



Høgskulen på Vestlandet

BIO160 Bacheloroppgave og Plakat Gruppe A - Bioingeniør

BIO160

Predefinert informasjon

Startdato:	26-05-2021 12:12	Termin:	2021 VÅR
Sluttdato:	28-05-2021 14:00	Vurderingsform:	Bestått/ikke bestått
Eksamensform:	Bacheloroppgave (skriftlig i gruppe)		
Flowkode:	203 BIO160 1 O 2021 VÅR		
Intern sensor:	Ranja Christiansen		

Deltaker

Naun:	Angela Patricia Amaya Kvalvik
Kandidatnr.:	204
HVL-id:	580705@hvl.no

Informasjon fra deltaker

Antall ord *:	11138
----------------------	-------

Egenerklæring *: Ja Nei
Inneholder besvarelsen konfidensielt materiale?: Ja Nei

Jeg bekrefter at jeg har registrert oppgavetittelen på norsk og engelsk i StudentWeb og vet at denne vil stå på vitnemålet mitt *:

Gruppe

Gruppenavn: Gr A7
Gruppenummer: 6
Andre medlemmer i gruppen: Tonje Marie Henriksen, Wenche Sissel Hamre

Jeg godkjenner avtalen om publisering av bacheloroppgaven min *

Ja

Er bacheloroppgaven skrevet som del av et større forskningsprosjekt ved HVL? *

Nei

Er bacheloroppgaven skrevet ved bedrift/virksomhet i næringsliv eller offentlig sektor? *

Ja, Haukeland Universitetssykehus



Høgskulen
på Vestlandet

BACHELOROPPGAVE

**Diagnostisering av celleforandringer
i sylinderepitel i livmorhalsen.**

**Bruk av Cellient[®] Celleblokkmetode til supplerende
informasjon.**

**Diagnostic of Cellular Changes of The Columnar
Epithelium of the Cervix.**

**Use of Cellient[®] Cellblock Method
for Additional Information.**

Angela P. A. Kvalvik

Tonje M. Henriksen

Wenche S. Hamre

Bachelor i bioingeniørfag

Fakultet for ingeniør- og naturvitenskap, FIN

Veiledere: Ranja Christensen og Lise Bjørkhaug Gundersen

28.05.2021

Jeg bekrefter at arbeidet er selvstendig utarbeidet, og at referanser/kildehenvisninger til alle kilder som er brukt i arbeidet er oppgitt, jf. Forskrift om studium og eksamen ved Høgskulen på Vestlandet, § 12-1.

Sammendrag

Innledning: Dette bachelorprosjektet utgjør et pilotprosjekt ved patologiavdelingen på Haukeland universitetssjukehus, hvor hensikten var å undersøke om gynekologiske livmorhalsprøver diagnostisert med AGUS kunne benyttes til å støpe celleblokker ved bruk av Cellient[®] automatisert celleblokkssystem. I tillegg ble det undersøkt hvorvidt immunhistokjemiske metoder for påvisning av immunmarkørene p16 og Ki-67 kunne benyttes på celleblokknittene. Overordnet mål var å undersøke hvorvidt Cellient[®] celleblokkmetode kunne benyttes som en supplerende metode, for sikrere morfologisk vurdering ved usikre cellefunn.

Metode: 51 livmorhalsprøver tidligere diagnostisert ved ThinPrep Pap test ble benyttet. 46 prøver med AGUS diagnose, en med AIS, to med ASC-US og to normale prøver. Celleblokk ble produsert ved bruk av Cellient[®] automatisert celleblokkssystem. Immunhistokjemi for immunmarkørene p16 og Ki-67 ble utført, for å undersøke egnethet på metanolfiksert materiale. Mikroskopisk vurdering av celle morfologi ble utført av patolog.

Resultat og konklusjon: Cellient[®] celleblokkmetode ble funnet å egne seg godt til vurdering av epitel fra livmorhalsen, og bidro til å lettere gjenkjenne og skille sylindere- og plateepitel fra hverandre. Den tekniske kvaliteten ved celleblokkene ble funnet å være overveiende god. Den immunhistokjemiske metoden må videre optimaliseres for diagnostisk bruk, særlig for p16, spesielt fordi den immunhistokjemiske metoden ikke er validert for metanolfikserte livmorhalsprøver.

Nøkkelord: *Livmorhalskreft, AGUS, Cellient[®] automatisert celleblokkmetode, immunhistokjemi, p16, Ki-67*

Abstract

Introduction: This bachelor project constitutes a pilot project at the department of pathology at Haukeland University Hospital, where the purpose was to investigate whether gynecological cervical samples, diagnosed with AGC, could be used to cast cell blocks using the Cellient® Automated Cell Block system. Furthermore, it was investigated whether immunohistochemical methods for detecting the immune markers p16 and Ki-67 could be used on the cell block sections. The goal was to determine whether the Cellient® cell block method could be used as a supplementary method for morphological assessment of atypical glandular cells.

Method: 51 cervical specimens previously diagnosed by ThinPrep Pap test were used. Of these samples, 46 were diagnosed with AGC, one with AIS, two with ASC-US and two normal samples. Cellient® Automated Cell Block system was used to produce the cell blocks. Immunohistochemistry was performed with p16 and Ki-67 proteins to investigate if methanol-fixed samples was suited. Microscopic assessment of cell morphology was performed by a pathologist.

Results and conclusion: Cellient® cell block method was found to be well suited for the assessment of cervical epithelium and did contribute to better recognize and distinguish columnar and squamous epithelium from each other. The technical quality of the cell blocks was predominantly good, but the method needs optimization for the use of immunohistochemistry, especially for p16, since the immunohistochemical method has not been validated for methanol-fixed cervical samples.

Keywords: *Cervix cancer, AGC, Cellient® automated cellblock system, immunohistochemistry, p16, Ki-67*

Forord

Den praktiske utførelsen av dette bachelorprosjektet ble utført ved cytologisk seksjon ved patologiavdelingen på Haukeland universitetssjukehus i perioden mars-juni 2021.

Bachelorprosjektet ble utformet av vår veileder Ranja Christiansen, på bakgrunn av et ønske om å undersøke hvorvidt Cellient[®] celleblokkmetode kunne benyttes som en supplerende analyse ved vurdering av usikre cellegrupper i livmorhalsprøver, diagnostisert som AGUS.

En stor takk rettes til vår veileder på cytologisk seksjon, Merry Haile Tesfay, som gav oss opplæring i bruk av Cellient[®] celleblokksystemet, samt veiledet oss underveis i støpeprosessen. Videre takkes personalet ved immunhistokjemisk seksjon Agathe Riisøen, Anette Turøy, Inger Skaug, Lise Skaar og Kalaiarasy Kugarajh, som har snittet alle celleblokkene i prosjektet, og videre utført immunhistokjemi for påvisning av immunmarkørene p16 og Ki-67. En stor takk rettes også til Irene Fredriksen og Marie Birkestvedt-Jones som ga oss en omvisning på seksjonen for immunhistokjemi, og en innføring i bruk av instrumentet Ventana BenchMark Ultra. Personalet ved histologisk seksjon takkes for utførelse av HE farging på celleblokknittene. Videre rettes en stor takk til patologen ved HUS som har gitt en vurdering av kvaliteten og morfologien til alle celleblokknittene i prosjektet, samt gitt oss en god gjennomgang og beskrivelse av funnene.

Til slutt takkes våre veiledere Ranja Christiansen og Lise Bjørkhaug Gundersen for deres gode og kritiske tilbakemeldinger, samt deres tålmodighet i en tidvis forvirrende læringsprosess.

Angela P. A. Kvalvik

Tonje M. Henriksen

Wenche S. Hamre

Definisjoner

AGUS	Atypisk sylinderepitel av usikker opprinnelse og/eller signifikans
AIS	Adenokarsinom in situ, begynnende celleforandring med utspring i sylinderepitel, men som ikke har spredd seg.
ASC-US	Irregulære plateepitelceller med forandringer av usikker betydning
Atypi	Avvik, særlig brukt om avvikende drag eller mønster i celler som kan være ondartet
Cytologi	Omhandler celler
Dysplasi	Celleforandringer. Forandringer i cellen som innebærer abnorm modning og vekstforstyrrelse
Differensiering	Oppfatte som forskjellig, skille, skjelne, nyansere
Fokal	Som har eller gjelder et bestemt utgangspunkt
HE-farge	Histologisk fargemetode med hematoksylin og eosin
Histologi	Omhandler vev
HPV	Humant papillomavirus
HUS	Haukeland Universitet Sykehus
LSIL	Lavgradig skvamøs intraepitelial lesjon
Metaplasi	Endring av modne celler i et vev til annen form enn det som hører til i vevet
Neoplasi	Nyvekst av vev uten vanlig celledyrking, omfatter både benign og malign cellevekst
PAP test	Cytologisk analyse av celleprøve, farges med Papanicolaou fargemetode
PCR	Polymerase Chain Reaction
Perinukleær	Oppklaring i mellomrommet mellom cellekjernens doble membran
Pleomorfisme	Mangeformet, kan vise seg i ymse former
Reaktiv forandring	Morfologiske endringer i cellens kjerne og cytoplasma, under inflammatoriske tilstander, infeksjoner (virus, parasitter, sopp), hormonbehandlinger, p-piller, graviditet, i fødselsperioden, under amming, og i postmenopausen.
TBC	The Bethesda Classification system, Bethesda klassifikasjonssystemet

Tumor-suppressor protein

Proteiner som regulerer cellevekst og differensiering ved å registrere forandringer i omgivende miljøet, overfører signaler til kjernen og direkte påvirker transkripsjon, translasjon, overlevelse eller celledeling.

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	I
Abstract	II
Forord	III
Definisjoner	IV
1. Introduksjon.....	1
1.1 Screeningprogram for livmorhalskreft	1
1.2 Økende andel adenokarsinomer	3
1.3 Normal livmorhals anatomi og histologi.	4
1.4 Vurdering og klassifikasjon av atypier i sylinderepitel	6
1.5 Cellient® Automated Cell Block System.....	8
1.6 Immunhistokjemi	8
1.7 Verifisering og validering av metoder	9
1.8 Formål.....	10
2. Material og metode.....	11
2.1 Prøvemateriale	11
2.2 Gjennomføring.....	11
3 Resultat.....	13
3.1 Cytologisk diagnose.....	13
3.2 Celleblokk.....	14
3.3 Vurdering av snitt fra celleblokker	14
3.4 Mikroskopibilder av snitt fra celleblokk.....	18
4 Diskusjon.....	24
5 Konklusjon	31
6 Referanser.....	33
Vedlegg	36

1. Introduksjon

1.1 Screeningprogram for livmorhalskreft

Som et ledd i arbeidet mot å redusere antall tilfeller og dødsfall forårsaket av livmorhalskreft, ble det i 1992 startet organisert registrering av celleprøver fra livmorhalsen (cervix), som resulterte i et permanent landsdekkende koordinert program fra 1998 (Kreftregisteret, 2005). Landsforeningen mot kreft hadde vært en pådriver i mange år frem til programmet ble igangsatt av Helsedirektoratet i Norge. Andre land i Norden var godt i gang og hadde allerede på midten av sekstitallet innført screening for kvinner i sine land (Jakobsen, 2015).

Fra oppstart med å registrere alle cytologiske prøver i 1991 og frem til i dag, har det vært store endringer. I 1995 ble det for første gang sendt ut brev med påminnelse om å ta celleprøve, i første omgang som et prøveprosjekt i Vestfold, deretter til alle kvinner i landet som ikke var registrert med celleprøve de tre siste årene. Programmet skulle omhandle alle kvinner i alderen 25-69 år og invitere til screening hvert tredje år. Livmorhalskreft utvikles over mange år med pågående infeksjon og målet med screening hvert 3. år er å avdekke forløpere til kreft, for å kunne starte behandling tidlig og dermed øke prognosene. Screeningstester utgjør slik forebyggende medisin, og har bidratt til at sykdom og celleforandringer kan oppdages på et tidlig tidspunkt, også hos asymptotiske pasienter. Selv om screeningstester i seg selv ikke bekrefter en diagnose, kan de peke mot sannsynlighet av en bestemt sykdom som videre kan analyseres og korrekt diagnostiseres. Resultat av livmorhalsprogrammet viste allerede etter 17 år, å gi en nedgang på 25 % i forekomst av livmorhalskreft og redusert dødelighet med 55 % (Jakobsen, 2015), hvilket belyser viktigheten av at programmet følges. Screeningprogrammet sender ut påminnelse til alle kvinner i målgruppen om å ta celleprøve med bestemt hyppighet, og fordelt slik at laboratoriene har jevn fordeling av prøver til analyse. Screeningstest for livmorhalskreft inkluderer i dag ThinPrep Pap test (Papanicolaou test) og test for humant papillomavirus, (HPV-test).

Celler fra livmorhals til både primær og sekundærscreening preserves i en ThinPrep PreservCyt løsning. Metoden som ble benyttet til screening fra starten av var utstryk av celleprøver på objektglass, fiksering og farging før undersøkelse i mikroskop. Metoden som benyttes i dag, ThinPrep Pap test, bygger på samme prinsipp, men ved bruk av automatiserte instrumenter (ThinPrep 5000 prosessor, Hologic). Metoden er kvalitativt bedre, hver prøve blir filtrert og et representativt utvalg celler blir fordelt i et tynt sirkulært lag på objektglasset.

Preparat blir farget etter Papanicolaou fargemetode, for så å bli vurdert i mikroskop (Eide, 2015).

Lesjoner i cervixepitel er hovedsakelig forårsaket av HPV og det er estimert at ca. 99 % av livmorhalskrefttilfellene skyldes langvarig HPV infeksjon (Kreftregisteret, 2021). HPV er et lite, ikke-innkapslet DNA-virus, bestående av rundt 8000 nukleotider (Münger et al., 2004). Mer enn 200 ulike genotyper er funnet, og viruset infiserer både kutant og mukøst vev (Burd, 2003). Lavrisiko lesjoner og kjønnsvorter, er forårsaket av blant annet HPV typene 6, 11, 42 og 44. Det er høyrisiko variantene av HPV, som ved langvarig pågående infeksjon, kan føre til celleforandringer og utvikling av livmorhalskreft. HPV 16 og HPV 18 forårsaker sammenlagt ca. 70 % av alle tilfeller av livmorhalskreft, mens HPV 31, 33, 45, 52 og 58 er ansvarlig for om lag 20 % av livmorhalskrefttilfellene (Folkehelseinstituttet, 2019).

I 2018 ble det innført en endring i livmorhalsprogrammet som medførte at alle prøver fra kvinner i alderen 34-69 år skulle HPV-testes. Ved innføring av HPV-test som primærscreening for den øvre aldersgruppen ble det også gjort endringer i hyppighet av innkalling til å ta celleprøve. For aldersgruppe 25-33 år er det anbefalt screening hvert 3. år, mens for aldersgruppen 34-69 år er anbefalt intervall for HPV-test 5 år. Til primærscreening av aldersgruppen 25-33 år benyttes cytologisk screening ved bruk av ThinPrep Pap test. Dersom det blir gjort funn i mikroskop blir prøven reanalysert ved å benytte HPV-test til sekundærscreening. Algoritmen for screening og videre oppfølging følges i henhold til flytskjema (Kreftregisteret, 2019), se vedlegg 1. HPV-test påviser tilstedeværelse av høyrisikovirus og ved negativt utfall vil det ikke være nødvendig med like hyppig screening. Dette er basert på hvor lang tid det tar fra infeksjon oppstår til det resulterer i patologisk celleforandring. Dersom pasienten opplever symptomer som blødning utenom menstruasjon, anbefales det å ta celleprøve utenom programmet. Prøven blir da screenet/cytologisk undersøkt. Ordningen skulle tre i kraft i 2019 og være fullstendig implementert som primærscreening for aldersgruppen innen 31.01.2021 (Helsedirektoratet, 2019). HPV-test benytter PCR-metode (polymerase chain reaction) for å påvise tilstedeværelse av virus-DNA i celleprøven. Krav satt til kommersielle HPV-tester er bestemt av en faggruppe nedsatt av Helsedirektoratet. HPV-test innebærer både DNA basert genotyping av høyrisikovariantene (hr) HPV 16 og 18, og påvisning hvis tilstedeværelse av ett eller flere varianter av hrHPV. Det kreves at hrHPV i en pakke skal bestå av minst 12 ulike varianter, samt internkontroll (Kreftregisteret, 2018). Screeningprogram og effektiv HPV-test har redusert både sykdom og

dødsfall på bakgrunn av livmorhalskreft, men forekomsten av adenokarsinomer har hatt en økende trend og kan synes upåvirket av screeningprogrammet.

1.2 Økende andel adenokarsinomer

Av karsinomene i livmorhalsen utgjør plateepitelkarsinomer rundt 80 %, mens 15-20 % er av typen endocervikale adenokarsinomer (Arshi & Farci, 2020). Plateepitelkarsinomer skyldes nesten utelukkende, og kun med sjeldne unntak, HPV infeksjon. Adenokarsinomer på den andre siden utgjør en mer heterogen tumorgruppe, der rundt 15-20 % av tilfellene er HPV-negative (Arshi & Farci, 2020; Park, 2020). Etter innføring av screeningprogrammet for livmorhalskreft er forekomsten av plateepitelkarsinom redusert, mens forekomsten av adenokarsinom i endocervix eller endometriet har økt. Kreftformen øker uavhengig av screening, hvilket kan skyldes at den cytologiske screeningen er bedre til å detektere plateepitelkarsinom enn adenokarsinom og forstadier til adenokarsinom (Helsedirektoratet, 2020). Forekomsten av adenokarsinom er i USA assosiert med lavere alder ved seksuell debut og flere seksualpartnere (Arshi & Farci, 2020), hvilket kan vise til viktighet av screening i ung alder. Endocervikale adenokarsinom er forbundet med dårligere prognose enn andre former for livmorhalskreft og økningen er bekymringsfull.

I en studie gjort i Sverige av Andersson et al. (2001), ble tilstedeværelsen av HPV i adenokarsinom undersøkt på grunnlag av økt forekomst av kreftformen, til tross for innføring av screeningprogram. Det er her snakk om screeningprogrammet som ble innført i begynnelsen av 90- tallet, hvor mikroskopering av celleutstryk ble benyttet som primærmetode. Studien viser til at cytologisk screening ikke har vært effektiv til å minke forekomsten av adenokarsinom. De fant at adenokarsinomene hadde en HPV prevalens på 71 %, med muligheter for noen falske negative resultater grunnet formalinfiksert materiale som kan redusere PCR deteksjonsraten. Studien konkluderte med at HPV-tester kan utgjøre en større rolle for å forebygge adenokarsinomer enn cytologisk screening og særlig hos unge kvinner (Andersson et al., 2001). HPV screening er vist å øke sensitiviteten for funn i sylinderepitel, sammenlignet med cytologisk screening i mikroskop.

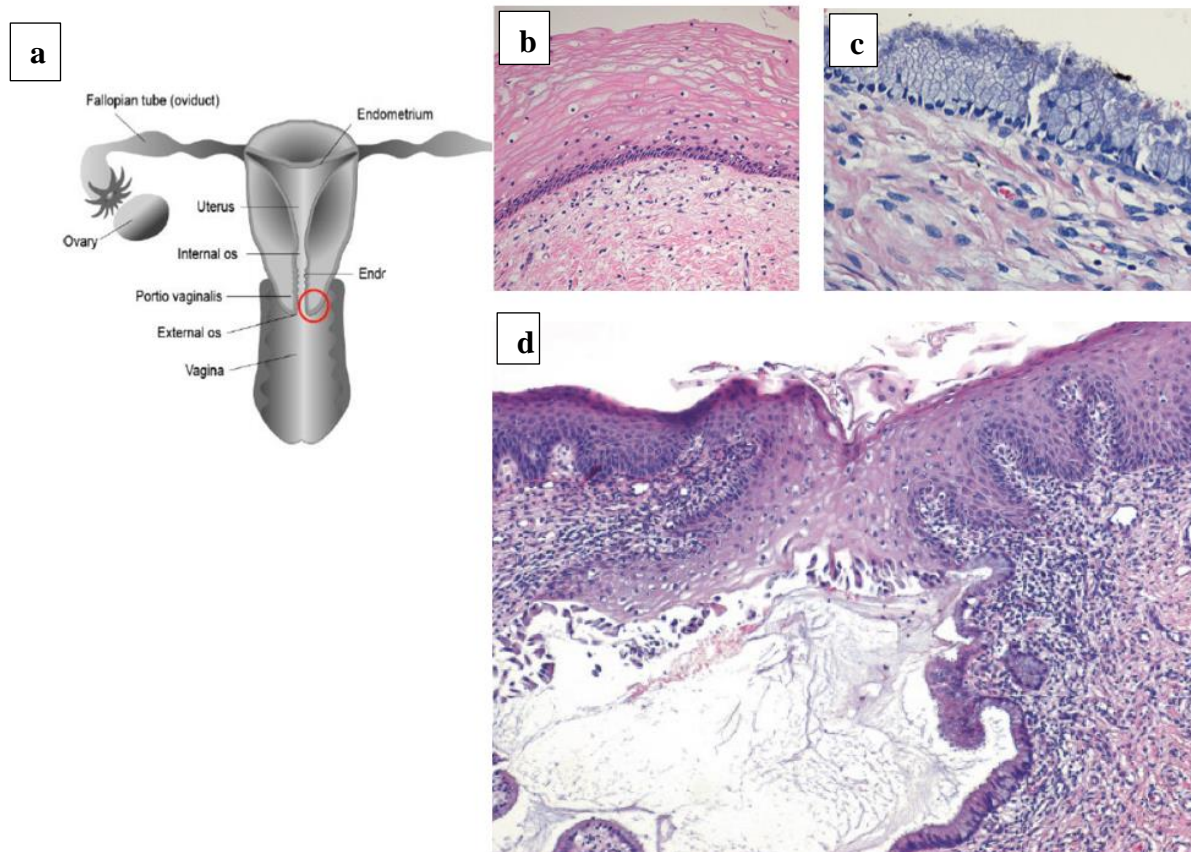
Videre kan en av årsakene til økningen av adenokarsinomer skyldes mangelfullt prøvemateriale. For å tilfredsstille krav til væskebasert celleprøve skal prøven inneholde et minimum av sylinderepitel og metaplastiske celler, satt til 10 velbevarte celler, hvorav fem fra hver celletype, i tillegg til 5000 plateepitelceller (Kreftregisteret, 2017).

Gode rutiner og kunnskap under prøvetaking er vesentlig for å oppnå en representativ prøve, og prøven må tas i transformasjonssonen. Transformasjonssonen er dekket av metaplastisk epitel, og er av spesiell interesse på grunn av utviklingen av et bestemt neoplasiprodukt av HPV virus type 16 og 18 (Stolnicu & Goldfrank, 2021). Hvor transformasjonssonen befinner seg i livmorhalsen endres etter kvinnens modningsstadium, forklart i kapittel 1.3. En celleprøve kan i mange tilfeller inneha utilstrekkelig mengde, eller mangel på sylinderepitel. Dette kan forekomme grunnet manglende kunnskap eller vanskelig prøvetaking ut ifra hvor cellene befinner seg (Castanon, Landy & Sasieni, 2016). I tillegg er det ikke sikkert celleforandringene i sylinderepitelet befinner seg i transformasjonssonen. Til tross for at så mye som 85 % av livmorhalskreft oppstår i transformasjonssonen, kan også 15 % utgå fra sylinderepitel i livmorhalsen (Kreftlex, 2021). Sylinderepitel kler hele indre del av livmorhalsen, og celleforandringene kan dermed finne sted høyere oppe i livmorhalsen eller selve livmoren. Ved en celleprøve tatt i transformasjonssonen vil dermed ikke de representative celler med atypi nødvendigvis komme med.

1.3 Normal livmorhals anatomi og histologi.

Forståelse av anatomiske, histologiske og cytologiske strukturer brukes til å vurdere endringer og ulike lesjoner som kan oppstå i livmor og livmorhalsen.

Livmoren er et glattmuskulært hult organ som finnes midt i bekkenhulen hos kvinner, mellom urinblæren og endetarmen. Organet er flattrøkt og pæreformet, med dimensjoner: 8-10 cm lang, 4 cm bredt, og 2-3 cm tykk (Sand, Sjaastad, Haug & Bjålie, 2009). Organet veier 30-60 gram, men størrelsen øker under graviditet. Livmoren er delt i tre områder: den største delen kalles for livmorkroppen (*corpus uteri*), taket av livmorhulen (*fundus uteri*) og livmorhalsen (*cervix uteri*) som er overgangen mellom vagina og livmorhulen (Stolnicu & Goldfrank, 2021).



Figur 1. Anatomi av livmor og histologi av livmorhalsen. **a)** Illustrasjon av livmor og livmorhals anatomi samt transformasjonssonen (rød ring). Biopsi av livmorvev, snitt farget med HE, normal histologi av livmor. **b)** normalt plateepitel, **c)** normalt sylinderepitel og **d)** transformasjonssone. Figur **a** hentet fra Uteruskurs Stavanger Universitet sykehus (Berland, 2016). Figurer **b-d** (Stolnicu & Goldfrank, 2021) er innhentet med godkjenning av Pathology Atlas, Springer Nature.

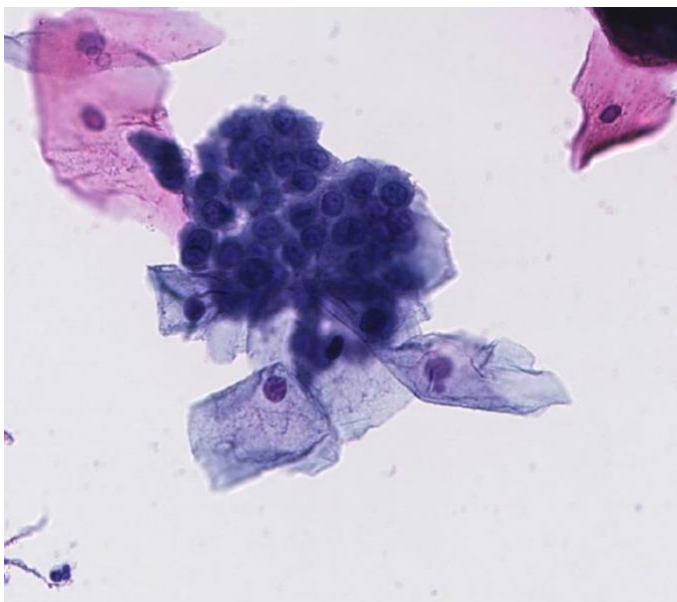
Livmorhalsen (figur 1) kan deles i to hovedområder og et mellomområde som gjenkjennes av typen epitel som dekker det: en ytre overflate som har direkte overgang med vaginal slimhinne kalles for **ektocervix**, dekket av stratifisert ikke-keratiniserende plateepitel, og en indre overflate kalt **endocervix** dekket med sylinderepitel. Området mellom de to epiteltypene kalles for **transformasjonssonen** eller **Squamocolumnar-Junction** (Stolnicu & Goldfrank, 2021)

Cervixepitel er påvirket av hormonelle stimuli, og endrer plassering i løpet av kvinnens liv. I løpet av første leveår flytter sylinderepitel seg til endocervixkanalen, mens under fruktbarhetsperioden flytter sylinderepitelet seg til ektocervix. Dette fysiologiske fenomenet kalles for **cervix ektropion**. Ved overgangsalder flytter sylinderepitelet seg tilbake til endocervixkanalen, kalt **inversjon** (Stolnicu & Goldfrank, 2021).

Mikroskopisk observasjon av histologiske biopsier fra livmoren utføres ved hjelp av fargeprosedyrer basert på Hematoksylin-Eosin, (figur 1). Observasjon av cytologiske prøver utføres ved hjelp av Papanicolaou farge metode (figur 2). Ved atypiske funn (figur 3) i cytologiske analyser kan det i tillegg brukes immunhistokjemiske teknikker for å identifisere grad og opprinnelse av celleforandringer (Stolnicu & Goldfrank, 2021).

1.4 Vurdering og klassifikasjon av atypier i sylinderepitel

Diagnose av cytologiske funn i sylinderepitel har vist seg å være en utfordring på grunn av sen interesse rundt studie og klassifikasjon. Den opprinnelige cytologiske undersøkelsen av cervix (Papanicolaou test) og klassifikasjon, ble opprinnelige tatt i bruk for å finne atypier og lesjoner i plateepitel. (Tambouret & Wilbur, 2015). Nyere studier som har oppdaget nytteverdien av å studere sylinderepitel i cytologiske undersøkelser, har vært til hjelp for å oppdatere klassifikasjonen av atypier og lesjoner i epitelet. Systemet som klassifiserer atypier i sylinderepitel og plateepitel kalles for Bethesda Klassifikasjon (TBC) (Nayar & Wilbur, 2015). Tredje utgave (2015) av TBC publikasjonen har tatt hensyn til atypier i sylinderepitel og beskrives videre. Normalt sylinderepitel kan observeres i figur 2.



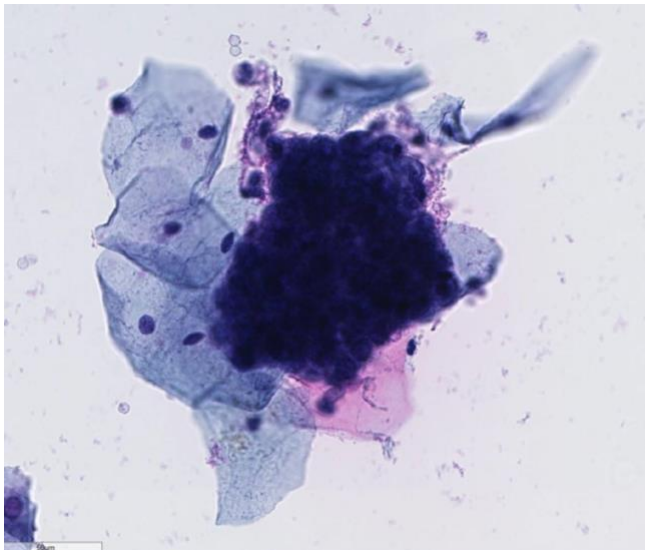
Figur 2. ThinPrep Pap test preparat HE-farget normal sylinderepitel, forstørret 40x, kasus 33. En gruppe sylinderepitelceller ligger i midten av bildet omgitt av plateepitel. Cellene samler seg i bikubestruktur, med tydelige cellegrensar. Plateepitelceller ligger i ytterkant. Gjengitt med tillatelse fra Patologisk avdeling, Haukeland Universitet Sykehus.

Bethesda Klassifikasjonen (TBC) er et amerikansk klassifikasjonssystem tatt i bruk på slutten av 80 tallet (1988). Klassifikasjonen systematiserer funn i gynekologiske

cytologiprøver. (Nayar & Wilbur, 2015). Når det kommer til endringer i sylinderepitel klassifiserer Bethesda systemet disse som atypisk sylinderepitel av usikker opprinnelse (AGUS), Adenokarsinom in situ (AIS) og invaderende Adenokarsinom. Atypiske forandringer som oppstår i sylinderepitel kalles for: atypisk sylinderepitel av usikker opprinnelse (**AGC/AGUS: Atypical glandular cells of unknown significance**).

Terminologien AGC (atypical glandular cells) erstattet AGUS i Bethesda systemet fra 2001 (Solomon et al., 2002), men AGUS benyttes fremdeles i Norge.

Diagnose settes ut fra cytologiske kriterier (Kreftregisteret, 2017) basert på TBC. AGUS omfatter dysplasi i både endocervikale og endometrieceller, som utgjør kjertelceller/sylinderepitel med større kjerneforandringer enn det som observeres ved reaktive eller reparative forandringer. En cellegruppe med AGUS diagnose kan observeres i figur 3.



Figur 3. ThinPrep Pap test preparat med sylinderepitel gitt diagnose AGUS, forstørret 40x, kasus 33. En gruppe overlappende sylinderepitelceller, med pleomorfe kjerner. Forholdet kjerne/cytoplasma er til fordel for kjernen som blir 3-5 ganger større enn normalt. Kromatin presenterer lett irregulart og hyperkromasi. Gjengitt med tillatelse fra Patologisk avdeling, Haukeland Universitet Sykehus.

Funnene er for uttalte til å være normale, men faller ikke under en malign diagnose. Funn samsvarer ikke med inflammasjon eller reaktive celler (Arshi & Farci, 2020). Kriteriene for AGUS mangler kvalitative og kvantitative trekk for diagnose av endocervikal adenokarsinom in situ, eller adenokarsinom, men alvorlige atypiske forandringer tyder på at AGUS er forstadiet til AIS eller adenokarsinom (Kreftregisteret, 2017). I dette prosjektet er det valgt å fokusere på AGUS prøver, da det er stor usikkerhet knyttet til cytologisk tolkning av AGUS prøver. Til tross for at HPV-testen er vist å øke sensitiviteten ved diagnostisering av

celleforandringer i sylinderepitel, skal ikke AGUS-prøver HPV testes (Kreftregisteret, 2019). Ved funn av usikre cellegrupper under mikroskopering av ThinPrep Pap test preparat, vurderes det derfor om celleblokkmetoden kan være et nyttig verktøy for å verifisere usikre funn i sylinderepitel.

1.5 Cellient® Automated Cell Block System

Cellient® Automated Cell Block system er et helautomatisk instrument som hovedsakelig benyttes til å produsere celleblokker fra ikke-gynekologiske prøver på patologiavdelingen ved Haukeland Universitetssjukehus. I prosjektet var det ønskelig å undersøke om instrumentet kunne benyttes til å fremstille celleblokker fra væskebaserte livmorhalsprøver. Dette for å undersøke om det var mulig å oppnå god kvalitet på celleblokkene, samt undersøke om celleblokkene kunne bidra til ytterligere informasjon om epitelcellene i livmorhalsen, sammenlignet med en ThinPrep Pap test. Håpet er at celleblokkmetoden vil oppnå velbevart og tydelig cellemorfologi, som vil kunne bidra til lettere differensiering mellom plate- og sylinderepitel, samt ulike celleforandringer med tilsvarende morfologi som AGUS.

Cellient® systemet bidrar til en rask og standardisert metode, som kan benyttes til prosessering av prøvemateriale med lavt celleantall (Xing, Hou, Fischer, Owens & Jiang, 2014, s. 9). Ved bruk av Cellient® systemet vil den cytologiske prøven legges i et plan i parafinen, og en større del av prøvematerialet vil bli konsentrert på et definert område. Cellient® systemet bidrar også til å redusere eller eliminere krysskontaminering, minke produksjonstiden, og produsere snitt med utmerket kvalitet som er sammenlignbare med rutinesnitt (Xing et al., 2014, s. 13). Cellient® celleblokker ivaretar det strukturelle detaljnivået i cellene, samt bidrar til å konservere nukleinsyrenes integritet. Det er også en fordel at restmateriale fra væskebaserte gynekologiske prøver på ThinPrep® Pap Test PreservCyt Solution kan benyttes til produksjon av celleblokkene. Celleblokkmetoden bidrar i tillegg til at immunhistokjemiske metoder kan benyttes til videre undersøkelse av snittene.

1.6 Immunhistokjemi

I tillegg til de tradisjonelle mikroskopiske observasjonene av cytologiske prøver farget med HE, ble immunhistokjemiske (IHC) metoder brukt til å få et tydeligere bilde av celledelingsaktiviteten og graden av atypi i sylinderepitelet. De immunhistokjemiske metodene ved patologiavdelingen på Haukeland benyttes per i dag til formalinfikserte vevsbiopsier, og immunmarkørene for p16 og Ki-67 som benyttes til de immunhistokjemiske analyser, er kun validert for formalinfikserte materialer. Det var derfor av interesse å

undersøke om metanolfikserte celler i celleblokk kunne benyttes, og hvilken kvalitet som kunne forventes oppnådd. Antistoff mot p16 og Ki-67 ble benyttet til å farge cervix preparatene ved AGUS atypi eller mistanke om AIS eller adenokarsinom.

Ki-67 er et kjerneprotein (NordiQC, 2009a). Proteinet finnes ved alle non-G0 faser av celledyklus. Proteinet er aktivert i begynnelsen av G1 og når sitt høyeste nivå ved M fase, og blir deretter katabolisert. Vevet som blir farget av antistoffet har en prosentandel celler som befinner seg i aktiv celledelingsfase. Unormalt uttrykk av Ki-67 proteinet assosieres med celleproliferasjon. Utrykk av markøren er tydeligere detektert ved høyere nivåer av atypiske lesjoner og ved adenokarsinom, og på den måte brukes som markør for tumor aggressivitet (Li, 2015). Ki-67 farger vevet brunt dersom positiv. Tonsiller brukes vanligvis som positiv kontroll for Ki-67 markøren, men lymfeknute kan alternativt benyttes. I likhet med tonsiller inneholder lymfeknuter et høyt antall av lymfocyt B (Mathias, Sveinung & Daniel, 2011) som farges positiv av Ki-67 markøren.

P16 er et tumor suppressor protein, som spiller en viktig rolle i reguleringen av celledyklusen (NordiQC, 2009b). Økt uttrykk av p16 reduserer celleproliferasjonen til stamceller, og er vanlig å finne hos eldre mennesker. Ved økt uttrykk observeres p16 både i kjernen og cytoplasma til celler. Mutasjoner i p16 genet er assosiert med tap av, eller økt uttrykk av tumor suppressor proteinet, som videre er assosiert med økt risiko for flere kreftvarianter eller forløpere til kreft. Utvikling av dysplasi er nært relatert til HPV infeksjon, og immunhistokjemisk identifikasjon av p16 er derfor særlig relevant ved lesjoner i cervix. Vev fra tonsill brukes som positiv kontroll, samt vev med påvist kreft, for eksempel plateepitelkarsinom.

1.7 Verifisering og validering av metoder

Cellient[®] automatisert celleblokkmetode er validert for bruk på Haukeland sykehus til histologiske ikke-gynekologiske prøver. I dette prosjektet ønskes det å se om instrumentet kan benyttes til å understøtte vurdering av AGUS prøver på gynekologisk cellemateriale.

Ved innføring av denne metoden på cytologiske livmorhalsprøver, forventes det å kunne understøtte funn ved diagnostikk og klassifisering av forandringer i sylinderepitel.

Alle nye analysemetoder går gjennom en valideringsprosess som tester om metoden egner seg til formål og forventninger, og før de tas i bruk ved diagnostikk. Dersom celleblokkmetoden eventuelt skal tas i bruk for vurdering av cytologiske prøver fra livmorhals, må metoden valideres. Etter en metode er validert, verifiseres den regelmessig for å dokumentere at

metoden fungerer etter laboratoriet sine forventninger. Kravene og kriteriene for å godkjenne resultater er bestemt av fagutvalg ved patologiseksjonen (Staby, 2020).

1.8 Formål

Forekomsten av adenokarsinomer utgått fra sylinderepitel i livmorhalsen øker til tross for innføringen av screeningprogrammet for livmorhalskreft. Forstadier til adenokarsinomer kan være vanskelig å oppdage med dagens cytologiske metoder. Videre skyldes ikke alle adenokarsinomer infeksjon av HPV. Så mye som 15-20 % av adenokarsinomene skyldes andre årsaker, og vil dermed ikke fanges opp av en HPV-test. AGUS diagnosen er en usikker diagnose, som ofte er vanskelig å tolke i mikroskop på en ThinPrep Pap test. Det kan i enkelte tilfeller være vanskelig å skille plateepitel og sylinderepitel fra hverandre, og det kan være vanskelig å skille neoplastiske atypier fra andre benigne celleforandringer. Ved funn av usikre cellegrupper tolket som sylinderepitel, settes det en AGUS diagnose, og kvinnen blir videre undersøkt ved kolposkopi og biopsi. Dette benyttes for å avkrefte eller bekrefte diagnosen satt på cytologisk materiale. Tidligere forskning på bruk av celleblokkmetode som tilleggsanalyse ved celleforandring av usikker årsak, indikerer at metoden gir ytterligere informasjon som kan bidra til å stille en sikrere diagnose. Dette ved at metoden bidrar til å avdekke blant annet benigne celleforandringer som innehar morfologisk likhet med AGUS, celleforandringer i plateepitel (eller annen type epitel enn sylinderepitel), samt fastslå AGUS diagnosen. Formålet med prosjektet ble dermed å undersøke hvorvidt Cellient[®] celleblokkmetode i kombinasjon med immunmarkører kunne bidra til å gi ytterligere informasjon om cytologisk usikre grupper av sylinderepitel fra livmorhals. Det var ønskelig å undersøke om Cellient[®] celleblokkmetode kunne fungere som en supplerende metode for å kvalitetssikre og verifisere AGUS diagnosen. Rent praktisk gikk oppgaven ut på å vurdere det tekniske vedrørende bruk av instrumentet Cellient[®], kvaliteten på celleblokkene, samt en ny morfologisk vurdering av cellene på celleblokk. I tillegg ble immunhistokjemi mot immunmarkørene p16 og Ki-67 benyttet for å undersøke om metoden kunne fungere, og bekrefte positive resultater ved atypiske og neoplastiske trekk på metanolfiksert materiale. Dette fordi den immunhistokjemiske metoden for nevnte markører tidligere kun er validert for formalinfiksert materiale.

2. Material og metode

2.1 Prøvemateriale

I alt ble det undersøkt celleprøver fra livmorhals hos 51 pasienter, tatt som rutineprøver i screeningprogrammet og gitt diagnosen AGUS, AIS, ASC-US og normal. Prøvene ble tatt og oppbevart på ThinPrep® Pap Test PreservCyt Solution® (Hologic®), en bufferløsning bestående av 35-55 % metanol (Hologic, 2019). AGUS, AIS, ASC-US og normal diagnose var satt på bakgrunn av cytologisk vurdering av ThinPrep Pap test preparat. Prøvematerialet i PreservCyt løsning var på forhånd vurdert å ikke inneha blod i større mengde enn akseptert. Noen av prøvene inneholdt faste komponenter og det krevdes dermed manuelle pipettering av materiale under prosessering. Enkelte prøver var av høy konsentrasjon og fortykning med PreservCyt Solution® av materialet var nødvendig.

Av de 51 pasientprøver var 46 prøver diagnostisert som AGUS, en som AIS, to som ASC-US og to som normale. I utgangspunktet skulle alle pasientprøvene ha diagnosen AGUS, ettersom det var usikre celleforandringer i sylinderepitel som var ønsket vurdert ved hjelp av celleblokkmetoden. AGUS er en diagnose som stilles relativt sjeldent, og holdbarheten på prøvematerialet er på kun 6 uker. Derfor ble samtlige 51 pasientprøver inkludert for å få tilstrekkelig antall prøver som grunnlag for vurdering av metoden. Det kunne også være av interesse å sammenligne resultatene fra den mikroskopiske vurderingen med resultatene oppnådd på celleblokk for de ulike diagnosene.

Enkelte av pasientprøvene overskred anbefalt holdbarhet på analysetidspunktet. Det ble på tross av dette valgt å benytte prøvene i prosjektet for å få tilstrekkelig antall AGUS prøver. Dette kan imidlertid utgjøre en feilkilde, men det antas å utgjøre en minimal forskjell.

2.2 Gjennomføring

Celleprøvene ble først innstøpt i parafin ved bruk av celleblokk systemet, for deretter å bli overlevert til immunhistokjemisk seksjon for snitting og immunfarging, samt HE farging ved histologisk seksjon, og til slutt vurdert mikroskopisk av patolog. Alt arbeid ble utført på avdeling for patologi ved HUS.

Til å støpe celleblokkene ble det benyttet kassett- og filterenheter, pipettespisser og Paraplast X-Tra™ parafin tilhørende Cellient® systemet. Kassett ble på forhånd merket med lab nummer og QR-kode unik til hver pasientprøve, ved bruk av kassettprinter (Primera Technology Inc., North Plymouth, MN), og tilhørende PTLab™ Software. Cellene ble

prosessert i Cellient® Automated Cell Block Systemet (Hologic® Inc, Marlborough, MA). Forhåndsbestemte parametere regulerte volum reagenser og eksponeringstid, samt temperatur som ble benyttet for oppvarming og nedkjøling i de ulike prosessene prøvematerialet gjennomgikk. I Cellient® prosessoren ble prøvematerialet tilsatt enten automatisk eller manuelt gjennom en åpning i kassetten. Prøvematerialet la seg over filteret, hvorpå vakuumenheten trakk væsken gjennom filteret slik at det faste materialet ble gjenværende. Prøvemateriale ble tilsatt frem til ønsket væskestrøm gjennom filteret ble oppnådd (Hologic, 2015). Videre ble 0,25 mL av fargestoffet eosin dispensert, som bidro til å farge cytoplasma i cellene. Dehydreringsmiddelet etanol (96 %) ble så dispensert. Volum dispensert, og tid prøven ble eksponert for etanol var avhengig av om automatisk eller manuell dispensering av prøvematerialet ble benyttet (Hologic, 2015). Xylen (98,5 %) ble brukt som klargjøringsreagens, før cellene ble infiltrert av Paraplast X-Tra™ parafin (Cellient®). Prøven ble da varmet opp til maks temperatur (innstilt i instrumentet ca. 80 grader) før parafin ble tilsatt, og vakuum trakk parafinet gjennom celleblokken til kassetten var full (Hologic, 2015). Prøven ble kjølt ned til minstemperatur (innstilt i instrumentet ca. 0 grader) og celleblokken hardnet i 10 minutter. Kassetten med celleblokk og filter ble fjernet fra instrumentet og så forflyttet til nedkjøling i fryseskap -18 °C i 5 minutter, før filteret ble fjernet. Prosessen tok rundt 28 minutter. Celleblokken ble deretter overført til ferdigstillelsesstasjonen hvor den ble videre innstøpt i parafin til kvadratisk form, for enklere å snitte på mikrotom. Denne prosessen tok rundt 15 minutter.

Videre ble celleblokkene levert immunhistologisk seksjon på patologisk avdeling, HUS, hvor de ble snittet, og overført til tre objektglass: to for immunhistokjemi og et til HE farging. Immunmarkører benyttet var monoklonale museantistoffer Ki-67 og p16 (Ki-67: Dako, ref.nr.: M7240, Lotnr.: 41236415, og p16: BD Pharmingen™, ref.nr.: 550834, Lotnr.: 8260844). Sammen med prøvematerialet ble det lagt positive og negative kontroller på objektglassene, (dette kalles for multiblokk), deretter tilsatt immunmarkører til kontroller og prøvematerialet. Ett preparat/snitt ble farget med Ki-67 og ett med p16 etter gjeldende protokoll for immunmarkøren, se vedlegg 2. Prosedyren ble utført i Ventana Benchmark Ultra (Roche Ltd.)

Histologisk snitt av lymfeknute og plateepitelkarsinom ble benyttet som intern positiv kontroll og lever eller bukspyttkjertel som negative kontroller (NordiQC, 2009a). Kontrollvevet ble farget på lik linje med pasientprøvene og ble godkjent på bakgrunn av

fargens sensitivitet og spesifisitet, samt forventet positivt og negativt utslag for markørene Ki-67 og p16 i de spesifikke celletypene i vevene.

I tillegg ble ett snitt farget med hematoksylin og eosin (HE) på fargeinstrument Tissue Tek Prisma® (Sakura®, Nederland). Gjeldende fargeprotokoll for HE farging ble benyttet i instrumentet, se vedlegg 2. Snittene ble kontrollert makroskopisk og mikroskopisk for rett farge og tone, sprekker, folder, tykkelse og artefakter.

Avslutningsvis ble de ferdige preparatene vurdert mikroskopisk av patolog og resultat av analysene ble presentert av bachelorgruppen.

Benyttet prosentregning til å sammenligne den opprinnelige cytologiske diagnosen med den morfologiske vurderingen gitt for celleblokkensnitt. Prosentberegning ble utført ved hjelp av formel 1.

Formel 1. Prosent beregning

$$p = \frac{x * 100 \%}{y}$$

Hvor x tilsvarer del av antall prøver som skal regnes og y tilsvarer den hele antall prøver.

3 Resultat

Resultater presenteres først med observasjon av produktet celleblokk og cytologisk vurdering av preparat basert på celleblokk i sin helhet, cellenes morfologiske fremstilling i celleblokk, HE fargede snitt og immunmarkørene Ki-67 og p16 til støttevurdering. Kvaliteten på celleblokkene ble vurdert ut fra kriterier om væskebasert gynekologisk materiale egnet seg til produksjon av celleblokker og ble basert på makro- og mikroskopisk observasjon. Til slutt presenteres tre kasus mer detaljert med bilder fra mikroskopering av snitt.

3.1 Cytologisk diagnose

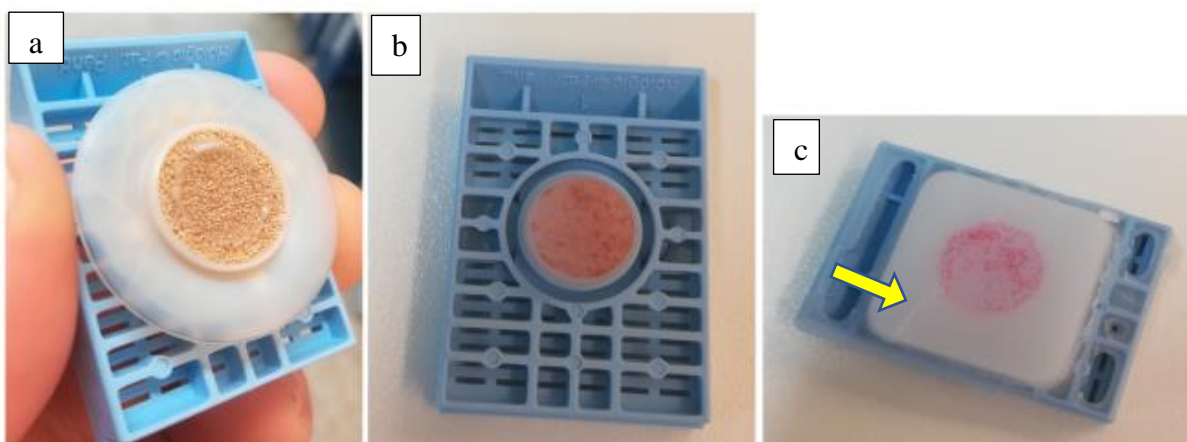
Tabell 1 viser en oversikt av opprinnelige diagnose satt på ThinPrep Pap test preparater av væskebasert cytologi. For fullstendig rådatatabell se vedlegg 3. Av de 51 prøvene, hadde 46 prøver (90 %) AGUS som diagnose, en prøve (1,96 %) AIS diagnose, to prøver (3,93 %) ASC-US diagnose og to prøver (3,93 %) var normale.

Tabell 1. Opprinnelig diagnose for 51 væskebasert cytologiske prøver.

Atypier funnet av væskebasert cytologi (ThinPrep Pap test)	Antall opprinnelige cytologiske diagnoser
AGUS	46
AIS	1
ASC-US	2
Normale	2
Totalt antall prøver	51

3.2 Celleblokk

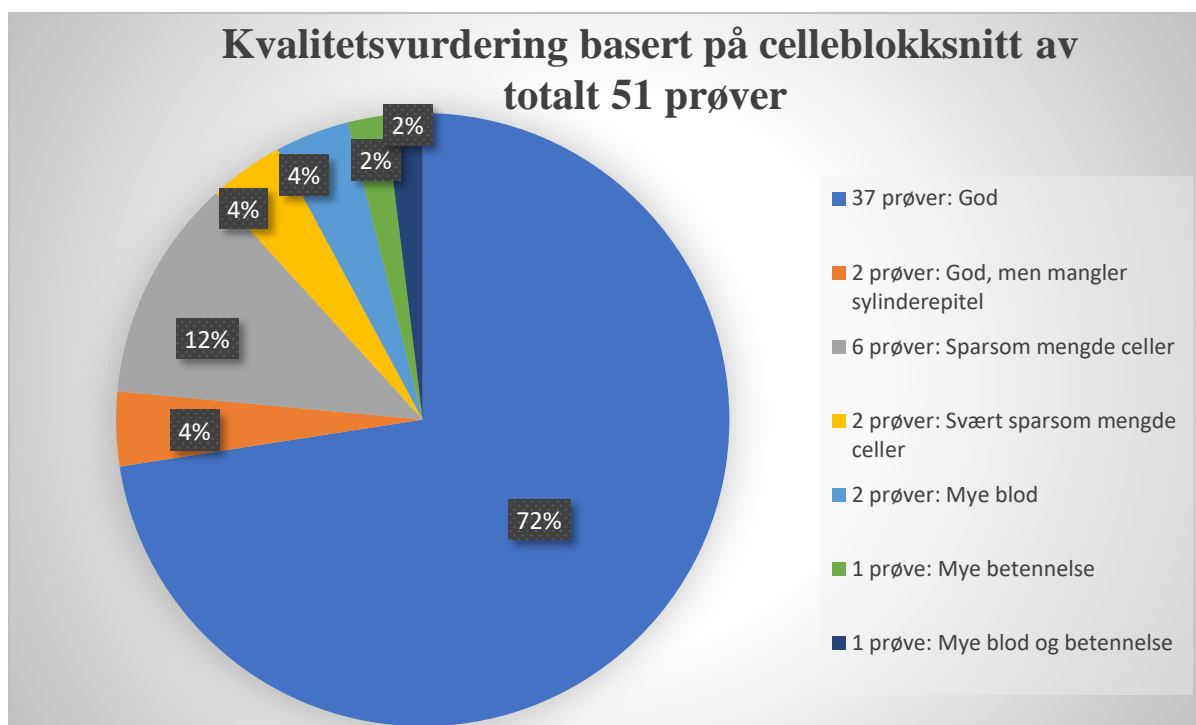
Kvaliteten på 51 av 51 celleblokker var godkjent. Eksempel på celleblokk sees i figur 4. Ved makroskopisk vurdering av celleblokkene ble kvaliteten på majoriteten av prøvene vurdert å være god. Til tross for dette ble det funnet at på enkelte av celleblokkene hadde cellene sklidd noe ut fra den sirkulære celleblokken til omkringliggende parafin. Videre kunne det observeres enkelte sprekker i den ytre parafinen på flertallet av de ferdige celleblokkene, spesifisert ved gul pil i figur 4c. Så lenge sprekken ikke krysset selve prøvematerialet ble kvaliteten vurdert å være god.



Figur 4. Bildet viser kassett med filter og celleblokk. a) Filterenhet påmontert kassett. b) Celleblokk prosessert og eosinfarget i Cellient®. c) Ferdig innstøpt celleblokk, hvor gul pil peker på sprekke i celleblokken. Foto: eget, mars 2021.

3.3 Vurdering av snitt fra celleblokker

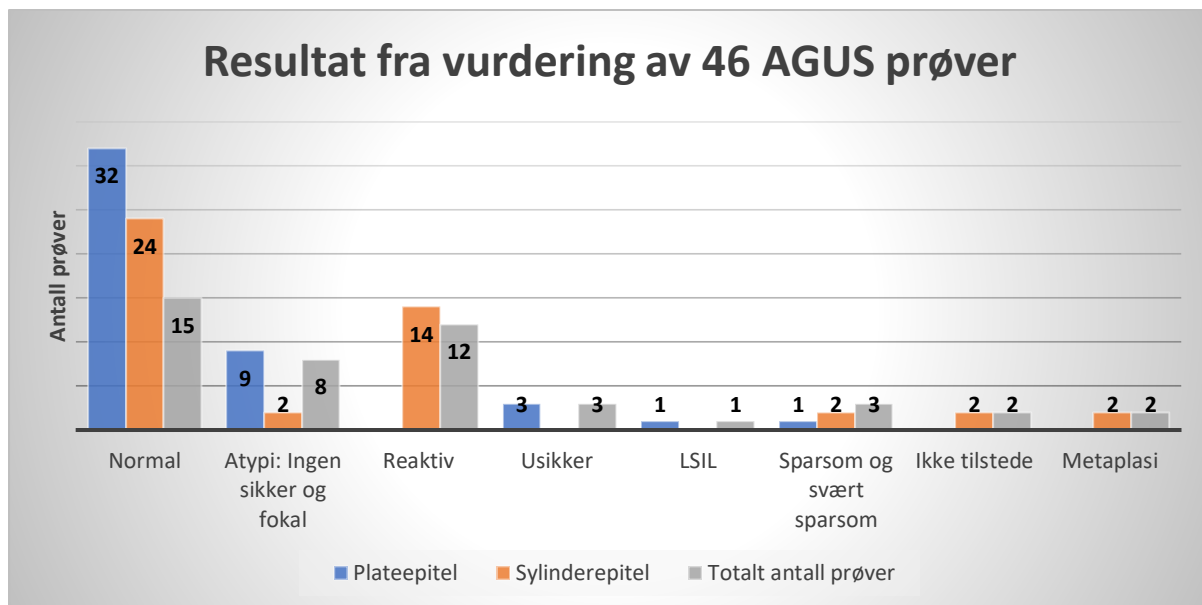
Vurdering av kvalitet på snitt av celleblokk (preparater) utført av patolog vises i figur 5. Ny vurdering av cellemorfologi fremstilles i tabell 2. Vurdering av kvalitet på celleblokkene presenteres i figur 6.



Figur 5. Kvalitetsvurdering basert på cellebloksnitt av totalt 51 prøver. Diagrammet fremstiller prosentandel av celleblokkene gitt ulike vurderingskategorier, med forklaring (til høyre) på antall snitt satt i de ulike kategoriene.

Fra figur 5 observeres at snitt fra 37 celleblokker (72 %) ble vurdert å ha god kvalitet. To snitt manglet sylinderepitel fullstendig (4 %). Seks av snittene presenterte sparsomt med prøvemateriale (12 %) og på to snitt (4 %) var det svært sparsomt med prøvemateriale. Mye blod var til stede på to av snittene (4 %). Ett snitt inneholdt mye betennelsesceller (2 %) og ett inneholdt mye av både blod og betennelsesceller (2 %).

Ved mikroskopering av snitt fra celleblokkene ble både plateepitelet og sylinderepitelet vurdert på tilstedeværelse og morfologi. Morfologisk kvalitet på snitt med opprinnelig AGUS diagnose presenteres i tabell 2 og figur 6.



Figur 6. Ny vurdering av plateepitel og sylinderepitel, og samlet vurdering av 46 AGUS prøver. Morfologisk vurdering av plateepitelet i de 46 AGUS prøvene vises som blå søyler, sylinderepitelet som oransje søyler, og den samlede vurderingen som grå søyler.

I figur 6 gis en separat oversikt over de morfologiske vurderingene av plateepitel (blå søyler) og sylinderepitel (oransje søyler) i de 46 AGUS prøvene. Videre gis en samlet vurdering av epitelet i prøvene, vist som grå søyler i diagrammet. Prøvene ble plassert i kategorier etter hvilke kriterier vi vurderte som «viktigst». Det kan blant annet observeres at 14 prøver inneholdt reaktivt sylinderepitel, mens samlet fremstilles det som at 12 prøver inneholdt reaktivt epitel. Dette kan forklares med at prøven vurdert til LSIL også inneholdt reaktivt sylinderepitel, men plasseres i kategorien LSIL, da disse celleforandringene er mer alvorlige. En prøve med reaktivt sylinderepitel inneholdt atypi i plateepitel, og ble dermed plassert under kategorien Atypi. For en oversikt over plate- og sylinderepitel i prøvene, se tabell 2.

Tabell 2. Tolkning av 46 prøver med opprinnelig AGUS diagnose, en prøve med AIS, to med ASC-US og to normale prøver.

AGUS			AIS		
Plateepitel	Sylinderepitel	Antall prøver	Plateepitel	Sylinderepitel	Antall prøver
Normalt	Normalt	15	Atypi	Normal	1
Ingen sikker atypi	Fokal atypi	1		Totalt antall prøver	1
Ingen sikker atypi	Normalt	1			
Usikkert	Normalt	2	ASC-US		
Normalt	Reaktivt	12	Plateepitel	Sylinderepitel	Antall prøver
Atypi	Normalt	5	ASC-US	Normal	1
Atypi	Reaktivt	1	Normal	Normal	1
Atypi?	Ikke til stede	1		Totalt antall prøver	2
LSIL	Reaktivt	1			
Normalt	Sparsomt/ ikke til stede	3	Normal		
Sparsomt	Normalt	1	Plateepitel	Sylinderepitel	Antall prøver
Normalt	Metaplasi	2	Normal	Normal	1
Usikkert	Atypi?	1	Reaktiv	Normal	1
	Totalt antall prøver	46		Totalt antall prøver	2

I figur 6 og tabell 2, vises tolkning av 46 prøvene med opprinnelig AGUS diagnose. 32 av prøvene (69,6 %) ble vurdert å inneholde normalt plateepitel og 24 av prøvene (52,2 %) normalt sylinderepitel. Resultatene for plate- og sylinderepitel er overlappende. Av de 46 AGUS prøvene ble 15 prøver (32,6 %), vurdert å inneholde både normalt plateepitel og sylinderepitel ved celleblokkvurdering. Alle de normale epitelcellene, både sylinderepitel og plateepitel, hadde negativt utslag på immunmarkørene p16 og Ki-67.

Ved vurdering av sylinderepitel i de 46 AGUS prøvene ble 14 prøver (30,43 %) vurdert å inneholde reaktive sylinderepitelceller. Ti av de reaktive prøvene (71 %) viste negativt utslag for p16 og Ki-67. Tre av de reaktive prøvene (21,4 %) viste en fokal økning av Ki-67 men var negative for p16. Den siste reaktive prøven (7 %) ble vurdert å ha fokal økning av Ki-67 samt økt mengde p16 i cytoplasma. To prøver (4,3 %) viser grad av atypi: en prøve inneholdt fokal atypi, med positivt utslag for p16 og fokalt økt Ki-67, og en prøve ble vurdert til å inneha mulig atypi i sylinderepitel, med økt mengde p16 i cytoplasma og fokalt økt Ki-67. To prøver (4,3 %) ble vurdert til å inneha metaplastiske celler, med negativt utslag for begge

immunmarkører. I to prøver (4,3 %) ble det funnet svært sparsom mengde sylinderepitel, og to prøver hvor sylinderepitel ikke var til stede (4,3%).

Ved vurdering av plateepitel i de 46 AGUS prøvene, ble det funnet atypisk plateepitel i syv av prøvene (15,21 %). En av de atypiske prøvene (14,3 %) ble funnet å ha fokal økning av Ki-67, men var negativ for p16. Fire av de atypiske prøvene (57, 1 %) hadde positivt utslag for både p16 og Ki-67. To atypiske prøver (28,6 %) hadde negativt utslag på begge markører. Videre ble det funnet tre prøver (6,5 %) med usikkerhet vedrørende funn i plateepitel. Av disse prøvene hadde én fokal økning av Ki-67 og negativ p16. I to av de usikre prøvene ble det funnet økt mengde p16 i cytoplasma, samt fokalt økt Ki-67. En prøve (2,1 %) inneholdt sparsom mengde plateepitelceller, og ble ikke vurdert. En av prøvene (2,1 %) ble vurdert til LSIL, lette celleforandringer i plateepitel. Denne prøven viste negativt utslag for begge immunmarkører. Til slutt ble to prøver (4,35 %) vurdert å være uten sikker atypi. Begge prøvene var negative for p16 og Ki-67.

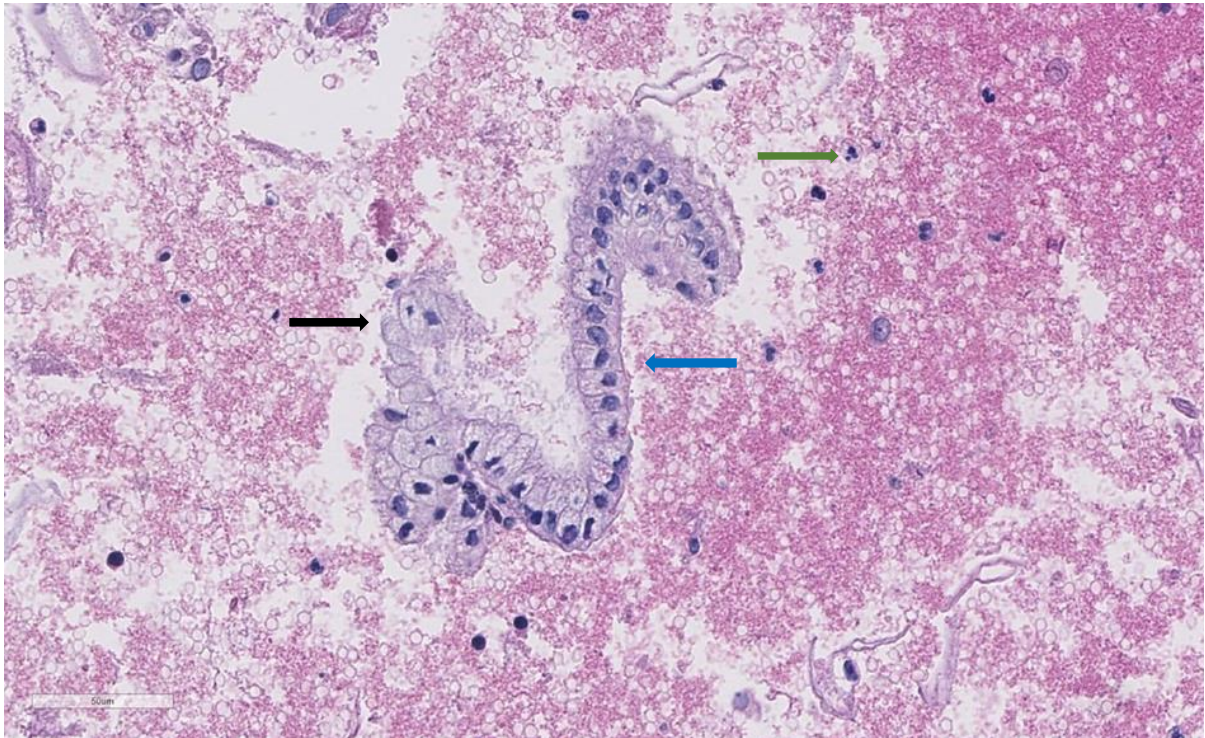
Ut fra snitt av celleblokk, ble prøven med AIS diagnose vurdert å ha atypi begrenset til plateepitelet. Plateepitelet med atypi ble vurdert til å ha økt mengde Ki-67 og negativ p16. Ny tolkning antydte plateepitel med nedvekst i kjertelepitel. Kvaliteten på celleblokk fra AIS prøven var god. Videre ble begge ASC-US prøvene vurdert å ha normalt sylinderepitel. Den ene prøven inneholdt i tillegg normalt plateepitel, mens den siste ble vurdert til ASC-US. Begge snittene fra ASC-US prøvene ble vurdert til å være negative for p16 og Ki-67. Celleblokk fra begge ASC-US prøvene var av god kvalitet. Til slutt i tabellen vises de normale prøvene. Begge to ble vurdert å ha normalt sylinderepitel. Den ene av prøvene ble ved vurdering av celleblokk, funnet å inneha reaktive plateepitelceller, og i tillegg mye blod og betennelsesceller. Begge snittene fra de normale prøvene var negative for p16 og Ki-67. Også celleblokker fra de normale prøvene var av god kvalitet.

3.4 Mikroskopibilder av snitt fra celleblokk

Under presenteres et utvalg av bilder fra mikroskopering av snittene, med immunhistokjemiske markører og HE-farging. Først presenteres et utvalg av bilder fra kasus 12 hvor der var funn av normalt sylinderepitel og atypi i plateepitel, samt resultat av immunhistokjemiske analyser. Deretter vises bilde fra kasus 33 som eksempel på reaktivt preget sylinderepitel, og til slutt normalt sylinderepitel fra kasus 51. De tre kasusene var opprinnelig diagnostisert AGUS.

Kasus 12

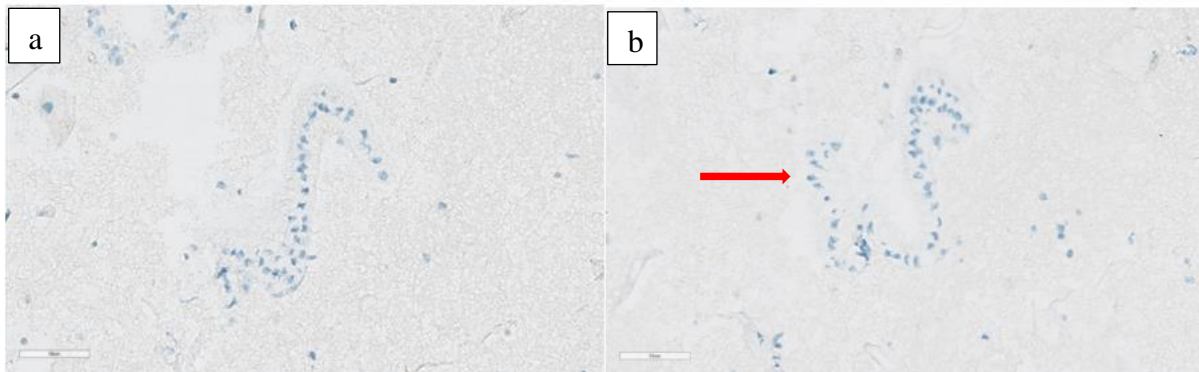
Celleblokk og snitt tilhørende kasus 12 var av god teknisk kvalitet. Celleblokken ble tolket å inneha normalt sylinderepitel med negativt utslag på p16 og lavt utslag på Ki-67, samt plateepitel med atypi og positivt utslag på p16 og fokalt økt Ki-67, se vedlegg 3.



Figur 7. Normalt sylinderepitel, HE-farget, ved forstørrelse 40x, kasus 12. I snittet observeres mye blod (rosa) samt noen betennelsesceller (grønn pil). I midten kan det tydelig observeres en rekke av sammenhengende normalt sylinderepitel (blå pil). Kjernene er ovalformet med tett kromatin, og ligger i bunnen av cellen. Et område viser manglende kjerner (svart pil) dette grunnet hvordan snitt ble utført.

I figur 7 observeres normalt sylinderepitel sentralt i bildet. Videre sees blod som rosa fargede celler rundt sylinderepitel, samt betennelsesceller farget mørk lilla (grønn pil).

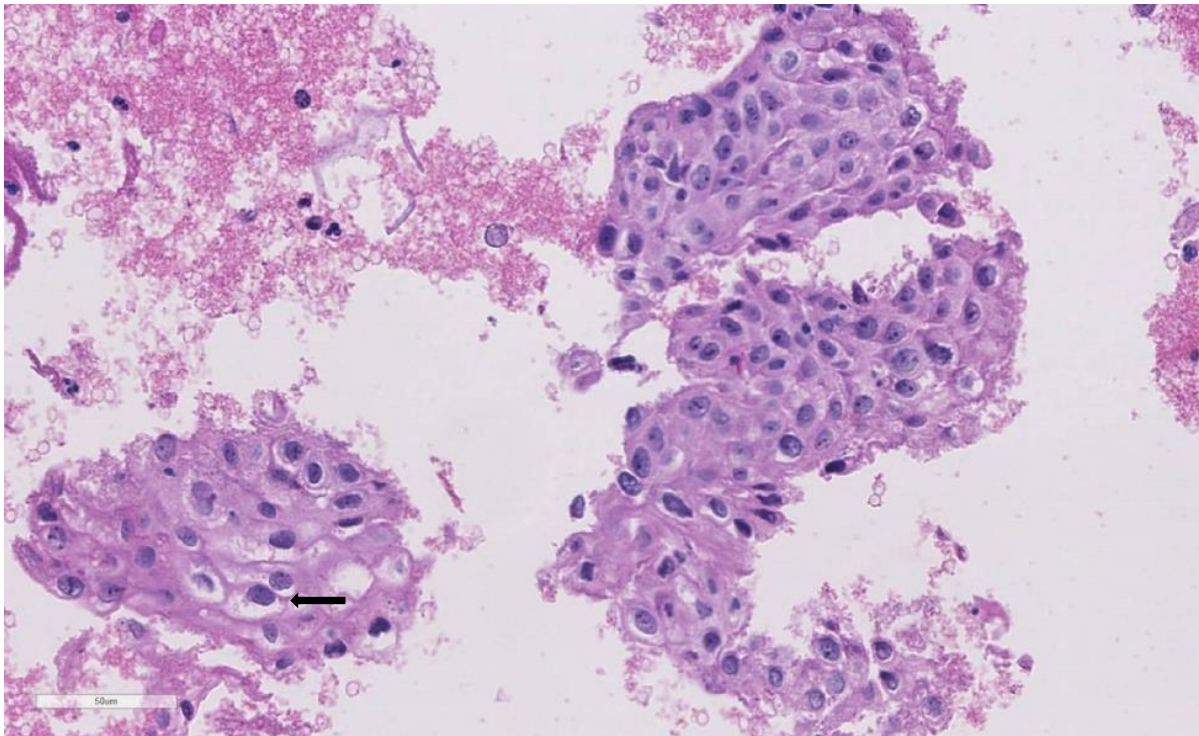
Sylinderepitelet er av sylindrisk form med kjerne basalt i cellen (blå pil), jevn størrelse og farge på kjerner, cellene er plassert systematisk i sammenheng med hverandre og respekterer cellegrenser. Enkelte av kjernene observeres å være smale. Noen sylinderepitelceller observeres å tilsynelatende ikke inneholde kjerne (svart pil.)



Figur 8. Sylinderepitel, negativ IHC utført med p16 og Ki-67, ved forstørrelse 40x, kasus 12. Normalt sylinderepitel i sentrum av begge bildene, kontrastfarget med hematoksylin som farger cellekjernene blå. a) p16 negativ farging i sylinderepitelcellekjerner, og b) Ki-67 negativ farging i sylinderepitelcellekjerner. Rød pil viser til cellekjerner som ikke fremkom i figur 7.

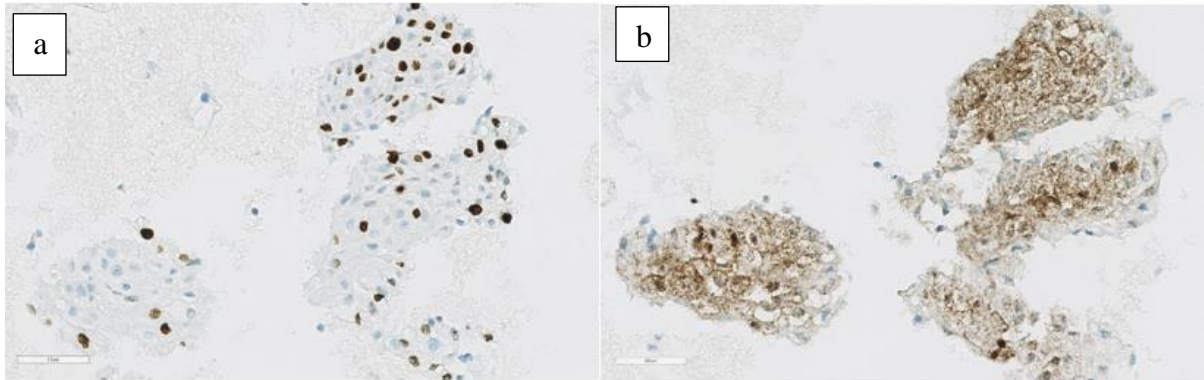
I figur 8, vises tilhørende snitt fra samme celleblokk hvor det fremkommer område med samme celler, men fra ulike nivå i celleblokken. Til høyre (figur 8b) markert med rød pil sees blå cellekjerner i sylinderepitel, som ikke var til stede i figur 7.

Snittene i figur 8 ble behandlet med de immunhistokjemiske markørerne for p16 til venstre og Ki-67 til høyre. Resultatet var negativt for markører da ingen brun farge var synlig.



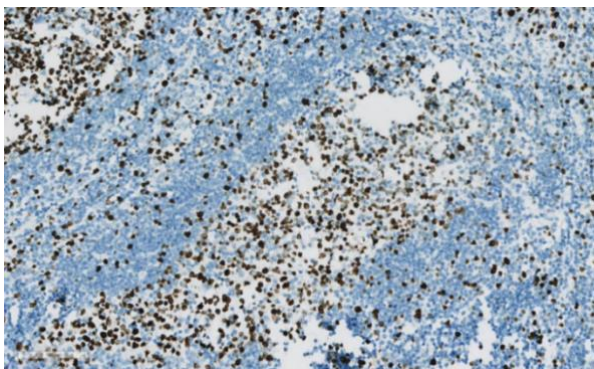
Figur 9. Atypisk plateepitel, HE-farget, ved forstørrelse 40x, kasus 12. Kjernene er større, irregulære og viser en umoden kvalitet, samt hyperkromasi. Cytoplasmatiske perinukleære oppklaringer er synlige (svart pil). Epitelkjernene viser ulike former og størrelser (pleomorfisme).

I figur 9 vises plateepitel i snitt farget med HE. Det sees ansamling av plateepitel hvor det observeres pleomorfe cellekjerner med innslag av kjernelegemer og hyperkromasi, samt noe oppklaring rundt enkelte kjerner (svart pil).



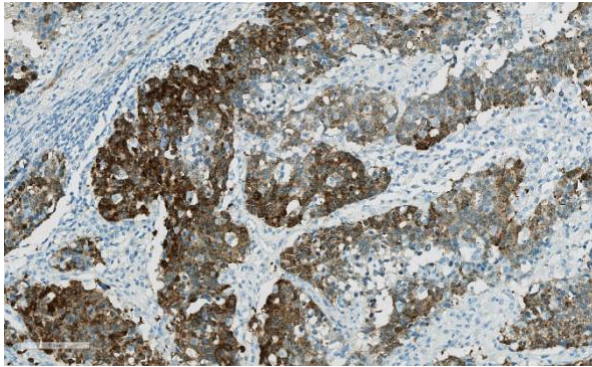
Figur 10. Plateepitel positiv på IHC markører for Ki-67 og p16, ved forstørrelse 40x, kasus 12. a) Ki-67 positivt plateepitel og b) p16 positiv i plateepitel. Immunmarkører sees som mørk brun og brun farge, kontrastfarge hematoksylin vises i lys blått. I bildet til venstre markerer Ki-67 økning i proliferasjon og til høyre markeres økt aktivitet i tumor suppressor proteinet p16.

Videre i figur 10 vises tilsvarende plateepitelceller presentert i figur 9, men her behandlet med de immunhistokjemiske markørene for Ki-67 og p16. Til venstre, figur 10a, sees økning av Ki-67 som brune og mørk brune cellekjerne i celler med økt proliferasjon. Og til høyre, i figur 10b, observeres områder med økt uttrykk av tumor suppressor proteinet p16, farget brunt i både kjerne og cytoplasma til plateepitelcellene.



Figur 11. Positiv kontroll Ki-67 i histologisk preparat av lymfeknute, ved forstørrelse 20x, kasus 12. Markøren for Ki-67 vises på bildet som mørk brun farge i cellekjerne i lymfocyt B.

Til sammenligning av forventet resultat i figur 10 ved bruk av markøren Ki-67, vises positiv kontroll i vev av lymfeknute figur 11, med utslag i brun farge hos lymfatiske B-cellekjerner.

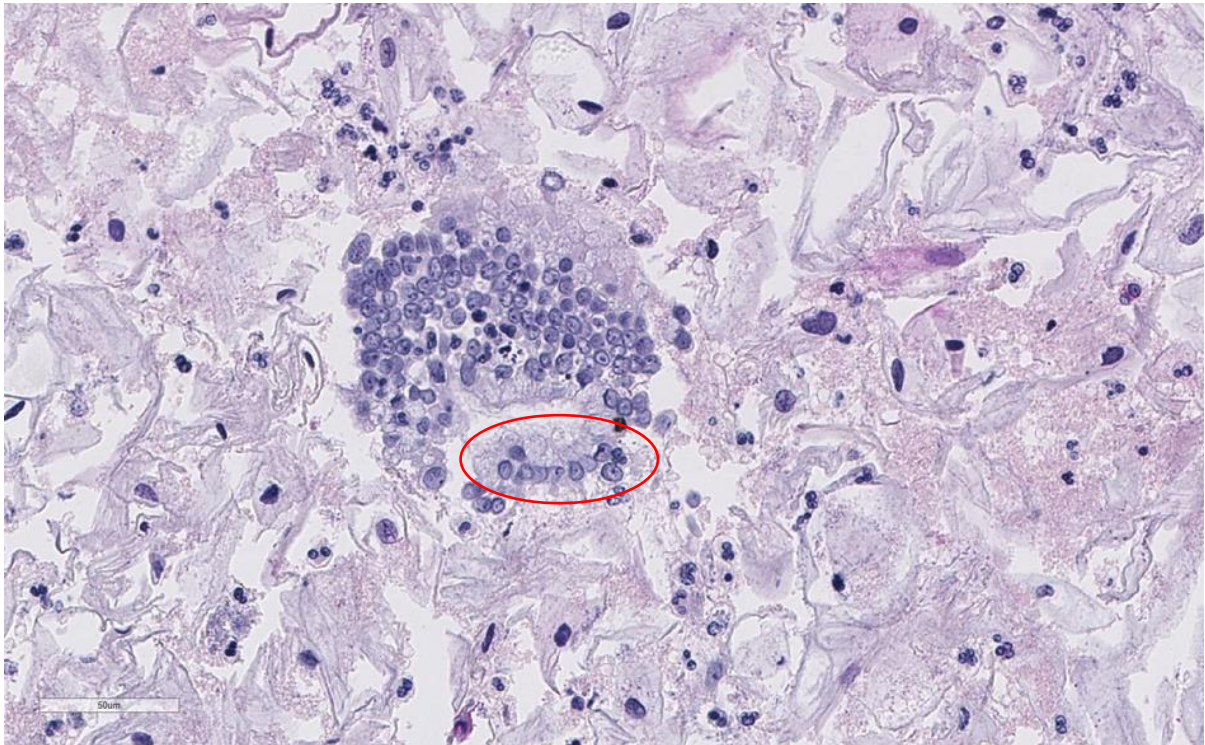


Figur 12. Positiv kontroll for p16 i histologisk preparat av plateepitelkarsinom, ved forstørrelse 20x, kasus 12. Utslag på markør vises som brun farge.

For markøren p16 ble histologisk preparat av plateepitelkarsinom benyttet som positiv kontroll, og resultat presenteres i figur 12. Antistoff for p16 har bundet til proteinet i kjerner og cytoplasma i neoplastiske celler med økt celleomsetning, i vev fra plateepitelkarsinom og markøren gir positivt utslag med brun farge. Det observeres kraftigere brunfarge i kontrollvevssnittet, figur 12, enn i de reaktive cellene presentert i figur 10b.

Kasus 33

Celleblokken til kasus 33 ble vurdert ha god kvalitet. Plateepitel ble tolket som normalt og hadde negativt utslag for immunmarkører Ki-67 og p16. Sylinderepitel ble tolket å være normalt og hadde negativt utslag for begge immunmarkører, vedlegg 3.

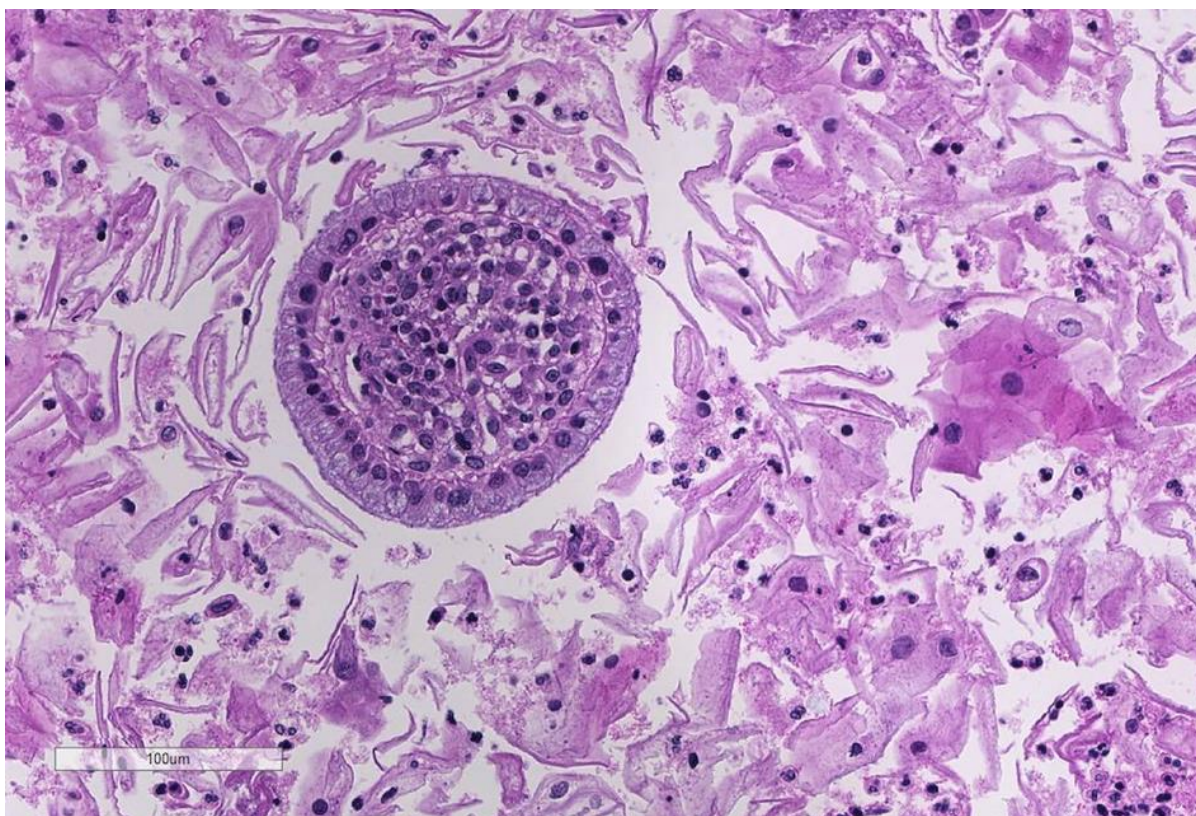


Figur 13. Reaktivt preget sylinderepitel, HE-farget, ved forstørrelse 40x, kasus 33. Sylinderepitel ses i midten av bilder med omgivende plateepitel og betennelsesceller. Sylinderepitelet har et homogent mønster, ingen overlapping og kjerner kan sees basalt i cellene (rød ring). Kjernene i sylinderepitelet er 2-3 ganger større enn normal, samt at kernelegemer er synlige.

Ved vurdering av HE snitt fra celleblokken ble det funnet reaktive sylinderepitelceller, figur 13.

Kasus 51

Cytologisk diagnose for kasus 51 (figur 14) var AGUS. Kvaliteten på celleblokken ble vurdert å være god. Celleblokken ble vurdert å inneholde normalt sylinderepitel, med negativt utslag for Ki-67 og p16 i snittene. Plateepitelet ble morfologisk vurdert å være usikkert, med økt forekomst av p16 i cytoplasma, og fokal økning av Ki-67.



Figur 14. Del av sylinderepitelkledd slimhinne med omgivende plateepitel, HE-farget, ved forstørrelse 40x, **kasus 51.** Sentralt sees en ring av sylinderepitel, jevn størrelse på kjerner basalt plassert i cytoplasma. I plateepitel sees cellekjerner av varierende størrelser, samt en del betennelsesceller.

4 Diskusjon

Vurdering av snitt fra celleblokkene er i denne omgang kun en subjektiv tolkning, utført av én patolog. Tolkningen har vært basert på kvaliteten på celleblokkene, cellenes morfologi, hvorvidt de ulike epitelcelletypene lar seg skille fra hverandre og en test på om immunhistokjemi for immunmarkørene p16 og Ki-67 lar seg utføre for metanolfikserte livmorhalsprøver.

Prøvemateriale

I dette prosjektet ble det kun benyttet prøver fra 51 kasus hovedsakelig med opprinnelig diagnose AGUS. Ideelt sett hadde det vært ønskelig med flere for å i større grad kunne generalisere. Men grunnet at AGUS er en diagnose som forekommer ved lav hyppighet, og sett i lys av at holdbarheten på væskebaserte prøver kun er 6 uker, var det vanskelig å skaffe flere prøver til studien. Et lavere antall prøver måtte derfor benyttes. Etersom resultatene baserer seg på tolkninger og vurderinger gjort av én patolog, er det ikke mulig å trekke noen

spesifikke konklusjoner av de fremkomne resultater, da celleblokkene vil kunne vurderes annerledes av andre patologer. Cytologiscreening er et avansert og subjektivt felt, hvor det tar flere år å opparbeide seg kunnskap og erfaring. Til tross for flere års erfaring, vil det likevel være en viss usikkerhet knyttet til de morfologiske tolkningene som gjøres.

Aspekter ved celleblokkmetoden

En fordel ved celleblokkmetoden er at en får samlet cellene fra den gjenværende livmorhalsprøven fra ThinPrep PreservCyt beholderen på et definert område i celleblokken. Dette gir et enklere overblikk over de tilstedeværende cellene i prøven, og dersom celleprøven inneholder få celler, vil celleblokkmetoden bidra til å konsentrere cellene.

Ved støpning av celleblokkene vil cellene fordeles over et filter og dermed støpes inn i parafinen i sin helhet. Cellene vil deretter snittes slik som de befinner seg i parafinen, og det vil oppnås et tverrsnitt av cellene. Slik vil kun deler av en celle fremvises på snittet. Dette fører til at cellemorfologien fremstår som annerledes enn på cytologiske preparater som ThinPrep Pap test. Eksempelvis i figur 7 der enkelte sylinderepitelceller ser ut til å mangle cellekjerner, og enkelte tilstedeværende kjerner viser ulikheter i både form og størrelse. Dette fremkommer fra produksjon av celleblokk hvor cellene ikke plasseres likt i blokkens dimensjon, og snitteprosessen forårsaker at cellene kan bli kuttet i ulike nivå. Ved bruk av ThinPrep Pap test preparat vises celler i sin helhet. Videre har celleblokken den fordel at en kan snitte cellene i blokken flere ganger, og dermed studere de samme cellene, men fra noe ulike «vinkler»/tverrsnitt. Om det eksisterer usikkerhet vedrørende cellemorfologien i celleblokkensnittet, så er det mulig å snitte blokken på nytt og kanskje oppnå et bedre bilde på de samme cellene. Ved produksjon av nytt ThinPrep Pap test preparat vil derimot helt nye celler presenteres.

En fordel med celleblokkmetoden er at restmateriale fra rutinemessige celleprøver kan benyttes til produksjon av celleblokkene, og pasienten trenger ikke å kalles inn til ny prøvetaking. En mister heller ikke muligheten til å utføre en HPV-test, selv om alt restmaterialet fra rutinemessige celleprøver benyttes til produksjon av celleblokk. Det benyttes da andre metoder for påvisning av HPV, enn ved HPV-testen beregnet på gynekologisk væskebasert ThinPrep PreservCyt materiale. Til tross for at AGUS diagnosen settes basert på cytologisk vurdering og prøvene ikke henvises til HPV-test etter algoritmen, vil det altså likevel være mulig å gjennomføre en HPV test fra materialet i celleblokken.

Makroskopisk vurdering av celleblokk

Av praktiske svakheter ble det oppdaget cellemateriale utover den sirkulære celleblokken og sprekkdannelse i parafin, med noen tilfeller av sprekk inn i prøvematerialet. Vandring av materiale antas å skyldtes at den sirkulære celleblokken hadde ligget for lenge i parafin i ferdigstillingsstasjonen før instrumentet ble satt til å kjøle og stivne parafinen. Rutine ved å sette i gang kjøleprosessen umiddelbart er derfor viktig. I dette tilfellet kan feilen skyldes at brukerne var under opplæring og ikke hadde nok erfaring. Cellematerialet ble likevel bevart da det utsklidde cellematerialet i svært liten grad utgjorde noen betydning for vurdering av cellene. Videre kan problem med sprekkdannelse i de ferdige celleblokkene, som vist i figur 4c, forklares med at celleblokker måtte fryses ned i 5 minutter for å muliggjøre fjerning av filterenheten uten at materialet skulle følge med. Dersom den sirkulære celleblokken ikke hadde oppnådd tilstrekkelig høy temperatur før den deretter ble lagt i ferdigstillingsstasjonen, kunne temperaturforskjell mellom parafin i blokken og stasjonen, føre til sprekkdannelse. Det kan derfor være en fordel å standardisere tid og temperering av celleblokken før innstøping i parafin. Direkte sprekker i prøvematerialet førte til utfordringer ved snittestasjon da snittet delte seg. Materialet er ofte av svært sparsom mengde og sprekkdannelse gir utfordringer under snitting som igjen utgjør en fare for å miste viktig informasjon.

Mikroskopisk vurdering av celleblokknittene

Ved mikroskopisk undersøkelse av ferdige snitt ble vurdering basert på blant annet kvaliteten på snittene, hvilket inkluderer en vurdering av blodige prøver, prøver med mye betennelse, og hvorvidt prøvene inneholdt de representative celletyper. Videre utføres en vurdering av om celleblokkene opprettholdt en synlig og velbevart cellemorfologi, samt om metoden muliggjør tydelig differensiering av sylinderepitel og plateepitel, og ulike celleforandringer.

Blodige prøver

En styrke med celleblokkmetoden er ved vurdering og tolkning av blodige prøver som vist i figur 7. Blodige prøver utgjør et særlig problem ved mikroskopisk diagnostisering av ThinPrep Pap test preparat, da blodcellene kan bidra til at preparatet inneholder lite epitelceller. Dette skyldes at blodet konkurrerer med epitelcellene i ThinPrep filteret, hvilket kan medføre for lite epitelceller på preparatet. Blodet kan altså føre til at få atypiske cellegrupper kommer med på utstryket. Mye blod kan dermed være med på å forklare hvorfor de gjeldende prøvene har vært vanskelige å tolke med ThinPrep Pap test metoden, og at en AGUS diagnose har blitt satt. Blodige prøver skal riktignok plukkes ut til vask ved mottak og ved screening, ut fra gjeldende prosedyre ved HUS. Ved bruk av celleblokkmetoden

konkurrerer ikke blodet med plassen til epitelcellene på samme måten, hvilket kan ha bidratt til at flere epitelceller kom med på preparatet, og gjorde epitelcellene lettere å undersøke.

Betennelse

Enkelte av snittene kunne observeres å inneholde flere betennesceller som vist i figur 7. En prøve som kvalitetsmessig ble vurdert å inneholde mye betennelse, ble vurdert til å inneha normalt plateepitel og sparsom mengde sylinderepitel. En annen prøve som inneholdt både mye blod og betennelse ble vurdert til å inneholde reaktivt plateepitel. Det reaktive plateepitelet observert, kan skyldes betennelse i livmorhalsen. Ved tilstedeværelse av betennelse i livmorhals kan det ofte resultere i at cellene blir reaktive, grunnet påført irritasjon på epitelcellene, og epitelcellene vil dermed kunne feiltolkes som AGUS.

Representativt prøvemateriale

Det kan under prøvetaking være problematisk å få et representativt utvalg av sylinderepitel med i prøvematerialet. Som sett på snitt fra to ulike celleblokker og pasientprøver, ble det ikke observert tilstedeværelse av sylinderepitel. Årsak til manglende sylinderepitelceller i prøvematerialet kan bunne i prøvetaking, eller at celletypen var av så sparsom mengde at ved produksjon av ThinPrep Pap test preparat ble alle representative sylinderepitelceller overført fra prøvebeholderen til preparatet. Dette kan ha ført til at celletypen var av så sparsom mengde at den ikke ble presentert på celleblokken. I de tilfeller hvor sylinderepitel er fraværende i en celleblokk, vil det ikke være mulig å utføre en vurdering i forhold til diagnosen AGUS.

Utfordringer ved differensiering av sylinderepitel kontra plateepitel

Det kan være vanskelig å differensiere (skille) mellom plateepitel og sylinderepitel ved bruk av ThinPrep Pap test, Sylinderepitel er i utgangspunktet vanskelig å bedømme da det i enkelte tilfeller kan forveksles med umodent plateepitel. Under prøvetaking kan de eksfolierte cellene inkludere umodne celler tilhørende basallaget av plateepitel. Cellene fra parababasal/basalt lag i plateepitel har en oval og umoden stor kjerne (10 µm) og liten mengde med cytoplasma. Dette kan lett mistolkes som atypisk sylinderepitel. Figur 9 er et godt eksempel på atypiske epitelceller som er vanskelig å identifisere da cellene har lav modning og ved cytologi kan tolkes som enten umodent plateepitel, sylinderepitel eller reaktive prosesser i begge epiteltypene.

Plateepitel med nedvekst i sylinderepitel kan også være vanskelig å skille fra sylinderepitel. Blant annet ble prøven diagnostisert med AIS på ThinPrep Pap test, vurdert å inneholde

atypisk plateepitel ved vurdering av snitt fra celleblokk. Det atypiske plateepitelet i denne prøven ble tolket å vise nedvekst i kjertler. Ved nedvekst av plateepitel i kjertler vil plateepitelet ta form av kjertelepitelet, altså sylinderepitel. Nedvekst i kjertler er derfor svært vanskelig å skille fra celleforandringer i sylinderepitel, grunnet den tilsvarende morfologien. Dette kan forklare hvorfor resultatet har blitt mistolket som en AIS. Bruk av celleblokkmetode muliggjorde altså en bedre differensiering av morfologisk svært like plate- og sylinderepitelceller, enn bruk av ThinPrep Pap test.

Vurderinger av celleforandringer i epitelcellene

Ved mikroskopisk vurdering av morfologien til epitelcellene i celleblokk ble to AGUS prøver (4,3 %) vurdert å inneholde metaplastiske celler. Metaplastiske celler er celler som utvikler seg til en annen celletype, særlig hvis utsatt for irritasjon eller skade. De metaplastiske cellene utgjør ingen skade, og inneholdt ikke økt mengde av proteinene p16 og Ki-67, og dermed ikke økt celleomsetning. Videre ble to AGUS prøver vurdert til å inneholde grad av atypi i sylinderepitelet. Det kunne ikke avgjøres om atypiene besto av reaktive eller neoplastiske (økt vekst/celleomsetning) celleforandringer. Så mange som 14 prøver (30,43 %) med opprinnelig AGUS diagnose, ble vurdert å inneholde reaktive sylinderepitelceller etter mikroskopisk vurdering av celleblokksnitt. Blant annet ble sylinderepitelcellene i kasus 33, figur 13, vurdert å være reaktive. Reaktivt epitel utgjøres av celler med benigne eller reversible celleforandringer, og skyldes gjerne irritasjon eller skade på cellene.

Ved mikroskopering av ThinPrep Pap test preparat kan det være vanskelig å skille reaktive eller metaplastiske celleforandringer fra neoplastiske celleforandringer i sylinderepitel, grunnet lignende morfologi. Ved usikkerhet vedrørende vurdering av sylinderepitelet settes derfor gjerne en AGUS diagnose, og gjeldende kvinner sendes videre til kolposkopi og biopsi. Dette for å forsøke å forsikre at ingen neoplastiske celleforandringer blir oversett. De kvinnene som kun har reaktive forandringer i sylinderepitel, må da gjennomgå et unødvendig inngrep. En studie av Risse et al. (Risse, Holierhoek, Meijer-Marres, Ouwerkerk-Noordam & Boon, 2011) viste at bruken av celleblokkmetode kan føre til at en unngår unødvendige kliniske vurderinger av pasienten, som kolposkopi og biopsi. Dette fordi bruken av celleblokkmetode bidro til å oppdage og utelukke benigne etterligninger (mimics) av AGUS, samt øke den diagnostiske nøyaktigheten ved faktiske høygradige kjertellesjoner. Studien viser til at både ved deres laboratorium, og i litteraturen som sådan, er AGUS en sjelden diagnose. Diagnosen er videre assosiert med signifikant sykdom i rundt 20-35 % av tilfellene i ulike studier. Det vil si at rundt 65-80 % av de cytologiske AGC diagnosene i realiteten

utgjøres av benigne reaktive prosesser, og for disse pasientene var den kliniske oppfølgingen med kolposkopi og biopsi derfor unødvendig. Til sammenligning viste vår studie normale resultater, inkludert reaktive og metaplastiske celleforandringer, i 63 % av de 46 AGUS prøvene. Prøvene med usikker vurdering (6,5 %), samt prøvene med sparsom mengde epitelceller (6,5 %), eller der epitelceller ikke var til stede (4,3 %), er ikke medregnet (til sammen 17,4 %). Videre viste vår studie atypi i 17,4 %, og LSIL i 2,2 % av de 46 AGUS prøvene. Kun to prøver inneholdt grad av atypi i sylinderepitel, mens resterende atypier ble funnet i plateepitel. Som tidligere nevnt kunne det ikke avgjøres om atypiene var reaktive eller neoplastiske. Ved bruk av celleblokkmetode og immunhistokjemi (Ki-67 og p16) kunne Risse et al. (Risse et al., 2011) eliminere visse «etterligninger» av AGUS. Disse «etterligningene» kunne utgjøres av endocervikale polypper, tubal metaplasi, mikroglandulær hyperplasi, endometrium/endometriose og follikulær cervicitt (livmorhalsbetennelse). Og dermed kunne celleblokkmetoden skille ut de virkelig signifikante AGUS lesjonene fra andre benigne funn.

En studie utført av Xing et al. (Xing et al., 2014) undersøkte hvorvidt Cellient[®] celleblokker av materiale i ThinPrep PreservCyt løsning kunne benyttes som tilleggsverktøy ved diagnostisering av AGUS/AGC. Her ble det funnet at metoden hadde flere funksjoner som gjorde den til en attraktiv tilleggsanalyse for å øke både sensitiviteten og spesifisiteten ved diagnostisering av AGUS. Analyse av celleblokkene hjalp patologene å klassifisere AGUS videre til andre diagnoser. De fant at rundt 30 % av tilfellene med AGUS diagnose, satt av cytoteknikere, ble funnet å være negative for dysplasi eller neoplasmer ved undersøkelse av celleblokkene utført av patolog. Til sammenligning med studien utført i bachelorprosjektet ble det funnet at 32,6 % av de opprinnelige AGUS diagnosene, ble vurdert å inneholde både normalt plateepitel og sylinderepitel ved celleblokkanalyse. Dersom prøver med reaktive (26,1 %) og metaplastiske (4,3 %) celleforandringer inkluderes, stiger andelen normale prøver til 63 %. I studien til Xing et al. inkluderte de vanligste feilklassifiseringene av AGUS reaktive/reparative endringer i endocervikale celler, endometrieceller og tubal metaplasi. Denne studien fant også at analyse av Cellient[®] celleblokkene av cellematerial fra ThinPrep PreservCyt løsning signifikant bidro til å øke den positive prediktive verdien til AGUS for detektering av adenokarsinomer. Sammenlignet med funn ved bruk av ThinPrep Pap test alene, ga bruken av celleblokkmetode høyere rate av adenokarsinomer ved oppfølging av pasientene (36% vs. 8%). En av grunnene til dette var at bruken av celleblokkmetode bidro til at andre diagnoser enn AGUS, ble satt i 56% av tilfellene. Denne studien rapporterer

imidlertid en svakhet når det kommer til utvelgelse av prøver, da celleblokker oftest ble bestilt av patologene når de mistenkte enten negative eller maligne prosesser. Dette kan føre til en økt positiv prediktiv verdi. Tilsvarende indikerer funn fra dette prosjektet at bruk av celleblokkmetode for livmorhalsprøver kan bidra til å utføre en sikrere vurdering av de ulike morfologiske forandringer i sylinderepitel.

Immunhistokjemi

Ved vurdering av de immunhistokjemiske snittene ble det observert god farging av Ki-67. Antistoff mot Ki-67 farger celler som viser økt celleomsetning, altså høyere celleomsetning enn hva man ville forventet i normalt vev. Videre ble det observert kun tre kasus som presenterte svak positivitet for p16 i plateepitel og en var svak positiv i sylinderepitel. Ved forskning av vevet, benyttes gjerne en standardisert gradering for Ki-67 og p16 i cervix. Ifølge Q Shi et al (2019) fargede celleområder tilsvarende 0-5 % kan vurderes som negativ (-), 6-25% kan graderes som positiv (+), 26-75 % kan graderes som (+ +) og 76-100 % kan graderes som (+ + +) (Shi, Xu, Yang, Meng & Qiu, 2019). Patologen som vurderte celleblokknittene i dette prosjektet, evaluerte immunmarkørene på samme måte som ved klinisk praksis i formalin fiksert material. Det vil si at for Ki-67 ble det vurdert om det var kvantitativt flere positive kjerner enn forventet ved normal eller reaktiv tilstand. I normale vevsprøver observeres farging av basallaget, med mindre til ingen grad av farging utover i vevet. Reaktive celler vil ha noe økt celleomsetning, men ikke like mye som ved neoplastiske celleforandringer. Om de Ki-67-fargede cellene befinner seg basalt eller i hele epitelet er vanskelig å si ved bruk av celleblokkmetoden. Når det gjelder klinisk vurdering av p16, krevdes at både kjerner og cytoplasma var positive i et større område, såkalt 'blokk-positivitet'. Det ble påpekt av patologen at i klinisk praksis finnes ingen cut-off grense for hvor mange kjerner som kreves til Ki-67 og hvor stor prosentandel kjerner og cytoplasma som farges ved bruk av p16. Metoden er sånn sett semi-kvantitativ og en subjektiv vurdering. Det ble oppnådd kun 3 positive resultater ved immunmarkøren p16, hvor både kjerner og cytoplasma var positive i et større område, altså blokk positivitet. Resterende prøver viste svak til ingen farge i kjerner og cytoplasma. Ved neoplastiske lesjoner i plate eller sylinderepitel vil formalinfikserte vevsprøver farges sterkt med p16. I celleblokkene ble det ikke funnet noen kraftig positiv respons på p16-fargingen, og fargen ble observert som «grums» i bakgrunnen (figur 10b). Mens protokoll for den immunhistokjemiske metoden opprinnelig er validert for formalinfiksert vevsmateriale, så ble celleprøvene benyttet i dette prosjektet oppbevart på et metanolbasert materiale. Metanolbasert materiale er noe

immunmarkørene ikke er validert for. Andre studier har også benyttet ikke-gynekologisk vev basert på metanolfikserte preparater til immunhistokjemiske analyser (Van Hemel & Suurmeijer, 2013). Her ble det observert falske negative resultater for noen immunmarkører til tross for at det formalinfikserte materialet var positivt for immunmarkøren.

Immunmarkøren Ki-67 ble funnet å ikke være påvirket av fikseringsmetoden. De negative resultatene kan skyldes at immunmarkørene opprinnelig er designet for å gi positive resultater ved bruk av formalinfiksert materiale. Mulige løsninger for dette er å benytte antistoffer som ikke er påvirket av fikseringsmetoden, det kan utvikles antistoff som er tilpasset metanolfiksert materiale, eller benytte metoder som ikke er antigen/antistoffbasert for å sikre diagnosen, for eksempel PCR-baserte metoder.

Videre er det mulig at de metanolfikserte prøvene må forbehandles på en annen måte enn de formalinfikserte for å gi tilfredsstillende resultater. Dette kan inkludere å variere temperaturen som benyttes under fargingen, samt tiden cellene utsettes for de ulike reagensene. En annen mulighet er å endre konsentrasjon av antistoffene før analyse. Spesielt for immunmarkøren p16 og videre bruk, må det foretas en validering der en, blant annet, prøver ut forskjellige optimaliseringer for å avgjøre hva som gir best resultat.

5 Konklusjon

Celleblokkmetoden ble funnet å egne seg godt til å vurdere livmorhalseepitel, og væskebasert cellemateriale egnet seg godt til produksjon av celleblokkene. Den tekniske kvaliteten ble funnet å være overveiende god, nesten som små mikrobiopsier. Metoden bidrar til å lettere gjenkjenne og skille plateepitel og sylinderepitel fra hverandre, enn det bruken av ThinPrep Pap test gjør. For å bedre den makroskopiske kvaliteten til celleblokkene indikerer resultatene at en med fordel kunne standardisere tiden for temperering av celleblokk, for å unngå sprekkdannelse i celleblokkene. Slik vil celleblokkene lettere kunne snittes, og en minimerer sjansen for tap av cellemateriale.

Resultatene viser sammenlagt at 32,6 % av de 46 AGUS prøvene ble funnet å være normale ved bruk av celleblokkmetoden, for både sylinderepitel og plateepitel. Normalt sylinderepitel ble funnet i 52,2 % av prøvene, og normalt plateepitel ble funnet i 69,6 % av prøvene. 30,4 % ble funnet å inneholde reaktive sylinderepitelceller, og 4,3 % ble funnet å inneholde metaplastiske celler. 17,4 % av AGUS prøvene ble funnet å inneholde atypi. Kun to av disse prøvene inneholdt atypisk sylinderepitel, mens resterende prøver inneholdt atypisk plateepitel.

Videre ble én prøve (2,2 %) vurdert til LSIL. 6,5 % av prøvene inneholdt sparsomt mengde epitelceller, og i 4,3 % var sylinderepitel ikke til stede. 6,5 % av prøvene ble vurdert som usikker vurdering av plateepitel.

Til tross for god kvalitet på celleblokkene, og lovende resultater for Ki-67, ble det ikke oppnådd tilfredsstillende farging av p16 med immunhistokjemi. Dette kan skyldes at celleblokksnittene består av metanolfikserte celler, mens immunmarkørene for immunhistokjemi er validert for formalinfiksert materiale. Før videre bruk må protokoll for immunhistokjemi av gynekologiske celleprøver utvikles og optimaliseres til å omfatte metanolfiksert materiale.

6 Referanser

- Andersson, S., Rylander, E., Larsson, B., Strand, A., Silfversvärd, C. & Wilander, E. (2001). The role of human papillomavirus in cervical adenocarcinoma carcinogenesis. *Eur J Cancer*, 37(2), 246-250. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(00\)00376-2](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(00)00376-2)
- Arshi, J. & Farci, F. (2020). Atypical Glandular Cells (AGS). *StatPearls Publishing*. Hentet fra <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564318/>
- Berland, J. (2016). Cervix Sylinderepitelesjoner. I: Stavanger Universitet Sykehus. Hentet fra <https://docplayer.me/47682776-Cervix-sylinderepitellesjoner-jannicke-berland-stavanger-universitetssykehus-uteruskurs-oslo.html?fbclid=IwAR0YWmPbEXljoNRSJqkLFtuA8vkHtzCi1hfsLoy7XOwG8aW SJHODa6yIIEI>
- Burd, E. M. (2003). Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical microbiology reviews*, 16(1), 1-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.1.1-17.2003>
- Castanon, A., Landy, R. & Sasieni, P. D. (2016). Is cervical screening preventing adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the cervix? *Int J Cancer*, 139(5), 1040-1045. <https://doi.org/10.1002/ijc.30152>
- Eide, M. L. (2015). Cervixcytologi for "dummies". Hentet 05.05.2021 fra <https://www.bioingenioren.no/fag/fag-i-praksis/2015/cervixcytologi-for-dummies/>
- Folkehelseinstituttet. (2019, 14.02.2019). Humant papillomavirus (HPV), genitale infeksjoner - veileder for helsepersonell. Hentet fra <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/humant-papillomavirus-hpv-genitale-/>
- Helsedirektoratet. (2019, 21.11.2019). Screeningprogram for kreft. Hentet 22.03.2021 fra <https://www.helsedirektoratet.no/tema/kreft/screeningprogram-for-kreft>
- Helsedirektoratet. (2020). *Nasjonalt handlingsprogram med retningslinjer for gynekologisk kreft* (IS-2854). Oslo: Helsedirektoratet. Hentet fra https://www.helsedirektoratet.no/retningslinjer/gynekologisk-kreft-handlingsprogram/Gynekologisk%20kreft%20%E2%80%93%20Nasjonalt%20handlingsprogram%20med%20retningslinjer%20for%20diagnostikk,%20behandling%20og%20oppf%C3%B8lging.pdf/_attachment/inline/2a961270-1ffb-4e75-bda9-2c91d928b0b3:260d6374135a50d0d3f15b7a9bdd4c6bf5d562f5/Gynekologisk%20kreft%20-

[%20Nasjonalt%20handlingsprogram%20med%20retningslinjer%20for%20diagnostikk,%20behandling%20og%20oppf%C3%B8lging.pdf](#)

Hologic. (2015). *Cellient automated cell block system* (2. utg.). Massachusetts, USA: Hologic.

Hologic. (2019). *Hologic ThinPrep Pap test PreservCyt Solution*. Marlborough, USA:

Hologic.

Jakobsen, E. (2015). Norge kom sent, men godt igang: Livmorhalsprogrammet 20 år. Hentet 22.03.21 fra <https://www.kreftregisteret.no/Generelt/Nyheter/Norge-kom-sent-men-godt-i-gang/>

Kreftlex. (2021). Livmorhalskreft. Hentet 12.05.2021 fra <https://www.kreftlex.no/Livmorhals>

Kreftregisteret. (2005, 13.11.2020). Kvalitetsmaual for Livmorhalsprogrammet. Hentet 30.04.2021 fra

<https://www.kreftregisteret.no/screening/livmorhalsprogrammet/Helsepersonell/Faglig-Radgivningsgruppe/kvalitetsmanual2/>

Kreftregisteret. (2017). Cytologi. Hentet 09.03.21 fra

<https://www.kreftregisteret.no/screening/livmorhalsprogrammet/Helsepersonell/Faglig-Radgivningsgruppe/kvalitetsmanual2/8.-klassifikasjon-cytologi-histologi-og-hpv-tester/cytologi/>

Kreftregisteret. (2018). Krav til HPV-tester som kan brukes til primærscreening. Hentet 15.04.2021 fra

<https://www.kreftregisteret.no/screening/livmorhalsprogrammet/Helsepersonell/screeningstrategi-og-nasjonale-retningslinjer/krav-til-hpv-tester/krav-til-hpv-tester-som-kan-brukes-i-primarscreening/>

Kreftregisteret. (2019, 21.05.2019). HPV i primærscreening. Hentet fra

<https://www.kreftregisteret.no/screening/livmorhalsprogrammet/Helsepersonell/screeningstrategi-og-nasjonale-retningslinjer/HPV-i-primarscreening/>

Li, L. T., Jiang, G., Chen, Q., & Zheng, J.N. (2015). Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review). *Molecular Medicine Reports*, (11), 1566-1572.

<https://doi.org/https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2914>

Mathias, N., Sveinung, L. & Daniel, Ø. (2011, Mai 11, 2021). Histologi og Patologi på nett: Lymfatisk vev. Snitt 5. Lymfeknute. Hentet fra

<http://meddev.uio.no/elaring/fag/anatomi/dlophp5/mikro/index.php?articleID=1076>

Münger, K., Baldwin, A., Edwards, K. M., Hayakawa, H., Nguyen, C. L., Owens, M., ...

Huh, K. (2004). Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *Journal*

- of virology*, 78(21), 11451-11460. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.21.11451-11460.2004>
- Nayar, R. & Wilbur, D. C. (2015). *The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology: Definitions, Criteria and Explanatory Notes* (3. utg.) Springer Cham.
- NordiQC. (2009a). Ki67. Hentet 26.03.2021 fra <https://www.nordiqc.org/epitope.php?id=1>
- NordiQC. (2009b). P16. Hentet 12.03.21 fra <https://www.nordiqc.org/epitope.php?id=59>
- Park, K. J. (2020). Cervical adenocarcinoma: integration of HPV status, pattern of invasion, morphology and molecular markers into classification. *Histopathology*, 76(1), 112-127. <https://doi.org/10.1111/his.13995>
- Ramsli, Ø. P. (2021). BenchMark Ultra (BMU). I Kvammen M. (Red.), (Vol. Dok. ID D41480): Helse Bergen HF. Avd. for Patologi, seksjon Biopsi.
- Risse, E. K. J., Holierhoek, J. P., Meijer-Marres, E. M., Ouwkerk-Noordam, E. & Boon, M. E. (2011). Increased diagnostic accuracy of atypical glandular cells in cervical liquid - based cytology using cell blocks. *Cytopathology*, 22(4), 253-260. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2303.2010.00793.x>
- Sand, O., Sjaastad, Ø. V., Haug, E. & Bjålie, J. G. (2009). *Menneskekroppen: Fysiologi og anatomi* (2. utg.) Gyldendal.
- Shi, Q., Xu, L., Yang, R., Meng, Y. & Qiu, L. (2019). Ki-67 and P16 proteins in cervical cancer and precancerous lesions of young women and the diagnostic value for cervical cancer and precancerous lesions. *Oncology letters*, 18 (2), 1351–1355. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10430>
- Solomon, D., Davey, D., Kurman, R., Moriarty, A., O'Connor, D., Prey, M., ... Young, N. (2002). The 2001 Bethesda System Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology. *JAMA*, 287(16), 2114-2119. <https://doi.org/10.1001/jama.287.16.2114>
- Staby, K. M. (2020). Kvalitetssikring av analyseresultater. I. Helse Bergen: HUS, avd for patologi.
- Stolnicu, S. & Goldfrank, D. (2021). *Anatomy, Histology, Cytology and Colposkopi of the Cervix* Springer, Cham.
- Van Hemel, B. M. & Suurmeijer, A. J. H. (2013). Effective Application of the Methanol-Based PreservCyt (TM) Fixative and the Cellient (TM) Automated Cell Block Processor to Diagnostic Cytopathology, Immunocytochemistry, and Molecular Biology. *Diagnostic Cytopathology*, 41, 734-741. Hentet fra <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23444168/> <https://doi.org/10.1002/dc.22963>

Xing, W., Hou, A. Y., Fischer, A., Owens, C. L. & Jiang, Z. (2014). automated cell block system is useful in the differential diagnosis of atypical glandular cells in Papanicolaou tests. *Cancer Cytopathol*, 122(1), 8-14.

<https://doi.org/10.1002/cncy.21343>

Vedlegg

Vedlegg 1: Flytskjema for cytologiscreening, hentet fra Kreftregisteret.

Vedlegg 2: Protokoll for immunhistokjemi og HE farging

Vedlegg 3: Rådatatabell med vurdering av celleblokker og snitt