



Особенности применения и интерпретации двойного окрашивания p16/Ki67 в цитологической практике.

*Лёшкина Г.В. – врач-цитолог,
член международной академии цитологии (PMIAC)*

ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора

2 ноября 2019 года

Общие проблемы цитологического скрининга



Cytology Based Screening: International Problems

- Низкая чувствительность (много ложноположительных и ложноотрицательных результатов)
- Низкая воспроизводимость (результат ФСВОК – 50% аденокарцином не были выявлены)



- ✓ **Scientific Problems**
 - A single Pap-Test has a very low sensitivity for CIN2+ lesions
 - Pap-Test has a high false negative rate
 - Reproducibility of Pap-Test is low
 - Pap-Test is less effective in detecting adenocarcinoma of cervix
- ✓ **Organisational Problems**
 - It is a very difficult and complex service to provide.

Пап-тест недостаточно точен

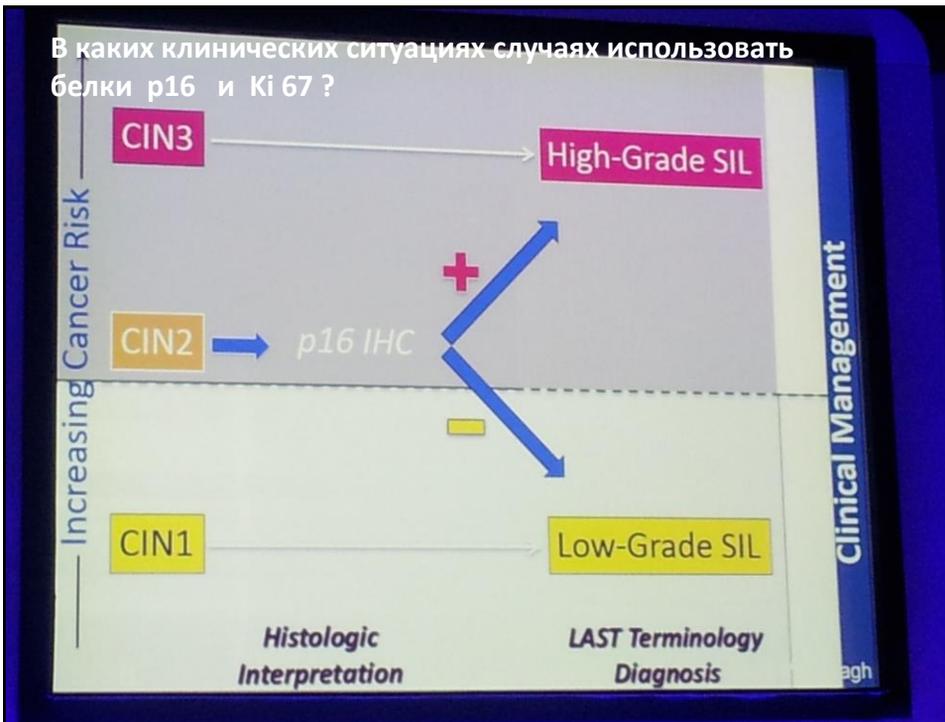
Высокий риск пропущенных поражений

Пересмотрены 4 948 жидкостных препаратов
Совпадение с оценкой экспертами

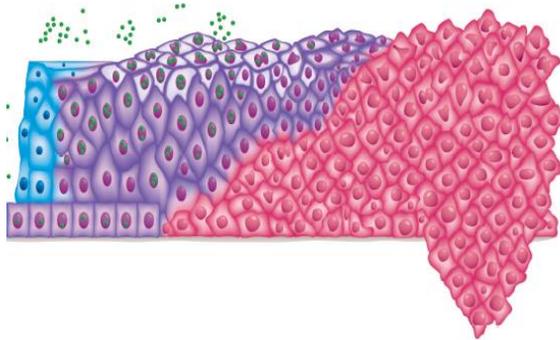
		NILM	ASCUS	LSIL	≥HSIL
Первоначальный диагноз	NILM		19%	3%	<1%
	ASCUS	57% ошибочных	43%	17%	2%
	LSIL		22%		6%
	≥HSIL	3%	23%	53% ошибочных	47%

Source: Stoler et al, JAMA, 2001

В каких клинических ситуациях случаях использовать белки p16 и Ki 67 ?



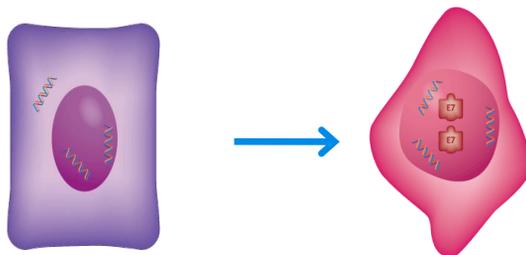
Интегрированная ВПЧ-инфекция



Полностью трансформированные клетки характеризуются нерегулируемой прогрессией клеточного цикла, нарушением созревания, что приводит к раку шейки матки.

5

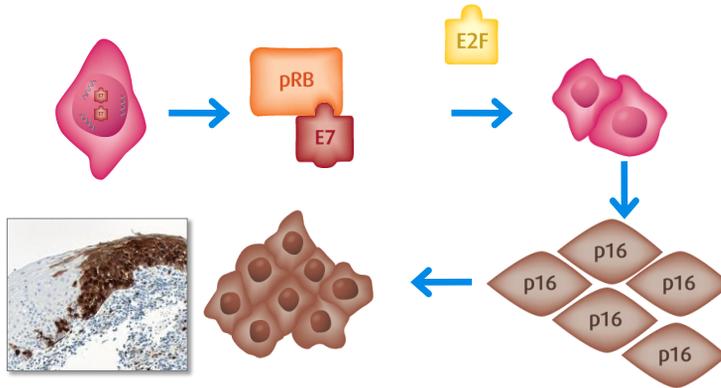
Интегрированная ВПЧ-инфекция



При внедрении вируса происходит выработка онкопротеинов E6 and E7 , что приводит к нарушению клеточного цикла.

6

Интегрированная инфекция: онкогенез

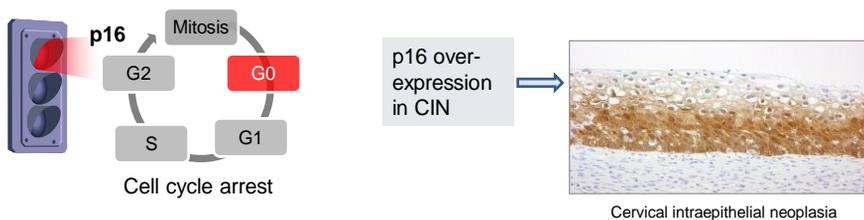


- В клетках с интегрированной формой инфекции вирусный онкопротеин E7 нарушает связывание pRB и E2F
- Это приводит к нарушению пролиферации клеток, генетической нестабильности и чрезмерной экспрессии p16
- Обнаруживается путем иммуногистохимического и иммуноцитохимического окрашивания

7

Экспрессия белка p16

- p16, регулятор нормального клеточного деления
- При дисплазии шейки матки p16 не может способствовать остановке клеточного цикла; онкопротеины E7 вируса ВПЧ инактивируют опухолевый супрессор pRb, мы видим окрашивание p16

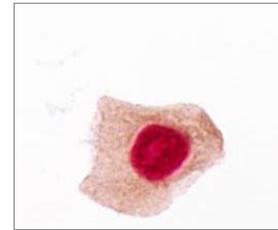
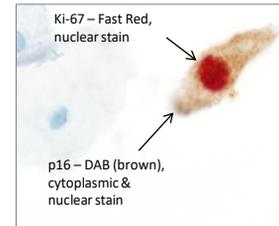


Cervical intraepithelial neoplasia

Биомаркеры p16/Ki-67 и коэкспрессия

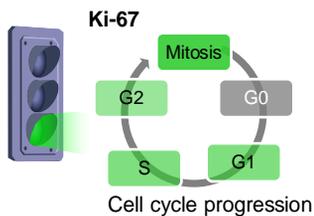
- **Обнаружение окрашивания p16 и Ki-67 в одной клетке**

- указывает на дерегулирование клеточного цикла, опосредованное вирусом папилломы человека в клетках плоского эпителия шейки матки
- выявление двойного окрашивания в одной клетке свидетельствует о поражении клеток плоского эпителия умеренной и высокой степени

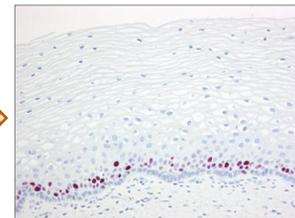


Маркер пролиферации Ki-67

- Маркер Ki-67 определяется в ядрах нормальных пролиферирующих клетках
- Не экспрессируется в неделящихся клетках
 - отсутствует в G0 фазе клеточного цикла

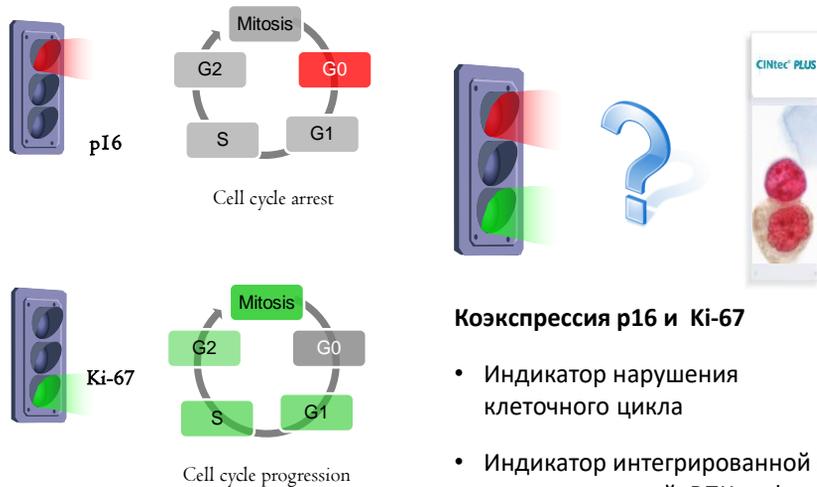


Proliferating, normal squamous epithelium, expressing Ki-67



Normal cervical squamous epithelium

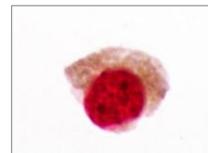
Совместное определение p16 /Ki67



11

Критерии двойного окрашивания эпителиальных клеток

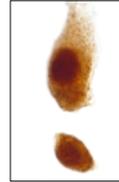
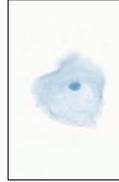
- Интерпретация не зависит от цитоморфологического заключения
- p16 окрашивание (коричневое) и Ki-67 окрашивание (красное) выявляется в одной клетке
- Специфическое красное окрашивание ядра и коричневое окрашивание цитоплазмы должно находиться в пределах **одной плоскости фокуса**
- Степень интенсивности окрашивания может быть от слабой до сильной
- Специфическое красное окрашивание Ki-67 может окрашивать ядро полностью или частично; возможно окрашивание только ядрышек
- Одна клетка с двойным окрашиванием расценивается как **положительный результат**



Двойное окрашивание

Отрицательный результат

- Клетки плоского эпителия окрашенные
 - В голубой цвет
 - p16, коричневое окрашивание ядра и /или цитоплазмы
 - Ki-67, ядерное окрашивание



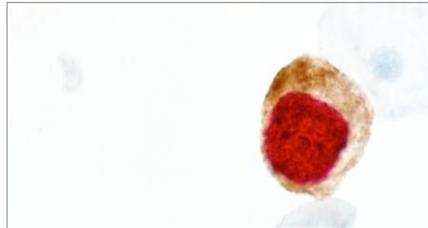
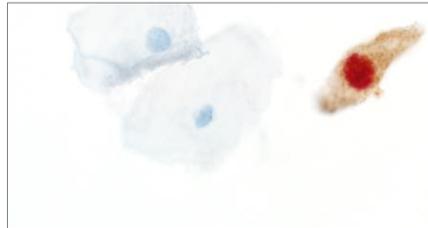
Положительный результат

- Двойное окрашивание p16 and Ki-67
 - p16 цитоплазматическое окрашивание и Ki-67 ядерное окрашивание
 - Изолированные клетки или кластеры



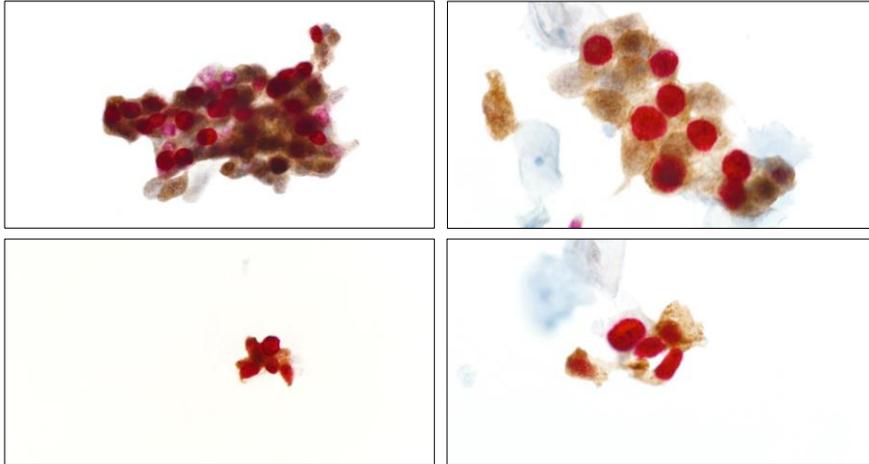
13

Изолированные клетки с двойным окрашиванием



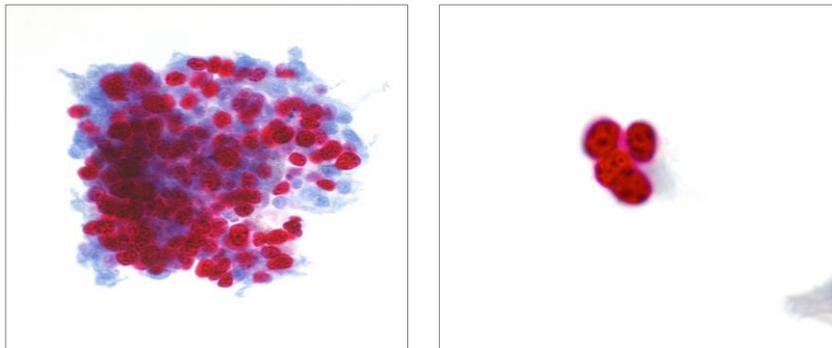
14

Кластеры из клеток с двойным окрашиванием



15

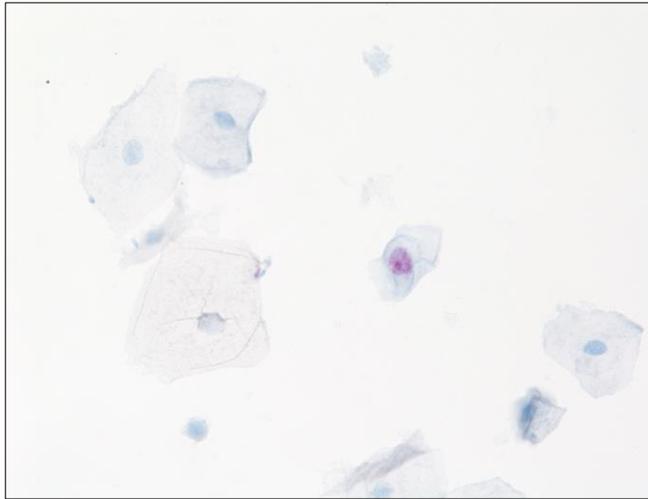
Ki-67 окрашивание



Клетки с ядерным окрашиванием Ki-67, расцениваются как негативные [20x, 40x]

16

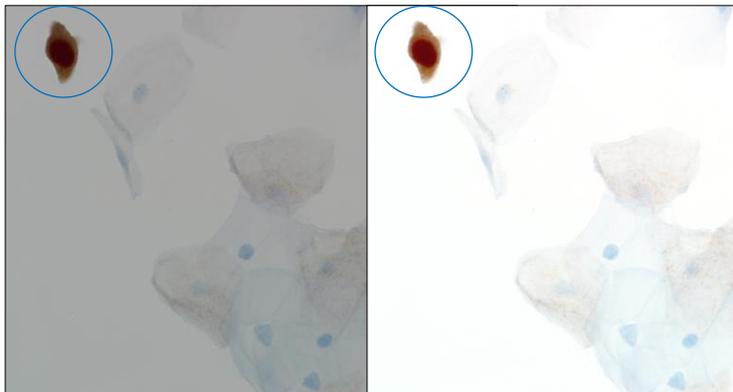
Окрашивание клеток только на Ki-67



Клетка плоского эпителия со слабым ядерным окрашиванием, негативным на Ki-67
(CINtec PLUS Cytology, 40x)

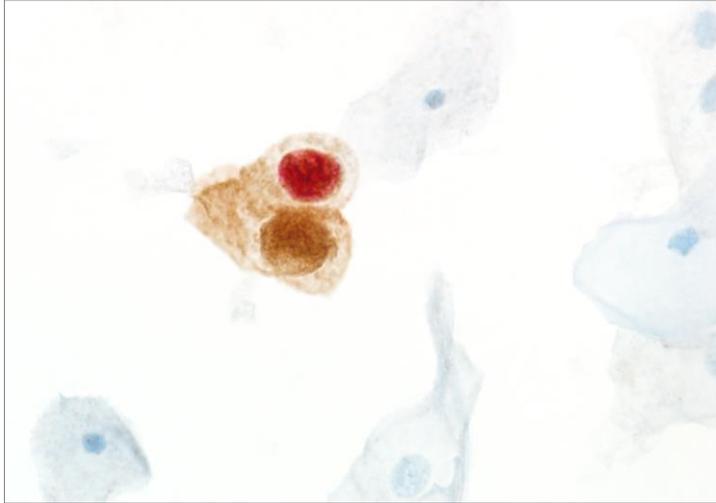
Интерпретация двойного окрашивания при выраженной экспрессии p16

Увеличьте освещенность препарата, чтобы увидеть окрашивание Ki-67



Положительный результат двойного окрашивания , 40x

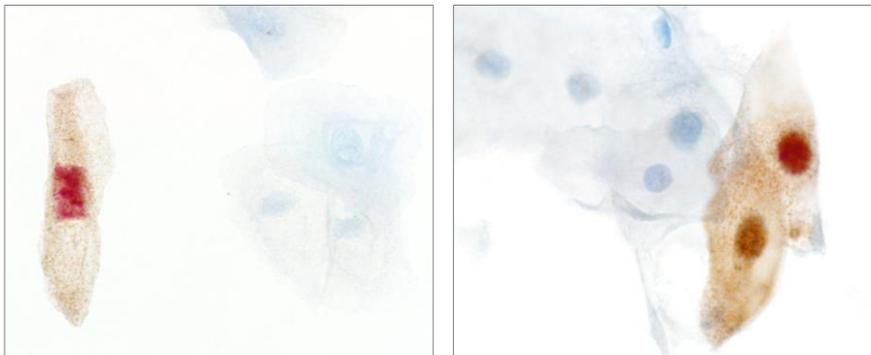
**ОДНА КЛЕТКА С ДВОЙНЫМ ОКРАШИВАНИЕМ,
ВТОРАЯ С ОКРАШИВАНИЕМ ТОЛЬКО НА p16**



19

Двойное окрашивание со слабой реакцией

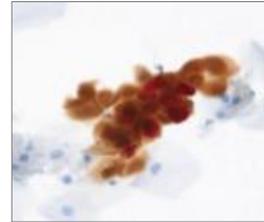
Слабое коричневое или красное окрашивание расценивается как позитивная реакция



20

Алгоритм для интерпретации клеточных кластеров

1. Поищите по краю кластеров клетки с двойным окрашиванием
 - Если да → коэкспрессия положительная
 - Если нет → переходите к шагу 2
2. Оцениваем окрашивание p16 (коричневое) в кластере. Оно может быть очаговое или диффузное.
 - Очаговое окрашивание p16: коэкспрессия отрицательная
 - Диффузное окрашивание p16: переходите к шагу 3
3. Окрашивание Ki-67; красные ядра располагаются над/под или встроены в кластер (необходимо использовать микровинт)
 - Окрашивание Ki-67, красные ядра располагаются над/под кластером - это негативный кластер, коэкспрессия отрицательная
 - Окрашивание Ki-67, красные ядра встроены в кластер → test result is positive, коэкспрессия положительная

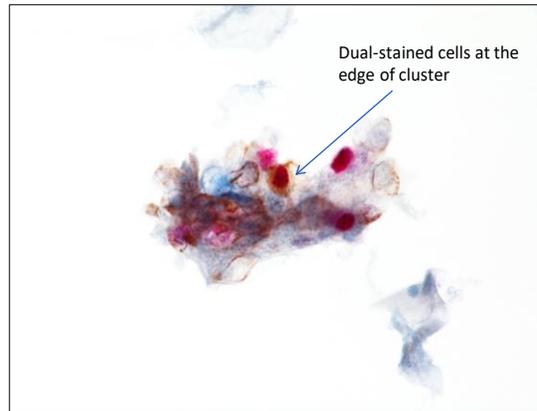


Как интерпретировать двойное окрашивание, если клетки расположены в группе:



Клетки с положительным двойным окрашиванием, расположенные по краю группы клеток. Группа содержит также клетки с диффузным позитивным окрашиванием на p16 и «замурованные» в этом кластере ядра с позитивным «красным» окрашиванием на Ki-67, что подтверждает общий позитивный результат двойного окрашивания (40x).

Как интерпретировать двойное окрашивание, если клетки расположены в группе:

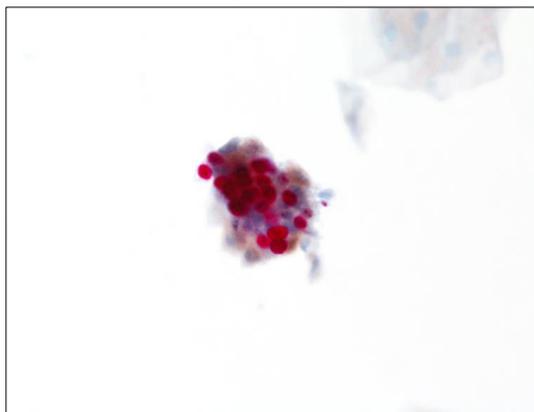


Несмотря на то, что в центре группы клеток позитивное окрашивание на p16 носит фокальный характер, расположенные по краю кластера клетки с положительным двойным окрашиванием позволяют интерпретировать результат, как позитивный (40х).

23

Группа клеток, окрашенных на p16 и Ki-67

Клетки с двойным окрашиванием отсутствуют



Группа клеток, в которой нет располагающихся по краю клеток с двойным окрашиванием, в то время как окрашивание на p16 носит фокальный характер, а окрашивание на Ki-67 является ядерным. Общий результат – негативный (40х).

24

Группа клеток, окрашенных на p16 и Ki-67

Клетки с двойным окрашиванием имеются

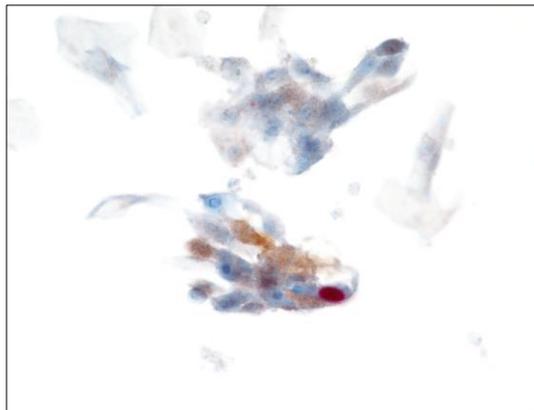


На краю этой плотной группы очень трудно разглядеть клетки с двойным окрашиванием. Вместе с тем, окрашивание на p16 носит диффузный характер, и группа включает в себя «замурованные» ядра с «красным» окрашиванием на Ki-67. Общий результат – положительный (40х).

25

Группа клеток, окрашенных на p16 и Ki-67

Клетки с двойным окрашиванием отсутствуют



Группа клеток без признаков двойного окрашивания по краю, с фокусами окрашивания на p16. Общий результат – негативный. Имеется одна клетка с ядром, окрасившимся на Ki-67, но без цитоплазматического окрашивания на p16 (40х).

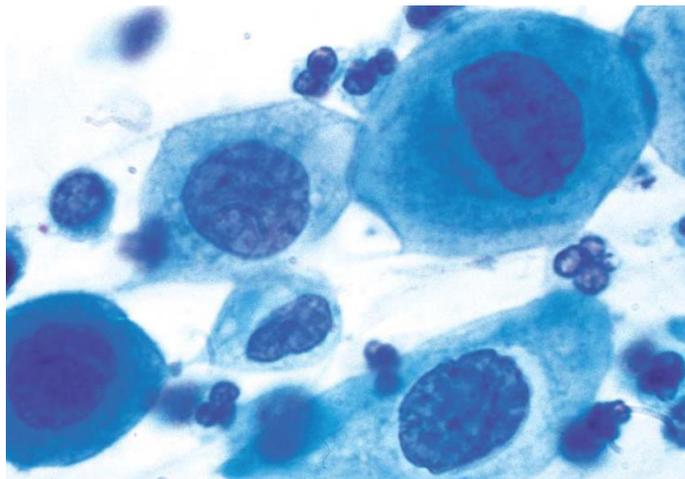
26

Адекватность клеточного образца

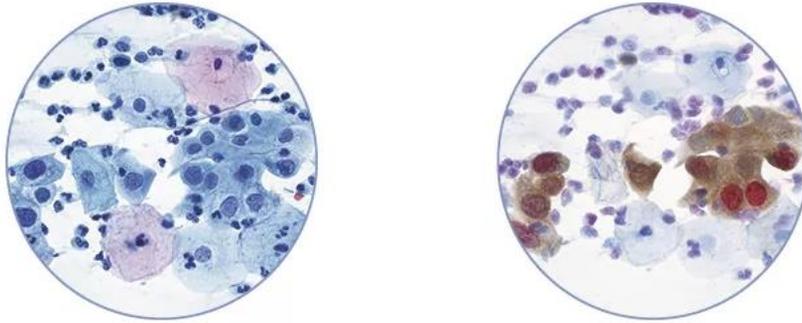
Адекватность препаратов оценивается согласно The Bethesda, 2014

- Адекватным считается препарат, содержащий 5,000 хорошо визуализированных клеток
- The process to estimate at least 5,000 cells on CINtec *PLUS* Cytology stained LBC slides:
 - ThinPrep slide, a minimum average count of at least three to four nucleated squamous cells in 10 random High power (40X) fields of view
 - SurePath slide, a minimum average count of at least seven to nine nucleated squamous cells in 10 random High power (40X) fields of view
- Выдается неадекватное заключение, если в препарате менее 5,000 клеток и нет двойного окрашивания
- Если в препарате менее 5,000 клеток, но обнаружена одна клетка с двойным окрашиванием, необходимо сообщить о положительном результате

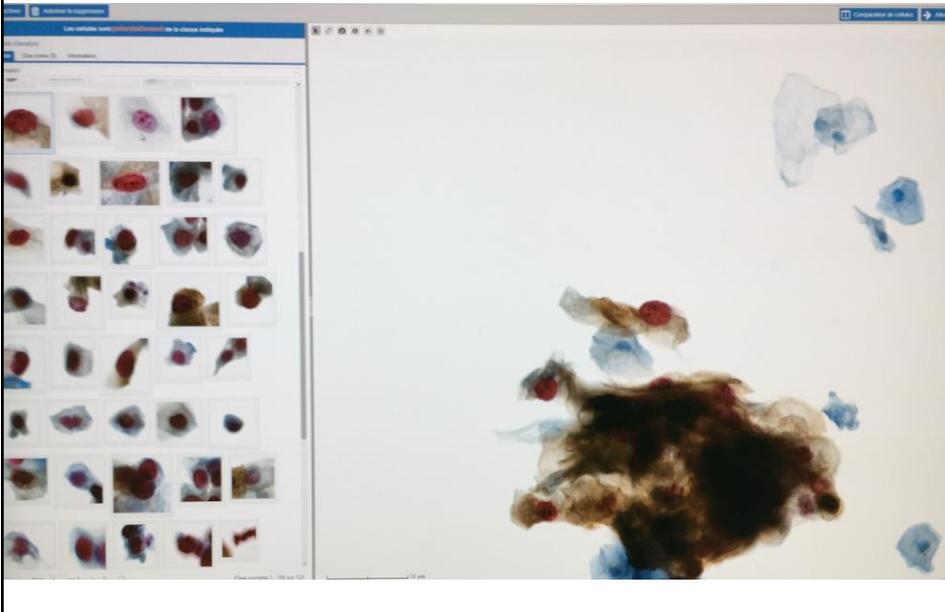
HSIL/метаплазия?



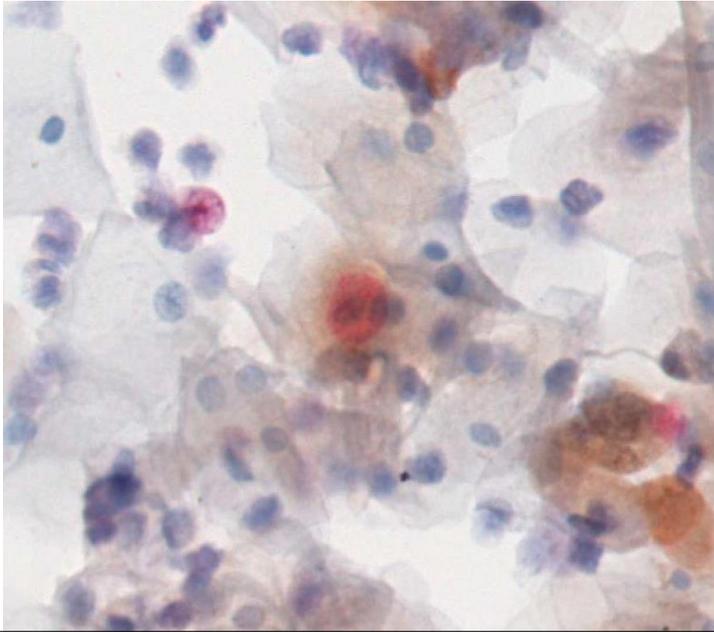
HSIL/метаплазия?



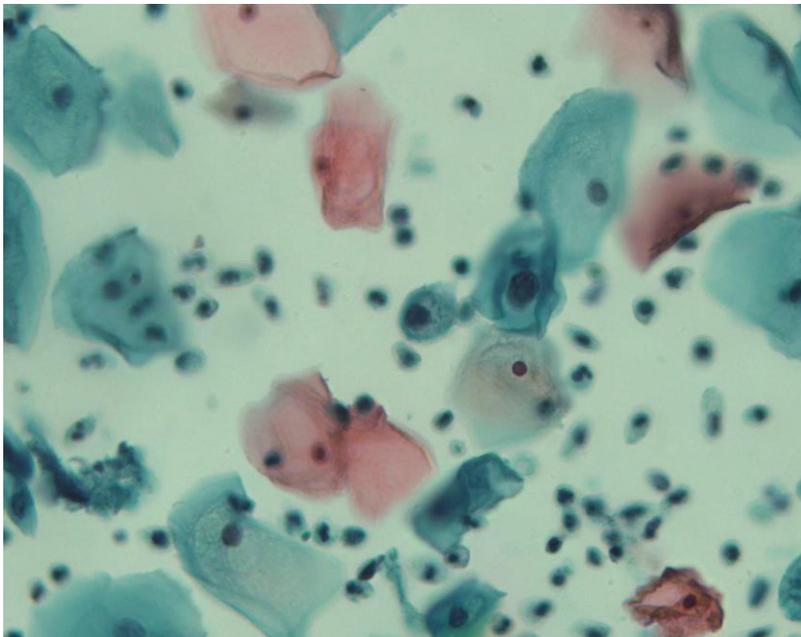
Возможность сканирования и просмотра галереи положительных клеток на сканере
Cyto Vision Pap



<https://vision-suite.com/demo/samples/937/slide>

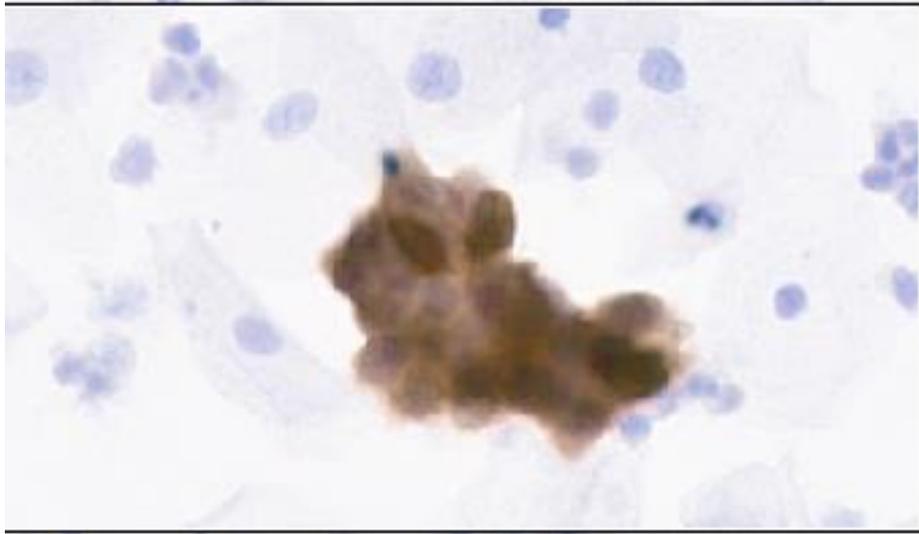


LSIL



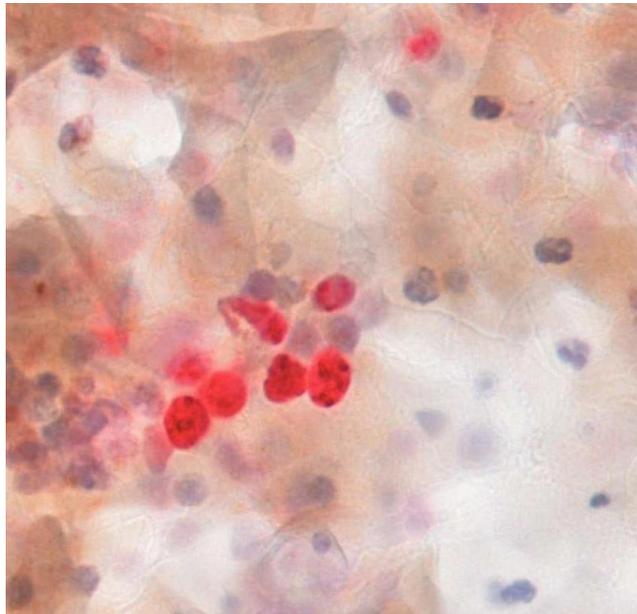
Двойная экспрессия p16/Ki67 не обнаружена

<https://vision-suite.com/demo/samples/939/slide>

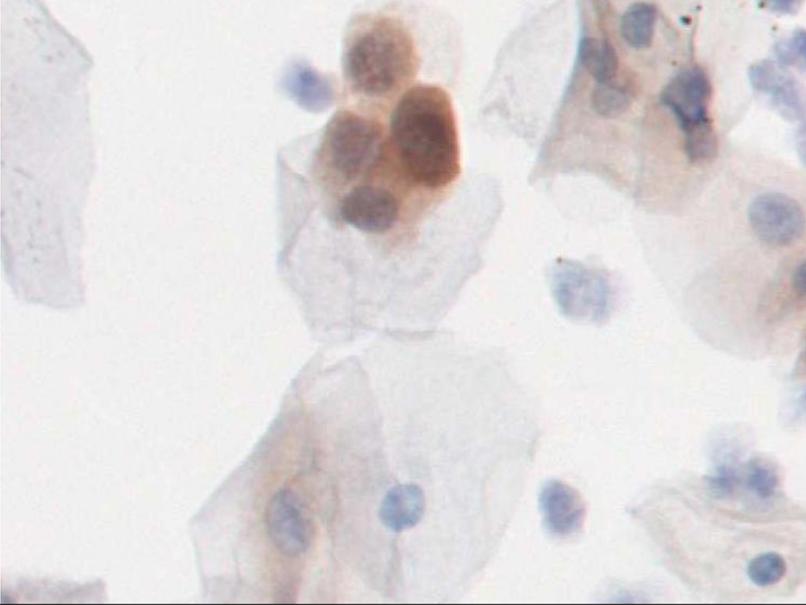


Двойная экспрессия p16/Ki67 не обнаружена

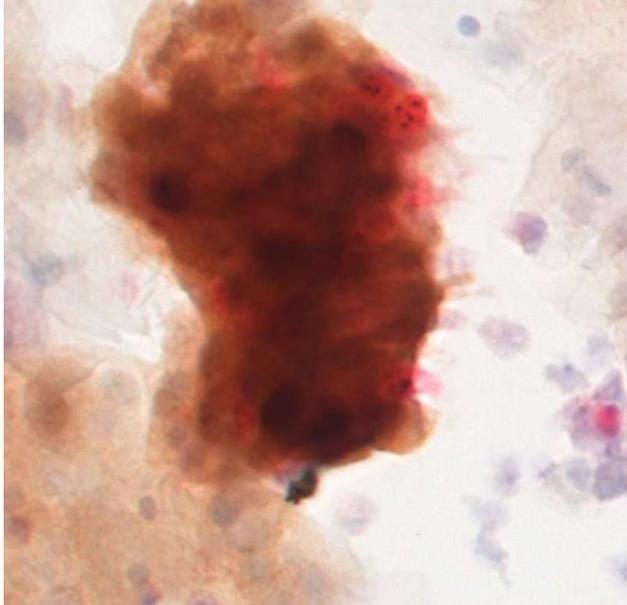
<https://vision-suite.com/demo/samples/939/slide>



Двойная экспрессия p16/Ki67 не обнаружена
<https://vision-suite.com/demo/samples/939/slide>



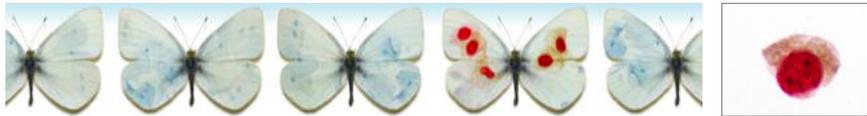
Двойная экспрессия p16/Ki67 не обнаружена
<https://vision-suite.com/demo/samples/939/slide>



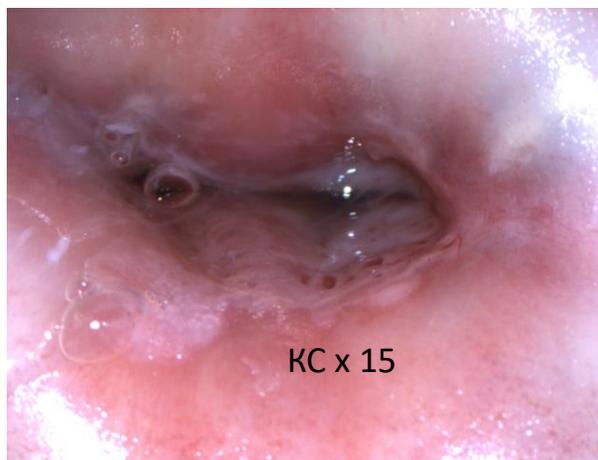
CINtec PLUS Cytology Staining

Критерии двойного окрашивания эпителиальных клеток

- Интерпретация не зависит от цитоморфологического заключения
- p16 окрашивание (коричневое) и Ki-67 окрашивание (красное) выявляется в одной клетке
- Специфическое красное окрашивание ядра и коричневое окрашивание цитоплазмы должно находиться в пределах **одной плоскости фокуса**
- Степень интенсивности окрашивания может быть от слабой до сильной
- Специфическое красное окрашивание Ki-67 может полностью окрашивать ядро или частично, возможно только окрашивание ядрышек
- Одна клетка с двойным окрашиванием расценивается как позитивный результат

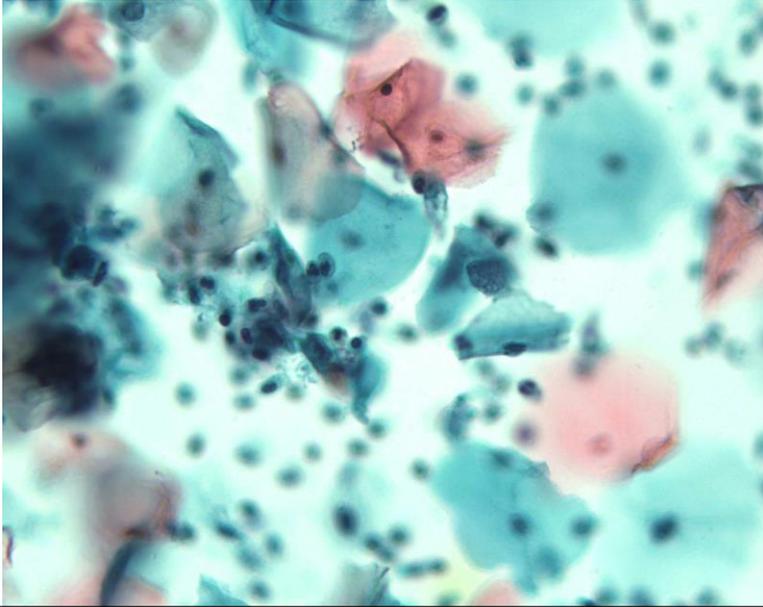


ЗТ – третьего типа- полностью не визуализируется – уходит в цервикальный канал. В области наружного зева УБЭ с папиллярным рельефом – кольпоскопически соответствует LSIL

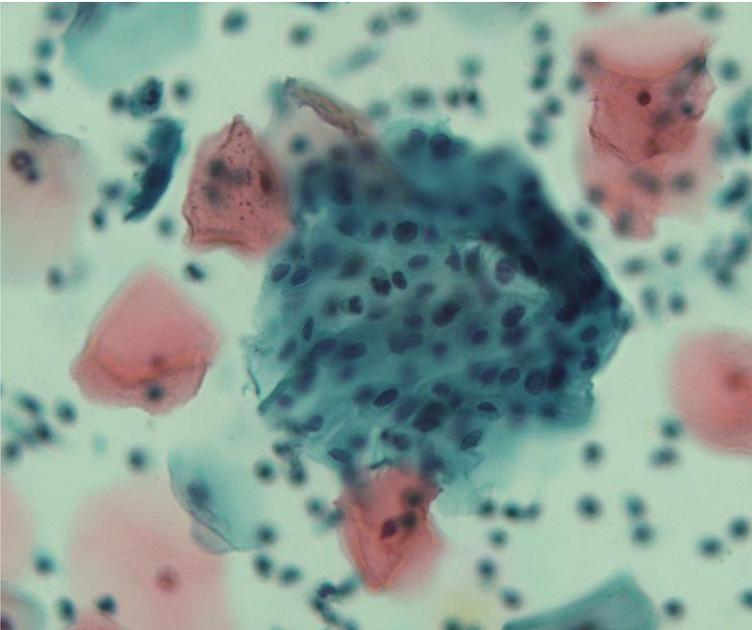


КС x 15

ASCUS

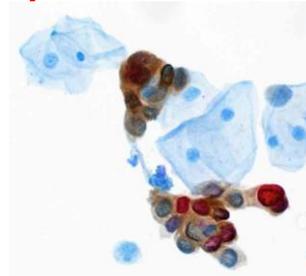


ASCUS атипия неясного значения



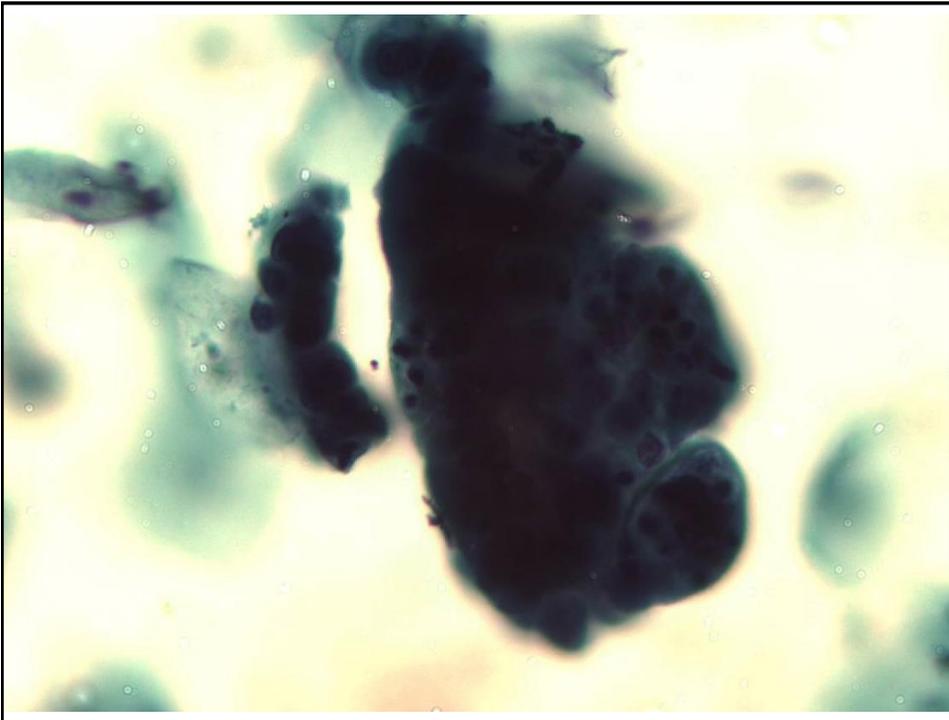
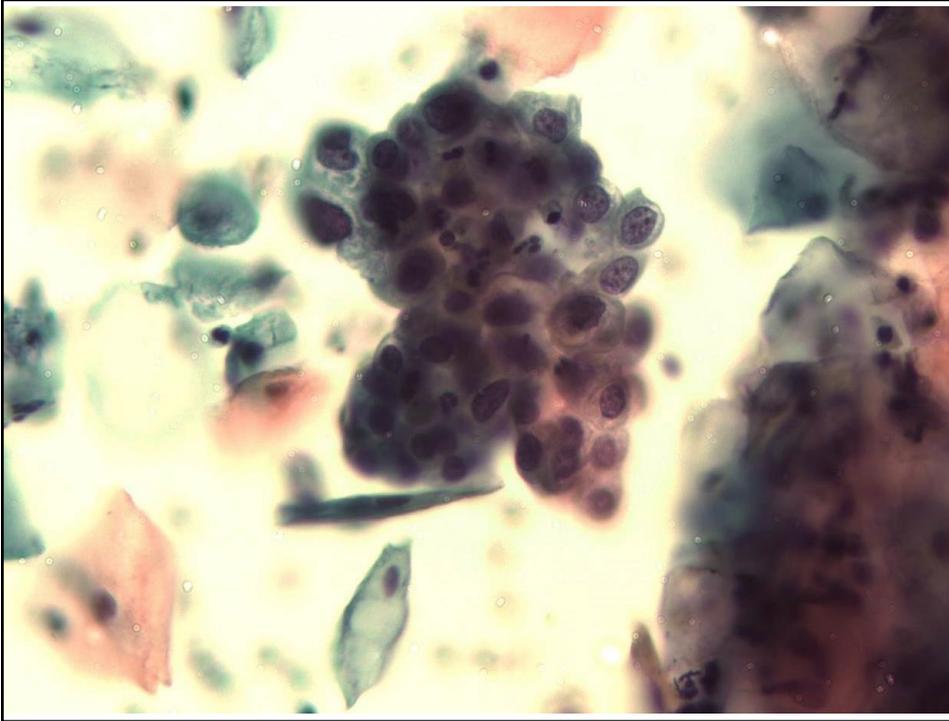
ВПЧ 16, 51 Ig 6,1

Белки p16/Ki67 совместная
экспрессия **обнаружена**



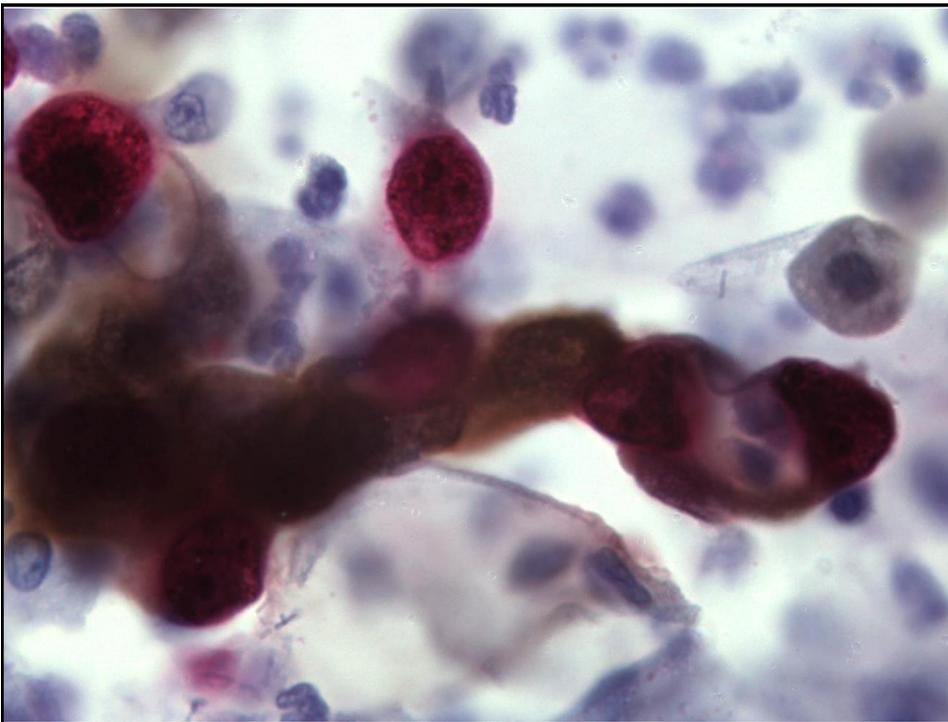
Гистологическое заключение:
CIN-2

Пациентка 29 лет
«Эрозия» шейки матки, полипоз
эндометрия



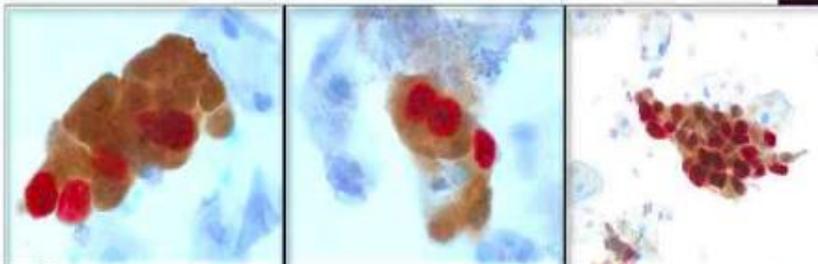
Цитологическое исследование:
HSIL/AGC/ NILM-HSV?

ВПЧ интегрированная (!) форма 18 Ig 6,2



Гистологическое исследование:
найден маленький
деформированный участок,
подозрительный по наличию
аденокарциномы

- Тест «коэкспрессия онкобелков p16/Ki67» полезен для дополнительной сортировки положительных результатов ВПЧ-теста или ВПЧ-ПАП-теста
- Высокая чувствительность и специфичность теста в отношении CIN2+ соблюдается только при выявлении совместной экспрессии p16/Ki67



031216 - Коэкспрессия онкобелков p16/Ki67

Стоимость услуги:

5890 руб.*

ПОКАЗАНИЯ К ИССЛЕДОВАНИЮ:

Показаниями для назначения анализа 031216 «Коэкспрессия онкобелков p16/Ki67» являются следующие результаты услуги 031212 «ВПЧ-ПАП-тест жидкостный»:

- ВПЧ-тест – положительный (≥ 3 Ig) (выявлен любой тип ВПЧ), ПАП-тест – ASCUS/ASC-H/L-SIL/H-SIL
- ВПЧ-тест – выявлены 16/18/45 типы (≥ 3 Ig), ПАП-тест – NILM (норма)
- ВПЧ-тест – отрицательный (не выявлен ВПЧ), ПАП-тест \geq H-SIL (CIN2/3).

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ:

Референсные значения (вариант нормы):

Параметр	Референсные значения	Единицы измерения
Коэкспрессия онкобелков p16/Ki67	Не обнаружена	

Положительный результат исследования «Коэкспрессия онкобелков p16/Ki67» является показанием для более тщательного обследования женщины на наличие предраковых поражений шейки матки с помощью кольпоскопического и гистологического исследования.

Благодарю за внимание!



glyoshkina@yandex.ru

+79162226234