare flere kvinder med diagnosen ASC-H for at få foretaget KBC i første omgang.

Den diagnostiske sensitivitet var 71,43 % og er derved højere end de 60 %, der er fastlagt som diagnostisk kvalitetsparameter i Sundhedsstyrelsens screeningsprogram (11). Den diagnostiske specificitet for p16-immunfarvning var 83,33 % og ligger under den diagnostiske kvalitetsparameter på 98 % (11). I forhold til specificiteten er den afprøvede metode altså ikke god nok til at udelukke, hvilke patienter hvis cytologiske diagnose ASC-H ikke skyldes dysplastiske forandringer.

Dog skal det overvejes, hvorvidt specificiteten må være lavere end 98 % ved p16-immunfarvningen, da prøven allerede har fået diagnosen ASC-H ved primær screening. Kvinden vil derved være i kontrolforløb, da p16-immunfarvning er sekundær screening. Dette forudsætter dog, at den diagnostiske sensitivitet er høj, og at metoden derved er god til at finde patienter, hvis cytologiske diagnose ASC-H skyldes dysplastiske forandringer.

Det kan desuden have en betydning, at bedømmelsen af immunfarvningen er en visuel bedømmelse, og at der på nuværende tidspunkt ikke er nogle retningslinjer for bedømmelse af p16-immunfarvning på snit fra celleblokke.

Ved mikroskopi af cytologisk materiale ligger cellerne enkeltvis eller i mikrobiopsier, og dette kan give visse problemer ved bedømmelse af cellematerialet. Det kan tænkes, at det er nemmere at bedømme sværhedsgraden af dysplastiske celleforandringer i en portiobiopsi, da hele slimhinden er repræsenteret.



BILLEDE 1 OG 2

viser hhv. p16-immunfarvning på snit fra celleblok og portiobiopsi.

Billede 1, p16(JC8)-immunfarvning på celleblok ASC-H 9. Forstørrelse x 40.

Billede 2, p16(JC8)-immunfarvning på portiobiopsi fra ASC-H 9. Forstørrelse x 20.

Datamaterialet er forholdsvis lille, og statistikken kan derfor være usikker. Antallet af falsk negative for p16-immunfarvning udgør 20 % af de samlede antal prøver med histologisk opfølgning, hvilket jeg vurderer er for højt. Metoden og bedømmelseskriterierne bør derfor valideres inden en eventuel implementering i proceduren på patologiafdelingerne.

Jeg undersøgte, hvordan en ændring af kriterierne for, hvornår en prøve er p16-positiv, ville påvirke resultatet. En ændring af kriterierne gav færre falsk negative, men flere falsk positive, og på baggrund af dette skønner jeg, at det derved ikke ville nedbringe overdiagnosticering og eventuel overbehandling.

På baggrund af statistikken kunne jeg konkludere, at p16-immunfarvning på celleblokke er et velegnet supplement til på et tidligere stadie at finde, hvilke kvinder der i første omgang behøver henvisning til gynækologisk speciallæge. Dette forudsætter dog, at de kvinder, der ved p16-immunfarvningen har fået falsk negativt resultat, enten opdages ved næste cytologiske test, eller at deres celleforandringer regredierer, for at p16-immunfarvning på celleblokke kan indføres som supplement i screeningsprogrammet. Det vil desuden være fordelagtigt at afprøve metoden på en bredere række diagnoser, fx 2. gangs ASCUS og 2. gangs LSIL, samt indføre retningslinjer for bedømmelseskriterierne. □

Referenceliste:

- 1: Sundhedsstyrelsen (2012). Screening for livmoderhalskræft – anbefalinger 2012. Lokaliseret d. 18. januar 2012 på: <http://www.sst.dk/publ/Publ2012/SYB/Kraeft/ScreenLivmoderhalsKrfAnbef.pdf>
- 2: Liu, Haiyan et al. (2007). Immunohistochemical detection of p16(JC8)INK4a in liquid-based cytology specimens on cell block sections. *Cancer Cytopathology*, 111, 74-82
- 3: http://mtmlabs.com/eu/index.php?option=com_content&view=article&id=10&Itemid=91&lang=en. Lokaliseret den 30. april 2012
- 4: Ejersbo, Dorthe et al. (2008). Kompendium i klinisk cytologi – Abnorm cervixcytologi (2. udgave). VIA University College
- 5: Nielsen, Ole (2005). Immunhistokemisk teknik. I: Vyberg, Mogens (red.), *Anvendt Immunhistokemi* (7. udgave, 2007, s. 9-46). Bioanalytikeruddannelsen København
- 6: Leica Microsystems-Bond™ Polymer Refine Detection Catalog No: DS9800. Lokaliseret den 30. april 2012 på: http://www.leica-microsystems.com/fileadmin/img_uploads/novocastra_reagents/Novocastra_datasheets/ds9800.pdf
- 7: Inger Lindebo Holm. FO 1002-1 Immunhistokemi. Forelæsningsnoter fra fronter. Lokaliseret den 10. maj 2012 på: <https://fronter.com/metropol/main.phtml>
- 8: Yu, Li et al. (2010). Diagnostic Value of p16(JC8)INK4A, Ki-67, and Human Papillomavirus L1 Capsid Protein Immunohistochemical Staining on Cell Blocks From Residual Liquid-Based Gynecologic Cytology Specimens. *Cancer Cytopathology*, 118, 47-55
- 9: Meyer, J.L. et al. (2007). Evaluation of p16INK4a Expression in ThinPrep Cervical Specimens With the CINtec p16INK4a Assay. *Cancer Cytopathology*, 111, 83-92
- 10: Lindahl, M. og Juhl, C. (2009). Den sundhedsvidenskabelige opgave. Vejledning og værktøjskasse (1. udgave, 2. oplag). Munksgaard Danmark, København
- 11: Dansk patologi årsrapport 2009. Lokaliseret den 31. maj 2012 på: http://danskpatologi.dk/doc/DSPAC_pdf/%C3%85rsrapport%20DKLS%202009_final.pdf



SARSTEDT

Sarstedt, førende inden for celledyrkning – Rendyrket kvalitet

Kvalitet

Alle Sarstedts produkter til celledyrkning er fremstillet af optisk ren polystyren og har gennemgået omfattende kvalitetstests.



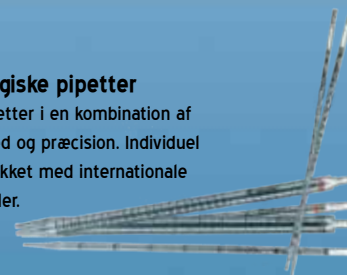
Skåle og plader

Celledyrkningsskåle og -plader, med tre forskellige vækstflader for optimal vækst. Celledyrkningsskålene er designet med "SUREgrip", så de er nemmere at håndtere og arbejde med. Pladerne har enkeltstøbte brønde, som reducerer risikoen for kontaminering samt antikondensering, som minimerer fordampning.



Serologiske pipetter

Målepipetter i en kombination af sikkerhed og præcision. Individuel steril pakket med internationale farvekoder.



Flasker

TC Flasker, med tre forskellige vækstflader for optimal vækst. Sarstedt celledyrkningsflasker er ideelle til dyrkning af både primære cellekulturer og kontinuerlige cellelinjer. Flaskerne har "QUICK-release" låg, og kan fås med og uden filter.



www.hounisen.com
Tlf. 86 21 08 00 • info@hounisen.com