

Triaža žensk s pozitivnim izvidom presejalnega testa HPV s testom p16/Ki-67

Veronika Kloboves Prevodnik

Oddelek za citopatologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška 2, Ljubljana

Povzetek

Dvojno imunocitokemično barvanje p16/Ki67 je občutljiv in specifičen test za odkrivanje predrakavih in rakavih sprememb materničnega vratu. Njegova vloga v presejalnih programih za odkrivanje raka materničnega vratu zaenkrat še ni določena. Predvideva se, da bi lahko imel pomembno vlogo v triaži žensk s pozitivnim izvidom presejalnega testa HPV in tudi v triaži žensk s citopatološkimi ocenami atipične ploščate celice neopredeljene (APC-N) in ploščatocelična intrepiteljska lezija nizke stopnje (PIL-NS).

Ključne besede: dvojno imunocitokemično barvanje p16/ki-67, triažni test, presejanje raka materničnega vratu

Uvod

Zaradi uspešnega delovanja organiziranega državnega programa zgodnjega odkrivanja predrakavih sprememb materničnega vratu (DP ZORA) se je incidenca raka materničnega vratu v Sloveniji zmanjšala skoraj za polovico. Leta 2003, ko se je program začel izvajati, je bila groba incidenčna stopnja raka materničnega vratu (RMV) 20,7. Dvanajst let kasneje, leta 2015, pa le še 11,4 (1). To je izjemen uspeh tako v slovenskem kot tudi v svetovnem merilu.

V Sloveniji in drugih deželah z dobro razvito in kakovostno citologijo se za odkrivanje predrakavih sprememb materničnega vratu uporablja citopatološka preiskava brisa materničnega vratu (BMV). BMV je najuspešnejši do sedaj uporabljeni presejalni test sploh, vendar ima svoje slabosti in omejitve. Dobre rezultate daje le v okoljih s kakovostno citologijo in z dobro razvitim sistemom za zagotavljanje in nadzor kakovosti. V Sloveniji je prav kakovostna citologija v državnem programu ZORA pomembno pripomogla k zmanjšanju incidence RMV. Slabost citopatološke preiskave BMV je, da sta občutljivost in specifičnost za odkrivanje predrakavih in rakavih sprememb na materničnem vratu odvisni od stopnje celične atipije, ki jo opredelimo s citopatološko preiskavo. Za citopatološke ocene ploščatocelična intraepiteljska lezija visoke stopnje ali več (PIL-VS+) je verjetnost, da ženska že ima predrakave spremembe visoke stopnje CIN2+ dovolj velika, da opravičuje takojšnjo kolposkopijo. Težava so citopatološke ocene ploščatocelična intraepiteljska lezija nizke stopnje (PIL-NS) in atipične ploščate celice neopredeljene (APC-N), kjer je verjetnost, da ženska že ima CIN2+ premajhna, da bi opravičevala takojšnjo kolposkopijo, obenem

pa je 5-letno tveganje za nastanek cervikalne intrepiteljske lezije in raka (CIN3+) 5,2 % in 2,6 %. To tveganje je previsoko, da bi le na osnovi teh citopatoloških ocen izključili CIN3+, zato je v teh primerih potrebna dodatna diagnostika in dolgotrajno spremljanje žensk. V večini držav, kjer je presejalni test citopatološka preiskava BMV, se po oceni APC-N in PIL-NS priporoča ponoven odvzem BMV za citopatološko preiskavo, testiranje na visoko tvegane HPV, če je rezultat testiranja na HPV pozitiven pa kolposkopija in biopsija s histološko preiskavo (2).

V Sloveniji za triažo žensk s citopatološko oceno APC-N in PIL-NS uporabljamo ponovni odvzem BMV za citopatološko preiskavo in triažni test na visoko tvegane HPV z metodo Hibrid Capture 2 (3). Triažni test na visoko tvegane HPV je zelo občutljiv, vendar nespecifičen, ker s testom ni možno ločiti med prehodno okužbo z visoko tveganim HPV, ki spontano izzveni, in dolgotrajno okužbo, ki je povezana z razvojem predrakavih in rakavih sprememb na materničnem vratu (4). V primeru pozitivnega testa na visoko tvegane HPV je test zato potrebno čez eno leto ponoviti (3). Tak način dela daje dobre rezultate, vendar je obremenjujoč za ženske in zdravstveni sistem, ker so potrebni številni obiski ginekologa in ponovitve testov. Poseben problem predstavljajo tudi tesnoba, negotovost in zaskrbljenost žensk zaradi nejasnih rezultatov testov. Zato v svetu potekajo številne raziskave, katerih glavni cilj je razviti občutljiv in specifičen triažni test, s katerim bi za ženske s citopatološko oceno APC-N in PIL-NS lahko zanesljivo ocenili tveganje za CIN2+ (5). Imunocitokemično barvanje p16/Ki-67 je eden od potencialnih triažnih testov, ki veliko obetajo. Narejene so bile številne študije, ki so pokazale, da je test nekoliko manj občutljiv

kot testiranje na visoko tvegane HPV, vendar veliko bolj specifičen (2). Evropske smernice za presejanje raka materničnega vratu uporabe triažnega testa p16/Ki-67 zaenkrat še ne priporočajo (6).

Dvojno imunocitokemično barvanje p16/Ki-67

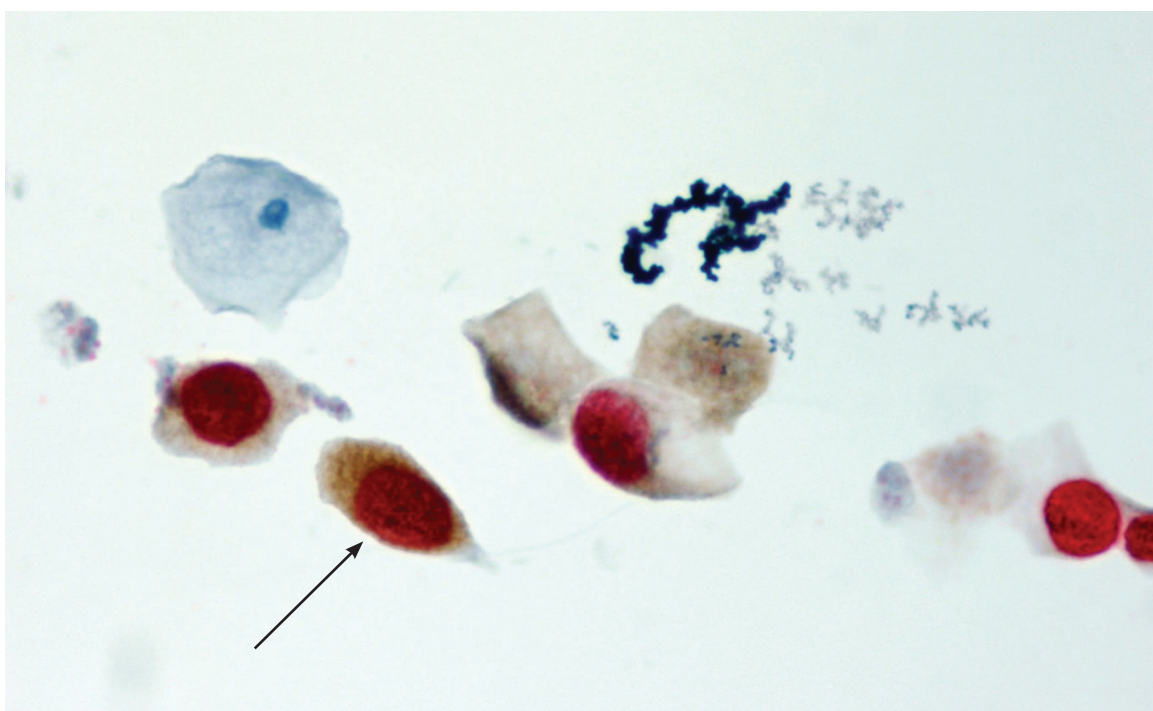
Proteina p16 in Ki-67 sta biološka označevalca, ki se v citologiji in histologiji že dalj časa uporabljata za diagnostiko predrakavih in rakavih sprememb na materničnem vratu (5). V celicah s predrakavimi in rakavimi spremembami se zaradi deregulacije celičnega ciklusa, ki je posledica dolgotrajne infekcije z visoko tveganimi HPV, oba proteina kopičita. Njuno prisotnost v celicah dokažemo z imunocitokemično oziroma imunohistokemično metodo. S posameznim imunocitokemičnim barvanjem za prikaz proteina p16 ali Ki-67 v BMV ne prikažemo le celic s predrakavimi in rakavimi spremembami, ampak tudi nekatere normalne celice ali celice z neneoplastičnimi spremembami. Imunocitokemično barvanje p16 je lahko pozitivno v endocervikalnih celicah in celicah ploščatocelične in tubarne metaplazije, imunocitokemično barvanje Ki-67 pa v normalnih celicah, ki proliferirajo zaradi vnetnih in drugih reaktivnih patoloških sprememb. Specifičnost posameznega določanja proteinov p16 in Ki-67 v vzorcih BMV je zato slaba in neprimerna za klinično uporabo (7, 8).

Da bi premostili premajhno specifičnosti posameznega proteinskega označevalca p16 in Ki-67, so razvili dvojno imunocitokemično barvanje p16/Ki-

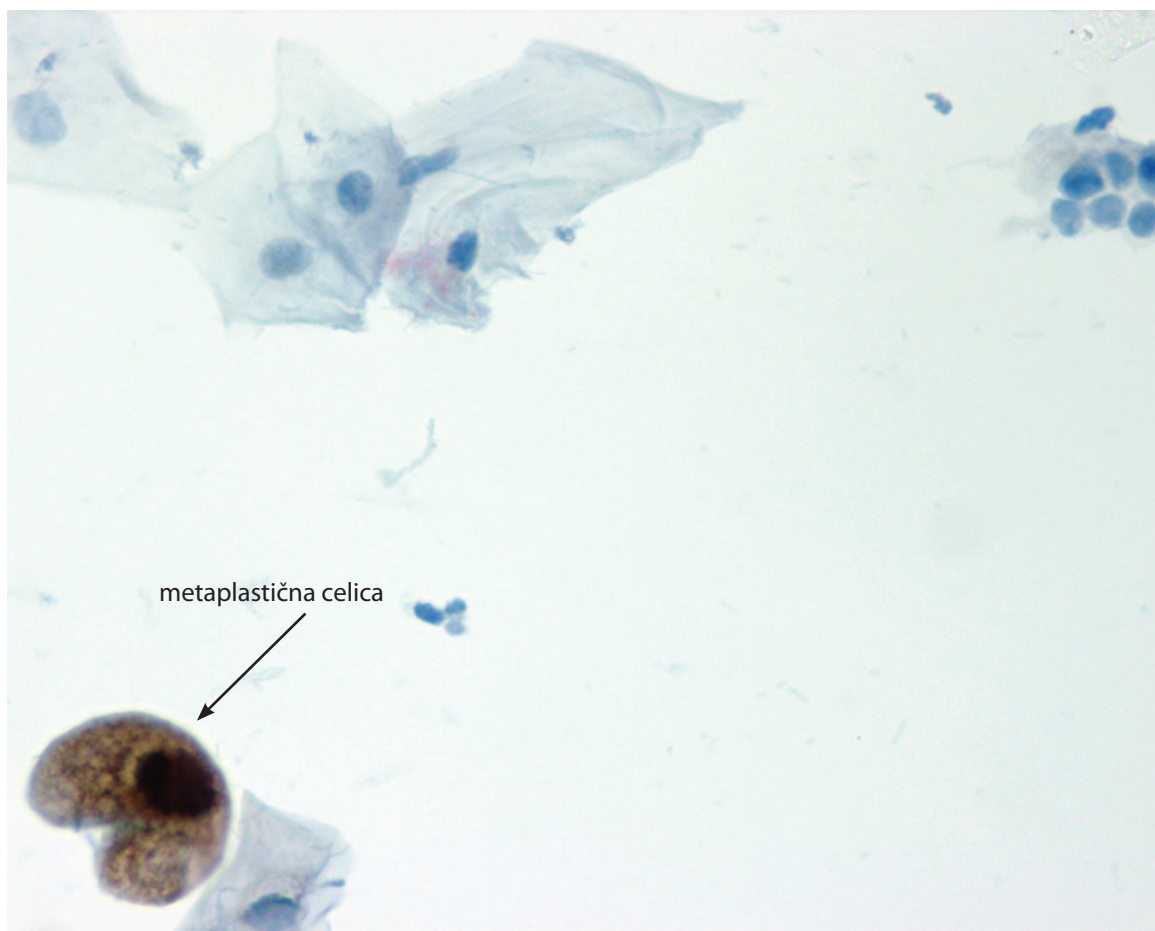
67, ki v BMV praviloma prikaže le celice s predrakavimi in rakavimi spremembami. Princip dvojnega imunocitokemičnega barvanja je, da na eni celici istočasno prikažemo izražanje dveh različnih antigenov (9).

V celicah, ki so transformirane zaradi infekcije z visoko tveganimi HPV, se prekomerno izražata tako p16 kot tudi Ki-67 protein (Slika 1), v normalnih celicah ali celicah z neneoplastičnimi spremembami pa le eden od obeh proteinov (Slika 2). Zato je dvojno imunocitokemično barvanje p16/Ki-67 pozitivno le v celicah, ki so neoplastično transformirane. Imunocitokemično barvanje je pozitivno, če se jedro celice obarva rdeče (Ki67), citoplazma pa rjavo (p16). Za pozitiven test zadostuje le ena pozitivna celica (Slika 1). Morfološke značilnosti celic pri interpretaciji rezultatov dvojnega imunocitokemičnega barvanja p16/Ki-67 niso pomembne, zato je ponovljivost rezultatov dobra. Dvojno imunocitokemično barvanje p16/Ki-67 je klinično dobro občutljiv in specifičen test (9).

Interpretacija rezultatov dvojnega imunocitokemičnega barvanja p16/Ki-67 je bolj zahtevna od interpretacije rezultatov drugih imunocitokemičnih barvanj, ki jih uporabljamo v citopatologiji. Problem je ocena imunocitokemičnih reakcij v celičnih skupinah in celicah, kjer je rezultat reakcije šibko pozitiven, zato je laboratorijske delavce, presegalce in citopatologe, ki bodo sodelovali pri interpretaciji rezultatov dvojnega imunocitokemičnega



Slika 1. Pozitiven rezultat dvojnega imunocitokemičnega barvanja p-16/Ki-67. Imunocitokemično barvanje je pozitivno, če se jedro celice obarva rdeče, citoplazma pa rjavo (celica označena s puščico).



Slika 2. Negativen rezultat dvojnega imunocitokemičnega barvanja p16/Ki-67. Imunocitokemično barvanje je negativno, če se jedro in/ali citopazma celice obarva le rjavo ali le rdeče (celica označena s puščico).

barvanja p16/Ki-67, potrebno ustrezno izobraziti. V laboratorijih, kjer metodo uvajajo na novo, je potrebno vzpostaviti možnost konzultacij z ustanovami, ki imajo s testom izkušnje in preverjeno dobre rezultate (10, 11).

Možnosti uporabe testa p16/Ki-67 v presejalnih programih za odkrivanje raka materničnega vratu

V literaturi najdemo številne raziskave o možni uporabi dvojnega imunocitokemičnega barvanja p16/Ki-67 za odkrivanje predrakavih in rakavih sprememb na materničnem vratu v BMV. Raziskave so bile narejene na kolposkopskih in presejalnih populacijah, kjer so najpogosteje primerjali občutljivost in specifičnost testa p16/ Ki-67 za odkrivanje CIN2+ s citopatološkim pregledom BMV in testom na visoko tvegane HPV. Glavni zaključek teh raziskav je, da je test p16/Ki-67 enako ali nekoliko bolj občutljiv kot citopatološki pregled BMV, specifičnost testa pa je precej boljša (12, 13). V primerjavi z testom na visoko tvegane HPV pa je test nekoliko manj občutljiv in precej bolj specifičen (Tabela 1) (2, 12).

Rezultati do sedaj objavljenih raziskav so pokazali, da bi dvojno imunocitokemično barvanje p16/Ki-67 lahko uporabili predvsem kot triažni test za ženske s citopatološko oceno APC-N ali PIL-NS v BMV (Tabela 1) in kot triažni test za HPV-pozitivne ženske (2, 13). Rezultati multicentrične evropske PALMS raziskave so pokazali, da bi test p16/Ki-67 lahko uporabljali tudi kot presejalni test predvsem za mlajše ženske, kjer testiranje na visoko tvegane HPV ne daje dobrih rezultatov zaradi številnih prehodnih okužb s HPV (Tabela 2) (12). Polman s sodelavci je v nedavno objavljeni raziskavi pokazal, da bi test p16/Ki-67 lahko uporabljali kot test ozdravitve za ženske po zdravljenju CIN2+ (14). Šekoranja s sodelavci pa je pokazala, da bi test p16/Ki-67 lahko uporabljali za triažo žensk z BMV s citopatološko oceno atipične ploščate celice, ni mogoče izključiti ploščatocelične intraepitelijske lezije visoke stopnje (APC-VS) (15). Kljub velikemu številu objavljenih raziskav vloga testa p16/Ki-67 v presejalnih programih za odkrivanje RMV še ni dorečena.

Tabela 1. Občutljivost in specifičnost triažnega testa p16/Ki-67 in testa na visoko tvegane HPV za detekcijo CIN2+ pri ženskah s citološko oceno APC-N in PIL-NS (prirejeno po viru 2).

Citopatološka ocena/ Raziskava	Število primerov	p16/Ki67 Občutljivost/specifičnost (CI)		Test HPV Občutljivost/specifičnost (CI)	
PIL-NS					
Schmidt et al.	415	0,94 (0,89-0,97)	0,68 (0,62-0,73)	0,96 (0,91-0,98)	0,19 (0,15-0,24)
Loghavi et al.	92	0,98 (0,81-1,00)	0,43 (0,32-0,55)	0,92 (0,52-0,99)	0,37 (0,21-0,56)
Wentzensen et al.	264	0,86 (0,78-0,92)	0,58 (0,50-0,65)	0,92 (0,84-0,96)	0,35 (0,29-0,43)
Waldstrom et al.	469	0,88 (0,80-0,93)	0,51 (0,46-0,56)	0,92 (0,84-0,96)	0,36 (0,32-0,41)
APC-N					
Edgerton et al.	63	0,64 (0,39-0,84)	0,53 (0,39-0,66)	/	/
Schmidt et al.	361	0,92 (0,84-0,96)	0,81 (0,76-0,85)	0,91 (0,82-0,96)	0,36 (0,31-0,42)
Loghavi et al.	96	0,91 (0,62-0,98)	0,61 (0,51-0,71)	0,91 (0,62-0,98)	0,44 (0,34-0,55)
Wentzensen et al.	140	0,82 (0,66-0,91)	0,63 (0,53-0,71)	0,97 (0,85-1,00)	0,26 (0,18-0,35)

PIL-NS: ploščatocelična intraepitelijska lezija nizke stopne, APC-N: atipične ploščate celice, najverjetneje neoplastične, ICK: imunocitokemične reakcije, HPV: človeški papilomavirus (angl. *Human papillomavirus*, HPV), CI: interval zaupanja (angl. *Confidence interval*, CI)

Tabela 2. Občutljivost in specifičnost dvojnega imunocitokemičnega barvanja p16/Ki-67, citopatološke preiskave BMV in testa na visoko tvegane HPV za CIN2+ v PALMS raziskavi (prirejeno po viru 2).

Starost (leta)	Število primerov	p16/Ki67 Občutljivost/specifičnost (CI)		Citopatologija Občutljivost/specifičnost (CI)		Test HPV Občutljivost/specifičnost (CI)	
18-65	25.577	86,7 (81,1-90,9)	95,2 (94,9-95,4)	68,5 (61,2-75,0)	95,4 (95,1-95,6)	/	/
18-29	6.372	89,4 (80,2-94,6)	92,0 (91,2-92,6)	71,9 (59,8-81,5)	92,6 (92,0-93,3)	/	/
30-65	19.205	84,7 (76,8-90,3)	96,2 (95,9-96,5)	65,9 (56,5-74,3)	96,3 (96,0-96,5)	93,3 (85,9-96,9)	93,0 (92,6-93,4)

HPV: človeški papilomavirus (angl. *Human papillomavirus*, HPV), CI: interval zaupanja (angl. *Confidence interval*, CI)

Zaključek

Smernic za umestitev testa p16/Ki-67 v presejalne programe za odkrivanje predrakavih in rakavih sprememb na materničnem vratu zaenkrat še ni. Večina raziskovalcev ga vidi kot možen triažni test za ženske s citopatološko oceno APC-N in PIL-NS (Tabela 1) ali kot triažni test za HPV-pozitivne ženske (2, 13). Keisser s sodelavci je nedavno objavila metaanalizo o uporabnosti testa p16/Ki-67 za triažiranje žensk s citopatološko oceno APC-N in PIL-NS. Zaključila je, da rezultati do sedaj objavljenih raziskav ne zadoščajo, da bi test lahko začeli uporabljati v presejalnih programih. Meni, da bodo potrebne nadaljnje

strogo načrtovane prospektivne raziskave, ki bodo pokazale, ali je test res boljši od testa na visoko tvegane HPV. Poleg tega Keisserjeva predvideva, da bo glavni javnozdravstveni doprinos uporabe testa v zmanjšanju števila diagnostičnih postopkov in potencialno v preprečevanju prekomernega zdravljenja. Na zmanjšanje umrljivosti za rakom materničnega vratu uporaba testa najverjetneje ne bo vplivala (2). Izsledki nedavno objavljene ATHENA raziskave pa so potrdili, da je dvojno imunocitokemično barvanje p16/Ki-67 boljši triažni test za HPV-pozitivne ženske kot citopatološki pregled BMV (16). Vloga testa p16/Ki67 v primarnem HPV presejanju med strokovnjaki zaenkrat še ni bila dorečena.

Literatura

1. Državni program ZORA [Internet]. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana. Dostopno na: <https://zora.onko-i.si/> [24. april 2017].
2. Keisser A, Zechmeister-Koss A. A systematic review of p16/Ki67 immunotesting for triage of low grade cervical cytology. *BJOG* 2015; 122:64-70.
3. Smernice za celostno obravnavo žensk s predrakavimi spremembami na materničnem vratu. Strokovna skupina za pripravo smernic: Marjetka Uršič Vrščaj et al. Urednica: Marjetka Uršič Vrščaj. Onkološki inštitut, Ljubljana, 2011.
4. Arbyn M, Martin-Hirsh P, Buntinx F, Van Ranst M, Paraskevaidis E, Dillner J. Triage of women with equivocal or low-grade cervical cytology results: a meta-analysis of the HPV test positivity reate. *J Cell Mol Med* 2009; 13; 648-59.
5. Pogačnik A, Kloboves-Prevodnik V, Nolde N, Novaković S, Prosenč U, Grgič M, Ivanuš U, Primic-Žakelj M. Nove triažne metode pri HPV-pozitivnih ženskah. V: 5. izobraževalni dan programa ZORA, Brdo pri Kranju, 15. oktober 2014. Ivanuš Urška (ur.), Primic-Žakelj Maja (ur.). *Zbornik predavanj*. Ljubljana: Onkološki inštitut, 2014, str. 36-40.
6. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. Second eddition, Supplements. Anttila A, Arbyn M, De Vuyst H, Dillner J, Dillner L, Franceschi S, Patnick J, Ronco G, Segnan N, Suonio E, Törnberg S, von Karsa L. Publication Office of European Union, Luxemburg, 2015.
7. Wentzensen N, Bergeron C, Cas F, Eschenbach D, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Evaluation of nuclear score for p16^{INK4a}-stained cervical squamous cells in liquid based cytology sample. *Cancer Cytopathology* 2005; 105; 461-7.
8. Sahebali S, Depuydt CE, Buolet GAV, Arbyn M, Moeneclaey LM, Vereecken AJ, Van Marck EA, Bogers JJ. Immunocytochemistry in liquid-based cervical cytology: analysis of clinical use following a cross-section study. *Int J Cancer* 2006; 118: 1254-60.
9. Edgerton N, Cohen C, Siddiqui MT. Evaluation of CINtec PLUS® testing as an adjunctive test in ASC-US diagnosed Surepath® preparations. *Diagn Cytopathol* 2011, 41(1); 35-40.
10. Wentzensen N, Fetterman B, Tougawa D, Shiffman M, Castle PE, Wood SN, Stiemerling E, Poirtas N, Lorely T, Kinney W. Interobserver reproducibility and accuracy of p16/Ki67 dual-stain cytology in cervical cancer screening. *Cancer Cytopathology* 2014; 122; 914-20.
11. Allia E, Ronco G, Coccia A, Luparia P, Macrì L, Fiorito C, Maletta F, Deambrogio C, Tunesi S, De Marco L, Gillio-Tos A, Sapino A, Ghiringhello B. Interpretation of p16^{INK4a}/Ki-67 dual immunostaining for the triage of human papillomavirus-positive women by experts and nonexperts in cervical cytology. *Cancer Cytopathol* 2015; 123:212-8.
12. Ikenberg H, Bergeron C, Schmidt D, Griesser H, Alameda F, Claudio Angeloni, Bogers J, Dachez R, Denton K, Hariri J, Keller T, von Knebel Doeberitz M, Neumann HH, Puig-Tintore LM, Sideri M, Rehm S, Ridder R, for the PALMS Study Group. Screening for Cervical Cancer Precursors With p16/Ki-67 Dual-Stained Cytology: Results of the PALMS Study. *J Natl Cancer Inst* 2013; 105:1550-7.
13. Wentzensen N, Fetterman B, Castle P E, Schiffman M, Wood SN, Stiemerling, E Tokugawa D, Bodelon C, Poitras, N Lorey T, Kinney W. p16/Ki-67 Dual Stain Cytology for Detection of Cervical Precancer in HPV-Positive Women. *JNCI J Natl Cancer Inst*, 2015; 107: 1-8.
14. Polman NJ, Uijterwaal MH, Witte BI, Berkhof J, van Kemenade FJ, Spruijt JW, van Baal WM, Graziosi PG, van Dijken DK, Verheijen RH, Helmerhorst TJ, Steenbergen RD, Heideman DA, Ridder R, Snijders PJ, Meijer CJ. Good performance of p16/ki-67 dual-stained cytology for surveillance of women treated for high-grade CIN. *Int J Cancer* 2017; 140: 423-30. doi: 10.1002/ijc.30449. Epub 2016 Oct 11.
15. Šekoranja D, Repše Fokter A. Triageing Atypical Squamous Cells-Cannot Exclude High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion With p16/Ki67 Dual Stain. *J Low Genit Tract Dis*. 2017; 21:108-11.
16. Wright TC Jr, Behrens CM, Ranger-Moore J, Rehm S, Sharma A, Stoler MH, Ridder R. Triageing HPV-positive women with p16/Ki-67 dual-stained cytology: Results from a sub-study nested into the ATHENA trail. *Gynecol Oncol* 2017; 144:51-6.