

Validierung der p16/Ki67-Doppelfärbung zur Bestätigung von hochgradigen Dysplasien bei gynäkologischen Proben

Alicia Noemi Jasmin, Cordey, BMA 20-23

Bildungsgang Biomedizinische Analytik HF

Institut für Gewebemedizin und Pathologie, Zytologische Diagnostik

1. Zusammenfassung

In die Routinediagnostik der Zytologischen Diagnostik (ZD) des Instituts für Gewebemedizin und Pathologie sollte eine p16/Ki67-Doppelfärbung eingeführt werden. Diese immunhistochemische Färbung kann zur Bestätigung von hochgradigen Dysplasien des Zervixkarzinoms genutzt werden.

Ziel dieser Arbeit war es, durch einen Validierungsprozess ein optimales Färberegebnis mit einer Farbstärke von +++ bei p16/Ki67-positiven Zellen und eine maximale Hintergrundfärbung von +/- auf gynäkologischen Proben zu erreichen. Es wurden 14 auf eine hochgradige Dysplasie positive Abstriche der «Portio/Cervix» untersucht, welche zu ThinPrep®- und/oder Zellblock-Präparaten verarbeitet wurden.

Die Resultate zeigten mit der endgültigen Färbung unter Verwendung einer H24095, einer 1:50-Antikörperverdünnung von p16 und einer 1:25-Antikörperverdünnung von Ki67 vorwiegend eine Farbstärke von ++ mit einer Hintergrundfärbung von +/- auf den Zellblock-Präparaten, sowie eine Farbstärke von +++ mit einer Hintergrundfärbung von + auf den ThinPrep®-Präparaten.

Somit konnte kein optimales Färberegebnis erreicht werden. Dennoch eignete sich das Färberegebnis aufgrund des klar ersichtlichen Kontrastes zwischen positiven Zellverbänden und dem unspezifischen Hintergrund für die Diagnostik. Die Färbung wurde im Anschluss an diese Arbeit in die Routine der ZD eingeführt.

2. Einleitung

Zur den Untersuchungen der ZD gehört u.a. das Screening von gynäkologischen Proben für einen Papanicolaou(PAP)-Test. Dieser dient der Früherkennung des Zervixkarzinoms und dessen Dysplasien. Dafür werden Zellen des Portioepithels und der Endozervix, kurz «Portio/Cervix», gewonnen [1]. Die Entstehung von Dysplasien wird stark mit Human-Papilloma-Virus (HPV)-Infektionen assoziiert [2]. Die ZD befundet gynäkologische Proben nach Bethesda 2014. Hier die daraus zentralen Begriffe für diese Arbeit:

Tabelle 1: relevante Nomenklatur nach Bethesda (Bubendorf, 2011, S. 102 -103)

LSIL	Niedriggradige intraepitheliale Läsion (low-grade squamous intraepithelial lesion)
HSIL	Hochgradige intraepitheliale Läsion (high-grade squamous intraepithelial lesion)

Die Diagnose wird in der Regel anhand des morphologischen Bilds in der Papanicolaou-Färbung gestellt. Dabei gelten mehrere Malignitätskriterien [3]. Nicht immer ist eine eindeutige Unterscheidung von LSIL und HSIL möglich. Dies ist jedoch für Prognose und Therapie unerlässlich.

Mit der p16/Ki67-Doppelfärbung lässt sich das Vorhandensein einer HSIL bestätigen. Denn nur bei stark transformiertem Zellzyklus durch HPV kommt es zur Überexpression beider Proteine in derselben Zelle. Die Co-expression von p16 und Ki67 ist physiologischer Weise und bis hin zum Stadium einer LSIL nicht möglich [4].

3. Ziele und Fragestellungen

Ziel war es, ein optimales Färberegebnis der p16/Ki67-Doppelfärbung zu generieren. Um dies zu erreichen, wurden in einem Validierungsprozess verschiedene Gewebepreparationen und Antikörperverdünnungen ausgetestet. Daraus abgeleitete Fragestellung:

- Wie müssen die verwendeten p16- und Ki67-Antikörperkonzentrationen in der p16/Ki67-Doppelfärbung verdünnt werden und wie muss das Zellmaterial vorbehandelt werden, um ein optimales Färberegebnis für gynäkologische Proben zu erzielen?

4. Material, Methodik, Vorgehen

Die p16/Ki67-Doppelfärbung basierte auf dem Prinzip einer indirekten Immunhistochemie und wurde auf einem vollautomatischen Färbearbeitsstationen, dem BOND-III der Firma Leica, durchgeführt.

Als Vorbehandlung wurde mit einem hitzeinduzierten Epitope Retrieval (HIER) gearbeitet. Die verwendeten Antikörper wurden simultan mittels einem «Cocktail» aus p16- und Ki67-Antikörperkonzentrationen angeboten (s. Abb. 1). Ausgewählt wurde Probenmaterial, welches in der Färbung zwingend positiv reagieren musste. Demnach wurden 14 auf eine hochgradige Dysplasie positive Abstriche der «Portio/Cervix» untersucht, welche zu ThinPrep®- und/oder Zellblock-Präparaten verarbeitet wurden. Jeder Abstrich entsprach einem Fall. Für ein optimales Färberegebnis wurden eine Farbstärke von +++ bei p16/Ki67-positiven Zellen und eine maximale Hintergrundfärbung von +/- festgelegt. Das jeweilige Färberegebnis wurde mittels Kreuzen entsprechend der erreichten Farbstärke und der Hintergrundfärbung protokolliert:

Tabelle 2: Farbskala zur Einteilung der Farbstärke (Cordey, 2023)

Bezeichnung der Farbstärke	Beschreibung
∅	Keine Positivität festzustellen
+	Leichte Anfärbung ersichtlich
++	Mittelstarke Anfärbung ersichtlich
+++	Starke Anfärbung ersichtlich
-	Keine Hintergrundfärbung festzustellen
+/-	Minimale Hintergrundfärbung vorhanden
+	Mässige unspezifische Hintergrundfärbung vorhanden

[1] Nauth, H. F. (2014). *Gynäkologische Zytologie* (2., aktualisierte und erweiterte Auflage). Thieme.
 [2] Wentzensen, N., Schiffman, M., Chelmos, D., Darragh, T. M., & Waxman, A. G. (2015). Risk Assessment Approach to Management. In R. Nayar, D. C. Wilbur (Hrsg.), *The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology: Definitions, Criteria, and Explanatory Notes* (3. Auflage, S. 305-313). Springer.
 [3] Jenny, J. & Ng, A. (1993). *Gynäkologische Zytologie und Krebsvorsorge in der gynäkologischen Praxis*. Hans Huber Verlag.
 [4] Roche. (2014). *CINtec® PLUS – Klarheit für die Frau und Sicherheit für den Arzt*. Roche. https://assets.cwp.roche.com/f/94122/66ca33660c/03-cintec_plus_farbeatlas-c-roche.pdf

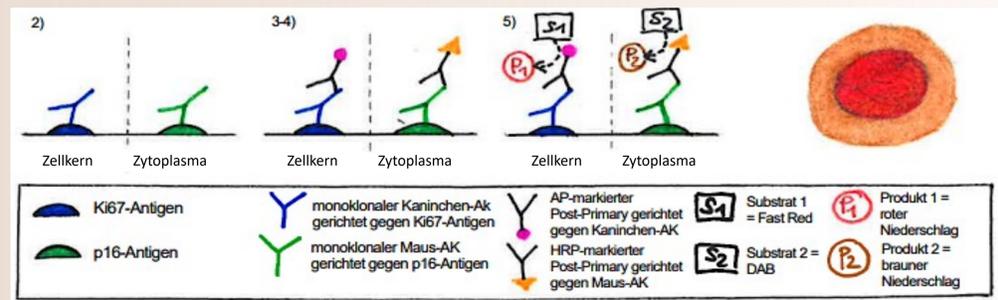


Abb. 1: Färbeprozessschritte der p16/Ki67-Doppelfärbung: 1. Behandlung der Probe mit Wasserstoffperoxid; 2. Der manuell verdünnte Cocktail aus spezifischen Maus- und Kaninchen-Primärantikörpern wird aufgetragen.; 3. Das Poly-AP-Reagenz lokalisiert Maus-Antikörper; 4. Das Poly-AP IgG-Reagenz lokalisiert Kaninchen-Antikörper; 5. Das Substratchromogen DAB (Diaminobenzidintetrahydrochlorid-Hydrat) macht Maus-Antikörper durch einen braunen Niederschlag sichtbar. Das Substratchromogen Fast Red macht Kaninchen-Antikörper durch einen roten Niederschlag sichtbar; 6. Hämatoxylin als Gegenfärbung (Cordey, 2023) – basierend auf Packungsbeileger, 2020.

5. Ergebnisse/ Resultate

Tabelle 3: Ergebnisprotokoll der Testdurchführung 3 vom 07.02.2023 (Cordey, 2023)

Fallnr.	Verdünnung	Vorbehandlung	Färbung	Hintergrund	Bemerkungen
7	p16 1:50, Ki67 1:25	H24095*	++	+/-	Zellblock
9	p16 1:50, Ki67 1:25	H24095	++	+/-	Zellblock
12	p16 1:50, Ki67 1:25	H24095	++	+/-	Zellblock

*H = HIER, 2= alkalische EDTA-Pufferlösung, 40 = Dauer der Vorbehandlung beträgt 40 Minuten, 95 = Temperatur bei der Vorbehandlung liegt bei 95° Celsius

Tabelle 4: Auszug aus dem Ergebnisprotokoll der Testdurchführung 5 vom 24.02.2023 (Cordey, 2023)

Fallnr.	Verdünnung	Vorbehandlung	Färbung	Hintergrund	Bemerkung
5	p16 1:50, Ki67 1:25	H24095	+	+	Zellblock
6	p16 1:50, Ki67 1:25	H24095	++	+/-	Zellblock
10	P16 1:50, Ki67 1:25	H24095	++	+/-	Zellblock
11	p16 1:50, Ki67 1:25	H24095	+++	+/-	Zellblock
10	p16 1:50, Ki67 1:25	H24095	+++	+	ThinPrep®
13	p16 1:50, Ki67 1:25	H24095	+++	+	ThinPrep®
14	p16 1:50, Ki67 1:25	H24095	+++	+	ThinPrep®

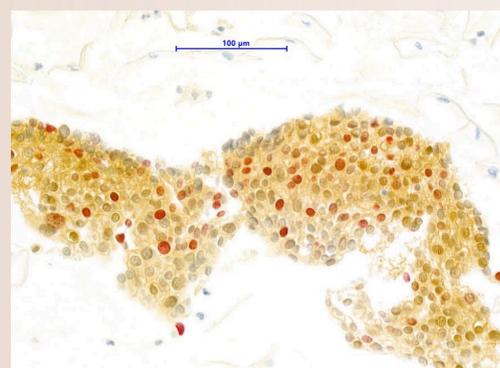


Abb. 2: Ausschnitt aus Fall 7, Zellblock, p16/Ki67-Doppelfärbung, Testdurchführung 3, 10x Vergrößerung (Cordey, 2023)

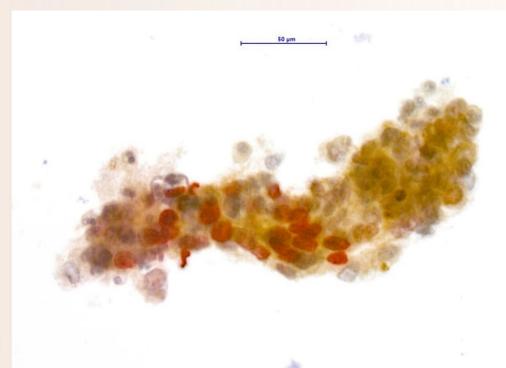


Abb. 3: Ausschnitt aus Fall 10, ThinPrep®, Testdurchführung 3, 20x Vergrößerung (Cordey, 2023)

6. Diskussion

In dieser Arbeit konnte kein optimales Färberegebnis erreicht werden. Da nur 14 Fälle untersucht wurden, büsste der Validierungsprozess ausserdem an Repräsentativität ein.

Das bestmögliche Ergebnis wurde mit einer Vorbehandlung durch H24095, einer 1:50-Antikörperverdünnung von p16 und einer 1:25-Antikörperverdünnung von Ki67 erzielt. Auf den Zellblock-Präparaten zeigte sich eine Farbstärke von ++ mit einer Hintergrundfärbung von +/- und auf den ThinPrep®-Präparaten eine Farbstärke von +++ mit einem Hintergrund von +. Durch den klar ersichtlichen Kontrast von positiven Zellen zum unspezifischen Hintergrund, konnte dennoch ein Färberegebnis erzielt werden, welches für die Diagnostik genutzt werden konnte.

Abbildungen
 Abb. 1: Cordey, A. (2023). *Färbeprozessschritte der p16/Ki67-Doppelfärbung* [...]. medi. – basierend auf Leica Biosystems, Packungsbeileger, ChromoPlex 1 Dual Detection for BOND, 2020.
 Abb. 2: Cordey, A. (2023). *Ausschnitt aus Fall 7, Zellblock, p16/Ki67-Doppelfärbung, Testdurchführung 3, 10x Vergrößerung*. medi.
 Abb. 3: Cordey, A. (2023). *Ausschnitt aus Fall 12, ThinPrep®, Testdurchführung 3, 20x Vergrößerung*. medi.
 Tabellen
 Tabelle 1: Bubendorf, L., Feichter, G.E., Obermann, E. C., & Dalquen, P. (2011) *Zytopathologie*. In Köppl, G., Kreipe, H. H. & Remmele, W. (Hrsg.), *Pathologie* (3., neubearbeitete Auflage). Springer.