

Brugsanvisning

CINtec[®] Histology Kit

CINtec[®] Histology Kit er en immunhistokemisk analyse til kvalitativ påvisning af antigenet p16^{INK4a} på vævssnit, der er klargjort fra formalinfikserede, paraffinindstøbte cervixbiopsier. Det er indikeret til at blive anvendt sammen med H&E-farvede objektglas fra de samme cervikale vævsprøver som en hjælp til at forøge diagnostisk nøjagtighed og overensstemmelse mellem observatører i diagnosen af cervikal intraepitelial neoplasi af høj grad.



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim
Germany

<https://navifyportal.roche.com>

REF

10213370001

GTIN

07613336230350



50



2-8 °C



0123

IVD



Indholdsfortegnelse

DANSK	3
I. Produktnavn	3
II. Tilsigtet brug	3
III. Udstyrets resumé og forklaring	3
Resumé og forklaring	3
Klinisk signifikans	4
Procedureprincip	5
IV. Reagenser	5
Medfølgende materialer	5
Opbevaring	7
Nødvendige materialer og reagenser, som ikke medfølger	8
Nødvendigt udstyr	8
V. Advarsler og forsigtighedsregler	9
Advarsel	9
Forsigtig	9
VI. Procedure	10
Klargøring af prøver	10
Paraffinindlejrede vævsprøver	10
Varmeinduceret epitopgenfinding	10
Farvningsprocedure	11
1. Klargøring af reagens	11
1.1 Epitope Retrieval Solution	11
1.2 Vaskebuffer	11
1.3 Substrate-Chromogen Solution (DAB)	11
1.4 Kontrastfarvestof	12
1.5 Monteringsmateriale	12
2. Farvningsprocedure for Autostainer-instrumenter	12
2.1 Afparaffinering og rehydrering	12
2.2 Farvningsprotokol for Autostainer-instrumenter	13
3. Farvningsprocedure til manuel brug	15
3.1 Afparaffinering og rehydrering	15
3.2 Farvningsprotokol til manuel brug	15
VII. Kvalitetskontrol	18
VIII. Fortolkning af resultater	18
IX. Begrænsninger	19

X.	Præstationskarakteristika	20
XI.	Fejlfinding	25
XII.	Symboler	28
XIII.	Producent	28
XIV.	Revisionsstatus	28
XV.	Ophavsret	29
	Appendiks 1 Referencer	30
	Appendiks 2	33

DANSK

I. Produktnavn

CINtec® Histology Kit

II. Tilsigtet brug

Til in vitro-diagnostisk brug.

CINtec® Histology Kit er en immunhistokemisk analyse til kvalitativ påvisning af antigenet p16^{INK4a} på vævssnit, der er klargjort fra formalinfikserede, paraffinindstøbte cervixbiopsier.

Det er indikeret til at blive anvendt sammen med H&E-farvede objektglas fra de samme cervikale vævsprøver som en hjælp til at forøge diagnostisk nøjagtighed og overensstemmelse mellem observatører i diagnosen af cervikal intraepitelial neoplasi af høj grad.

Testen er beregnet til manuel brug eller til brug på Autostainer-instrumenter.

Denne analyse skal fortolkes af en kvalificeret patolog og sammenholdes med histologisk undersøgelse, relevante kliniske oplysninger og egnede kontroller.

III. Udstyrets resumé og forklaring

Resumé og forklaring

CINtec® Histology Kit er baseret på et monoklonalt museantistof (klon E6H4®), der er rettet mod humant p16^{INK4a}-protein.

p16^{INK4a}-proteinet er en cyklinafhængig kinaseinhibitor, der spiller en stor rolle i reguleringen af den eukaryotiske cellecyklus. Det er en del af den retinoblastomprotein (pRB)-medierede kontrol af G1-S-overgangsfasen og udøver sin funktion ved at hæmme cellecyklussen i løbet af celledifferentieringsprocesser. I terminalt differentierede epitelceller eksprimeres p16^{INK4a} ved niveauer, der typisk ikke er påviselige ved immunhistokemi.

I forskellige tumorentiteter blev p16^{INK4a}-genet fundet at være funktionsmæssigt inaktiveret af genmutation eller promoterhypermethylation. Denne inaktivering af p16^{INK4a}-tumorsuppressorgenet har vist sig at bidrage til cellecyklusdysregulering og tab af kontrol af celleproliferation.

Men ved replikation af delvise, cervikale epitelceller, hvor human papillomavirus (HR-HPV)-onkoproteiner af højrisikotypen har startet celletransformeringsprocessen, har p16^{INK4a}-ekspression vist sig at være kraftigt opreguleret [1; 2]. Denne kraftige overekspression af p16^{INK4a} er blevet tæt forbundet med aktiviteten af E7-onkoproteinerne fra HR-HPV på det molekulære niveau. Overekspression af p16^{INK4a} har vist sig at reflektere den E7-onkoprotein-medierede inaktivering af det funktionelle kompleks mellem pRB og transkriptionsfaktor E2F, der er en af hovedhændelserne under den HR-HPV-fremkaldte celletransformation [3].

Der er mange undersøgelser i den udgivne litteratur, der rapporterer, at overekspression af p16^{INK4a}-proteinet blev immunhistokemisk observeret i en høj

andel af tilfældene af svær prækankrøs cervikal dysplasi (dvs. 80-100 % af alle CIN2-læsioner, og næsten alle CIN3-læsioner) og invasive cancere. Det er påvist, at milde intraepitelial-læsioner i cervix (CIN1) udviser overekspression af p16^{INK4a} i forskellige grader, typisk inden for et område på 30-60 % [1, 2, 4-16].

I fortolkningen af resultaterne skal der tages hensyn til den kendsgerning, at p16^{INK4a} er et cellulært protein, som kan eksprimeres på påviselige niveauer i cervikale dysplastiske læsioner af høj grad og livmoderhalscancere samt under visse betingelser, der ikke er forbundet med cervikal dysplasi, omend på forskellige niveauer og med forskellige ekspressionsmønstre. Histologiske vævspræparater har intakt vævsmorfologi til at hjælpe med fortolkningen af p16^{INK4a}-positivitet for den cervikale læsion. Det er blevet foreslået, at et diffust farvningsmønster, dvs. en kontinuerlig farvning af celler i de basale og parabasale celleglag, med eller uden farvning af celler af overfladiske celleglag, klassificeres som et positivt testresultat for p16^{INK4a}-overekspression. Dette farvningsmønster har vist sig at give det højeste niveau af både sensitivitet og specificitet for CIN af høj grad [1, 4, 5]. I modsætning hertil betragtes et fokalt farvningsmønster (farvning af isolerede celler eller små celleklynger, dvs. ikke-kontinuerlig farvning, især ikke af de basale og parabasale celler) samt manglende immunreaktivitet som et negativt testresultat for p16^{INK4a}-overekspression [1, 4, 5].

Fortolkningen af objektglas, der er farvet til p16^{INK4a} ved brug af CINtec® Histology Kit, skal udføres sammen med H&E-farvede objektglas, der er klargjort fra de samme cervixvævsprøver. De yderligere oplysninger, der opnås fra de CINtec®-farvede objektglas, skal kombineres med de foreløbige morfologibaserede diagnoser, der er stillet på de H&E-farvede objektglas, for at kunne stille en endelig diagnose.

Klinisk signifikans

Det har vist sig, at forbindende læsning af H&E-farvede objektglas, der omfatter cervikale biopsisnit sammen med på hinanden følgende objektglas fra samme vævsprøve og immuno-farvet for p16^{INK4a}, forbedrer den diagnostiske nøjagtighed og inter-observatørenighed vedrørende diagnosticering af cervikal intraepitelial neoplasie af høj grad (CIN2+).

Den patologiske diagnose, der stilles på grundlag af H&E-farvede cervikale vævssnit, fastlægger grundlaget for afgørelsen om at iværksætte yderligere behandling. Derfor er virkningen af en unøjagtig diagnose betydelig. En unøjagtig diagnose kan føre til uhensigtsmæssig håndtering af patienten, dvs overbehandling af kvinder, der i bund og grund er raske, eller underbehandling af kvinder med fastslåede dysplastiske læsioner af høj grad.

Der er høj grad af uoverensstemmelse blandt patologer om den diagnostiske fortolkning af histologiske H&E-farvede vævssnit. Der er i forskellige publikationer blevet rapporteret lav grad af inter- og intra-observatørenighed inden for cervixhistologi [17-20].

Et stort multicenter-forsøg i USA vurderede fortolkningen af histologiske undersøgelser af cervixprøver (2237 kolposkopiske biopsier og 535 LEEP conization biopsiprøver) udført af flere veluddannede patologer. Reproducerbarheden af de histopatologiske fortolkninger var kun moderat (kappa = 0,46 for stansebiopsier og kappa = 0,49 for LEEP biopsiprøver) [17]. Med brug af WHO og et modificeret Bethesda-klassificeringssystem, viste det vist sig, at inter-observatørenigheden blandt seks histopatologer, der vurderede 125 kolposkopiske biopsiprøver, var lav for begge klassificeringssystemer [18].

Ligeledes viste en undersøgelse foretaget i Storbritannien lav inter-observatør enighed blandt otte sagkyndige histopatologer, der undersøgte 100 kolposkopiske biopsiprøver (uvægtet kappa-værdi 0,358) [19].

Ved at føje objektglas, der er farvet med CINtec® Histology Kit, til de traditionelle, H&E-farvede objektglas, der anvendes til diagnosticering, er den samlede nøjagtighed af denne histomorfologiske diagnoseprocedure blevet forbedret [21-39].

Procedureprincip

CINtec® Histology Kit indeholder et sæt reagenser til immucytokemisk påvisning af p16^{INK4a}-antigenet. Kittet er beregnet til udførelse af en immunhistokemisk farvningsprocedure i to trin af formalinfikserede, paraffinindstøbte vævsprøver fra cervixbiopsier. Til påvisning af antigenet anvendes en primær, monoklonal E6H4®, der er rettet mod humant p16^{INK4a}-protein.

Der anvendes et visualiseringsreagens, der er klar til brug, bestående af polymerreagens, der er konjugeret med peberrodsperoxydase og anti-mus Fab'-antistoffragmenter fra ged. Visualiseringsreagenserne har undergået en fast-fasebinding for at eliminere krydsreaktivitet med humane immunglobuliner. Kromogenreaktionen er baseret på peberrodsperoxidase-medieret konvertering af et DAB-kromogen til et synligt reaktionsprodukt på antigenstedet. Efter kontrastfarvning, kan prøven dækkes med dækglas og resultaterne kan evalueres ved hjælp af lysmikroskopi.

IV. Reagenser

Medfølgende materialer

De nedenfor angivne materialer medfølger i alle sæt og er tilstrækkelige til at udføre 50 prøver og 50 negative kontrolreaktioner. Antallet af prøver er baseret på brugen af 200 µL reagens pr. objektglas.

1 Peroxidase Blocking Reagent

Peroxidase Blocking Reagent

2 x 11,5 mL, klar til brug

3 % hydrogenperoxid, indeholdende 15 mmol/L natriumazid (NaN₃).

EUH210: Sikkerhedsdatablad kan på anmodning rekvireres.

2 Mouse anti-Human p16^{INK4a} Antibody

Mouse anti-Human p16^{INK4a} Antibody

11,5 mL, klar til brug

Monoclonal mouse anti-Human p16^{INK4a} antibody (~1 µg/mL), Clone E6H4™, leveret i 50 mmol/L tris-buffer pH 7,2, tilsat 15 mmol/L natriumazid (NaN₃) og stabiliseringsprotein.

3 Visualization Reagent

Visualization Reagent

2 x 11,5 ml, klar til brug



Advarsel

H317 Kan forårsage allergisk hudreaktion.

P261 Undgå indånding af støv/røg/gas/tåge/damp/spray.

P272 Tilsmudset arbejdstøj bør ikke fjernes fra arbejdspladsen.

P280 Bær beskyttelseshandsker.

P333 + P313 Ved hudirritation eller udslæt: Søg lægehjælp.

P362 + P364 Alt tilsmudset tøj tages af og vaskes inden genanvendelse.

P501 Indholdet/beholderen bortskaffes på et godkendt affaldsbehandlingsanlæg.

Indeholder:

26172-54-3 2-methyl-2H-isothiazol-3-one hydrochlorid

55965-84-9 reaktionsmasse på: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC-nr. 247-500-7] og 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EC-nr. 220-239-6] (3:1)

Polymerreagens konjugeret med peberrods-peroxydase og affinitetsoprenset anti-mus Fab' antistofragmenter fra ged, leveret i en stabiliseringsopløsning bestående af konserveringsmidler og stabiliseringsprotein.

4 Negative Reagent Control

Negative Reagent Control

11,5 mL, klar til brug

Monoklonalt anti-rotte oxytocin-forbundet neurofysinantistof fra mus (~1 µg/mL), leveret i 50 mmol/L tris-buffer pH 7,2, tilsat 15 mmol/L natriumazid (NaN₃) og stabiliseringsprotein. Til verifikation af farvningens specificitet. Rotte oxytocin-relateret neurophysin ikke er til stede i humane væv.

5 DAB Buffered Substrate

DAB Buffered Substrate

31 mL

Substratbufferopløsning, pH 7,5, indeholdende < 0,1 % hydrogenperoxid, stabilisatorer og forstærkere.

6 DAB Chromogen

DAB Chromogen

0,85 mL, 3,3'-diaminobenzidin kromogenopløsning.



Fare

H314 Forårsager svære forbrændinger af huden og øjenskader.

H341 Mistænkt for at forårsage genetiske defekter.

H350 Kan fremkalde kræft.

P201 Indhent særlige anvisninger før brug.

P280 Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjenbeskyttelse/ansigtsbeskyttelse.

P303 + P361 + P353 VED KONTAKT MED HUDEN (eller håret): Tilsmudset tøj tages straks af. Skyl/brus huden med vand.

P304 + P340 + P310 VED INDÅNDING: Flyt personen til et sted med frisk luft og sørg for, at vedkommende hviler i en stilling, som letter vejtrækningen. Ring omgående til en GIFTINFORMATION eller en læge.

P305 + P351 + P338 + P310 HVIS STOFFET KOMMER I ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylning. Ring omgående til en GIFTINFORMATION eller en læge.

P308 + P313 VED eksponering eller mistanke om eksponering: Søg lægehjælp.

Indeholder 868272-85-9 3,3'-Diaminobenzidin tetrahydrochlorid hydrat

BEMÆRK: Der henvises til lokal og national lovgivning vedr. bortskaffelse.

7 Epitope Retrieval Solution 10X

Epitope Retrieval Solution 10X

500 mL, 100 mmol/L tris-buffer pH 9, der er tilsat 10 mmol/L EDTA og 15 mmol/L natriumazid (NaN_3).

Opbevaring

Opbevares ved 2-8 °C. Objektglassene må ikke anvendes efter udløbsdatoen. Der findes ingen data om opbevaring af reagenserne under andre forhold end de ovenfor angivne.

Kittets komponenter er stabile i 6 måneder, hvis de opbevares ved 2-8 °C efter åbning. Opløsninger skal kasseres, hvis de er uklare.

Fortyndet Wash Buffer og fortyndet Epitope Retrieval Solution er stabile i op til en måned ved opbevaring ved 2-8 °C. Opløsninger må ikke anvendes, hvis de er uklare i udseende.

Nødvendige materialer og reagenser, som ikke medfølger

CINtec® Wash Buffer 10X til brug sammen med CINtec® Histology Kit er tilgængelig under katalognummer 10215364001 fra Roche, men er ikke inkluderet i kittet. Der henvises til hjemmesiden www.roche.com for bestillingsoplysninger.

500 mmol/L Tris-bufferopløsning med 1,5 mol/L NaCl, pH 7,6, indeholdende vaskemiddel og et antimikrobielt stof.



Advarsel

H317 Kan forårsage allergisk hudreaktion.

P261 Undgå indånding af støv/røg/gas/tåge/damp/spray.

P272 Tilsmudset arbejdstøj bør ikke fjernes fra arbejdspladsen.

P280 Bær beskyttelseshandsker.

P333 + P313 Ved hudirritation eller udslæt: Søg lægehjælp.

P362 + P364 Alt tilsmudset tøj tages af og vaskes inden genanvendelse.

P501 Indholdet/beholderen bortskaffes på et godkendt affaldsbehandlingsanlæg.

Indeholder 55965-84-9-reaktionsmasse på: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC-nr. 247-500-7] og 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EC-nr. 220-239-6] (3:1)

Absorberende servietter.

Hæmatoxylin-kontrastfarvning.

Destilleret eller deioniseret vand (vaskevand).

Ethanol, 95 % og 70 %.

Monteringsmateriale.

Positive og negative væv til brug som proceskontroller.

Objektglas (SuperFrost® Plus eller tilsvarende).

Xylen.

Dækglas.

Nødvendigt udstyr

Valgfrit: Tørreovn, som kan opretholde en temperatur på 60 °C eller mindre.

Valgfrit: Dako- eller LabVision Autostainer-instrument.

Fugtkammer (valgfrit).

Lysmikroskop (4-40x objektivforstørrelse).

Farvningskar eller -bade.

Vaskeflasker.

Timer (med mulighed for 2-60 minutters intervaller).

Vandbad med låg (der kan holde Epitope Retrieval Solution på 95-99 °C).

V. Advarsler og forsigtighedsregler

Advarsel

1. Forsigtig! Nogle af reagenserne inkluderet i dette kit indeholder farlige kemikalier. Ved håndtering af kittets komponenter skal sikkerhedsforanstaltningerne for håndtering af farlige laboratoriereagenser overholdes.
2. Dette produkts komponent 1, 2, 4 og 7 indeholder natriumazid (NaN_3), hvilket er meget giftigt i dets rene form. Natriumazid kan ved koncentrationer, der ikke er klassificeret som farlige, reagere med bly- og kobber og udvikle højeksplosive ophobninger af metal azider. Efter bortskaffelse skal der skylles med rigelige mængder vand, for at forhindre azidophobning i rørføring.
3. Komponenterne 2, 3 og 4 indeholder materiale af animalsk oprindelse. Overhold korrekte håndteringsprocedurer, der gælder for ethvert produkt, der stammer fra biologiske kilder.
4. Sikkerhedsdatablad til kittet kan rekvireres.
5. Når histologiske prøver, herunder alle prøver før og efter fiksering, samt alle materialer, der har været eksponeret for dem, håndteres og bortskaffes, skal sikkerhedsforanstaltningerne for håndtering af potentielt smittefarligt materiale samt gældende affaldshåndteringskrav overholdes.
6. Undgå peroral pipettering af reagenser. Undgå, at hud og slimhinder kommer i kontakt med reagenser og prøver. Skulle reagenser og prøver komme i kontakt med hud eller slimhinder, vask med rigelige mængder vand.
7. Visualization Reagent og DAB Chromogen kan påvirkes ugunstigt, hvis de udsættes for meget kraftige lysniveauer. Undgå stærkt lys, såsom direkte sollys, ved opbevaring af kittets komponenter og farvning.
8. Brug egnet personligt beskyttelsesudstyr, og undgå kontakt med øjne og hud, når de medfølgende komponenter og de komponenter, der skal anvendes i forbindelse med CINtec® Histology Kit, håndteres. Se sikkerhedsdatabladet (SDS) for yderligere information.
9. Mærkning af produktsikkerhed følger primært EU'S GHS-vejledning.

Forsigtig

1. Til in vitro-diagnostisk brug.
2. Kun til professionel brug.
3. Minimer mikrobiel kontaminering af reagenser for at undgå ikke-specifik farvning.
4. Inkubationstider, -temperaturer eller -metoder, der varierer fra de specificerede, kan give fejlagtige resultater.
5. Anvend ikke kittet, hvis emballagen eller nogen af komponenterne er beskadiget. Underret straks producenten, hvis emballagen er kompromitteret eller komponenterne beskadiget.
6. Bortskaffelse af alle affaldsmaterialer skal være i henhold til lokale retningslinjer og bestemmelser.

7. Alle reagenser er formuleret til brug med denne test. For at testen kan udføres efter hensigten må Ingen materialer erstattes med andre.
8. Hvis der observeres uventet farvning, der ikke kan forklares af afvigelser i laboratorieprocedurerne, og der er mistanke om et problem med CINtec® Histology Kit, skal du straks se kontaktoplysningerne i afsnit XIII. for yderligere information om teknisk support.
9. Produktsvigt på grund af håndteringsproblemer eller ustabilitet giver ingen klare tegn. Derfor skal positive og negative kontroller køres samtidig med patientprøverne som en kvalitetskontrol.
10. Hvis der skal rapporteres alvorlige hændelser, der er relateret til brugen af denne enhed, skal du kontakte den lokale Roche-repræsentant og de ansvarlige myndigheder i den medlemsstat eller det land, brugeren er bosiddende i.

VI. Procedure

Klargøring af prøver

CINtec® Histology Kit er beregnet til brug med vævsprøver, der er bevaret til immunhistokemiske procedurer. Prøver skal klargøres i overensstemmelse med standardmetoder til behandling af væv.

Positivt ladede objektglas, såsom SuperFrost® Plus-objektglas, anbefales for optimal ydelse.

Paraffinindlejrede vævsprøver

Neutralt bufferet, formalinfikserede, paraffinindstøbte vævsprøver behandlet med rutinestandardmetoder er egnet til brug med dette kit. Hvis prøverne er klargjort ved hjælp af en anden konserveringsmetode, skal brugeren bekræfte metodens egnethed.

Prøver fra biopsien skal fikseres i 18-24 timer i neutralt bufferet formalin (10 % anbefales) og opdeles i blokke med en tykkelse på 3 eller 4 mm. Vævsblokkene dehydreres derefter i en serie af alkohol og xylene, efterfulgt af infiltrering af smeltet paraffin, der holdes ved en temperatur på maks. 60 °C. Hver vævsblok opdeles i snit på 4-5 µm og monteres på SuperFrost® Plus-mikroskopiobjektglas af et histopatologisk laboratorium. Objektglas skal farves med det samme, da antigeniciteten af vævssnittene kan forringes med tiden.

Varmeinduceret epitopgenfinding

Til varmeinduceret epitopgenfinding skal de på objektglas monterede vævssnit opvarmes ved nedsænkning i Epitope Retrieval Solution i et kalibreret vandbad, der kan holde Epitope Retrieval Solution ved en temperatur på 95-99 °C. Laboratorier med høj beliggenhed bør fastslå den bedste metode til at opretholde den påkrævede vandbadstemperatur. Producenten anbefaler, at den heri beskrevne procedure følges til punkt og prikke.

Efter varmeinduceret epitopgenfinding skal vævssnittene nedkøles ved stuetemperatur i 20 minutter før yderligere behandling. Farvning af vævssnittene skal udføres straks derefter.

Farvningsprocedure

1. Klargøring af reagens

Alle reagenser skal have en stuetemperatur på (20-25 °C) før brug til immunfarvning. Derfor skal alle efterfølgende trin udføres ved omgivende temperatur.

Det skal sikres, at prøverne ikke udtørres under immunfarvningsproceduren, da udtørring kan føre til farvningsartefakter.

Følgende reagenser skal klargøres, før farvningsproceduren påbegyndes:

1.1 Epitope Retrieval Solution

Klargør den mængde Epitope Retrieval Solution, der er tilstrækkelig til den planlagte farvningsprocedure, ved at fortynde en mængde af hætteglas 7 (Epitope Retrieval Solution 10X) i forholdet 1:10 med destilleret eller deioniseret vand.

Epitope Retrieval Solution kan opbevares ved 2-8 °C i op til 1 måned efter fortyndning. Den fortyndede opløsning skal kasseres, hvis den er uklar.

BEMÆRK: Brug af vand med høje ionniveauer til at fortynde opløsningen til epitopgenfinding kan reducere prøvens farvningsresultat betydeligt. Det skal sikres, at det anvendte vand er ordentligt destilleret eller deioniseret (dvs. at det skal sikres, at ionbytningssøjlen til fremstilling af deioniseret vand er blevet kontrolleret ved rutinemæssig vedligeholdelse). Postevand må ikke anvendes!

1.2 Vaskebuffer

Brug CINTec® Wash Buffer 10X, katalognummer 10215364001, leveret af Roche i kombination med CINTec® Histology Kit. Der henvises til hjemmesiden www.roche.com for bestillingsoplysninger.

Klargør den mængde Wash Buffer, der er tilstrækkelig til den planlagte farvningsprocedures vasketrin, ved at fortynde en mængde Wash Buffer 10X, katalognummer 10215364001, i forholdet 1:10 med destilleret eller deioniseret vand.

Wash Buffer kan opbevares ved 2-8 °C i op til 1 måned efter fortyndning. Den fortyndede opløsning skal kasseres, hvis den er uklar.

1.3 Substrate-Chromogen Solution (DAB)

Til klargøring af Substrate-Chromogen Solution tilsættes en dråbe DAB Chromogen til 2 mL DAB Buffered Substrate. Forsæt som følger:

- i) Overfør 2 mL DAB Buffered Substrate fra hætteglas 5 til et reagensglas.
- ii) Tilsæt en dråbe (25-30 µL) DAB Chromogen fra hætteglas 6, bland og påfør vævssnittene med en pipette. Blandes og påføres vævssnit med en pipette.

2 mL Substrate-Chromogen Solution (DAB), der er klargjort i henhold til ovenstående vejledning, er normalt tilstrækkeligt til farvning af fem vævssnit samt de tilsvarende fem kontrolprøver.

BEMÆRK: Brug den klargjorte Substrate-Chromogen Solution (DAB) samme dag.

BEMÆRK: Tilsætning af for meget DAB Chromogen til DAB Buffered Substrate vil

resultere i forringelse af det positive signal.

1.4 Kontrastfarvestof

DAB-farvningsreaktioner resulterer i et vanduopløseligt, farvet slutprodukt. Alkohol- eller vandbaseret hæmatoxylin kan anvendes til kontrastfarvning. Hvis anvendt, følg anvisningerne leveret af leverandøren af hæmatoxylinen til at udføre kontrastfarvningen.

1.5 Monteringsmateriale

Til montering af objektglas efter farvning anbefales et ikke-vandigt, fast monteringsmedium. Vandig montering er imidlertid også acceptabelt.

Eukitt Mounting Medium anbefales til ikke-vandig montering. Aquatex Merck anbefales til vandig montering.

2. Farvningsprocedure for Autostainer-instrumenter

CINtec® Histology Kit er tilpasset til brug med Autostainer-instrumenterne (Lab Vision Autostainer 480 eller Dako Autostainer Plus) i henhold til nedenfor beskrevne skabelon. Andre instrumenter eller systemer kan muligvis benyttes med lignende funktion efter behørig godkendelse af brugeren. Prøverne og reagenserne skal klargøres, som beskrevet i afsnit 1.1-1.5 og 2.1, før farvning.

2.1 Afparaffinering og rehydrering

Inden afparaffinering placeres objektglassene i en tørreovn ved en temperatur på maks. 60 °C i mindst 20 minutter, men maks. 1 time, med henblik på kvantitativ fjernelse af vand for derved at forbedre vævets klæbning til glasobjektglasset ("bagning") og for at smelte paraffinen. Objektglas med vævsprøver skal afparaffineres for at fjerne indstøbningsmaterialet, og derefter rehydreres, før farvningsproceduren kan udføres. Det er meget vigtigt at undgå ufuldstændig fjernelse af paraffin, da rester af indstøbningsmaterialet kan resultere i forøget ikke-specifik farvning. Objektglassene inkuberes ved stuetemperatur (20-25 °C) i henhold til de følgende trin.

- 5 (±1) minutter i et xylenebad.
- Gentag dette trin én gang med et friskt bad.
- Fjern overskydende væske.
- 3 (±1) minutter i 95 % ethanol.
- Gentag dette trin én gang med et friskt bad.
- Fjern overskydende væske.
- 3 (±1) minutter i 70 % ethanol.
- Gentag dette trin én gang med et friskt bad.
- Fjern overskydende væske.
- Mindst 30 sekunder i destilleret eller deioniseret vand.

Påbegynd farvningsproceduren, som beskrevet i afsnit 2.2, trin 1: Epitop retrieval.

Xylen- og alkoholopløsninger bør ikke anvendes til mere end 40 objektglas.

BEMÆRK: Brugeren skal være opmærksom på, at afvigelser i udstyrstemperaturer og eksponeringstider under præanalytisk prøveklargøring kan føre til ufuldstændig

fjernelse af paraffin fra objektglas med vævsprøver. Rester af paraffin kan føre til ufuldstændig farvning med enhver histologifarvning, herunder CINtec® Histology stain. Histopatologilaboratorier bør inkludere regelmæssig overvågning af udstyret for at mindske afvigelser i prøveklargøring før farvning. Observering af skarpt definerede kanter i immunreaktive vævsområder eller andre farvningsuoverensstemmelser i et objektglas kan, med en immunhistokemisk farvning, være en indikator for ikke-optimal eller ufuldstændig præanalytisk behandling af prøven. Brugere bør overveje at kontrollere udstyret og de præanalytiske prøveklargøringsmetoder ved observation af uoverensstemmelser.

2.2 Farvningsprotokol for Autostainer-instrumenter

Trin 1: Epitopgenfinding

- Fyld farvningsglassene, f.eks. Coplin-glas af plastik, med fortyndet Epitope Retrieval Solution (se Procedure, afsnit 1.1).
- Sæt farvningsglassene med Epitope Retrieval Solution i vandbad og opvarm vandbad og Epitope Retrieval Solution til 95-99 °C. Det er vigtigt at justere vandniveauet i vandbadet for at sikre, at glassene er 80 % nedsænket i vandet. Læg låg på glassene for at stabilisere temperaturen og undgå fordampning.
- Nedsenk afparaffinerede snit i den forvarmede Epitope Retrieval Solution i farvningsglassene. Dette trin sænker normalt temperaturen i glassene til under 90 °C.
- Bring vandbadenes og Epitope Retrieval Solutions temperatur i glassene tilbage til 95-99 °C. Kontrollér Epitope Retrieval Solutions temperatur i glassene.
- Inkubér i 10 (±1) minutter ved 95-99 °C. Begynd først nedtællingen, når det er bekræftet, at epitopgenfindingsopløsningens temperatur i glassene har nået en temperatur på 95-99 °C.
- Tag hele glasset med objektglas ud af vandbadet.
- Lad objektglassene afkøle i Epitope Retrieval Solution i 20 (±1) minutter ved stuetemperatur.
- Omhæld Epitope Retrieval Solution og skyl snittene i Wash Buffer (se Procedure, afsnit 1.2).
- For optimal præstation lægges snittene i blød i Wash Buffer i 5 minutter efter epitopgenfinding og før farvning

BEMÆRK: Epitope Retrieval Solution er kun beregnet til engangsbrug. Må ikke genbruges.

Trin 2: Instrumentprogrammering

Inden første anvendelse af et CINtec® Histology Kit på et Autostainer-instrument skal der opsættes en ny skabelon. Der henvises til brugervejledningen til det dedikerede Autostainer-instrument.

Trin 3: Autostainerprocedure

- Overfør reagenserne fra sættes hætteglas til Autostainer-reagensglas. Brug det Autostainer-genererede kort for programtider og reagensmængder (se punkt 4 for specifikke tider og mængder).
 - Sæt Autostainer-reagensglassene i Autostainer-reagensstativet i henhold til det computer-genererede "Reagent Layout Map".
 - Sæt objektglassene i Autostaineren i henhold til det computer-genererede "Slide Layout Map".
 - For at undgå at prøverne udtørres, skal de stænkes med vaskebuffer, efter de er sat i Autostaineren.
 - Det følgende er en beskrivelse af programkørslen:
 - skyl*.
 - 200 µL Peroxidase-Blocking Reagent - 5 minutter
 - skyl*.
 - 200 µL Primary p16^{INK4a}-antibody eller Negative Reagent Control – 30 minutter
 - skyl*.
 - 200 µL Visualization Reagent - 30 minutter
 - skyl*.
 - skyl*.
 - skyl*.
 - skift.
 - 200 µL Substrate-Chromogen Solution (DAB) - 10 minutter
 - skyl*.
 - Skyl objektglassene i deioniseret vand efter substratkromogentrinet.
- *brug Wash Buffer til de respektive skylletrin.

BEMÆRK: Hvis det anvendte Autostainer-instrument skyller objektglassene i buffer, skal objektglassene skylles i deioniseret vand, efter de er taget ud af Autostaineren.

Trin 4: Kontrastfarvning (vejledningen er for hæmatoxylin)

- Nedsenk objektglassene i et bad med hæmatoxylin. Inkuber i 2-5 minutter, afhængigt af styrken på den anvendte hæmatoxylin.
- Placer objektglassene i et bad med postevand og skyl forsigtigt med rindende hanevand. Sørg for, at alle hæmatoxylinrester er væk.
- Skyl forsigtigt objektglassene kort i et bad med destilleret eller deioniseret vand.
- Kontrastfarvning kan udføres direkte på Autostainer-instrumentet.

BEMÆRK: Afhængigt af inkubationstiden og virkningsgraden af det anvendte hæmatoxylin vil kontrastfarvningen give en lys- til mørkeblå farvning af cellekernerne. Overdreven eller ufuldstændig kontrastfarvning kan forstyrre en korrekt fortolkning af resultaterne.

Trin 5: Montering

Ikke-vandigt, permanent monteringsmateriale anbefales. Men vandigt monteringsmateriale er også acceptabelt. Overhold brugsanvisningen fra monteringsmediets leverandør.

BEMÆRK: Objektglassene skal beskyttes mod lys, så de ikke falmer, og opbevares ved stuetemperatur (20-25 °C).

3. Farvningsprocedure til manuel brug

BEMÆRK: Undgå, at vævssnittene udtørre under farvningsproceduren. Udtørrede vævssnit kan resultere i forøget ikke-specifik farvning. Ved længerevarende inkubation skal væv opbevares i et fugtigt miljø.

Overhold de almindelige procedurer for manuel immunhistokemisk farvning, når der anvendes et CINtec® Histology Kit til manuel farvning.

3.1 Afparaffinering og rehydrering

Inden afparaffinering placeres objektglassene i en tørreovn ved en temperatur på maks. 60 °C i mindst 20 minutter, men maks. 1 time, med henblik på kvantitativ fjernelse af vand for derved at forbedre vævets klæbning til glasobjektglasset ("bagning") og for at smelte paraffinen. Objektglas med vævsprøver skal afparaffineres for at fjerne indstøbningsmaterialet, og derefter rehydreres, før farvningsproceduren kan udføres. Det er meget vigtigt at undgå ufuldstændig fjernelse af paraffin, da rester af indstøbningsmaterialet kan resultere i forøget ikke-specifik farvning. Objektglassene inkuberes ved stuetemperatur (20-25 °C) i henhold til de følgende trin.

- 5 (±1) minutter i et xylenebad.
- Gentag dette trin én gang med et friskt bad.
- Fjern overskydende væske.
- 3 (±1) minutter i 95 % ethanol.
- Gentag dette trin én gang med et friskt bad.
- Fjern overskydende væske.
- 3 (±1) minutter i 70 % ethanol.
- Gentag dette trin én gang med et friskt bad.
- Fjern overskydende væske.
- Mindst 30 sekunder i destilleret eller deioniseret vand.

Påbegynd farvningsproceduren, som beskrevet i afsnit 3.2, trin 1: Epitop retrieval. Xylen- og alkoholopløsninger bør ikke anvendes til mere end 40 objektglas.

3.2 Farvningsprotokol til manuel brug

Trin 1: Epitopgenfinding

- Fyld farvningsglassene, f.eks. Coplin-glas af plastik, med fortyndet Epitope Retrieval Solution (se Procedure, afsnit 1.1).

- Placer farvningsglas med Epitope Retrieval Solution i vandbad, og opvarm vandbad og Epitope Retrieval Solution til 95-99 °C. På det trin er det vigtigt at justere vandniveauet i vandbadet for at sikre, at glassene er 80 % nedsænket i vandet. Læg låg på glassene for at stabilisere temperaturen og undgå fordampning.
- Nedsenk afparaffinerede snit i den forvarmede Epitope Retrieval Solution i farvningsglassene. Dette trin sænker normalt temperaturen i glassene til under 90°C.
- Bring vandbadenes og Epitope Retrieval Solutions temperatur i glassene tilbage til 95-99 °C. Kontrollér Epitope Retrieval Solutions temperatur i glassene.
- Inkubér i 10 ($\pm$ 1) minutter ved 95-99 °C. Begynd først nedtællingen, når det er bekræftet, at epitopgenfindingsopløsningens temperatur i glassene har nået en temperatur på 95-99 °C.
- Tag hele glasset med objektglas ud af vandbadet.
- Lad objektglassene afkøle i Epitope Retrieval Solution i 20 ($\pm$ 1) minutter ved stuetemperatur.
- Omhæld Epitope Retrieval Solution, og skyl snittene i den fortyndede Wash Buffer (se Procedure, afsnit 1.2).
- For optimal præstation lægges snittene i blød i Wash Buffer i 5 ($\pm$ 1) minutter efter epitopgenfindning og før farvning.

BEMÆRK: Epitope Retrieval Solution er kun beregnet til engangsbrug. Må ikke genbruges.

Trin 2: Peroxidase-Blocking Reagent

- Påfør 200 μ L Peroxidase-Blocking Reagent for at dække prøven.
- Inkuber i 5 ($\pm$ 1) minutter.
- Bank overskydende væske af, og placer objektglassene i et friskt Wash Buffer-bad i 5 ($\pm$ 1) minutter.

Trin 3: Primary Antibody eller Negative Reagent Control

- Fjern overskydende buffer.
- Dæk prøven med 200 μ L primært antistof (Mouse Anti-Human p16^{INK4a} eller Negative Reagent Control).
- Inkuber i 30 ($\pm$ 1) minutter.
- Bank overskydende væske af, og placer objektglassene i et friskt Wash Buffer-bad i 5 ($\pm$ 1) minutter.

Trin 4: Visualization Reagent

- Fjern overskydende buffer.
- Dæk prøven med 200 μ L Visualization Reagent.

- Inkuber i 30 (± 1) minutter.
- Bank overskydende væske af og placer objektglassene i et friskt bufferbad i 5 (± 1) minutter.
- Gentag dette trin to gange med et friskt Wash Buffer-bad.

Trin 5: Substrate-Chromogen Solution (DAB)

- Dæk prøven med 200 μ L Substrate-Chromogen Solution (DAB), som er klargjort i henhold til proceduren, der er beskrevet i 1.3 ovenfor.
- Inkuber i 10 (± 1) minutter.
- Bank overskydende væske af, og skyl forsigtigt med destilleret eller deioniseret vand.

Saml Substrate-Chromogen Solution (DAB) affald i en beholder til farlige materialer til korrekt bortskaffelse.

Trin 6: Kontrastfarvning (vejledningen er for hæmatoxylin)

- Nedsenk objektglassene i et bad med hæmatoxylin. Inkuber i 2-5 minutter, afhængigt af styrken på den anvendte hæmatoxylin.
- Placer objektglassene i et bad med postevand og skyl forsigtigt med rindende hanevand. Sørg for, at alle hæmatoxylinrester er væk.
- Skyl forsigtigt objektglassene kort i et bad med destilleret eller deioniseret vand.

BEMÆRK: Afhængigt af inkubationstiden og virkningsgraden af det anvendte hæmatoxylin vil kontrastfarvningen give en lys- til mørkeblå farvning af cellekernerne. Overdreven eller ufuldstændig kontrastfarvning kan forstyrre en korrekt fortolkning af resultaterne.

Trin 7: Montering

Ikke-vandigt, permanent monteringsmateriale anbefales. Til xylene-baseret, permanent monteringsmateriale er det nødvendigt med en dehydreringsprocedure, f.eks.

- destilleret eller deioniseret vand.
- 3 min 70 % ethanol
- 3 min 70 % ethanol
- 3 min 96 % ethanol
- 3 min 99 % ethanol
- 5 min xylene
- 5 min xylene

Men vandigt monteringsmateriale er også acceptabelt. Overhold leverandørens brugsanvisning til monteringsmaterialet.

BEMÆRK: Objektglassene skal beskyttes mod lys, så de ikke falmer, og opbevares ved stuetemperatur (20-25 °C).

VII. Kvalitetskontrol

Afvigelser fra de anbefalede procedurer for fiksering og behandling af prøver i brugerens laboratorium kan føre til betydelige forskelle i resultater og nødvendiggøre regelmæssige, interne kontroller.

Positiv vævskontrol

Eksterne positive kontrolmaterialer bør være friske sektions-/biopsi-/kirurgiprøver, der er fikserede, behandlede og indlejrede så hurtigt som muligt på samme måde som patientprøver. Positive vævskontroller er indikative for korrekt klargjorte væv og korrekte farvningsteknikker. En positiv ekstern vævskontrol for hvert sæt af testbetingelser bør inkluderes i hver farvningskørsel. De væv, der anvendes til de eksterne positive kontrolmaterialer, skal vælges fra patientprøver med kendt positiv farvning for p16^{INK4a}. Hvis de positive kontroller ikke fremviser positiv farvning, skal resultater med testprøverne anses for ugyldige.

Negativ vævskontrol

Celletyper, der vides at være negative for p16^{INK4a} og til stede i de fleste vævssnit, kan bruges i laboratoriet som interne negative kontrolsteder for at kontrollere specifikationerne for funktionen af IHC. Hvis der opstår specifik farvning (falsk positiv farvning) på den negative vævskontrol, skal patientprøvernes resultater anses som ugyldige.

Ikke-specifik, negativ reagenskontrol

Brug den ikke-specifikke Negative Reagent Control i stedet for det primære antistof med et snit af hver patientprøve til at vurdere ikke-specifik farvning og muliggøre en bedre fortolkning af den specifikke farvning på antigenstedet.

Hvis der opstår specifik farvning (falsk positiv farvning) på den ikke-specifikke Negative Reagent Control, skal resultaterne af patientprøven anses for ugyldige.

VIII. Fortolkning af resultater

Kontrolprøver, der er farvet med Negative Reagent Control som primær reagens, må ikke udvise specifik farvning.

Positiv farvning med monoclonal mouse anti-Human p16^{INK4a} antibody, Clone E6H4[™], skal evalueres på baggrund af enhver ikke-specifik baggrundsfarvning af den anvendte Negative Reagent Control. Som ved enhver immunhistokemisk test betyder et negativt resultat, at antigenet ikke blev detekteret, og ikke, at antigenet var fraværende i de analyserede celler/væv.

I fortolkningen af resultaterne skal der tages hensyn til den kendsgerning, at p16^{INK4a} er et cellulært protein, som kan eksprimeres på påviselige niveauer i cervikale dysplastiske læsioner af høj grad og livmoderhalscancere samt under visse betingelser, der ikke er forbundet med cervical dysplasi, omend på forskellige niveauer og med forskellige ekspressionsmønstre.

De farvede objektglasprøver vurderes i henhold til et binært klassificeringssystem, der består af klassificeringerne "positiv" og "negativ".

Vurderingen "positiv" tildeles, hvis den p16^{INK4a}-farvede objektglasprøve viser en kontinuerlig farvning af celler i de basale og parabasale celleglag i cervikalt pladeepitel med eller uden farvning af celler af overfladiske celleglag ("diffust farvningsmønster"). Et eksempel på et objektglas bedømt som "positivt" ("diffust farvningsmønster") er vist i appendiks 2, figur 1.

Klassificeringen "negativ" tildeles, hvis p16^{INK4a}-farvede objektprøver udviser enten en negativ farvningsreaktion i pladeepitelen ("negativt farvningsmønster") eller farvning af enkeltstående celler eller små celleklynger, dvs. en ujævn farvning, specielt ikke af basale og parabasale celler ("fokalt farvningsmønster"). Et eksempel på et objektglas bedømt som "negativt" ("fokalt farvningsmønster") er vist i appendiks 2, figur 2.

Fortolkningen af objektglas, der er farvet til p16^{INK4a} ved brug af CINtec® Histology Kit, skal udføres sammen med H&E-farvede objektglas, der er klargjort fra de samme cervixvævsprøver. De yderligere oplysninger, der opnås fra de CINtec®-farvede objektglas, skal kombineres med de foreløbige morfologibaserede diagnoser, der er stillet på de H&E-farvede objektglas, for at kunne stille en endelig diagnose.

IX. Begrænsninger

- Kun til professionel brug. Særlig uddannelse er påkrævet for at udføre immunhistokemiske procedurer.
- Den kliniske fortolkning af en positiv eller negativ farvning skal evalueres på baggrund af klinisk præsentation, morfologi og andre histopatologiske kriterier. Den kliniske fortolkning af enhver positiv eller negativ farvning skal suppleres med morfologiske undersøgelser med korrekte positive og negative interne og eksterne kontroller samt andre diagnostiske tests. Ansvaret pålægges en kvalificeret patolog/cytolog, der er bekendt med korrekt brug af IHC-antistoffer, reagenser og metoder til fortolkning af de trin, der bruges til at klargøre og fortolke det endelige IHC-præparat.
- Farvningsresultaterne i immunhistokemi er stærkt påvirkede af de farvede cellers kvalitet. Derfor bidrager trinene til fiksering, vask, tørring, opvarmning, udskæring eller kontaminering med andre væv væsentligt til det samlede resultat af farvningen og kan føre til artefakter, antistofbinding eller falsk negative resultater. Uoverensstemmende resultater kan skyldes forskelle i fikserings- og indstøbningsmetoder eller naturlige uregelmæssigheder i selve vævet.
- Overdreven eller ufuldstændig kontrastfarvning kan forstyrre en korrekt fortolkning af resultaterne.
- Producenten leverer disse antistoffer/reagenser optimalt fortyndede til brug i henhold til vejledningerne givet heri til immunhistokemisk testning på klargjorte vævssnit. Enhver afvigelse fra de anbefalede testprocedurer kan ugyldiggøre erklærede forventede resultater. Passende kontroller skal anvendes og dokumenteres. Brugere, der afviger fra de anbefalede testprocedurer, vil under disse betingelser være ansvarlige for fortolkningen af patientresultater.
- Falsk positive resultater kan ses på grund af ikke-immunologisk binding af proteiner eller substratreaktionsprodukter. De kan også skyldes pseudoperoxidaseaktivitet (erythrocytter) eller endogen peroxidaseaktivitet (cytokrom C).
- Reagenserne kan fremvise uventede reaktioner i tidligere utestet væv. Muligheden for uventede reaktioner, selv i testede vævsgrupper, kan ikke fuldstændigt elimineres på grund af den biologiske forskel i antigenekspressionen i neoplasmer eller andre patologiske væv. Kontakt Roche mtm laboratories AG med dokumenterede, uventede reaktion(er). For oplysninger om teknisk support henvises til kontaktoplysningerne i afsnit XIII.

- Erstat ikke kittets reagenser med reagenser, der har andre lot-numre, eller med reagenser fra andre producenter.

X. Præstationskarakteristika

Klinisk præstation

Den kliniske ydelse af CINtec® Histology Kit er blevet vurderet i en kontrolleret, klinisk undersøgelse med formalinfikerede, paraffinindstøbte vævsprøver [21]. Undersøgelsen blev designet til at demonstrere hensigtsmæssigheden af CINtec® Histology Kit som en hjælp til at øge den diagnostiske præcision og inter-observatørenighed om påvisning af cervikal intra-epitelial neoplasie af høj grad (CIN2+).

Den kliniske undersøgelse blev udført på retrospektivt indsamlede cervikale stanse- og keglebiopsier. Der blev brugt i alt 500 cervixprøver, som blev indhentet fra to forskellige europæiske patologilaboratorier og beriget til svær dysplasi ud fra deres oprindelige diagnoser, til klargøring af H&E-farvede objektglas og fortløbende objektglas, der blev farvet med CINtec® Histology Kit i henhold til producentens vejledning.

Tre europæiske eksperter i gynækopatologi stillede hver en uafhængig diagnose i hvert tilfælde på baggrund af det H&E-farvede objektglas. Tilfælde med uoverensstemmende resultater blev yderligere vurderet på et afgørelsesmøde, og flertalsdiagnoserne (konsensusdiagnoser, to ud af tre) tjente som referencediagnoser i undersøgelsen.

Tolv forskere (autoriserede patologer, der regelmæssigt læser cervikal patologi), fra fire europæiske lande (Frankrig, Italien, Spanien og Tyskland) deltog som paneelpatologer i undersøgelsen. I første runde af objektglasfortolkning stillede alle panelets patologer hver deres diagnose i samtlige tilfælde, udelukkende baseret på H&E-farvede objektglas. Patologerne var til alle tider blindede i forhold til de oprindelige diagnoser og referencediagnoserne. Efter en udvaskningsperiode på mere end 4 uger blev det samme sæt (med nye mærkater) H&E-farvede objektglas igen vurderet af samtlige panelets tolv patologer sammen med de parrede objektglas for hvert tilfælde, der var farvet med CINtec® Histology Kit.

Til vurderingen af, om der var forbedringer af den diagnostiske nøjagtighed for CINtec® Histology-farvede cervikale objektglas, der blev vurderet sammen med de respektive H&E-farvede objektglas i forhold til de H&E-farvede cervikale objektglas alene, blev resultaterne af hver enkelt paneelpatologs aflæsning for begge metoder sammenlignet med konsensusdiagnoserne, der blev stillet af de tre eksperter i gynækopatologi.

Resultater:

I alt 482 tilfælde med komplette diagnoser fra alle undersøgelsespatologer blev inkluderet i dataanalysen. Hyppigheden af de forskellige diagnostiske kategorier baseret på de tre sagkyndige gynækopatologers konsensusdiagnoser var negativ for dysplasi (n = 194), CIN1 (n = 96), CIN2 (69) og CIN3 (n = 123).

Diagnostisk nøjagtighed til påvisning af CIN2+

Den samlede sensitivitet til identificering af CIN2+ var steget fra 1787 (H&E) til 2018 (H&E plus CINtec® Histology) sandt positive CIN2+-resultater med kun en lille reduktion af den samlede specificitet fra 3088 (H&E) til 3051 (H&E plus CINtec® Histology) sandt negative $\leq$ CIN1-resultater.

Tabel 1

Forbedring af diagnostisk nøjagtighed for svær CIN (CIN2+) ved forbindende aflæsning af H&E plus CINtec®-farvede objektglas i forhold til H&E-farvede objektglas alene. Antallet af sandt positive, falsk negative, falsk positive og sandt negative resultater sammenlignet med konsensusdiagnoserne fra eksperterne i gynækopatologi. (Bemærk: Samlet overensstemmelse med konsensusdiagnoserne fra eksperterne i gynækopatologi ville have resulteret i 2304 (192 CIN2+-tilfælde, x 12 panelpatologer) sandt positive resultater)

	Sande positive	Falske negative	Falske positive	Sande negative
H&E	1787	517	392	3088
H&E+CINtec® Histology	2018	286	429	3051

Blandet effekt ANOVA-model til Jackknife-pseudoværdier, almindeligt kendt som Dorfman-Berbaum-Metz (DBM)-metoden, blev brugt til at teste for effekterne af CINtec® Histology-testen for nøjagtighed.

Nulhypotesen om, at den diagnostiske nøjagtighed baseret på H&E i forhold til H&E plus CINtec® Histology-farvede objektglas for CIN2+ er tilsvarende, blev afvist med $p=0,0004$ (arealet under kurven (AUC)) for H&E: 0,877; AUC for H&E plus CINtec® Histology: 0,925).

Tabel 2

Præstationskarakteristika for forbindende aflæsning af H&E plus CINtec® Histology-farvede objektglas versus H&E-farvede objektglas alene med henblik på identifikation af CIN af høj grad (CIN2+). Konsensusdiagnoser, der var stillet af tre eksperter i gynækopatologi ud fra H&E-farvede objektglas, blev brugt som referencediagnoser

	H&E % (95 % CI)	H&E plus CINtec® Histology % (95 % CI)
Sensitivitet	77,6 % (75,8, 79,3)	87,6 % (86,2, 88,9)
Specificitet	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 prædiktiv værdi; NPV, negativ prædiktiv værdi; DLR+, sandsynlighedsforhold for positiv diagnose; DLR–, sandsynlighedsforhold for negativ diagnose

Ved at bruge konsensusdiagnoserne fra de tre eksperter i gynækopatologi som referencestandard blev sensitiviteten for påvisning af CIN2+ forbedret med 13 % (sensitivitet for H&E-diagnoser, der er 77,6 %, blev øget til 87,6 % for diagnoser, der var stillet på H&E plus CINtec® Histology-farvede objektglas).

Stigningen i diagnostisk præcision til påvisning af CIN2+ blev uafhængigt bevist med statistisk signifikans for undergrupper af cervikale stansebiopsier (n = 249, AUC for H&E: 0,895; AUC for H&E plus CINtec® Histology: 0,929, p = 0,0053) og cervikale kegleprøver (n = 233, AUC for H&E: 0,887; AUC for H&E plus CINtec® Histology: 0,948, p=0,009).

Inter-observatørenighed om påvisning af CIN2+

Til vurdering af forbedringen af inter-observatørenighed om påvisning af CIN2+ mellem panelpatologer blev der anvendt en multiklassificeringsform for kappa-statistik mellem diagnoser stillet på H&E-farvede livmoderhalskræftobjektglas og diagnoser stillet på H&E-farvede objektglas aflæst forbundende med CINtec® Histology-farvede cervikale objektglas.

Tabel 3

Forbedring af inter-observatørenighed om påvisning af CIN2+ ved forbundende aflæsning af H&E plus CINtec® Histology-farvede objektglas kontra H&E-farvede objektglas alene. Der er angivet kappa-værdier som en sandsynlighedskorrigeret måling af overensstemmelse

Diagnostisk kategori	Kappa H&E	Kappa H&E plus CINtec®	Statistisk signifikans
CIN2+, alle tilfælde	0,580	0,756	p<0,0001
CIN2+, kun stansebiopsier	0,598	0,748	p<0,0001
CIN2+, kun keglebiopsier	0,548	0,765	p<0,0001

Kappa-statistikken som en sandsynlighedskorrigeret måling af overensstemmelse mellem panelets patologer til påvisning af CIN2+ var væsentligt forbedret for H&E plus CINtec® Histology-farvede objektglas aflæsninger i forhold til H&E-objektglas aflæsninger alene (stigning i kappa-værdier for alle tilfælde fra 0,580 til 0,756, p<0,0001).

Reproducerbarhed i klassificering af p16^{INK4a}-farvningsmønster

Hvor gode panelets patologer var til at vurdere p16^{INK4a}-farvningsmønsteret i cervixvævsprøver som diffust p16^{INK4a}-positive, fokalt p16^{INK4a}-positive eller negative for p16^{INK4a}, blev bedømt.

Der var en høj grad af reproducerbarhed fra patolog til patolog i klassificeringen af p16^{INK4a}-farvningsmønstre som enten positive (diffust farvningsmønster) eller negative (fokalt farvningsmønster eller ingen immunreaktivitet). Kappa-værdien (tilfældighedskorrigeret metode for enighed) for reproducerbarhed mellem de tolv panelpatologer for bedømmelse af p16^{INK4a}-farvningsmønsteret som enten positivt (diffust farvningsmønster) eller negativt (fokalt farvning mønster, og ingen immunoreaktivitet) viste sig at være fremragende (gennemsnitlig kappa = 0,899, middel kappa = 0,903).

Analytisk præstation

Analytisk sensitivitet

Sensitivitetsundersøgelsen blev udført med CINtec® Histology Kits fra 3 lot. Femogtredive cervixbiopsier med CIN3+ blev analyseret i sensitivitetsundersøgelsen, heriblandt 6 biopsier klassificeret som CIN3 og 29 biopsier klassificeret som pladecellecarcinom.

Fem ud af 6 (83,3 %) af de tilfælde, der blev klassificeret som CIN3, viste stærk diffus p16-farvning. Ét CIN3-biopsitilfælde viste svag p16-ekspression, men savnede et klart p16-positivt signal.

Toogtyve ud af 29 (75,9 %) af de tilfælde, der blev klassificeret som pladecellecarcinom, viste stærk diffus p16-farvning. Fem tilfælde af pladecellecarcinom viste svag p16-ekspression, men savnede et klart p16-positivt signal. Kun 2 ud af 29 (6,9 %) af tilfældene var fuldstændig negative for p16. Dette kan forklares, idet det tidligere blev rapporteret, at 3-8 % af pladecellecarcinomtilfældene var negative for p16-farvning [1; 6]. Dette afspejler muligvis en lille procentdel af tilfælde, hvor dedifferentiering og kromosomale omlejring førte til inaktivering eller sletning af p16-genets locus.

For alle 3 sæt resulterede farvning på et velkarakteriseret panel af rottevævssnit ved hjælp af den negative reagenskontrol i stærk og specifik farvning af enkeltneuroner i rottehjerne. Derudover viste nogle canalikulære celler i nyrerne, enkeltmakrofager i milten og enkeltmakrofager og plasmaceller i tyndtarmen svag farvning. Andre væv i rottevævsanalysen var fuldstændig negative.

Anti-p16-antistoffet E6H4™ er i stand til at gengive kontinuerlig farvning af celler i basal- og parabasalcellelagene med eller uden farvning af celler i mellemliggende eller mellemliggende og overfladiske lag af pladeepitellet i cervikale biopsier med CIN af høj grad (CIN2 og CIN3). Negative Reagent Control (NRC) kan specifikt påvise neuroner i rotten.

Analytisk specificitet

Specificiteten af det anti-humane p16^{INK4a}-antistofklon E6H4™ fra mus er blevet verificeret ved Western blot-analyse (positiv for HeLa-cellelinjelysate; se også [1]).

Specificitetsundersøgelsen blev udført med CINtec® Histology Kits fra 3 lots på et velkarakteriseret panel med 90 NBF (neutral bufret formalin)-fikserede normale vævsprøver (30 forskellige typer væv) og 54 andre tumurvæv end livmoderhalsvæv (arrangeret i Multi Tissue Arrays = MTA'er).

Til farvning ved hjælp af det p16-specifikke antistof (klon E6H4™) på normalt væv blev der observeret 16 forskellige p16-negative væv [cerebrum, cerebellum, binyrer, skjoldbruskkirtel, knoglemarv, hjerte, spiserør, mave, tarm, colon, lever, nyre, stribet muskel, hud, mesothelium, livmoderhals] og 14 forskellige p16-positive væv [Svag farvning: hypofyse, lunge, thymus, prostata; positiv: nerve, tarm, mandel, bugspytkirtel, milt; stærkt positiv: uterus, æggestok, bryst, testikler, parathyroidea]. Til farvning ved anvendelse af det p16-specifikke antistof (klon E6H4™) på andre tumurvæv end livmoderhalsvæv blev der observeret 22 forskellige p16-negative tumortilfælde og 32 forskellige p16-positive tumortilfælde.

For alle 3 lots af CINtec® Histology var resultaterne negative for alle væv (normalt væv og tumurvæv), der blev testet, når der blev anvendt Negative Reagent Control. Det monoklonale antirotte-oxytocin-relaterede neurophysin-antistof fra mus reagerer ikke signifikant med humane normale vævsprøver og humant tumurvæv.

Reproducerbarhed

Reproducerbarhed mellem kørsler

Reproducerbarheden mellem kørsler blev fastsat for CINtec® Histology Kit ved brug af den manuelle protokol ved at farve 36 objektglas, der var klargjort fra vævsblokke, der var diagnosticeret som CIN2+. De dysplastiske områder på alle snit blev farvet med tilsvarende intensitet ($\pm 0,5$ på en skala fra 0 til 3) i alle kørsler. Normale områder på alle objektglas viste ingen specifik farvning.

Reproducerbarhed inden for samme kørsel

Reproducerbarheden inden for samme kørsel blev bedømt med CINtec® Histology Kit med den manuelle protokol og på Autostainer-instrumentet på tre forskellige dage. Undersøgelsen omfattede i alt tre vævsblokke, der var diagnosticeret som CIN2+. Der blev dagligt inkluderet ét seriesnit fra hver blok. Det dysplastiske område på snittene fra én blok blev farvet med tilsvarende intensitet ($\pm 0,5$ på en skala fra 0 til 3) på alle dage og også ved manuel og automatisk farvning. Normale områder på alle objektglas viste ingen specifik farvning.

Reproducerbarhed mellem lots

For at bedømme reproducerbarheden mellem lots blev CINtec® Histology Kits fra 3 forskellige lots brugt til farvning af snit fra CIN2+-tilfælde. Manuel og automatisk farvning blev udført i henhold til protokollen, som er angivet i brugsanvisningen. Det dysplastiske område på snittene fra en blok blev farvet med tilsvarende intensitet ($\pm 0,5$ på en skala fra 0 til 3) med reagenserne fra alle tre lots ved manuel og automatisk farvning. Normale områder på alle objektglas viste ingen specifik farvning.

Bemærk! Scoringsmetoden for farvningsintensitet med en skala fra 0 til 3 blev udelukkende anvendt til evaluering af den analytiske præstation og må ikke bruges til fortolkning af farvningen af vævssnit i klinisk praksis. I stedet skal den kvalitative fortolkning af farvede objektglas, som beskrevet i afsnit VIII, bruges til rutinefortolkning.

XI. Fejlfinding

Se afsnit XIII. for kontaktoplysninger i tilfælde af behov for teknisk assistance.

Problem	Mulig årsag	Foreslået handling
1. Ingen objektglas-farvning	<u>1a.</u> Afgang fra brugsanvisningen.	<u>1a.</u> Læs brugsanvisningen grundigt, og følg de angivne procedurer.
2. Svag objektglas-farvning	<u>2a.</u> Utilstrækkelig epitopgenfinding.	<u>2a.</u> Brug Epitope Retrieval Solution, der lige er klargjort, og/eller sørg for, at Epitope Retrieval Solution når 95-99 °C i fulde 10 minutter og nedkøles i yderligere 20 minutter.
	<u>2b.</u> Utilstrækkelige reagensinkubationstider.	<u>2b.</u> Læs 2.2. / 3.2. Anbefalet farvningsprotokol.
	<u>2c.</u> Uegnet fikseringsmetode.	<u>2c.</u> Sørg for, at patientvævet ikke er overfikseret, eller at der ikke er anvendt en alternativ fikseringsvæske.
	<u>2d.</u> Lonkoncentrationen i vandet, der er brugt til at fortynde epitopgenfindingsopløsningen, er for høj.	<u>2d.</u> Sørg for, at ionbytningsøjlen til fremstilling af deioniseret vand er blevet kontrolleret ved rutinemæssig vedligeholdelse.

	<u>2e.</u> Uegnet afparaffinering.	<u>2e.</u> Brugerne skal være opmærksom på, at afvigelser i udstyrstemperaturer og eksponeringstider under præanalytisk prøveklargøring kan føre til ufuldstændig fjernelse af paraffin fra objektglas med vævsprøver. Rester af paraffin kan føre til ufuldstændig farvning med enhver histologifarvning, herunder CINtec® Histology stain. Histopatologilaboratorier bør inkludere regelmæssig overvågning af udstyret for at mindske afvigelser i prøveklargøring før farvning. Observering af skarpt definerede kanter i immunreaktive vævsområder eller andre farvningsuoverensstemmelser i et objektglas kan, med en immunhistokemisk farvning, være en indikator for ikke-optimal eller ufuldstændig præanalytisk behandling af prøven. Brugerne bør overveje at kontrollere udstyret og de præanalytiske prøveklargøringsmetoder ved observation af uoverensstemmelser.
3. Overdreven baggrunds-farvning af objektglas	<u>3a.</u> Ufuldstændig fjernelse af paraffin.	<u>3a.</u> Brug friske xylenebade og følg proceduren i afsnit 2.1. / 3.1.;
	<u>3b.</u> Montering af snit på objektglas med anvendelse af stivelsesmidler.	<u>3b.</u> Stivelsesmidler anvendt til montering af snit kan udvise immunoreaktivitet og bør derfor undgås.
	<u>3c.</u> Utilstrækkelig skylning af objektglas.	<u>3c.</u> Brug ny opløsning i bufferbadene og vaskeflaskerne.
	<u>3d.</u> Tørring af snit under farvningsprocedure.	<u>3d.</u> Brug fugtkammer. Aftør kun tre til fire objektglas ad gangen inden påføring af reagens.
	<u>3e.</u> Uegnet fikseringsmetode.	<u>3e.</u> Brug kun fikseringsvæske anbefalet heri. Atypisk fikserede celler kan udvise overdreven baggrundsfarvning.

	<u>3f.</u> Ikke-specifik binding af reagenser til væv.	<u>3f.</u> Kontrollér prøvens fikseringsmetode og tilstedeværelsen af nekrose.
4. Væv løsnes fra objektglas	<u>4a.</u> Brug af uegnede objektglas.	<u>4a.</u> Følg anbefalingerne heri og brug SuperFrost® Plus-objektglas.
5. For kraftig specifik farvning	<u>5a.</u> Uegnet fikseringsmetode.	<u>5a.</u> Sørg for at bruge korrekt fikseringsvæske og -metode.
	<u>5b.</u> Langvarige reagensinkubationstider.	<u>5b.</u> Gennemse og overhold farvningsprotokollen, som er beskrevet i afsnit 2.2/3.2 ovenfor.
	<u>5c.</u> Uegnet vaskeopløsning.	<u>5c.</u> Brug Wash Buffer (10 x) (katalognummer 10215364001).

XII. Symboler

Symbol:



Forklaring:

Katalognummer
Batch-kode
Globalt vareidentifikationsnummer.
Unik apparatidentifikator
Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik
Producent
Indeholder tilstrækkeligt til <n> prøver
Se brugsanvisningen
Anvendes inden
Temperaturbegrænsning
Fremstillingsdato
Må ikke genbruges
Telefonnummer til teknisk support
Indeholder materialer, der stammer fra dyr
Indhold

XIII. Producent

Produceret af:

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim
Germany

<https://navifyportal.roche.com>

Kontakt for teknisk support (telefon):

Du kan finde en oversigt over sikkerhed og præstation her:

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

XIV. Revisionsstatus

Den aktuelle brugsanvisning repræsenterer version 1.0 udgivet i juni 2024.

Ændringer i forhold til tidligere version for produkt 9511 / 06594441001 (2.9, udgivet i december 2022):

- Producent er ændret fra Roche mtm laboratories AG til Roche Diagnostics GmbH, og dermed er et nyt produktnummer, 10213370001, udstedt
- Diverse redigeringer.

XV. Ophavsret

CINtec er et varemærke tilhørende Roche.

Alle andre varemærker tilhører deres respektive ejere.

© 2024 Roche

Appendiks 1 Referencer

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^{INK4a} 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^{INK4a} 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^{INK4a} 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^{INK4a} 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^{INK4a} 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^{INK4a} 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^{INK4a} 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^{INK4a} 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^{INK4a} 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^{INK4a} 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^{INK4a} 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^{INK4a} 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^{INK4a} 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^{INK4A} 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^{INK4a} 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^{INK4a} 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^{INK4a} 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^{INK4a} 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) immunochemistry 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

Appendiks 2

Eksempel på diffust farvningsmønster

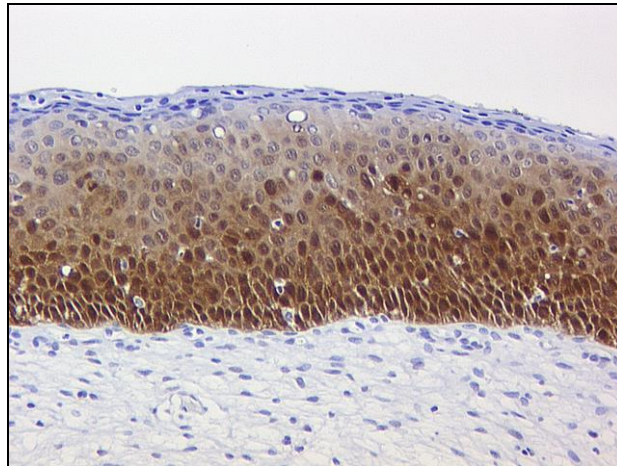


Fig. 1: CIN 3

Eksempel på fokalt farvningsmønster

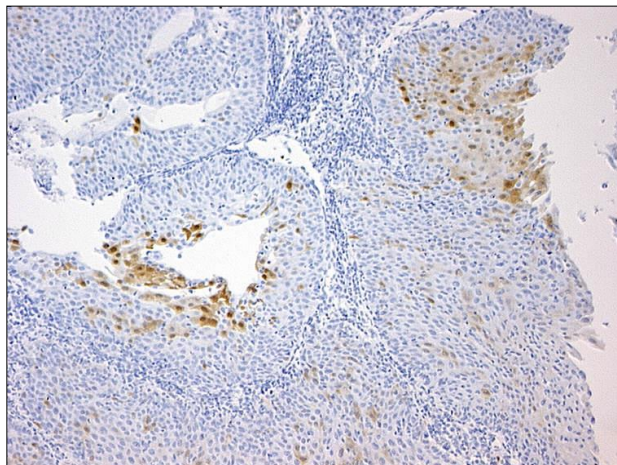


Fig. 2: Pladecellemetaplasti, moden