



FAKULTET FOR NATURVITENSKAP

Institutt for bioingeniørfag

Norges teknisk- naturvitenskapelige universitet
Norwegian University of Science and Technology (NTNU)

**Optimalisering og validering av
fargeprotokoller for anti-p16^{INK4a} klon BC42
fra Biocare Medical**

**Optimization and validation of staining
protocols for anti-p16^{INK4a} clone BC42 from
Biocare Medical**

Av / by

Vilde Røysgård Røisland
Lina Kristine Torp Solberg

Trondheim, 2021

FORORD

Denne bacheloroppgaven ble gitt av og utført ved Enhet for Immunhistokjemi, Avdeling for Patologi ved St. Olavs hospital i Trondheim via Institutt for bioingeniørfag ved NTNU.

Først og fremst vil vi rette en stor takk til spesialbioingeniør Lise Eid Wålberg for all hjelp og faglig veiledning gjennom hele prosjektet. Takk for all tilrettelegging, sene arbeidsdager og ekstra møter midt oppi alle andre forpliktelser du har hatt denne perioden. Vi vil også takke vår prosessveileder Asle Grislingås for god hjelp og oppmuntrende tilbakemeldinger som tok oss gjennom skriveprosessen. Tusen takk også til familie og kjære som har hjulpet oss med støtte, motivasjon og korrekturlesing.

Dette har vært en utfordrende tid for mange, og med de restriksjoner og forhåndsregler som må tas har det vært vanskelig for laboratoriene å ta inn bachelorstudenter i år. Vi er derfor veldig takknemlige for at vi ble tatt så godt imot på Avdeling for patologi ved St. Olavs hospital. Prosjektet og teorien bak har vært spennende å fordype seg i, og vi håper vi har gjort en god jobb for dere på patologilaboratoriet.

Vilde R. Røisland

Vilde R. Røisland

Lina K.T. Solberg

Lina. K. T. Solberg

SAMMENDRAG

Dette prosjektet ble gjennomført som den avsluttende bacheloroppgaven for bioingeniørutdanningen tilhørende Institutt for bioingeniørfag ved det Naturvitenskapelige Fakultet på Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU). Oppgaven ble gitt av Enhet for immunhistokjemi ved Avdeling for patologi, St. Olavs hospital. Hensikten med prosjektet var å undersøke mulighetene for bytte av primærantistoff i immunhistokjemisk farging for proteinet p16^{INK4a}. Det aktuelle nye antistoffet er anti-p16^{INK4a} klon BC42 fra Biocare Medical. Bakgrunnen for dette er et ønske om kostnadsbesparelse. Det aktuelle anti-p16^{INK4a} inngår også i en dobbeltfargeprotokoll sammen med anti-Ki67. Dobbeltfargeprotokollen er derfor også vurdert i denne oppgaven. Bruksområdet til disse fargeprotokollene er hovedsakelig i diagnostikk og utredning av kreft oppstått som følge av infeksjon med Humant papillomavirus (HPV). I tillegg benyttes de i utredning av maligne melanomer. I mai 2022 vil EUs nye IVD-regulativ tre i kraft. Alle fargeprotokoller som benyttes, eller skal innføres i diagnostikken ved medisinske laboratorier, må derfor vurderes og godkjennes i henhold til dette regulativet.

For å undersøke problemstillingen ble det utført en optimalisering og verifisering av anti-p16^{INK4a} klon BC42 i enkeltfargeprotokoll for p16 samt dobbeltfargeprotokollen for Ki67/p16 i henhold til laboratoriets prosedyrer. Det ble testet ut ulike forbehandlingsmetoder. Til deteksjon av primærantistoffet ble deteksjonskit OptiView DAB og UltraView AP Red fra Ventana/Roche benyttet. Det ble benyttet litteratursøk for å undersøke forholdene knyttet til IVDR.

Den best egnede protokollen for p16-enkeltfargen ble 48 min HIER forbehandling med CC1 buffer fra Ventana, 12 min inkubering med primærantistoffet og bruk av pre-peroxidase inhibitor. Denne protokollen gav like god, tidvis bedre, fargekvalitet enn den nåværende p16-enkeltfargeprotokollen. Protokollen er utformet i henhold til kravene satt i IVDR. For Ki67/p16-dobbeltfargeprotokollen ble protokollen med 48 min HIER forbehandling med CC1 buffer, 32 min og 12 min inkubering med henholdsvis anti-Ki67 og anti-p16^{INK4a}, samt amplifisering, den best egnede protokollen. Dobbeltfargeprotokollen gav også minst like god fargekvalitet som den nåværende Ki67/p16-dobbeltfargeprotokollen. Denne protokollen kan ikke umiddelbart godkjennes i henhold til IVDR og vil trolig måtte gå under «in house»-unntaket. Videre ble det funnet at bytte av primærantistoff vil medføre en betydelig kostnadsbesparelse for de to fargeprotokollene.

ABSTRACT

This project was conducted as the final bachelor's thesis for the biomedical laboratory engineering program at the Department of Biomedical Laboratory Science by the Faculty of Natural Science, at the Norwegian University of Science and Technology (NTNU). The project was initiated by the Unit of immunohistochemistry at the Department of Pathology at St. Olavs hospital. The purpose of this project was to investigate the possibilities of replacing the primary antibody used in staining of the protein p16^{INK4a}. The new antibody tested is anti-p16^{INK4a} clone BC42 from Biocare Medical. The reason for this is savings in cost for the staining method. The p16^{INK4a}-antibody will also be used in a double staining method together with anti-Ki67. This protocol is also evaluated in this project. These staining methods are used in diagnosis of cancers formed as a result of human papilloma virus (HPV) infection. In addition, they are used in evaluation malignant melanomas. In May of 2022 the new EU regulative regarding IVD-equipment will come into effect. All staining methods in diagnostic use at the laboratories will have to be evaluated and approved according to these regulations. The staining methods in this project were therefore evaluated to provide the laboratory with information on which demands are placed upon them regarding documentation in the introduction of these methods.

To investigate the issue an optimalization and verification of the p16^{INK4a} clone BC42 antibody in a single and a double staining method was conducted. The optimalization tested different pre-treatment options. For the detection of the primary antibodies OptiView DAB and UltraView AP Red detection kits from Ventana/Roche were used. A study of literature was conducted to find information regarding the IVDR.

The results of the p16^{INK4a} single staining method using 48 minutes of HIER with Ventana's CC1 buffer solution, 12 minutes incubation time with the primary antibody and use of peroxidase inhibitor were equivalent, and in some cases better than, the existing staining method for p16^{INK4a}. The staining method was found to be in accordance with the IVDR. The method for double staining Ki67/p16 used 48 minutes of HIER with CC1 buffer, 32 minutes and 12 minutes incubation time with Ki67- and p16-antibody respectively, as well as an amplification step. This method also resulted in a high-quality staining comparable to the existing method. This staining method was not found to be in accordance with the IVDR, and will have to be evaluated in regards to the "in house"-exception. It was concluded that the change in primary antibody for these staining methods was favourable in regards to cost.

BEGREPSAVKLARINGER OG FORKORTELSER

Tabell i: Tabellen viser en oversikt over de ulike forkortelser og spesielle begreper som er benyttet i oppgaveteksten.

Begrep	Forklaring
HE	Hematoxylin Eosin farging
IVDR	EU regulativ som omfatter produksjon og omsetting av in vitro diagnostisk medisinsk utstyr i EU og på EØS-markedet.
IVD-utstyr	Forkortelse for in vitro diagnostisk utstyr.
Kon	Vevsbit hentet ut fra cervix ved en konisering. En konisering er en behandling av forstadier til cervixkreft som går ut på å kirurgisk fjerne de affekteerte områdene.
Protokoll	En protokoll, eller fargeprotokoll, er sammensetningen av fremgangsmåte og bestemte betingelser som sammen utgjør fargeprosessen. Eller med andre ord; oppskriften på fargingen.
RTU antistoff	“Ready to use”-antistoff. Et antistoff som leveres ferdig fortynnet fra produsent, i motsetning til et antistoff-konsentrat.
Titreere på antistoff	Pipettere på antistoff manuelt underveis i den ellers automatiserte fargeprotokollen på BenchMark Ultra. Beskrevet som «titrering» i laboratoriets prosedyrer.

INNHALDSFORTEGNELSE

FORORD	I
SAMMENDRAG	II
ABSTRACT	III
BEGREPSAVKLARINGER OG FORKORTELSER	IV
INNHALDSFORTEGNELSE	V
1. INNLEDNING	1
1.1 HENSIKTEN MED PROSJEKTET	1
1.2 KREFT OG KREFTUTVIKLING	1
1.2.1. Forekomst av kreft i Norge	1
1.2.2. Hva er kreft?.....	2
1.2.3. Egenskaper hos kreftceller	2
1.2.4. Tumorsuppressorer og protoonkogener	3
1.2.5. Cellesyklus	3
1.2.6. Regulering av cellesyklus.....	4
1.2.7. Kreftdiagnostikk og persontilpasset medisin	4
1.3 P16 ^{INK4A} -PROTEINET.....	5
1.4 KI67-PROTEINET	6
1.5 HUMANT PAPILLOMAVIRUS OG KREFTUTVIKLING	7
1.6 CERVIX.....	9
1.7 CERVIKAL DYSPLASI OG KREFT I CERVIX	10
1.8 MUNNHULEN, SVELGET OG TONSILLENE.....	10
1.9 HODE- OG HALSKREFT: PLATEEPITELKARSINOM I MUNNHULE OG SVELG	11
1.10 HUDEN	11
1.11 MALIGNE MELANOMER	12
1.12 IMMUNHISTOKJEMI VED AVDELING FOR PATOLOGI, ST. OLAVS HOSPITAL.....	13
1.13 IMPLEMENTERING AV NYE PROTOKOLLER I LABORATORIET	14
1.14 IVDR	14
1.15 PROBLEMSTILLING	15
2. MATERIALE OG METODE	16
2.1 PRØVEMATERIALE.....	16
2.2 KONTROLLMATERIALE.....	17
2.3 REAGENSER	19
2.4 UTSTYR	20
2.5 METODE	20
2.6 DOBBELTFARGEPROTOKOLLER	21
2.7 PRINSIPP	22
2.7.1. Fiksering.....	22
2.7.2. Forbehandling av vevet	22
2.7.3. Primærantistoff.....	23
2.7.4. Deteksjon av primærantistoff	23
2.7.5. Kontrastfarging med hematoxylin	25
2.7.6. Dehydrering og infiltrering med Xylen	25
2.7.7. Montering.....	26
2.8 PROTOKOLLER BENYTTET I UTPRØVINGEN	26

3. RESULTATER OG DISKUSJON.....	28
3.1 P16 ENKELTFARGEPROTOKOLL	28
3.1.1. Utprøving av enkeltfargeprotokoller	28
3.1.2. Endelig p16 protokoll.....	29
3.1.3. Kontroller for endelig p16 protokoll	29
3.1.4. Sammenlikning av fargekvalitet med nåværende enkeltfargeprotokoll.....	30
3.2 Ki67/P16-DOBBELTFARGEPROTOKOLL.....	32
3.2.1. Utprøving av dobbeltfargeprotokoller	32
3.2.2. Endelig Ki67/p16 dobbeltfargeprotokoll.....	33
3.2.3. Kontroller for dobbeltfargeprotokoll	33
3.2.4. Sammenlikning av fargekvalitet med nåværende dobbeltfargeprotokoll.....	34
3.2.5. Resultater for Ki67/p16 ^{INK4a} dobbeltfargeprotokoll	35
3.3 PATOLOGENES VURDERING AV FARGEKVALITET	35
3.4 KOSTNADSVURDERING AV P16 ^{INK4A} KLON BC42.....	36
3.5 VURDERING I HENHOLD TIL IVDR	37
3.5.1. Enkeltfargeprotokoll for p16 med antistoff p16 ^{INK4a} BC42 fra Biocare Medical	37
3.5.2. Dobbeltfargeprotokoll for Ki67/p16 med antistoff p16 ^{INK4a} fra Biocare Medical og Ki67 MIB1 fra Dako/Agilent.....	37
3.6 BEGRENSNINGER OG FEILKILDER I METODEN.....	39
4. KONKLUSJON.....	42
5. REFERANSER.....	43
6. VEDLEGG.....	48

1. INNLEDNING

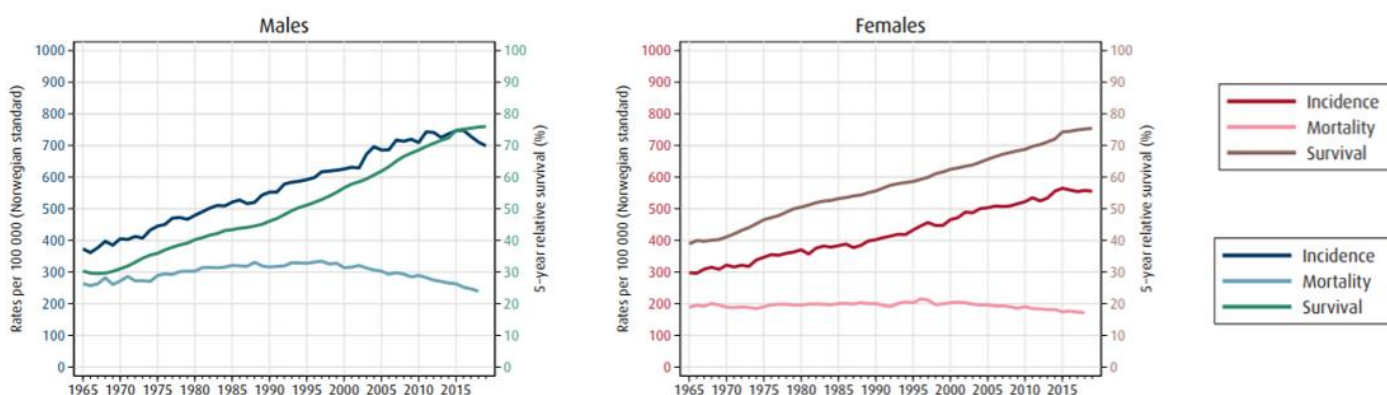
1.1 Hensikten med prosjektet

Denne bacheloroppgaven ble gitt av Enhet for immunhistokjemi, Avdeling for patologi, ved St. Olavs hospital i Trondheim. Hensikten med prosjektet var å utføre en optimalisering og verifisering for en enkeltfargeprotokoll med primærantistoffet p16^{INK4a}, klon BC42, fra Biocare Medical, samt en dobbeltfargeprotokoll med anti-Ki67. Funnene fra prosjektet skal legge grunnlag for en vurdering om bytte av antistoffleverandør med bakgrunn i kostnadsreduksjon. I dag benyttes primærantistoffet CINtec p16^{INK4a} Histology, klon E6H4, produsert av Ventana/Roche. For å gi et tilstrekkelig bilde av konsekvensene ved å bytte antistoffleverandør ble det i tillegg til kostnadsvurderingen og verifiseringen utført en vurdering av det ønskede antistoffet opp mot kravene satt i EUs nye IVD-regulativ.

1.2 Kreft og kreftutvikling

1.2.1. Forekomst av kreft i Norge

I løpet av livet vil en av tre nordmenn få kreft. Årlig får rundt 35 000 personer en kreftdiagnose og over 10 000 dør som følge av kreft. Som vist i figur 1 er disse tallene økende. Dette fordi en stadig større andel av befolkningen blir eldre. Kreft rammer først og fremst eldre, der tre firedeler av krefttilfellene finnes hos de over 60 år. Den dominerende kreftformen hos menn er prostatakreft og hos kvinner brystkreft. Kjønnsmessig er det en skjevfordeling, der menn rammes oftere av kreft enn kvinner. På grunn av ny utvikling og forskning blir behandlingsmetodene bedre og stadig flere overlever kreftsykdom. Denne utviklingen vises tydelig i figur 1. I Norge overvåkes forekomsten av de ulike kreftformer av Kreftregisteret (1) (2) (3).



Figur 1: Figuren viser sammenlagt incidens, dødelighet og 5 års overlevelse i Norge for alle kreftformer samlet i tidsperioden 1965-2019. Figuren er delt mellom kvinner og menn. Hentet fra kreftregisterets rapport «Cancer in Norway 2019» (3).

1.2.2. Hva er kreft?

Kreft er en gruppe sykdommer som utarter seg ved at tumorer oppstår som følge av ukontrollert celledeling (1). Ukontrollert celledeling er neoplastiske celleforandringer, der celler prolifererer uavhengig av normale vekstsignaler og reguleringsmekanismer. Neoplasiene kan være benigne eller maligne (4). Maligne neoplasier har aggressive vekstegenskaper som gjør de skadelige for organismen de oppstår i, og er det samme som kreft. Kreft oppstår ved at det akkumuleres mutasjoner i cellens DNA fordi skadene ikke rettes opp før cellen deles (5). Sykdomsgruppen har stor variasjon, både med hensyn til årsakssammenhenger og uttrykk av aggressive egenskaper (6). Samme krefttype vil dermed utarte seg ulikt fra pasient til pasient (4). Enkelte faktorer har kjente årsakssammenhenger med kreftutvikling:

- Eksponering for kjemiske karsinogener kan gi kreft. For eksempel er enkelte stoffer i tobakksrøyk tett linket til kreft i munn, svelg og luftveier (1).
- Stråling kan gi direkte skade på DNA. Maligne melanomer er en vanlig kreftform som forårsakes av eksponering for UV-stråling (1).
- Virale infeksjoner kan gi kreft (1). Eksempelvis er humant papillomavirus tett knyttet til kreftutvikling i cervix. Tematikken rundt dette er sentral i denne oppgaven.
- Arv og genetisk disposisjon kan øke risikoen for å utvikle kreft. Arvede mutasjoner oppstår i germline celler (kjønnsceller) og omfatter mutasjoner i tumorsuppressorgener (5).

1.2.3. Egenskaper hos kreftceller

I hovedsak er det seks ulike egenskaper som kreftceller uttrykker i ulik grad og ved ulike trinn i kreftutviklingen:

- Cellen unngår reguleringsmekanismene for cellevekst og -deling i cellyklus. Kreftceller er ikke avhengige av signaler fra omkringliggende celler for proliferering (5) (6).
- Tumoren inducerer angiogenese, altså nydannelse av blodkar (6) (7).
- Cellene blir udødelige replikasjonsmessig, siden telomerene stadig forlenges ved hjelp av enzymet telomerase (5) (6) (8) .
- Kreftceller har ofte mutasjoner i gener der produktet inngår i intracellulære apoptose-induserende mekanismer, og kan dermed unngå celledød (5) (6).
- Tumoren vokser invasivt og danner metastaser (5). Kreftceller påvirkes ikke av kontakthibering slik som normale celler gjør via celleadhesjonsstrukturer (9).
- Cellene opprettholder eller øker proliferative signaler, slik blir de autonome (6).

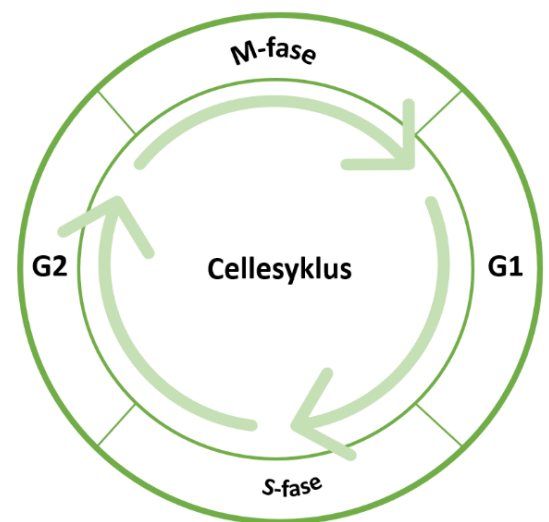
1.2.4. Tumorsuppressorer og protoonkogener

To hovedklasser av gener er spesielt viktige når det kommer til mutasjoner og utvikling av kreft: tumorsuppressorgener og protoonkogener. Tumorsuppressorgener er gener som normalt bidrar til å nedregulere celledelingen, indusere apoptose og reparere DNA-feil. Dersom det oppstår mutasjoner i disse genene kan dette føre til en inaktivering av det respektive genet. Da vil cellen kunne dele seg ukontrollert. En slik mutasjon kalles en "loss-of-function"-mutasjon og har en recessiv effekt. Dette betyr at begge allelene må inaktiveres for at proteinet skal miste sin effekt. Dersom det kun oppstår mutasjon i det ene allelet, vil det resterende fortsatt kode for proteinet og cellen kan opprettholde normal funksjon (5).

Protoonkogener er gener som normalt er med på å regulere celledelingen og får cellen til å vokse. Når det oppstår mutasjoner i et protoonkogen kan dette føre til et gen som konstant er aktivert. Proteinene som genet koder for vil bli hyperaktivt og dette kan føre til utvikling av kreft. En slik mutasjon kalles en "gain-of-function"-mutasjon og har en dominerende effekt. Det vil si at det trengs bare mutasjon i en av de to allelene for å skape en forandring i cellen som fører til kreftutvikling. Det muterte genet kalles et onkogen mens det korresponderende normale genet kalles et protoonkogen (5).

1.2.5. Cellesyklus

Cellesyklus forstyrres eller endres når en celle blir en kreftcelle. Cellesyklus omfatter hele prosessen, med dens reguleringsmekanismer, der en celle forbereder seg til og gjennomgår en celledeling. Den består av fire faser: G1-, S-, G2- og M-fase som vist i figur 2. I S-fasen vil DNA i cellekjernen replikeres. M-fasen er delingsfasen og består av mitosen (deling av nucleus) og cytokinesen (deling av cytoplasma). G1- og G2-fasene kalles «gap-faser». I gap-fasene vil cellen kontrollere og overvåke sitt indre og ytre miljø. Det inngår spesifikke syklusregulerende sjekkpunkt i begge gap-fasene. Sjekkpunktene er viktige for å unngå at cellen deler seg med skade eller når forholdene ikke ligger til rette. Ved celledskade vil funksjonen til sjekkpunktene indusere reparasjon av skaden og cellesyklusarrest, eller apoptose ved alvorlig skade (5) (10) .



Figur 2: Figuren viser gangen i cellesyklus med de ulike fasene G1, S, G2 og M. Illustrert av medforfatter i denne oppgaven.

1.2.6. Regulering av cellesyklus

Endringer i reguleringsmekanismene som inngår i cellesyklus er en sentral del av kreftutvikling. Cellesyklus har en sentral kontrollmekanisme som styrer overgangene mellom de ulike faser. Denne sentrale kontrollen styres av intracellulære feedback-mekanismer, samt ytre signaler fra miljøet rundt cellen. Bremsmekanismene som inngår i cellesyklusens sjekkpunkt styres av syklinavhengige kinaser, forkortet CDK. Disse påvirkes av syklin-konsentrasjonen, som varierer gjennom cellesyklus. De syklinavhengige kinasene reguleres av fosforylering og defosforylering via CDK-inhibitorer. Syklin-kinase-kompleksene vil også utøve sin funksjon via fosforylering av andre proteiner som inngår i cellesyklusens reguleringsmekanismer (5) (10).

Retinoblastom-protein: Aktivt retinoblast tumorsuppressor-protein, RB-proteinet, vil stoppe cellesyklus ved å indusere cellesyklusarrest i G1-fase og dermed hindre overgang til S-fase. RB-proteinet hindrer transkripsjon av cellens DNA ved å regulere en gruppe transkripsjonsfaktorer (E2F-faktorene). Når cellen er klar til å dele seg vil RB-proteinet fosforyleres og dermed inaktiveres. Denne funksjonen er viktig for at cellen ikke skal dele seg før forholdene er riktige. I mange krefttyper er RB-proteinet inaktivert. Dette kan skje via mutasjoner i RB-genet eller ved at det produseres komponenter som regulerer RB-proteinet sin funksjon. Dette kan for eksempel være syklin D, CDK4 og CDK6, eller p16^{INK4a} som inhiberer de forutnevnte (11).

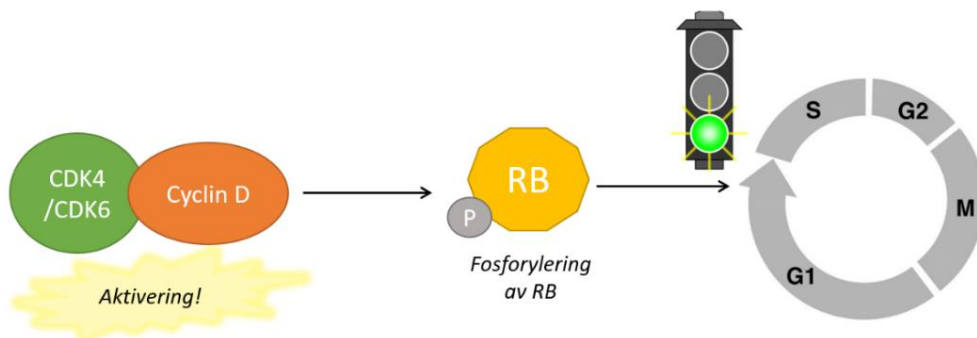
P53: P53-proteinet er et tumorsuppressor-protein og inngår normalt i sjekkpunkt-mekanismen i cellen før S-fasen av cellesyklus. P53-proteinet bidrar til reparasjon av celledskade ved å stanse cellesyklus i G1-fasen, og kan indusere apoptose ved irreversibel celledskade. Hvis funksjonen til p53 inhiberes eller p53-genet muteres vil cellen kunne dele seg til tross for skadet DNA. Dermed vil det skje en opphoping av mutasjoner og cellen kan utvikle seg til en kreftcelle. Mutasjon i gener som koder for p53-proteinet ses hyppig i krefttumorer (12).

1.2.7. Kreftdiagnostikk og persontilpasset medisin

Siden variasjonen i kreftsvulsters genuttrykk er stor, vil pasienter med samme overordnede krefttype respondere ulikt på samme behandling. Persontilpasset kreftbehandling er derfor et viktig steg mot at flere overlever kreftsykdom (13). Denne behandlingen baserer seg på bruken av svært spesifikke markører for kreftsvulstens ulike egenskaper. Markørene kan være biokjemiske, genetiske, metabolske eller protein-relatert. Flere av markørene kan brukes sammen for å stille en sikker diagnose, til prognosebestemmelse og gi mer målrettet behandling. De kan også benyttes i kreftforebyggende undersøkelser, der endringer i cellenes oppførsel kan oppdages før kreften er utviklet (14). Innen patologi benyttes flere av disse markørene i immunhistokjemiske undersøkelser. To av disse markørene, proteinene p16^{INK4a} og Ki67, er sentrale i dette bachelorprosjektet.

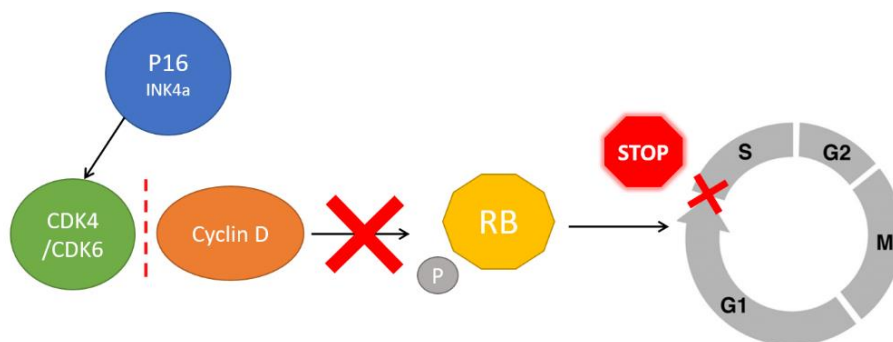
1.3 P16^{INK4a}-proteinet

P16^{INK4a} er et tumorsupressor-protein som er involvert i reguleringen av cellyklus. Proteinet er en cyclin-avhengig kinase (CDK) inhibitor som hindrer cellen fra å gå over til S-fasen i cellyklus ved å binde de to proteinene CDK4 og CDK6. Disse er avhengige av cyclin D, som er et regulatorisk protein, for å være biologisk aktive. CDK4 og CDK6 har sentrale roller i cellyklus: Ved å fosforylere og inaktivere RB-proteinet bidrar CDK4 og CDK6 til at cellen går inn i S-fasen av cellyklus der DNA replikeres (15). Denne reaksjonskaskaden er vist i figur 3.



Figur 3: Figuren viser en forenklet versjon, med de aktuelle komponenter, av kaskaden som gir overgang til S-fase i cellyklus. Illustrert av medforfatter i denne oppgaven.

Når P16^{INK4a} binder CDK4 og CDK6 fører dette til at de to proteinene blokkeres som vist i figur 4. De vil dermed ikke ha mulighet til å binde cyclin D eller videre fosforylere og inaktivere RB-proteinet. Cellen vil gå inn i cellyklusarrest og forbli i G1-fasen. CDK4 og CDK6 sin evne til å stimulere cellen til deling vil dermed opphøre. På denne måten vil P16^{INK4a} være med på å kontrollere celledelingen. En celle vil begynne å produsere P16^{INK4a} når den ikke lenger er i stand til å gjennomføre celledelingen på en kontrollert måte (15).



Figur 4: Figuren viser kaskaden som påvirkes når P16^{INK4a} utøver sin normale funksjon som bremsemekanisme for cellyklus. Illustrert av medforfatter i denne oppgaven.

P16^{INK4a}-proteinet er normalt uttrykt i cellekjernen. Et mutert p16^{INK4a} vil ikke være i stand til å danne stabile komplekser med CDK4 og CDK6. Dette vil derfor føre til at cellen ikke vil kunne bli satt i cellyklusarrest og cellen kan dermed dele seg ukontrollert (16). En slik ukontrollert celledeling kan

igjen føre til utvikling av kreft. Opptil halvparten av alle krefttyper som kan ramme mennesket viser en nedregulering av p16^{INK4a}-proteinet. I hvor stor grad proteinet er nedregulert ligger mellom 25% og 70% i de aktuelle kreftformene. Disse kreftformene kan ramme blant annet spiserør, lever, lunge, blære og tykktarm. P16^{INK4a}-proteinet kan også være overuttrykt ved visse krefttyper, eksempelvis i cervixkreft og karsinomer i munnhule/svelg. Ved overuttrykkelse finnes proteinet både i cellekjerne og cytoplasma. Felles for disse krefttypene er at de er forårsaket av infeksjoner med humant papillomavirus. Tilstedeværelse av onkoproteinene E6 og E7 fra viruset er årsaken til at p16^{INK4a}-proteinet overuttrykkes i disse tilfellene (15).

I diagnostikken er vurdering av p16^{INK4a}-uttrykk nyttig fordi:

- Karsinomer som utgår fra overgangssonen i cervix er nesten utelukkende forårsaket av høyrisiko humant papillomavirus. Disse karsinomene vil oftest ha et oppregulert uttrykk av p16^{INK4a} (17) (18) (19).
- Markøren kan benyttes til å differensiere mellom maligne melanomer og benigne nevi (føflekker). Uttrykksgraden av p16^{INK4a} vil gi indikasjon på aggressiviteten i melanomet (20).
- Det finnes som regel ikke økt uttrykk av p16^{INK4a} i endometriet, og dette benyttes til å differensiere karsinomer utgått fra endometrium og adenokarsinom fra cervix (21).
- Karsinomer i munnhule og svelg som har oppstått som følge av en HPV-infeksjon, hvilket utgjør omkring en tredjedel av tilfellene av krefttypen, vil ofte ha økt uttrykk av p16^{INK4a} (22).

1.4 Ki67-proteinet

Ki67 er et kjerneprotein som spiller en viktig rolle i celleproliferasjon. Det benyttes derfor til vurdering av proliferasjonsaktivitet i mange typer tumorvev. Uttrykket av Ki67 varierer i løpet av en celledyklus: I inaktive celler som befinner seg i G0-fasen vil proteinet ikke uttrykkes. I de aktive fasene, slik som G1, S, G og under mitosen, vil Ki67 uttrykkes i kjernen (23). Proteinets rolle er viktig når det gjelder fordeling av heterokromatin i interfase. Det vil også forhindre aggregering av kromosomer i mitosen, der det ligger som en film utenpå kromosomene. Ki67 kodes for av MKI67 genen på kromosom 10. Uttrykket av genen er regulert av typen E2F-transkripsjonsfaktorer. E2F transkripsjonsfaktorene er igjen avhengige av celledyklus og dens reguleringsmekanismer. I reguleringsmekanismene inngår CDK4, CDK6 og RB-proteinet. Slik henger uttrykk av Ki67 sammen med CDK4, CDK6 og RB-proteinet (24).

I bruken av Ki67 som tumormarkør vil vevet graderes etter hvor stor andel av cellene som uttrykker Ki67. Markøren er en nyttig indikator på mitose og celleantall, og dermed en god indikator på

prognose og metastase-potensialet i en tumor (25). I lys av dette prosjektet er relevante bruksområder for Ki67-markøren følgende:

- Høygradige dysplasier og invasive karsinomer i cervix har i største delen (75-100%) av tilfellene et økt uttrykk av Ki67. For tilfeller av lavgradige dysplasier har omlag 20% økt uttrykk av Ki67 (17) (26).
- Ki67 kan benyttes som markør for prognosen i endometriekreft. Økt uttrykk av Ki67 indikerer aggressivitet i tumoren (27).

1.5 Humant papillomavirus og kreftutvikling

Humane papillomavirus er svært spesifikke og infiserer kun epitelceller i menneskekroppen:

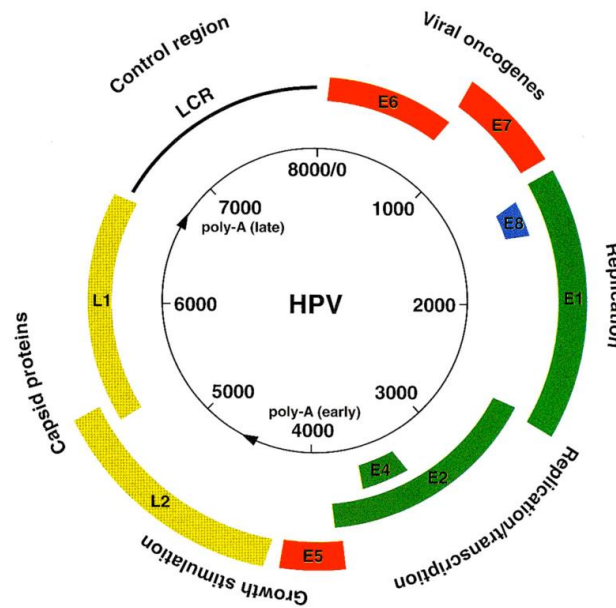
Eksempelvis plateepitel i munnhulen, genital hud eller slimhinnen i vagina (28) (29). Det er funnet 200 genotyper av humant papillomavirus, der 40 av disse smitter via kontakt mellom slimhinner. Smitte skjer oftest gjennom seksuell kontakt og er av de vanligste seksuelt overførbare infeksjonene. Av disse 40 typene er enkelte "høyrisiko" genotyper og knyttet til kreftutvikling. Høyrisiko HPV omfatter genotypene 16, 18, 31, 33, 45, 52 og 58. HPV 16 og 18 er alene årsaken til omkring 70% av cervixkreft-tilfeller (29). HPV-infeksjon er utgangspunkt for utvikling av plateepitelkarsinomer og adenokarsinomer i cervix. Langvarig HPV infeksjon er også sterkt knyttet til andre former for gynekologisk kreft. I tillegg er HPV knyttet til kreftutvikling i endetarm, svelg og hals (28).

HPV infeksjon i vagina og cervix er hyppig hos unge kvinner, men bekjempes av vertens immunforsvar i 90% av tilfellene. I de resterende 10% av tilfellene vil infeksjonen bli langvarig fordi kroppens immunrespons på HPV er liten. Årsaken til dette er at infeksjonen kun rammer epitel, og dermed er svært overflattisk (28). Langvarig infeksjon med høyrisiko HPV kan føre til dysplasi og forstadier til kreft i løpet av 10 til 15 år, og invasiv kreft først år etter dette (29). Det er flere årsaker til at høyrisiko HPV typer kan gi kreft. Mekanismene er de samme for de ulike HPV-relaterte kreftformene som diskuteres i denne oppgaven.

Produksjon av onkoproteinene E6 og E7:

HPV-genomet består av kun åtte gener: E1, E2, E4, E5, E6, E7, L1 og L2 som vist i figur 5. Genene E6 og E7 med deres onkoproteinprodukter er de viktigste bidragsyterne til HPV sin karsinogene effekt. Disse to onkoproteinene har ulike målstrukturer i epitelcellene. De viktigste av disse er p53 og RB-proteinet (17) (29). Ved langvarig infeksjon med viruset vil de integrerte genene E6 og E7, som normalt uttrykkes i lave nivå, bli oppregulert og dermed bli overuttrykt. Denne oppregulerte

produksjonen er størst hos høyrisiko HPV-typer. Når mengden av onkoproteinene øker vil også deres effekter på p53 og RB-proteinet i vertscellene få større omfang (29).



Figur 5: Figuren viser en skjematisk oversikt over genomet til humane papillomavirus (HPV) med de ulike genes funksjon. Illustrasjonen er hentet fra (30).

P53-proteinet bidrar, som nevnt tidligere, til reparasjon av celledskade og induserer apoptose ved irreversibel skade. Ved tilstedeværelse av onkoproteinet E6 vil denne funksjonen inhiberes. Dette medfører at celler som normalt skulle gått i apoptose kan dele seg videre, til tross for opphoping av skader på cellens DNA (17).

E7 fra HPV vil inhibere funksjonen til RB-proteinet ved at E7-onkoproteinet bindes til en bestemt struktur på RB-proteinet med affinitet for virale protein (11). Gjennom interaksjonen med RB-proteinet er overuttrykk av E7 hos høyrisiko HPV-typer linket sammen med økt uttrykk av p16^{INK4a} i tumorvev. E7-protein hos lavrisiko HPV-typer vil ikke stimulere til økt uttrykk av p16^{INK4a} hos cellene (21).

E2 uttrykk:

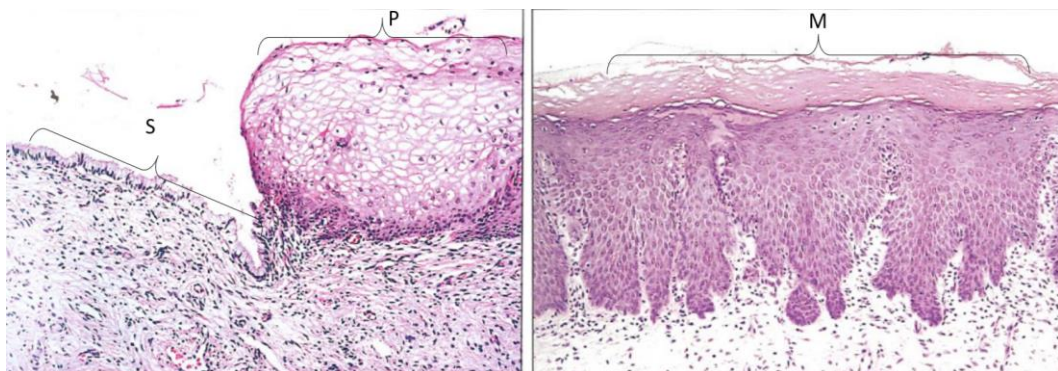
E2-genet er viktig for virusets replikasjon. Proteinet har flere genregulerende funksjoner: Det kan både aktivere transkripsjon og undertrykke promotorer. Det kan også øke replikasjonen av virusets DNA, siden E2 er nært knyttet sammen med E1. E1-proteinet er virusets replikasjonsfaktor. Ved integrering av HPV-genomet i vertscellens genom ved en infeksjon, vil E2-proteinets egenskaper forstyrres og nedsettes (31). Dette medfører at uttrykket av onkogenene E6 og E7 øker, siden den negative feedback-funksjonen knyttet til disse (via E2) ødelegges. Endringen i E2-uttrykk er vanligst for HPV av genotype 18 (32). De fleste celler hentet fra cervixkarsinomer har integrert HPV-DNA med aktivt uttrykk av genene E6 og E7 (31).

Uttrykket av E2 kan også gi karsinogene effekter ved at genet inaktiveres, eksempelvis via metylering. Da kan ikke genet lenger utøve sin funksjon som «undertrykker» av de andre virusgenene. Dette kan gi økt produksjon av onkoproteinene E6 og E7, som har samme effekt på vertscellen som nevnt tidligere (31).

1.6 Cervix

Cervix uteri, eller livmorhalsen, er betegnelsen på den nederste tredjedelen av uterus. I den øvre delen av cervix vil slimhinnen ligne det overliggende endometriet (slimhinnen i uterus). Den nedre delen av cervix kalles canalis cervicis og er rørformet. Slimhinnen canalis cervicis vil ikke frastøtes ved menstruasjon eller gjennomgå de samme forandringene som det overliggende endometriet. Denne slimhinnen er tykk (2-3mm), og består av enlaget sylinderepitel. Den har en kjertellignende struktur der overflaten består av en rekke folder kalt plicae palmatae. Sylinderepitelet i dette området er sekretoriske og danner cervix-slimet. I overgangen mellom cervix og vagina, vil cervix synes som en fold eller tapp. Denne kalles portio vaginalis (livmortappen) og vil på yttersiden være kledd med flerlaget plateepitel. Innsiden, som er en del av canalis cervicis, er kledd med enlaget sylinderepitel. Det er i overgangssonen mellom disse epiteltypene at det kan oppstå cervical dysplasi (33).

Overgangssonen er den brå overgangen mellom flerlaget plateepitel i vagina og enlaget sylinderepitel i cervix og endometrium, vist i figur 6. Nøyaktig hvor overgangen befinner seg varierer. Endringer i overgangssonen skjer ved store svingninger i hormonnivåer, som for eksempel ved pubertet, menopause eller graviditet. Avhengig av dette kan den befinne seg høyt eller lavt i canalis cervicis, eller på portio vaginalis. I overgangssonen oppstår det metaplastisk epitel ved irritasjon og skade på sylinderepitelet. Irritasjon av sylinderepitelet vil medføre at de basale reservecellene aktiveres og får endret differensiering. Da produseres et flerlaget metaplastisk epitel som er mer motstandsdyktig (33). Strukturen til det metaplastiske epitelet kan ses til høyre i figur 6.



Figur 6: Bildet til venstre viser overgangssonen mellom enlaget sylinderepitel (S) i cervix/endometrium og flerlaget plateepitel (P) i vagina før metaplastiske endringer har oppstått. Bilde til høyre viser hvordan vevsstrukturen er når metaplastisk epitel (M) har oppstått. Bilde hentet fra: «Pathology of the female reproductive tract» (34). Forstørrelse ikke tilgjengelig, HE-farget

1.7 Cervikal dysplasi og kreft i cervix

Cervikal dysplasi er vekstforstyrrelser hos cellene i overgangssonen på cervix, også kun referert til som “celleforandringer”. Disse forstyrrelsene oppstår i de metaplastiske cellene og er forårsaket av HPV. I overgangssonen i cervix er basalcellene mer utsatt enn andre steder. Viruset kan da infisere og skade de basale cellene. Dette kan gi kreft hvis de skadde basalcellene fortsetter å dele seg (28).

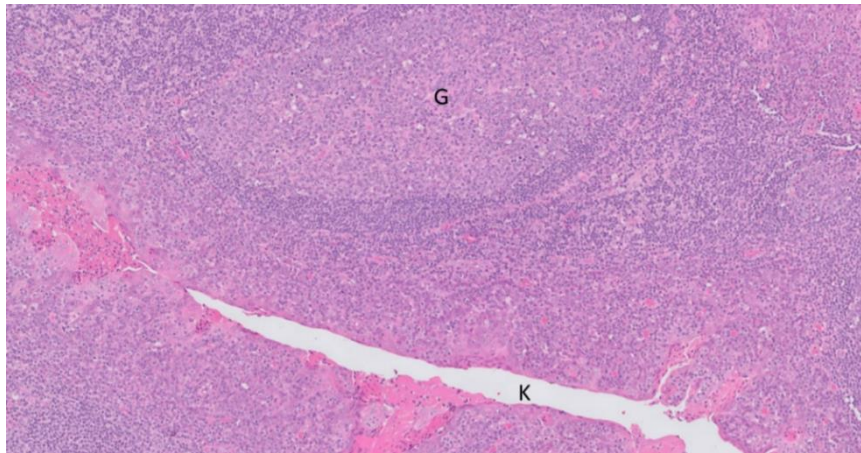
Cervikal dysplasi klassifiseres etter alvorlighetsgraden av celleforandringene som CIN I, II eller III. Andre klassifikasjoner benyttes også. CIN I tilsvarer lette celleforandringer, CIN II er moderate celleforandringer og CIN III er alvorlige eller grove celleforandringer og et forstadium til kreft (35). CIN I kan forårsakes av infeksjon med lavrisiko HPV-typer. CIN II/III kommer i all hovedsak av infeksjon med høyrisiko HPV-typer (21). Dysplasier forårsaket av lavrisiko HPV-genotyper vil somregel ikke ha økt uttrykk av p16^{INK4a}. For dysplasier forårsaket av høyrisiko HPV-genotyper, CIN II og III, er økt p16^{INK4a}-uttrykk svært vanlig (18) (29).

Cervical dysplasi kan altså være forstadier til kreft i cervix, en av de hyppigst forekommende kreftformene blant kvinner både i Norge og verden. Årlig dør om lag 70 norske kvinner av krefttypen, og cirka 300 får diagnosen (28). I Norge er tallene synkende på grunn av forbedret screeningprogram, tidlig behandling av dysplastiske forstadier og vaksinasjon mot enkelte typer HPV.

1.8 Munnhulen, svelget og tonsillene

Munnhulen består av tennene, tannkjøttet, spyttkjertler, tungen, smaksløker og ganen (33). Svelget, pharynx, kan deles i tre hoveddeler: Øverst er nasopharynx, en del av nesens og luftveiene, som stopper ved den bløte ganen. Oropharynx som er den delen som tilhører munnhulen. Laryngopharynx, den nederste delen, som er strupehodet (36). En slimhinne av ikke-keratinisert flerlaget plateepitel kler munnhulen og deler av svelget (33).

Tonsillene, mandlene, er to lymfoide organ som ligger til hver sin side i oropharynx. Overflaten er, i likhet med resten av oropharynx, kledd med ikke-keratinisert flerlaget plateepitel. Overflaten av tonsillene har 10-20 dype folder, disse kalles krypter. Kryptene vil igjen forgreine seg til flere og dypereliggende krypter, som vist i figur 7 under. Under epitellaget i tonsillene, i lamina propria, finnes lymfoid vev som sørger for at det er store mengder lymfocytter tilstede i epitelet. De germinale sentrene i tonsillen inneholder store mengder B-celler og dendritiske celler. Disse sentrene vil, siden de inneholder store og lyse celler, fremstå lysere i fargede snitt enn det omkringliggende vevet i tonsillen (33) (36). Dette vises tydelig i figur 7 på neste side.



Figur 7: Tonsillens oppbygning med krypter (K) og germinale sentere (G). Bildet er hentet fra digitalt arkiv tilhørende Avdeling for patologi ved St. Olavs hospital. Forstørrelse 10x, HE-farget.

1.9 Hode- og halskreft: Plateepitelkarsinom i munnhule og svelg

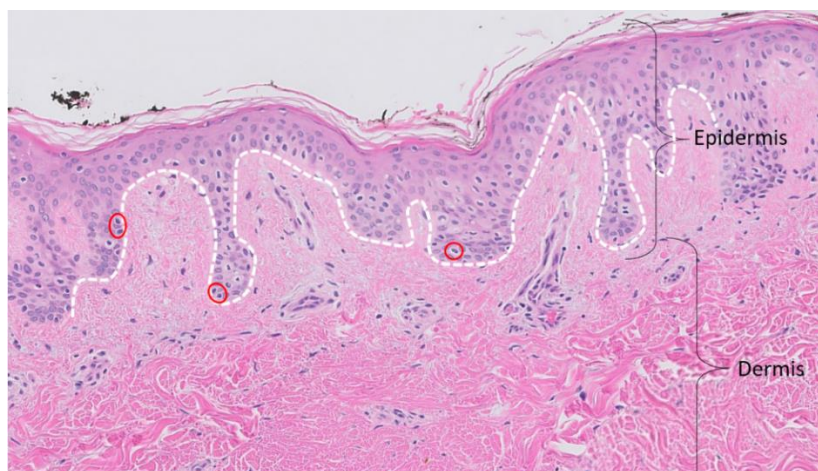
Hode- og halskreft er en fellesbetegnelse som benyttes for flere ulike krefttyper i hode og hals-regionen. For dette bachelorprosjektet og de aktuelle immunhistokjemiske markørene er det karsinomer i munnhulen og svelget som er hovedfokuset. Det er observert en økt forekomst av disse karsinomene de siste årene. Karsinomer i øvre del av svelget har en kjent sammenheng med infeksjoner med høyrisiko humant papillomavirus. Infeksjoner i disse områdene er blitt mer utbredt de senere årene, der viruset overføres gjennom seksuell kontakt. Årlig sees omkring 600 nye tilfeller av karsinomer i munnhule/svelg. I de tidlige stadiene har kreftformen få symptomer, og kan dermed gå udiagnostisert langt ut i forløpet. Dette gir økt risiko for metastasering og dermed dårligere prognose. Over halvparten av tumorer av denne krefttypen utgår fra tonsillene. De resterende utgår gjerne fra bakre vegg i svelget, tungen eller den bløte ganen. Foruten HPV-infeksjon finnes andre disponerende risikofaktorer for utvikling av karsinomer i svelg/munnhule. Blant disse er røyking og stort inntak av alkohol viktigst (22) (37).

1.10 Huden

Huden er kroppens største organ og består av tre lag: epidermis (overhuden), dermis (lærhuden) og subcutis (underhuden). Epidermis består av flerlaget plateepitel der flesteparten av cellene er keratinocytter. Basalcellene gjennomgår kontinuerlig celledeling slik at eldre celler skyves opp til overflaten. I løpet av denne prosessen gjennomgår cellene en modning som innebærer at de begynner å produsere hornstoffet keratin. I overhudens øverste lag gjennomgår cellene apoptose og vil omdannes til et slitesterkt nettverk. Denne overflaten vil kontinuerlig slites av og erstattes av et nytt hornlag slik at hudens overflate alltid er fornyet og slitesterk. I basalaget i epidermis finnes melanocytter som

produserer pigmentet melanin. Melanin samles i melanosomer som er små korn som finnes inne i melanocytene. Ved hjelp av utstikkere overføres melanosomene til keratinocytene. Melanin vil beskytte DNA i cellekjernen mot skader fra UV-stråler (33) (38) (39).

Dermis er hudens tykkeste lag og består av kollagene fibre, elastiske fibre og ulike celletyper. Kollagene fibre tilfører huden styrke. Elastiske fibre bidrar til elastisitet i huden. Disse to typer fibre produseres av fibroblaster som er lokalisert i dermis. I tillegg finnes mastceller og makrofager, som er en del av hudens immunforsvar. Subcutis består hovedsakelig av fett og bindevev. I tillegg består den av to typer kjertler; talgkjertler og svettekjertler (33) (38) (39). En oversikt over hudens histologi ses i figur 8 nedenfor.



Figur 8: Figuren viser histologien i dermis og epidermis. Skillet mellom de to lagene er markert med en stiptet linje der basalmembranen går. Enkelte melanonocytter er markert med rød ring. Bildet er hentet fra digitalt arkiv tilhørende Avdeling for patologi ved St. Olavs hospital. Forstørrelse 10x, HE-farget.

1.11 Maligne melanomer

Malignt melanom er en alvorlig form for hudkreft som oppstår i melanocytene. Kreftformen er ikke assosiert med HPV-infeksjon, men kommer av eksponering for UV-stråling. UV-stråling vil bryte bindinger i cellenes DNA slik at det dannes nye kovalente bindinger mellom to påfølgende pyrimidinbaser. Det dannes da en dimer, for eksempel Thymin-dimer, som vil hindre enzymene som replikerer og translaterer DNAet ved at det dannes en «knekk» i DNA-tråden. Dette kan medføre feilkoding i replikasjonen om skaden ikke rettes opp (40).

Den mest effektive behandlingen for ikke-metastasert melanom er å fjerne den kirurgisk. Metastasert melanom krever tilleggsbehandling (41). Det er derfor viktig å fange opp pasienter med økt risiko for å utvikle metastaser. Immunhistokjemisk farging med anti-p16^{INK4a} og anti-Ki67 kan bidra til å oppdage disse tilfellene på riktig tidspunkt slik at behandlingen kan tilrettelegges for hver enkelt pasient.

Nevi (føflekker) og maligne melanomer har forskjellig uttrykk av proteinene p16^{INK4a} og Ki67. P16^{INK4a} vil alltid være uttrykt i kjernen hos normale melanocytter. De fleste nevi vil også uttrykke p16^{INK4a} både i kjerne og cytoplasma (41). I melanomer derimot kan p16^{INK4a} være mutert og uttrykt i mindre grad. Da ses proteinet kun i kjernen. Mutasjon i p16^{INK4a}-genet kan også gi negativ farging for p16^{INK4a}. Uttrykt av p16^{INK4a} i cellene vil gradvis minke fra benigne nevi, til melanomer uten metastaser, og videre til melanomer med metastaser. Et manglende uttrykk av p16^{INK4a} vil derfor være assosiert med en mer aggressiv kreftform med metastasering. Uttrykk av p16^{INK4a} i maligne melanomer kan på denne måten bidra til å si noe om prognosen til pasienter diagnostisert med denne typen hudkreft. Uttrykt p16^{INK4a} i cytoplasma vil tyde på at kreften ikke er metastasert til lymfeknuter. Ki67-proteinet uttrykkes kun i prolifererende celler. Kreftceller vil derfor ha et høyere uttrykk av Ki67 enn normale melanocytter. Siden proliferasjonsraten er nyttig for å kunne skille maligne melanomer fra benigne nevi, er proteinet Ki67 av interesse. Fravær av p16^{INK4a} sammen med en økt proliferasjonsrate kan derfor benyttes til å skille maligne melanomer fra benigne nevi (41).

Forekomst av malignt melanom øker på verdensbasis. Samlet for begge kjønn er denne kreftformen den nest hyppigste i aldersgruppen 25-49 år (42). Forekomsten har økt kraftig de senere årene, spesielt hos menn. Dette kan ha sammenheng med at diagnosen ofte stilles på et sent tidspunkt. Særlig er endrede solvaner av stor betydning for økningen (43).

1.12 Immunhistokjemi ved Avdeling for patologi, St. Olavs hospital

Immunhistokjemi er en teknikk der antistoffers antigenbindene egenskap utnyttes. Immunologiske fargemetoder benyttes som supplement til vanlige histologiske undersøkelser. Metoden brukes til å detektere strukturer i celler som er av interesse for klassifisering av sykdommer og kreftsvulster. Immunhistokjemi er nyttig i utredning av metastasert kreft; bestemte antigene strukturer i tumoren kan avdekke hvilken vevstype primærtumoren er utgått fra. Ved behandling av pasienter og bestemmelse av prognose kan resultater fra immunhistokjemiske undersøkelser bidra i å tilpasse den beste behandlingen for hver enkelt pasient.

Enhet for immunhistokjemi tilhører Avdeling for patologi ved St. Olavs hospital. Enheten har i dag 5 helautomatiserte immunhistokjemiske fargeinstrumenter av typen BenchMark Ultra fra Ventana/Roche (44). Ved Avdeling for patologi er flere analyser akkreditert etter ISO 15189 standarden, deriblant den grunnleggende HE-fargemetoden og 9 ulike immunhistokjemiske metoder. Immunhistokjemisk farging for p16^{INK4a} er ikke enda akkreditert etter ISO 15189. På et generelt nivå etterlever arbeidet på laboratoriet denne kvalitetsstandard for alle analyser (45).

1.13 Implementering av nye protokoller i laboratoriet

Immunhistokjemi er et område med stor utvikling. Nye antistoffer blir stadig tilgjengelig på markedet og nye sykdomsmarkører dukker opp. Når et laboratorium velger å ta i bruk et nytt antistoff må det utarbeides en protokoll som optimaliseres og valideres. Målet med å utvikle en slik protokoll er å oppnå en korrekt visualisering av antigenet i prøver der man ikke vet i hvor stor grad antigenet er uttrykt. Optimalisering av protokollen innebærer å finne fram til de parameterne som gir best mulig fargekvalitet. Den endelige protokollen skal være i stand til å identifisere antigenet i unormalt vev der det uttrykkes i større og mindre grad, samt i normalt vev. Ulike parametere som vurderes er valg av antistoffklon, type forbehandling, forbehandlingstid, inkubasjonstid for antistoff og konsentrasjon av primærantistoff dersom det er relevant med fortykning. Når optimalisering av protokollen er gjennomført er neste steg å validere protokollen for å sikre at den er egnet til diagnostisk bruk ved laboratoriet. I de tilfeller der antistoffets egenskaper og kvalitet er tilstrekkelig kartlagt av produsent vil det være nok å utføre en verifisering før implementering i laboratoriet (46) (47).

1.14 IVDR

I 2017 opprettet EU et nytt regulativ for in-vitro diagnostisk medisinsk utstyr (IVDR) med en overgangsperiode på 5 år. Regulativet trer i kraft den 26. mai 2022. «In vitro diagnostisk utstyr» omfatter produkter som reagenser, kontroller, kalibratorer og annet som inngår i en undersøkelse av en prøve hentet ut fra en pasient (48). Regulativet gjelder både produksjon og omsetting av slikt utstyr på det europeiske markedet (49). Målene med IVDR er å øke pasientsikkerheten og sikre sporbarheten i produksjonen av IVD-utstyr. Det setter høyere krav til dokumentasjon, risikostyring, kvalitetssystem, sporbarhet, pakking og merking av utstyr enn det som gjaldt tidligere (50) (51). Utstyr produsert i tråd med disse kvalitetskravene får kvalitetsmerkingen «CE». Denne merkingen gjør at utstyret fritt kan omsettes på det europeiske markedet.

Hvis utstyr som er produsert i henhold til IVDR brukes på en annen måte enn den som er spesifisert av leverandøren stilles store krav til dokumentasjon. Da regnes laboratoriet selv som produsent for metoden, og det såkalte "in-house"-unntaket gjelder. Unntaket gjelder utstyr som produseres eller modifiseres til bruk internt på laboratoriet, fordi det er av nytte for en bestemt pasientgruppe med spesifikke behov (52). Tolkingsmessig er det er gråsoner rundt hvor store avvikene fra anbefalt bruk kan være før unntaket slår inn. Unntaket kan ikke benyttes dersom det er kommersielle godkjente alternativ på markedet, med mindre det foreligger en adekvat begrunnelse basert på pasientbehov (51) (52).

Videre stilles en rekke andre krav til det egenprodusert utstyret, og at utstyret oppfyller disse skal dokumenteres. For at bruk eller produksjon av slikt utstyr skal være godkjent i henhold til «in-house»-unntaket i IVDR må det blant annet følge et kvalitetsstyringssystem som tilsvarer standarder satt i EN ISO 15189. Norske laboratorier kan akkrediteres i henhold til denne standarden via Norsk Akkreditering. En nærmere beskrivelse av disse kravene finnes under artikkel 5 punkt 5 i IVDR, samt i vedlegg til «Forskrift om medisinsk utstyr» kapittel 3 i det norske lovverket (53) (54) (55).

Når nye metoder og protokoller skal implementeres ved Enhet for immunhistokjemi er det derfor viktig å få en oversikt over hva som gjelder i henhold til IVDR når den skal tas i bruk. Analysetilbudet på avdelingen er stort, og det benyttes allerede flere metoder som må tilpasses dette nye regelverket.

1.15 Problemstilling

Immunhistokjemi er et fagfelt i vekst og samtidig som antall prøver øker vil også kostnadene knyttet til analysene øke. Det er derfor hensiktsmessig å prøve ut rimeligere alternativer for reagensene som inngår i analysene. Problemstillingen for denne oppgaven ble derfor som følger:

*Hvordan vil et bytte til anti-p16^{INK4a} klon BC42 fra Biocare Medical påvirke fargekvalitet i p16 enkeltfarge- og Ki67/p16 dobbeltfarge-protokollene, samt kostnader knyttet til disse analysene?
Hvordan vil de nye protokollene omfattes av IVDR?*

2. MATERIALE OG METODE

2.1 Prøvemateriale

Til undersøkelse av problemstillingen ble det benyttet parafininnstøpt formalinfiksert vev med kjente diagnoser. Disse er vist i tabell 1 og vevsprøvene som ble farget er gitt et nummer som benyttes videre i denne oppgaven.

Tabell 1: Tabellen viser prøveidentifikasjonsnummer samt vevstype og diagnose for de ulike vevsprøvene benyttet i utprøvingen. Prøveidentifikasjonsnumrene vil bli benyttet videre i denne oppgaven.

Prøveidentifikasjon	Vevstype og diagnose
1	Cervix, kon med dysplasi CIN II/III
2	Cervix, kon med dysplasi CIN II/III
3	Tonsille, med plateepitelkarsinom
4	Tonsille, tungebasis, med plateepitelkarsinom
5	Hud med malingt melanom, normalt uttrykk av p16 ^{INK4a}
6	Hud med malingt melanom, bortfall av p16 ^{INK4a}
7	Godartet nevus
8	Godartet nevus
9	Cervix, biopsi med dysplasi CIN II/III
10	Cervix, biopsi med dysplasi CIN II/III
11	Cervix, biopsi med dysplasi CIN II/III
12	Cervix, kon med dysplasi CIN III
13	Cervix, kon med dysplasi CIN III
14	Cervix, kon med dysplasi CIN II/III

Diagnosene til disse prøvene dekker et vidt bruksområde for metoden. Uttrykket av p16^{INK4a} og Ki67 varierer mellom vevstypene og internt i deres strukturer. Derfor ble det valgt å teste ut flere vevstyper for å sikre korrekt utslag for både lave og høye nivåer av p16^{INK4a} og Ki67. Hovedvekten av prøvene som utredes med immunhistokjemisk farging for p16^{INK4a} er koniseringer fra cervix. Dette er prøver som har fått påvist høygradige dysplasier som CIN II og III. Derfor ble denne typen prøvemateriale vektlagt i utprøvingen. Ki67-markøren benyttes for mange typer vev og protokollen skal kun verifiseres for Ki67/p16 dobbeltfargeprotokollen med de aktuelle vevstyper.

Materialet til utprøvingen ble hentet fra diagnostisk biobank. Når laboratoriet har fullført arbeidet med en pasientprøve vil materialet bli tatt vare på slik at det kan benyttes, om behøvelig, i sammenheng

med diagnostikk eller oppfølging senere hos pasienten. Prøvemateriale kan også benyttes til intern kvalitetssikring på laboratoriet. Det tas hensyn til et eventuelt senere behov for materiale i utvelgelsen av prøver til bruk i kvalitetssikring. Blant annet vil det ikke benyttes prøver med små mengder materiale igjen. Prøvenummer/identifikasjonsnummer for prøvene kan ikke oppgis i denne oppgaven av generelle personvern hensyn. De er derfor gitt nytt identifikasjonsnummer som vist i tabell 1 over.

2.2 Kontrollmateriale

Kontrolltyper og opparbeidelse:

For hvert farget snitt benyttes et kontrollsnitt av vev med et kjent uttrykk av den aktuelle markøren. Dette kan være normalvev eller neoplastisk vev (46). Vev som benyttes til kontroll består av ulike strukturer, hver med sitt uttrykk av den aktuelle markøren. Et og samme vevssnitt kan derfor benyttes som både høy positiv, lav positiv og/eller negativ kontroll (56). Disse vevene støpes sammen i multivevsblokker og snittes. Kontrollsnittet plasseres så på objektglasset med prøven, og farges dermed under samme betingelser.

Vevskontrollene kan lages fra arkiverte pasientprøver som tidligere er blitt analysert eller fra restmateriale som er igjen etter at representative områder er hentet ut fra vevsprøven. Dette materialet kan benyttes i internt kvalitetsarbeid. Diagnosen og annen informasjon tilknyttet vevsprøven er lagret i laboratoriets datasystem. Normalvev fra pasienter som ikke har noen tilknytning til Avdeling for patologi kan også benyttes som kontrollmateriale. Dette kan eksempelvis være tonsiller som jevnlig fjernes hos pasienter med tonsillitt på sykehusets avdelinger. Gode kontrollmaterialer kan være vanskelig å oppdrive. Kontrollmateriale vurderes og fremstilles kontinuerlig, alt etter tilgang og behov, av avdelingens ansatte.

Vurdering av kontroller:

Resultatene i immunhistokjemiske metoder er kvalitative. Tolkningen av resultatene gjøres av patologer med ulik erfaring og er i stor grad subjektive. Bruk av kontroller er nødvendig for å sikre optimal fargekvalitet for vurderingen. Positive strukturer i kontrollen vurderes først, og inneholder antigenet som skal påvises. Disse strukturene kan ha høyt eller lavt uttrykk av antigenet. De forventede positive strukturene i vevet vil kontrollere at reagensene og protokollen som benyttes fungerer hensiktsmessig. Med «hensiktsmessig» menes at antigenet blir påvist og i en tydelig grad. Om den positive kontrollen ikke får farge er farger resultatet ugyldig. Videre vurderes de negative strukturene i kontrollene. Er disse farget kan det tyde på uspesifikk binding og dårlig fargekvalitet. Kontrollen vurderes av bioingeniør med hensyn til den tekniske kvaliteten på fargingen. Det er

bioingeniørens oppgave å påse at fargeprotokollene gir fargerresultater som kan benyttes i pasientutredelse, og å utbedre mangler i disse. Kontrollene vurderes også av patolog ved undersøkelse og svarutgivelse for prøven. Det er patologen som er ansvarlig for det svaret som gis ut til pasienten, og som dermed overordnet står ansvarlig for kvalitetsvurderingen (46) (47) (56).

Kontroller benyttet i prosjektet:

For markørene p16^{INK4a} og Ki67 er det flere vevstyper som er egnede kontroller. Et utvalg av disse ble benyttet i dette prosjektet og er vist i tabell 2. Kontrollene ble vurdert for alle fargede prøver i samarbeid med prosjektets veileder. Kontrollene ble også vurdert av patolog ved vurdering av fargekvalitet på de utprøvde protokollene.

Tabell 2: Tabellen viser en oversikt over de kontroller som ble benyttet i dette prosjektet, og deres uttrykk av de aktuelle antigene strukturer i vevet.

Vevstype	Uttrykk av p16 ^{INK4a}	Uttrykk av Ki67
Tonsille normalvev	Positiv: Plateepitelceller i kryptene, kjerne og cytoplasma. Svakt positivt uttrykk i kjerne og cytoplasma hos Dendrittiske celler i germinale sentere.	Positiv: Kjerner i B-celler i germinale sentre. Basalt sylinderepitel.
	Negativ: Lymfocytter i lymfoid vev	Negativ: B-celler i andre områder
Cervixdysplasi CIN II / III	Positiv: Sterk positiv i CIN II/III lesjoner i plateepitel, uttrykket i cytoplasma og kjerne.	Positiv: Lesjoner i dysplastiske plateepitelceller vil være sterkt positiv.
	Negativ: Resterende vev	Negativ: Resterende vev
Pancreas normalvev	Positiv: Varierende farging i langerhanske øyer.	Positiv: Liten andel epitel i eksokrine kjertler.
	Negativ: Resterende vev, eksokrine celler	Negativ: Resterende vev

Informasjonen om kontrollene er hentet fra: (19) (25) (26) (57).

2.3 Reagenser

- Deteksjonskit: OptiView DAB IHC fra Ventana /Roche Diagnostics. Deteksjonskitet består av følgende reagens:
 - OptiView Peroxidase Inhibitor
 - OptiView HQ Universal Linker
 - OptiView HRP Multimer
 - OptiView H₂O₂
 - OptiView DAB
 - OptiView Copper
- Deteksjonskit: UltraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit fra Ventana / Roche Diagnostics. Deteksjonskitet består av følgende reagens:
 - UltraView Universal AP Red Multimer
 - UltraView Universal AP Red Fast Red A
 - UltraView Universal AP Red Fast Red B
 - UltraView Universal AP Red Naphtol
 - UltraView Universal AP Red Enhancer
- Amplifiseringskit: Ventana Medical Systems, Inc´s AmplifikasjonsKit fra Ventana / Roche Diagnostics. Amplifiseringskitet består av Amplifier A og Amplifier B.
- Primærantistoff: RTU monoklonalt p16^{INK4a} -antistoff fra mus, klon BC42, fra BioCare Medical.
- Primærantistoff: Konsentrat av monoklonalt anti-Ki67 fra mus, klon MIB1, fra Dako /Agilent.
- Andre reagenser som inngår i analysen:
 - ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) fra Ventana
 - ULTRA Cell Conditioning Solution (Ultra CC2) fra Ventana
 - Reaction Buffer fra Ventana
 - ULTRA LCS (Predilute) fra Ventana
- Hematoxylin, pH 2.05
- Xylen
- 80%, 96% og absolutt alkohol (100%)
- Pertex monteringsmiddel fra Histolab

2.4 Utstyr

- Fargeinstrument: Benchmark Ultra fra Roche Diagnostics
- Monteringsinstrument: Thermo scientific Cover Tech
- Digitalisering av fargede preparat: NanoZoomer S360 fra Hamamatsu og Ultra Fast Skanner (UFS) fra Phillips
- Pipette, volum 10-100 μ L
- Mikrotom: Leica RM2255
- Objektglass: Superfrost plus fra Thermo scientific

2.5 Metode

Skriveprosessen og laboratoriearbeid:

Metoden som ble benyttet til undersøkelse av problemstillingen i denne rapporten er en kvalitativ metode som bygger på subjektive vurderinger. Innsamlingen og tolkningen av materialet som ble undersøkt, ble utført parallelt gjennom hele arbeidsperioden. Skriveprosessen ble i stor grad gjennomført digitalt gjennom online-løsningen for Microsoft Word. Samtaler med veiledere ble gjennomført delvis digitalt og delvis i person. Materialet som vurderes i oppgaven ble samlet inn gjennom litteratursøk og praktisk laboratoriearbeid. Praktisk laboratoriearbeid og vurdering av fargerresultater ble gjennomført i samarbeid med prosjektets veileder og vurdert av patologer fra Enhet for immunhistokjemi ved Avdeling for patologi, St. Olavs hospital.

Verifiseringsprosessen og vurdering av fargekvalitet:

Prestasjonen til anti-p16^{INK4a} BC42 fra Biocare Medical er validert av produsent for bruk på Benchmark ultra i Ventana/Roche systemet (58). Det er også dobbeltfargeprotokollen for Ki67/p16 av laboratoriet. Dermed ble det utført en verifisering for det nye anti-p16^{INK4a}. Etter optimalisering og valg av egnet protokoll gjennomgikk antistoffet en verifiseringsprosess. Den utarbeidede protokollen ble testet gjentatte ganger. Dette ble gjort for å sikre at antistoffet oppfyller de kravene som settes til analytisk spesifisitet og sensitivitet. Antistoffet prøvdes ut på en rekke ulike vevstyper. På denne måten ble antistoffets repeterbarhet og reproducerbarhet testet. Inkludert i verifiseringsprosessen benyttes kontrollmateriale med normale veldefinerte cellestrukturer så vel som klinisk relevant kontrollmateriale, det vil si unormalt vev (46) (47).

Denne prosessen ble gjennomført for enkeltfargeprotokoll for p16, samt dobbeltfargeprotokoll for Ki67/p16. Det ble testet ut færre variasjoner i optimaliseringen av dobbeltfargeprotokollen, siden

denne tok utgangspunkt i funnene fra verifiseringen av enkeltfargeprotokollen. Utgangspunktet for verifiseringen av anti-p16^{INK4a} var 5 ulike protokoller, hvorav én var protokoll anbefalt av antistoffleverandøren. For dobbeltfargeprotokollen Ki67/p16 ble det testet ut to ulike protokoller. En oversikt over de ulike protokoller testet ut i verifiseringen finnes under delkapittelet: «2.8 Protokoller benyttet i utprøvingen». Prosessen og funn ble dokumentert i laboratoriets interne kvalitetssikringsdatabase for prosedyrer og dokumenter; EQS. Protokollene vil testes ut videre på en rekke prøver i diagnostikken før verifiseringen er fullkommen (47).

2.6 Dobbeltfargeprotokoller

Dobbeltfargeprotokoller er en type multifargeprotokoll. Multifargeprotokoller benytter to eller flere ulike markører på et og samme vevssnitt. Dobbeltfargeprotokollen som ble verifisert i dette bachelorprosjektet benyttet to primærantistoff; anti-p16^{INK4a} og anti-Ki67. Disse ble visualisert med hvert sitt deteksjonskit; henholdsvis UltraView AP Red Detection Kit og OptiView DAB Detection Kit. De aktuelle antigenene strukturene i vevet vil dermed få ulik farge. Fordelen med dobbeltfargeprotokoller er at:

- Den diagnostiske informasjonsmengden pr. snitt økes ved å benytte flere markører samtidig.
- Metoden vil gi informasjon om sammenhengen mellom to markører, for eksempel om de vil opptre sammen eller i ulike cellepopulasjoner.
- Det behøves mindre vevsmateriale. Dette gir større muligheter for antallet markører som kan benyttes på samme vevsprøve, uten at det behøves mer materiale.
- Det spares ressurser og gir en mer effektiv utnyttelse av fargekapasitet på maskinene.

Det er likevel flere utfordringer med teknikken. For det første benyttes i stor grad antistoffer fra mus og kanin. Antistoff med annen opprinnelse er ikke tilgjengelig for mange analyser. Benyttes flere antistoffer fra samme dyreart stiller det høye krav til spesifisitet i visualiseringskitet med sekundærantistoffet, eller ekstra for/etter-behandlingstrinn i protokollen. Hvilke antistoff som er på markedet vil derfor begrense muligheten for bruk av dobbeltfargeprotokoller. Dette kunne by på utfordringer i utformingen av dobbeltfargeprotokollen i dette prosjektet, siden begge primærantistoffene stammer fra samme dyreart (mus). Det kan også være vanskelig for patologen som skal vurdere snittet å differensiere mellom de to markørene hvis de begge uttrykkes i samme vevsstruktur, eksempelvis i cellekjerner. Det var derfor viktig å sørge for at fargene i sluttresultatet enkelt kan skilles fra hverandre. Med hensyn til dette må uttrykket av de to markørene vurderes i forhold til hverandre, slik at den ene ikke domineres av den andre (46). Dette var også en aktuell problemstilling i utformingen av dobbeltfargen for Ki67/p16.

2.7 Prinsipp

2.7.1. Fiksering

Fiksering er en prosess der hensikten er å stabilisere vevet så raskt som mulig etter at cellene kobles fra blodomløpet i kroppen. Ved å fikse vevet stoppes den enzymaktiviteten som starter i det en vevsbiopsi fjernes fra kroppen (59). Formalin er et mye brukt fikseringsmiddel som bevarer vevets struktur. Formalin vil kryssbinde proteiner i vevet ved å danne metylenbroer mellom karbonatomene i aminosyrene. Dette vil redusere immunreaktiviteten med spesifikke antistoffer ved å maskere epitopene (46). Vevet som ble benyttet i dette prosjektet hadde på forhånd gjennomgått formalinfiksering, fremføring og parafininnstøpning.

2.7.2. Forbehandling av vevet

Før vevssnittene kan farges med immunhistokjemisk metode må de gjennomgå en forbehandling slik at kryssbindingene brytes og epitopene i vevet demaskeres. Det finnes ulike forbehandlingsmetoder som kan benyttes. Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) er en forbehandlingsmetode hvor det benyttes varme sammen med en buffer for å gjendanne antigenreaktiviteten i formalinfiksert parafinstøpt vev. Snittene vil kokes i en trisbuffer kalt Cell Conditioner. Det finnes to ulike varianter av bufferen; CC1 med pH 8,0 og CC2 med pH 6,0. Bufferen vil føre til at de kovalente kryssbindingene mellom proteinene i vevet brytes. En slik forbehandling kan ha en uheldig effekt på morfologien i vevet. Det er derfor viktig å vurdere type buffer og tiden på forbehandlingen under utprøvingen av en ny protokoll. Demaskering av antigener kan også gjøres ved å benytte en enzymbasert metode. Denne metoden kan i noen tilfeller være ødeleggende for morfologien i vevet og konsentrasjon og behandlingstid må derfor prøves ut. Det er også mulighet for å benytte en kombinasjon av HIER og enzym (46) (47) .

I dette prosjektet ble det utført utprøvinger av protokoller med forskjellig type forbehandling og forbehandlingstid. For p16 protokollene ble CC1 prøvd ut i 32, 48 og 64 minutter mens CC2 ble prøvd ut i 48 minutter. Dette ble gjort siden 48 minutter var anbefalt av produsent. Det ble også prøvd ut forbehandling med enzymet protease 1.

Et blokkeringsstrinn med peroxidase benyttes før eller etter tilsats av primærantistoff. Det er viktig å blokkere en eventuell endogen peroxidaseaktivitet i vevet. Dersom det finnes peroxidase i vevet fra før av vil disse enzymene kunne produsere falske-positive signaler som interferer med signalene fra den immunhistokjemiske fargingen. Dette vil ses som en brun bakgrunnsfarge i vevet. Det er vanlig å benytte hydrogenperoxid (H_2O_2) som blokkeringsreagens for å forhindre denne typen

bakgrunnsfarging. Ved å forbehandle vevet med tilstrekkelige mengder hydrogenperoxid, vil dette resultere i en irreversibel inaktivering av endogen peroxidase som finnes i visse celler og vev. Eksempler på celler som inneholder peroxidase er granulocytter, erytrocytter og hepatocytter (46) (47). I dette prosjektet ble blokkeringstrinnet med peroxidase utført før tilsats av primærantistoffet.

2.7.3. Primærantistoff

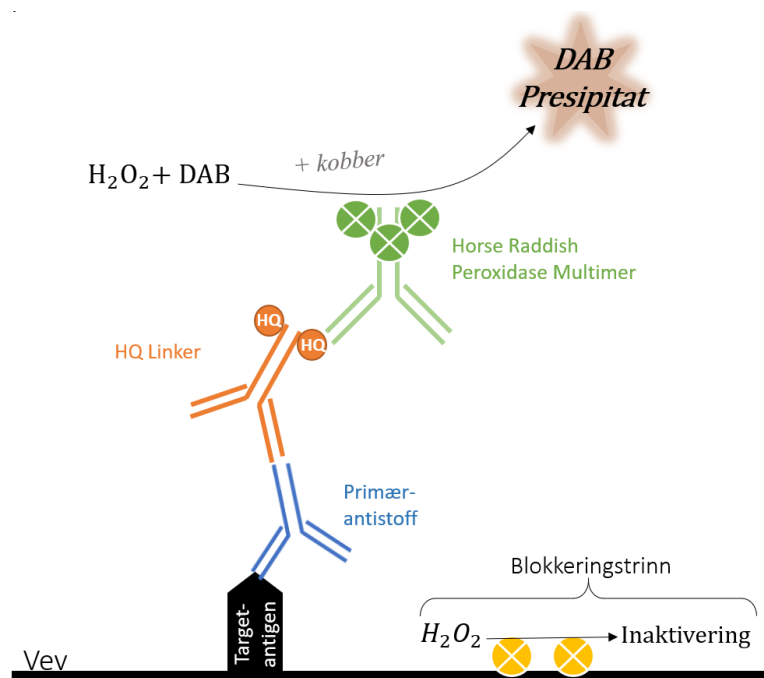
Primærantistoffet er det antistoffet som benyttes for å detektere de ønskelige strukturer i vevet før visualiseringsprosessen. I dette prosjektet benyttes anti-Ki67 og anti-p16^{INK4a}. Begge antistoffene er produsert i mus. Antistoffene er monoklonale, som vil si at de er produsert av identiske celler fra samme klon. Monoklonale antistoff vil gjenkjenne kun én bestemt epitop på antigenene, og er dermed mer spesifikke enn polyklonale antistoff. Derfor benyttes oftest monoklonale antistoff i immunhistokjemisk farging. Da unngås kryssreaktivitet og bakgrunnsstøy minskes (46) (47).

I dette prosjektet ble anti-p16^{INK4a} manuelt titrert på preparatene. Dette ble gjort siden antistoffet er under utprøving og dermed ikke overført til egnede beholdere for instrumentet. Anti-Ki67 er allerede i bruk ved avdelingen der det finnes på dispenser som settes på Benchmark Ultra. Dermed påføres dette automatisk i analysen.

2.7.4. Deteksjon av primærantistoff

OptiView DAB IHC deteksjonskit benyttes for å påvise anti-p16^{INK4a} som har bundet seg til vevet i enkeltfargeprotokollen. Deteksjonskitet benyttes også til påvisning av anti-Ki67 i dobbeltfargeprotokollen. Når en antigen-antistoff binding oppstår må dette visualiseres på en måte som danner et farget produkt observerbart i lysmikroskop. Deteksjonskitet benytter en indirekte metode til å påvise primærantistoff fra kanin og mus der det dannes en brunfarget utfelling.

Etter inkubasjon med primærantistoff tilsettes sekundærantistoff merket med HQ-molekyler. Dette sekundærantistoffet kalles en HQ linker og vil bindes til primærantistoffet. HQ-molekylene har høy affinitet til tertiærantistoffet HRP Multimer. HRP Multimer vil dermed binde seg til HQ-molekylene. Tertiærantistoffet er merket med enzymet Horseradish Peroxidase (HRP) som katalyserer reaksjonen der det dannes et brunt utfellingsprodukt. Fargeutviklingen foregår ved at 3,3'-diaminobenzidin tetrahydroklorid (DAB), i kombinasjon med kobber og H₂O₂, danner en brunfarget utfelling ved at H₂O₂ oksiderer DAB. Reaksjonsprinsippet er illustrert i figur 9 på neste side. Kobber vil fungere som en forsterker av reaksjonsproduktet. Kobber reagerer med det oksiderte produktet av DAB og dette vil gjøre brunfargen som oppstår tydeligere. Ved å benytte et lysmikroskop kan cellene som uttrykker proteinet p16^{INK4a} observeres ved at de har fått en karakteristisk brun farge (47) (56).

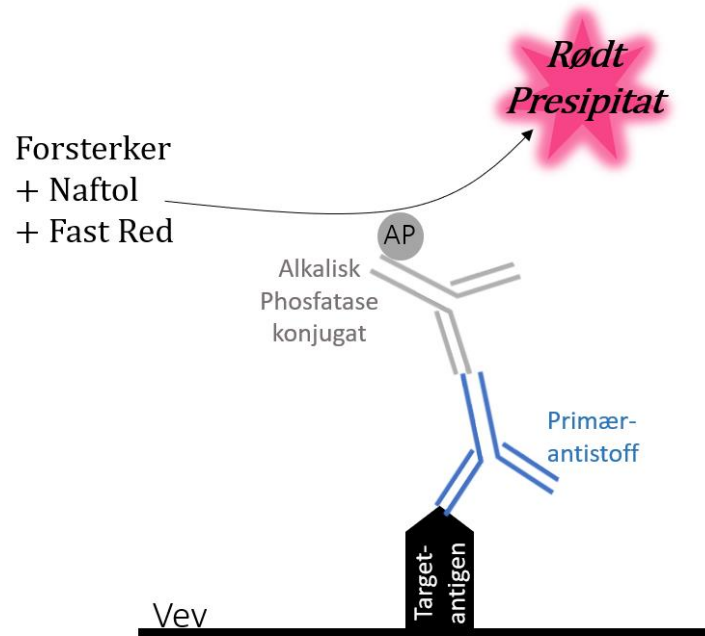


Figur 9: Illustrasjon av prinsippet for OptiView DAB deteksjonskit. Illustrert av medforfatter i denne oppgaven.

UltraView Universal AP Red Detection Kit benyttes sammen med OptiView DAB Detection Kit i en dobbeltfarging av Ki67/p16. Anti-Ki67 vil først synliggjøres med DAB-deteksjon. Videre ble snittene vasket slik at brun overskuddsfarge skylles bort. Snittene gikk deretter gjennom en koking der de varmes opp til 90°C. Dette gjøres for å denaturere strukturer som neste primærantistoff kan binde seg uspesifikt til. Deretter ble anti-p16^{INK4a} detektert ved hjelp av UltraView AP Red deteksjonskit. Deteksjonskitet benytter, på samme måte som OptiView DAB, en indirekte metode til å påvise primærantistoff fra mus og kanin der det dannes en rød utfelling.

Etter inkubasjon med anti-p16^{INK4a} tilsettes sekundærantistoff som er merket med enzymet alkalisk fosfatase. Enzymet katalyserer reaksjonen der det dannes et rødt utfellingsprodukt (60).

Fargeutviklingen foregår ved at substratet Naphthol hydrolyseres til phenolkomponenter som vil binde seg til et rødt kromogen (46). Reaksjonsprinsippet er illustrert i figur 10 på neste side. Fargen kan observeres ved hjelp av lysmikroskopi (60).



Figur 10: Illustrasjon av reaksjonsprinsippet for UltraView AP Red deteksjonskit. Illustrert av medforfatter i denne oppgaven.

Det ble inkludert et amplifiseringstrinn sammen med UltraView AP Red deteksjonskit i en av protokollene for dobbeltfargen. Dette ble gjort for å undersøke om fargeintensiteten kunne forbedres. Amplifikasjonskitet består av anti-mus-IgG fra mus og anti-kanin-IgG fra mus. Siden anti-p16^{INK4a} er fra mus vil anti-mus-IgG binde seg til dette. Antall antistoff bundet til antigenstedet vil dermed øke og som følge av dette vil også fargeintensiteten øke (61).

2.7.5. Kontrastfarging med hematoxylin

Etter den immunhistokjemiske fargingen må vevet kontrastfarges. Dette ble gjort for å få frem strukturer som cellekjerner og cytoplasma, slik at patologen kan orientere seg i vevet. Uten kontrastfarging ville det vært vanskelig å se hvilke strukturer, for eksempel overflateepitel, som har blitt farget med den immunhistokjemiske metoden. Snittene ble plassert i et fargekar med hematoxylinløsning i 20 sekunder. Det ble benyttet hematoxylinløsning med pH 2,05. Etter dette ble snittene satt til blåning i 3 min i lunkent vann. Dette øker pH og hematoxylin endrer farge fra rødlig til blålilla.

2.7.6. Dehydrering og infiltrering med Xylen

Snittene ble dehydrert gjennom en rekke med økende alkoholprosent: 80% - 96% - absolutt alkohol - absolutt alkohol (etanol). Dette gjøres siden monteringsmiddelet, Pertex, er hydrofobt og ikke

blandbart med vann. Etter dehydrering ble snittene plassert i 3 kar Xylen som er løselig med monteringsmiddelet. Henholdsvis 1 min i hvert av de tre karene.

2.7.7. Montering

Montering ble gjort ved hjelp av en automatisk oppleggsmaskin; Thermo scientific Cover Tech. Preparatene ble så tørket i varmeskap i 20 min. Deretter ble de skannet og digitalisert slik at de er tilgjengelige i laboratoriets datasystem.

2.8 Protokoller benyttet i utprøvingen

Enkeltfargeprotokoll for p16:

Protokollene ble utformet i henhold til laboratoriets prosedyre. I utformingen av protokollene ble det tatt utgangspunkt i produsentens anbefalinger gitt i pakningsvedlegget til antistoffene.

Amplifikasjonstrinn ble ikke benyttet for noen av protokollene, da dette ikke var anbefalt. I avgjørelsen av hvilke parametere som testes ut ble også erfaringen til de ansatte på laboratoriet vektlagt. Dermed ble fokuset i utprøvingen på de ulike forbehandlingsmetodene som var tilgjengelig. Utformingen av protokollene ble gjort i samarbeid med veileder. Anti-p16^{INK4a} som ble testet ut er et «ready to use» -antistoff og det ble derfor ikke testet ut ulike fortyninger. Tabell 3 viser de ulike enkeltfargeprotokoller for p16 som ble testet ut.

Tabell 3: Tabellen viser en oversikt over protokoller som er blitt testet ut i optimaliseringen av enkeltfargeprotokollen med anti-p16^{INK4a} klon BC42 fra Biocare Medical.

P16-protokoller				
Protokollnavn	HIER	Tid antistoff	Deteksjonskit	Enzym
A	CC1 32 min	12 min	OptiView DAB	Nei
B	CC1 48 min	12 min	OptiView DAB	Nei
C	CC1 64 min	12 min	OptiView DAB	Nei
D	CC2 48 min	12 min	OptiView DAB	Nei
E	Nei	12 min	OptiView DAB	Protease 1

Dobbeltfargeprotokoll for Ki67 og p16:

I utformingen av Ki67/p16-dobbeltfargeprotokollene ble det lagt vekt på at samspillet mellom de to fargene skulle fungere optimalt. Det ble derfor testet ut en protokoll med amplifiseringstrinn for deteksjon av p16^{INK4a}. Dette trinnet skulle bidra til å øke sensitiviteten til analysen. I utforming av protokollene ble det tatt utgangspunkt i de funn som ble gjort ved optimalisering av p16-enkeltfargeprotokollen. Tabell 4 viser de to Ki67/p16-dobbeltfargeprotokollene som ble utprøvd under verifiseringen.

Tabell 4: Tabellen viser en oversikt over de ulike protokoller som er blitt testet ut i optimaliseringen av Ki67/p16-dobbeltfargeprotokollen som benytter anti-Ki67 MIB1 fra Dako sammen med anti-p16^{INK4a} klon BC42 fra Biocare Medical.

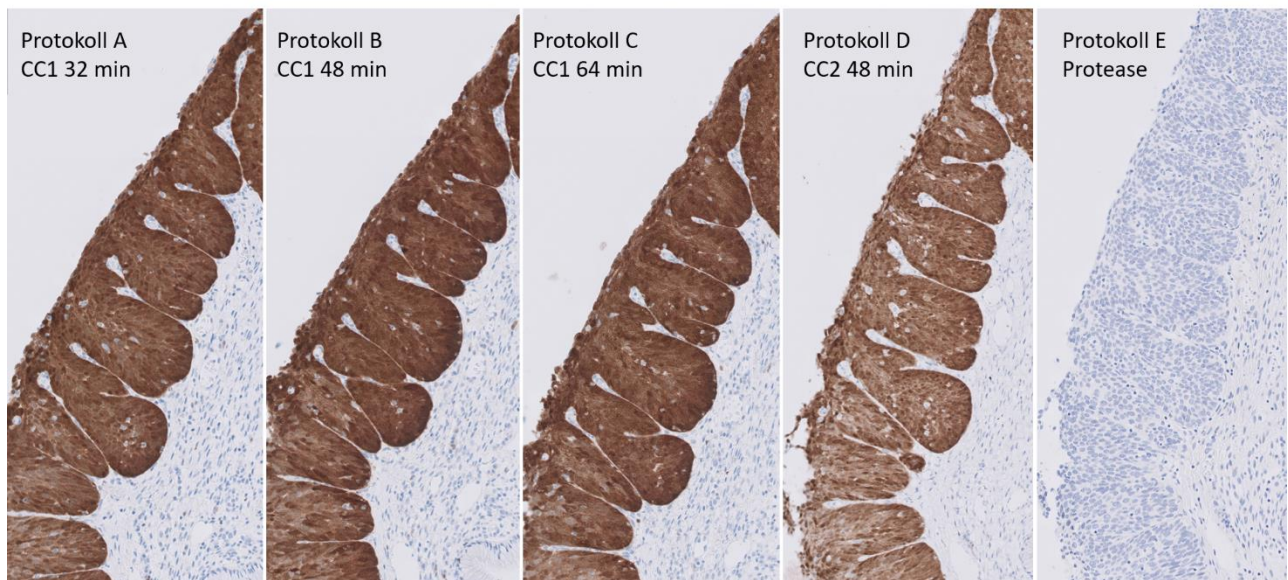
Ki67/p16 -protokoller					
Protokollnavn	HIER	Tid antistoff	Deteksjonskit	AMP	Fortynning
F	CC1 48 min for begge	32 min Ki67 12 min p16	OptiView DAB (Ki67) UltraView AP Red (p16)	Nei	1:200 Ki67 RTU p16
G	CC1 48 min for begge	32 min Ki67 12 min p16	OptiView DAB (Ki67) UltraView AP Red (p16)	8 min Kit for p16	1:200 Ki67 RTU p16

3. RESULTATER OG DISKUSJON

3.1 P16 enkeltfargeprotokoll

3.1.1. Utprøving av enkeltfargeprotokoller

Til første del av verifisering, ble det utført en optimalisering og utprøving av fargeprotokoller på dysplastisk vev fra cervix. Figur 11 nedenfor viser resultatet av alle de ulike enkeltfargeprotokollene som ble testet ut med anti-p16^{INK4a} klon BC42 fra Biocare Medical. Protokoll A, som benytter CC1 i 32 min i HIER-behandlingen gav god farge. Dog er fargeintensiteten noe svakere enn for protokoll B, som er anbefalt fra antistoffets produsent. Kontrasten for protokoll A sammenliknet med protokoll B er også noe svakere. Protokoll B gav farging med god kontrast og fargeintensitet. Protokoll C gav god farging, men med lang HIER-behandling risikeres skade på ømfintlig vev, og protokollen kan dermed være uegnet for andre vevstyper. Av størst relevans er i dette tilfellet hudbiopsier til diagnostikk av melanomer. Dermed ble protokoll C utelukket. Protokoll D, som benytter CC2-buffer i HIER-behandlingen, påvirket kjernemorfologien. Dermed ble også den uegnet. Det er tydelig at fargeprotokollen som benyttet ezymbehandling med protease 1, protokoll E, ikke er egnet til formålet da resultatet ble en falsk negativ farging.



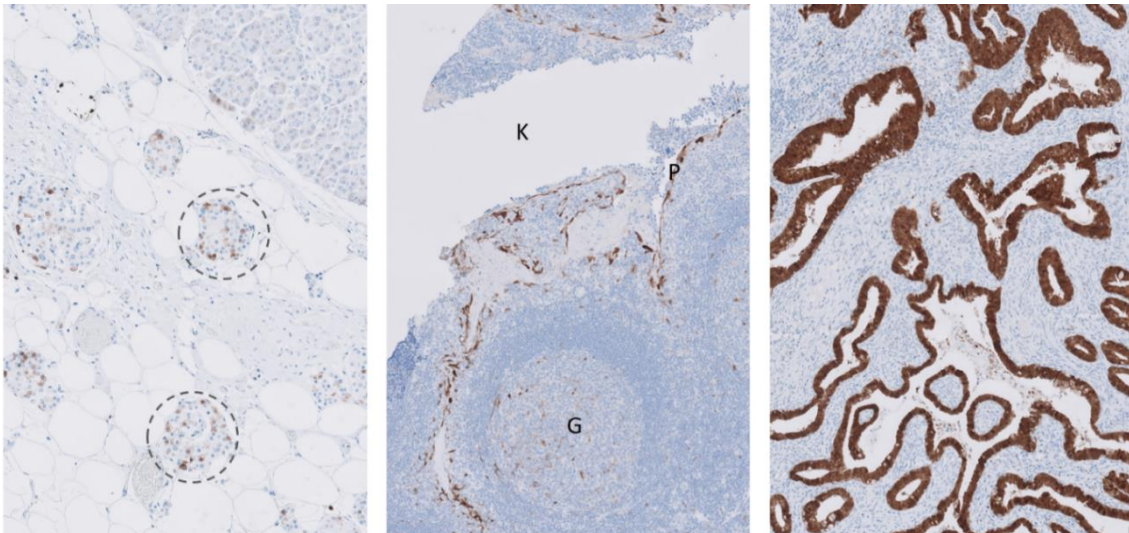
Figur 11: Figuren viser resultatene fra de ulike protokoller som ble utprøvd i optimaliseringen av p16-enkeltfargeprotokollen. Protokoll B ble valgt. Protokollene er testet på prøve nr. 1, et cervix-kon med dysplasi CIN II/III. Forstørrelsen på bildene er 20x.

3.1.2. Endelig p16 protokoll

Etter utprøving av ulike protokoller ble den endelige protokollen for p16 bestemt og videre testet ut i verifiseringsprosessen. Protokollen som gav den mest optimale fargingen er protokoll B. Dette er produsentens anbefalte protokoll for antistoffet i bruk med OptiView DAB deteksjonskit på Benchmark Ultra. Denne protokollen har en forbehandlingstid på 48 min med HIER i CC1-løsning, peroxidase inhibitor før primærantistoff og antistoffinkubering på 12 min.

3.1.3. Kontroller for endelig p16 protokoll

Kontrollene som ble farget med den valgte enkeltfargeprotokollen for p16 viste alle farging i de forventet positive strukturene. Uttrykk av p16^{INK4a} vises som brun farge. Resultatene for kontrollene er vist i figur 12 nedenfor.



Figur 12: Figuren viser kontrollresultat fra p16-enkeltfargeprotokollen. Fra venstre: 1. Pancreaskontroll med p16^{INK4a}-uttrykk i de langerhanske øyene, der enkelte er markert med sirkler). 2. Tonsillekontroll der p16^{INK4a} uttrykkes i de dendritiske cellene i germinalsentrene (G), samt i plateepitelet (P) i overflaten av krypten (K). 3. Cervixkontroll med uttrykk av p16^{INK4a} både i cytoplasma og kjerne av lesjonene i overflateepitelet. Forstørrelse 10x.

I pancreaskontrollen forventes et varierende uttrykk av p16^{INK4a} i øycellene. Dette stemmer overens med oppnådd fargerresultat. Enkelte celler i de langerhanske øyene er farget brune og dette samsvarer med et varierende uttrykk av p16^{INK4a}. Resterende vev og eksokrine celler er ikke farget.

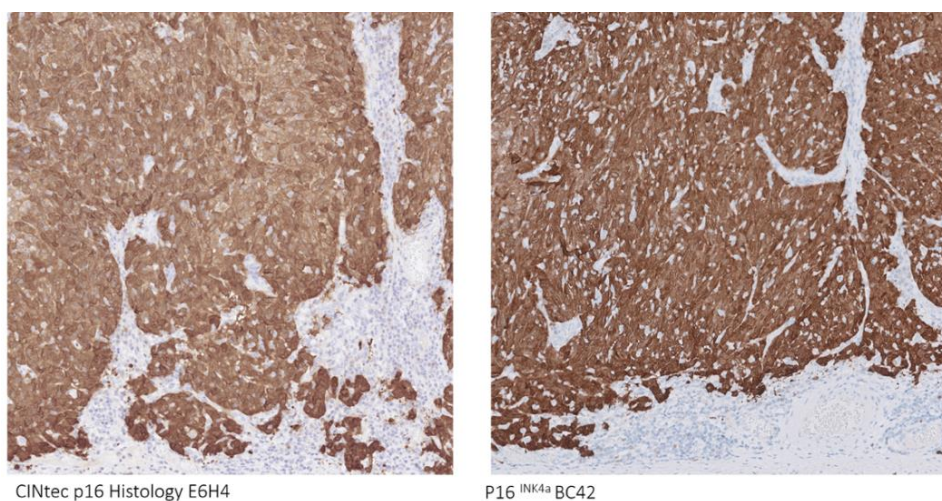
Tonsillekontrollen viser et forventet fargerresultat der uttrykk av p16^{INK4a} er farget brunt. Follikulære dendritiske celler i germinalsentrene er farget lys brunt, hvilket samsvarer med et svakt uttrykk av p16^{INK4a}. I overflaten av kryptene er plateepitelet farget mørk brunt som tilsvarer et sterkt uttrykk av p16^{INK4a}. Cervixkontrollen viser et sterkt uttrykk av p16^{INK4a} i overflateepitel med CIN II/III lesjoner. Kontrollen viser en sterk brun farge både i cellekjerne og cytoplasma som forventet. Resterende vev er ikke farget.

Totalt sett viser fargingen av kontrollene til en fargeprotokoll som er godt egnet i bruk. Kontrollenes strukturer med høyt p16^{INK4a}-uttrykk har alle fått en kraftig farging med god kontrast. At også svakt uttrykk av p16^{INK4a} er synlig i tonsillekontrollen tyder på at protokollen har god sensitivitet. Det var svært lite uspesifikk bakgrunnsfarging, noe som tyder på at antistoffet har god spesifisitet i denne protokollen. Med bakgrunn i dette vurderes den tekniske kvaliteten til fargingen som god.

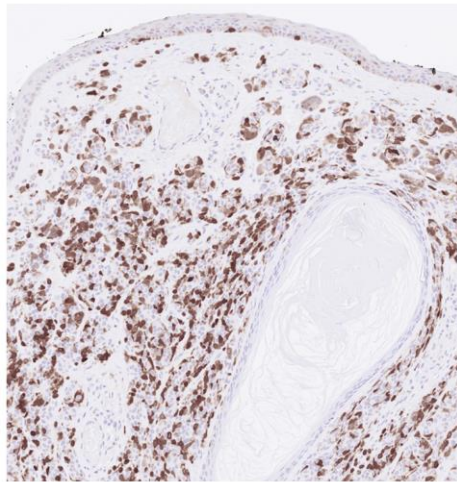
3.1.4. Sammenlikning av fargekvalitet med nåværende enkeltfargeprotokoll

Et av hovedformålene med dette bachelorprosjektet var å undersøke hvorvidt antistoffet CINtec p16^{INK4a} fra Ventana/Roche i nåværende fargeprotokoll kan erstattes av p16^{INK4a} fra Biocare Medical med hensyn til fargekvalitet. For å vurdere dette er det hentet frem bilder fra et representativt utvalg fargede prøver. Bildene av prøvene er vist i figur 13-16 sidestilt med bilde av samme prøve farget med nåværende fargeprotokoll.

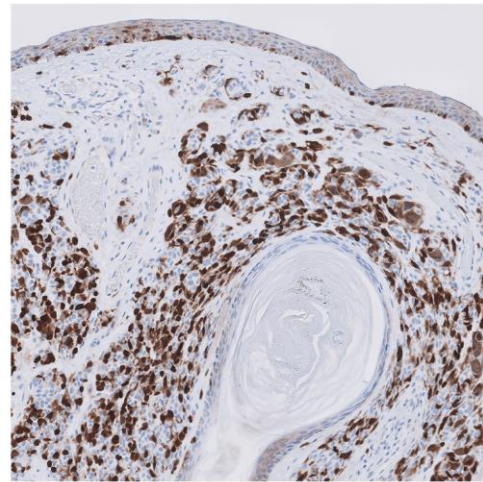
Prøve nummer 3, vist i figur 13, viser en høyere fargeintensitet når p16^{INK4a} BC42 benyttes framfor CINtec p16^{INK4a} Histology E6H4. Brunfargen er for flere av prøvene tydeligere ved bruk av det nye antistoffet. Strukturene i vevet skilles ikke like godt og flyter mer over i hverandre ved bruk av CINtec p16^{INK4a} Histology E6H4. Kontrasten er altså noe dårligere. Prøve nummer 8, vist i figur 14, viser samme fargerresultat som prøve nummer 3: en skarpere fargeintensitet ved bruk av det nye antistoffet. Dette tyder på at sensitiviteten til den nye protokollen er noe bedre enn for den nåværende protokollen, da denne gir svakere farge ved lavt og middels høyt uttrykk av p16^{INK4a}. Prøve nummer 6, vist i figur 15, viser et tilnærmet likt fargerresultat ved bruk av de to antistoffene. Her ses imidlertid en tydelig forskjell på fargerresultatet for kontrastfargingen med hematoxylin. Prøve nummer 12 en cervix-lesjon med høygradig dysplasi og kraftig uttrykk av p16^{INK4a}, vist i figur 16, har et tilnærmet likt fargerresultat som prøve nummer 6. Fargekvaliteten er like sterk og tydelig ved bruk av begge de to antistoffene.



Figur 13:Fargerresultat for CINtec p16 Histology E6H4 fra Ventana/Roche (venstre) og p16^{INK4a} BC42 fra Biocare Medical (høyre) på prøve nummer 3, en tonsille med plateepitelkarsinom. Forstørrelse 10x.

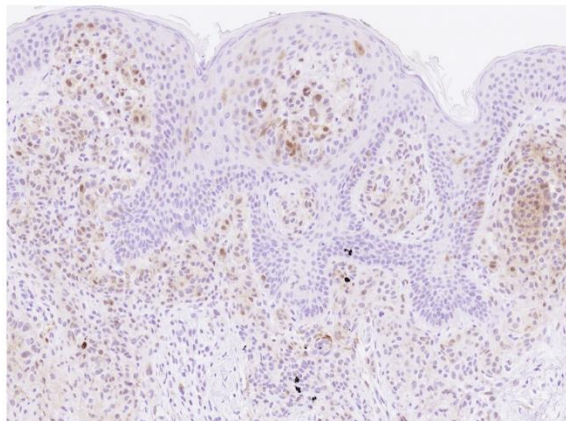


CINtec p16 Histology E6H4

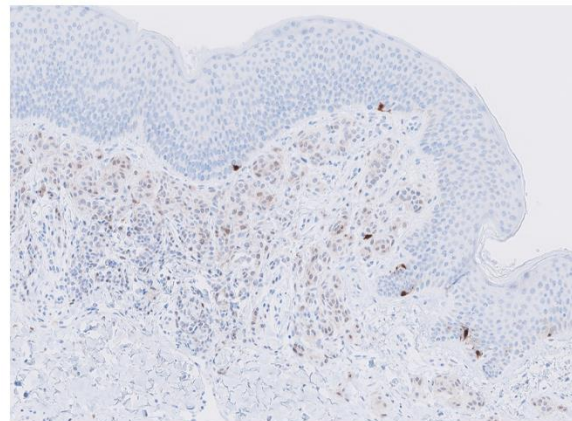


P16^{INK4a} BC42

Figur 14: Fargerresultat for CINtec p16 Histology E6H4 fra Ventana/Roche (venstre) og p16^{INK4a} BC42 fra Biocare Medical (høyre) på prøve nummer 8, en godartet nevus med normalt uttrykk av p16. Forstørrelse 10x.

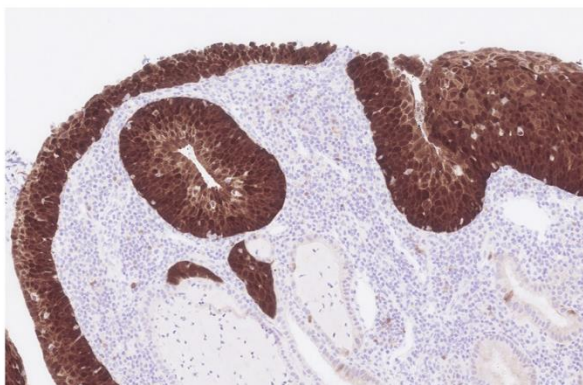


CINtec p16 Histology E6H4

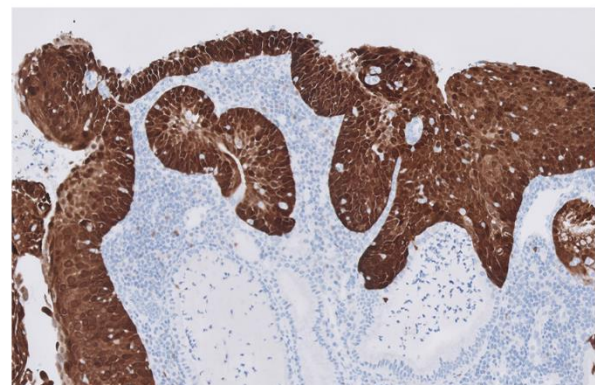


P16^{INK4a} BC42

Figur 15: Fargerresultat for CINtec p16 Histology E6H4 fra Ventana/Roche (venstre) og p16^{INK4a} BC42 fra Biocare Medical (høyre) på prøve nummer 6, et malignt melanom med bortfall av normalt p16 uttrykk, hvilket er typisk for melanom. Forstørrelse 10x.



CINtec p16 Histology E6H4



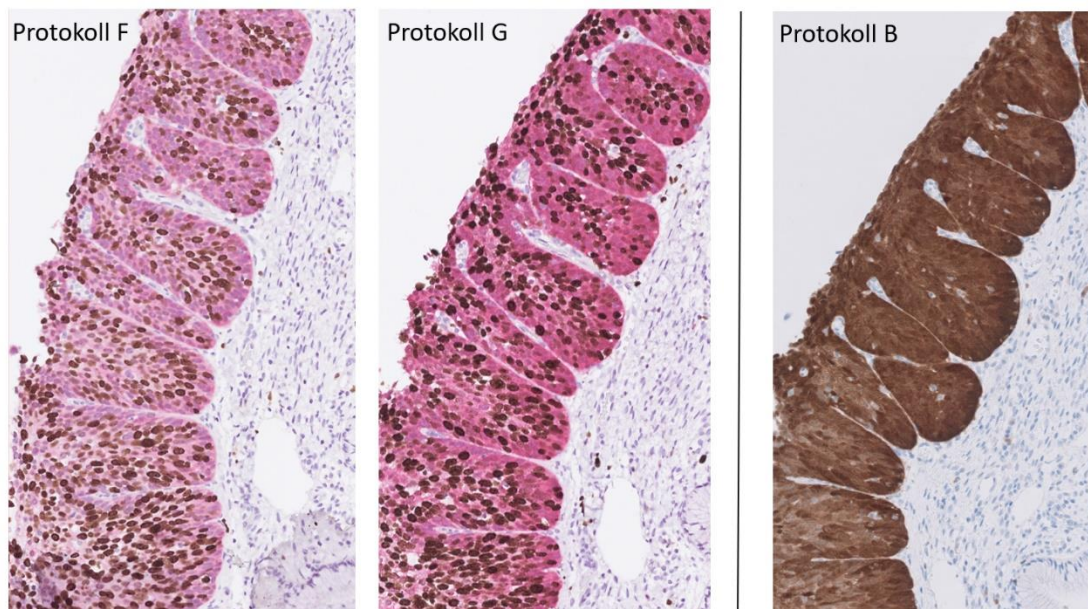
P16^{INK4a} BC42

Figur 16: Fargerresultat for p16^{INK4a} BC42 fra Biocare Medical og CINtec p16 Histology E6H4 fra Ventana/Roche på prøve nummer 12, et cervix-kon med dysplasi grad CIN III. Forstørrelse 10x.

3.2 Ki67/p16-dobbeltfargeprotokoll

3.2.1. Utprøving av dobbeltfargeprotokoller

Figur 17 nedenfor viser resultatet av de to dobbeltfargeprotokollene som ble testet ut. Til venstre på figuren ses resultatet av protokoll F, som ikke inneholder et amplifiseringstrinn. Fargeintensiteten er noe svak. Midtstilt i figur 17 ses resultatet av protokoll G. Denne dobbeltfargeprotokollen består av et amplifiseringstrinn som øker fargeintensiteten for UltraView AP Red deteksjonskitet. Kontrastfargen for de to dobbeltfargeprotokollene er tilnærmet lik. Til høyre i figur 17 ses den valgte p16-enkeltfargeprotokollen, protokoll B, til sammenlikning i vurderingen av protokoll F og G.



Figur 17: Figuren viser resultatene fra utprøving av Ki67/p16-dobbeltfargeprotokoll, samt p16-enkeltfargeprotokoll. Fra venstre: 1. Protokoll F som ikke inneholder amplifiseringstrinn. 2. Protokoll G som inneholder amplifiseringstrinn. 3. Den best egnede protokollen for p16-enkeltfarge, protokoll B. Fargingen er gjort på prøve nummer 1, et cervix-kon med dysplasi CIN II/III. Forstørrelse 20x.

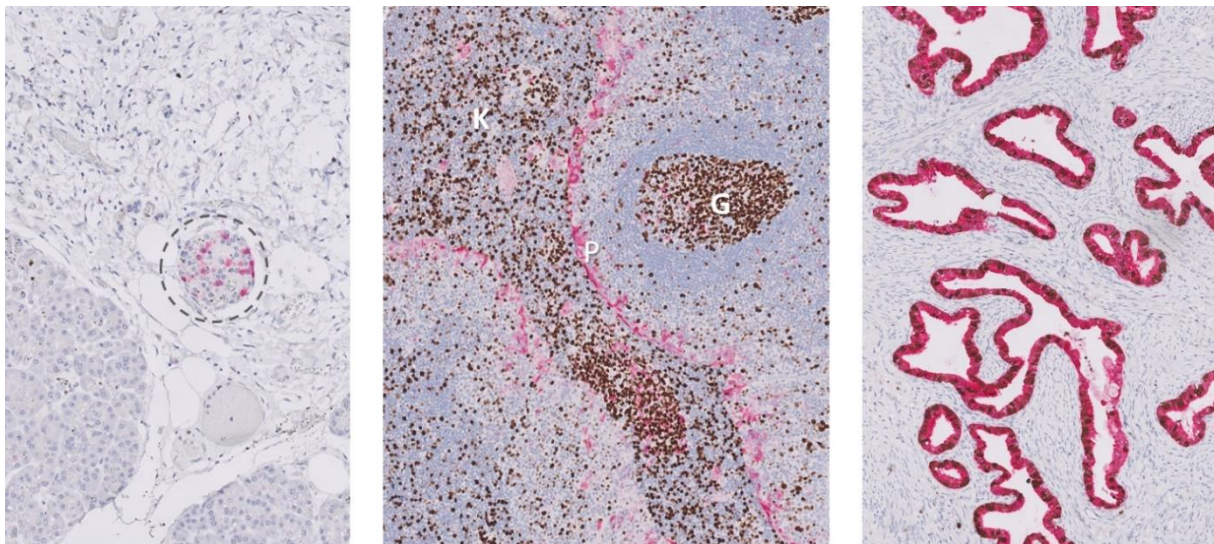
Ved sammenlikning med valgt p16-enkeltfargeprotokoll, vist i figur 17, er det tydelig at Ki67/p16-dobbeltfargeprotokollen med amplifisering gir et fargerresultat mest likt den valgte p16-enkeltfargeprotokollen. Den rosa fargen i dobbeltfargeprotokollen med amplifisering ligger nærmere intensiteten til den brune fargen i enkeltfargeprotokollen vist i figur 17. Det er også tydelig at de samme strukturene er farget. Dermed er Ki67/p16-dobbeltfargeprotokollen med amplifisering best egnet, og prøves ut på flere vevstyper.

3.2.2. Endelig Ki67/p16 dobbeltfargeprotokoll

Det ble testet ut to Ki67/p16 dobbeltfargeprotokoller i optimaliseringen. Dobbeltfargeprotokoll G med amplifiseringstrinn viser seg å være best egnet. Denne dobbeltfargeprotokollen har en forbehandlingstid på 48 min med HIER i CC1-løsning og en antistoffinkubering på 32 min og 12 min for henholdsvis anti-Ki67 og anti-p16^{INK4a}. OptiView DAB og UltraView AP Red deteksjonskit benyttes for visualisering av henholdsvis anti-Ki67 og anti-p16^{INK4a}. Et amplifiseringstrinn på 8 minutter er inkludert i visualiseringen av anti-p16^{INK4a} med UltraView AP Red deteksjonskit.

3.2.3. Kontroller for dobbeltfargeprotokoll

Kontrollene farget med den valgte Ki67/p16-dobbeltfargeprotokollen viste alle farging i de forventede positive strukturene. P16^{INK4a} positive strukturer vises som rosa-rød farge og Ki67 positive strukturer som brun farge. Resultatet av kontrollenes farging sees i figur 18.



Figur 18: Kontroller for dobbeltfarging med p16^{INK4a} BC42 fra Biocare Medical og Ki67 MIB 1 fra DAKO. Fra venstre: 1. Pancreaskontroll med uttrykk av p16^{INK4a}, farget rosa, i de langerhanske øyene (markert med sirkel). 2. Tonsillekontroll med uttrykk av p16^{INK4a} i germinalsentrene (G) og plateepitel (P) i kryptene (K). Uttrykk av Ki67, farget brunt, i basalt sylinderepitel og i B-celler i germinalsentrene (G). 3. Cervix CIN II/III med uttrykk av p16^{INK4a} og Ki67 i lesjoner i overflateepitel. Forstørrelse 10x.

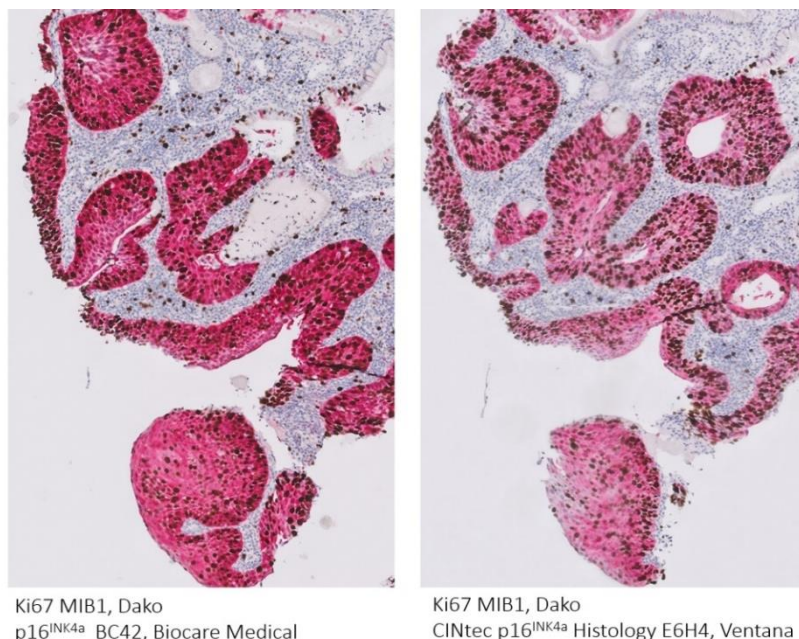
I pancreaskontrollen forventes en tilnærmet negativ farging med Ki67 og et varierende uttrykk av p16^{INK4a} i øycellene. Dette stemmer overens med oppnådd fargerresultat. Enkelte celler i de langerhanske øyene er farget rosa og dette samsvarer med et varierende uttrykk av p16^{INK4a}. Uttrykk av Ki67 er omtrent fraværende, hvilket er forventet. Tonsillekontrollen viser et fargerresultat der follikulære dendrittiske celler i germinalsentrene er farget lys rosa, hvilket samsvarer med et svakt uttrykk av p16^{INK4a}. I overflaten av kryptene er plateepitelet farget mørk rosa som tilsvarende et sterkt uttrykk av p16^{INK4a}. Basalt sylinderepitel og B-celler i germinalsentrene er farget brunt som samsvarer

med uttrykk av Ki67. Cervixkontrollen viser et sterkt uttrykk av p16^{INK4a} i overflateepitel med CIN II/III lesjoner. Samtidig er kjerner i dysplastiske plateepitelceller farget brune for Ki67.

Sammenlagt viser alle kontrollene farging for p16^{INK4a} og Ki67 i de forventede strukturene. Uspesifikk bakgrunnsfarging er minimal, hvilket tyder på god spesifisitet for antistoffene i protokollen. At brun farge for Ki67 er tydelig avgrenset til kun cellekjernene underbygger dette. Synlig svak rosa farge i germinalsentrene på tonsillekontrollen tilsier at sensitiviteten til protokollen er god. Med bakgrunn i dette vurderes den tekniske kvaliteten til fargingen som god.

3.2.4. Sammenlikning av fargekvalitet med nåværende dobbeltfargeprotokoll

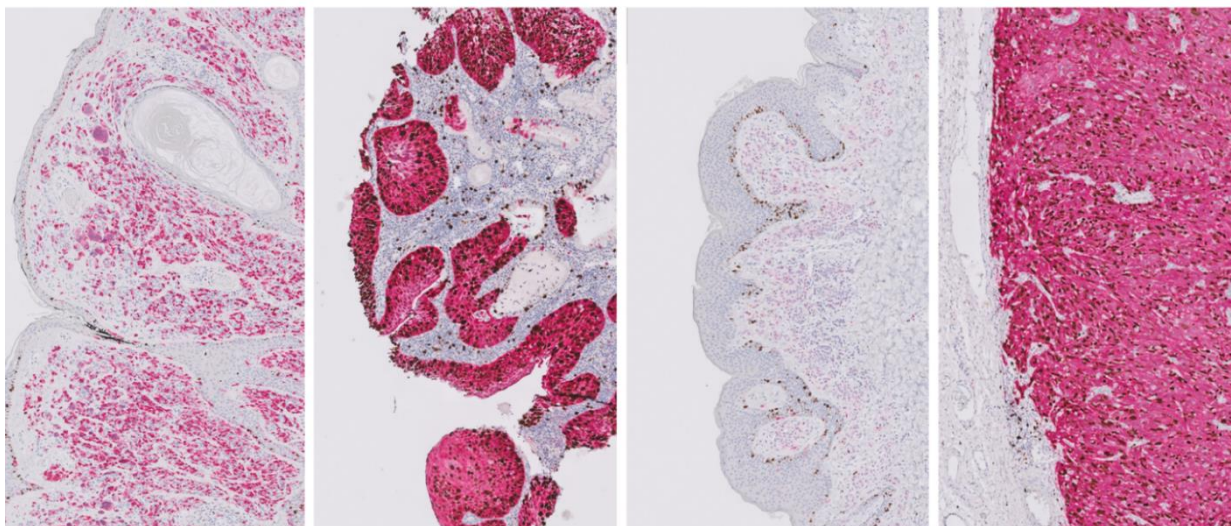
Til sammenlikning av fargekvalitet på dobbeltfargeprotokollene ble det farget ett snitt med nåværende dobbeltfargeprotokoll. Vevstypen som ble vakt ut til formålet er et kon fra cervix med dysplasi CIN III. Årsaken til dette er hensynet til ressursbesparelser for verifiseringen av protokollen. I denne dobbeltfargeprotokollen synes p16^{INK4a} positive strukturer som rød-rosa farge, ettersom det er benyttet UltraView AP Red deteksjonskit for anti-p16^{INK4a}. Som vist i figur 19 nedenfor resulterer også her bruken av anti-p16^{INK4a} BC42 fra Biocare Medical i kraftigere farge sammenliknet med nåværende fargeprotokoll som benytter anti-p16^{INK4a} klon E6H4 fra Ventana. Kontrasten i fargingen er god. Alle strukturer kommer tydelig frem, deriblant kjernefarging med Ki67 som enkelt kan skilles fra den rød-rosa fargen for p16^{INK4a}. Det nye anti-p16^{INK4a}, klon BC42 fra Biocare Medical, fungerer godt i dobbeltfargeprotokollen med Ki67 MIB1 fra Dako.



Figur 19: Figuren viser Ki67/p16-dobbeltfargeprotokollen med klon anti-Ki67 klon MIB1 fra Dako og anti-p16^{INK4a} klon BC42 fra Biocare Medical til venstre. Den nåværende Ki67/p16-dobbeltfargeprotokollen som benytter anti-Ki67 klon MIB1 fra Dako og anti-p16^{INK4a} CINtec Histology E6H4 fra Ventana/Roche til høyre. Vevstype: Cervix kon med dysplasi CIN III, prøve nr. 12. Forstørrelse 10x.

3.2.5. Resultater for Ki67/p16^{INK4a} dobbeltfargeprotokoll

Figur 20 viser den endelige Ki67/p16-dobbeltfargeprotokollen med p16^{INK4a} BC42 fra Biocare Medical testet ut på ulike typer vev. De fire prøvene har alle oppnådd et fargerresultat av god kvalitet. I alle prøvene kommer den brune kjernefargen til Ki67 tydelig fram i den rosa fargingen for p16^{INK4a}. Fargerresultatet viser at den valgte dobbeltfargeprotokollen, protokoll G, egner seg godt på vevstypene godartet nevus, cervix CIN II/III, malignt melanom og tonsille.



Figur 20: Figuren viser den endelige Ki67/p16-dobbeltfargeprotokollen i ulike vevstyper. Vevstyper fra venstre: 1. Prøve nummer 8, godartet nevus. 2. Prøve nummer 12, cervix-kon med dysplasi CIN III. 3. Prøve nummer 6, malignt melanom med bortfall av p16^{INK4a}. 4. Prøve nummer 3, tonsille med plateepitelkarsinom. Forstørrelse 10x.

3.3 Patologenes vurdering av fargekvalitet

Etter farging ble preparatene gitt videre til tre patologer, hver med sin spesialitet, for vurdering av fargekvalitet. Patologen med ansvar for prøvene av tonsille og munnhule vurderer fargekvaliteten til god. Fargerresultatet med det nye anti-p16^{INK4a} ble vurdert som mye bedre enn den nåværende fargingen. Patologen med spesialitet innen hud anser også fargekvaliteten til å være god, men sammenliknet med nåværende protokoll ble det ikke vurdert å være noen forskjell i kvalitet. Prøvene fra cervix vurderes av patolog med spesialisering innenfor dette fagfeltet. Fargekvaliteten ble også her vurdert som god, uten noen stor forskjell fra nåværende protokoll. Totalt sett anses fargekvaliteten på preparatene som svært god. Med hensyn til fargekvaliteten vil det være gunstig å bytte antistoff fra CINtec Histology anti-p16^{INK4a} E6H4 fra Ventana til anti-p16^{INK4a} BC42 fra Biocare Medical.

3.4 Kostnadsvurdering av P16^{INK4a} klon BC42

Et av hovedformålene med dette bachelorprosjektet var å gjøre en kostnadsvurdering av det nye anti-p16^{INK4a} klon BC42 fra Biocare Medical for å undersøke muligheten for kostnadsbesparelser for de aktuelle analysene. I dag benyttes antistoffet CINtec p16^{INK4a} Histology E6H4 fra Ventana/Roche, som også leverer reagenser og instrumenter til det automatiserte fargesystemet. Gjennomsnittlig farges det omtrent 1400 snitt for p16^{INK4a} alene og 2300 snitt med dobbeltfargen Ki67/p16 årlig ved Enhet for immunhistokjemi. Et bytte til et rimeligere alternativ gir derfor store utslag. Kostnaden for de ulike fargeprotokoller pr. snitt som farges er gitt i tabell 5. Prisene i tabellen er regnet ut med bakgrunn i prisinformasjonen gitt i *Vedlegg 1: «Prisoversikt for reagenser»* til denne rapporten.

Under arbeidet med rapporten kom Biocare Medical med et tilbud for anti-p16^{INK4a} BC42 på 25 mL beholdere. Dette til forskjell fra 6 mL-beholdere som ble benyttet i utprøvingen. Å kjøpe antistoffet i større kvanta er billigere pr. snitt og beregningene er derfor basert på dette nye tilbudet.

Tabell 5: Tabellen viser en oversikt over de ulike fargeprotokollene for p16 og Ki67/p16, samt deres pris pr. snitt som farges. Prisene som oppgis er eksklusive merverdiavgift.

Protokolltype	Primærantistoff	Deteksjonskit	Pris pr. snitt i NOK
Enkeltfargeprotokoll p16	CINtec p16 ^{INK4a} Histology E6H4, Ventana/ Roche	OptiView DAB IHC, Ventana/Roche	147.30 kr
Enkeltfargeprotokoll p16	P16 ^{INK4a} BC42, Biocare Medical, 25 mL	OptiView DAB IHC, Ventana/Roche	121.44 kr
Dobbeltfargeprotokoll Ki67/p16	Ki67 MIB1, Dako/Agilent CINtec p16 ^{INK4a} Histology E6H4, Ventana/ Roche	OptiView DAB IHC, Ventana/Roche UltraView Universal AP Red, Ventana/Roche	205.21 kr
Dobbeltfargeprotokoll Ki67/p16	Ki67 MIB1, Dako/Agilent P16 ^{INK4a} BC42, Biocare Medical, 25 mL	OptiView DAB IHC, Ventana/Roche UltraView Universal AP Red, Ventana/Roche	179.35 kr

Beregnet besparelse pr. snitt ved bytte til anti-p16^{INK4a} BC42 med innkjøpsvolum på 25 mL blir 25.86 kr. Dette tilsvarer en årlig kostnadsbesparelse på 36 204 kroner (NOK) for p16-enkeltfarge, og 59 478 kroner (NOK) for dobbeltfarge med Ki67/p16. Sammenlagt vil bytte av primærantistoff mot p16^{INK4a}

til det rimeligste tilbudet fra Biocare Medical resultere i en kostnadsbesparelse på 95 682 kroner (NOK).

Større innkjøpsvolum for anti-p16^{INK4a} BC42 vil lette det praktiske arbeidet og minske svinn relatert til overføring av innkjøpt antistoff til beholderne som benyttes i det automatiserte systemet. Ettersom fargeprotokollene som benytter anti-p16^{INK4a} gjennomføres hyppig, er det ikke grunn til å tro at holdbarheten vil være en begrensende faktor med hensyn til innkjøpsvolum. Dermed er et bytte til p16^{INK4a} klon BC42 fra Biocare Medical kjøpt inn på 25mL-beholdere helt klart å foretrekke med hensyn til kostnaden av analysen.

3.5 Vurdering i henhold til IVDR

3.5.1. Enkeltfargeprotokoll for p16 med antistoff p16^{INK4a} BC42 fra Biocare Medical

Den endelige enkeltfargeprotokollen med anti-p16^{INK4a} BC42 fra Biocare Medical følger de betingelser som er anbefalt i pakningsvedlegget til antistoffet. I pakningsvedlegget til antistoffet er det anbefalt protokoll for farging med OptiView DAB deteksjonskit på Benchmark Ultra som inngår i Ventana-systemet. Det er dette systemet som benyttes på Avdeling for patologi. Dette betyr at produsenten har gjort nødvendige utprøvinger og har dokumentert antistoffets prestasjon i fargesystemet. I pakningsvedlegget til p16^{INK4a} BC42 fra Biocare Medical finnes også CE-merkingen. Denne merkingen tilsier at antistoffet er sertifisert til bruk i henhold til IVDR. Dette er forutsatt at det brukes etter produsentens anbefaling, hvilket er tilfellet for den aktuelle protokollen. Dermed er også bruken av dette antistoffet godkjent i henhold til IVDR, og det kreves ikke videre dokumentasjon fra laboratoriets side for å benytte dette i klinisk diagnostikk når regulativet trer i kraft. Nåværende enkeltfargeprotokoll som benytter antistoffet CINtec p16^{INK4a} Histology E6H4 fra Ventana/Roche vil trolig også godkjennes på denne måten, uten at det behøver å inngå i «In house»-unntaket. Dermed er det liten forskjell på dokumentasjonsarbeidet som må utføres for p16-enkeltfargeprotokollen før regulativet trer i kraft.

3.5.2. Dobbeltfargeprotokoll for Ki67/p16 med antistoff p16^{INK4a} fra Biocare Medical og Ki67 MIB1 fra Dako/Agilent

Alle reagenser og kit som inngår i denne dobbeltfargeprotokollen er CE-merket, men det finnes ingen dokumenterte anbefalinger for bruken av disse i Ki67/p16-dobbeltfargen. Reagensene som inngår

kommer også fra ulike produsenter: Antistoffene er fra Biocare Medical og Dako, mens deteksjonskit og fargesystemet kommer fra Ventana/Roche. Det er ingen anbefalinger i pakningsvedleggene til antistoffene som tilsier at de kan benyttes med de aktuelle deteksjonskitene i protokollen. Det er altså ikke mulig å benytte reagensene, som regnes som IVD-utstyr, i henhold til produsentenes anbefalinger. Dermed er ikke bruken av dem godkjent i henhold til IVDR. Dette medfører at laboratoriet må få denne analysen innunder «in house» unntaket innen 26. mai 2022 for at Ki67/p16-fargingen fortsatt kan være i deres repertoar av analysetilbud. Alternativet vil være å finne en kommersielt tilgjengelig erstatning. For at «in house»-unntaket skal kunne gjelde for Ki67/p16 dobbeltfargeprotokollen må en rekke krav oppfylles (52). Disse er beskrevet under artikkel 5 punkt 5 i IVDR og er som følger:

Punkt a) sier at metoden kun kan benyttes innenfor laboratoriet som utviklet den (51). Dette punktet er oppfylt siden laboratoriet ikke distribuerer metoden videre, og den er kun opprettet for bruk av avdelingens egne patologer.

Punkt b) sier at bruk og tilvirking av IVD-utstyr skal inngå i «egne» kvalitetsstyringssystem (51). Hva som inngår i «egne» kvalitetsstyringssystem er ikke videre spesifisert i artikkelen. Det norske lovverkets «Forskrift om medisinsk utstyr» omhandler IVD-utstyr og kan være en aktuell kilde for hva som er egnet kvalitetsstyring. Kravene satt i denne forskriften følges av laboratoriet. Ved avdelingen benyttes kvalitetsstyringssystemet EQS. Ut ifra dette anses kravet som oppfylt.

Punkt c) setter krav om at laboratoriet skal følge EN ISO15189 eller tilsvarende standard (51). Avdeling for patologi har flere analyser som er akkreditert i henhold til ISO 15189 gjennom Norsk Akkreditering (45). Avdelingen etterlever denne kvalitetsstandarden også i øvrig arbeid. Derfor anses kravet for å være oppfylt.

I punkt d) går det frem at avdelingen må dokumentere de hindringer som ligger i veien, med hensyn til pasientenes behov og sikkerhet, for at det kommersielle tilbudet ikke kan benyttes (51). På Avdeling for patologi ved St. Olavs hospital benyttes Ventana-systemet fra Roche Diagnostics for alle automatiserte analyser. Det vil være svært ressurskrevende å bringe inn nye system og leverandører med kommersielle tilbud for den aktuelle fargemetoden. En aktuell leverandør i dette tilfellet er Biocare Medical, som har et kommersielt tilbud for Ki67/p16-dobbelfarge (62). I følge IVDR skal laboratoriet benytte det kommersielle tilbudet hvis dette er av tilstrekkelig kvalitet og funksjon. Kostnadsspørsmålet blir ikke lagt vekt på i IVDR, der fokuset utelukkende er på kvalitet for pasienten. Dette kan by på problemer når reglementet skal settes ut i praksis. Det er ikke til å unngå at kostnad, i praksis, er en viktig faktor i valg av leverandører og analyserepertoaret på laboratoriene. Dette må vurderes før Ki67/p16-dobbeltfargeprotokollen kan inngå i unntaket.

Punkt e) setter krav om at laboratoriet skal dokumentere og begrunne tilvirking og bruk av egenprodusert IVD-utstyr til en «kompetent autoritet» om det forespørres (51). I Norge vil dette være Legemiddelverket, som har ansvar for laboratoriekontroll og tilsyn av medisinsk utstyr (63). Ved tilstrekkelig dokumentasjon av disse forholdene vil kravet være oppfylt.

Videre setter punkt f) krav om at laboratoriet må utarbeide en offentlig deklarasjon som viser: (i) deres navn og adresse, (ii) detaljer for identifisering av IVD-utstyret (iii) en deklarasjon om dets prestasjon i henhold til kravene satt i IVDR, samt eventuelle årsaker til at disse ikke er møtt (51). Dermed må det til en vurdering og deklarasjon av Ki67/p16-dobbeltfargen sin prestasjon for å oppfylle dette kravet.

Punkt g) og h) i den aktuelle artikkelen er irrelevante for protokollen som diskuteres (51). Punktene omhandler krav som settes til IVD-utstyr av klasse D, mens reagensene som inngår i Ki67/p16-dobbeltfargen går under klasse A og C (48).

Punkt i) pålegger laboratoriet å ta i betraktning erfaringer som gjøres i bruken av egenprodusert IVD-utstyr, og gjøre nødvendige korrigeringer (51). Dette punktet anses som oppfylt for Ki67/p16-dobbeltfargeprotokollen. Alle metoder ved laboratoriet vurderes kontinuerlig da dette er en del av kvalitetssikringsarbeidet.

Med hensyn til de overnevnte kravene satt i IVDR, er det gode muligheter for at Ki67/p16 -dobbeltfargeprotokollen kan inngå i «in house»-unntaket. Før IVDR trer i kraft må alle analyser ved avdelingen evalueres i henhold til regulativet. Dette medfører at den nåværende Ki67/p16-dobbeltfargeprotokollen, som benytter anti-p16^{INK4a} klon E6H4 fra Ventana og anti-Ki67 MIB1 fra Dako, også må vurderes og inngå i «in house»-unntaket. Jobben med dokumentasjon i henhold til de overnevnte punktene må derfor gjøres uavhengig om den nye dobbeltfargen som benytter anti-p16^{INK4a} BC42 fra Biocare Medical tas i bruk. Den største hindringen for at den nye protokollen kan inngå i unntaket er vurderingen om tilgjengelige kommersielle alternativer kan benyttes i stedet.

3.6 Begrensninger og feilkilder i metoden

Ved immunhistokjemisk farging med antistoff må det tas hensyn til ulike begrensninger og eventuelle feilkilder. Når det benyttes to primærantistoff der begge antistoffene er produsert i samme art vil det sekundære antistoffet, som er en del av deteksjonskitet, kunne kryss reagere med hvert av de to primærantistoffene. I denne oppgaven er anti-p16^{INK4a} og anti-Ki67 produsert i mus. For å unngå kryssreaktivitet vil man først påføre første primærantistoff med tilhørende deteksjonskit og deretter andre primærantistoff med tilhørende deteksjonskit, med et vasketrinn imellom disse. I dette tilfellet påføres anti-Ki67 først slik at dette binder seg til Ki67-positive strukturer i vevet. OptiView DAB deteksjonskit benyttes til å visualisere bindingen mellom antistoff og antigen. Deretter påføres anti-

p16^{INK4a} som vil bindes til p16-positive strukturer i vevet. Bindingene som oppstår visualiseres med UltraView AP Red deteksjonskit og gir vevet en rød/rosa farge. Ved å benytte en slik protokoll vil sjansen for at det oppstår problemer med kryssreaktivitet grunnet to primærantistoff fra samme art minimeres (46).

Ved farging med to antistoff er det viktig å ta hensyn til hvilket deteksjonskit som benyttes til hvilket primærantistoff. Da det er enklere å skille vevsstrukturene dersom kjernefargen er brun og cytoplasmafargen er rød benyttes UltraView AP Red deteksjonskit til å visualisere p16^{INK4a} i cytoplasma. P16^{INK4a} vil dermed ikke være synlig i kjernen, der den overskygges av brunfargen fra Ki67. Den røde/rosa fargen ikke vil overskygge den brune fargen, hvilket gjør at man tydelig kan se uttrykk av Ki67. I motsatt tilfelle ville den rosa fargen fra Ki67, som kun finnes i kjernen, ikke være synlig. Dermed ble protokollen utformet med OptiView DAB for Ki67 og UltraView AP Red for p16^{INK4a}.

Ved sammenligning av fargekvalitet for anti-p16^{INK4a} E6H4 fra Ventana og anti-p16^{INK4a} BC42 fra Biocare Medical er det viktig å være oppmerksom på at det finnes feilkilder som ikke har direkte tilknytning til antistoffets egnethet. Snittene i denne oppgaven som er farget med anti-p16^{INK4a} E6H4 fra Ventana ble farget mot slutten av 2020 og begynnelsen 2021, men ble ikke digitalisert før i april 2021. Som en konsekvens av dette kan fargekvaliteten på disse digitale bildene av snittene oppfattes som noe dårligere enn de egentlig er, siden brunfargen i snittet kan falme noe over tid. Ettersom tidsrommet mellom farging og digitalisering bare utgjør noen måneder vil fargekvaliteten antagelig ikke ha forandret seg så mye at det vil utgjøre en forskjell.

Feilkilder knyttet til kontrastfargingen kan være med på å påvirke vurdering av fargekvalitet. Farging med Hematoxylin utføres manuelt. Årsaken er at fargekvaliteten ikke blir optimal dersom kontrastfargingen gjøres automatisk på Benchmark Ultra. Siden dette gjøres manuelt, kan kontrastfargingen variere fra snitt til snitt. Dette skjer på grunn av intra- og interindividuelle variasjoner mellom hver farging. Eksempler på dette er små forandringer i pH på hematoxylin-løsningen, ulik temperatur eller tid i vannbad. Ufullstendig eller kraftig kontrastfarging kan være med på å skape en mørkere brunfarge.

Det kan også diskuteres hvorvidt de aktuelle protokollene ble utprøvd på tilstrekkelig antall snitt og ulike vevstyper. I dette prosjektet ble de mest aktuelle vevstypene utprøvd. Med bakgrunn i oppnådde resultatene ble verifiseringen godkjent av patologer ved laboratoriet med hensyn til fargekvalitet. Videre vil protokollene implementeres i rutinediagnostikken. Protokollene benyttes i en prøveperiode for å være sikker på at de fungerer optimalt. I løpet av denne perioden vil det farges 60 prøver, og en ny vurdering av protokollen gjøres etter dette. Dersom alle prøvene oppnår tilstrekkelig og forventet fargekvalitet, vil protokollen benyttes videre i rutinediagnostikken ettersom den har vist gode resultater på et stort antall prøver.

Analysens reproduserbarhet over tid vil kunne påvirkes av ytre faktorer som varierer fra en immunhistokjemisk farging til en annen. I dette prosjektet ble snittene farget over en tidsperiode på flere uker der forskjellige ansatte ved enheten hadde ansvar for drift og vedlikehold av fargeinstrumentene fra dag til dag. Det ble også benyttet flere ulike fargeinstrumenter, alle av typen Benchmark Ultra, under utprøvingen. I tillegg ble forskjellige lot på deteksjonskit og enkelte øvrige reagenser benyttet. Protokollen ble også prøvet ut på en rekke ulike vevstyper, der alle fikk gode fargerresultater. Ingen av de nevnte faktorene ser ut til å ha hatt en innvirkning på fargerresultatene i den grad at de har påvirket fargekvaliteten på snittene. Analysens reproduserbarhet vurderes dermed til å være god.

4. KONKLUSJON

Etter utprøving av ulike protokoller for anti-p16^{INK4a} klon BC42 fra Biocare Medical ble protokoll B ansett som best egnet. Protokoll B har en forbehandlingstid på 48 min med HIER i CC1-løsning, peroxidase inhibitor før primærantistoff og antistoffinkubering på 12 min. Fargeresultatet på kontroller og prøver ble som forventet og vurdert som optimalt. Antistoffet fungerer også godt sammen med anti-Ki67 i en dobbeltfargeprotokoll. P16^{INK4a}-positive strukturer i vevet vil farges rød/rosa samtidig som den brune kjernefargen til Ki67 kommer tydelig fram.

Ved bytte av antistoff vil laboratoriet få en årlig kostnadsbesparelse på totalt 95 682 kroner (NOK), sammenliknet med nåværende protokoller. Prismessig er det altså en stor gevinst i bytte til BC42 fra Biocare Medical. I henhold til IVDR er den endelige p16-enkeltfargeprotokollen i samsvar med produsentens anbefalinger og dermed godkjent. Dobbeltfargeprotokollen er derimot ikke godkjent i henhold til IVDR uten videre og må inngå i «in house»-unntaket.

Med bakgrunn i fargeresultatene fra utprøvingen av anti-p16^{INK4a} klon BC42 fra Biocare Medical vil det være en fordel for avdelingen å bytte til dette primærantistoffet med tanke på fargekvalitet og kostnader. Når det gjelder godkjenning i henhold til IVDR vil det trolig utgjøre liten forskjell å bytte primærantistoff, ettersom dokumentasjonsarbeidet vil være de samme for nåværende analyse.

5. REFERANSER

1. Krefte, NHI [Internett]. NHI.no. [sitert 6. april 2021]. Tilgjengelig på: <https://nhi.no/kroppen-var/sykdomsprosesser/kreft/>
2. Nøkkeltall om kreft, Kreftregisteret [Internett]. Kreftregisteret.no. [sitert 6. april 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.kreftregisteret.no/Temasider/om-kreft/>
3. Cancer in Norway [Internett]. [sitert 14. april 2021]. Tilgjengelig på: https://www.kreftregisteret.no/globalassets/cancer-in-norway/2019/cin_report.pdf
4. Roald B, Sauer T, Klepp O. kreft. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2020 [sitert 6. april 2021]. Tilgjengelig på: <http://sml.snl.no/kreft>
5. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, mfl. Essential Cell Biology. Fjerde utgave. New York: Garland Science; 2014.
6. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 4. mars 2011;144(5):646–74.
7. Klepp O. metastase. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2019 [sitert 9. april 2021]. Tilgjengelig på: <http://sml.snl.no/metastase>
8. Børresen-Dale A-L. telomerase. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2018 [sitert 9. april 2021]. Tilgjengelig på: <http://sml.snl.no/telomerase>
9. Mendonsa A, Na T-Y, Gumbiner BM. E-cadherin in Contact Inhibition and Cancer. Oncogene. august 2018;37(35):4769–80.
10. Aarnes H. cellesyklus. I: Store norske leksikon [Internett]. 2020 [sitert 8. april 2021]. Tilgjengelig på: <http://snl.no/cellesyklus>
11. Dick FA, Rubin SM. Molecular mechanisms underlying RB protein function. Nat Rev Mol Cell Biol. mai 2013;14(5):297–306.
12. Fossum S. p53. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2019 [sitert 13. mai 2021]. Tilgjengelig på: <http://sml.snl.no/p53>
13. Persontilpasset behandling [Internett]. Kreftforeningen. [sitert 8. april 2021]. Tilgjengelig på: <https://kreftforeningen.no/om-kreft/behandling/persontilpasset-behandling/>
14. Verma M. Personalized Medicine and Cancer. J Pers Med. mars 2012;2(1):1–14.
15. Romagosa C, Simonetti S, López-Vicente L, Mazo A, Lleonart ME, Castellvi J, mfl. p16 Ink4a overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. Oncogene. mai 2011;30(18):2087–97.
16. Foulkes WD, Flanders TY, Pollock PM, Hayward NK. The CDKN2A (p16) gene and human cancer. Mol Med. januar 1997;3(1):5–20.

17. Balasubramaniam SD, Balakrishnan V, Oon CE, Kaur G. Key Molecular Events in Cervical Cancer Development. *Med Kaunas Lith* [Internett]. 17. juli 2019;55(7). Tilgjengelig på: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31319555/>
18. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, mfl. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer*. 15. april 2001;92(2):276–84.
19. p16 - NordiQC - Immunohistochemical Quality Control [Internett]. [siteret 10. mars 2021]. Tilgjengelig på: <https://nordiqc.org/epitope.php?id=59>
20. Slominski A, Wortsman J, Carlson AJ, Matsuoka LY, Balch CM, Mihm MC. Malignant melanoma. *Arch Pathol Lab Med*. oktober 2001;125(10):1295–306.
21. Mills A, Carriolho C, Focchi G, Kong C, Park K, Regauer S, mfl. *Female Genital Tumors*. 5. France: International Agency for Research on Cancer (IARC); 342–344 s. (WHO Classification of Tumors).
22. GEIBLER C, Tahtali A, Diensthuber M, Gassner D, Stöver T, Wagenblast J. The Role of p16 Expression as a Predictive Marker in HPV-positive Oral SCCN – A Retrospective Single-center Study. *Anticancer Res*. 1. mars 2013;33(3):913–6.
23. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. mars 2000;182(3):311–22.
24. Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*. juni 2018;127(2):175–86.
25. Ki67 - NordiQC - Immunohistochemical Quality Control [Internett]. [siteret 10. mars 2021]. Tilgjengelig på: <https://nordiqc.org/epitope.php?id=1>
26. Kanthiya K, Khunnarong J, Tangjitgamol S, Puripat N, Tanvanich S. Expression of the p16 and Ki67 in Cervical Squamous Intraepithelial Lesions and Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 2016;17(7):3201–6.
27. Jiang P, Jia M, Hu J, Huang Z, Deng Y, Lai L, mfl. Prognostic Value of Ki67 in Patients with Stage 1-2 Endometrial Cancer: Validation of the Cut-off Value of Ki67 as a Predictive Factor. *OncoTargets Ther*. 2020;13:10841–50.
28. Humant papillomavirus (HPV), genitale infeksjoner [Internett]. Folkehelseinstituttet. 2019 [siteret 16. mars 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/humant-papillomavirus-hpv-genitale-/>
29. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet Lond Engl*. 8. september 2007;370(9590):890–907.
30. Antonishyn N. Figure 1. Genome organization of human papillomavirus. The genetic map... I: ResearchGate [Internett]. 2020 [siteret 10. mai 2021]. Tilgjengelig på: https://www.researchgate.net/figure/Genome-organization-of-human-papillomavirus-The-genetic-map-of-HPV-16-is-illustrated_fig1_29855842

31. Nishimura A, Ono T, Ishimoto A, Dowhanick JJ, Frizzell MA, Howley PM, mfl. Mechanisms of Human Papillomavirus E2-Mediated Repression of Viral Oncogene Expression and Cervical Cancer Cell Growth Inhibition. *J Virol.* april 2000;74(8):3752–60.
32. Collins SI, Constandinou-Williams C, Wen K, Young LS, Roberts S, Murray PG, mfl. Disruption of the E2 Gene Is a Common and Early Event in the Natural History of Cervical Human Papillomavirus Infection: A Longitudinal Cohort Study. *Cancer Res.* 1. mai 2009;69(9):3828–32.
33. Gude MF, Dall AM, Veedfald S, Brüggmann AH, Meier AO. HISTOLOGI tekst og atlas. 1. utgave, 1. opplag. København: FALD's forlag, København; 2015.
34. Robboy SJ. Pathology of the female reproductive tract. 2. utg. Bd. second edition. Churhill Livingstone Elsevier; 2009.
35. Roald B. dysplasi. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2018 [sitert 16. mai 2021]. Tilgjengelig på: <http://sml.snl.no/dysplasi>
36. Fossum CC, Chintakuntlawar AV, Price DL, Garcia JJ. Characterization of the oropharynx: anatomy, histology, immunology, squamous cell carcinoma and surgical resection. *Histopathology.* juni 2017;70(7):1021–9.
37. Munnsvelgkreft (orofarynkskreft) [Internett]. NHI.no. [sitert 19. mars 2021]. Tilgjengelig på: <https://nhi.no/sykdommer/kreft/ore-nese-hals-kreft/munnsvelgkreft-orofarynkskreft/>
38. Eroschenko VP. Atlas of Histology. 10 utgave. Idaho: Lippincott Williams and Wilkins; 2005.
39. Langeland T. huden. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2020 [sitert 23. mars 2021]. Tilgjengelig på: <http://sml.snl.no/huden>
40. Durbeej B, Eriksson LA. Reaction mechanism of thymine dimer formation in DNA induced by UV light. *J Photochem Photobiol Chem.* 20. september 2002;152(1):95–101.
41. Mihic-Probst D, Mnich CD, Oberholzer PA, Seifert B, Sasse B, Moch H, mfl. p16 expression in primary malignant melanoma is associated with prognosis and lymph node status. *Int J Cancer.* 1. mai 2006;118(9):2262–8.
42. Nasjonalt handlingsprogram med retningslinjer for diagnostikk, behandling og oppfølging av maligne melanomer. Helsedirektoratet. mai 2020;128.
43. Melanom i hud [Internett]. [sitert 22. april 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.kreftregisteret.no/Temasider/kreftformer/melanom/>
44. Wålberg LiseE. Presentasjon Bachelorstudenter, Enhet for immunhistokjemi. Trondheim.
45. Akkrediteringsomfang | Norsk Akkreditering [Internett]. [sitert 22. april 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.akkreditert.no/akkrediterte-organisasjoner/akkrediteringsomfang/?AkkId=1028>
46. Taylor C. Education Guide Immunohistochemical Staining Methods Sixth Edition [Internett]. 6. utg. Bd. Sixth Edition. Dako Denmark A/S, An Agilent Technologies Company; 2013. Tilgjengelig på: https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/08002_ihc_staining_methods.pdf
47. Wålberg LiseE. Immunhistokjemi - Utprøving og validering av primærintistoff. 2020.

48. Klassifisering av medisinsk utstyr - Legemiddelverket [Internett]. Statens legemiddelverk. [sitert 28. april 2021]. Tilgjengelig på: [https://legemiddelverket.no/medisinsk-utstyr/klassifisering-av-medisinsk-utstyr#-endringer-i-klassifiseringsreglene-for-medisinsk-utstyr-\(mdr\)](https://legemiddelverket.no/medisinsk-utstyr/klassifisering-av-medisinsk-utstyr#-endringer-i-klassifiseringsreglene-for-medisinsk-utstyr-(mdr))
49. Nye forordninger om medisinsk utstyr - Legemiddelverket [Internett]. Statens legemiddelverk. [sitert 28. april 2021]. Tilgjengelig på: <https://legemiddelverket.no/medisinsk-utstyr/nye-forordninger-for-medisinsk-utstyr>
50. 8-ivd-regulativet-synnove-navdal.pdf [Internett]. [sitert 19. mars 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.nito.no/contentassets/82c2323c18004303ba7c8b0210ed90e9/nettverkstreff-4.-november/8-ivd-regulativet-synnove-navdal.pdf>
51. EUR-Lex - 32017R0746 - EN - EUR-Lex [Internett]. EUR-Lex Access to European Union Law. [sitert 17. mars 2021]. Tilgjengelig på: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2017/746/oj>
52. Egentilvirkning av medisinsk utstyr internt i en helseinstitusjon («in-house»- unntaket) - Legemiddelverket [Internett]. Statens legemiddelverk. [sitert 28. april 2021]. Tilgjengelig på: [https://legemiddelverket.no/medisinsk-utstyr/egentilvirkning-av-ivd-medisinsk-utstyr-internt-i-en-helseinstitusjon-in-house-unntaket#egentilvirkning-av-medisinsk-utstyr-%E2%80%93nye-krav-fra-26.-mai-2021-\(mdr\)](https://legemiddelverket.no/medisinsk-utstyr/egentilvirkning-av-ivd-medisinsk-utstyr-internt-i-en-helseinstitusjon-in-house-unntaket#egentilvirkning-av-medisinsk-utstyr-%E2%80%93nye-krav-fra-26.-mai-2021-(mdr))
53. 14:00-17:00. ISO 15189:2012 [Internett]. ISO. [sitert 19. mars 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.iso.org/cms/render/live/en/sites/isoorg/contents/data/standard/05/61/56115.html>
54. Forskrift om medisinsk utstyr - Kapittel 3. In vitro-diagnostisk medisinsk utstyr - Lovdata [Internett]. [sitert 28. april 2021]. Tilgjengelig på: https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2005-12-15-1690/KAPITTEL_4#%C2%A73-4
55. Forskrift om medisinsk utstyr - Vedlegg for in vitro-diagnostisk medisinsk utstyr (IVDMU) - Lovdata [Internett]. [sitert 28. april 2021]. Tilgjengelig på: https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2005-12-15-1690/KAPITTEL_9#KAPITTEL_9
56. VENTANA. Pakningsvedlegg: OptiView DAB IHC Detection Kit. REF: 760-700. VENTANA, Roche Diagnostics; 2011.
57. Holten ML, Wålberg LiseE. Vedlegg: Kontroll MIB+p16 fra «Immunhistokjemi -kvalitetssikring av snitt». 2020.
58. BiocareMedical. Pakningvedlegg: p16 (INK4a) BC42. Concentrated and Prediluted Monoclonal Antibody. 901-3231-122120. Biocare Medical;
59. Thavarajah R, Mudimbaimannar VK, Elizabeth J, Rao UK, Ranganathan K. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. J Oral Maxillofac Pathol JOMFP. 2012;16(3):400–5.
60. Pakningsvedlegg: UltraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit. Ref: 760-501. Ventana, Roche. VENTANA, Roche Diagnostics; 2016.
61. Pakningsvedlegg: Amplification Kit. Ref: 760-080. Ventana, Roche. VENTANA, Roche Diagnostics; 2012.
62. p16 + Ki-67 Multiplex IHC™ [Internett]. Biocare Medical. [sitert 28. april 2021]. Tilgjengelig på: <https://biocare.net/product/p16-ki-67-antibody/>

63. Arbeidsoppgaver - Legemiddelverket [Internett]. Statens legemiddelverk. [sitert 28. april 2021]. Tilgjengelig på: <https://legemiddelverket.no/om-oss/organisasjon/legemiddelverkets-oppgaver#tilsyn-og-overv%C3%A5king>

6. VEDLEGG

Vedlegg 1: Prisoversikt for reagenser

Tabellen viser en oversikt over all prisinformasjon for reagenser som er gjort tilgjengelig via veileder for prosjektet for arbeidet med denne oppgaven. Innkjøpskostnader for deteksjonskit og andre reagenser som inngår i fargeprosessen er ikke tilgjengelig, fordi enheten betaler leverandøren på bakgrunn av antall fargede snitt. Prisen for amplifikasjonskitet er også inkludert i prisen for deteksjonskitene. Alt dette inngår i pris pr. snitt for deteksjonskit. Når antistoff ikke titreres på manuelt, men overføres til fargedispenser på instrumentet, må det iberegnes dødvolume for denne. Dispenserne rommer 25 mL. Det benyttes 100 µL av hvert reagens pr. snitt som farges.

Reagens	Kostnad pr. enhet ved innkjøp i NOK (eks. mva)	Volum av enhet ved innkjøp	Bruksvolum til farging (fratrukket dødvolume)	Snitt som kan farges med dette volumet	Pris pr. snitt i NOK (eks. mva)
P16 ^{INK4a} BC42, Biocare Medical 6 mL RTU, kjøpt til utprøving	3 950.00	6 mL x4	22 mL	220	71.82
P16 ^{INK4a} BC42, Biocare Medical 25 mL RTU, nytt tilbud fra leverandør 03.05.21	16 325.00	25 mL	23 mL	230	70.98
CINtec p16 Histology E6H4, Ventana/Roche	24 210.91	Ikke tilgjengelig	25 mL	250	96.84
Ki67 MIB1, Dako/Agilent, konsentrat	13 931.00	1 mL	187 mL	1870	7.45
OptiView DAB IHC, Ventana/Roche	Ikke tilgjengelig	Ikke tilgjengelig	25 mL	250	50.46
UltraView Universal Alkaline Phosphatase Red, Ventana/Roche	Ikke tilgjengelig	Ikke tilgjengelig	25 mL	250	50.46