



## Bruksanvisning

# CINtec<sup>®</sup> Histology Kit

CINtec<sup>®</sup> Histology Kit er en immunhistokjemianalyse for kvalitativ påvisning av p16<sup>INK4a</sup>-antigen på vevssnitt som er klargjort fra formalinfikserte parafininnstøpte cervikale biopsier. Den er indisert for bruk sammen med H&E-fargede objektglass som er klargjort fra samme cervikale vevsprøve, som et hjelpemiddel til å øke diagnostisk nøyaktighet og overensstemmelse mellom observatører når det gjelder diagnostisering av høygradig cervical intraepitelial neoplasi.




Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Strasse 116  
68305 Mannheim  
Germany

<https://navifyportal.roche.com>

**REF** 10213370001

**GTIN** 07613336230350

**Σ** 50

 2–8 °C



**CE**  
0123

**IVD**



## Innholdsfortegnelse

NORSK .....	2
I. Produktnavn .....	2
II. Tiltent bruk .....	2
III. Sammendrag og forklaring av enheten .....	2
Sammendrag og forklaring .....	2
Klinisk signifikans .....	3
Prosedyreprinsipp .....	4
IV. Reagenser .....	4
Materialer som følger med .....	4
Lagring .....	6
Nødvendige materialer og reagenser som ikke medfølger .....	6
Nødvendig utstyr .....	7
V. Advarsler og forholdsregler .....	7
Advarsel .....	7
Forsiktig .....	8
VI. Prosedyre .....	8
Klargjøring av prøven .....	8
Parafinnstøpte vevsprøver .....	8
Varmeindustert epitopdemaskering .....	9
Fargingsprosedyre .....	9
1. Reagensforberedelse .....	9
1.1 Epitope Retrieval Solution .....	9
1.2 Wash Buffer .....	9
1.3 Substrate-Chromogen Solution (DAB) .....	10
1.4 Kontrastfarge .....	10
1.5 Monteringsmedium .....	10
2. Fargingsprosedyre for Autostainer-instrumentet .....	10
2.1 Avparafinisering og rehydrering .....	10
2.2. Fargingsprotokoll for Autostainer-instrumentet .....	11
3. Fargingsprosedyre for manuell bruk .....	13
3.1 Avparafinisering og rehydrering .....	13
3.2 Fargingsprotokoll for manuell bruk .....	14
VII. Kvalitetskontroll .....	16
VIII. Tolkning av resultater .....	16
IX. Begrensninger .....	17
X. Ytelsesegenskaper .....	18
XI. Feilsøking .....	22
XII. Symboler .....	24
XIII. Produsent .....	25
XIV. Revisjonsstatus .....	25
XV. Opphavsrett .....	25
Vedlegg 1 Referanser .....	26
Vedlegg 2 .....	29

# NORSK

## I. Produktnavn

CINtec® Histology Kit

## II. Tiltent bruk

Til in vitro-diagnostisk bruk.

CINtex® Histology Kit er en immunhistokjemianalyse for kvalitativ påvisning av p16<sup>INK4a</sup>-antigen på vevssnitt som er klargjort fra formalinfikserte parafininnstøpte cervikale biopsier.

Den er indisert for bruk sammen med H&E-fargede objektglass som er klargjort fra samme cervikale vevsprøve, som et hjelpemiddel til å øke diagnostisk nøyaktighet og overensstemmelse mellom observatører når det gjelder diagnostisering av høygradig cervikal intraepitelial neoplasia.

Testen er beregnet på manuell bruk, eller til bruk på Autostainer-instrumentet.

Denne analysen skal tolkes av en kvalifisert patolog i sammenheng med en histologisk undersøkelse, relevant klinisk informasjon og egnede kontroller.

## III. Sammendrag og forklaring av enheten

### Sammendrag og forklaring

CINtec® Histology Kit er basert på et monoklonalt antistoff fra mus (klon E6H4®) rettet mot humant p16<sup>INK4a</sup>-protein.

Proteinet p16<sup>INK4a</sup> er en cyklinavhengig kinasehemmer som spiller en stor rolle i reguleringen av den eukaryotiske celledivisjonsprosessen. Det er en del av den retinoblastomprotein (pRB)-medierte kontrollen av G1-S-faseovergangen, og det utløser celledivisjonsstans i løpet av celledifferensieringsprosesser. I terminalt differensierte epitelceller er p16<sup>INK4a</sup>-uttrykket ved nivåer som vanligvis ikke påvises med immunhistokjemi.

I forskjellige tumorlegemer ble p16<sup>INK4a</sup>-genet funnet å være funksjonelt inaktivert av genmutasjon eller hypermetylering av promotor. Denne inaktiveringen av p16<sup>INK4a</sup>-tumorsuppressorgenet har vist seg å bidra til feilregulering av celledivisjonsprosessen og til tap av kontroll over celleproliferasjon.

I replikeringskompetente cervikale epitelceller derimot, hvor onkoproteiner fra høyrisiko-type av humant papillomvirus (HR-HPV) har iverksatt celletransformeringsprosessen, har p16<sup>INK4a</sup>-uttrykket vist seg å være høyt oppregulert [1; 2]. Dette sterke overuttrykket av p16<sup>INK4a</sup> er på molekylnivå tett knyttet til aktiviteten til E7-onkoproteinene fra HR-HPV. Overuttrykket av p16<sup>INK4a</sup> viste seg å gjenspeile den E7-onkoproteinmedierte inaktiveringen av det funksjonelle komplekset mellom pRB og transkripsjonsfaktor E2F, som er en av de viktigste hendelsene under den HR-HPV-induserte celletransformeringen [3].

Det finnes flere studier i den publiserte litteraturen som rapporterer at overuttrykk av p16<sup>INK4a</sup>-proteinet er observert immunhistokjemisk i en svært høy andel av tilfeller med høygradig kreftartet cervikal dysplasi (dvs. 80–100 % av CIN2-lesjoner og praktisk talt alle CIN3-lesjoner) og invasive kreftformer. Lavgradige cervikale

intraepiteliale lesjoner (CIN1) har vist seg å demonstrere p16<sup>INK4a</sup>-overuttrykk ved ulike nivåer, vanligvis innenfor et område på 30–60 % [1; 2; 4-16].

Tolkningen av resultatene må ta i betraktning at p16<sup>INK4a</sup> er et celleprotein som kan gi uttrykk ved detekterbare nivåer i cervikale høygradige dysplastiske lesjoner og cervikale kreftformer så vel som ved visse tilstander som ikke er forbundet med cervikal dysplasi, dog på ulike nivåer og med ulike uttrykksmønstre. Histologiske vevspreparater har intakt vevsmorfologi for å forenkle tolkningen av p16<sup>INK4a</sup>-positivitet i den cervikale lesjonen. Det har blitt foreslått at et diffust fargemønster, dvs. en kontinuerlig farging av celler på basale og parabasale cellelag med eller uten farging eller celler på overfladiske cellelag, skal klassifiseres som et positivt testresultat for p16<sup>INK4a</sup>-overuttrykk. Dette fargemønsteret har vist seg å gi det høyeste nivået av både sensitivitet og spesifisitet for høygradig CIN [1; 4; 5]. Derimot skal et fokalt fargemønster (farging av isolerte celler eller små celleklynger, dvs. ikke-kontinuerlig farging, spesielt ikke på basale og parabasale celler) så vel som mangel på immunreaktivitet klassifiseres som et negativt testresultat for p16<sup>INK4a</sup>-overuttrykk [1; 4; 5].

Tolkningen av objektglass farget for p16<sup>INK4a</sup> ved hjelp av CINtec<sup>®</sup> Histology Kit skal utføres i kombinasjon med H&E-fargede objektglass som er klargjort fra samme cervikale vevsprøve. Tilleggsinformasjonen fra de CINtec<sup>®</sup>-fargede objektglassene skal kombineres med den foreløpige morfologibaserte diagnosen fastsatt på de H&E-fargede objektglassene for å kunne stille en endelig diagnose.

### **Klinisk signifikans**

Den sammensatte målingen av H&E-fargede objektglass bestående av cervikale biopsisnitt sammen med etterfølgende objektglass fra samme vevsprøve, immunfarget for p16<sup>INK4a</sup>, har vist seg å forbedre den diagnostiske nøyaktigheten og overensstemmelsen mellom observatører ved diagnostisering av høygradig cervikal intraepitelial neoplasi (CIN2+).

Den patologiske diagnosen fastsatt på H&E-fargede cervikale vevssnitt utgjør grunnlaget for beslutningen om videre behandling. Følgelig er innvirkningen av en unøyaktig diagnose signifikant. Unøyaktig diagnose kan føre til feil pasientbehandling, dvs. overbehandling av praktisk talt friske kvinner eller underbehandling av kvinner med etablerte høygradige dysplastiske lesjoner.

Den diagnostiske tolkningen av histologiske H&E-fargede vevssnitt er gjenstand for mye uoverensstemmelse blant patologer. Lavt nivå av overensstemmelse mellom observatører og mellom observasjoner av samme observatør ved histologi av cervix er rapportert i forskjellige publikasjoner [17-20].

En stor multisenterstudie i USA vurderte tolkningen av histologiske undersøkelser av cervikale prøver (2237 kolposkopiske biopsier og 535 biopsiprøver fra LEEP-konisering) utført av flere velutdannede patologer. Reproduerbarheten til de histopatologiske tolkningene var kun moderat (kappa = 0,46 for punchbiopsier og kappa = 0,49 for LEEP-biopsiprøver) [17]. Med WHO og et modifisert Bethesda-klassifiseringssystem har man demonstrert at overensstemmelsen mellom seks histopatologer som vurderer 125 kolposkopiske biopsiprøver, er lav for begge klassifiseringssystemer [18]. Likeledes demonstrerte en studie utført i Storbritannia lav overensstemmelse mellom åtte histopatologeksperter som undersøkte 100 kolposkopiske biopsiprøver (uvektet kappa-verdi på 0,358) [19].

Ved å anvende objektglass farget med <sup>®</sup> Histology Kit i tillegg til de konvensjonelle H&E-fargede objektglassene som brukes til å fastsette diagnosen, forbedres den samlede nøyaktigheten for denne histomorfologiske diagnoseprosedyren [21-39].

## **Prosedyreprinsipp**

CINtec® Histology Kit inneholder et sett med reagenser for immunhistokjemisk påvisning av p16<sup>INK4a</sup>-antigen. Settet er designet for å utføre en totrinns immunhistokjemisk fargingsprosedyre for formalinfikserte parafininnstøpte vevsprøver hentet fra cervikale biopsier. For påvisning av antigenet brukes et primært monoklonalt antistoff fra mus, klon E6H4®, rettet mot humant p16<sup>INK4a</sup>-protein.

Et bruksklart visualiseringsreagens som består av en polymerreagens konjugert med pepperrotperoksidase og anti-mus-Fab'-antistofffragmenter fra geit. Visualization Reagent er underlagt solid-faseabsorpsjon for å eliminere kryssreaktivitet med humane immunoglobuliner. Kromogenreaksjonen er basert på pepperrotperoksidase-mediert omdanning av et DAB Chromogen til et synlig reaksjonsprodukt ved antigenstedet. Etter kontrastfarging kan prøven dekkes med glass, og resultatene kan evalueres med lysmikroskopiinspeksjon.

## **IV. Reagenser**

### **Materialer som følger med**

Materialene som er oppgitt nedenfor er inkludert i hvert sett og er tilstrekkelig til å utføre 50 tester og 50 reaksjoner med negativ kontroll. Antallet tester er basert på bruken av 200 µL av reagensene per objektglass.

#### **1 Peroxidase Blocking Reagent**

##### **Peroxidase Blocking Reagent**

2 x 11,5 mL klar til bruk

3 % hydrogenperoksid, som inneholder 15 mmol/L natriumazid (NaN<sub>3</sub>).

EUH210: Sikkerhetsdataark tilgjengelig på forespørsel.

#### **2 Anti-humant p16<sup>INK4a</sup>-antistoff fra mus**

##### **Anti-humant p16<sup>INK4a</sup>-antistoff fra mus**

11,5 mL klar til bruk

Monoklonalt anti-humant p16<sup>INK4a</sup>-antistoff fra mus (~1 µg/mL), klon E6H4™, levert i 50 mmol/L Tris-buffer pH 7,2, som inneholder 15 mmol/L natriumazid (NaN<sub>3</sub>) og stabiliserende protein.

#### **3 Visualization Reagent**

##### **Visualization Reagent**

2 x 11,5 mL klar til bruk



Advarsel

H317 Kan gi en allergisk hudreaksjon.

P261 Unngå innånding av støv/røyk/gass/tåke/damper/spray.

P272 Tilsølte arbeidsklær må ikke fjernes fra arbeidsplassen.  
P280 Benytt vernehansker.  
P333 + P313 Ved hudirritasjon eller utslett: Søk legehjelp.  
P362 + P364 Tilsølte klær tas av og vaskes før de brukes igjen.  
P501 Innhold/beholder leveres til et godkjent avfallsanlegg.

Inneholder:

26172-54-3 2-metyl-2H-isotiazol-3-on-hydroklorid  
55965-84-9-reaksjonsmasse på: 5-klor-2-metyl-4-isotiazolin-3-on [EC-nr. 247-500-7] og 2-metyl-2H-isotiazol-3-on [EC-nr. 220-239-6] (3:1)

Polymerreagens konjugert med pepperrotperoksidase og affinitetsrenset anti-mus-Fab' antistoff-fragmenter fra geit, levert i stabiliseringsløsning bestående av konserveringsmidler og stabiliserende protein.

#### 4 Negative Reagent Control

##### **Negative Reagent Control**

11,5 mL klar til bruk

Monoklonalt anti-rotte oksytocinrelatert nevrofysin-antistoff fra mus (~1 µg/mL) leveres i 50 mmol/L Tris-buffer pH 7,2 som inneholder 15 mmol/L natriumazid (NaN<sub>3</sub>) og stabiliserende protein. Til verifikasjon av spesifisiteten til fargingen. Rotteoksytocin-relatert nevrofysin er ikke til stede i humant vev.

#### 5 DAB Buffered Substrate

##### **DAB Buffered Substrate**

31 mL

Substratbufferløsning, pH 7,5, som inneholder < 0,1 % hydrogenperoksid, stabilisatorer og forsterkningsmidler.

#### 6 DAB Chromogen

##### **DAB Chromogen**

0,85 mL, 3,3'-diaminobenzidinkromogenløsning.



Fare

H290 Kan være etsende for metaller.  
H314 Gir alvorlige etseskader på hud og øyne.  
H341 Mistenkes for å kunne forårsake genetiske skader.  
H350 Kan forårsake kreft.

P201 Innhent særskilt instruks før bruk.

P280 Benytt vernehansker/verneklær/øyevern/ansiktsvern.

P303 + P361 + P353 VED HUDKONTAKT (eller håret): Ta straks av alle kontaminerte klær. Skyll huden med vann.

P304 + P340 + P310 VED INNÅNDING: Flytt personen til frisk luft og hold vedkommende i komfortabelt pustestilling. Kontakt GIFTSENTRALEN/lege umiddelbart.

P305 + P351 + P338 + P310 VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser hvis dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett å skylle. Kontakt GIFTSENTRALEN/lege umiddelbart.  
P308 + P313 Ved eksponering eller mistanke om eksponering: Søk legehjelp.

Inneholder 868272-85-9 3,3'-diaminobenzidin-tetrahydroklorid-hydrat

**MERK:** Ta kontakt med lokale eller nasjonale myndigheter for forskrifter om avhending.

## 7 Epitope Retrieval Solution 10X

### **Epitope Retrieval Solution 10X**

500 mL, 100 mmol/L Tris-buffer pH 9 som inneholder 10 mmol/L DTA og 15 mmol/L natriumazid (NaN<sub>3</sub>).

### **Lagring**

Oppbevares ved 2–8 °C. Skal ikke brukes etter utløpsdatoen for holdbarhet. Ingen data er generert i forhold til oppbevaringen av reagensene under alle andre forhold enn de som er oppgitt over.

Etter at pakken er åpnet, er komponentene stabile i 6 måneder hvis oppbevart ved 2–8 °C. Løsninger må kastes hvis de ser grumsete ut.

Fortynnet Wash Buffer og fortynnet Epitope Retrieval Solution er stabil i opptil én måned hvis de oppbevares ved 2–8 °C. Løsningene må ikke brukes hvis de virker grumsete.

### **Nødvendige materialer og reagenser som ikke medfølger**

**CINtec® Wash Buffer 10X** som skal brukes med CINtec® Histology Kit, er tilgjengelig under katalognummer 10215364001 fra Roche, men er ikke inkludert i settet. For detaljer om bestilling, se websiden [www.roche.com](http://www.roche.com).

500 mmol/L tris-buffer løsning med 1,5 mol/L NaCl, pH 7,6, inneholder vaskemiddel og et antimikrobielt middel.



Advarsel

H317 Kan gi en allergisk hudreaksjon.

P261 Unngå innånding av støv/røyk/gass/tåke/damper/spray.

P272 Tilsølte arbeidsklær må ikke fjernes fra arbeidsplassen.

P280 Benytt vernehansker.

P333 + P313 Ved hudirritasjon eller utslett: Søk legehjelp.

P362 + P364 Tilsølte klær tas av og vaskes før de brukes igjen.

P501 Innhold/holder leveres til et godkjent avfallsanlegg.

Inneholder 55965-84-9 reaksjonsmasse på: 5-klor-2-metyl-4-isotiazolin-3-on [EC-nr. 247-500-7] og 2-metyl-2H-isotiazol-3-on [EC-nr. 220-239-6] (3:1)

Absorberende kluter;  
Hematoxylin kontrafarge;  
Destillert eller deionisert vann (vaskevann);  
Etanol, 95 % og 70 %;  
Monteringsmedium;  
Positive og negative vev for å bruke som prosesskontroller;  
Objektglass (SuperFrost® Plus eller tilsvarende);  
Xylen;  
Dekkglass.

### **Nødvendig utstyr**

Valgfritt: Tørkeovn som kan holde en temperatur på 60 °C eller mindre;  
Valgfritt: Dako eller LabVision Autostainer-instrument;  
Fuktighetskammer (valgfritt);  
Lysmikroskop (4–40x objektiv forstørrelse);  
Fargeglass eller bad;  
Vaskeflasker;  
Tidsmåler (som kan måle 2–60 minutters intervaller);  
Vannbad med lokk (kan opprettholde Epitope Retrieval Solution ved 95–99 °C).

## **V. Advarsler og forholdsregler**

### **Advarsel**

1. Forsiktig! Noen av reagensene i dette settet inneholder farlige kjemikalier. Ved håndtering av komponentene i denne pakken, følg forholdsregler for sikkerhet for håndtering av farlige laboratoriereagenser.
2. Komponenter 1, 2, 4 og 7 i dette produktet inneholder natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ), som er sterkt toksisk i sin rene form. Selv om natriumazid ikke er klassifisert som farlig, kan det ved produktkonsentrasjoner reagere med bly- og kobberer og utvikle meget eksplosive ansamlinger av metallazider. Ved avhending, skyll rikelig med vann for å unngå azidanopsamling i rørene.
3. Komponenter 2, 3 og 4 inneholder materiale av animalsk opphav. Følg riktige håndteringsprosedyre slik den er aktuell for produkt som er laget av biologisk opphav.
4. Sikkerhetsdataark for settet er tilgjengelig på forespørsel.
5. Ved håndtering og avhending av histologiprøver, inkludert alle prøver før og etter fiksering, så vel som alle materialer som er utsatt for dem, skal du følge sikkerhetsforholdsreglene for håndtering av potensielt smittefarlig materiale så vel som gjeldende krav til avfallsavhending.
6. Aldri pipetter reagenser med munnen. Unngå kontakt mellom hud/slimhinnene og reagenser og prøver. Hvis reagensene eller prøvene kommer i kontakt med huden eller slimhinnene, vask med rikelig med vann.

7. Visualization Reagent og DAB Chromogen kan påvirkes negativt hvis de utsettes for mye lys. Ikke oppbevar pakkekomponenter eller utfør farging i sterkt lys, f.eks. direkte sollys.
8. Bruk egnet personlig verneutstyr for å unngå kontakt med øyne og hud ved håndtering av noen av komponentene som er inkludert eller som skal brukes i sammenheng med CINtec® Histology Kit. Se sikkerhetsdataark (SDS) for mer informasjon.
9. Produktsikkerhetsmerking følger primært EU GHS-veiledningen.

## **Forsiktig**

1. Til in vitro-diagnostisk bruk.
2. Kun til profesjonell bruk.
3. Minimer mikrobiell kontaminering av reagenser for å unngå ikke-spesifikk farging.
4. Andre inkubasjonstider, temperaturer eller metoder enn de som er spesifisert, kan gi feilaktige resultater.
5. Ikke bruk pakken hvis emballasjen eller noen av komponentene i den er skadet. Dersom emballasjen kompromitteres eller komponentene skades, vennligst informer produsenten om dette umiddelbart.
6. Avhending av alle avfallsmaterialer må være i samsvar med lokale retningslinjer og forskrifter.
7. Alle reagenser er utviklet spesielt for bruk med denne testen. For at testen skal utføres som spesifisert, skal ingen substitusjoner gjøres.
8. Hvis det observeres uventet farging som ikke kan forklares av variasjoner i laboratorieprosedyrer og det er mistanke om et problem med CINtec® Histology Kit, se kontaktinformasjon gitt i del XIII. for mer informasjon om teknisk støtte.
9. Hvis produktet svikter på grunn av problemer med håndtering eller ustabilitet, resulterer det ikke i tydelige tegn. Som kvalitetskontrolltiltak, skal derfor positive og negative kontroller kjøres samtidig med pasientprøver.
10. Hvis du trenger å rapportere mistenkte alvorlige hendelser knyttet til denne enheten, kontakter du den lokale Roche-representanten og den ansvarlige myndigheten i medlemslandet der brukeren holder til.

## **VI. Prosedyre**

### **Klargjøring av prøven**

CINtec® Histology Kit er laget for bruk med vevsprøver konserverte for immunhistokjemiske prosedyrer. Prøver skal klargjøres i henhold til standardmetoder for vevsprosessering.

Positivt ladde objektglass, f.eks. SuperFrost® Pluss-objektglass, anbefales for optimal ytelse.

### **Parafinnstøpte vevsprøver**

Nøytralt bufrede formalinfikserte parafinnstøpte vevsprøver behandlet med rutinemessige standardmetoder er egnet for bruk med dette settet. Hvis prøver klargjøres med en annen konserveringsmetode, må brukeren verifisere at metoden er egnet.

Prøver fra biopsien skal fikseres i 18–24 timer i nøytralbufret formalin (10 % anbefales) og deles opp i snitt med en tykkelse på 3 eller 4 mm. Vevssnittene dehydreres deretter i en rekke alkoholer og xylen etterfulgt av infiltrering med smeltet parafin holdt ved maksimalt 60 °C. Hvert vevsblokk deles opp i 4–5 µm og monteres på SuperFrost® Pluss mikroskopiglass av et histopatologilaboratorium. Objektglass skal farges umiddelbart, da antigenisiteten til skårne vevssnitt kan reduseres over tid.

## **Varmeindusert epitopdemaskering**

For varmefremkalt epitopdemaskering, må vevssnittene montert på objektglass varmes opp ved nedsenking i Epitope Retrieval Solution i et kalibrert vannbad som kan opprettholde Epitope Retrieval Solution ved en temperatur på 95–99 °C. Laboratorier som ligger høyere til, skal bestemme best metode for å opprettholde nødvendig temperatur på vannbadet. Produsenten anbefaler ingen avvik fra prosedyren som er beskrevet her.

Etter varmeindusert epitopdemaskering må vevssnittene nedkjøles ved romtemperatur i 20 minutter før de behandles videre. Deretter må fargingen av vevssnittene utføres umiddelbart.

## **Fargingsprosedyre**

### **1. Reagensforberedelse**

Alle reagenser skal nå romtemperatur (20–25 °C) før immunfarging. Tilsvarende skal alle etterfølgende trinn utføres ved romtemperatur.

Vær forsiktig så du unngår å tørke prøvene i løpet av immunfargingsprosedyren, da tørking kan føre til fargingsartefakter.

De følgende reagensene skal klargjøres før oppstart med fargingsprosedyren:

#### **1.1 Epitope Retrieval Solution**

Klargjør volumet med Epitope Retrieval Solution som må til for fargeprosedyren som er planlagt ved fortykning av en mengde av beholder 7 (Epitope Retrieval Solution 10X) 1:10 med destillert eller deionisert vann.

Etter fortykning kan Epitope Retrieval Solution oppbevares ved 2–8 °C i opptil en måned. Den fortynnede løsningen må kastes hvis den ser grumsete ut.

**MERK:** Bruk av vann med forhøyede nivåer av ioner for fortykning av epitopgjenvinningsløsningen kan redusere testens fargeytelse betydelig. Vennligst pass på at vannet som brukes er riktig destillert eller deionisert (dvs. forsikre deg om at ionutvekslingssøylen for produksjon av avionisert vann er kontrollert i rutinemessig vedlikehold). Ikke bruk vann fra kranen!

#### **1.2 Wash Buffer**

Bruk CINTec® Wash Buffer 10X, katalognummer 10215364001, levert av Roche i kombinasjon med CINTec® Histology Kit. For detaljer om bestilling, se websiden [www.roche.com](http://www.roche.com).

Klargjør et volum av som må til for vasketrinnene i fargeprosedyren som er planlagt ved fortykning av en mengde av Wash Buffer 10X, katalognummer 8550, 1:10 med destillert eller deionisert vann.

Etter fortynning kan Wash Buffer oppbevares ved 2–8 °C i opptil en måned. Den fortynnete løsningen må kastes hvis den ser grumsete ut.

### 1.3 Substrate-Chromogen Solution (DAB)

For klargjøring av Substrate-Chromogen Solution, må én dråpe DAB Chromogen tilsettes til 2 mL DAB Buffered Substrate. Gå frem på følgende måte:

- i) Overfør 2 mL DAB Buffered Substrate beholder 5 til et testrør;
- ii) Tilsett én dråpe (25–30 µL) av DAB Chromogen fra beholder 6. Bland og påfør på vevssnittene med en pipetter.

2 mL av Substrate-Chromogen Solution (DAB) klargjort etter instruksjonene ovenfor er vanligvis tilstrekkelig for å farge fem vevssnitt, inkludert tilhørende fem kontrollprøver.

**MERK:** Bruk den klargjorte Substrate-Chromogen Solution (DAB) innenfor samme dag.

**MERK:** Tilsetning av for mye DAB Chromogen til DAB Buffered Substrate vil resultere i at det positive signalet svekkes.

### 1.4 Kontrastfarge

DAB-fargereaksjonen resulterer i et vannløselig farget sluttprodukt. Alkohol eller vannbasert hematoxylin kan brukes til motfarging. Hvis brukt, følg instruksjonene som er gitt av leverandøren av hematoxylin for å utføre kontrastfarging.

### 1.5 Monteringsmedium

Til å montere objektglassprøver etter farging anbefales et ikke-vandig, permanent monteringsmedium. Men vannholdig montering er også akseptabel.

Eukitt monteringsmedium anbefales for ikke-vannholdig montering. Aquatex Merck anbefales for ikke-vannholdig montering.

## 2. Fargingsprosedyre for Autostainer-instrumentet

CINtec® Histology Kit er tilpasset for bruk på Autostainer-instrumentet (Lab Vision Autostainer 480 eller Dako Autostainer Plus) i henhold til malen som er skissert nedenfor. Det er mulig å bruke andre instrumenter eller systemer med sammenlignbar funksjon etter hensiktsmessig validering utført av brukeren. Før farging med Autostainer-instrumentet skal prøvene og reagensene klargjøres som oppgitt i Punkt 1.1–1.5 og 2.1

### 2.1 Avparafinisering og rehydrering

Forut for avparafinisering plasserer du objektglassene i en tørkeovn ved en temperatur på maks 60 °C i minst 20 minutter, men ikke i lenger enn én time for å kvantitativt fjerne vann og dermed forbedre klebingen av vevet til objektglasset («baking») og smelte parafinen. Vevsobjektglass må avparafiniseres for å fjerne innstøpningsmediet og må deretter rehydreres før fargingsprosedyren kan utføres. Det er kritisk å unngå ufullstendig fjerning av parafin, da resterende innstøpningsmedium vil føre til økt ikke-spesifikk farging. Inkuber objektglassene ved omgivelsestemperatur (20–25 °C) i henhold til følgende trinn.

- 5 ( $\pm$ 1) minutter i et xylenbad;
- gjenta dette trinnet én gang med et friskt bad;
- fjern overflødig væske;
- 3 ( $\pm$ 1) minutter i 95 % etanol;
- gjenta dette trinnet én gang med et friskt bad;
- fjern overflødig væske;
- 3 ( $\pm$ 1) minutter i 70 % etanol;
- gjenta dette trinnet én gang med et friskt bad;
- fjern overflødig væske;
- minimum 30 sekunder i destillert eller deionisert vann.

Begynn fargeprosedyrene som beskrevet i Punkt 2.2, trinn 1: Epitopdemaskering.

Xylen- og alkoholløsninger skal ikke brukes til mer enn 40 objektglass.

**MERK:** Brukere skal være oppmerksom på at variasjoner i utstyrtemperatur eller eksponeringstider under preanalytisk prøveklargjøring kan føre til ufullstendig fjerning av parafin fra vevsobjektglassene. Resterende parafin kan føre til ufullstendig farging med histologifarging, inkludert CINTec® histologifarging. Histopatologiske laboratorier skal inkludere regelmessig overvåking av utstyret for å redusere variasjon i prøveklargjøring før farging. Observasjon av skarpt definerte grenser innenfor immunreaktive vevsområder eller andre fargeuoverensstemmelser innenfor et objektglass kan med enhver immunhistokjemisk farging være en indikator på ikke-optimal eller ufullstendig preanalytisk behandling av prøven. Brukerne bør vurdere å kontrollere utstyret og de preanalytiske prøveklargjøringsmetodene hvis inkonsekvent farging observeres.

## 2.2. Fargingsprotokoll for Autostainer-instrumentet

### Trinn 1: Epitopdemaskering

- fyll fargingsglass, *f.eks.* Coplin-glass i plast med den fortynnede Epitope Retrieval Solution (se prosedyre, punkt 1.1);
- plasser fargingsglassene som inneholder Epitope Retrieval Solution i vannbad og varm vannbadet og til 95–99 °C. Det er viktig å justere vannivået i vannbadet for å sikre at glassene er senket 80 % ned i vannet. Dekk til glassene med lokk for å stabilisere temperaturen og unngå fordampning;
- dykk de avparafiniserte snittene i den forvarmede Epitope Retrieval Solution i fargingsglassene; dette trinnet vil vanligvis senke temperaturen i glassene til mindre enn 90 °C;
- få temperaturen på vannbadet **og** Epitope Retrieval Solution i glassene tilbake til 95–99 °C; sjekk temperaturen på Epitope Retrieval Solution i glassene;
- inkuber i 10 ( $\pm$ 1) minutter ved 95–99 °C; begynn å telle ned først etter at det er bekreftet at temperaturen på Epitope Retrieval Solution i glassene har nådd 95–99 °C;
- ta hele glasset med objektglassene ut av vannbadet;
- la objektglassene kjøles ned i Epitope Retrieval Solution i 20 ( $\pm$ 1) minutter ved romtemperatur;

- dekanter Epitope Retrieval Solution og skyll snittene i Wash Buffer (se prosedyre, punkt 1.2);
- for optimal ytelse senk snittene i Wash Buffer i 5 minutter etter epitopdemaskering og før farging.

**MERK:** Epitope Retrieval Solution er utformet kun for engangsbruk. Ikke bruk på nytt.

## Trinn 2: Programmering av instrumentet

Før den første påføringen av CINtec® Histology Kit på et Autostainer-instrumentet, må en ny mal settes opp. Se brukerhåndboken for den konkrete Autostainer-instrumentet.

## Trinn 3: Automatisk fargemaskinprosedyre

- overfør reagensene fra pakkeflaskene til reagensflaskene på den automatiske beholdere. Bruk kartet generert av den automatiske fargemaskinen for programtider og reagensvolum (se punkt 4 for spesifikke tider og volum);
  - sett reagensflaskene fra den automatiske beholdere inn i reagensstativet på fargemaskinen i henhold til «Reagens-oppsett-kartet»;
  - last objektglassene på den automatiske fargemaskinen i henhold til det datagenererte objektglassoppsettskartet;
  - for å forhindre tørking skal prøvene drysses med vaskebuffer etter lasting på den automatiske fargemaskinen;
  - følgende er en beskrivelse av programkjøringen:
    - skyll\*;
    - 200 µL Peroxidase Blocking Reagent– 5 minutter;
    - skyll\*;
    - 200 µL Primary p16<sup>INK4a</sup> antibody eller Negative Reagent Control – 30 minutter;
    - skyll\*;
    - 200 µL Visualization Reagent – 30 minutter;
    - skyll\*;
    - skyll\*;
    - skyll\*;
    - bytt;
    - 200 µL Substrate-Chromogen Solution (DAB) – 10 minutter;
    - skyll\*;
    - skyll objektglassene i deionisert vann etter substratkromogentrinnet.
- \*bruk Wash Buffer for de respektive skylletrinnene.

**MERK:** Hvis det Autostainer-instrumentet som brukes skyller objektglass med buffer, må objektglassene skylles med deionisert vann når de er fjernet fra den Autostainer-instrumentet.

## Trinn 4: Kontrastfarging (instruksjonene er for hematoxylin)

- senk objektglassene i et bad med hematoxylin. Inkuber i 2–5 minutter, avhengig av styrken på brukt hematoxylin;
- plasser objektglassene i et springvannbad og skyll forsiktig med rennende vann fra springen. Se til at alle resterende hematoxylin har blitt fjernet;
- skyll objektglassene forsiktig en kort stund i et bad med destillert eller deionisert vann;
- Kontrastfarging kan utføres direkte på Autostainer-instrumentet.

**MERK:** Avhengig av inkubasjonstid og potens for det benyttede hematoxylin vil kontrastfarging gi en blek til mørk blå farging av cellekjerner. For mye eller ufullstendig kontrastfarging kan virke forstyrrende på den riktige tolkningen av resultater.

## Trinn 5: Montering

Ikke-vannbasert, permanent monteringsmedium anbefales. Ellers er også vannholdig monteringsmedium akseptabelt. Følg bruksanvisningen fra leverandøren av monteringsmediet.

**MERK:** For å minimere falming skal objektglassene beskyttes mot lys og oppbevares i romtemperatur (20–25 °C).

## 3. Fargingsprosedyre for manuell bruk

**MERK:** Forhindre uttørking av vevssnittene under fargingsprosedyren. Tørkede vevssnitt kan føre til økt ikke-spesifikk farging. For langvarige inkubasjoner holdes vevene i et fuktig miljø.

Følg standardprosedyrene som brukes ved manuell immunhistologifarging ved bruk av CINtec® Histology Kit for manuell farging.

### 3.1 Avparafinisering og rehydrering

Forut for avparafinisering plasserer du objektglassene i en tørkeovn ved en temperatur på maks 60 °C i minst 20 minutter, men ikke i lenger enn én time for å kvantitativt fjerne vann og dermed forbedre klebingen av vevet til objektglasset («baking») og smelte parafinen. Vevsobjektglass må avparafiniseres for å fjerne innstøpningsmediet og må deretter rehydreres før fargingsprosedyren kan utføres. Det er kritisk å unngå ufullstendig fjerning av parafin, da resterende innstøpningsmedium vil føre til økt ikke-spesifikk farging. Inkuber objektglassene ved omgivelsestemperatur (20–25 °C) i henhold til følgende trinn.

- 5 (±1) minutter i et xylenbad;
- Gjenta dette trinnet én gang med et friskt bad;
- Fjern overflødig væske;
- 3 (±1) minutter i 95 % etanol;
- Gjenta dette trinnet én gang med et friskt bad;
- Fjern overflødig væske;
- 3 (±1) minutter i 70 % etanol;
- Gjenta dette trinnet én gang med et friskt bad;
- Fjern overflødig væske;
- Minimum 30 sekunder i destillert eller deionisert vann.

Begynn fargeprosedyrene som beskrevet i Punkt 3.2, trinn 1: Epitopdemaskering. Xylen- og alkoholløsninger skal ikke brukes til mer enn 40 objektglass.

### 3.2 Fargingsprotokoll for manuell bruk

#### Trinn 1: Epitopdemaskering

- fyll fargingsglass, *f.eks.* Coplin-glass i plast med den fortynnede Epitope Retrieval Solution (se prosedyre, punkt 1.1);
- plasser fargingsglassene som inneholder Epitope Retrieval Solution i vannbad og varm vannbadet og til 95–99 °C. Her er det viktig å justere vannivået i vannbadet for å sikre at glassene er senket 80 % ned i vannet. Dekk til glassene med lokk for å stabilisere temperaturen og unngå fordampning;
- dykk de avparafiniserte snittene i den forvarmede Epitope Retrieval Solution i fargingsglassene; dette trinnet vil vanligvis senke temperaturen i glassene til mindre enn 90 °C;
- få temperaturen på vannbadet **og** Epitope Retrieval Solution i glassene tilbake til 95–99 °C; sjekk temperaturen på Epitope Retrieval Solution i glassene;
- inkuber i 10 ( $\pm 1$ ) minutter ved 95–99 °C; begynn å telle ned først etter at det er bekreftet at temperaturen på Epitope Retrieval Solution i glassene har nådd 95–99 °C;
- ta hele glasset med objektglassene ut av vannbadet;
- la objektglassene kjøles ned i Epitope Retrieval Solution i 20 ( $\pm 1$ ) minutter ved romtemperatur;
- dekanter Epitope Retrieval Solution og skylt snittene i den fortynnede Wash Buffer (se prosedyre, punkt 1.2);
- for optimal ytelse senk snittene i Wash Buffer i 5 ( $\pm 1$ ) minutter etter epitopdemaskering og før farging.

**MERK:** Epitope Retrieval Solution er utformet kun for engangsbruk. Ikke bruk på nytt.

#### Trinn 2: Peroxidaseblokkeringsreagens

- påfør 200  $\mu$ L Peroxidase Blocking Reagent for å dekke prøven;
- inkuber i 5 ( $\pm 1$ ) minutter;
- bank forsiktig av overflødig væske og plasser snittene i et ferskt Wash Buffer-bad i 5 ( $\pm 1$ ) minutter.

#### Trinn 3: Primary Antibody eller Negative Reagent Control

- fjern overflødig buffer;
- dekk til prøven med 200  $\mu$ L Primary Antibody (Mus Anti-Humane p16<sup>INK4a</sup> fra mus eller Negative Reagent Control);
- inkuber i 30 ( $\pm 1$ ) minutter;
- bank forsiktig av overflødig væske og plasser snittene i et ferskt Wash Buffer-bad i 5 ( $\pm 1$ ) minutter.

#### Trinn 4: Visualization Reagent

- fjern overflødig buffer;
- dekk til prøven med 200 µL Visualization Reagent;
- inkuber i 30 (±1) minutter;
- bank forsiktig av overflødig væske og plasser snittene i et ferskt bufferbad i 5 (±1) minutter;
- gjenta dette trinnet to ganger med et bad i fersk Wash Buffer.

#### Trinn 5: Substrate-Chromogen Solution (DAB)

- dekk til prøven med 200 µL Substrate-Chromogen Solution (DAB) som er klargjort i henhold til prosedyren som er beskrevet i 1.3 ovenfor;
- inkuber i 10 (±1) minutter;
- bank forsiktig av overflødig væske og skyll forsiktig med destillert eller deionisert vann.

Samle avfallet fra Substrate-Chromogen Solution (DAB) i en beholder for farlig avfall for riktig bortskaffing.

#### Trinn 6: Kontrastfarging (instruksjonene er for hematoxylin)

- senk objektglassene i et bad med hematoxylin. Inkuber i 2–5 minutter, avhengig av styrken på brukt hematoxylin;
- plasser objektglassene i et springvannbad og skyll forsiktig med rennende vann fra springen. Se til at alle resterende hematoxylin har blitt fjernet;
- skyll objektglassene forsiktig en kort stund i et bad med destillert eller deionisert vann;

**MERK:** Avhengig av inkubasjonstid og potens for det benyttede hematoxylin vil kontrastfarging gi en blek til mørk blå farging av cellekjerner. For mye eller ufullstendig kontrastfarging kan virke forstyrrende på den riktige tolkningen av resultater.

#### Trinn 7: Montering

Ikke-vannbasert, permanent monteringsmedium anbefales. For xylen-baserte permanente monteringsmedier er det nødvendig med en dehydreringsprosedyren, f.eks.

- destillert eller deionisert vann
- 3 min. 70 % etanol
- 3 min. 70 % etanol
- 3 min. 96 % etanol
- 3 min. 99 % etanol
- 5 min. xylen
- 5 min. xylen

Ellers er også vannholdig monteringsmedium akseptabelt. Følg bruksinstruksjonene til leverandøren for monteringsmedium.

**MERK:** For å minimere falming skal objektglassene beskyttes mot lys og oppbevares i romtemperatur (20–25 °C).

## VII. Kvalitetskontroll

Avvik fra anbefalte prosedyrer for prøvifiksering og -behandling på brukerens laboratorium kan gi signifikant variasjon i resultater og nødvendiggjøre vanlig utførelse av interne kontroller.

### Positiv vevskontroll

Eksterne positive kontrollmaterialer skal være autopsi-/biopsi/kirurgiprøver fiksert, behandlet og innstøpt så snart som mulig på samme måte som pasientprøven(e). Positive vevskontroller indikerer riktig klargjorte vevsprøver og riktige fargeteknikker. Én positive ekstern vevskontroll for hvert sett med testbetingelser skal inkluderes i hver fargekjøring. Vevsprøvene som brukes for de eksterne positive kontrollmaterialene, skal velges fra pasientprøver med kjent positiv farging for p16<sup>INK4a</sup>. Hvis de positive vevskontrollene ikke viser egnet positiv farging, bør resultater med testprøvene anses som ugyldige.

### Negativ vevskontroll

Celletyper kjent for å være negative for p16<sup>INK4a</sup> er til stede i de fleste vevssnitt og kan brukes av laboratorieteknikeren som interne negative kontrollsteder for å verifisere IHC-tytelsesspesifikasjonene. Hvis det forekommer spesifikk farging (falskt positiv farging) i den negative vevskontrollen, skal resultater med pasientprøvene betraktes som ugyldige.

### Ikke-spesifikk Negative Reagent Control

Bruk den ikke-spesifikke Negative Reagent Control i stedet for det primære antistoffet med et snitt av hver pasientprøve for å evaluere ikke-spesifikk farging og muliggjøre bedre tolkning av spesifikk farging på antigenstedet.

Hvis det forekommer spesifikk farging (falskt positiv farging) med den ikke-spesifikke Negative Reagent Control, skal resultater med pasientprøvene betraktes som ugyldige.

## VIII. Tolkning av resultater

Kontrollprøver farget med Negative Reagent Control som primær reagens, må ikke vise spesifikk farging.

Positiv farging med det monoklonale anti-humane antistoffet av mus p16<sup>INK4a</sup>, klon E6H4<sup>™</sup> vurderes i lys av eventuell ikke-spesifikk bakgrunnsfarging i Negative Reagent Control. På samme måte som for alle andre immunhistokjemiske tester betyr et negativt resultat at antigenet ikke ble påvist, og ikke at antigenet ikke var til stede i cellene eller det analyserte vevet.

Tolkningen av resultatene må ta i betraktning at p16<sup>INK4a</sup> er et celleprotein som kan gi uttrykk ved detekterbare nivåer i cervikale høygradige dysplastiske lesjoner og cervikale kreftformer så vel som ved visse tilstander som ikke er forbundet med cervikal dysplasi, dog på ulike nivåer og med ulike uttryksmønstre.

De fargede objektglassprøvene evalueres i henhold til et binært klassifiseringssystem med klassifiseringene «positiv» og «negativ».

Klassifiseringen «positiv» tildeles hvis den p16<sup>INK4a</sup>-fargede objektglassprøven viser en kontinuerlig farging av celler på de basale og parabasale cellelagene til skvamøst cervikalt epitel, med eller uten farging av celler på overfladiske cellelag («diffust fargemønster»). Et eksempel på et objektglass klassifisert som "positivt" («diffust fargemønster») vises i vedlegg 2, figur 1.

Klassifiseringen «negativ» tildeles hvis den p16<sup>INK4a</sup>-fargede objektglassprøven viser enten en negativ fargereaksjon i skvamøst epitel («negativt fargemønster») eller en farging av isolerte celler eller små celleklynger, dvs. en ikke-kontinuerlig farging, spesielt ikke av basale og parabasale celler («fokalt fargemønster»). Et eksempel på et objektglass klassifisert som «negativt» («fokalt fargemønster») vises i vedlegg 2, figur 2.

Tolkningen av objektglass farget for p16<sup>INK4a</sup> ved hjelp av CINtec® Histology Kit skal utføres i kombinasjon med H&E-fargede objektglass som er klargjort fra samme cervikale vevsprøve. Tilleggsinformasjonen fra de CINtec®-fargede objektglassene skal kombineres med den foreløpige morfologibaserte diagnosen fastsatt på de H&E-fargede objektglassene for å kunne stille en endelig diagnose.

## IX. Begrensninger

- Kun til profesjonell bruk. Spesiell opplæring kreves for å utføre immunhistokjemiske prosedyrer.
- Den kliniske tolkningen av en positiv eller negativ farging skal evalueres i sammenheng med klinisk presentasjon, morfologi og andre histopatologiske kriterier. Den kliniske tolkningen av en positiv eller negativ farging må suppleres av morfologiske studier med egnede positive og negative interne og eksterne kontroller så vel som andre diagnostiske tester. Det er ansvaret til en kvalifisert patolog som er kjent med riktig bruk av IHC-antistoffer, reagenser og metoder, å tolke alle trinnene som brukes til å klargjøre og tolke det endelige IHC-preparatet.
- Fargerresultatene i immunhistokjemien påvirkes sterkt av kvaliteten på vevet som farges. Følgelig vil trinnene for fiksering, vasking, tørking, oppvarming, snitting eller kontaminering med annet vev bidra betydelig til det samlede resultatet av fargingen, og kan føre til artefakter, antistoffansamling eller falskt negative resultater. Uoverensstemmende resultater kan skyldes variasjoner i fikserings- og innstøpingsmetoder eller naturlige uregelmessigheter i vevet.
- For mye eller ufullstendig kontrastfarging kan virke forstyrrende på den riktige tolkningen av resultater.
- Produsenten leverer disse antistoffene/reagensene ved optimal fortykning til bruk i henhold til instruksjonene som er gitt i dette dokumentet, for IHC-testing på klargjorte vevssnitt. Ethvert avvik fra anbefalte testprosedyrer kan gjøre erklærte forventede resultater ugyldige. Behørig kontroll må benyttes og dokumenteres. Brukere som avviker fra de anbefalte testprosedyrene, må i disse tilfellene selv bære ansvaret for tolkningen av pasientresultater.
- Falskt positive resultater kan ses på grunn av immunologisk binding av proteiner eller substratreaksjonsprodukter. De kan også skyldes pseudoperoksidase-aktivitet (erytrocytter) og endogen peroksidase (cytokrom C).

- Reagenser kan fremvise uventede reaksjoner i vevstyper som ikke har vært testet tidligere. På grunn av biologiske variasjoner i antigenuttrykket i neoplasmer eller annet patologisk vev, kan ikke muligheten for antigenekspresjon selv i testede prøvegrupper utelukkes helt. Kontakt Roche mtm Laboratories AG med dokumenterte uventede reaksjoner. Du finner kontaktinformasjon til teknisk støtte i avsnitt XIII.
- Ikke bytt ut pakkereagenser med reagenser som har forskjellige serienumre eller med reagenser fra andre produsenter.

## X. Ytelsesegenskaper

### Klinisk ytelse

Den kliniske ytelsen til CINtec® Histology Kit har blitt evaluert i en kontrollert klinisk studie ved hjelp av formalinfikserte, parafinnstøpte cervikale vevsprøver [21]. Studien ble utviklet for å demonstrere egnetheten til CINtec® Histology Kit og som et hjelpemiddel for å øke den diagnostiske nøyaktigheten og overensstemmelsen mellom observatører for påvisning av høygradig cervical intraepitelial neoplasi (CIN2+).

Den kliniske studien ble utført på retrospektivt innsamlede cervikale punch- og koniseringsbiopsier. Totalt 500 cervikale prøver innhentet fra to forskjellige europeiske patologilaboratorier, beriket for høygradig dysplasi basert på opprinnelige diagnoser, ble brukt til preparering av H&E-fargede objektglass og etterfølgende objektglass farget med CINtec® Histology Kit i henhold til produsentens instruksjoner.

Tre europeiske gynekopatologi-eksperter stilte uavhengige diagnoser i hvert tilfelle basert på det H&E-fargede objektglasset. Tilfeller med avvikende resultater gjennomgikk en felles andre evalueringsprosess under et adjudiseringsmøte, og flertallsdiagnosene (konsensusdiagnosene, to av tre) fungerte som referansediagnosen for studien.

Tolv forskere (sertifiserte patologer som evaluerer cervical patologi regelmessig) fra 4 europeiske land (Frankrike, Italia, Spania og Tyskland), deltok som panelpatologer i studien. I den første runden av objektglasstolkning stilte alle panelpatologer egne diagnoser for hvert tilfelle basert på kun H&E-fargede objektglass. Patologene var til enhver tid blindet mot de opprinnelige diagnosene og referansediagnosene. Etter en utvaskingsperiode på mer enn 4 uker ble det samme settet med H&E-fargede objektglass (med nye etiketter) evaluert på nytt av alle de tolv panelpatologene i kombinasjon med de samsvarende objektglassene for hvert tilfelle farget med CINtec® Histology Kit.

For å vurdere forbedringene i diagnostisk nøyaktighet for de CINtec® Histologifargede cervikale objektglassene som måles med de respektive H&E-fargede objektglassene, sammenlignet med de H&E-fargede cervikale objektglassene alene, ble resultatene fra hver panelpatologs målinger sammenlignet med konsensusdiagnosene fastsatt av de tre gynekopatologi-eksperterne.

### Resultater:

Totalt 482 tilfeller med fullstendige diagnoser fra alle studiepatologer ble inkludert i dataanalysen. Frekvensene for de forskjellige diagnosekategoriene basert på konsensusdiagnosene fra de tre gynekopatologi-eksperterne var negativ for dysplasi (n = 194), CIN1 (n = 96), CIN2 (69) og CIN3 (n = 123).

### Diagnostisk nøyaktighet for påvisning av CIN2+

Den samlede sensitiviteten for identifikasjonen av CIN2+ ble økt fra 1787 (H&E) til 2018 (H&E pluss CINtec® Histology) reelt positive CIN2+-resultater, med kun en liten reduksjon i samlet spesifisitet fra 3088 (H&E) til 3051 (H&E pluss CINtec® Histologi) reelt negative ≤CIN1-resultater.

Tabell 1

Forbedring av diagnostisk nøyaktighet for høygradig CIN (CIN2+) gjennom kombinert måling av H&E pluss CINtec® Histologi-fargede objektglass sammenlignet med H&E-fargede objektglass alene, antall sant positive, falskt negative, falskt positive og sant negative resultater sammenlignet med konsensusdiagnosene av ekspertpatologene er oppgitt (Merk: Totalt samsvar med konsensusdiagnosen av ekspertpatologene ville ha resultert i 2304 (192 CIN2+ tilfeller, x 12 panelpatologer) sant positive resultater)

	Sant positive	Falskt negative	Falskt positive	Sant negative
H&E	1787	517	392	3088
H&E+CINtec® Histologi	2018	286	429	3051

ANOVA-modell med blandede virkninger for Jackknife-pseudoverdier, også kjent som Dorfman-Berbaum-Metz (DBM)-metoden, ble brukt til å teste effektene av CINtec®-Histologi-testen på nøyaktigheten.

Nullhypotesen om at den diagnostiske nøyaktigheten basert på H&E pluss CINtec® Histology-fargede objektglass for CIN2+ er lik, ble avvist med  $p=0,0004$  (område under kurven (AUC) for H&E: 0,877; AUC for H&E pluss CINtec® Histology: 0,925).

Tabell 2

Ytelsesegenskaper for den konjunktive avlesningen av H&E pluss CINtec® Histology-fargede objektglass sammenlignet med H&E-fargede objektglass alene for identifiseringen av høygradig CIN (CIN2+). Konsensusdiagnoser fastsatt av tre gynekopatologiekspertter på H&E-fargede objektglass brukt som referansediagnoser

	H&E % (95 % CI)	H&E+CINtec® Histology % (95 % CI)
Sensitivitet	77,6 % (75,8, 79,3)	87,6 % (86,2, 88,9)
Spesifisitet	88,7 % (87,6, 89,8)	87,7 % (86,5, 88,8)
PPV	82,0 % (80,3, 83,6)	82,5 % (80,9, 84,0)
NPV	85,7 % (84,5, 86,8)	91,4 % (90,4, 92,4)
DLR+	6,885 (6,256; 7,578)	7,105 (6,494; 7,773)
DLR-	0,253 (0,234; 0,273)	0,142 (0,127; 0,158)

95 % CI, 95 % konfidensintervaller, PPV, positiv prediktiv verdi, NPV, negativ prediktiv verdi, DLR+, positiv diagnostisk sannsynlighetsforhold, DLR-, negativ diagnostisk sannsynlighetsforhold

Med konsensusdiagnosen til de tre ekspertgynekopatologene som referanse ble følsomheten i påvisningen av CIN2+ forbedret med relative 13 % (følsomhet for H&E-diagnoser på 77,6 % økt til 87,6 % for diagnoser etablert på H&E pluss CINtec® Histologi-fargede objektglass).

Økningen i diagnostisk nøyaktighet for påvisning av CIN2+ ble uavhengig dokumentert med statistisk signifikans for undergruppene av cervikale punchbiopsier (n = 249; AUC for H&E: 0,895; AUC for H&E pluss CINtec® Histology: 0,929; p = 0,0053) og cervikale koniseringsprøver (n = 233; AUC for H&E: 0,887; AUC for H&E pluss CINtec® Histology: 0,948; p = 0,009).

### Overensstemmelse mellom observatører for påvisning av CIN2+

For å vurdere forbedringen av overensstemmelsen for påvisning av CIN2+ mellom panelpatologer ble det brukt en flerklassifiseringsversjon av Kappa-statistikken mellom diagnostisering utført på H&E-fargede cervikale objektglass og diagnostisering utført på H&E-fargede objektglass målt i kombinasjon med CINtec® Histologifargede cervikale objektglass.

*Tabell 3*

Forbedring av overensstemmelse mellom observatører for påvisning av CIN2+ ved kombinert måling av H&E pluss CINtec® Histologifargede objektglass sammenlignet med H&E-fargede objektglass alene. Kappa-verdier gitt som en sjanse-korrigert måling av overensstemmelsen

Diagnostisk kategori	Kappa H&E	Kappa H&E pluss CINtec®	Statistisk signifikans
CIN2+, alle tilfeller	0,580	0,756	p<0,0001
CIN2+, kun punchbiopsier	0,598	0,748	p<0,0001
CIN2+, kun koniseringsbiopsier	0,548	0,765	p<0,0001

Kappa-statistikken som en sjansekorrigert måling av overensstemmelsen mellom panelpatologene for påvisning av CIN2+ ble betydelig forbedret for målinger av H&E pluss CINtec® Histologi-fargede objektglass sammenlignet med måling av kun H&E-objektglass (økning i kappa-verdier for alle tilfeller fra 0,580 til 0,756; p<0,0001).

### Reproduserbarhet ved klassifisering av p16<sup>INK4a</sup>-fargemønsteret

Samsvaret blant panelpatologene når det gjelder å klassifisere p16<sup>INK4a</sup>-fargemønsteret i cervikale vevsprøver som diffust p16<sup>INK4a</sup>-positive, fokalt p16<sup>INK4a</sup>-positive eller p16<sup>INK4a</sup>-negative ble evaluert.

Det var et høyt nivå av reproduserbarhet mellom patologer når det gjaldt å klassifisere p16<sup>INK4a</sup>-fargemønsteret som enten positivt (diffust fargemønster) eller negativt (fokalt fargemønster eller ingen immunreaktivitet). Kappa-verdien (sjanse-korrigert måling av overensstemmelse) for reproduserbarhet mellom de tolv panelpatologene når det gjaldt å klassifisere p16<sup>INK4a</sup>-fargemønsteret som enten positivt (diffust fargemønster) eller negativt (fokalt fargemønster og ingen immunreaktivitet) viste seg å være utmerket (gjennomsnittlig kappa = 0,899; median-kappa = 0,903).

## Analytisk ytelse

### Analytisk sensitivitet

Sensitivitetsstudien ble utført med CINtec® Histology Kit fra 3 partier. Trettifem cervikale biopsier med CIN3+ ble analysert i sensitivitetsstudien, inkludert 6 biopsier klassifisert som CIN3, og 29 biopsier klassifisert som skvamøst cellekarsinom.

Fem av 6 (83,3 %) av tilfeller klassifisert som CIN3 viste sterkt diffus p16-farging. Én CIN3-biopsi viste svak p16-uttrykk men manglet et klart p16-positivt signal.

Tjueto av 29 (75,9 %) av tilfeller klassifisert som skvamøst cellekarsinom viste sterkt diffus p16-farging. Fem tilfeller av skvamøst cellekarsinom viste svakt p16-uttrykk men manglet et klart p16-positivt signal. Kun 2 av 29 (6,9 %) av tilfellene var helt negative for p16. Dette kan forklares da det ble tidligere meldt at 3–8 % av skvamøst cellekarsinom-tilfeller var negative for p16-farging [1; 6]. Dette kan avspeile en lav prosent av tilfeller der dedifferensiering og kromosomale omordninger førte til inaktivering eller sletting av p16-genlocusen.

For alle 3 partier resulterte farging på et brønnkarakterisert panel av rottevevssnitt med Negative Reagent Control i sterk og spesifikk farging av enkeltnevroner i rottehjernen. I tillegg viste noen kanalikulære nyreceller, enkeltmakrofager i milten og enkeltmakrofager og plasmaceller i tynntarmen, svak farging. Andre vev av rottevevsmatrisen var helt negative.

Anti-p16-antistoffet E6H4™ kan gi kontinuerlig farging av celler av de basale og parabasale cellelagene, med eller uten farging av celler av mellomliggende og overflatiske lag av det skvamøse epitelium i cervikale biopsier med høygradig CIN (CIN2, CIN3). Negative Reagent Control (NRC) kan påvise spesifikt nevroner i rotten.

### Analytisk spesifisitet

Spesifisiteten av det anti-humane p16<sup>INK4a</sup> antistoffet klon E6H4™ har blitt verifisert av Western blot-analyse (positiv for HeLa celleinjeksat; se også [1]).

Spesifisitetsstudien ble utført med CINtec® Histology Kit fra 3 partier på et brønnkarakterisert panel av 90 NBF (nøytralt bufret formalin)-fikserte normalvevsprøver (30 forskjellige typer vev) og 54 andre tumorvev enn cervix uteri (ordnet i matriser med flere vev (Multi Tissue Arrays = MTA-er)).

For farging med det p16-spesifikke antistoffet (klon E6H4™) på normale vev ble 16 forskjellige p16-negative vev observert [cerebrum, cerebellum, binyren, skjoldbruskkjertel, beinmarg, hjerte, spiserør, mage, tarm, kolon, lever, nyre, stripet muskel, hud, mesotelium, cervix] og 14 forskjellige p16-positive vev [Svak farging: hypofysen, lunge, thymus-kjertel, prostata; positiv: nerve, tarm, mandel, bukspyttkjertel, milt; sterkt positiv: livmor, eggstokk, bryst, testis, parathyroid]. For farging med det p16-spesifikke antistoffet (klon E6H4™) på andre tumorvev enn cervix uteri ble det observert 22 forskjellige tilfeller av p16-negativ tumor og 32 forskjellige p16-positiv tumor.

For alle 3 partier med CINtec® Histology var resultatene negative for alle vev (normalt vev og tumorvev) testet ved bruk av Negative Reagent Control. Det monoklonale anti-rotte oksytocinrelatert nevrofysin-antistoffet, reagerer ikke signifikant med humane normale vevsprøver og humant tumorvev.

## Reproduserbarhet

### Reproduserbarhet mellom kjøringer

Reproduserbarheten mellom kjøringer ble bestemt for CINtec® Histology Kit med den manuelle protokollen ved å farge 36 objektglass klargjort fra vevsblokker som ble diagnostisert som CIN2+. De dysplastiske områdene på alle snitt ble farget med sammenlignbar intensitet (+/- 0,5 på en skala fra 0 til 3) mellom alle kjøringer. Normale områder på alle objektglass viste ingen spesifikk farging.

### Reproduserbarhet innen kjøringer

Reproduserbarheten innen kjøringer ble bestemt med CINtec® Histology Kit med den manuelle protokollen og på det Autostainer-instrumentet på tre ulike dager. Totalt tre vevsblokker diagnostisert som CIN2+ ble inkludert. Fra hver blokk ble et seriesnitt inkludert hver dag. De dysplastiske områdene på snittene fra én blokk ble farget med sammenlignbar intensitet (+/- 0,5 på en skala fra 0 til 3) på alle dager og også i manuell og automatisk farging. Normale områder på alle objektglass viste ingen spesifikk farging.

### Reproduserbarhet mellom partier

For å bestemme reproduserbarhet mellom partier ble CINtec® Histology Kit fra 3 ulike partier brukt for å farge snitt fra CIN2+-tilfeller. Manuell og automatisk farging ble utført i overensstemmelse med protokollen som finnes i bruksanvisningen. De dysplastiske områdene på snittene fra én blokk ble farget med sammenlignbar intensitet (+/- 0,5 på en skala fra 0 til 3) med reagensene fra alle tre partier i manuell og automatisk farging. Normale områder på alle objektglass viste ingen spesifikk farging.

Merk at skåringsmeoden for fargingsintensitet med en skala fra 0 til 3 utelukkende ble brukt til analytiske ytelsesevalueringsformål og skal ikke brukes til tolkning av fargingen av vevssnitt i klinisk praksis. I stedet skal den kvalitative tolkningen av fargede objektglass som beskrevet i punkt VIII, brukes til rutinetolkningen.

## XI. Feilsøking

Se del XIII. for kontaktinformasjon ved behov for teknisk hjelp.

<b>Problem</b>	<b>Sannsynlig årsak</b>	<b>Foreslått handling</b>
<b>1. Ingen farging av objektglass</b>	<b>1a.</b> Avvik fra bruksanvisninger;	<b>1a.</b> Les bruksanvisningen nøye og hold deg til prosedyrene som fremgår av den;
<b>2. Svak farging av objektglass</b>	<b>2a.</b> Utilstrekkelig gjenvinning av epitop;	<b>2a.</b> Bruk nylig klargjort Epitope Retrieval Solution og / eller pass på at epitopdemaskeringsløsning når 95–99 °C i hele 10 minutter og får avkjøles i ytterligere 20 minutter;
	<b>2b.</b> Utilstrekkelige reagensinkubasjonstider;	<b>2b.</b> Gjennomgang 2.2. / 3.2. Fargingsprotokollanbefalinger;
	<b>2c.</b> Utilstrekkelig fikseringsmetode;	<b>2c.</b> Sjekk at pasientvevet ikke overfikseres eller at det ikke ble brukt alternativt fiksativ;
















Problem	Sannsynlig årsak	Foreslått handling
	<b>2d.</b> Vann som er brukt til å fortynne Epitope Retrieval Solution inneholder for høy ion-konsentrasjon;	<b>2d.</b> Sjekk at ionutvekslingsøylen for produksjon av deionisert vann er kontrollert under rutinemessig vedlikehold;
	<b>2e.</b> Utilstrekkelig avparafinisering;	<b>2e.</b> Brukere skal være oppmerksom på at variasjoner i utstyrstemperatur eller eksponeringstider under preanalytisk prøveklargjøring kan føre til ufullstendig fjerning av parafin fra vevsobjektglassene. Resterende parafin kan føre til ufullstendig farging med histologifarging, inkludert CINtec® histologifarging.  Histopatologiske laboratorier skal inkludere regelmessig overvåkning av utstyret for å redusere variasjon i prøveklargjøring før farging. Observasjon av skarpt definerte grenser innenfor immunreaktive vevsområder eller andre fargeuoverensstemmelser innenfor et objektglass kan med enhver immunhistokjemisk farging være en indikator på ikke-optimal eller ufullstendig preanalytisk behandling av prøven. Brukerne bør vurdere å kontrollere utstyret og de preanalytiske prøveklargjøringsmetodene hvis inkonsekvent farging observeres;
<b>3. For mye bakgrunnsfarging av objektglass</b>	<b>3a.</b> Ufullstendig fjerning av parafin;	<b>3a.</b> Bruk ferske xylenbad og følg prosedyren slik som skissert i Punkt 2.1. / 3.1.;
	<b>3b.</b> Montering av snitt på objektglass utført med tilsetningsstoffer med stivelse;	<b>3b.</b> Tilsetningsstoffer med stivelse som ble brukt til å montere snitt, kan utvise immunreaktivitet og bør derfor unngås;
	<b>3c.</b> Utilstrekkelig skylling av objektglass;	<b>3c.</b> Bruk fersk løsning i bufferbad og vaskeflasker;
	<b>3d.</b> Tørking av snitt under fargingsprosedyren;	<b>3d.</b> Bruk fuktighetskammer. Tørk kun over tre til fire objektglass om gangen før påføring av reagens;

Problem	Sannsynlig årsak	Foreslått handling
	<b>3e.</b> Utilstrekkelig fikseringsmetode;	<b>3e.</b> Bruk bare fiksativ som er anbefalt i dette dokumentet. Feilaktig fiksert vev kan utvise for mye bakgrunnsfarging;
	<b>3f.</b> Ikke-spesifikk binding av reagenser til vev;	<b>3f.</b> Kontroller fikseringsmetoden til prøven og om det foreligger nekrose;
<b>4. Vev løsner fra objektglass</b>	<b>4a.</b> Bruk av uegnede objektglass;	<b>4a.</b> Følg anbefalingene her og bruk SuperFrost® Plus-objektglass;
<b>5. For sterk spesifikk farging</b>	<b>5a.</b> Utilstrekkelig fikseringsmetode;	<b>5a.</b> Sørg for riktig fiksativ og fikseringsmetode;
	<b>5b.</b> Forlengede reagensinkubasjonstider;	<b>5b.</b> Se gjennom og følg fargingsprotokollen som er oppgitt i punktene 2.2/3.2 ovenfor;
	<b>5c.</b> Utilstrekkelig vaskeløsning;	<b>5c.</b> Bruk Wash Buffer (10 x) (katalognummer 8550).

## XII. Symboler

Symbol:

Forklaring:

	Katalognummer
	Partikode
	Globalt artikkelnummer
	Unik enhetsidentifikator
	In vitro-diagnostisk medisinsk enhet
	Produsent
	Inneholder nok til <n> tester
	Se bruksanvisningen
	Brukes før
	Temperaturgrense
	Produksjonsdato
	Må ikke gjenbrukes
	Kontakt for teknisk støtte (telefon)
	Inneholder materialer med opprinnelse fra dyr
	Innhold

### **XIII. Produsent**

**Produsert av:** Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Strasse 116  
68305 Mannheim  
Germany

<https://navifyportal.roche.com>

**Ta kontakt for teknisk support (telefon):** +800 5505 6606

Sammendrag av sikkerhet og ytelse finner du her:

<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>

### **XIV. Revisjonsstatus**

Gjeldende bruksanvisning utgjør versjon 2.0, utgitt i november 2025.

Endringer fra tidligere versjon (1.0, utgitt i juni 2024):

- H290 lagt til
- Redaksjonelle endringer

### **XV. Opphavsrett**

CINtec er et varemerke som tilhører Roche.

Alle andre varemerker tilhører sine respektive eiere.

© 2025 Roche

## Vedlegg 1

### Referanser

1. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, and von Knebel Doeberitz M. Overexpression of p 16<sup>INK4a</sup> as a specific marker for dysplasia and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001, 92(2):276-84
2. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, and Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol* 1998, 153(6):1741-8
3. von Knebel Doeberitz M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer* 2002, 38(17):2229-42
4. Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D, Kurman RJ, Schmidt D, Stoler M, and von Knebel Doeberitz M. p16<sup>INK4a</sup> immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surgical Pathol* 2002, 26(11):1389-99
5. Wang SS, Trunk M, Schiffman M, Herrero R, Sherman ME, Burk RD Hildesheim A, Concepcion Bratti M, Wright TC, Rodriguez AC, Chen S, Reichert A, von Knebel Doeberitz C, Ridder R, and von Knebel Doeberitz M. Validation of p16<sup>INK4a</sup> as a marker of oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004, 13(8):1355-60
6. Agoff SN, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB, and Koutsky LA. p16<sup>INK4a</sup> expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Modern Pathol* 2003, 16(7):665-73
7. Negri G, Egarter-Vigl E, Kasal A, Romano F, Haitel A, and Mian C. p16<sup>INK4a</sup> is a useful marker for the diagnosis of adenocarcinoma of the cervix uteri and its precursors: an immunohistochemical study with immunocytochemical correlations. *Am J Surg Pathol* 2003, 27(2):187-93
8. Negri G, Vittadello F, Romano F, Kasal A, Rivasi F, Girlando S, Mian C, and Egarter-Vigl E. p16<sup>INK4a</sup> expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Virchows Arch* 2004, 445(6):616-20
9. Schorge JO, Lea JS, Elias KJ, Rajanbabu R, Coleman RL, Miller DS, and Ashfaq R. p16<sup>INK4a</sup> as molecular biomarker of cervical adenocarcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 2004, 190(3):668-73
10. Christal JL, and Valente PT. The utility of p16 immunohistochemistry in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Case Rev* 2006, 11(3):117-20
11. Kong CS, Balzer BL, Troxell ML, Patterson BK, and Longacre TA. p16<sup>INK4a</sup> Immunohistochemistry is Superior to HPV In Situ Hybridization for the Detection of High-risk HPV in Atypical Squamous Metaplasia. *Am J Surg Pathol* 2007, 31(1):33-43
12. Nucci MR, and Crum CP. Redefining Early Cervical Neoplasia: Recent Progress. *Adv Anat Pathol* 2007, 14(1):1-10
13. Ishikawa M, Fujii T, Saito M, Nindl I, Ono A, Kubushiro K, Tsukazaki K, Mukai M, and Nozawa S. Overexpression of p16<sup>INK4a</sup> as an indicator for human papillomavirus oncogenic activity in cervical squamous neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 2006, 16(1):347-53

14. Kalof AN, Evans MF, Simmons-Arnold L, Beatty BG, and Cooper K. p16<sup>INK4a</sup> Immunoeexpression and HPV In Situ Hybridization Signal Patterns Potential Markers of High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2005, 29(5):674-9
15. Ansari-Lari MA, Staebler A, Zaino RJ, Shah KV, and Ronnett BM. Distinction of Endocervical and Endometrial Adenocarcinomas: Immunohistochemical p16 Expression Correlated With Human Papillomavirus (HPV) DNA Detection. *Am J Surg Pathol* 2004, 28(2):160-7
16. Regauer S, and Reich O. CK17 and p16 expression patterns distinguish (atypical) immature squamous metaplasia from high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). *Histopathology* 2007, 50(5):629-35
17. Stoler MH, and Schiffman M. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations. *JAMA* 2001, 285(11):1500-5
18. McCluggage WG, Walsh MY, Thornton CM, Hamilton PW, Date A, Caughley LM, and Bharucha H. Inter- and intra-observer variation in the histopathological reporting of intraepithelial lesions using a modified Bethesda grading system. *Br J Obstet Gynaecol* 1998, 105(2):206-10
19. Ismail SM, Colclough AB, Dinnen JS, Eakins D, Evans DMD, Gradwell E, O'Sullivan JPO, Summerell JM, and Newcombe R. Reporting cervical intraepithelial neoplasia (CIN): intra- and interpathologist variation and factors associated with disagreement. *Histopathology* 1990, 16(4):371-6
20. De Vet HCW, Knipschild PG, Schouten HJ, Koudstaal J, Kwee W-S, Willebrand D, Sturmans F, and Arends JW. Interobserver variation in histopathological grading of cervical dysplasia. *J Clin Epidemiol* 1990, 43(12):1395-8
21. Bergeron C, Ordi J, Schmidt D, Trunk MJ, Keller T, and Ridder R, for the CINtec Histology Study Group. Conjunctive p16<sup>INK4a</sup> testing significantly increases accuracy in diagnosing high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol* 2010, 133(3):395-406
22. Sayed K, Korourian S, Ellison DA, Kozlowski K, Talley L, Horn HV, et al. Diagnosing cervical biopsies in adolescents: the use of p16 immunohistochemistry to improve reliability and reproducibility. *J Low Genit Tract Dis* 2007, 11(3):141-6
23. Gurrola-Diaz CM, Suarez-Rincon AE, Vazquez-Camacho G, Buonocunto-Vazquez G, RosalesQuintana S, Wentzensen N, et al. p16<sup>INK4a</sup> immunohistochemistry improves the reproducibility of the histological diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia in cone biopsies. *Gynecol Oncol* 2008, 111(1):120-4
24. Horn LC, Reichert A, Oster A, Arndal SF, Trunk MJ, Ridder R, et al. Immunostaining for p16<sup>INK4a</sup> used as a conjunctive tool improves interobserver agreement of the histologic diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2008, 32(4):502-12
25. Haidopoulos D, Partsinevelos GA, Vlachos GD, Rodolakis A, Markaki S, Voulgaris Z, et al. p16<sup>INK4A</sup> is a strong biomarker for cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical carcinoma: a reappraisal. *Reprod Sci* 2009, 16(7):685-93
26. Lesnikova I, Lidang M, Hamilton-Dutoit S and Koch J. p16 as a diagnostic marker of cervical neoplasia: a tissue microarray study of 796 archival specimens. *Diagn Pathol* 2009, 4:22
27. Ordi J, Garcia S, del Pino M, Landolfi S, Alonso I, Quinto L, et al. p16<sup>INK4a</sup> immunostaining identifies occult CIN lesions in HPV-positive women. *Int J Gynecol Pathol* 2009, 28(1):90-7

28. Galgano MT, Castle PE, Atkins KA, Brix WK, Nassau SR and Stoler MH. Using biomarkers as objective standards in the diagnosis of cervical biopsies. *Am J Surg Pathol* 2010, 34(8):1077-87
29. Reuschenbach M, Seiz M, von Knebel Doeberitz C, Vinokurova S, Duwe A, Ridder R, et al. Evaluation of cervical cone biopsies for coexpression of p16<sup>INK4a</sup> and Ki-67 in epithelial cells. *Int J Cancer* 2012, 130(2):388-94
30. Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, Heller DS, Henry MR, Luff RD, McCalmont T, Nayar R, Palefsky JM, Stoler MH, Wilkinson EJ, Zaino RJ, Wilbur DC; Members of LAST Project Work Groups. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *J Low Genit Tract Dis* 2012, 16(3):205-42. Erratum in: *J Low Genit Tract Dis*. 2013, 17(3):368
31. Liao GD, Sellors JW, Sun HK, Zhang X, Bao YP, Jeronimo J, et al. p16<sup>INK4A</sup> immunohistochemical staining and predictive value for progression of cervical intraepithelial neoplasia grade 1: a prospective study in China. *Int J Cancer* 2014, 134(7):1715-24
32. Reuschenbach M, Wentzensen N, Dijkstra MG, von Knebel Doeberitz M and Arbyn M. p16<sup>INK4a</sup> immunohistochemistry in cervical biopsy specimens: A systematic review and meta-analysis of the interobserver agreement. *Am J Clin Pathol* 2014, 142(6):767-72
33. Shah AA, Jeffus SK, Zhao Z, Stoler MH and Stelow EB. Adjunct p16(INK4a) immunohistochemistry aids the detection of high-grade squamous intraepithelial lesions in endocervical curettage specimens. *Am J Clin Pathol* 2014, 141(3):342-7
34. Bergeron C, Ronco G, Reuschenbach M, Wentzensen N, Arbyn M, Stoler M, et al. The clinical impact of using p16(INK4a) immunohistochemistry in cervical histopathology and cytology: an update of recent developments. *Int J Cancer* 2015, 136(12):2741-51
35. Clinton LK, Miyazaki K, Ayabe A, Davis J, Tauchi-Nishi P and Shimizu D. The LAST guidelines in clinical practice: implementing recommendations for p16 use. *Am J Clin Pathol* 2015, 144(6):844-9
36. Zhang G, Yang B and Abdul-Karim FW. p16 Immunohistochemistry is useful in confirming highgrade squamous intraepithelial lesions (HSIL) in women with negative HPV testing. *Int J Gynecol Pathol* 2015, 34(2):180-6
37. Darragh TM. The LAST Project and the diagnostic bottom line. *Cytopathology* 2015, 26(6):343-5
38. de Sam Lazaro S, Newbill CP, Berlin M and Morgan TK. p16 Staining of Cervical Biopsies May Decrease the Frequency of Unnecessary Loop Electrosurgical Excision Procedures. *J Low Genit Tract Dis* 2016, 20(3):201-6
39. Stoler MH, Wright TC Jr, Ferenczy A, Ranger-Moore J, Fang Q, Kapadia M, Ridder R. Routine Use of Adjunctive p16 Immunohistochemistry Improves Diagnostic Agreement of Cervical Biopsy Interpretation: Results From the CERTAIN Study. *Am J Surg Pathol*. 2018, 42(8):1001-9

## Vedlegg 2

### Eksempel på diffust fargemønster

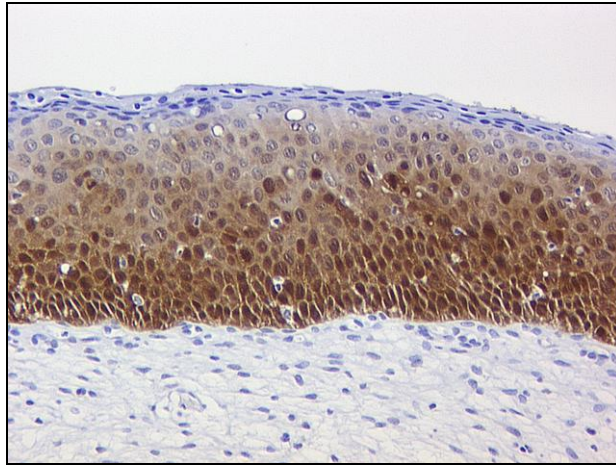


Fig. 1: CIN 3

### Eksempel på fokalt fargemønster

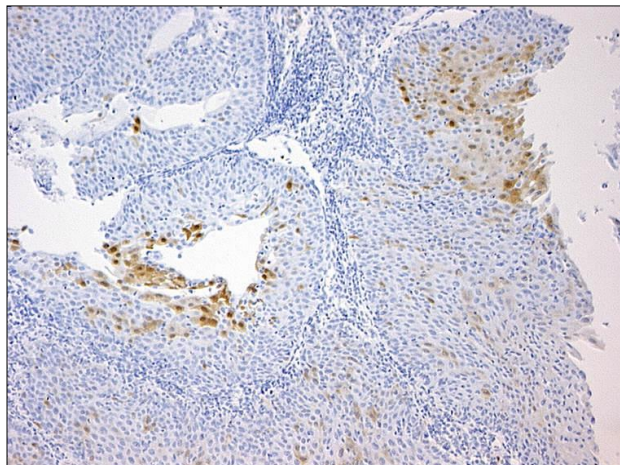


Fig. 2: Skvamøs metaplasi, moden