

**S T A D I A**

HELSINGIN AMMATTIKORKEAKOULU

# **Suuren riskin HPV:n osoittaminen nestemäisistä gynekologisista irtosolunäytteistä (ThinPrep<sup>®</sup>) in situ hybridisaatio -menetelmällä**

Kätilöopiston sairaalan patologian laboratoriossa

Bioanalytiikan koulutusohjelma,  
bioanalyttikko  
Opinnäytetyö  
12.11.2007

---

Jenni Winter



Koulutusohjelma		Suuntautumisvaihtoehto	
Bioanalytiikan koulutusohjelma			
Tekijä/Tekijät			
Jenni Winter			
Työn nimi			
Suuren riskin HPV:n osoittaminen nestemäisistä gynekologisista irtosolunäytteistä (ThinPrep®) in situ hybridisaatio -menetelmällä			
Työn laji	Aika	Sivumäärä	
Opinnäytetyö	Syky 2007	49 + 6 liitettä	
<p>TIIVISTELMÄ</p> <p>Kohdunkaulan syöpä on maailmanlaajuisesti naisten toiseksi yleisin syöpätauti. Tutkimuksilla on osoitettu, että 99,7 %:ssa tapauksista taustalla on suuren riskin HPV-infektio (HR-HPV). HPV-infektio voidaan todeta naisilta otettavasta gynekologisesta irtosolunäytteestä sen tunnusomaisten solujen, koilosyyttien, ansiosta. Syövän esiasteissa alkaa koilosyyttien määrä kuitenkin vähentyä. Pahimmissa muutoksissa koilosyyttejä ei enää ole nähtävissä, jolloin HPV-infektio saadaan varmistettua kudospäätteestä in situ hybridisaatio -menetelmällä (ISH). ISH on virus-DNA -värjäys.</p> <p>Tavallisen gynekologisen irtosolunäytteen rinnalle on kehitetty nestemäinen gynekologinen irtosolunäyte. Suomessa menetelmä on vielä tutkimusasteella, mutta muualla maailmassa sen käyttö on yleistynyt. Tutkimuskäytössä on myös polymeraasiketjureaktio -menetelmä (PCR), jolla voidaan luotettavasti tutkia suuren riskin HPV-infektion läsnäolo nestemäisestä gynekologisesta irtosolunäytteestä. Nestemäinen gynekologinen irtosolunäyte lienee tulevaisuutta myös Suomessa. Uuden menetelmän yleistyessä on mielekästä tutkia sen käyttömahdollisuuksia lisää.</p> <p>Opinnäytetyössäni tutkin, voidaanko potilaiden nestemäisistä gynekologisista irtosolunäytteistä todeta ISH-menetelmällä suuren riskin HPV-DNA:ta. Tutkimukseni käsitti 29 potilastapausta, joista kymmenellä (10) oli sytologisena luokituksena ASC-US, kymmenellä (10) LSIL ja yhdeksällä (9) ASC-H/HSIL. Näiltä potilailta oli määritetty HR-HPV-infektio nestemäisistä gynekologisista irtosolunäytteistä myös PCR-menetelmällä. Luotettavuuden lisäämiseksi tein myös potilaiden histologisista näytteistä ISH:n, jonka jo tiedetään olevan toimiva menetelmä. Lisäksi tein proteiinivärjäykset p16INK4a:n ja Ki-67:n. Näiden proteiinien tiedetään lisääntyvän silloin, kun kyseessä on suuren riskin HPV-infektio.</p> <p>Kaikki sytologisista näytteistä tehdyt in situ hybridisaatio -värjäykset antoivat negatiivisen tuloksen. Toisin sanoen HPV-DNA:ta ei voitu havaita. PCR-menetelmällä saatujen tulosten sekä myös kudospäätteistä tehtyjen ISH-, p16INK4a- ja Ki-67 -värjäysten perusteella tulosten olisi pitänyt olla positiivisia.</p> <p>Kaikkien saatujen tulosten perusteella voidaan todeta, että in situ hybridisaatio -värjäys ei toiminut odotetulla tavalla nestemäisistä gynekologisista irtosolunäytteistä. In situ hybridisaatio on siis nykykäytännöllä toimimaton menetelmä ja se vaatii lisäselvittelyä.</p>			
Avainsanat			
HR-HPV, gynekologinen irtosolunäyte, in situ hybridisaatio, p16INK4a, Ki-67			



Degree Programme in		Degree	
Biomedical Laboratory Science		Bachelor of Health Care Service	
Author/Authors			
Jenni Winter			
Title			
Detection of High Risk HPV by In Situ Hybridization Assay in Liquid Based Cytology Samples (ThinPrep®)			
Type of Work	Date	Pages	
Final Project	Autumn 2007	49 + 6 appendices	
<p>ABSTRACT</p> <p>Cervical cancer is the second common women's cancer disease worldwide. With studies it has been shown that 99,7 % of the cases have a background of High-Risk HPV-infection (HR-HPV). HPV-infection can be found in a woman's gynecological samples. There could be seen distinctive cells called koilocytes. In the prestages of the cancer the number of koilocytes starts to decrease. In worst cases koilocytes cannot be seen anymore. In these cases HPV-infection can be confirmed with an in situ hybridization assay (ISH) in a tissue sample. ISH is a virus-DNA-staining.</p> <p>Besides the conventional gynecological pap smear a liquid based cytology (LBC) method has been developed. In Finland this method is still a research level but elsewhere this method has become more common. There is also a PCR assay which can reliably show the presence of a high-risk HPV-infection in liquid based samples. LBC may be the future method in Finland. If the new method becomes more common it is reasonable study it more.</p> <p>My final project studies the detection of HPV-DNA in situ hybridization assay in patient's liquid based cytology samples. I had 29 patient cases. Ten (10) patients had a cytological classification ASC-US, ten (10) had LSIL and nine (9) had ASC-H/HSIL. These patients already had HR-HPV results by PCR assays. For creating more reliability to the study I performed ISH-stainings in tissue samples which already had been shown to be a workable method. I also performed protein stainings p16INK4a and Ki-67. The expression of these proteins are proliferate in a high-risk HPV.</p> <p>All samples made by cytological in situ hybridization assays gave negative results. Otherwise the HPV-DNA could not be detected. Based on the results of PCR assays, tissue ISH, p16INK4a and Ki-67 cytological in situ hybridization should have been positive. Based on all the results I found out that in situ hybridization did not work in liquid based samples as was expected. In situ hybridization is not suitable with the existing working methods and it requires more researching.</p>			
Keywords			
HR-HPV, pap smear, in situ hybridization, p16INK4a, Ki-67			

## SISÄLLYS

1 JOHDANTO	1
2 IHMISEN PAPILLOOMAVIRUS JA KOHDUNKAULAN SYÖPÄ	2
2.1 Ihmisen papilloomavirus (HPV)	3
2.2 Suuren ja pienen riskin HPV	3
2.3 HPV-infektion yhteys kohdunkaulan syöpään	3
3 GYNEKOLOGINEN IRTOSOLUNÄYTE	5
3.1 Perinteinen gynekologinen irtosolunäyte	5
3.2 Nestemäinen gynekologinen irtosolunäyte (ThinPrep®)	7
4 GYNEKOLOGISEN IRTOSOLUNÄYTTEEN TUTKIMINEN	9
4.1 Solut	10
4.1.1 Gynekologisen irtosolunäytteen solut	10
4.1.2 Solumuutokset HPV-infektiossa	11
4.2 Luokittelu	12
4.2.1 Papanicolaoun luokitus	12
4.2.2 Bethesdan luokitus	13
5 IN SITU HYBRIDISAATIO -MENETELMÄ (ISH)	14
6 MUUT HPV-INFEKTION LIITTYVÄT TUTKIMUSMENETELMÄT	17
6.1 Proteiinivärjäykset p16 <sup>INK4a</sup> ja Ki-67	17
6.2 HR-HPV PCR	19
7 TUTKIMUSONGELMAT	21
8 TUTKIMUKSEN SUORITTAMINEN	23
8.1 Näytteiden keräys ja identifiointi	23
8.2 Näytelasien valmistus	25
8.2.1 Histologiset näytelasit	25
8.2.2 Sytologiset näytelasit (ThinPrep®)	26
8.3 Värjäykset	27
8.3.1 p16 <sup>INK4a</sup> - ja Ki-67 -värjäykset	27
8.3.2 In situ hybridisaatio histologisista näytteistä	29
8.3.3 In situ hybridisaatio nestemäisistä gynekologisista irtosolunäytteistä	31
9 TULOKSET JA POHDINTAA	32
9.1 In situ hybridisaation tulokset nestemäisistä gynekologisista irtosolunäytteistä	36
9.2 p16 <sup>INK4a</sup> - ja Ki-67-tulosten vastaavuus sytologiseen in situ hybridisaatioon	39
9.3 HR-HPV PCR:n, sytologisen ja histologisen in situ hybridisaation vastaavuus	40
9.4 Yhteenveto	41
10 LOPUKSI	42
LÄHTEET	45
LIITTEET 1-6	

## 1 JOHDANTO

HPV (human papillomavirus) eli ihmisen papilloomavirus on useimmiten sukupuoliteitse tarttuva virus. HPV on suuren kiinnostuksen ja tutkimuksen alaisena, sillä se on keskeinen tekijä kohdunkaulan syövän synnyssä. (Auvinen 2006.) Kaikki papilloomavirukset eivät aiheuta genitaalialueiden infektoita, vaan osa saa aikaan esimerkiksi jalkapohjasyylä. Tietyt papilloomavirustyytit tarttuvat kuitenkin juuri sukupuolikontaktissa ja edes kondomin käyttö ei välttämättä estä tartuntaa. (Burd 2003: 3.)

Läheskään kaikki henkilöt eivät HPV-infektiosta huolimatta sairastu syöpään. Vain pieni osa heistäkin, joilla todetaan pitkäkestoinen suuren riskin HPV:n aiheuttama infektio, sairastuu lopulta syöpään. HPV-infektio voidaan todeta naisilta otettavasta gynekologisesta irtosolunäytteestä sen tunnusomaisten solujen, koilosyyttien, ansiosta. (Grénman 2007: 5.)

Kohdunkaulan syöpä on maailmanlaajuisesti naisten toiseksi yleisin syöpätauti. Jo yksin Suomessa löydetään vuosittain 170–200 uutta kohdunkaulan syöpää. (Auvinen 2006.) Maailmanlaajuisesti luku on yli puoli miljoonaa (Grénman 2007: 4). Suomessa naisten kohdunkaulan syövästä johtuva kuolleisuus on huomattavasti laskenut käytössä olevasta joukkoseulonnasta johtuen ja sen yleisyys on matalampia koko maailmassa. Joukkoseulonnan vaikuttavuus on siis huomattavaa. Kohdunkaulan syövän muutoksia ja esiasteita toki todetaan edelleen, mutta varhaisessa vaiheessa löydettyinä niitä pystytään hoitamaan. (Suomen Syöpärekisteri 2007.)

Vaikka joukkoseulonnat ovat huomattavasti laskeneet syöpäkuolleisuutta ja uusien kohdunkaulan syöpien ilmaantuvuutta, näyttää siltä, että tautitapaukset ovat jossain määrin taas nousussa. Huomattavaa on se, että syöpä todetaan yhä nuoremmilla. Riskitekijöitä kohdunkaulan syövän ilmaantumiseen ovat muun muassa tupakointi, varhain aloitettu sukupuolielämä sekä useat sukupuolikumppanit. (Anttila – Pukkala – Nieminen – Hakama 1998: 1119 - 1123; Suomen Syöpärekisteri 2007.) Etenkin nuorilla alle 17-vuotiailla kohdunkaulan alue on haavoittuvampaa, joten tartunnan mahdollisuus kasvaa (Grénman 2007: 5).

Uutena menetelmänä kohdunkaulan syövän seulonnassa on perinteisen gynekologisen irtosolunäytteen rinnalle tullut nestemäinen gynekologinen irtosolunäyte eli niin sanottu

nestepapa. Vaikka nestemäinen gynekologinen irtosolunäyte onkin Suomessa vasta keiluasteella, on se muualla maailmassa jo laajemmassa käytössä. Yhdysvalloissa FDA (Food and Drug Administration) suosittelee nestemäistä gynekologista irtosolunäytettä. (Vesterinen 2004: 45.) Nestemäisen gynekologisen irtosolunäytteen erinomaisuus piilee siinä, että yhdestä näytteenottokerrasta ja näytteestä voidaan tehdä useampia tutkimuksia sekä värjäyksiä. Perinteisessä irtosolunäytteessä solut levitetään näytteenottovälineistä yhdelle näytelasille, joka siis voidaan värjätä vain kerran. (Laurila 2007: 9.)

Helsingin- ja Uudenmaan sairaanhoitopiirissä on Naistensairaalassa menossa kolposkopia-HPV-tutkimus. Tutkimuksen tarkoituksena on selvittää voidaanko HPV-testauksen avulla suoraan löytää kolposkopiaa ja hoitoa tarvitsevat potilaat. Tähän tutkimukseen liittyy myös nestemäisen gynekologisen irtosolunäytteen otto ja tutkimus. (Tutkimussuunnitelma 2005.)

Omassa tutkimuksessani selvitän nestemäisen gynekologisen irtosolunäytteen soveltuvuutta HPV-diagnostiikkaan. Työssäni tutkin, voidaanko nestemäisestä gynekologisesta irtosolunäytteestä osoittaa suuren riskin HPV-infektio. Tutkimuksen luotettavuuden kannalta teen saman potilaan histologisista näytteistä, tutkitusti luotettavia menetelmiä käyttäen, myös muita värjäyksiä. Tutkimukseni suoritan Helsingin ja Uudenmaan Sairaanhoitopiiriin kuuluvan Kättilöopiston sairaalan patologian laboratoriossa (HUSLAB), josta myös sain opinnäytetyöni aiheen. Työni ohjaajina laboratoriossa toimivat patologian erikoislääkäri, dosentti Jussi Tarkkanen sekä laboratoriohoitajat Susanna Ihalainen (bioanalytikko, AMK) ja Leena Sulka.

## 2 IHMISEN PAPILLOOMAVIRUS JA KOHDUNKAULAN SYÖPÄ

1970-luvulla alkoi eri papilloomavirusten tunnistus. Samoihin aikoihin alettiin epäillä syy-yhteyttä ihmisen papilloomavirusten ja genitaalialueiden syöpien välillä. (Aaltonen – Hiltunen-Back – Paavonen 2002: 1388.) Tutkimukset jatkuvat vilkkaana tänäkin päivänä (Auvinen 2007).

## 2.1 Ihmisen papilloomavirus (HPV)

Virus on erittäin resistentti. Se kestää hyvin niin kuumuutta kuin kuivuuttakin. Papilloomaviruksen kestävyydestä kertoo myös se, että se voi tartuttaa jopa kontaminoitujen vaatteiden välityksellä. (Burd 2003: 3.)

Papilloomavirukset kuuluvat kansainvälisen virusluokituksen mukaan *Papillomaviridae* -ryhmään (Patterson 2007: 1601). HPV on pieni DNA-virus (Paavonen 2007: 10), joka koostuu perintöaineesta sekä proteiinihuoaresta (Grénman 2007: 4). Papilloomaviruksen DNA on kaksisäikeinen ja rengasmaisen. Virus on kooltaan noin 8 000 emäspäriä ja se kykenee infektoimaan kerrostuneen levyepiteelin basaalisoluja. (Aaltonen ym. 2002: 1388; Burd 2003: 4.)

## 2.2 Suuren ja pienen riskin HPV

Suuren tai pienen riskin HPV:ksi luokitellaan sen perusteella, minkälainen yhteys syöpään kyseessä olevalla virustyyppillä on (Paavonen 2001: 288). Kondyloomia ja lieviä solumuutoksia saa aikaan pienen riskin HPV-tyypit, kun taas suuren riskin HPV-tyypit voivat aiheuttaa muutoksia syövän suuntaan. Pienen riskin luokkaan kuuluvat tunnetuimpina tyypit 6 ja 11 ja suuren riskin luokkiin tyypit 16 ja 18. (Auvinen 2006; Käypähoito 2006.)

Pienen riskin HPV:sta käytetään lyhennettä LR-HPV (Low-Risk HPV) ja suuren riskin HPV:sta lyhennettä HR-HPV (High-Risk HPV) (Käypähoito 2006).

## 2.3 HPV-infektion yhteys kohdunkaulan syöpään

Papilloomavirusinfektio saadaan useimmiten sukupuoliyhteydessä (Paavonen 2001: 288) ja kuten aikaisemmin todettiin; juuri suuren riskin papilloomavirus saattaa aiheuttaa syöpää. Walboomersin ym. (1999: 12) tekemän tutkimuksen mukaan 99,7 prosenttia kohdunkaulan syöivistä on peräisin suuren riskin HPV-infektiosta. Papilloomainfektio

on usein oireeton, joten virus saattaa päästä tekemään tuhojaan pidemmän aikaa. (Auvinen 2006.)

Viruksen geenit jaetaan E- ja L-ryhmiin (E = early, L = late) sen perusteella, missä vaiheessa lisääntymistä geenien toiminta tapahtuu (Aaltonen ym. 2002: 1388). Suuren riskin HPV-tyypit 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82 (Patterson 2007: 1602) kykenevät aiheuttamaan syöpää solujen muuttuessa kuolemattomiksi. Viruksen perimä voi integroitua isäntäsoluun, jolloin HPV:n kaksisäikeinen DNA-rengas avautuu ja virus menee osaksi isäntäsolun perimää. Kuolemattomuuteen vaikuttavat pääasiassa suuren riskin viruksen onkogeeneit E6 ja E7. Nämä onkogeeneit pystyvät sitomaan DNA:n korjauksessa tarvittavia isäntäsolun proteiineja itseensä ja täten isäntäsolun oma virheiden korjaus ja kasvun rajoittaminen eivät toimi. Suuren riskin virus pakottaa soluja jakautumaan ja näin virus kykenee monistamaan omaa perimäänsä. L-geenien tehtävänä on koodata viruksen rakenneproteiineja. Solun muuttuminen syöpäsoluksi on monivaiheista, mutta mutaatioiden kertyessä mahdollista. (Aaltonen ym. 2002: 1388; Syrjänen 2006: 308.)

Kohdunkaulan pintaepiteelin vauriot voivat siis muokkautua vähitellen syöväksi. Näitä välivaiheita eli esiastemuutoksia kutsutaan histologiassa dysplasioiksi. Esiastemuutokset jaotellaan WHO:n (World Health Organization) mukaisesti eri dysplasialuokkiin, mutta dysplasioiden rinnalla tai niiden sijasta käytetään myös CIN-luokitusta. (Mäenpää – Vesterinen 2001: 211; Lyly 1985: 14.) Sytologinen luokitus on myös tärkeä, sillä sen perusteella päädytään joko ottamaan potilaalta kudoksenäyte tai jäädään seuraamaan tilannetta (HUS 2006). Lisää Bethesdan sytologisesta luokituksesta kappaleessa 4.2.2.

*Lievä dysplasia* (**Dysplasia levis**, DL) vastaa luokitusta CIN I. Muutoksia nähdään pintaepiteelin syvemmissä osissa. Tumamuutokset ovat lieviä. (Kauraniemi 1994: 74; Lyly 1985: 14.) Muutos vastaa Bethesdan mukaista sytologista luokitusta LSIL (Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion) (Vesterinen 2004: 42).

*Keskivahva dysplasia* (**Dysplasia moderata**, DM) vastaa luokitusta CIN II. Tässä muutokset ulottuvat edellistä syvemmälle, noin pintaepiteelin puoliväliin asti. (Kauraniemi 1994: 74; Lyly 1985: 14.) Muutos vastaa Bethesdan mukaista sytologista luokitusta HSIL (High-grade Squamous Intraepithelial Lesion) (Vesterinen 2004: 42).



*Vahva dysplasia* (**Dysplasia gravis**, DG) ja *alkava syöpä* (**Carsinoma in situ**, CIS) vastaavat luokitusta CIN III. Näissä muutokset ulottuvat lähes pintaan tai pintaan asti. Mitooseja voidaan nähdä epiteelin pinnassa asti. (Kauraniemi 1994: 74; Lyly 1985: 14.) Muutos vastaa Bethesdan mukaista sytologista luokitusta HSIL (High-grade Squamous Intraepithelial Lesion) (Vesterinen 2004: 42).

### 3 GYNEKOLOGINEN IRTOSOLUNÄYTE

Gynekologista irtosolunäytettä tarkastelemalla kyetään toteamaan mahdolliset solumuutokset. Tarkoituksena on löytää mahdollisia esiastemuutoksia, joista voi kehittyä ajan myötä syöpä. Epänormaalin näytteen perusteella voidaan päätyä ottamaan potilaalta myös kudoksenäyte. (Grénman 2007: 5; Nieminen 2001: 167.)

#### 3.1 Perinteinen gynekologinen irtosolunäyte

Gynekologisen irtosolunäytteen näytteenotossa vaaditaan huolellisuutta. Näytettä on saatava riittävä määrä ja oikeista paikoista, jotta tulkinta olisi luotettavaa. (Kauraniemi – Vuopala 1994: 19.) Lisäksi on tärkeää sivellä solut varovasti näytelasille. Solujen rikkoutuminen hankaloittaa diagnosointia (Sulka 2007).

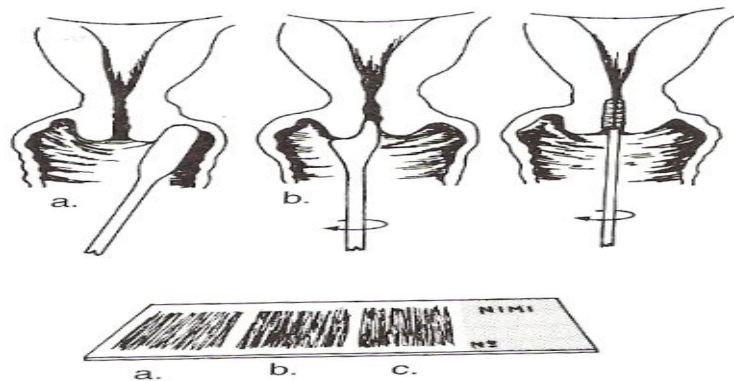
Gynekologinen irtosolunäyte, eli kansan suussa vakiintunut papanäyte, otetaan kolmesta eri kohdasta genitaalialueelta ja sivellään yhdelle näytelasille ennalta sovitussa (pysyvässä) järjestyksessä (ks. kuvio 1.):

Ensimmäinen näyte eli **vaginanäyte** (a.) otetaan vaginan taka- ja sivupohjukoista. Näyte levitetään nimestä katsoen kauimmaiseen päähän näytelasia kevyesti sivelemällä. Tarkoituksena on saada yhden solukerroksen paksuinen näyte. Turhaa hankaamista tulee välttää, jotta solut eivät rikkoontuisi. (HUSLAB 2006a: 1; Kauraniemi – Vuopala 1994: 19.)

Toinen näyte eli **portionäyte** (b.) otetaan kohdunnapukasta. Näytettä on tärkeä saada junktioalueelta (levy- ja lieriöepiteelin raja-alue), joka fertiili-ikäisillä naisilla on usein

näkyvässä vaalean ja tummemman epiteelin rajana. Vaihdevuosien jälkeen junktioalue vetäytyy usein kohdunkaulakanavaan. Näyte levitetään näytelasin keskelle. (HUSLAB 2006a: 1; Kauraniemi – Vuopala 1994: 19.)

Kolmas näyte eli **endocervixnäyte** (c.) otetaan kohdunkaulakanavasta. Näyteharja työnnetään kanavaan niin syväälle, kuin se kevyesti työntämällä menee. Näyte levitetään näytelasin hiospäiseen reunaan. (HUSLAB 2006a: 2; Kauraniemi – Vuopala 1994: 20.)



KUVIO 1. Gynekologisen irtosolunäytteen näytteenottoaikat. a. Vagina b. Portio c. Endocervix. (Kauraniemi – Vuopala 1994: 20.)

Niukahko verenvuoto näytteenoton aikana ei haittaa arviointia, mutta runsaana se saattaa peittää alleen tutkittavia soluja. Näytteenottoa ei siis suositella kuukautisten aikaan. (HUSLAB 2006a 2; Kauraniemi – Vuopala 1994: 19.)

Kun kaikki näytteet on otettu ja levitetty lasille, tulee lasi laittaa välittömästi fiksoitumaan eli kiinnittymään. Näytelasi laitetaan fiksoitumaan 96 prosentista etanolia sisältävään astiaan tai sen sijaan voidaan käyttää fiksaatiosumutetta. Mikäli näyte pääsee kuivahtamaan, solujen morfologia kärsii ja värjäytyvyys heikkenee. Tällaisessa tapauksessa solujen yksityiskohtia on vaikea tulkita ja se saattaa osaltaan vaikuttaa sytologisen diagnoosin tarkkuuteen. (HUSLAB 2006a: 3; Kauraniemi – Vuopala 1994: 21.) Näytelasin tulee olla fiksaatioliuoksessa vähintään 20 minuuttia, jotta fiksoituminen ehtii tapahtua. Mikäli näytteet eivät ole kiinnittyneet kunnolla, saattaa värjäyksessä tulla ongelmia näytteiden osittain huuhtoutuessa lasilta pois. (Kauraniemi – Vuopala 1994: 21.)

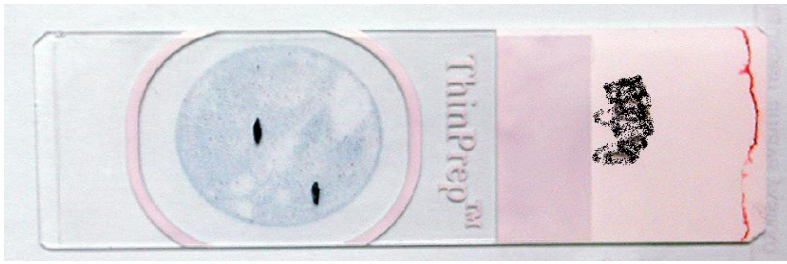
Solut värjätään laboratoriossa Papanicolaoun värjäyksellä (ks. liite 1) (Värjäysohje 2007).

### 3.2 Nestemäinen gynekologinen irtosolunäyte (ThinPrep<sup>®</sup>)

Perinteisen gynekologisen irtosolunäytteen rinnalle on kehitelty nestemäinen gynekologinen irtosolunäyte (LBC, Liquid Based Cytology), jonka on osoitettu vähentävän vääriä negatiivisia tulkintoja. Nestemäisessä gynekologisessa irtosolunäytteessä solut kerätään samoin kuin perinteisessäkin gynekologisessa irtosolunäytteessä, mutta aluslasille sivelyn sijasta näytteenottolastaimessa ja -harjassa olevat solut huljutellaan näytepurkkiin. (Burd 2003: 8; Tarkkanen 2002: 50.) Näytepurkissa on valmiina alkoholifiksaatio-liuos (PreservCyt<sup>®</sup>), joka on metanolipohjaista (vertaa: perinteisen irtosolunäytteen fiksaatioaineena etanoli). Solujen morfologia ja struktuuri pysyvät nestemäisessä gynekologisessa irtosolunäytteessä parempina kuin perinteisessä, sillä solujen kuivumista ei ehdi tapahtua. (Burd 2003: 8; Cytyc 2007.)

Nestemäisen gynekologisen irtosolunäytteen ominaisuuksiin kuuluu näytteen puhtaus (Vesterinen 2004: 45). Fiksaatioliuoksen avulla näytteestä saadaan pois veri, lima ja muu ei-diagnostinen materiaali. Erityisen fiksaatioliuoksen vuoksi näyte voidaan ottaa myös kuukautisten aikaan, toisin kuin perinteisessä irtosolunäytteenotossa. (Cytyc 2007.) Fiksaatioliuos on myös bakteridisidistä; 15 minuutissa inaktivoituu lähes sataprosenttisesti seuraavat bakteerit: *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stafylococcus aureus* ja *Mycobacterium tuberculosis*. (Cytyc Corporation 2.4).

Nestemäinen näyte eroaa perinteisestä gynekologisesta irtosolunäytteestä myös solujen lokalisaation kannalta. Perinteisen solujen lasille sivelyn sijasta kaikki solut huuhdellaan fiksaatioliuokseen, jossa ne luonnollisesti sekoittuvat keskenään. Automaation hoidossa siirrostuksen näytepurkista näytelasille, on solujen lokalisaatio sattuman kauppaa. (Ihalainen 2007.) Näin ei siis voida suoraan sanoa, missä tietystä paikasta otetut solut lasilla sijaitsevat. Tuloksena näytelasilla on siisti pyöreä alue, jossa solut sijaitsevat (ks. kuvio 2). Lisäksi nestemäiseen näytteeseen tottumisen jälkeen (vaikuttaa pienentävästi solujen kokoon) mikroskopointi voi olla nopeampaa juuri näytteen puhtauden takia. (Cytyc 2007; Sulka 2007.)



KUVIO 2. Kuva ThinPrep®-näytelasista. (Mukaillen Kekkonen 2006.)

Solujen siirto näytekupista lasille tapahtuu siis laboratorioissa automaatiota hyväksikäyttäen. Kätilöopiston patologian laboratorioissa on tutkimuskäytössä Cytoc Corporationin ThinPrep® 2000 -laite (ks. kuvio 3), joka valmistaa nestemäisistä irtosolunäytteistä näytelasit. Yhdestä näytteestä voidaan tarpeen mukaan tehdä useampia näytelaseja, joten muitakin tutkimuksia voidaan Papanicolaoun värjäyksen lisäksi tehdä. Tosin vuonna 2004 julkaistussa tutkimuksessa (Schiller ym. 2004: 543) todetaan, että nestemäisestä irtosolunäytteestä tehdyt näytelasit eivät ole aina tasalaatuisia verrattaessa samasta näytteestä tehtyjä useampia näytelaseja. Tutkittaessa esimerkiksi HPV-positiivisuutta, ensimmäinen tehty näytelasi antaa suuremmalla todennäköisyydellä positiivisen tuloksen kuin myöhemmät tehdyt näytelasit (Schiller ym. 2004: 543).



KUVIO 3. ThinPrep® 2000 (Winter 2007).

Näytettä ja purkissa olevaa fiksaatioliuosta kuluu jokaisella käyttökerralla. Se kuinka paljon liuosta kuluu, riippuu näytteen solukkuudesta; mitä enemmän soluja on, sitä vähemmän laite fiksaatioliuosta ja näytettä kuluttaa. Fiksaatioliuokseen voidaan lisätä ns. lisäysliuosta (Cytolyt®), jotta nestepinta saadaan tarvittavalle tasolle. Näytekupissa on merkit, joiden välissä nestepinnan tulee olla. (Ihalainen 2007.) Koska näytettä kuluu jokaisella kerralla kun näytelasia valmistetaan, vähenee myös tutkittavien

solujen määrä. Alun perinkin hyvin vähän atyyppisiä soluja sisältävässä näytteessä saattaa nämä solut loppua jo muutaman näytelasin jälkeen. (Tarkkanen 2007.)

Näytelasit värjätään Papanicolaoun värjäyksen mukaan (ks. liite 2). Nestemäisen gynekologisen irtosolunäytteen värjäyksessä on pieni ero verrattuna perinteisen gynekologisen irtosolunäytteen värjäykseen (Värjäyskaavio).

Nestemäinen gynekologinen irtosolunäyte ei kuulu tutkimusvalikoimaan, vaan se on vielä tutkimusasteella. Nestemäinen gynekologinen irtosolunäyte otetaan vain potilailta, jotka osallistuvat käynnissä olevaan kolposkopia-HPV-tutkimukseen. Tämän tutkimuksen tarkoituksena on selvittää, voidaanko HPV-DNA -testauksen avulla löytää paremmin ja kustannustehokkaammin (kuin tällä hetkellä käytössä olevalla protokollalla) ne potilaat, jotka tarvitsevat kolposkopiaa ja hoitoa. Onnistuessaan tutkimus vaikuttaisi siihen, että hoitoa tarvitsemattomia potilaita ei turhaan ohjattaisi kolposkopiaan vaan hoito ja tutkimus suunnattaisiin suoraan potilaille, jotka sitä tarvitsevat. (Tutkimussuunnitelma 2005.)

Koska nestemäinen gynekologinen irtosolunäyte on vasta tutkimusasteella, näytelasien mikroskopointiin vielä totutellaan. Näytelaseja katsotaan Kätilöopistolla suhteellisen vähän sekä harvoin. Verrattaessa saman henkilön perinteisen gynekologisen irtosolunäytteen sytologista diagnoosia nestemäisen näytteen sytologiseen diagnoosiin, suuria eroja ei yleensä ole. Eroja toki löytyy, mutta ne ovat usein pieniä rinnakkaisluokkien välisiä eroja. (Ihalainen 2007; Sulka 2007.)

#### 4 GYNEKOLOGISEN IRTOSOLUNÄYTTEEN TUTKIMINEN

Sytologia eli soluoppi tutkii joko pintaepiteelistä irrotettuja tai siitä itsestään irronneita soluja. Solut kuvastavat niiden alkuperäisen paikan, kudoksen tilaa. Jotta tutkittaessa voidaan ottaa kantaa solujen hyvän- tai pahanlaatuisuuteen, on kyettävä tunnistamaan sukuelinten sytologiaa. Epiteelisolukko sukuelimissä on hormonaalisen vaikutuksen alaisena, joten esimerkiksi ikä ja kuukautiskierto vaikuttavat solukuvaan. (Vuopala – Koivuniemi 1994: 23.)

## 4.1 Solut

Solujen morfologiaa tarkastellaan monelta kantilta. Huomiota kiinnitetään muun muassa värjäytyvyyteen, solun kokoon, tumaan, tumakalvon paksuuteen sekä poimuiluun. (Timonen 1998: 83.)

Solujen lisäksi lasilta katsotaan myös leukosyyttien määrää, sieniä, alkueläimiä ja bakteereita sekä reaktiivisia muutoksia (Nieminen 2001: 258; Timonen 1998: 82).

### 4.1.1 Gynekologisen irtosolunäytteen solut

Värjättyssä gynekologisessa irtosolunäytelasissa tulisi näkyä kaikista kolmesta näytteenottoaikoista peräisin olevia soluja, huolimatta siitä kummalla menetelmällä (perinteinen vai neste) ne ovat otettuja. Itse asiassa riittävän näytteen kriteereinä pidetäänkin sitä, että näytteestä löytyy lieriösoluja. Junktioalue on tärkeä, sillä siellä sijaitsee useimmiten mahdollinen atypiasolukko. Tästä syystä on tärkeää saada mukaan soluja riittävän syvältä. (Syrjänen 1994: 71; Kauraniemi – Vuopala 1994: 19.)

**Vagina.** Levyepiteeli alkaa emättimen aukosta jatkuen aina portioon asti. Levyepiteelit ovat jaoteltavissa neljään kerrokseen, joista alimmaisena on tyvikerros. Tyvikerros on vain yhden solukerroksen paksuinen. Tästä tyvikerroksesta levyepiteelit uusiutuvat ja kasvavat vähitellen ylös eli pinnalle päin. (Vuopala – Koivuniemi 1994: 23 - 25.)

Tyvikerroksen solut eli basaalisolut ovat pieniä, pyöreähköjä ja niukkasytoplasmaisia soluja, joita harvoin näkyy papanäytteessä (Vuopala – Koivuniemi 1994: 25).

Syväkerrossolut sijaitsevat basaalisolujen päällä, pinnalle päin mentäessä. Kerroksia on useita ja muodoltaan solut ovat pyöreitä tai soikeita. Kooltaan solut ovat hieman suurempia kuin tyvisolut. (Vuopala – Koivuniemi 1994: 25.)

Keskikerrossolut ovat reilusti suurempia kuin alemmat solut. Näissä soluissa alkaa näkyä kulmikkuutta ja poimuilua. Mitä enemmän pinnalle päin tullaan, sitä enemmän sytoplasmaa on solun suurentuessa. Tumakoko pysyy lähes vakiona. (Vuopala – Koivuniemi 1994: 25 - 27.)

Pintakerrossolut ovat erilaistuneet eniten matkatessaan tyvikerroksesta kohti pintaa. Solut ovat suuria ja monikulmaisia. Tuma on pienempi kuin keskikerrossoluissa. Kypsyessään ja aivan pinnalle päästyään solut kuolevat ja irtoilevat itsestään. (Vuopala – Koivuniemi 1994: 25 - 27.)

**Portio.** Portionäytteessä solut voivat vaihdella. Joskus näytteessä saattaa olla ainoastaan levyepiteeliä, joka siis jatkuu vaginasta portioon asti. Toinen vaihtoehto on lieriöepiteelin löytyminen. Tällöin lieriöt tulevat näytteeseen endocervixin puolelta. Lisänä saattaa olla metaplastista levyepiteeliä, joka voi tulla junktioalueelta. (Vuopala – Koivuniemi 1994: 27.)

**Endocervix.** Endocervixsolut ovat lieriöepiteeliä ja solut ovat yhdessä kerroksessa. Lieriöepiteeliä on sekretorista (limaa erittävää) sekä värekarvallista. Solut ovat lieriömäisiä pitkuloita tai kennomaisen pyöreitä, riippuen osittain mistä avaruudellisesta kulmasta soluja katsellaan. Sekretorisissa lieriöissä tuma sijaitsee usein hieman enemmän tyviosassa kun taas värekarvallisissa lieriöissä tuma on kutakuinkin keskellä. (Vuopala – Koivuniemi 1994: 29.)

Joskus näytteestä saattaa löytyä endometriumsoluja. Solut ovat genitaalikanavan pienimpiä soluja. Sytoplasman osuus on pieni ja se on epätarkkarajainen. Gynekologisesta irtosolunäytteestä löytyessä solut ovat ehtineet olla irti kauan aikaa, joten niiden koko ja morfologia muuttuvat. Normaalisti endometriumsoluja saattaa näkyä näytteessä kuu-kautiskierron alkupuoliskolla. (Vuopala – Koivuniemi 1994: 33.)

#### 4.1.2 Solumuutokset HPV-infektiossa

Tyypillinen löydös HPV-infektiossa on koilosyytti. Tämä helposti tunnistettava solu on levyepiteelisolu, jonka tunnistamisen tekee helpoksi tuman ympärillä (sytoplasmassa) oleva kirkastuma-alue (*halo*). Koilosyytti nimi tulee Kreikan kielen sanasta *koilos*, joka tarkoittaa ontelomaista kirkastumaa. (Syrjänen 1994: 69 - 70.)

Koilosyytille on normaalia monitumaisuus sekä tumakoon suureneminen. Värjäytyvydessä saattaa myös esiintyä muutoksia. Koilosyytit sijaitsevat useimmiten portion epiteelissä. (Syrjänen 1994: 70.)

Syövän esiasteissa alkaa koilosyyttien määrä vähentyä. Mitä pahempi CIN-muutos, sitä vähemmän koilosyyttejä löytyy. CIN III -muutoksissa koilosyyttejä ei enää ole nähtävissä, joten HPV-infektion läsnäolo saadaan varmistettua kudoksenäytteen in situ hybridisaatiolla. (Syrjänen 1994: 71.)

## 4.2 Luokittelu

Luokiteltaessa gynekologisia näytteitä (sytologinen diagnoosi), käytetään pääasiassa Bethesda luokitusta. Joukkoseulontojen vastauksissa Bethesda rinnalla vastataan myös Papanicolaoun luokka, joskin HUSLAB ilmoittaa ohjekirjassaan käyttävänsä tulkintaan Bethesda 2001 -luokitusta (HUSLAB 2006b: 445 - 446.)

Stakesin vuoden 2005 alusta voimaan tullessa ohjeessa (*"Ilmoitus rintasyövän ja kohdunkaulasyövän joukkotarkastuksista"*) todetaan, että Papanicolaoun luokituksista ollaan siirtymässä Bethesda luokitukseen. Papanicolaoun luokitus on siis jäämässä pois gynekologisten irtosolunäytteiden vastauskäytännöissä. (Suomen syöpärekisteri 2007; Timonen 1998: 86.)

### 4.2.1 Papanicolaoun luokitus

Perinteiset Papanicolaoun luokat (papaluokat) ilmoitetaan roomalaisilla numeroilla I-V. Myöhemmin luokitukseen on lisätty luokka 0, joka kertoo näytteen riittämättömyydestä tai muusta ongelmasta, jonka vuoksi näytettä ei voida luotettavasti tutkia. Papanicolaoun luokat:

Luokka 0	Riittämätön näyte
Luokka I	Solukuva normaali (voi kuitenkin olla tulehdus, sieni, <i>Trichomonas vaginalis</i> )
Luokka II	Hyvänlaatuinen muutos (voi olla esimerkiksi ärsytysatypiaa tai viruksesta johtuvaa muutosta)
Luokka III	Dysplasian suhteen epäilyttävä solumuutos (lieviä tai kohtalaisia solumuutoksia)



Luokka IV Dysplasian suhteen vahvasti epäilyttävä muutos (vahvoja solumuutoksia)

Luokka V Syöpäsoluja (selkeitä syöpäsoluja)

Papanicolaoun luokitusta käytetään gynekologian lisäksi myös muiden elinten sytologiseen luokitukseen. (Stenbäck – Koivuniemi 1994: 12 - 15; Timonen 1998: 86; Vesterinen 2004: 36 - 37.)

#### 4.2.2 Bethesdan luokitus

Bethesdan järjestelmä (TBS, The Bethesda System) luotiin yhdysvalloissa 1989 American Society for Colposcopy and Servical Pathology:n (Yhdysvaltain kolposkopia- ja kohdunkaulan patologia yhdistys) tuella (Vesterinen 2004: 40). Bethesdan luokituksen tarkoitus on helpottaa laboratorion ja klinikon välistä kommunikointia (Kurman – Solomon 1994: ix) ja se luotiin tarpeeseen yhdenmukaistaa sytologisen luokituksen järjestelmä. Kritiikkiä perinteistä Papanicolaoun luokitusta vastaan oli antanut lähinnä Yhdysvallat siitä, että eri maiden välinen tulosten vertailtavuus on hankalaa syntyneiden modifikaatioiden takia. (Syrjänen 1994: 62; Vesterinen 2004: 40.)

Bethesdan luokitusta on jouduttu ajan myötä parantelemaan. Ensin vuonna 1991 ja toisen kerran vuonna 2001. Vuoden 2001 uudistamiseen osallistui WHO, Kansainvälinen sytologiyhdistys (International Academy of Cytology) ja FDA. (Vesterinen 2004: 40.)

Bethesdan luokituksessa ilmenee näytteen tutkittavuus (mm. niukka näyte, paksu näyte, tulehdus häiritsee) sekä yleinen löydös (ei epiteelisoluatypiaa, epiteelisoluatypiaa). Leveyepiteeliatypiat jakautuvat vaurion mukaan omiin luokkiinsa:

ASC-US	Merkitykseltään määrittelemätön muutos (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance)
LSIL	Lievä epiteelisoluvaurio (Low grade Squamous Intraepithelial Lesion)
ASC-H	Merkitykseltään määrittelemätön muutos, vahva epiteelivaurio ei poissuljettavissa (Atypical Squamous Cells, cannot exclude High grade squamous cell intraepithelial lesion)
HSIL	Vahva epiteelivaurio (High grade Squamous Intraepithelial Lesion)

Lieriöepiteelin vauriot ilmaistaan sijaintipaikkansa mukaisilla luokilla esimerkiksi neoplasiaepäily endocervixsoluissa tai endometriumsoluissa, endocervixin adenokarsinoma in situ, endocervixin adenokarsinooma, endometriumin adenokarsinooma. Lisäksi Bethesdaassa otetaan muun muassa kantaa infektoihin sopiviin löydöksiin sekä reaktiivisiin muutoksiin. (Solomon 2001; Vesterinen 2004: 40 - 42.)

## 5 IN SITU HYBRIDISAATIO -MENETELMÄ (ISH)

In situ hybridisaatio (ISH) on menetelmä, jonka avulla voidaan potilaan näytteestä (kudos- tai solunäyte) havainnoida tiettyjä nukleiinihapposekvenssejä. Menetelmä sallii yksittäisten spesifisten kohteiden havainnoinnin soluissa, säilyttäen kuitenkin samalla solujen ja kudoksen morfologian. (Harvey 2006: 89).

Hybridisaatiolla tarkoitetaan kahden erillisen yksijuosteisen nukleiinihapponauhan yhteen liittymistä. Tämä voi tapahtua vain silloin, kun nauhat ovat toisilleen komplementaariset eli erilaiset, mutta toisilleen sopivat. DNA-nauhoilla on luontainen kyky muodostua kaksijuosteisiksi silloin, kun olosuhteet ovat myönteiset. Tällöin nauhoissa olevat nukleotidit pariutuvat vastinemäksensä kanssa (G-C, A-T). (Kononen – Pelto-Huikko 1998: 176; Suominen – Ollikka 2004: 114.)

Kätilöopiston sairaalan patologian laboratoriossa on käytössä in situ hybridisaatiomenetelmä, joka on virus-DNA -värjäys. Käytössä on suuren riskin HPV tutkimus, jolla voidaan todeta, löytyykö kudoksenäytteestä suuren riskin HPV:ta (Ventana a). Värjäys suoritetaan BenchMark<sup>®</sup>-laitteella (Ventana Medical Systems) ja käytössä on ISH iVIEW<sup>™</sup><sub>Blue</sub> Plus Detection Kit -reagenssipakkaus. Lisäksi tarvitaan koetin sekä proteaasi ja taustaväri. (Ventana a.)

In situ hybridisaation -menetelmän pääosiot:

**Denaturointi**, jossa DNA-nauhassa olevien vastinemästen väliset vetysidokset katkeavat ja kaksijuosteinen nauha saatetaan yksijuosteiseksi. Tämä saadaan aikaan aikaan korkealla lämpötilalla (~100°C). Normaalisti denaturaatio on palautuva eli reversiibeli tila. Kun

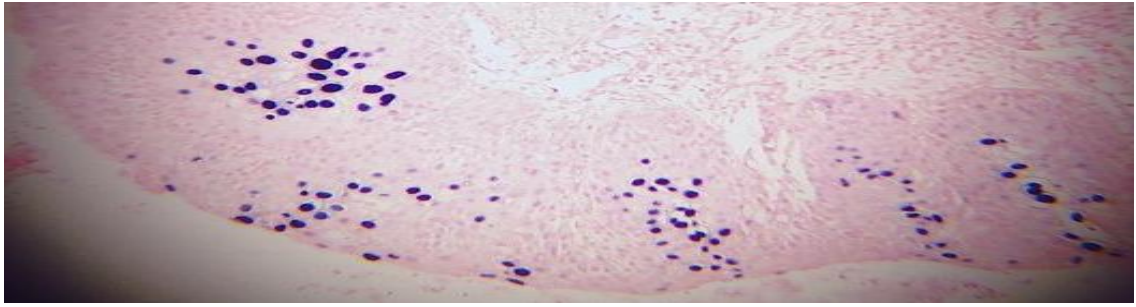
lämpötila taas laskee, toisistaan eronneet vastinnauhat liittyvät jälleen yhteen. (Suominen – Ollikka 2004: 114; Ventana b.)

**Hybridisaatio.** Hybridisaatio tapahtuu siten, että leimattu koetin lisätään ja lämpötilaa laskemalla saadaan komplementaarinen leimattu yksijuosteinen koetinnauha tarttumaan näytteen yksijuovaiseen nukleiinihapponauhaan. Näin nauhoista saadaan taas kaksijuosteisia. (Suominen – Ollikka 2004: 114; Ventana b.) Koettimia voidaan leimata useilla eri tavoilla, kuten radioaktiivisilla aineilla, digoksigeniinillä tai biotiinilla. (Kononen – Pelto-Huikko 1998: 179; Suominen – Ollikka 2004: 117; Ventana a; Ventana b.)

**Pesut.** Pesuilla saadaan sitoutumattomat ja epäspesifiset koettimet pois. Tarkoituksena on saada huuhdeltua kaikki ylimääräinen koetin pois, jolloin jäljelle jää ainoastaan kohteen viruksen DNA:han kiinnittyneet koettimet. (Suominen – Ollikka 2004: 114; Ventana b.)

**Detektio** eli saattaminen näkyväksi. Leimattu koetin voidaan saada näkyväksi erilaisilla menetelmillä. Esimerkkinä fluoresenssi- ja värireaktiot. Riippuen menetelmästä, havainnointiin käytetään eri välineitä. Esimerkin mukaisissa tapauksissa käytössä on fluoresenssimikroskooppi tai valomikroskooppi. (Suominen – Ollikka 2004: 117; Ventana a.)

Kättilöopiston patologian laboratoriossa käytetään koettimena INFORM HPV III Family 16 Probe -koetinta. Koetin on DNP-leimattu ja se toimii HPV:n genotyypeille 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 ja 66. Koetin siis sitoutuu kudoksessa mahdollisesti oleviin edellä mainittujen HPV-tyyppien viruskopioihin, jotka sijaitsevat solujen tumissa. Mikäli näytteessä on suuren riskin HPV-DNA:ta, sen antama sininen signaali on nähtävissä mikroskooppisesti epiteelisolujen tumissa (ks. kuvio 4). (Ventana 2007.)



KUVIO 4. Mikroskooppikuva positiivisesta HPV-DNA:ta sisältävästä kudoksenäytteestä (Ihalainen – Winter 2007).

In situ hybridisaatio -menetelmässä tuloksia tulkittaessa otetaan kantaa värjäytyvyyteen. Värjäytyvyys eli siis positiivisuus ilmaistaan joko solujen episomaalisena tai integroituneena värjäytymisenä. Episomaalinen värjäytyminen kertoo, että viruskopioita on paljon ja täten myös väriä on nähtävissä solujen tumissa paljon. Episomaalinen värjäytyminen kertoo, että muutos ei vielä ole pahin mahdollinen. Integroituneessa värjäytymisessä tumassa on hyvin vähän viruskopioita, joten väriäkin on nähtävissä vähän. Tässä tapauksessa muutos on jo paha ja se korreloi suoraan dysplasian vahvuuteen. Samassa näytteessä on mahdollista löytää kumpaakin värjäytymistä (ks. kuvio 5). (Grogan – Nitita – Pestic-Dragovich – Pang – Ji 2006: 5 - 6.)



KUVIO 5. Mikroskooppikuva histologisesta in situ hybridisaatio -värjäyksestä. Näytteessä sekä episomaalista että integroitua värjäytymistä. (Ihalainen – Winter 2007.)

In situ hybridisaatio -menetelmä on kehittynyt paljon viimeisen vuosikymmenen aikana. Koettimia ja leimaamismenetelmiä on kehitetty ja kehitetään edelleen ottaen huomioon laboratorioden tarpeet sekä erilaiset näytteet. (Harvey 2006: 89.)

## 6 MUUT HPV-INFEKTIOON LIITTYVÄT TUTKIMUSMENETELMÄT

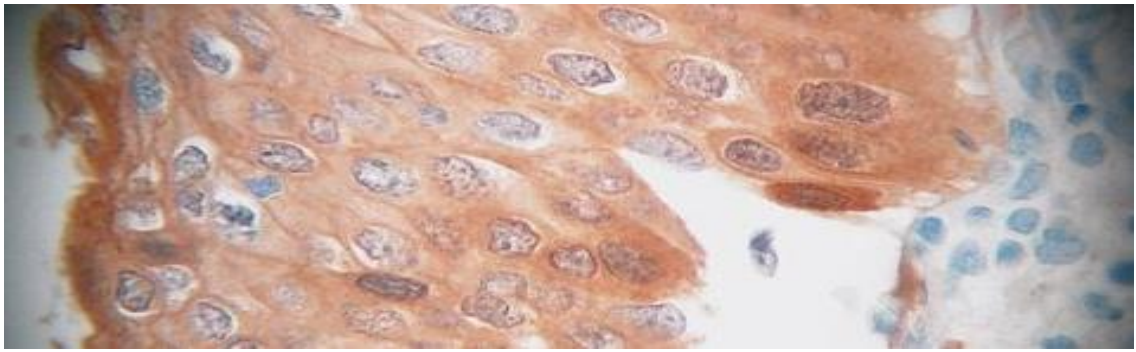
Kätilöopiston patologian laboratoriossa patologi voi pyytää lisäpyyntönä histologiset p16<sup>INK4a</sup>- ja Ki-67 -värjäykset. Näiden avulla diagnoosia ja muutoksen laajuutta voidaan tarkentaa kudoksen värjäytyvyyden mukaan. Värjäytyvyyden perusteella voidaan myös arvioida dysplasian vakavuutta. (Tarkkanen 2007.) Kuten in situ hybridisaatio -värjäyskin, myös p16<sup>INK4a</sup>- ja Ki-67 -värjäykset tehdään BenchMark<sup>®</sup>-laitteella (Ventana a; Ventana c).

Suuren riskin HPV-positiivisuus voidaan määrittää nestemäisestä gynekologisesta irtosolunäytteestä in situ hybridisaation lisäksi myös polymeerasiketjureaktion avulla (Roche 2006). Toinen menetelmä on Hybrid Capture<sup>®</sup> 2 -testi, joka on tutkimuskäytössä joukkoseulontojen yhteydessä (Tarkkanen 2007). Tämä menetelmä ei liity opinnäytetyöhöni, mutta on syytä tuoda esiin sen olemassaolo.

### 6.1 Proteiinivärjäykset p16<sup>INK4a</sup> ja Ki-67

**p16<sup>INK4a</sup>.** Kyseessä on proteiini, joka osallistuu solukierron säätelyyn. Suuren riskin papilloomaviruksen (HR-HPV) onkogeneeni E7 kiinnittyy retinoblastoomaproteiiniin (kasvunrajoitegeenin koodaama, rajoittaa solun jakautumista) ja saa aikaan tämän proteiinin normaalin kulun inaktivaation. Inaktivaatiosta johtuen p16<sup>INK4a</sup>-proteiinin negatiivinen palaute ei toimi ja proteiinia alkaa muodostua liikaa. (DakoCytomation.) Tästä lisääntymisominaisuudesta johtuen p16<sup>INK4a</sup>-värjäys on hyödyllinen tutkimus osoitettaessa suuren riskin papilloomaviruksen aiheuttamia solumuutoksia sekä myös syöpiä (Agoff ym. 2003: 666; Patterson 2007: 1604; Walts – Lechago – Bose 2006: 795).

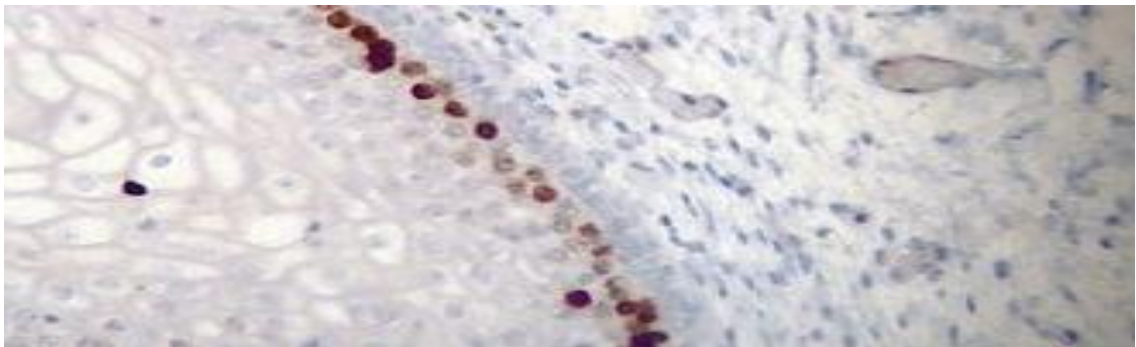
p16<sup>INK4a</sup>-värjäyksessä punertavan ruskea väri sitoutuu sytoplasmaan (ks. kuvio 6) (Cell Marque 2007a).



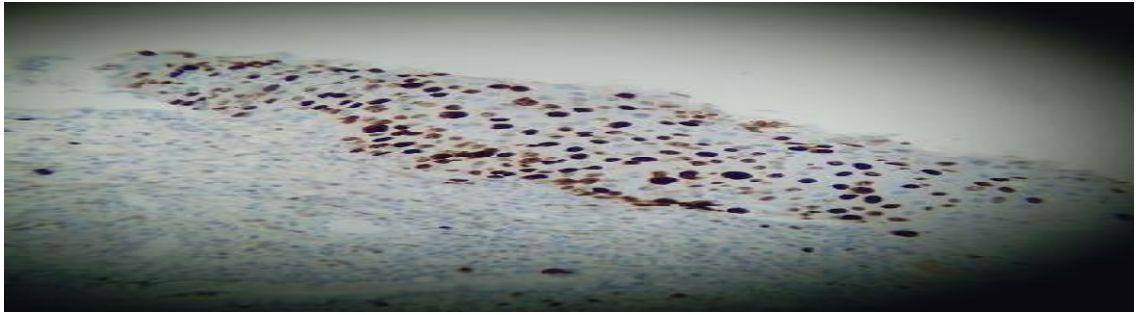
KUVIO 6. Mikroskooppikuva p16<sup>INK4a</sup>-positiiviseksi värjäytyneestä epiteelistä (Ihalainen – Winter 2007).

**Ki-67.** Ki-67 on proteiini, joka osallistuu keskeisenä tekijänä soluproliferaation (solujen lisääntyminen) säätelyyn. Ki-67 -proteiinia tavataan solusyklin kaikissa aktiivisissa vaiheissa (G1, S, G2, M), mutta ei lepovaiheessa (G0). Useissa kasvaimissa Ki-67 -proteiinin immunoreaktiivisuus kasvaa ja se korreloi kasvaimen kasvunopeuteen. Ki-67 kuvastaa solun jakautumisaktiivisuutta ja on hyvä osoittamaan tietyssä solupopulaatiossa proliferoituvaa solufraktiota, koska syöpäsoluille on ominaista niiden hallitsematon jakautuminen. (NordiQC 2007.) Ki-67 -värjäyksen on osoitettu olevan hyödyllinen tutkimus suuren riskin HPV-infektiota epäiltäessä. (Carreras ym. 2007: 590; Shi ym. 2007.)

Ki-67 on värin sitoutumiseltaan aina positiivinen. Se värjää proliferoituvien epiteelisolujen tumat punertavan ruskeiksi. (Cell Marque 2007b.) Tulkittaessa Ki-67 värjäys negatiiviseksi, värjäytyneitä soluja on ainoastaan basaalisolukerroksessa (ks. kuvio 7). Ki-67 on siis normaalistikin läsnä oleva proteiini, mutta solun jakautumisnopeuden kasvaessa proliferoivat solut ”alkavat levitä” alkuperäiseltä paikaltaan basaalisolukerroksesta kohti pintaa. Dysplasioissa värjäytymistä on useammassa kuin yhdessä kerroksessa, jopa koko epiteelin paksuudelta (ks. kuvio 8). (Ihalainen 2007; Tarkkanen 2007.)



KUVIO 7. Mikroskooppikuva negatiivisesta Ki-67 -värjäyksestä (Ihalainen – Winter 2007).



KUVIO 8. Mikroskooppikuva positiivisesta Ki-67 -värjäyksestä (Ihalainen – Winter 2007).

**Menetelmä.** p16<sup>INK4a</sup>- ja Ki-67 -värjäyksille on käytössä *ultraView<sup>tm</sup> Universal DAB Detection Kit* -reagenssipakkaus, jonka menetelmä on epäsuora (leimaamaton vasta-aine) ja biotiinivapaa. Se kykenee havaitsemaan kudoksen mahdolliseen antigeneeniin sitoutuneet primaarivasta-aineet. (HUSLAB 2007: 1 - 2; Ventana c.)

Tämä menetelmä on rakennettu multimeeritekniikalle. Se rakentuu multimeeriseen glykopolysakkaroidimolekyylisiin. Kompleksi on pieni, joten se mahdollistaa kiinnittymisen ahtaisiinkin kohtiin. Tämä lisää osaltaan herkkyyttä. Tällä tekniikalla myös tausta pysyy puhtaampana, sillä biotiinia ei käytetä. (Ventana d.) Menetelmässä entsyymi (Horseradish Peroxydase) on konjugoitu suoraan sekundaariseen vasta-aineeseen (Ventana c). Primaarivasta-aineena toimivat p16<sup>INK4a</sup>- tai Ki-67 -vasta-aineet, jotka eivät kuitenkaan kuulu reagenssipakkaukseen vaan ne tilataan erikseen (Cell Marque 2007a; Cell Marque 2007b). Erillisinä tilataan myös tumaväri (Hematoxylin) sekä sinistysreagenssi (Bluing Reagent) (HUSLAB 2007: 2). Laite käyttää pesuissa ja muissa reaktioissaan vielä erillisiä puskuriliuoksia, jotka niin ikään tilataan erikseen Ventana b).

## 6.2 HR-HPV PCR

Polymeraasiketjureaktio (PCR, Polymerase Chain Reaction) on geenitekniikan menetelmä, jossa lämpösykliin avulla kyetään monistamaan kahden nukleotidijärjestykseltään tunnetun alukkeen välinen DNA-jakso polymeraasientsyymien avulla (Suominen – Ollikka 2004: 107).

Papilloomavirusta ei voida kasvattaa tavanomaisissa kudosten viljelmissä (on hyvin vaikea kasvatettava *in vitro* -diagnostiikassa), joten nukleinihappo-osoitus PCR-menetelmällä

on sensitiivinen tapa osoittaa suuren riskin HPV-infektio potilaan nestemäisestä gynekologisesta irtosolunäytteestä (Roche 2006).

Kolposkopia-HPV-tutkimukseen liittyen Kättilöopiston patologian laboratorion toimesta lähetetään tutkimuspotilailta kerätyistä nestemäisistä gynekologisista irtosolunäytteistä pieni osa mikrobiologian vastualueen virologian laboratorioon. Siellä näytteistä määritetään suuren riskin HPV polymeraasiketjureaktiolla. Tulokset ovat numeerisia, mutta ne vastataan joko positiivisina tai negatiivisina tuloksina (Fingerroos 2007; Roche 2006). Tämä menetelmä on tasavertainen Hybrid Capture<sup>®</sup> 2 -menetelmän kanssa, vaikka eroja toki löytyy. Myös uusia testejä on tulossa markkinoille useilta eri valmistajilta (Tarkkanen 2007.)

Virologialla on käytössä Rochen AMPLICOR<sup>®</sup> Human Papilloma Virus (HPV) Test -reagenssipakkaus. Tätä testiä käytettäessä voidaan polymeraasiketjureaktiolla, nukleinihappohybridisaatiota hyväksikäyttäen, osoittaa näytteestä HPV-tyyppien 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ja 68 läsnäolo. Tämä testi on validoitu ainoastaan nestemäisille gynekologisille irtosolunäytteille. Testi sallii näytteen HPV-DNA:n sekä  $\beta$ -globiini-DNA:n samanaikaisen monistumisen.  $\beta$ -globiini toimii riittävän solumäärän kontrollina. (Roche 2006.)

Testi perustuu neljään pääprosessiin. Ensimmäisenä vaiheena on näytteen esikäsittely. Näytteessä oleva DNA vapautetaan hajottamalla solut reagenssien avulla kohotetussa lämpötilassa. (Roche 2006.)

Toinen vaihe on amplifikaatio eli monistaminen. Monistamiseen käytetään PCR-laitetta, johon on ohjelmoitu monistuksen sykli. AMPLICOR<sup>®</sup> HPV-testi käyttää spesifisiä komplementaarisia alukkeita, jotka tunnistavat tietyn nukleotidisekvenssin HPV-genomin L1-alueelta. Lämpö saa aikaan virus-DNA:n ja kohde-DNA:n paljastumisen, jolloin alukkeiden kohdesekvenssit paljastuvat. PCR-reaktioseoksessa (mastermix) oleva Taq-polymeraasientsyymi (Taq) aktivoituu lämmön vaikutuksesta ja polymeraasientsyymi rakentaa toisen DNA-nauhan nukleotideistä (dNTP) magnesiumin läsnäollessa. Tätä pidennysreaktiota jatketaan kunnes on saatu aikaan sopiva määrätty määrä monistettua tuotetta. Amplifikaatio suoritetaan AMPLICOR<sup>®</sup> HPV-testin ohjeen mukaisesti. (Roche 2006.)



Kolmantena vaiheena tapahtuu hybridisaatio. Yksinauhaisiksi denaturoidut HPV- ja  $\beta$ -globiininomistustuotteet pipetoidaan kuoppalevyille, joka on päällystetty joko biotiinileimatulla HR-HPV-koettimella tai  $\beta$ -globiini-spesifillä koettimella. (Roche 2006.)

Viimeisessä vaiheessa tapahtuu detektio eli reaktio saatetaan mitattavaan muotoon. Kuoppalevyille lisättävä avidiini-peroksidaasikonjugaatti sitoutuu koettimessa olevaan biotiiniin. Kun reaktioon lisätään vielä peroksidaasientsyymien substraatti ja peroksidaasi, seurauksena muodostuu värillinen kompleksi, jonka intensiteettiä voidaan mitata. Absorbanssi mitataan spektrofotometrillä 450 nm:n aallonpituudella. (Roche 2006.)

Spektrofotometrillä mitatut tulokset tulkitaan Rochen AMPLICOR<sup>®</sup> Human Papilloma Virus (HPV) Test -reagenssipakkauksessa olevan tulostaulukon mukaisesti (ks. taulukko 1) (Roche 2006).

TAULUKKO 1. AMPLICOR<sup>®</sup> Human Papilloma Virus (HPV) Test -tulosten tulkinta (mukaillen Roche 2006).

HPV-tulos $A_{450}$	$\beta$ -globiini-tulos $A_{450}$	Tulkinta
< 0,20	$\geq 0,20$	negatiivinen, ei havaittua HPV-DNA:ta
<0,20	< 0,20	tulos ei hyväksyttävä
$\geq 0,20$	mikä tahansa arvo	positiivinen, havaittu HPV-DNA:ta

## 7 TUTKIMUSONGELMAT

Työssäni tutkin pystytäänkö nestemäisen gynekologisen irtosolunäytteen pohjalta saamaan selville in situ hybridisaatio -menetelmällä, onko potilaalla suuren riskin HPV-infektio. Toisin sanoen tutkin, onko in situ hybridisaatio -menetelmällä värjätyissä nestemäisissä gynekologisissa irtosolunäytteissä nähtävissä suuren riskin HPV-DNA:ta.

Tutkimuksen aiheen sain HUSLABin Kättilöopiston patologian laboratorion. Aikaisemmin laboratoriossa on tehty opinnäytetyö (Burakoff – Saloranta – Suominen 2007), jossa tutkittiin voidaanko histologinen in situ hybridisaatio -menetelmä ottaa käyttöön ja kuinka menetelmä todetaan luotettavaksi. Luotettavuutta tukevana testinä suoritettiin p16<sup>INK4a</sup>- ja Ki-67 -proteiinien värjäys. Omassa tutkimuksessani käytän myös samoja

merkkiaineita, sillä niiden perusteella voidaan osaltaan luotettavasti arvioida, soveltuuko in situ hybridisaatio tehtäväksi nestemäisistä gynekologisista irtosolunäytteistä (Carreras ym. 2007: 590).

Työssäni käytän tutkimusmateriaalina kolposkopia-HPV-tutkimukseen osallistuneilta potilailta kerättyjä nestemäisiä gynekologisia irtosolunäytteitä. Näistä näytteistä on jo virologian toimesta tehty PCR-menetelmällä suuren riskin HPV-määritys. Tämä tieto on oleellinen osa tutkimustani. Käytännössä vertaan sytologisen in situ hybridisaation tulosta tähän PCR-menetelmällä tehtyyn tulokseen. Lisävertailun vuoksi teen myös potilaan histologisesta näytteestä in situ hybridisaation. Sytologisen ja histologisen in situ hybridisaation sekä PCR-menetelmän tulosten tulisi vastata toisiaan, jotta voidaan sanoa in situ hybridisaatio -värjäyksen toimivan nestemäisistä gynekologisista irtosolunäytteistä. Lisäluotettavuutta antavat myös rutiinikäytössä olevat proteiinivärjäykset.

Tutkimusongelmani ovat seuraavat:

- In situ hybridisaatio -menetelmän käyttäminen suuren riskin HPV-infektion osoittamiseen nestemäisistä gynekologisista irtosolunäytteistä
  1. Voidaanko nestemäisistä gynekologisista irtosolunäytteistä tehdä suuren riskin HPV-määritys in situ hybridisaatiolla siten, että se osoittaa HPV-DNA:ta sisältävät solut?
  2. Kuinka HPV-infektiossa esiintyvät muut molekulaariset dysplasiaa osoittavat proteiinit (p16<sup>INK4a</sup> ja Ki-67) tukevat sytologisen in situ hybridisaation tulosta?
  3. Kuinka PCR-menetelmällä saatu HR-HPV-tulos sekä sytologisen ja histologisen in situ hybridisaation tulokset vastaavat toisiaan?

Koska nestemäinen gynekologinen irtosolunäyte saattaa olla osa tulevaisuutta, on tarpeen tutkia sen käyttömahdollisuuksia lisää. Tutkimuksen voidaan ajatella olevan lisätutkimus jo käynnissä olevaan kolposkopia-HPV-tutkimukseen. Suuren riskin HPV:ta voidaan tutkia ja todeta histologisesta näytteestä, mutta silloin potilaalle on tehtävä kolposkopia kudospalan saamiseksi. Mikäli HPV:n määrittäminen nestemäisestä gyneko-

logisesta irtosolunäytteestä onnistuisi in situ hybridisaatiolla, saataisiin riskiluokka (HR-HPV, LR-HPV) selvitettyä ilman erillistä kudospalan ottoa. Täten saataisiin osaltaan kolposkopiatoimenpiteet ja hoito suunnattua suoraan niitä tarvitseviin potilaisiin. Myös HR-HPV:n tutkimus omassa laboratorioissa mahdollistuisi sen sijaan, että näytteet lähetettäisiin virologialle PCR-menetelmällä tutkittavaksi.

## 8 TUTKIMUKSEN SUORITTAMINEN

Tutkimustani varten allekirjoitettiin HUSLABin tutkimuslupa-anomus sekä Helsingin ammattikorkeakoulu Stadian vakiosopimus. Lisäksi sain puoltavan lausunnon (lausunto 127/2007) Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin naistentautien ja synnytysten, korva- ja silmätautien, neurologian ja neurokirurgian eettiseltä toimikunnalta.

Empiiriseen osuuteen tutkimuksessani kuului p16<sup>INK4a</sup>-, Ki-67- ja in situ hybridisaatio -värjäykset. Histologisista näytteistä tein p16<sup>INK4a</sup>-, Ki-67- ja in situ hybridisaatio -värjäykset. Sytologisista näytteistä tein in situ hybridisaatio -värjäyksen. Ennen värjäysten suorittamista kävimme ohjaajani kanssa läpi laitteiden toiminnan ja käytön.



KUVIO 9. BenchMark® (Winter 2007).

Kaikki värjäykset tehtiin BenchMark®-laitteella (ks. kuvio 9). Laite on immunohistokemiallinen täysautomaattinen värjäyslaite, joka koostuu moduuleista. Värjäysmoduulissa (*staining module*) prosessoidaan näytelasit. Automatisoitu liuosmoduuli (*automated fluidics module*) sisältää puskuriliuosastiat ja se säätelee puskuriliuosten pumppausta värjäysmoduuliin. Jätesäiliö (*waste module*) sijaitsee puskuriliuosmoduulin alapuolella, oven takana. Lisäksi laitteeseen kuuluu tietokone sekä viivakooditarratulostin. (Ventana 2000: 5 - 6.)

### 8.1 Näytteiden keräys ja identifiointi

Empiirinen vaihe alkoi potilaiden valinnalla. Sain opinnäytetyöohjaajiltani tulostetun listan tutkimuspotilaista (kolposkopia-HPV-tutkimus). Listalla oli potilaita, joilta kaikil-

ta oli otettu nestemäinen gynekologinen irtosolunäyte (ThinPrep<sup>®</sup>) ja lisäksi nestemäisestä irtosolunäytteestä oli tehty suuren riskin HPV-määritys PCR-menetelmällä.

Lista piti sisällään tietoja potilaiden tutkimustuloksista. Listalta löytyi alkuperäinen gynekologinen irtosolutulos, jonka perusteella jatkotutkimuksia oli tehty. Lisäksi listalta löytyivät HR-HPV-tulos (PCR), kolposkopian yhteydessä otetun perinteisen irtosolunäytteen ja nestemäisen irtosolunäytteen tulos sekä kudoksenäytteiden patologisten anatomien diagnoosi (PAD).

Kriteerit, joiden perusteella valitsin potilaat tutkimukseeni, sain dos. Jussi Tarkkaselta. Kriteereinä pidettiin sitä, että sekä sytologisen että histologisen diagnoosin tulisi olla normaalista poikkeava. Etsiessäni kriteerit täyttäviä potilaita, käytin sytologisen diagnoosin haussa kolposkopian yhteydessä otettujen perinteisten gynekologisten irtosolunäytteiden tuloksia. Tarkoituksena oli kerätä eri sytologisista diagnooseista (ASC-US, LSIL ja ASC-H/HSIL) kustakin kymmenen potilasta. Suotavaa oli saada kahdeksan HR-HPV-positiivista ja kaksi HR-HPV-negatiivista potilasta jokaisesta ryhmästä. Löysin kriteerit täyttäviä potilaita helposti. Ainoastaan ASC-H/HSIL-luokituksen osalta en löytänyt toista HR-HPV-negatiivista potilasta. Negatiivinen tulos HR-HPV:n suhteen onkin kohtalaisen harvinainen ASC-H/HSIL-muutoksissa (von Knebel Doeberitz 2002: 2230). Tästä syystä ryhmässä ASC-H/HSIL on yksi potilas vähemmän. Potilaita tutkimukseeni kertyi siis yhteensä 29 kappaletta (ks. taulukko 2).

TAULUKKO 2. Tutkimukseen kerätyt näytteet Bethesda- ja PCR-menetelmän HR-HPV -luokituksiltaan.

Bethesda	HR-HPV +	HR-HPV –	YHTEENSÄ
ASC-US	8 kpl	2 kpl	10 näytettä
LSIL	8 kpl	2 kpl	10 näytettä
ASC-H/HSIL	8 kpl	1 kpl	9 näytettä
			<b>= 29 näytettä</b>

Seuraavana oli vuorossa etsiä tutkimukseen valittujen potilaiden parafiiniin valetut kudoksenäytteet eli näyteblokit. Nämä näytteet etsin histologisen numeroinnin avulla arkistoista.

Omaa tutkimustani varten annoin jokaiselle potilastapaukselle oman tutkimusnumeron (ks. taulukko 3), jota voisin vapaasti käyttää opinnäytetyössäni ilman todellisia tunnuksia. Omat tutkimusnumeroni ovat täysin erillisiä, eikä niillä ole mitään yhteyttä todellisiin tutkimus- tai näytenumeroihin.

TAULUKKO 3. Potilastapausten tutkimusnumerot ja niiden jakautuminen kriteerien mukaisesti luokkiinsa.

Bethesda	HR-HPV +	HR-HPV –	HUOM!
ASC-US näytteet	<b>A1-A8</b>	<b>A9-A10</b>	
LSIL näytteet	<b>L1-A8</b>	<b>L9-L10</b>	
ASC-H/HSIL näytteet	<b>H1-H8</b>	<b>H10</b>	Näytettä H9 ei ole

## 8.2 Näytelasien valmistus

Histologiset näyteblokit oli arkistoitu osittain laboratorion tiloihin, osittain kellariin. Näytteet löytyivät kuitenkin helposti juoksevan histologisen näytenumeron perusteella. Sytologiset näytteet eli nestemäiset gynekologiset irtosolunäytteet olivat arkistoitu laboratorion tiloihin. Näytteet löytyivät joko sytologisen näytenumeron tai kolposkopia-HPV-tutkimusnumeron perusteella.

Kudosblokeista leikattiin värjäyksiä varten 4 µm:n leikkeitä mikrotomilla. Käytin samaa mikrotomia kaikkien leikkeiden leikkaamiseen. Näytelaseina käytin SuperFrost<sup>®</sup> Plus -laseja, jotka kovalenttisten sidosten avulla saavat leikkeet pysymään paremmin lasilla.

### 8.2.1 Histologiset näytelasit

Näyteblokkien etsinnän jälkeen kirjoitin näytelasit, joille leikkaisin histologiset näytteet. Histologisista näytteistä tekisin p16<sup>INK4a</sup>-, Ki-67- ja in situ hybridisaatio -värjäykset, joka tarkoitti sitä, että jokaisesta kuduskasetista leikkasin kolme näytelasia. Laseihin kirjoitin oman tutkimusnumeroni sekä varmuuden vuoksi vielä oikean histologisen numeron. Käytin histologista numeroa siksi, että näytteiden tunnistaminen jo yksistään leikatessa olisi helpompaa ja luotettavampaa. Näin ollen näytetunnistuksen virhemahdollisuuksien määrä pieneni.

Jokaisesta histologisesta näyteblokista tein siis kolme lasia. Laseja kertyi kuitenkin hie-  
man enemmän kuin alun perin oli tarkoitus, sillä potilaalta oli saatettu ottaa useampi  
näyte, joissa kaikissa tulokset olivat kriteerieni mukaisia. Yhden potilastapauksen koh-  
dalla kudoksenäyte oli jaettu useampaan osaan (näyte L9). Sanallisista diagnooseista ei  
selvinnyt jaetun näytteen osalta, missä näyteblokkissa muutos oli. Otin tutkimukseeni  
potilaan kaikki näyteblokit. Kahdeksassa potilastapauksessani oli enemmän kuin yksi  
näyteblokki. Yhteensä valmistin 29 potilaan 38 kudoksenäytteenä 114 histologista näyte-  
lasia.

p16<sup>INK4a</sup>- ja Ki-67 -laseille leikkasin kontrollit. p16<sup>INK4a</sup>:n kontrollina toimi aiemmin  
positiiviseksi todettu potilasnäyte. Näitä hyviä positiivisia näytteitä kerätään kontrol-  
leiksi, sillä kaupallisia kontrolleja ei käytetä. Ki-67 -värjäyksen kontrollina toimi taval-  
linen ihon luomi, jossa luonnollista solujen jakautumista on selkeästi näkyvissä basaa-  
lisolukerrossa. Tästä johtuen luomi on hyvä materiaali kontrolliksi.

In situ hybridisaatio -värjäyksessä käytetään kaupallista kontrollilasia (Ihalainen 2007).

### 8.2.2 Sytologiset näytelasit (ThinPrep<sup>®</sup>)

Sytologiset näytelasit numeroin samalla periaatteella kuin histologisetkin näytelasit.  
Näytelaseihin kirjasin siis oman tutkimusnumeroni sekä sytologisen näytenumeron.  
Helppotusta saman potilaan histologisen ja sytologisen näytteiden yhdistämiseen toi se,  
että käytin omaa tutkimusnumeroani.

Nestemäisestä gynekologisesta irtosolunäytteestä näytelaseja valmistettaessa tarvitaan  
ThinPrep<sup>®</sup> 2000 -laitteen ja CytoLyt<sup>®</sup>-liuoksen lisäksi erillisiä filttäreitä eli suodattimia,  
jotka ovat kertakäyttöisiä. Filteri on ontto läpinäkyvä putki, jonka toisessa päässä on  
puoliläpäisevä kalvo. Fiksaationeste ja muu hajonnut materiaali läpäisevät kalvon, mut-  
ta solut jäävät siihen kiinni (ks. liite 3). (Cytoc Corporation: 1.19.)

Yhden näytelasin valmistukseen (ks. liite 4) kului aikaa muutama minuutti. Näytepurk-  
keihin lisäsin CytoLyt<sup>®</sup>-liuosta, jotta nestepinta olisi tarvittavalla tasolla. Tämän jälkeen  
asetin laitteeseen näytelasin sekä avatun näytepurkin. Filterin kiinnitin erilliseen ada-  
pteriin ja filteri-adapteri -yhdistelmän liitin koneen pidikkeisiin. Ohjauspaneelistä valit-

sin ohjelman, joka on gynekologisille näytteille tarkoitettu ohjelma. Tästä eteenpäin laite hoiti työn automaattisesti.

Ensimmäisenä laite suorittaa näytteen sekoittamisen. Näytepurkki nousee siten, että filteriosan kalvopää asettuu nestepinnan alapuolelle. Laite luo nesteeseen virtauksen, joka saa aikaan liman ja muun materiaalin lopullisen hajoamisen. Seuraavaksi laite luo negatiivisen paineen avulla vakuumin, jolloin laite näytettä imiessään kerää soluja puoliläpäisevälle kalvolle. Laite tunnistaa, milloin kalvolle on kertynyt sopiva määrä soluja. Määrän ollessa optimaalinen, laite nostaa filterin pois näytepurkista ja siirtää puoliläpäisevän kalvon näytelasin pintaa vasten. Kevyellä kosketuksella solut siirtyvät kalvolta lasille. Lopuksi laite tiputtaa valmiin lasin laitteen sisällä olevaan näyteastiaan ja ilmoittaa merkkiäänellä lasin valmistumisesta. Lasi otetaan pois laitteesta ja laitetaan fiksoitumaan (96 % etanoli) tai se ilmakeivataan (värjäyksestä riippuen). Tämän jälkeen lasi on valmis värjättäväksi. (Cytoc Corporation: 1.2, 1.18 - 1.21.)

### 8.3 Värjäykset

Värjäykset suoritin useassa erässä, sillä yhteen värjäyskertaan näytelaseja mahtuu BenchMark<sup>®</sup>-laitteeseen 20 kappaletta. Lisäkertoja värjäykseen tuotti myös se, että värjäsin samaan aikaan rutiinin potilasnäytteitä.

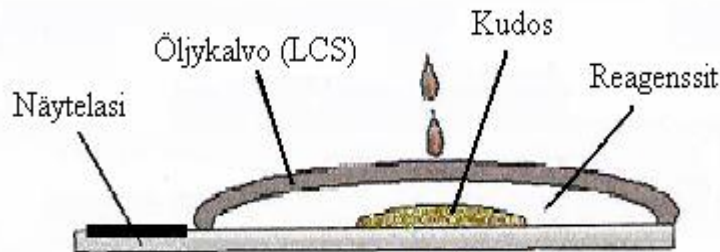
#### 8.3.1 p16<sup>INK4a</sup>- ja Ki-67 -värjäykset

p16<sup>INK4a</sup>- ja Ki-67 -värjäykset suoritin laboratorion p16<sup>INK4a</sup>-värjäysohjetta seuraten (ks. liite 5). Menetelmä kummassakin värjäyksessä on sama (Ventana e; Ventana f).

Värjäysprosessi alkoi lämpökaapista, jossa näytelaseja inkuboitii tunnin ajan 60°C:een lämmössä. Inkubointi vaikuttaa suotuisasti näytteen lasilla pysyvyyteen. Ilman inkubaatiota on ongelmana ollut näytteiden liukeneminen pois näytelasilta värjäyksen aikana. (Ihalainen 2007.) Inkubaation aikana tein viivakooditarrat BenchMark<sup>®</sup>-tarratulostimella, joka on liitetty tietokoneeseen. Tarroja tehtäessä tulee tietokoneelta valita ensin halutut protokollat eli ohjelmat, jotta viivakoodit lukemalla laite tietää, mikä värjäys kullekin lasille tehdään (HUSLAB 2007). Jokaiselle värjäysmenetelmälle on

oma protokollansa. Tunnisteiksi viivakooditarroihin kirjasin potilaalle antamani tutkimusnumeron (esim. A4, L5, H6) sekä histologisen numeron. Histologisen numeron pidin mukana edelleen, jotta näytteen tunnistaminen olisi luotettavampaa. Inkubaation jälkeen laitoin viivakooditarrat näytelaseille ja asetin lasit laitteen näytepaikoille värjäysmoduuliin. Reagenssikäruksellin paikoilleen asettamisen jälkeen käynnistin laitteen.

Automaattinen värjäysprosessi alkaa näytteiden kuumennuksella. Korkealla lämpötilalla ja pesuliuksella (EzPrep) näytelaseilta poistetaan parafiini. Laite lisää tämän jälkeen näytteiden päälle öljyä (LCS, Liquid Coverslip). Laite pipetoi kaikki reagenssit tämän öljykalvon päälle. Reagenssit läpäisevät öljykalvon, josta ne valuvat alas oikealle paikalleen, kudoksen päälle (ks. kuvio 10). Öljy suojaa näytettä ja reaktioita. Öljyn ansiosta reagenssit leviävät tasaisesti näytelasillemme. (Ventana e; Ventana f; Ventana a.)



KUVIO 10. Näytelasi sivusta katsottuna. Reagenssit pipetoidaan öljykalvon päälle, josta ne valuvat kudoksen päälle. Öljykalvon ansiosta reagenssit levittyvät lasille tasaisesti. (Mukaillen Ventana g.)

Seuraavaksi laite suorittaa esikäsitteilyn CC1-liuksella (Cell Condition 1, pH 8,4), joka on EDTA-pohjainen puskuri. Esikäsitteilyllä kudoksesta saadaan formaliinin vaikutuksesta peittyneet antigeenin epitoopit esiin (epitoooppi = antigeenin kohta, jonka vasta-aine tunnistaa). (HUSLAB 2007; Ventana a; Ventana e; Ventana f.)

Seuraavana lisättävän inhibiittoriliuoksen (Ultra View Inhibitor, 3 % vetyperoksidiliuos) tehtävänä on endogeenisen peroksidaasiaktiivisuuden vaimennus (Ventana a).

Inhibiittoriliuoksen jälkeen on vuorossa primaarin p16<sup>INK4a</sup>- tai Ki-67 -vasta-aineen liitys. Vasta-aine saa inkuboitua eli vaikuttaa 10 minuutin ajan, jolloin se pääsee sitoutumaan näytteessä olevaan p16<sup>INK4a</sup>- tai Ki-67 -antigeeniin. Inkuboinnin jälkeen sitoutumaton vasta-aine ja reagenssijäämät pestään pois TRIS-pohjaisella liuksella (Reaction Buffer, pH 7,6). (Ventana a; Ventana e; Ventana f.)



Pesun jälkeen laite lisää multimeerikompleksin (Ultra View Universal HRPO multimer). Kompleksi sisältää sekundaarivasta-aineen (hiiren IgG, IgM, kanin IgG), johon on konjugoitu entsyymi (HRP = Horseradish peroxidase). (Ventana a; Ventana e; Ventana f.)

Tämän jälkeen on vuorossa kromogeeni (Ultra View DAB, 3,3'-diaminobentsidiini tetrahydrokloridi) ja substraatti (Ultra View H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,04 % vetyperoksidipuskuriliuos), jotka reagoidessaan tuottavat tumman ruskeaa väriä. (Ventana a; Ventana e; Ventana f.)

Värjäyksen viimeisinä vaiheina näytelaseille lisätään kupari, hematoksyliini sekä sinistysreagenssi. Kupari (Ultra View Copper) antaa p16<sup>INK4a</sup>- ja Ki-67 -proteiineille lopullisen punaruskean värin. Hematoksyliini värjää tumat ja sinistys muuttaa tumavärin violetisemmäksi. (HUSLAB 2007.)

Värjäysajo kestää noin kaksi tuntia, jonka jälkeen näytelasit poistetaan laitteesta. Näytelasien poistamisen jälkeen laitteella ajetaan pesuohjelma, jotta likaantuneet näytepaikat saadaan puhtaiksi. Pesuohjelmassa näytepaikat pestään pesuliuksella, joka liuottaa pois näytepaikoissa olevan jäännösöljyn. Pesuohjelman jälkeen laite lisää näytepaikoille uuden öljyn. (Ventana e; Ventana f.)

Laitteen suorittaessa pesuohjelmaa, pesin näytelasit pesuaineella poistaakseni lasilta öljyn. Pesun jälkeen vein näytelasit nousevaan alkoholisarjaan (aqua ..... ksyleeni) veden poistamiseksi näytteistä. Viimeiseksi peittelin lasit peitinkalvoautomaatilla.

### 8.3.2 In situ hybridisaatio histologisista näytteistä

Kätilöopiston sairaalan patologian laboratorion BenchMark<sup>®</sup>-laitteessa on valmiina protokolla kudoksenäytteiden in situ hybridisaatio -värjäyksille. Kontrollina käytin kaupallista kontrollilasia. Lasilla on sekä positiivinen että negatiivinen kontrolli. Positiivinen kontrolli on CaSki -solulinjan (Cervical carcinoma) näytettä, joka sisältää satoja HPV-tyyppin 16 viruskopioita. Negatiivinen kontrolli sisältää solulinjan T24 soluja, jotka ovat ihmisen virtsarakon karsinomasoluja. (HUSLAB 2007; Ventana h.)

Kuten aina värjätessä BenchMark<sup>®</sup>-laitteella, nämäkin näytelasit laitetaan inkuboitumaan ensin lämpökaappiin 60°C:een lämpöön. Sillä aikaa kirjoitin viivakooditarrat.

Laite aloittaa värjäyksen poistamalla näytelaseilta parafiinin. Parafiinin poistoon laite käyttää EzPrep-liuosta sekä korkeaa lämpötilaa. Parafiinin poiston jälkeen ohjelma suorittaa entsyymikäsittelyn (entsyymidigestio). Entsyymikäsittelyn alussa tarvitaan CC2-liuosta (Cell Condition 2, sitraattipuskuri pH 6,0) ja lämpöä. Lopussa käytetään proteaasia (ISH Protease 3). (Ventana i; Ventana a.) Proteaasin tehtävänä on hajottaa fiksaation vaikutuksesta denaturoituneet proteiinit; nukleiinihapot ovat ympäröity proteiineilla ja nämä proteiinit voivat hankaloittaa koettimen kiinnittymistä tai jopa estää sen pääsyn kohteeseen. Lisäksi entsyymikäsittelyn tarkoituksena on herkistää kudoksen immunoreaktiivisuutta. (Ventana a; Ventana b; Ventana i.)

Seuraavana laite lisää prehybridisaatio -reagenssia (iVIEW+ HybReady), joka sisältää esihybridisaatiopuskuria formamidissa. Lyhyen inkuboinnin jälkeen lisätään varsinainen koetin (INFORM HPV III Family 16 Probe), joka DNP-leimattu (dinitrofenoli). (Ventana 2007; Ventana a; Ventana b; Ventana i.)

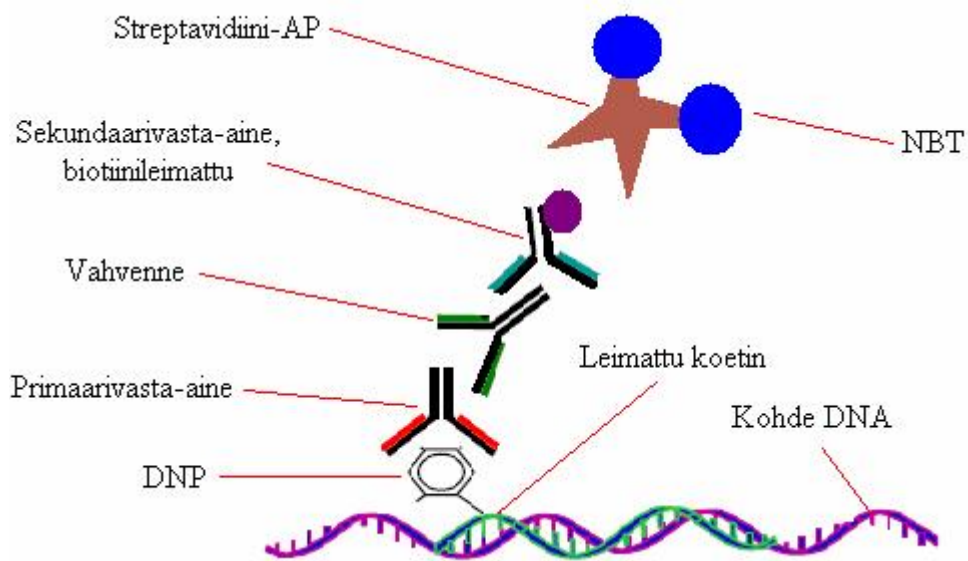
Denaturaatio alkaa lämpötilaa nostamalla. Lämpötila nostetaan 95°C:een, jolloin kaksijuosteiset DNA-nauhat saatetaan yksijuosteisiksi. Lämpötila lasketaan tämän jälkeen 52°C:een. Inkubointi jatkuu kahden tunnin ajan, jolloin koettimet kiinnittyvät näytteessä mahdollisesti oleviin kohde-DNA -nauhoihin. (Ventana a; Ventana b; Ventana i.)

Seuraavaksi ovat vuorossa pesut, joilla saadaan sitoutumaton ja epäspesifi koetin pois. Pesun on oltava kunnollinen, jotta kaikki epäspesifi saadaan pestyä pois. Se ei kuitenkaan saa olla liian voimakas, sillä muutoin poistetaan näytteestä myös spesifiset hybridit. Lämpötilan pitää olla optimoitu sopivaksi. (Ventana a; Ventana b; Ventana i; Ventana j.)

Seuraavaksi laite lisää primaarivasta-aineen (iVIEW+ Anti-DNP), joka sisältää kanin anti-DNP -vasta-ainetta fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa. Tämä anti-DNP sitoutuu DNP-leimattuun koettimeen. (Ventana a; Ventana i.)

Seuraavana vuorossa on reaktion vahvistajan lisääminen (iVIEW+ Amp). Vahvistaja sisältää hiiren anti-rabbit vasta-ainetta (mouse anti-rabbit antibody). Tämän jälkeen li-

sättävä sekundaarivasta-aine (iVIEW+ Biotinylated Ig) taas kiinnittyy vahvistusreagensiin. Alkaliseen fosfataasiin konjugoitu streptavidini (iVIEW+ SA-AP) on tarpeellinen kromogeenisena entsyyminä ja se mahdollistaa värisignaalin tumassa. Reaktioita stabiloidaan vahventeella (iVIEW+ Enhancer), jonka jälkeen lisätään vielä NBT:tä (nitro blue tetrazolium, iVIEW+ NBT). NBT saa aikaan sinisen värin näkymisen HPV-DNA:ta sisältävien solujen tumissa. Taustan värjäykseen käytetään punaista väriä (ISH Red Counterstain). (Ventana a; Ventana b; Ventana i; Ventana j.) Syntyvän kompleksin hahmottaminen onnistuu parhaiten kaaviokuvan avulla (ks. kuvio 11).



KUVIO 11. In situ hybridisaatiossa muodostuva kompleksi, joka on nähtävissä sinisenä värinä HR-HPV:ta sisältävien solujen tumissa (mukaiillen Ventana 2007).

Värjäysajo kestää noin kuusi tuntia ja lasien laitteesta poistamisen jälkeen käynnistetään pesuohjelma. Lisäksi öljy pestään laseilta pois samoin kuin proteiinivärjäyksissäkin. Pesun jälkeen näytelasit viedään nousevaan alkoholisarjaan, jonka jälkeen näytteet voidaan peittää peitinkalvoautomaatilla.

### 8.3.3 In situ hybridisaatio nestemäisistä gynekologisista irtosolunäytteistä

Värjäystä varten laboratorio tilasi nestemäisille gynekologisille irtosolunäytteille tarkoitettua koettimen ja kontrollin (Ihalainen 2007). Koetin tunnistaa HPV-tyypit 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 ja 66, jotka ovat samat kuin histologisille näytteille tarkoi-

tetussa koettimessa (Ventana k). Myös tietokoneen ohjelma piti päivittää sopimaan sytologisille näytteille (Ihalainen 2007).

ThinPrep<sup>®</sup> 2000 -laitteella valmistetut näytelasit käsittelin ennen ja jälkeen in situ hybridisaatio -värjäystä Ventanan ohjeen mukaan (ks. liite 6). Näytteiden käsittely värjäyksen jälkeen eroaa histologisesta in situ hybridisaatiosta. (Ventana m.)

In situ hybridisaation protokollaa muokattiin nestemäiselle gynekologiselle näytteelle sopivaksi. Protokollaan tehtiin pieniä muutoksia, kuten parafiinin poistosta luovuttiin kokonaan. Kokeilin myös CC2-liuoksen vaikuttavuutta värjäytyvyyteen. Ventana on ohjeistanut suullisesti, että protokolla voi muuten olla sama kuin histologisilla näytteillä, mutta CC2-liuos jätetään pois. Värjäyksen eteneminen on siis muuten sama kuin histologisessa in situ hybridisaatiossa (ks. kappale 8.3.2). (Ihalainen 2007; Ventana i; Ventana l.)

Nestemäisten gynekologisten irtosolunäytteiden värjäykset aloitin yhdellä näytteellä. Näytteeksi valitsin tapauksen H4, joka oli antanut histologisessa in situ hybridisaatiossa selkeän ja vahvan positiivisen värjäytymisen ja myös PCR-menetelmällä saatu HR-HPV-tulos oli positiivinen. Tiedossa siis oli, että kyseisessä potilasnäytteessä on HPV-DNA:ta sisältäviä soluja. Toiseen ajoon valitsin näytteet L5 ja H3, samoin perustein. Kolmanteen ajoon valitsin näytteiksi vielä seitsemän näytettä (A2, A5, A7, L1, L4, L6 ja H8), joissa ThinPrep<sup>®</sup>-näytteistä annettu sytologisen luokitus oli LSIL.

Tulosten perusteella useampia näytteitä ei värjäyty.

## 9 TULOKSET JA POHDINTAA

Tulosten tulkinnassa tulee ottaa huomioon HPV-tutkimusten HPV-tyypit. HPV-tyypeissä löytyy eroavaisuutta verrattaessa PCR-menetelmän ja in situ hybridisaatio -menetelmän tunnistamia virustyyppijä:

PCR:n tunnistamat HPV-tyypit: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ja 68 (Roche 2006).

ISH:n tunnistamat HPV-tyypit: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 ja 66 (Ventana 2007).

Virustyyppjä vertaamalla huomataan, että eroavaisuutta tunnistuksessa on HPV-tyypeillä 59, 66 ja 68. PCR-menetelmä siis tunnistaa tyypit 59 ja 68, joita in situ hybridisaatio -menetelmä ei tunnista. In situ hybridisaatio -menetelmä taas tunnistaa tyypin 66, jota PCR-menetelmä ei tunnista. Tämän tiedon pohjalta voidaan harkita, että menetelmien antaessa keskenään poikkeavan tuloksen, ero saattaa johtua eri HPV-tyyppien tunnistamisesta.

In situ hybridisaatio -värjäyksiä tulkitessani otan kantaa vain värin löytymiseen. Värin löytyminen kertoo, että HR-HPV-signaalia on nähtävissä. Tulokset vastaan joko positiivisena tai negatiivisena, riippuen onko väriä nähtävissä vai ei. Omissa tuloksissani ei siis episomaalista tai integroitua värjäystulosta erotella toisistaan.

Näyte L3 hylätään sarjasta. Syynä on tekninen virhe. Histologisissa näytelaseissa ei ole näkyvissä levyepiteeliä, johon tehtyjen värjäysten väri voisi sitoutuisi. Tämän näytteen tuloksia tekemistäni histologisista värjäyksistä ei voida arvioida eikä sen tuloksia ole otettu huomioon tulkinnoissa.

Näytteen H1 kohdalla sattui potilasvalinnan yhteydessä kirjausvirhe. Potilaan sytologisen luokituksen tulisi potilasryhmässä H olla ASC-H tai HSIL. Nyt ryhmään päätyi potilas, jonka sytologinen luokitus onkin ASC-US. Tästä syystä H1 näytteen sytologinen luokitus on ryhmästä poikkeava. Virhe ei vaikuta tutkimustuloksiin tai johtopäätöksiin.

Näytteestä H2 ei tehty histologista in situ hybridisaatio -värjäystä. Syynä oli värjäykseen tarvittavien reagenssien jäljellä oleva vähäinen määritysmäärä ja potilasnäytteitä varten on oltava reagensseja jäljellä. Reagenssipakkaukset ovat kalliita, joten niitä ei tilata suuria määriä kerralla.

Kaikki tutkimuksessani käytetyt kontrollit antoivat odotetunlaisen tuloksen. Positiiviset kontrollit näyttivät selkeää positiivista ja negatiiviset selkeää negatiivista. Tulkinnan varaa ei jäänyt. Kontrollien toimivuudesta voidaan tehdä johtopäätös, että kaikki potilasnäytteiden värjäystulokset ovat luotettavia. Taulukossa 4 on esitetty kaikki tutkimukseni kannalta tärkeät tulokset. Seuraavissa alakappaleissa vertaan saatuja tutkimustulok-

sia toisiinsa sekä peilaan näitä tuloksia tutkimusongelmiini. Tutkimustuloksia pohdin potilastapauksittain.

## TAULUKKO 4. Tulokset.

Potilastapauksissa A4, A6, L2, L7, L9 (jaettu näyte), H5, H7 ja H10 näyteblokkeja on ollut useampi. Selitteet: DL = Dysplasia levis, DM = Dysplasia moderata, C. planum = Condyloma planum (HPV:n aiheuttama kudosuutos ilman syövän esiastetta), X = tutkimusta ei tehty.

Huom! Näytettä H9 ei ole. Näyte L3 hylätty sarjasta.

Tumman harmaalla itse suorittamani värjäykset, muut vastaukset valmiina.

Tutkimusnr/ Potilastapaus	Sytol. luokitus	Sytol. luokitus, Thinrep®	Histol. PAD	Sytol. HR-HPV PCR	Sytol. ISH	Histol. ISH	Histol. Ki-67	Histol. p16 <sup>INK4a</sup>
A1	ASC-US	ASC-US	DM	pos	X	pos	pos	pos
A2	ASC-US	LSIL	DM	pos	neg	pos	pos	pos
A3	ASC-US	ASC-US	DL	pos	X	pos	pos	pos
A4	ASC-US	ASC-US	DM	pos	X	pos	pos	pos
"			DM		X	pos	pos	pos
A5	ASC-US	LSIL	DL	pos	neg	pos	pos	pos
A6	ASC-US	LSIL	DL	pos	X	neg	pos	pos
"			DL		X	neg	pos	pos
A7	ASC-US	LSIL	DM	pos	neg	pos	pos	pos
A8	ASC-US	LSIL	DL	pos	X	pos	pos	pos
A9	ASC-US	ASC-US	C. planum	neg	X	neg	neg	neg
A10	ASC-US	ASC-US	C. planum	neg	X	neg	neg	neg
L1	LSIL	LSIL	DM	pos	neg	pos	pos	pos
L2	LSIL	ASC-US	DM	pos	X	pos	pos	pos
"			DM		X	pos	pos	pos
<del>L3</del>	<del>LSIL</del>	<del>LSIL</del>	<del>DL</del>	<del>pos</del>	<del>X</del>	<del>neg</del>	<del>neg</del>	<del>neg</del>
L4	LSIL	LSIL	DM	pos	neg	pos	pos	pos
L5	LSIL	LSIL	DL	pos	neg	pos	pos	pos
L6	LSIL	LSIL	DL	pos	neg	pos	pos	pos
L7	LSIL	HSIL	DL	pos	X	neg	pos	neg
"			DL		X	neg	pos	neg
L8	LSIL	LSIL	DL	pos	X	pos	pos	pos
L9	LSIL	LSIL	DL	neg	X	neg	neg	neg
"					X	neg	neg	neg
"					X	neg	neg	neg
L10	LSIL	ASC-US	DM	neg	X	neg	neg	neg
H1	ASC-US	ASC-US	DL	pos	X	pos	pos	pos
H2	HSIL	LSIL	DL	pos	X	X	pos	pos
H3	HSIL	LSIL	DL	pos	neg	pos	pos	pos
H4	HSIL	HSIL	DM	pos	neg	pos	pos	pos
H5	HSIL	normaali	DM	pos	X	pos	pos	pos
"			DM		X	pos	pos	pos
H6	HSIL	HSIL	DM	pos	X	pos	pos	pos
H7	HSIL	HSIL	DM	pos	X	pos	pos	pos
"			DM		X	pos	pos	pos
H8	HSIL	LSIL	DL	pos	neg	pos	pos	pos
H9	-	-	-	-	-	-	-	-
H10	HSIL	ASC-H	DL	neg	X	neg	neg	neg
"					X	neg	neg	neg

## 9.1 In situ hybridisaation tulokset nestemäisistä gynekologisista irtosolunäytteistä

Ensimmäinen ThinPrep<sup>®</sup>-näyte antoi värjäytymisen osalta odotusten vastaisen tuloksen. Tämän näytteen (H4) olisi pitänyt antaa positiivinen signaali eli väriä olisi pitänyt näkyä tumissa. Näin voidaan sanoa, sillä muut taulukosta nähtävät tulokset kertovat luotettavasti, että potilaalla on suuren riskin HPV-infektio. Suuren riskin HPV-infektiota tukevat PCR-menetelmän, histologisen in situ hybridisaation, p16<sup>INK4a</sup>:n ja Ki-67:n positiiviset tulokset. Värjäytyvyys oli solujen osalta yleisestikin hailakkaa, joten taustaväriin aika saattoi olla liian lyhyt. Tällä ei kuitenkaan ole vaikutusta HPV-DNA:n värjäytymiseen.

Toiseen ajoon lisäsin taustaväriin aikaa, jotta solut saataisiin näkymään paremmin. Solut olivat tästäkin huolimatta yllättävän hailakoita. In situ hybridisaation värjäystulokset toisen ajon näytteistä (L5, H3) olivat samanlaisia kuin ensimmäisessäkin ajossa; jokainen värjätty lasi oli oletusten vastaisesti negatiivinen.

Ennen viimeistä tutkimusajoani yritin keksiä syytä, miksi muilla menetelmillä positiiviseksi todetut näytteet eivät antaneet tällä menetelmällä oletetunlaista tulosta. Kontrolleissa positiivinen kuitenkin näytti hyvin selkeää positiivista (ks. kuvio 12). Pohdimme asiaa yhdessä ohjaajani Susanna Ihalaisen kanssa. Tutkimuksessani käytetyt nestemäiset gynekologiset irtosolunäytteet olivat tuoreudeltaan hyvinkin vaihtelevia; osa näytepurkeista oli jo ehtinyt vanhentua. Morfologiaan vanhentuneet näytteet eivät kuitenkaan ole aikaisemminkaan vaikuttaneet (Ihalainen 2007; Sulka 2007). Omaa tutkimustani varten jouduin käyttämään vanhoja näytteitä, sillä uudemmista näytteistä kaikkia näytevalintakriteerien mukaisia tuloksia ei ollut saatavilla. Ventanalta on kerrottu, että in situ hybridisaation on todettu toimivan vanhoista nestemäisistä gynekologisista irtosolunäytteistä. Siitä ei kuitenkaan ollut tietoa, kuinka vanhoista näytteistä heillä on kokemusta, eikä tästä saatu varmuutta.





KUVIO 12. Mikroskooppikuva positiivisesta HR-HPV-kontrollista (sytologinen in situ hybridisaatio -värjäys, kaupallinen kontrollilasi). Soluissa nähtävissä siniseksi värjättyä HR-HPV-DNA:ta. (Ihalainen – Winter 2007.)

Vanhan näytteen aiheuttaman negatiivisen tuloksen poissulkemiseksi kokeilin värjäystä tuoreilla näytteillä. Kokeilin myös jättää pois CytoLyt<sup>®</sup>-liuoksen, jolla näytepurkin nestepinta saadaan tarvittavalle tasolle. Poistin tämän vaihtoehdon, koska se on ainoa eroava asia näytepurkeissa, jos verrataan tutkimukseni näytepurkkeja tuoreeseen ”käyttämättömään” näytteeseen. Tilalle lisäsin PreservCyt<sup>®</sup>-liuosta. Kyseessä on siis fiksaatio-liuos, jota purkeissa on jo ennen näytteenottoa. Tulokset olivat näidenkin näytteiden osalta negatiivisia. Näitä näytteitä en käytä taulukoidessani tuloksia. Nämä uusista näytteistä tehdyt tutkimukset tein vain kokeilun vuoksi ja poistaakseni virhelähdemahdollisuuden.

Negatiivisten tulosten syytä pohtiessa tulee ottaa huomioon näytteen laimentuminen ja atyyppisten solujen loppuminen. Näytteestä on lähetetty pieni osa virologialle tutkimukseen, jonka jälkeen on tehty lasi Papanicolaoun värjäystä varten. Vasta sitten tein oman lasini. Jo näytteen virologialle lähetyksen jälkeen näyte on laimentunut. Näytteen laimentuminen voi olla osittaisena syynä myös siihen, että osa ThinPrep<sup>®</sup>-näytelasien sytologisista luokituksista ovat lievempiä kuin perinteisen. Toki myös päinvastaisiakin tuloksia löytyy.

Pidimme yhteisen palaverin, johon osallistui kaikki laboratorion opinnäytetyöohjaajani. Sain dos. Jussi Tarkkaselta ohjeeksi tehdä yhteensä kymmenen värjäystä sytologisella in situ hybridisaatiolla, jolloin tulosten tulkinnan kannalta voidaan tehdä luotettavia johtopäätöksiä. Mikäli kymmenen näytettä (34,5 %) antaa negatiivisen tuloksen, sitä voidaan pitää riittävänä määränä osoittamaan menetelmän toimimattomuus käytetyillä toimintatavoilla. Näin voidaan myös lähes varmuudella sulkea pois näytteiden laimentumisesta

johtuva negatiivisuus. Viimeisen tutkimusajoni näytelasit (A2, A5, A7, L1, L4, L6 ja H8) värjäsin ja käsittelin suoraan Ventanan ohjeiden mukaisesti. Näiden tulokset olivat myös negatiivisia.

Bewtran, Xien, Soundararajanin, Gatalican ja Hatcherin (2005: 127) tutkimuksessa todetaan, että Ventanan sytologisella in situ hybridisaatio -menetelmällä tehdyssä HPV-DNA-värjäyksessä on pieni, mutta merkittävä väärin negatiivisten tulosten mahdollisuus. Kyseisessä tutkimuksessa ei tosin käytetty ThinPrep<sup>®</sup>-menetelmää vaan kyseessä oli toinen nestemäinen irtosolunäyte -menetelmä.

Vaikka Bewtran ym. tekemän tutkimuksen perusteella tuloksissa on mahdollisuus väärin negatiivisiin tuloksiin, ei heidän päätelmäänsä voida suoraan soveltaa omaan tutkimukseeni. Omat tulokseni antavat systemaattisesti negatiivisen tuloksen kaikista tehdyistä näytteistä. Näinkin suurella otannalla ei enää voida katsoa kyseessä olevan vain satunnainen virhe. Tutkimuksen kalleuden takia ei myöskään haluttu tehdä suurempaa määrää värjäyksiä.

PCR- ja in situ hybridisaatio -menetelmien osittain erilainen HPV-tyyppien tunnistuskyky ei vaikuta sytologisista näytteistä tehtyihin värjäystuloksiin. Näin voidaan todeta, sillä kymmenen näytteen antaessa negatiivisen tuloksen, kyseessä ei suurella todennäköisyydellä voi aina olla tyyppi 59 tai 68. Näitä HPV-tyyppejä ei siis in situ hybridisaatio tunnista, mutta PCR tunnistaa.

Jos sytologinen in situ hybridisaatio antaa negatiivisen tuloksen, PCR-menetelmällä tehdyn määrityksen ollessa positiivinen, voidaan miettiä atyyppisten solujen määrää. On mahdollista, että nestemäisessä gynekologisessa irtosolunäytteessä muuntuneita soluja on alun perinkin ollut vain vähän. Tällaisessa tapauksessa saattaa käydä niin, että näitä atyyppisiä soluja ei enää riitä seuraaville näytelaseille. Toinen vaihtoehto on se, että yksikään harvasta atyyppisestä solusta ei päädy lasille. Näitäkään vaihtoehtoja tuskin voidaan soveltaa tutkimukseeni, sillä näin tuskin on mahdollista käydä kovin montaa kertaa peräkkäin. Katsoin myös ohjaajieni kanssa muutamia Papanicolaouvärjättyjä ThinPrep<sup>®</sup>-laseja, joista olin tehnyt sytologisen in situ hybridisaation. Morfologian perusteella atyyppisiä soluja oli havaittavissa useassa näytteessä reilustikin.

Menetelmän toimimattomuuteen saattaa vaikuttaa jokin protokollassa oleva pieni asia. Joku menetelmän lämpötiloista tai ajoista saattaa vaatia hienosäätöä, pH:n vaikutus ja pesujen lämpötilat on otettava huomioon. Yksistään liian alhainen pesulämpötila voi saada aikaan negatiivisen tuloksen. Näitä ei kuitenkaan ole ollut mahdollista lähteä säätämään, vaan on jouduttu pärjäämään ohjelmoidun protokollan mukaisilla asetuksilla.

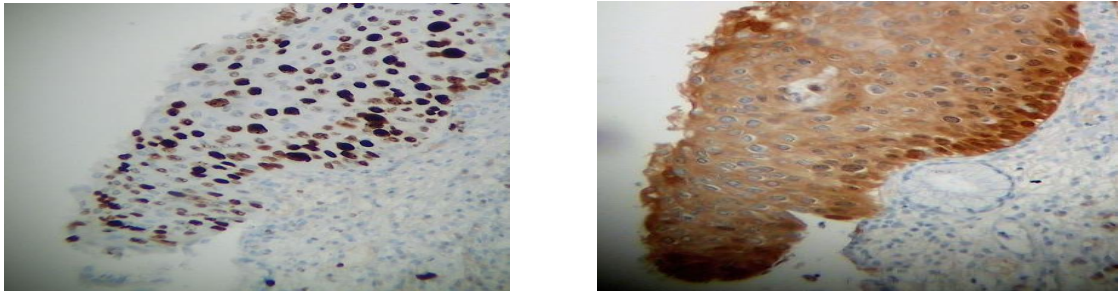
Sytologisten in situ hybridisaatiolla värjättyjen lasien mikroskopoinnin suoritin itsenäisesti, mutta kaikki näytelasit katsoi myös dos. Jussi Tarkkanen. Tulokset voidaan siis todeta luotettavaksi.

Yhteenvedona voidaan todeta, että kaikki nestemäisistä gynekologisista irtosolunäytteistä tehdyt in situ hybridisaatio -värjäykset antoivat negatiivisen tuloksen. Missään näytelasissa ei mikroskopoidessa ollut nähtävissä värjäytynyttä HPV-DNA:ta. Saatujen tulosten pohjalta voidaan tulkita kyseessä olevan toimimaton menetelmä, joka ei nykyisillä käytännöillä ja toimintatavoilla toimi.

## 9.2 p16<sup>INK4a</sup>- ja Ki-67-tulosten vastaavuus sytologiseen in situ hybridisaatioon

p16<sup>INK4a</sup>- ja Ki-67 -tulokset eivät vastanneet sytologisten in situ hybridisaatio -värjäysten tuloksia. Syynä tähän ovat kaikkien tehtyjen sytologisten in situ hybridisaatio -värjäysten negatiiviset tulokset. Vaikka proteiinivärjäysten vastaavuutta sytologiseen in situ hybridisaatioon ei voida vertailla, p16<sup>INK4a</sup>- ja Ki-67 -proteiinivärjäysten keskinäistä vastaavuutta voidaan kuitenkin vertailla.

p16<sup>INK4a</sup>- ja Ki-67 -värjäytymistulokset vastaavat toisiaan (ks. kuvio 13) hyvin kaikkien muiden paitsi yhden potilaan näytteiden osalta. Näyte L7 antoi p16<sup>INK4a</sup> -värjäyksillä negatiiviset tulokset, kun taas värjäyksillä Ki-67 tulokset olivat positiivisia. Tässä tapauksessa voidaan ajatella, että värjäyksen p16<sup>INK4a</sup> herkkyys ei välttämättä ole riittänyt. Lisäksi on otettava huomioon, että p16<sup>INK4a</sup>- ja Ki-67 -tulokset eivät suinkaan aina kulje käsi kädessä (Tarkkanen 2007). Vaikka usein voidaankin osoittaa p16<sup>INK4a</sup>- ja Ki-67 -värjäysten antavan toisiaan tulevan tuloksen (positiivinen – positiivinen, negatiivinen – negatiivinen), eivät niiden toisistaan eriävät vastaukset välttämättä kerro värjäyksen epäonnistumisesta. Tästä syystä kontrolli on erittäin tärkeä, jotta voidaan ottaa kantaa värjäyksen onnistumiseen ja luotettavuuteen.



KUVIO 13. Vasemmalla positiivinen Ki-67 -värjäys, oikealla positiivinen p16<sup>INK4a</sup>-värjäys. Kyseessä potilaan A3 värjäykset. (Ihalainen – Winter 2007.)

Tulosten perusteella voidaan yhteenvetona todeta, että p16<sup>INK4a</sup> - ja Ki-67 -tulokset tukevat tässä tutkimuksessa hyvin toisiaan. Potilastapauksissa 96,4 prosentissa p16<sup>INK4a</sup>:n ja Ki-67:n tulokset vastaavat toisiaan. Värjäykset siis toimivat tutkimuksessani hyvin rinnakkain tehtyinä ja ne ilmentävät hyvin potilaan suuren riskin HPV:n läsnäoloa.

Tutkiessani proteiinivärjäysten näytelaseja, p16<sup>INK4a</sup> -värjäyksen tulosten tulkinta oli helppoa. Väriä joko oli selvästi näytteessä tai sitä ei ollut lainkaan. Sen sijaan Ki-67 -värjäyksen tulkinta ei aina ollut kovin selkeää, sillä Ki-67 -värjäyksessä sitoutunutta väriä on nähtävissä aina. Vaikeissa tapauksissa sain apua tulosten tulkinnassa ohjaajiltani. Kaikkein vaikeimmat tapaukset ja hiemankaan epäselvät tapaukset katsoin yhdessä dos. Jussi Tarkkasen kanssa. Tulosten tulkintaa ja vastauksia voidaan siis pitää luotettavina.

Luotettavuutta näiden proteiinivärjäysten tuloksiin tuo myös onnistuneet kontrollit sekä se, että värjäykset ovat rutiinikäytössä hyviksi todettuja menetelmiä.

### 9.3 HR-HPV PCR:n, sytologisen ja histologisen in situ hybridisaation vastaavuus

Sytologisen in situ hybridisaation negatiivisista tuloksista johtuen, vastaavuutta PCR-menetelmän ja histologisen in situ hybridisaation tuloksiin on turha analysoida. Muiden menetelmien keskinäisiä vastaavuuksia voidaan kuitenkin vertailla.

Näyte A6 antaa PCR-menetelmällä sekä kummallakin proteiinivärjäyksellä positiivisen tuloksen, mutta kyseisen näytteen histologinen in situ hybridisaatio on negatiivisen. Kyse voi olla epäedustavasta kohdasta otetusta kudoksenäytteestä. Potilaan gynekologinen

irtosolunäyte on antanut normaalista poikkeavan tuloksen sekä morfologiaa tarkastelemalla että PCR-menetelmällä (positiivinen), joten tämä näyte on otettu edustavasti. Kudosnäyte on kuitenkin saatettu ottaa paikasta, jossa muutoksia ei ole. Tämän syyn voidaan ajatella vaikuttavan histologisen in situ hybridisaation värjäystulokseen. Toisaalta proteiinivärjäysten positiivinen tulos viittaa enemmänkin herkkyyteen. On mahdollista, että histologisen in situ hybridisaation herkkyys ei riitä havaitsemaan näytteen HPV-DNA:ta. Syy voi myös löytyä menetelmien HPV-tyyppien tunnistuskyvystä. Potilaalla saattaa olla HPV-tyypin 59 tai 68 aiheuttama infektiio, jota histologinen in situ hybridisaatio ei tunnista.

Näyte L7 puolestaan antaa histologisella in situ hybridisaatiolla negatiivisen tuloksen, mutta PCR-menetelmällä positiivisen tuloksen. Kyse saattaa tässäkin tapauksessa olla histologisen in situ hybridisaation herkkyydestä. Toinen syy eroavaisuuteen voi olla HPV-tyyppi. Kyse voisi siis tässäkin tapauksessa olla tyypeistä 59 ja 68.

Histologisen in situ hybridisaatio -värjäyksen voidaan todeta toimivan, samoin kuin PCR -menetelmänkin. Tulokseen voidaan päätyä, sillä nämä kaksi menetelmää vastaavat tuloksiltaan toisiaan 92,9 prosentissa potilastapauksia. Vain kahden potilaan kohdalla tulokset olivat eriäviä. PCR-menetelmä on valittu kolposkopia-HPV-tutkimukseen, joten testin voidaan todeta olevan luotettava. Histologinen in situ hybridisaatio -menetelmä voidaan myös todeta luotettavaksi, sillä tutkimus on rutiinikäytössä. Tulosten perusteella voidaan todeta, että PCR- ja histologinen in situ hybridisaatio -menetelmä olisivat hyvä vertauskohde pohdittaessa sytologisen in situ hybridisaation toimivuutta, sillä nämä testit voidaan todeta luotettaviksi ja hyvin toisiaan tukeviksi.

#### 9.4 Yhteenveto

Yksistään sytologisten in situ hybridisaatio -värjäystulosten perusteella voidaan todeta, että värjäys ei toimi tällä hetkellä käytössä olevilla menettelytavoilla. Tulokset olivat systemaattisesti negatiivisia; värjäytyissä näytteissä ei ollut havaittavissa suuren riskin HPV-DNA:ta. Esitietojen ja muiden suuren riskin HPV-infektiota tukevien värjäysten perusteella voidaan sanoa, että värjäytyissä näytteissä olisi tullut näkyä suuren riskin HPV-infektion läsnäolo. Kaikki sytologisella in situ hybridisaatiolla värjätyt lasit olivat PCR-menetelmällä todettu positiivisiksi suuren riskin HPV:n suhteen. PCR-menetelmä

on validoitu nestemäisille gynekologisille irtosolunäytteille, joten tutkimusta ja sen antamia tuloksia voidaan pitää luotettavina. Lisäksi histologisten in situ hybridisaatio -värjäysten tulokset olivat PCR-menetelmällä saatua tulosta vastaavat, lukuun ottamatta kahta tapausta, joista toinen hylättiin teknisen virheen vuoksi.

Kaikkien värjäysten ja sitä edeltävien valmisteluiden luotettavuus voidaan todeta hyväksi. Värjäykset suoritettiin Ventana Medical Systems:n ohjeiden mukaisesti. Sytologisissa in situ hybridisaatio -värjäyksissä kokeilin myös ns. käsittelemättömiä ja tuoreita näytteitä, mutta niiden käytöllä ei ollut vaikutusta tuloksiin. Kaikki potilasnäytteet leikkasin samalla mikrotomilla ja leikkeet olivat edustavia, lukuun ottamatta yhtä näytettä, joka värjäyksen jälkeen hylättiin sarjasta. Kaikkien näytelasien esikäsittelyt olivat ajallisesti ja suorituksiltaan samanlaisia. Myös kontrollit antoivat odotetunlaiset tulokset kaikkien värjäysten kohdalla. Histologiset värjäykset ovat kaikki todettu luotettaviksi ja toimiviksi menetelmiksi ja ne ovatkin rutiinikäytössä.

Todettaessa sytologinen in situ hybridisaatio -menetelmä toimimattomaksi, seuraava askel on selvittää siihen johtaneet syyt. Mikäli menetelmä halutaan toimivaksi, on seuraava toimintatapa ottaa yhteys Ventana Medicals Systems:iin ja pyytää heiltä ohjeistusta sekä apua, jotta ongelma saadaan korjattua. Menetelmää on muokattava, sillä nykyisillä ohjeilla ja toimintatavoilla haluttuja ja luvattuja tuloksia ei saatu. Tutkimuksen epäonnistumisen selvittely laboratoriossa jatkuu.

## 10 LOPUKSI

Opinnäytetyöni aihe on mielenkiintoinen ja ajankohtainen. HPV-infektio ja sen osuus kohdunkaulan syöpiin on ollut etenkin viime aikoina toistuvasti esillä. Työn rajaaminen oli kuitenkin alkuun vaikeaa, sillä aiheeseen liittyi mielestäni monta tärkeää asiaa. Mitään aihetta en olisi halunnut jättää pois. Työ olisi kuitenkin tullut todella laajaksi, joten sisällysluettelon karsiminen oli pakollista. Lopullinen sisällysluettelo pitää mielestäni sisällään tärkeimmät asiat, jotka työhöni liittyy.

Teorian löytäminen oli paikoittain hankalaa, sillä menetelmät ja niiden uudet sovellukset ovat hyvin tuoreita. Osasta menetelmistä teorian tietoa ei vielä juurikaan ole saatavilla.

Jouduin käyttämään lähdemateriaalina paljon valmistajien omia tuotoksia sekä ohjeita. Vanhaa teoriatietoa joutui myös soveltamaan paljon näihin uusiin menetelmiin. Tiedon määrä ja ymmärrys ovat lisääntyneet huomattavasti työn edetessä ja tämän uuden tiedon soveltaminen käytännön työhön on ollut tuottoisaa. Aiheeseen perehtyminen monelta kantilta toi lisämielekkyyttä empiirisen osion suorittamiseen.

Opinnäytetyöprosessin alkuun liittyvä todella haasteellinen asia oli tuottaa tutkimussuunnitelma eettisen lautakunnan käsiteltäväksi. Prosessi oli vaikea ja venyi pitkälle, mutta puoltavan lausunnon sain ajallaan. Lausunto pitää sisällään laajemmat luvat, kuin lopulta tarvitsin. Alun perin oli tarkoitus, että näytteet tutkimukseeni kerätään suoraan potilaan tullessa kolposkopiaan ja näin ollen näytteet olisivat olleet tuoreita. Ventanan antamien tietojen perusteella kuitenkin päädyttiin käyttämään vanhoja näytteitä. Todellisuudessa aika ei olisi edes riittänyt uusien näytteiden laajaan keräämiseen. Tässä tapauksessa potilasmäärä tutkimuksessani olisi ollut hyvin pieni.

Mielenkiintoa ja pohdintaa herätti myös työssäni käytettyjen nestemäisten ja perinteisten gynekologisten irtosolunäytteiden sytologiset luokituserot. Kuten työssäni aiemmin totean, nestemäisiä gynekologisia irtosolunäytteitä on mikroskoipoitu vasta suhteellisen vähän aikaa. Vaikka luokitusperiaatteet ovat luonnollisesti samat kuin tutkittaessa perinteistä gynekologista irtosolunäytettä, on tulkinta kuitenkin erilaista. Näytteet ovat mikroskoipoitaessa hyvinkin erilaisia ja muuntuneiden solujen tunnistus nestemäisestä näytteestä tehdään usein vain muutaman solun perusteella (Ihalainen 2007). Tutkimukseni potilastapausten kohdalla sytologinen luokitus muuttui 44,8 prosentilla (13/29) kun verrataan perinteisen gynekologisen irtosolunäytteen luokitusta nestemäisen näytteen luokitukseen. 46,2 prosentilla luokitus muuttui pahempaan ja 53,8 prosentilla lievempään suuntaan. Luokituserot olivat yleisesti pieniä; yhden luokan muutos suuntaan tai toiseen. Vain yhdessä tapauksessa luokkamuutos oli muuttunut radikaalisti; HSIL-luokituksesta tuli nestemäistä näytettä luokiteltaessa normaali. Tässä tapauksessa HSIL-luokitus on luultavimmin tehty vain muutaman solun perusteella, joita ei enää ole riittänyt tai päätynyt ThinPrep<sup>®</sup>-näytelasiin.

Opinnäytetyöprosessini lopuksi totean, että ohjaajieni asiantuntijuudella ja ohjauksella on ollut suuri vaikutus työn etenemiseen ja sen valmiiksi saattamiseen. Asiantuntijuuden ja tiedon jakaminen on tärkeää niin päivittäisessä laboratoriorutiinissa kuin opiskelijan ohjauksessakin. Olen saavuttanut omat tavoitteeni opinnäytetyön ja oppimisen suh-

teen. Uskon myös, että tutkimukselliset tavoitteet ja kysymykset ovat saaneet työn kautta vastaukset. Kiitokset laboratorion ohjaajilleni mielekkästä aiheesta ja ohjauksesta, sekä tukemisesta ammatillisessa kasvussani.



## LÄHTEET

- Aaltonen, Leena-Maija – Hiltunen-Back, Eija – Paavonen, Jorma 2002: Papilloomavirukset limakalvoilla. *Duodecim* 118 (13). 1388 - 1396.
- Agoff, S. Nicholas – Lin, Patricia – Morihara, Janice – Mao, Constance – Kiviat, Nancy B – Koutsky, Laura A. 2003: p16<sup>INK4a</sup> Expression Correlates with Degree of Cervical Neoplasia: A Comparison with Ki-67 Expression and Detection of High-Risk HPV Types. *Mod Pathol* 16 (7). 665 - 673.
- Anttila, Ahti – Pukkala, Eero – Nieminen, Pekka – Hakama, Matti 1998: Kohdunkaulan syövän ilmaantuvuus on Suomessa selvästi suuremmassa. *Duodecim* 114 (11). 1117 - 1124.
- Auvinen, Eeva 2006: Papilloomavirukset taudinaiheuttajina. Verkkodokumentti. <[http://www.yhtyneetlaboratoriot.fi/site\\_images/papilloomavirukset.pdf](http://www.yhtyneetlaboratoriot.fi/site_images/papilloomavirukset.pdf)>. Luettu 18.7.2007.
- Auvinen, Eeva 2007: HPV-diagnostiikka mikrobiologian laboratoriossa. Helsinki. Laboratoriolääketiede ja näyttely '07-luento. 4.10.
- Bewtra, C – Xie, Q – Soundararajan, S – Gatalica, Z – Hatcher, L 2005: Genital human papillomavirus testing by in situ hybridization in liquid atypical cytologic materials and follow-up biopsies. *Acta Cytol* 2 (49). 127 - 131.
- Burakoff, Päivi – Saloranta, Marjo – Suominen, Sara 2007: HPV In situ -hybridisaation käyttöönotto Kätilöopiston patologian laboratoriossa. Opinnäytetyö. Helsinki: Helsingin ammattikorkeakoulu Stadia. Sosiaali- ja terveystieteiden koulutusohjelma.
- Burd, Eileen M. 2003: Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clin Microbiol Rev* (16). 1 - 17.
- Carreras, R. – Alameda, F. – Mancebo, G. – García-Moreno, P. – Mariñoso, M .L. M. – Costa, C – Fusté, P. – Baró, T. – Serrano, S. 2007: A study of Ki-67, c-erbB2 and cyclin D-1 expression in CIN-I, CIN-III and squamous cell carcinoma of cervix. *Histol Histopathol* 22 (6). 587 - 592.
- Cell Marque 2007a: Anti-p16<sup>INK4a</sup>. Datasheet. Rocklin, CA.
- Cell Marque 2007b: Anti-Ki-67. Datasheet. Rocklin, CA.
- Cytoc 2007: ThinPrep System. Marlborough, MA: Cytoc Corporation. Verkkodokumentti. <<http://www.thinprep.com/pap-test/thinprep-system.html>>. Luettu 27.3.2007.
- Cytoc Corporation: ThinPrep<sup>®</sup> 2000 Operator's Manual. Marlborough, MA.
- DakoCytomation. CINtec<sup>™</sup> p16<sup>INK4a</sup> Cytology Kit. Scientific Background. Carpinteria, CA.

- Fingerroos, Rita 2007. Laboratoriohoitaja. HUSLAB, virologian laboratorio. Helsinki. Suullinen tiedonanto. 10.9.
- Grénman, Seija 2007: Kohdunkaulasyöpä eli mitä ihmisen papilloomavirus voi pahimmillaan aiheuttaa. Rokote uutiset. Sanofi Pasteur MSD. 4 - 6.
- Grogan, Thomas M. – Nitta, Hiro – Pestic-Dragovich, Lidija – Pang, Lizhen – Ji, Jay 2006: Interpretation Guide for Ventana INFORM<sup>®</sup> HPV Probes In Situ Hybridization (ISH) Staining of Cervical Tissue. U.S.A: Ventana.
- Harvey, Richard 2006: In situ hybridization. Teoksessa Key, Mark (toim.): Immunohistochemical Staining Methods Fourth. Carpinteria: Dako. 89 - 94.
- HUSLAB 2006a: Papa-näytteenotto. Erillisohje. Microsoft<sup>®</sup> Word -tiedosto. Versio hyväksytty 26.10.
- HUSLAB 2006b: Gynekologinen irtosolunäyte. Janne Suvisaari (toim.). Ohjekirja 2007. Helsinki: Edita. 445 - 446.
- HUSLAB 2007: p16<sup>INK4a</sup>-immunohistokemiallinen värjäys Benchmarkilla. Kättilöopiston patologian laboratorio. Versio 1.0. Hyväksytty 31.1.
- Ihalainen, Susanna – Winter, Jenni 2007. Mikroskooppikuvia opinnäytetyön värjäyksistä. Kättilöopiston patologian laboratorio. Helsinki. 1.11.
- Ihalainen, Susanna 2007. Laboratoriohoitaja, bioanalyytikko (AMK). HUSLAB, patologian laboratorio. Helsinki. Suulliset tiedonannot 1.9.–30.10.
- Kauraniemi, Tapani – Vuopala, Salme 1994: Gynekologinen irtosoludiagnostiikka: Näytteenottotekniikka, kiinnittäminen ja lähettäminen. Teoksessa Koivuniemi, Ari (toim.): Kliininen sytologia: Irtosolu-, harjairtosolu- ja ohutneulabiopsiatutkimukset. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy. 19 - 22.
- Kauraniemi, Tapani 1994: Gynekologinen irtosoludiagnostiikka: Kohdunkaulan levyepiteelikarsinooman esiasteiden sytologinen diagnostiikka. Teoksessa Koivuniemi, Ari (toim.): Kliininen sytologia: Irtosolu-, harjairtosolu- ja ohutneulabiopsiatutkimukset. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy. 73 - 84.
- Kekkonen, Anneli 2006: Gynekologista sytologiaa. Microsoft<sup>®</sup> PowerPoint<sup>®</sup> -esitys: gynsyt opetuskuvat.
- Kononen, Juha – Peltö-Huikko, Markku 1998: In situ-hybridisaatio. Teoksessa Rantala, Immo – Lounatmaa, Kari (toim.): Biologinen valomikroskopia. Helsinki: Yliopistopaino. 176 - 185.
- Kurman, Robert J. – Solomon, Diane 1994: The Bethesda System for Reporting Cervical/Vaginal Cytologic Diagnoses: Definitions, Criteria, and Explanatory Notes for Terminology and Specimen Adequacy. New York.
- Käypähoito 2006: Kohdunkaulan, emättimen ja ulkosynnyntien solumuutokset – diagnostiikka, hoito ja seuranta. Verkkodokumentti.

<[http://www.kaypahoito.fi/kh/kh\\_julkaisu.NaytaArtikkeli?p\\_artikkeli=hoi50049](http://www.kaypahoito.fi/kh/kh_julkaisu.NaytaArtikkeli?p_artikkeli=hoi50049)>. Luettu 20.10.

- Laurila, Pekka 2007: ”Säilyttääkö papa asemansa ensisijaisena seulontamenetelmänä?”. Rokote uutiset. Sanofi Pasteur MSD. 7 - 10.
- Lyly, Teppo 1985: Syöpä on monta sairautta. Teoksessa Alitalo, Kari – Andersson, Leif – Lyly, Teppo – Vaheri, Antti (toim.): Syövän biologia. Porvoo: WSOY. 9 - 18.
- Mäenpää, Juhani – Vesterinen, Ervo 2001: Ulkosynnyttimien , emättimen ja kohdunkaulan kasvaimet. Teoksessa Ylikorkala, olavi – Kauppila, Antti (toim.): Naistentaudit ja synnytykset. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 208 - 218.
- Nieminen, Pekka 2001: Gynekologinen irtosolunäyte. Teoksessa Ylikorkala, olavi – Kauppila, Antti (toim.): Naistentaudit ja synnytykset. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 258 - 267.
- NordiQC 2007: Ki-67. Verkkodokumentti. Päivitetty 1.4.2007. <<http://www.nordiqc.org/Epitopes/ki67/ki67.htm>>. Luettu 22.5.2007.
- Paavonen, Jorma 2001: Gynekologiset infektiot. Teoksessa Ylikorkala, olavi – Kauppila, Antti (toim.): Naistentaudit ja synnytykset. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 279 - 296.
- Paavonen, Jorma 2007: ”Voidaanko HPV-rokotteen myötä heittää hyvästit kohdunkaulan syövälle?”. Rokoteuutiset. Sanofi Pasteur MSD. 10 - 12.
- Patterson, Bruce K. 2007: Human Papillomaviruses. Teoksessa Murray, Patrick R. – Baron, Ellen Jo – Jorgensen, James H – Landry, Marie Louice – Pfaller, Michael A. (toim.): Manual of clinical microbiology. 9. painos. Volume 2. Washington, DC: ASM Press. 1601 - 1609.
- Roche 2006: AMPLICOR<sup>®</sup> Human Papilloma Virus (HPV) Test. Datasheet.
- Schiller, CL – Nickolov, AG – Kaul, KL – Hahn, EA – Hy, JM – Escobar, MT – Watkins WG – Sturgis, CD 2004: High-risk human papillomavirus detection: a split-sample comparison of hybrid capture and chromogenic in situ hybridization. Am J Clin Pathol 121 (4). 539 - 545.
- Shi, J – Zheng, JS – Yin, F – Hu, WW – Huang, XJ – Zhou, XL 2007: Association of p16, p53, Ki-67 expressions with high-risk human papilloma virus infection in cervical intraepithelial neoplasia. Verkkodokumentti. <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=17545048&ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed\\_ResultsPanel.Pubmed\\_RVDocSum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=17545048&ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum)>. Luettu 4.9.
- Solomon, Diane 2001: 2001 Terminology. Verkkodokumentti. <<http://bethesda2001.cancer.gov/terminology.html>>. Luettu 5.10.

- Stenbäck, Frej – Koivuniemi, Ari 1994: Yleistä sytologiaa. Teoksessa Koivuniemi, Ari (toim.): Kliininen sytologia: Irto- ja harjairtosolu- ja ohutneulabiopsiatutkimukset. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy. 1 - 16.
- Sulka, Leena 2007. Laboratoriohoitaja, sytologiassistentti. HUSLAB, patologian laboratorio. Helsinki. Suulliset tiedonannot maaliskuu - toukokuu.
- Suomen Syöpärekisteri 2007: Kohdunkaulan syövän seuranta. Verkkodokumentti. <<http://www.cancerregistry.fi/joukkotarkastus/2-10-14.html>>. Luettu 22.5.2007.
- Suominen, Ilari – Ollikka, Pauli 2004: Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. 3 - 2. painos. Helsinki: Opetushallitus.
- Syrjänen, Kari 1994: Gynekologinen irtosoludiagnostiikka: Gynekologiset papilloomavirusinfektiot, kondyloomat ja kohdunkaulan syövän esiasteet, histologiaa ja sytologiaa. Teoksessa Koivuniemi, Ari (toim.): Kliininen sytologia: Irto- ja harjairtosolu- ja ohutneulabiopsiatutkimukset. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy. 61 - 72.
- Syrjänen, Stina 2006: Ihmisen papilloomavirukset ja niiden aiheuttamat suuinfektiot. Suomen Hammaslääkärilehti 13 (6). 304 - 312.
- Tarkkanen, Jussi 2002: Nestepapatutkimus gynekologisen sytologian laadun parantajana. Moodi 26 (1). 50.
- Tarkkanen, Jussi 2007. Patologian erikoislääkäri, dosentti. HUSLAB, patologian laboratorio. Helsinki. Suulliset ja kirjalliset tiedonannot 1.9.–5.11.
- Timonen, Tuomo 1998: Sytologia. Teoksessa Rantala, Immo – Lounatmaa, Kari (toim.): Biologinen valomikroskopia. Helsinki: Yliopistopaino. 81 - 87.
- Tutkimussuunnitelma 2005: Tutkimussuunnitelma: kolposkopian ohjaus poikkeavan pappi- ja koostumuksen perusteella, tunnistetut: Kolposkopia-HPV. Sähköpostitiedonanto. Alkuperäinen lähettäjä Jakobsson, Maija. 3.6.
- Walboomers, Jan M. M. – Jacobs, Marcel V. – Manos, M. Michele – Bosch, F. Xavier – Kummer, J. Alain – Shah, Keerti V. – Snijders, Peter J. F. – Peto, Julian – Meijer, Chris J. L. M. – Muñoz, Nubia 1999: Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J. Pathol 189 (1). 12 - 19.
- Walt, AE – Lechago, J – Bose, S 2006: P16 and Ki67 immunostaining is a useful adjunct in the assessment of biopsies for HPV-associated anal intraepithelial neoplasia. Am J Surg Pathol 30 (7). 795 - 80.
- Ventana 2000: BenchMark Operator's Manual. Tuscon, AZ.
- Ventana 2007: INFORM® HPV III Tissue Probes. Microsoft® PowerPoint® -esitys: HPV III Tissue Nordic meeting.
- Ventana a. ISH iVIEW™<sub>Blue</sub> Plus Detection Kit. Datasheet. Tuscon, AZ.

- Ventana b. Theoretical approach of in situ hybridization. Microsoft® PowerPoint® -esitys: Molecular Genetic English.
- Ventana c. ultraView™ Universal DAB Detection Kit. Datasheet. Tuscon, AZ.
- Ventana d. Diagnostic Solutions. Personalized Medicine through Innovative Diagnostic Tools. Microsoft® PowerPoint® -esitys: UltraVIEW.
- Ventana e. Protocol 24: Ultra Ki-67. Procedure: BMK ultraView DAB Par. BenchMark IHC/ISH Staining Module.
- Ventana f. Protocol 27: Ultra p16 mild. Procedure: BMK ultraView DAB Par. BenchMark IHC/ISH Staining Module.
- Ventana g. The BenchMark IHC. Tuscon, AZ.
- Ventana h. HPV Tissue High Risk Positive Specimen Slides. Datasheet. Tuscon, AZ.
- Ventana i. Protocol 996: HPV III Family 16 +. Procedure: INFORM HPV III iVIEW Blue +. BenchMark IHC/ISH Staining Module.
- Ventana j. Principles of in situ hybridization. Microsoft® PowerPoint® -esitys: ISH general.
- Ventana k. INFORM® HPV III FamilyProbe (C). Datasheet. Tuscon, AZ.
- Ventana l. Protocol 999: Sytologinen HPV III. Procedure: INFORM HPV III iVIEW Blue +. BenchMark IHC/ISH Staining Module.
- Ventana m. HPV LBP Standard Procedure. Microsoft® Word -tiedosto.
- Vesterinen, Ervo 2004: Papa-kokeen kertomaa. Helsinki: Edita.
- Winter, Jenni 2007. Valokuvia. Kätilöopiston patologian laboratorio. 5.10.
- von Knebel Doeberitz 2002: New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. European Journal of Cancer 38 (17). 2229 - 2242.
- Vuopala, Salme – Koivuniemi, Ari 1994: Gynekologinen irtosoludiagnostiikka: Genitaalikanavan normaali sytologia ja histologia. Teoksessa Koivuniemi, Ari (toim.): Kliininen sytologia: Irtosolu-, harjairtosolu- ja ohutneulabiopsiatutkimukset. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy. 23 - 40.
- Värjäysohje 2007: Papanicolaoun konevärjäys gynekologisille irtosolunäytteille. Kätilöopiston patologian laboratorio. Helsinki. Työohje hyväksytty 28.2.
- Värjäyskaavio. Papanicolaoun konevärjäys nestemäisille gynekologisille irtosolunäytteille. Tissue-Tek DRS -laitteen värjäyskaavio. Kätilöopiston patologian laboratorio. Helsinki.

PAPANICOLAOUN KONEVÄRJÄYS GYNEKOLOGISILLE  
IRTOSOLUNÄYTTEILLE

Värjäys suoritetaan Tissue-Tek DRS-laitteella.

1. Gillin hematoksyliini	1 min. 30 s.
2. Juokseva vesi	30 s.
3. Aqua	2 min. 30 s.
4. 70 % alkoholi	2 min.
5. 3 % ammoniumdiffi	15 s.
6. 70 % alkoholi	2 min.
7. 80 % alkoholi	2 min.
8. 96 % alkoholi	2 min.
9. OG	2 min.
10. 96 % alkoholi	2 min.
11. 96 % alkoholi	2 min.
12. EA	3 min. 30 s.
13. 96 % alkoholi	2 min.
14. 96 % alkoholi	1 min.
15. Absoluuttinen alkoholi	2 min.
16. Absoluuttinen alkoholi	2 min.
17. Absoluuttinen alkoholi	2 min.
18. Ksyleeni	5 min.
19. Ksyleeni	5 min.
20. Lopuksi näytelasit laitetaan puhtaaseen ksyleeniin odottamaan peitinkalvoa.	

(Mukaiillen lähteestä Värjäysohje 2007.)

PAPANICOLAOUN KONEVÄRJÄYS NESTEMÄISILLE GYNEKOLOGISILLE  
IRTOSOLUNÄYTTEILLE

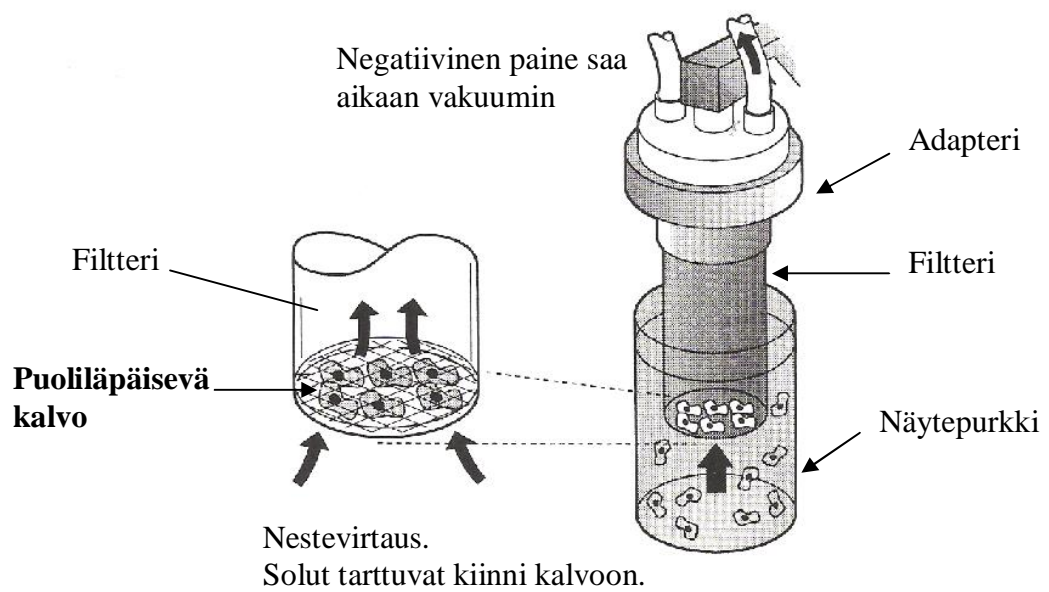
Värjäys suoritetaan Tissue-Tek DRS-laitteella.

- |   |              |
|---|--------------|
| 1. Gillin hematoksyliini  | 1 min. 30 s. |
| 2. Juokseva vesi  | 30 s.        |
| 3. Aqua   | 2 min. 30 s. |
| 4. 70 % alkoholi  | 2 min.       |
| 5. <u>3 % ammoniumdiffi</u>   | <u>8 s.</u>  |
| 6. 70 % alkoholi  | 2 min.       |
| 7. 80 % alkoholi  | 2 min.       |
| 8. 96 % alkoholi  | 2 min.       |
| 9. OG   | 2 min.       |
| 10. 96 % alkoholi   | 2 min.       |
| 11. 96 % alkoholi   | 2 min.       |
| 12. EA  | 3 min. 30 s. |
| 13. 96 % alkoholi   | 2 min.       |
| 14. 96 % alkoholi   | 1 min.       |
| 15. Absoluuttinen alkoholi  | 2 min.       |
| 16. Absoluuttinen alkoholi  | 2 min.       |
| 17. Absoluuttinen alkoholi  | 2 min.       |
| 18. Ksyleeni  | 5 min.       |
| 19. Ksyleeni  | 5 min.       |
| 20. Lopuksi näytelasit laitetaan puhtaaseen ksyleeniin odottamaan peitinkalvoa. |              |

Ainoa ero perinteisen gynekologisen irtosolunäytteen värjäykseen on aikaero ammoniumdiffissä.

(Mukaiillen lähteestä Värjäysohje.)

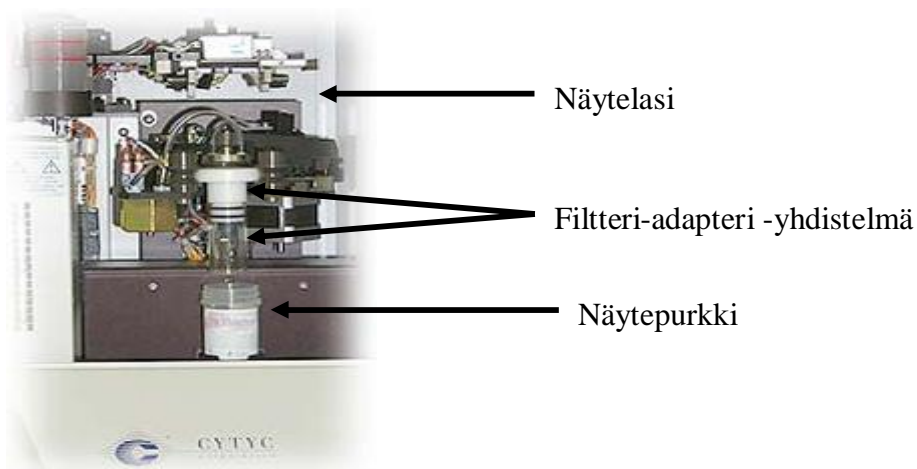
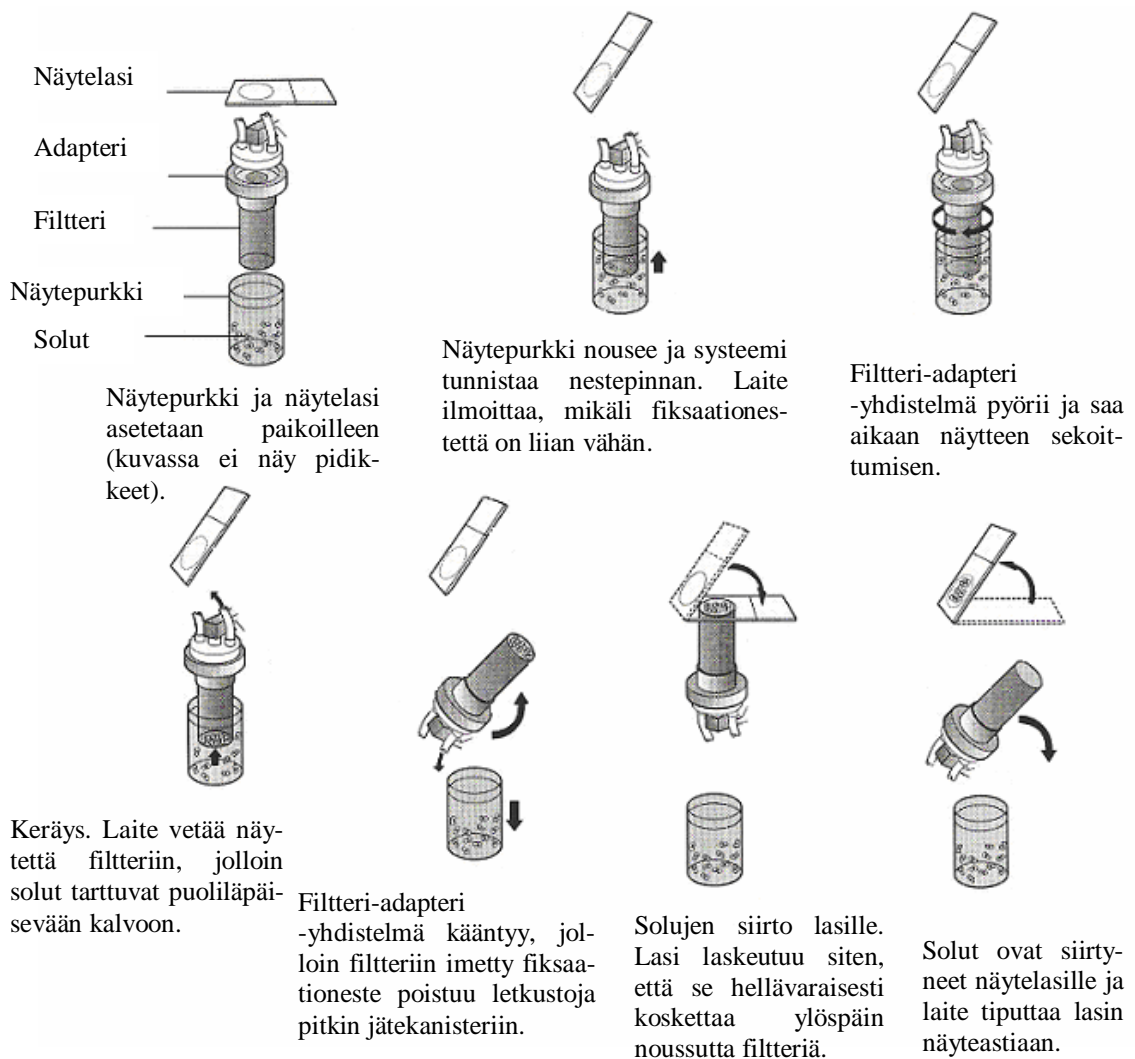
THINPREP® -NÄYTELASIN PROSESSOINTIIN KUULUVAN  
PUOLILÄPÄISEVÄN KALVON TOIMINTA



(Mukaan lähteestä Cytoc Corporation: 1.19.)



## NÄYTELASIN PROSESSOINTI NESTEMÄISESTÄ GYNEKOLOGISESTA IRTOSOLUNÄYTTEESTÄ THINPREP® 2000 -LAITTEELLA



(Mukailten lähteestä Cytoc Corporation: 1.21.)

p16<sup>INK4a</sup> -VÄRJÄYS BENCHMARK -LAITTEELLA

1. Leikkaa näyteblokista 4µm paksuiset leikkeet SuperFrost<sup>®</sup> Plus-lasien alalaitaan. Positiivinen kontrollileike leikataan lasin ylälaitaan.
2. Anna lasien kuivua kunnolla ja vie ne sitten lämpökaappiin 60°C:een.
3. Tee laseihin viivakooditarrat Benchmark<sup>®</sup> -tarratulostimella. Valitse protokolla. Kirjoita tarrojen ensimmäiselle riville näytenumero ja toiselle riville potilaan sukunimi.
4. Laita lasit koneeseen numerojärjestyksessä. Aloita ensimmäisestä puhtaasta näytepaikasta. Kun kaikki tai lähes kaikki paikat ovat käytettyjä, suorita pesuohjelma.
5. Aseta reagenssikiekko paikoilleen. Tarkista koneelta, että reagenssit riittävät. Tarkista myös puskureiden määrä ja jätekanisterin riittävyys.
6. Käynnistä ohjelma valitsemalla hiirellä kohta **Run**. Ruksita reagenssitarkistus ja jäteastiatarkistus. Merkitse lasien lukumäärä, jotka värjätään. Sen jälkeen valitse hiirellä **Start**.

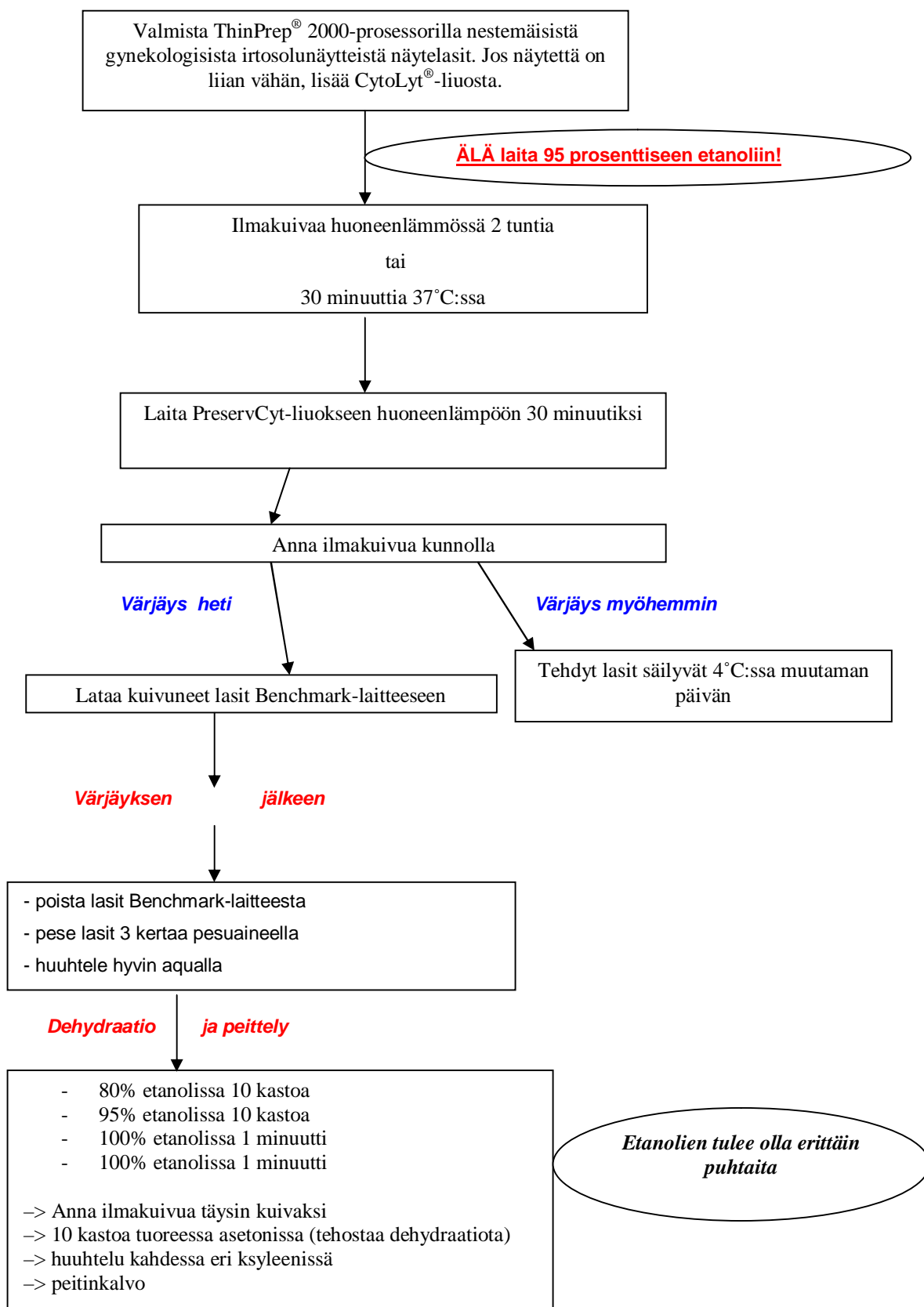
Laite lukee viivakoodit näytelaseilta selvittääkseen, mikä värjäys on kyseessä. Laite myös laskee lasit. Lukumäärän tulisi vastata koneelle syöttämäsi numeroa.

Seuraavaksi laite lukee reagenssien viivakoodit ja tarkistaa, että ne riittävät määrättyihin värjäyksiin ja ovat käyttökelpoisia.

Mikäli joku yllämainituista asioista ei täsmää, laite antaa virheilmoituksen, eikä käynnisty ennen kuin asia on korjattu.

7. Jos kyseessä on vanhentunut reagenssi *ultraView*<sup>tm</sup> Universal DAB Detection Kit -reagenssipakkauksesta, pitää tilalle vaihtaa kokonaan uusi kitti. Uuden ja vanhan kitin reagensseja ei saa sekoittaa keskenään.
8. Ohjelma kestää ~2 tuntia. Ohjelman päätyttyä laite antaa äänimerkkejä, kunnes hiirellä valitaan **Sign Off** ja avataan luukku.
9. Pese laseilta pois öljy kuumalla vedellä sekä Tisko –pesuaineella.
10. Vie lasit nousevan alkoholisarjan kautta aquasta ksyleeniin.
11. Peitä lasit lyhyellä kalvolla peitinkalvoautomaatilla.
12. Kirjaa näytteet QPATiin.
13. Kirjaa värjätyt näytteet vihkoon, joka on Benchmark<sup>®</sup> -laitteen vieressä.  
Merkitse vihkoon värjäyspäivämäärä, potilaan nimi, kuinka monta lasia värjätty sekä kenelle patologille jaettu.
14. Kun lasit ovat kuivuneet, tarkista kontrollien toimivuus. Vie lasit sen jälkeen tutkimusta pyytäneelle patologille pyynnön/lahetteen kanssa.

## NESTEMÄISTEN GYNEKOLOGISTEN IRTOSOLUNÄYTTEIDEN PROSESSOINTIKAAVIO IN SITU HYBRIDISAATIOLE



(Mukaiillen lähteestä Ventana m.)