

CINtec® p16 Histology

REF	805-4713	Σ	50
	06695248001		
REF	825-4713	Σ	250
	06695256001		
IVD			

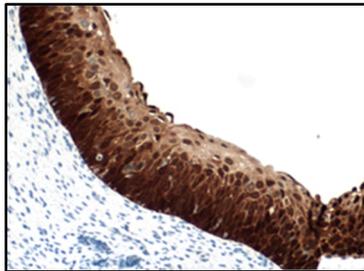


Figura 1. Coloração com CINtec p16 Histology de células epiteliais escamosas do colo do útero.

UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

CINtec p16 Histology é um ensaio imuno-histoquímico para a deteção qualitativa da proteína p16^{INK4a} em secções de tecido fixado em formol e impregnado em parafina preparado a partir de biopsias de colo do útero. Tem indicação para ser utilizado em conjunto com lâminas coradas com H&E preparadas a partir da mesma amostra de tecido do colo do útero, como auxiliar para aumentar a exatidão do diagnóstico e a concordância entre observadores no diagnóstico de neoplasia intra-epitelial do colo do útero de alto grau.

Este produto deverá ser interpretado por um patologista qualificado, em conjunto com um exame histológico, a informação clínica relevante e os controlos adequados.

Este anticorpo destina-se a utilização em diagnóstico in vitro (IVD).

RESUMO E EXPLICAÇÃO

CINtec p16 Histology é constituído por um só componente: anti-p16^{INK4a} (E6H4), um anticorpo monoclonal primário de rato.

Como inibidor da cinase dependente da ciclina, a p16^{INK4a} (p16) desempenha um papel fulcral na progressão do ciclo celular e na diferenciação celular.¹⁻⁴ A proteína p16^{INK4a} controla a transição da fase G1-S mediada pela proteína retinoblastoma (pRB) e desencadeia uma paragem do ciclo celular no decorrer do processo de diferenciação celular.^{1,5} Em células normais, diferenciadas a nível terminal, a p16^{INK4a} é expressa em níveis baixos, normalmente não detetáveis através de imuno-histoquímica.^{1,5} Trabalhos de investigação identificaram que uma sobre-expressão forte de p16^{INK4a} em tecidos pré-cancerosos e cancerosos está intimamente associada à expressão da oncoproteína do vírus do papiloma humano (HPV) E7.^{1,3,6,7,8}

A deteção IHC da sobre-expressão de p16 pode ajudar na interpretação das amostras histológicas de colo do útero. Tem sido reportada a sobre-expressão da proteína p16 em células epiteliais escamosas neoplásicas do colo do útero, ao passo que se verificou estar maioritariamente ausente no epitélio normal e em lesões não neoplásicas.^{1,2,5,6,7} Numerosos estudos investigaram a correlação entre a sobre-expressão de p16 e a presença de neoplasia intraepitelial do colo do útero (CIN).^{8,9} Tem sido observada sobre-expressão de p16 em praticamente todas as lesões CIN3, na grande maioria das lesões CIN2 e, tipicamente, em 40% a 60% das lesões do colo do útero escamosas classificadas como CIN1 em secções de tecido corado com H&E.⁸⁻¹³

SIGNIFICADO CLÍNICO

A interpretação do diagnóstico de amostras de biopsia de colo de útero serve de base às decisões de tratamento das pacientes. CIN1 é a manifestação histológica de uma infeção por HPV. Em geral, recomenda-se que as pacientes com diagnóstico de lesões CIN1 regressem para uma avaliação de seguimento ao fim de um ano.¹⁴ Na patologia do colo do útero, as lesões CIN2 são o limiar clínico mais utilizado para tratamento.¹⁴ Nas pacientes com diagnóstico de lesões CIN2 ou CIN3, é recomendada terapêutica excisional ou ablativa. O risco do tratamento excisional nas pacientes em idade fértil inclui efeitos adversos em futuras gravidezes.^{15,16,17} Por conseguinte, o diagnóstico exato de CIN e, em particular, de CIN2 e CIN3 é importante nas decisões de gestão da doente.¹⁸

A interpretação morfológica de amostras de biopsia de colo do útero apenas por H&E está sujeita a variabilidade interobservadores.¹⁸⁻²⁵ Vários estudos avaliaram o uso adjuvante de lâminas coradas com p16 e o efeito na fiabilidade interobservadores na interpretação do diagnóstico de amostras histológicas do colo do útero por patologistas. Em todos estes estudos, a concordância de diagnóstico entre patologistas melhorou significativamente quando as lâminas coradas com p16 foram interpretadas juntamente com as lâminas coradas com H&E, em comparação com a interpretação da lâmina corada com H&E isoladamente.^{10,11,13,21,22,26,27,28}

Além disso, vários estudos avaliaram o efeito na exatidão do diagnóstico da interpretação da histologia cervical quando foram utilizadas lâminas coradas com p16 juntamente com lâminas coradas com H&E. Dijkstra e colegas (2010) demonstraram uma concordância quase perfeita entre os diagnósticos estabelecidos com base em lâminas coradas com p16 interpretadas por um só patologista, em comparação com os diagnósticos adjudicados feitos por um painel de peritos patologistas utilizando como base a coloração apenas com H&E.¹⁰ Bergeron e colegas reportaram um aumento significativo da exatidão do diagnóstico quando a interpretação incluía tanto lâminas coradas com p16 como lâminas coradas com H&E, em comparação com a interpretação feita com base apenas em lâminas coradas com H&E (p = 0.0004), com a sensibilidade ≥CIN2 a aumentar de 77% para 87%.¹¹ Num estudo prospetivo recente, baseado na população, em que um centro clínico académico localizado nos EUA analisou mais de 1450 casos consecutivos de biopsia do colo do útero, observou-se que a coloração com p16 "é um adjuvante de diagnóstico útil e fiável para distinguir biopsias com e sem CIN2+."¹² Portanto, a interpretação adjuvante das lâminas coradas com H&E em secções de biopsia do colo do útero aliada a lâminas consecutivas da mesma amostra de tecido imunocoradas para p16 tem o potencial de melhorar significativamente a concordância do diagnóstico na interpretação das biopsias de colo do útero.

PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO

CINtec p16 Histology é um anticorpo monoclonal primário de rato produzido contra a proteína p16^{INK4a}. CINtec p16 Histology liga-se à proteína p16^{INK4a} em secções de tecido fixado em formol e impregnado em parafina (FFPE) e apresenta um padrão de coloração nuclear e/ou citoplasmático. Este anticorpo pode ser visualizado utilizando OptiView DAB IHC Detection Kit (Ref. 760-700; 06396500001) ou *ultraView* Universal DAB Detection Kit (Ref. 760-500; 05269806001). Consulte a respetiva folha de métodos para obter mais informações.

MATERIAIS FORNECIDOS

CINtec p16 Histology (Ref. 805-4713 / 06695248001) contém reagente suficiente para 50 testes.

Um dispensador de 5 mL de CINtec p16 Histology contém aproximadamente 5.0 µg de um anticorpo monoclonal de rato.

CINtec p16 Histology (Ref. 825-4713 / 06695256001) contém reagente suficiente para 250 testes.

Um dispensador de 25 mL de CINtec p16 Histology contém aproximadamente 25.0 µg de um anticorpo monoclonal de rato.

Este anticorpo encontra-se diluído em Tris-HCl com proteína transportadora e 0.10% de conservante ProClin 300.

A concentração específica do anticorpo é de aproximadamente 1.0 µg/mL. Não foi observada qualquer reatividade não específica conhecida ao anticorpo neste produto.

CINtec p16 Histology é um anticorpo recombinante monoclonal de rato purificado a partir de sobrenadante de cultura celular.

Consulte a folha de métodos incluída na embalagem do kit de deteção VENTANA apropriado para obter descrições detalhadas sobre: Princípio do procedimento, Material e métodos, Colheita das amostras e preparação para análise, Procedimentos de controlo de qualidade, Resolução de problemas, Interpretação dos resultados e Limitações.

MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

Os reagentes de coloração, como os dos kits de deteção VENTANA e os componentes auxiliares, incluindo lâminas de controlo tecidular positivo e negativo, não são fornecidos. Os produtos indicados no folheto informativo podem não estar todos disponíveis em todas as regiões. Consulte o seu representante de assistência local.

Os seguintes reagentes e materiais podem ser necessários para a coloração, mas não são fornecidos:

1. Tecido de controlo recomendado
2. Lâminas de microscópio carregadas positivamente

3. Negative Control (Monoclonal) (Ref. 760-2014 / 05266670001)
4. OptiView DAB IHC Detection Kit (Ref. 760-700 / 06396500001)
5. *ultraView* Universal DAB Detection Kit (Ref. 760-500 / 05269806001)
6. Antibody Diluent (Ref. 251-018 / 05261899001)
7. EZ Prep Concentrate (10X) (Ref. 950-102 / 05279771001)
8. Reaction Buffer Concentrate (10X) (Ref. 950-300 / 05353955001)
9. LCS (Predilute) (Ref. 650-010 / 05264839001)
10. ULTRA LCS (Predilute) (Ref. 650-210 / 05424534001)
11. Cell Conditioning Solution (CC1) (Ref. 950-124 / 05279801001)
12. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (Ref. 950-224 / 05424569001)
13. Hematoxylin II (Ref. 790-2208 / 05277965001)
14. Bluing Reagent (Ref. 760-2037 / 05266769001)
15. Meio de montagem permanente
16. Lamela de cobertura
17. Dispositivo de cobertura automático
18. Equipamento de laboratório de uso genérico
19. Instrumento BenchMark IHC/ISH

CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE

Após a receção e quando não estiver a ser utilizado, conservar entre 2-8 °C. Não congelar.

Para garantir uma correta distribuição do reagente e a estabilidade do anticorpo, volte a colocar a tampa do dispensador após cada utilização e coloque o dispensador imediatamente no frigorífico na posição vertical.

Cada dispensador de anticorpos tem indicada a respetiva data de validade. Quando corretamente conservado, o reagente permanece estável até à data indicada na etiqueta. Não utilizar o reagente depois de ultrapassada a data de validade.

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os tecidos FFPE processados regularmente são adequados para utilização com este anticorpo primário quando utilizados com kits de deteção VENTANA e instrumentos BenchMark IHC/ISH. O fixador de tecido recomendado é o formol neutro tamponado a 10%.²⁹ As secções devem ser cortadas com aproximadamente 4 µm de espessura e colocadas em lâminas carregadas positivamente. Uma vez que a antigenicidade das secções de tecido cortado pode diminuir ao longo do tempo, as lâminas devem ser coradas imediatamente. Peça ao representante da Roche uma cópia de "Recommended Slide Storage and Handling" para obter mais informações.

De acordo com as recomendações, os controlos positivos e negativos devem ser executados em simultâneo com amostras desconhecidas.

AVISOS E PRECAUÇÕES

1. Para utilização em diagnóstico in vitro (IVD).
2. Apenas para utilização profissional.
3. Não utilizar num número de testes superior ao especificado.
4. A solução ProClin 300 é utilizada como conservante neste reagente. Está classificada como irritante e pode causar sensibilização através do contacto com a pele. Tome as precauções razoáveis ao manusear a mesma. Evite o contacto dos reagentes com os olhos, a pele e as membranas mucosas. Utilize luvas e vestuário de proteção.
5. As lâminas carregadas positivamente podem ser suscetíveis a pressões ambientais que podem ter como consequência uma coloração inadequada. Contacte o representante da Roche para mais informações sobre como utilizar estes tipos de lâminas.
6. Os materiais de origem humana ou animal devem ser manuseados como materiais que envolvem risco de contaminação e eliminados adotando as devidas precauções. Em caso de exposição, devem ser seguidas as diretivas de saúde das autoridades responsáveis.^{30,31}
7. Evite o contacto dos reagentes com os olhos e as membranas mucosas. Se os reagentes entrarem em contacto com áreas sensíveis, lave com água em abundância.
8. Evite a contaminação microbiana dos reagentes, pois tal poderá dar origem a resultados incorretos.
9. Para mais informações acerca da utilização deste dispositivo, consulte o Manual do utilizador do instrumento BenchMark IHC/ISH, bem como as instruções de utilização de todos os componentes necessários em navifyportal.roche.com.

10. Consulte as autoridades locais e/ou estatais no que se refere ao método de eliminação recomendado.
11. A etiquetagem de segurança do produto segue principalmente as diretrizes do GHS da UE. Ficha de dados de segurança disponível para utilizadores profissionais a pedido.
12. Para reportar situações graves suspeitas relacionadas com este dispositivo, contacte o representante local da Roche e a autoridade competente do Estado-Membro ou do País onde o utilizador está estabelecido.

Este produto contém componentes classificados da seguinte forma, nos termos do disposto no Regulamento (CE) N.º 1272/2008:

Tabela 1. Informações sobre os perigos.

Perigo	Código	Advertência
	H317	Pode provocar uma reação alérgica cutânea.
	H412	Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.
	P261	Evitar respirar névoas ou vapores.
	P273	Evitar a libertação para o ambiente.
	P280	Usar luvas de proteção.
	P333 + P313	Em caso de irritação ou erupção cutânea: Consulte um médico.
	P362 + P364	Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar.
	P501	Eliminar o conteúdo/recipiente num centro de tratamento de resíduos apropriado.

Este produto contém CAS # 55965-84-9, uma massa de reação de: 5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3-ona e 2-metil-2H-isotiazol-3-ona (3:1).

PROCEDIMENTO DE COLORAÇÃO

Os anticorpos primários VENTANA foram desenvolvidos para utilização em instrumentos BenchMark IHC/ISH em combinação com kits de deteção e acessórios VENTANA. Consulte a Tabela 2 e a Tabela 3 abaixo para obter mais informações sobre os protocolos de coloração recomendados.

Este anticorpo foi otimizado para tempos de incubação específicos, mas o utilizador terá de validar os resultados obtidos com este reagente.

Os parâmetros para os procedimentos automáticos podem ser apresentados, impressos e editados de acordo com o procedimento contido no Manual do utilizador do instrumento. Consulte a folha de métodos incluída na embalagem do kit de deteção VENTANA apropriado para obter mais detalhes relativamente aos procedimentos de coloração de imuno-histoquímica.

Para mais informações sobre a utilização correta deste dispositivo, consulte a folha de métodos do dispensador em linha associado com o P/N 805-4713 ou P/N 825-4713.

Tabela 2. Protocolo de coloração recomendado para CIntec p16 Histology com *ultraView* Universal DAB Detection Kit em instrumentos BenchMark IHC/ISH.

Tipo de procedimento	Método		
	GX	XT	ULTRA ou ULTRA PLUS
Desparafinação	Selecionado	Selecionado	Selecionado
Cell Conditioning (revelação de antígeno)	CC1, Padrão	CC1, Padrão	ULTRA CC1, 64 minutos 95 °C
Anticorpo (primário)	24 minutos, 37 °C	16 minutos, 37 °C	20 minutos, 36 °C
ultraBlock*	8 minutos	n/a	n/a
Coloração de contraste	Hematoxylin II, 4 minutos		

Tipo de procedimento	Método		
	GX	XT	ULTRA ou ULTRA PLUS
Pós-contraste	Bluing, 4 minutos		

*Utilização de Antibody Diluent no passo ultraBlock.

Tabela 3. Protocolo de coloração recomendado para CINtec p16 Histology com OptiView DAB IHC Detection Kit em instrumentos BenchMark IHC/ISH.

Tipo de procedimento	Método		
	GX	XT	ULTRA ou ULTRA PLUS
Desparafinação	Selecionado	Selecionado	Selecionado
Cell Conditioning (revelação de antígeno)	CC1, 32 minutos	CC1, 48 minutos	ULTRA CC1, 48 minutos 100 °C
Inibidor de peroxidase pré-primário	Selecionado	Selecionado	Selecionado
Anticorpo (primário)	8 minutos, 37 °C	8 minutos, 37 °C	12 minutos, 36 °C
Pós-fixador*	8 minutos	n/a	n/a
Coloração de contraste	Hematoxylin II, 4 minutos		
Pós-contraste	Bluing, 4 minutos		

*Utilização de Antibody Diluent no passo pós-fixador.

Devido à variação na fixação e no processamento dos tecidos, bem como nos instrumentos laboratoriais gerais e nas condições ambientais, poderá ser necessário aumentar ou diminuir a incubação do anticorpo primário, o condicionamento celular ou o pré-tratamento com protease com base nas amostras individuais, na detecção utilizada e na preferência do leitor. Para mais informações sobre as variáveis da fixação, consulte "Immunohistochemistry Principles and Advances".³²

CONTROLO DE REAGENTE NEGATIVO

Além da coloração com CINtec p16 Histology, deve ser corada uma segunda lâmina com o reagente de controlo negativo apropriado.

CONTROLO TECIDULAR POSITIVO

A prática laboratorial ideal deve incluir uma secção de controlo positivo na mesma lâmina que contém o tecido de teste. Isto ajuda a identificar quaisquer falhas na aplicação dos reagentes na lâmina. Um tecido com coloração positiva fraca é o mais adequado para o controlo de qualidade. O tecido de controlo poderá conter elementos de coloração positiva e negativa e servir como controlo positivo e negativo. O tecido de controlo deverá ser uma amostra recém-colhida de autópsia, biópsia ou cirurgia, preparada ou fixada o mais cedo possível e de forma idêntica à das secções de teste.

Os controlos tecidulares positivos conhecidos deverão ser utilizados apenas para monitorizar o desempenho dos reagentes e instrumentos, e não para auxiliar na determinação de um diagnóstico específico de amostras de teste. Se os controlos tecidulares positivos não demonstrarem uma coloração positiva, os resultados da amostra de teste deverão ser considerados inválidos.

Exemplos de tecidos de controlo positivos para este anticorpo incluem o pâncreas normal, a amígdala normal e o carcinoma do colo do útero.

Em tecido de amígdala normal, existe coloração nuclear e/ou citoplasmática de células epiteliais escamosas dispersas primariamente no epitélio da cripta e células dendríticas foliculares dispersas em centros germinais, e ausência de coloração na maioria dos linfócitos (pode ser observada coloração de linfócitos raros).

INTERPRETAÇÃO DA COLORAÇÃO/RESULTADOS PREVISTOS

O padrão de coloração celular de CINtec p16 Histology é nuclear e/ou citoplasmático.

A sobre-expressão do biomarcador p16^{INK4a} em amostras de biópsia do colo de útero é representada como uma coloração contínua difusa das células das camadas celulares basais e parabasais do epitélio escamoso do colo do útero, com ou sem coloração das camadas celulares intermédia, ou intermédia a superficial. Este padrão de coloração difuso contínuo representa um estado de CINtec p16 Histology positivo. A coloração focal é representada por uma coloração não contínua de células isoladas ou de pequenos agrupamentos de células, e não das células basais e parabasais, em particular. Uma coloração focal e ausência de coloração da p16 representam um estado de CINtec p16 Histology negativo. O padrão de coloração da p16 e os critérios do estado de CINtec p16 Histology são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Estado de CINtec p16 Histology e padrões de coloração da p16.

Estado de CINtec p16 Histology	Padrão de coloração da p16	Descrição da coloração
Positivo	Difusa	Coloração contínua de células das camadas celulares basais e parabasais do epitélio escamoso do colo do útero, com ou sem coloração das camadas celulares intermédia, ou intermédia a superficial
Negativo	Focal	Coloração de células isoladas ou de pequenos agrupamentos de células; i.e., uma coloração não contínua, e não das células basais e parabasais, em particular
	Ausência de coloração da p16	Reação de coloração negativa no epitélio escamoso

LIMITAÇÕES ESPECÍFICAS

CINtec p16 Histology pode demonstrar coloração epitelial fibroblástica e colunar em tecidos de colo do útero, a qual não interfere com a interpretação.

O sistema de detecção OptiView é, de um modo geral, mais sensível do que o sistema de detecção *ultraView*. O utilizador terá de validar os resultados obtidos com este reagente e estes sistemas de detecção.

O tecido de paciente deve ser corado no prazo de 24 semanas após o seccionamento do bloco de tecido. O desempenho da coloração com CINtec p16 Histology em secções que tenham sido conservadas à temperatura ambiente durante mais de 24 semanas não foi verificado.

As amostras devem ser fixadas durante pelo menos 1 hora em 10% NBF, formol-zinco ou Z-fix, ou durante, pelo menos, 3 horas em AFA. A utilização de tempos de fixação ou de tipos de fixador que não sejam os recomendados pode dar origem a resultados falsamente negativos. Os fixadores álcool-formol e PREFER não são recomendados para utilização com este ensaio.

Os ensaios podem não estar todos registados em todos os instrumentos. Contacte o seu representante local da Roche para obter mais informações.

CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

DESEMPENHO ANALÍTICO

Foram realizados testes de coloração para sensibilidade, especificidade, precisão e exatidão, e os resultados estão listados abaixo.

Sensibilidade e especificidade

A sensibilidade e a especificidade analíticas foram determinadas através da coloração de vários casos de tecidos humanos normais e neoplásicos com CINtec p16 Histology. Os resultados são apresentados na Tabela 5 e na Tabela 6. Muitos tecidos normais demonstraram coloração de algumas células ou de tipos de células específicos, conforme foi observado. Isto é de prever devido ao papel que a proteína p16^{INK4a} tem na regulação do ciclo celular.

Tabela 5. A sensibilidade/especificidade de CINtec p16 Histology foi determinada testando tecidos normais FFPE.

Tecido	N.º de casos positivos/totais	Células positivas em tecido normal
Cérebro hemisférico	4/4	Células gliais
Cerebelo	3/3	Células de Purkinje
Glândula suprarrenal	3/3	Células epiteliais adrenocorticais
Ovário	3/3	Células estromais
Pâncreas	3/3	Ilhéus de Langerhans, células acinares
Gânglio linfático	3/3	Linfócitos, células dendríticas foliculares
Glândula paratiroide	2/3	Células principais
Glândula pituitária	3/3	Células epiteliais da pituitária anterior
Testículo	3/3	Células espermatogénicas, células de Leydig
Tiroide	3/3	Células foliculares
Mama	3/3	Células mioepiteliais, células epiteliais lumbinais, células estromais
Baço	3/3	Linfócitos, células dendríticas foliculares
Amígdala	6/6	Células epiteliais escamosas, linfócitos, células dendríticas foliculares
Timo	3/3	Células reticulares epiteliais, linfócitos, corpúsculos de Hassall
Medula óssea	2/3	Células mieloides
Pulmão	3/3	Pneumócitos, células epiteliais brônquicas
Coração	0/3	Sem células positivas
Esófago	3/3	Células epiteliais escamosas
Estômago	3/3	Células epiteliais, glândulas fúndicas
Intestino delgado	3/3	Células epiteliais
Cólon	3/3	Células epiteliais
Apêndice	0/3	Sem células positivas
Fígado	0/3	Sem células positivas
Glândula salivar	3/3	Células epiteliais do ducto estriado, células acinares serosas
Faringe/cavidade oral	2/3	Células epiteliais respiratórias, células epiteliais do ducto estriado, células acinares das mucosas, células acinares serosas
Rim	3/3	Células epiteliais tubulares, células mesangiais dos glomérulos
Próstata	3/3	Células acinares, células basais
Bexiga	3/3	Células uroteliais
Endométrio	3/3	Células glandulares do endométrio, células estromais
Colo do útero ^a	1/120	Células epiteliais escamosas
Músculo esquelético	0/3	Sem células positivas

Tecido	N.º de casos positivos/totais	Células positivas em tecido normal
Pele	0/3	Sem células positivas
Nervo	4/4	Células de Schwann
Mesotélio	0/3	Sem células positivas
Tecidos moles	3/3	Células endoteliais, fibroblastos, células ductais

^a Os tecidos avaliados incluem tecidos do colo do útero normal e de cervicite crónica. Os casos de colo do útero foram interpretados com base no algoritmo de pontuação CINtec Histology, que considera como negativa a coloração de células escamosas normais (coloração focal), endocervicais ou estromais.

Tabela 6. A sensibilidade/especificidade de CINtec p16 Histology foi determinada testando vários tecidos neoplásicos FFPE.

Patologia	N.º de casos positivos/totais
Glíoblastoma (cérebro hemisférico)	1/1
Meningioma (cérebro hemisférico)	1/1
Ependimoma (cerebelo)	1/1
Oligodendroglioma (cerebelo)	1/1
Adenocarcinoma (cabeça e pescoço)	1/1
Carcinoma de células escamosas (cabeça e pescoço)	0/1
Carcinoma seroso (ovário)	1/1
Tumor de células da granulosa (ovário)	1/1
Teratoma (ovário)	1/1
Neoplasia neuroendócrina pancreática (pâncreas)	1/1
Adenocarcinoma ductal (pâncreas)	1/1
Seminoma (testículos)	1/1
Carcinoma embrionário (testículo)	1/1
Carcinoma folicular (tiroide)	1/1
Carcinoma papilar (tiroide)	0/1
Carcinoma ductal in situ (mama)	1/1
Carcinoma ductal invasivo (mama)	1/1
Carcinoma lobular invasivo (mama)	1/1
Adenoma (glândula suprarrenal)	1/1
Feocromocitoma (glândula suprarrenal)	1/1
Linfoma difuso de grandes células B (baço)	0/1
Adenoma pleomórfico (glândula salivar)	1/1
Tumor de Warthin (glândula salivar)	1/1
Carcinoma de pequenas células (pulmão)	1/1
Carcinoma de células escamosas (pulmão)	0/1
Adenocarcinoma (pulmão)	1/1
Carcinoma de células escamosas (esófago)	0/1
Adenocarcinoma (esófago)	1/1
Adenocarcinoma (estômago)	1/1

Patologia	N.º de casos positivos/totais
Tumor estromal gastrointestinal (estômago)	1/1
Adenocarcinoma (intestino delgado)	0/1
Tumor estromal gastrointestinal (intestino delgado)	1/1
Adenocarcinoma (cólon)	1/1
Carcinoma adenoescamoso (cólon)	1/1
Tumor carcinoide (apêndice)	1/1
Carcinoma hepatocelular (fígado)	1/1
Colangiocarcinoma (fígado)	0/1
Carcinoma de células renais (rim)	1/2
Adenoma papilar renal (rim)	1/1
Adenocarcinoma (próstata)	2/2
Carcinoma de células claras (útero)	1/1
Carcinoma endometriode (útero)	1/1
Leiomioma (útero)	0/1
Leiomiossarcoma (útero)	1/1
Neoplasia intraepitelial do colo do útero I (CIN I) (colo do útero)	12/37
CIN I-II, borderline baixo vs. alto grau (colo do útero)	2/8
CIN II (colo do útero)	52/60
CIN II-III, alto grau (colo do útero)	1/3
CIN III (colo do útero)	65/67
Carcinoma de células escamosas (colo do útero)	73/76
Carcinoma adenoescamoso (colo do útero)	2/2
Adenocarcinoma (colo do útero)	1/1
Carcinoma neuroendócrino (colo do útero)	1/1
Rabdomiossarcoma alveolar (músculo)	0/1
Mixoma (músculo)	1/1
Carcinoma basocelular (pele)	1/1
Melanoma invasivo (pele)	1/1
Carcinoma de células escamosas (pele)	0/1
Schwannoma (nervo periférico)	1/1
Neurofibrossarcoma (nervo)	1/1
Linfoma anaplásico de grandes células (gânglio linfático)	1/1
Linfoma folicular (gânglio linfático)	1/1
Linfoma de Hodgkin (gânglio linfático)	1/1
Carcinoma de células uroteliais (bexiga)	1/1
Carcinoma de células escamosas (bexiga)	0/1
Plasmacitoma (extramedular)	1/1
Mesotelioma (mesotélio)	1/1
Tumor fibroso solitário da pleura (mesotélio)	1/1
Angiossarcoma (tecidos moles)	1/1
Lipossarcoma (tecidos moles)	1/1

Precisão entre instrumentos

Foram concluídos dois estudos para avaliar a precisão entre instrumentos. Um estudo foi realizado num instrumento BenchMark XT e num instrumento BenchMark ULTRA utilizando *ultraView* Universal DAB Detection Kit, e um segundo estudo foi realizado num instrumento BenchMark ULTRA com *OptiView* DAB IHC Detection Kit.

No primeiro estudo, as secções de dois blocos multitecidulares com carcinoma de células escamosas do colo do útero, amígdala e pâncreas foram coradas em três instrumentos BenchMark XT e três instrumentos BenchMark ULTRA com *ultraView* Universal DAB Detection Kit (5 secções de cada bloco multitecidular por cada instrumento). As intensidades da coloração da p16 situaram-se dentro dos 0.5 pontos da mediana de pontuação em 100% dos tecidos, quando corados em três instrumentos BenchMark XT. As intensidades da coloração da p16 situaram-se dentro dos 0.5 pontos da mediana de pontuação em 100% dos carcinomas de células escamosas do colo do útero (15/15), 93% da amígdala (14/15) e 93% do pâncreas (14/15), quando corados em três instrumentos BenchMark ULTRA. Todos os tecidos corados com CINtec p16 Histology apresentavam coloração de fundo aceitável.

No segundo estudo, a precisão do teste CINtec p16 Histology foi determinada em três instrumentos BenchMark ULTRA através da coloração de lâminas replicadas de 28 casos de colo do útero (oito de colo do útero normal, seis de CIN1, seis de CIN2, quatro de CIN3 e quatro casos de carcinoma do colo do útero) utilizando o kit de deteção *OptiView* DAB IHC. Cada caso foi corado em cada um de três instrumentos BenchMark ULTRA como cada um dos três lotes de CINtec p16 Histology. Globalmente, nove lâminas coradas com CINtec p16 Histology de cada caso foram incluídas no estudo (três lotes de CINtec p16 Histology, três instrumentos BenchMark ULTRA). Cada lâmina corada com CINtec p16 Histology foi então emparelhada com uma lâmina corada com H&E do mesmo caso. Todas as lâminas foram randomizadas e depois avaliadas por um só patologista a quem o diagnóstico do caso tinha sido ocultado, no que diz respeito às intensidades de coloração da p16, estado de CINtec p16 Histology positivo e negativo e coloração de fundo. Os dados demonstraram que 97.6% dos tecidos apresentavam pontuações de intensidade de coloração dentro de 0.5 pontos em todos os instrumentos. Além disso, 100% das secções coradas com CINtec p16 Histology em três instrumentos BenchMark ULTRA demonstraram o mesmo estado de CINtec p16 Histology. Todos os tecidos corados com CINtec p16 Histology apresentavam coloração de fundo aceitável.

Adicionalmente, a precisão intermédia entre instrumentos foi determinada em três instrumentos BenchMark ULTRA PLUS efetuando a coloração de lâminas em duplicado de 24 casos de tecido do colo do útero (onze de colo do útero normal, um de CIN1, dois de CIN2, sete de CIN3 e três de carcinoma de células escamosas). As lâminas de teste foram randomizadas e depois avaliadas por um só patologista a quem o diagnóstico do caso tinha sido ocultado, no que diz respeito ao estado de CINtec p16 Histology positivo e negativo, morfologia e coloração de fundo não específica. A taxa de percentagem de concordância global foi de 99.3%. Todos os tecidos corados com CINtec p16 Histology apresentavam 100% de morfologia e coloração de fundo aceitáveis.

Precisão entre lotes

A precisão de lote para lote de CINtec p16 Histology foi avaliada testando três lotes de CINtec p16 Histology num instrumento BenchMark ULTRA utilizando *OptiView* DAB IHC Detection Kit. As secções de cada uma das 26 amostras de tecido de biopsia do colo do útero (seis colo de útero normal, seis CIN1, seis CIN2, seis CIN3 e dois casos de carcinoma do colo do útero) foram coradas em duplicado utilizando cada lote CINtec p16 Histology. Cada lâmina de tecido corada com CINtec p16 Histology foi emparelhada com uma lâmina H&E adjacente e com uma lâmina corada com controlo de reagente negativo do mesmo caso. Os conjuntos de lâminas foram randomizados e avaliados por um único patologista, com o diagnóstico e o número de lote ocultados. O estado de CINtec p16 Histology (positivo = coloração da p16 difusa; negativo = coloração da p16 focal ou ausência de coloração) foi determinado com base na lâmina de CINtec p16 Histology. As categorias CIN (CIN2+ (CIN2, CIN3, adenocarcinoma in situ ou carcinoma invasivo, combinadas numa só categoria)/CIN1- (nenhum CIN ou CIN1 combinadas numa só categoria)) foram determinadas com base na interpretação adjuvante das lâminas de H&E e de CINtec p16 Histology. Os resultados demonstram a reprodutibilidade de CINtec p16 Histology em três lotes de produção do anticorpo. Todos os casos demonstraram uma concordância 100% positiva e negativa para o estado de CINtec p16 Histology e uma concordância de 98.7% para a categoria CIN nos três lotes de produção. É apresentado um resumo dos dados na Tabela 7. A coloração de fundo foi aceitável em 100% dos tecidos corados.

Tabela 7. Reprodutibilidade de lote para lote de anticorpo primário CINtec p16 Histology em amostras de colo do útero medidas de acordo com o estado de CINtec p16 Histology (positivo/negativo) e a categoria CIN (CIN2+/CIN1-).

Reprodutibilidade de	Avaliação	Concordância média positiva (n/N)	Concordância média negativa (n/N)	Porcentagem de concordância global (n/N)
De lote para lote	Estado de CINtec Histology	100.0% 352/352	100.0% 264/264	100.0% 308/308
	Categoria CIN	98.1% 314/320	98.0% 290/296	98.1% 302/308

Repetibilidade intradia e precisão de dia para dia

Globalmente, foram realizados três estudos para avaliar a repetibilidade intradia e a precisão de dia para dia. Nos primeiros dois estudos, o patologista avaliou os tecidos com base na intensidade de coloração da p16 (0-4), enquanto no terceiro estudo foi avaliado o estado de CINtec p16 Histology (positivo/negativo) em biopsias de colo do útero.

No primeiro estudo, as secções de dois blocos multitecniculares com três tecidos (carcinoma de células escamosas do colo do útero, amígdala, pâncreas) foram coradas num instrumento BenchMark XT com *ultraView* Universal DAB Detection Kit. No segundo estudo, dois blocos multitecniculares com amígdala, pâncreas e três casos de colo do útero (carcinoma de células escamosas invasivo, CIN1-, CIN2+) foram corados num instrumento BenchMark ULTRA com *OptiView* DAB IHC Detection Kit. A repetibilidade intradia de CINtec p16 Histology foi testada através da coloração de 14 secções replicadas de cada bloco multitecnicular com CINtec p16 Histology. CINtec p16 Histology passou nos critérios de aceitação com 100% de tecidos a apresentar uma coloração dentro de 0.5 pontos da mediana da pontuação de intensidade da coloração em ambos os estudos. A precisão de dia para dia foi testada em 5 dias não consecutivos durante um período mínimo de 20 dias. Em ambos estes estudos, CINtec p16 Histology passou nos critérios de aceitação com 100% de tecidos a apresentar uma coloração dentro de 0.5 pontos da mediana da pontuação de intensidade da coloração para a repetibilidade intradia e para a precisão de dia para dia. Todos os tecidos corados com CINtec p16 Histology apresentavam fundo aceitável.

No terceiro estudo, foram avaliadas 24 amostras de tecido do colo do útero (três casos de carcinoma de células escamosas do colo do útero, seis CIN3, seis CIN2, seis CIN1, três casos de colo do útero normal) através do estado de CINtec p16 Histology (positivo/negativo) num instrumento BenchMark ULTRA com *OptiView* DAB IHC Detection Kit. Os testes foram realizados em 5 dias não consecutivos durante um período mínimo de 20 dias. Em cada dia de teste, foram coradas duas lâminas de cada caso com CINtec p16 Histology (150 lâminas ao todo) e uma lâmina de cada caso foi corada com um controlo de reagente negativo (75 lâminas ao todo). Nas análises da repetibilidade intradia, o estado de CINtec p16 Histology (positivo/negativo) foi comparado entre duas lâminas avaliáveis do mesmo caso no mesmo dia. Como foram considerados 5 dias neste estudo, o número total de comparações de cada caso em termos de repetibilidade intradia foi 5. O número total de comparações para o estudo da precisão de dia para dia foi de 120 = 24 casos x 5 comparações por caso.

Os resultados indicaram 100% de repetibilidade intradia e 100% de precisão de dia para dia quando os tecidos foram avaliados com base no estado de CINtec p16 Histology. Todas as secções coradas com CINtec p16 Histology apresentavam coloração de fundo aceitável.

Adicionalmente, a repetibilidade intraensaio foi determinada corando 5 lâminas de cada um dos 24 casos de tecido de colo do útero (onze casos de colo do útero normal, um de CIN1, dois de CIN2, sete de CIN3 e três de carcinoma de células escamosas) num instrumento BenchMark ULTRA PLUS. As lâminas de teste foram randomizadas e depois avaliadas por um só patologista a quem o diagnóstico do caso tinha sido ocultado, no que diz respeito ao estado de CINtec p16 Histology positivo e negativo, morfologia e coloração de fundo não específica. A taxa de percentagem de concordância global foi de 97.5%. Todos os tecidos corados com CINtec p16 Histology apresentavam 100% de morfologia e coloração de fundo aceitáveis.

Adicionalmente, a precisão intermédia entre dias foi determinada corando lâminas duplicadas de 24 casos de tecido de colo do útero (onze casos de colo do útero normal,

um de CIN1, dois de CIN2, sete de CIN3 e três de carcinoma de células escamosas) num instrumento BenchMark ULTRA PLUS em 5 dias não consecutivos durante, pelo menos, um período de 20 dias. A precisão intermédia entre dias foi de 98.8%. Todos os tecidos corados com CINtec p16 Histology apresentavam 100% de morfologia e coloração de fundo aceitáveis.

Exatidão entre plataformas e kit de deteção

A exatidão do ensaio foi demonstrada nas plataformas BenchMark ULTRA, BenchMark XT e BenchMark GX, utilizando *OptiView* DAB IHC Detection Kit *ultraView* Universal DAB Detection Kit. No total, 186 casos de colo do útero foram corados com CINtec p16 Histology e avaliados quanto ao estado de CINtec p16 Histology (positivo/negativo) e ao fundo (aceitável/inaceitável). A OPA foi de 98.3-100% para cada comparação emparelhada de plataformas dentro de um kit de deteção e cada comparação emparelhada de kits de deteção dentro de uma plataforma. Todos os casos avaliáveis corados com CINtec p16 Histology apresentavam coloração de fundo aceitável.

Adicionalmente, foi conduzido um estudo para comparar o desempenho de coloração de CINtec p16 Histology, utilizando *OptiView* DAB IHC Detection Kit no instrumento BenchMark ULTRA PLUS versus instrumento BenchMark ULTRA. Cento e vinte (120) casos de tecido de colo do útero (60 positivos para CINtec p16 Histology e 60 negativos para CINtec p16 Histology) foram corados, e as lâminas coradas foram avaliadas por um patologista que determinou o estado de CINtec p16 Histology. A taxa de percentagem de concordância global foi de 99.1%. Todos os tecidos corados com CINtec p16 Histology apresentavam 100% de morfologia e coloração de fundo aceitáveis.

Precisão intraleitor e precisão entre leitores

A precisão intraleitor e de leitor para leitor foi avaliada em 50 casos de colo do útero (16 casos de colo do útero normal, 12 CIN1, 12 CIN2, 6 CIN3 e 4 de carcinoma do colo do útero) corados com CINtec p16 Histology num instrumento BenchMark ULTRA com *OptiView* DAB IHC Detection Kit.

Todas as lâminas foram randomizadas e avaliadas subsequentemente por três patologistas quanto ao estado positivo/negativo de CINtec p16 Histology. O diagnóstico do caso foi ocultado dos patologistas. As lâminas coradas com CINtec p16 Histology foram re-randomizadas para uma segunda avaliação do estado de CINtec p16 Histology por cada um dos três patologistas, após um período de washout de 4 semanas. A percentagem de concordância global em termos de precisão intraleitor e entre leitores para o estado de CINtec p16 Histology foi de 98.7%, conforme apresentado na Tabela 8.

No estudo de precisão intraleitor e entre leitores da categoria CIN, cada lâmina de CINtec p16 Histology foi emparelhada com uma lâmina corada com H&E do mesmo caso e os conjuntos de lâminas emparelhadas foram randomizados. A categoria CIN (CIN2+/CIN1-) foi avaliada por três patologistas com base na interpretação adjuvante das lâminas coradas com H&E e coradas com CINtec p16 Histology. Após um período de washout de, pelo menos, 4 semanas, os pares de lâminas foram novamente randomizados, e foi efetuada uma segunda avaliação da categoria CIN por cada um dos três patologistas. Os dados apresentados na Tabela 8 demonstram que a percentagem de concordância global em termos de precisão intraleitor e entre leitores para a categoria CIN foi de 98.0% e 90%, respetivamente.

Tabela 8. Precisão intraleitor e entre leitores do ensaio CINtec p16 Histology em amostras de colo do útero medida de acordo com o estado de CINtec p16 Histology (positivo/negativo) e a categoria CIN (CIN2+/CIN1-).

Precisão do leitor	Avaliação	Concordância média positiva (CI de 95%)	Concordância média negativa (CI de 95%)	Porcentagem de concordância global (CI de 95%)
Intraleitor	Estado de CINtec p16 Histology	98.7% (93.9-100.0%)	98.6% (93.0-100.0%)	98.7% (94.0-100.0%)
	Categoria CIN	97.4% (89.1-100.0%)	98.4% (92.6-100.0%)	98.0% (92.0-100.0%)
Entre leitores	Estado de CINtec p16 Histology	98.7% (93.1-100.0%)	98.6% (92.3-100.0%)	98.7% (93.9-100.0%)

Precisão do leitor	Avaliação	Concordância média positiva (CI de 95%)	Concordância média negativa (CI de 95%)	Percentagem de concordância global (CI de 95%)
	Categoria CIN	87.0% (71.8-97.6%)	91.9% (83.0-98.5%)	90.0% (80.0-98.0%)

Estudo de reprodutibilidade (Estudo de precisão de laboratório para laboratório)

Foi levado a cabo um estudo de reprodutibilidade interlaboratorial de CINtec p16 Histology para demonstrar a reprodutibilidade do ensaio na determinação do estado de CINtec p16 Histology e da categoria CIN, utilizando 27 casos de colo do útero (10 casos sem CIN, 5 CIN1, 5 CIN2, 5 CIN3 e 2 de carcinoma do colo do útero) executados em três instrumentos BenchMark ULTRA em cada um de três dias não consecutivos em três laboratórios externos. As amostras foram randomizadas e avaliadas por um total de seis patologistas (dois patologistas/centro), tanto para o estado CINtec p16 Histology (positivo/negativo) como para a categoria CIN (CIN2+/CIN1-), com base na interpretação adjuvante das lâminas coradas com H&E e coradas com CINtec p16 Histology. O diagnóstico do caso foi ocultado dos patologistas. O estado de CINtec p16 Histology e os resultados da categoria CIN são apresentados na Tabela 9 e na Tabela 10, respetivamente. Adicionalmente, as taxas de aceitabilidade morfológica e da coloração de fundo dos seis patologistas em todos os centros foram de 96.3% e 97.1%, respetivamente. Os dados indicam uma concordância excelente da reprodutibilidade do ensaio em termos de centros, dias e patologistas.

Tabela 9. Reprodutibilidade interlaboratorial: concordância em termos de estado de CINtec p16 Histology (positivo/negativo) das amostras de colo do útero.

Taxas de concordância relativas a Reprodutibilidade interlaboratorial (estado de CINtec p16 Histology)	Concordância média positiva	Concordância média negativa	Percentagem de concordância global
Entre centros (3 centros)	96.2% (91.2-99.3%)	93.9% (86.3-99.0%)	95.3% (90.6-99.2%)
Entre dias (3 dias não consecutivos)	98.2% (95.9-99.7%)	97.1% (93.3-99.5%)	97.8% (95.5-99.5%)
Entre leitores (2 patologistas/centro)	95.5% (87.8-100.0%)	92.9% (82.6-100.0%)	94.4% (87.1-100.0%)

Tabela 10. Reprodutibilidade interlaboratorial: concordância em termos de categoria CIN (CIN2+/CIN1-) de amostras de colo do útero com base na interpretação adjuvante das lâminas coradas com H&E e coradas com CINtec p16 Histology.

Taxas de concordância relativas a Reprodutibilidade interlaboratorial (categoria CIN)	Concordância média positiva	Concordância média negativa	Percentagem de concordância global
Entre centros (3 centros)	94.4% (86.8-98.8%)	94.1% (86.7-98.6%)	94.3% (88.5-98.6%)
Entre dias (3 dias não consecutivos)	96.9% (93.1-99.2%)	96.6% (93.0-99.1%)	96.8% (94.0-99.1%)
Entre leitores (2 patologistas/centro)	95.0% (87.4-98.9%)	94.8% (88.6-98.9%)	94.9% (89.3-98.7%)

DESEMPENHO CLÍNICO

Concordância de diagnóstico

O estudo CERvical Tissue Adjunctive Analysis (CERTAIN) foi realizado para demonstrar que a leitura adjuvante de resultados de CINtec p16 Histology resulta numa melhoria da coerência do diagnóstico de neoplasia intraepitelial do colo do útero (CIN), bem como dos níveis de concordância entre as leituras feitas por Community Pathologists (CP) e Expert Pathologists (XP) em tecido da punção do colo do útero.

O estudo clínico CERTAIN foi realizado em 1100 amostras de colo do útero FFPE colhidas por punção retrospectivamente, que representam uma população referenciada para colposcopia. Foi estabelecido um diagnóstico de referência derivado de XP para cada caso de estudo utilizando apenas lâminas coradas com H&E e utilizando as lâminas coradas com H&E e coradas com CINtec p16 Histology. Dois XP estabeleceram os seus diagnósticos independentes (sem CIN, CIN1, CIN2, CIN3, adenocarcinoma in situ ou carcinoma invasivo) com base nas lâminas coradas com H&E para cada um dos 1100 casos. Foram também fornecidas aos patologistas as seguintes informações clínicas: idade da paciente, resultado do teste de Papanicolaou e resultado do teste de HPV (se disponível). Os casos discordantes foram avaliados por um terceiro XP. Os casos em que não se conseguiu uma maioria de diagnóstico de dois em três foram revistos durante uma reunião de análise de adjudicação onde participaram os três XP. Os resultados da maioria (ou consensuais) estabeleceram o diagnóstico de referência derivado de peritos para cada caso avaliado no estudo (denominado diagnóstico de referência XP1 ou H&E). Após um período mínimo de quatro semanas de washout, os mesmos XP avaliaram as lâminas coradas com H&E e coradas com CINtec p16 Histology, para estabelecer o seu diagnóstico: sem CIN; histologia de LSIL/CIN1; histologia de HSIL/CIN2; histologia de HSIL/CIN3; adenocarcinoma in situ ou carcinoma invasivo; (denominado diagnóstico de referência XP2 ou H&E + CINtec p16 Histology). O processo de estabelecimento dos diagnósticos por maioria foi o mesmo que foi utilizado para estabelecer o diagnóstico de referência apenas em lâminas coradas com H&E. Participaram no estudo setenta (70) CP certificados pela ordem, originários de todos os Estados Unidos da América. Na primeira ronda (Ronda 1, CP1), os 1100 casos corados com H&E foram divididos em quatro conjuntos de leitura de 275 casos com distribuições comparáveis de categorias de diagnóstico individual por diagnóstico de referência. Os 70 CP foram atribuídos a quatro grupos, constituídos por 17 ou 18 patologistas por grupo. Para cada caso, no âmbito do conjunto de leituras que lhes tinham sido atribuídas, foram fornecidas aos patologistas as seguintes informações clínicas: idade da paciente, resultado do teste de Papanicolaou e resultado do teste de HPV (se disponível). Os CP fizeram os seus diagnósticos independentemente na lâmina corada com H&E para cada um dos casos que lhes tinham sido atribuídos: sem CIN; CIN1; CIN2; CIN3; adenocarcinoma in situ ou carcinoma invasivo. Cada caso de estudo foi lido individualmente por 17 ou 18 patologistas da comunidade.

Na segunda ronda (Ronda 2, CP2), os CP leram as lâminas coradas com H&E juntamente com as lâminas emparelhadas correspondentes coradas com CINtec p16 Histology do mesmo conjunto de casos do conjunto de leituras que lhes tinham sido atribuídas. Depois de um período de washout de, pelo menos, 4 semanas entre as rondas 1 e 2, cada patologista apresentou os respetivos diagnósticos de forma independente: sem CIN; histologia LSIL/CIN1; histologia HSIL/CIN2; histologia HSIL/CIN3; adenocarcinoma in situ ou carcinoma invasivo. Os CP destacaram o estado de CINtec p16 Histology (CINtec p16 Histology positivo = coloração p16 difusa; CINtec p16 Histology negativo = coloração focal ou sem coloração de p16), juntamente com o respetivo diagnóstico histológico, utilizando tanto a lâmina corada com H&E como a lâmina corada com CINtec p16 Histology. O objetivo primário deste estudo foi demonstrar a melhoria da concordância de diagnóstico sem comprometer a percentagem de concordância positiva, ou seja, a probabilidade de um resultado de teste positivo coincidir com um diagnóstico \geq CIN2 (CIN2, CIN3, adenocarcinoma in situ ou carcinoma invasivo combinados numa única categoria) ou \leq CIN1 (sem CIN ou CIN1 combinados numa única categoria) com base em lâminas coradas com H&E (Ronda 1) em comparação com a interpretação das lâminas coradas com H&E juntamente com lâminas coradas com CINtec p16 Histology (Ronda 2).

Melhoria da exatidão do diagnóstico dos peritos patologistas

A melhoria na exatidão do diagnóstico dos peritos patologistas foi determinada comparando o diagnóstico de referência H&E do perito patologista (XP1) com o diagnóstico de referência H&E e CINtec p16 Histology do perito patologista (XP2). A análise foi efetuada com base na interpretação do total de 1100 biopsias de colo do útero. A melhoria da exatidão do diagnóstico entre o diagnóstico de referência H&E, feito por peritos patologistas, e o diagnóstico de referência H&E e CINtec p16 Histology, feito por peritos patologistas, é apresentada na Tabela 11. Ao utilizar H&E e CINtec p16 Histology

na interpretação do diagnóstico das biópsias de colo do útero, os XP identificaram mais 23.7% casos \geq CIN2 em comparação com a interpretação do diagnóstico feita utilizando apenas H&E.

Tabela 11. Concordância entre o diagnóstico de referência H&E e o diagnóstico de referência H&E e CINtec p16 Histology em todos os casos.

		Diagnóstico de referência H&E					Total
		Sem CIN	CIN1	CIN2	CIN3	ACIS* ou cancro	
Diagnóstico de referência H&E + CINtec p16 Histology	Sem CIN	693	13	4	0	0	710
	Histologia a LSIL	46	120	4	1	0	171
	Histologia a HSIL	30	31	83	69	1	214
	ACIS* ou cancro	0	0	0	0	5	5
Total		769	164	91	70	6	1100

*ACIS: adenocarcinoma in situ

Interpretação do patologista da comunidade utilizando H&E versus H&E e CINtec p16 Histology em comparação com um diagnóstico de referência H&E derivado de peritos

A concordância do diagnóstico entre patologistas da comunidade foi determinada comparando os resultados dos diagnósticos H&E da ronda 1 dos patologistas da comunidade (CP1) com o diagnóstico de referência H&E do perito patologista (XP1), e os resultados dos diagnósticos H&E + CINtec p16 Histology da ronda 2 dos patologistas da comunidade (CP2) com o diagnóstico de referência H&E do perito patologista (XP1). As médias das taxas de concordância e dos intervalos de confiança (CI) entre caso e leitor são apresentadas na Tabela 12. Foi observado um aumento estatisticamente significativo na PPA, a medida da detecção de lesões \geq CIN2 (+6.8% com CI de 95%: 4.7% a 9.0%). Adicionalmente, a percentagem de concordância negativa (NPA) da detecção de \leq CIN1 aumentou em 1.3% com um CI de 95%: 0.5% a 2.3%.

Tabela 12. Taxas de concordância positiva e negativa das leituras dos patologistas da comunidade em lâminas coradas com H&E versus lâminas coradas com H&E e lâminas coradas com CINtec p16 Histology com diagnóstico de referência H&E derivado de peritos (XP1).

Parâmetro de avaliação	H&E	H&E + CINtec p16 Histology	Diferença	Valor p
PPA % (CI de 95%)	83.5% (79.9, 86.8)	90.3% (87.5, 92.7)	6.8% (4.7, 9.0)	< .0001
NPA % (CI de 95%)	90.4% (89.4, 91.4)	91.8% (90.6, 92.9)	1.3% (0.5, 2.3)	0.0032

Nota: A diferença não é igual a 1.4% devido a erro de arredondamento: H&E = 90.44%, H&E + CINtec Histology = 91.76%, Diferença = 1.32%.

Um diagrama com o resumo da exatidão do diagnóstico dos leitores patologistas da comunidade individualmente em termos de diagnóstico \geq CIN2 versus \leq CIN1 utilizando lâminas coradas com H&E apenas versus lâminas coradas com H&E juntamente com lâminas coradas com CINtec p16 Histology em comparação com o diagnóstico de referência H&E derivado de peritos é apresentado na Figura 2. São apresentadas a PPA e a NPA (percentagem de concordância negativa, i.e. a concordância de um resultado de teste negativo com \leq CIN1 por XP1) da interpretação feita por cada patologista para a Ronda 1 (lâminas coradas com H&E apenas – círculos azuis) versus Ronda 2 (lâminas coradas com H&E juntamente com lâminas coradas com CINtec p16 Histology – triângulos vermelhos). As elipses de previsão indicam o intervalo de desempenho de PPA e NPA esperado para a maioria dos patologistas: 80% deve ficar dentro da elipse e 20% deve ficar fora da elipse. Estes dados demonstram que a interpretação das biópsias de colo do útero utilizando H&E juntamente com lâminas coradas com CINtec p16 Histology melhora a concordância de diagnóstico e reduz a variabilidade entre leitores.

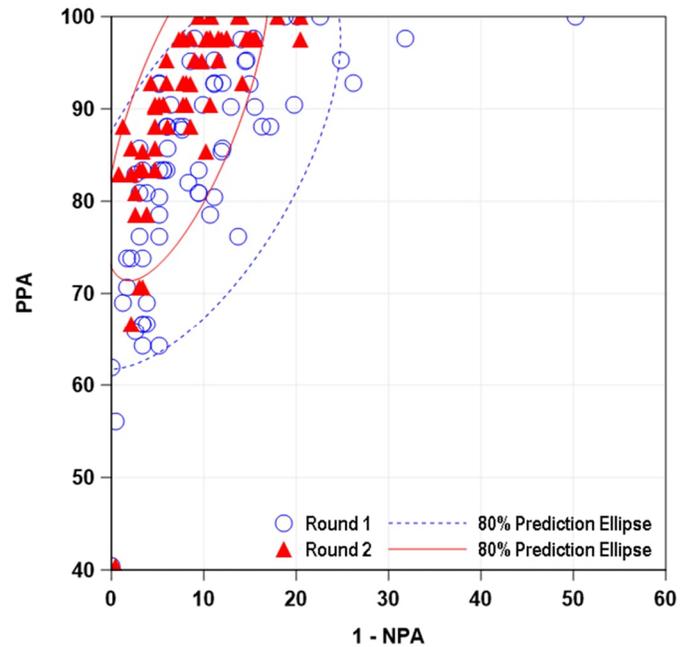


Figura 2. Diagrama resumo da concordância de diagnóstico (PPA versus 1-NPA) dos patologistas da comunidade, em termos de diagnóstico \geq CIN2 versus \leq CIN1, utilizando apenas H&E (Ronda 1) e H&E + CINtec p16 Histology (Ronda 2), em comparação com o diagnóstico de referência H&E derivado de peritos (XP1) (elipse de previsão de 80% gerada presumindo normalidade bivariada).

Interpretação do patologista da comunidade utilizando H&E versus H&E e CINtec p16 Histology em comparação com um diagnóstico de referência H&E + CINtec p16 Histology derivado de peritos

Em seguida, os resultados da leitura dos patologistas da comunidade utilizando ambos os métodos (H&E + CINtec p16 Histology versus H&E apenas) foram comparados com o diagnóstico de referência (XP2) estabelecido pelos peritos ginecopatologistas utilizando lâminas coradas com H&E e CINtec p16 Histology. Os resultados da primeira ronda de leitura individual e do diagnóstico de referência H&E de consenso foram ocultados dos respetivos peritos patologistas. O processo de estabelecimento dos diagnósticos consensuais foi o mesmo que foi utilizado para estabelecer o diagnóstico de referência H&E acima descrito.

Os resultados da leitura do patologista da comunidade utilizando lâminas coradas com H&E apenas versus lâminas coradas com H&E com lâminas coradas com CINtec p16 Histology foram analisados e comparados com o diagnóstico de referência H&E e CINtec p16 Histology derivado de peritos (Tabela 13). Estes dados demonstram um aumento estatisticamente significativo na PPA (+11.5% com CI de 95%: 9.3% a 13.5%) e na NPA (+3.0% com CI de 95%: 2.2% a 3.7%).

Tabela 13. Taxas de concordância positiva (PPA) e negativa (NPA) das leituras dos patologistas da comunidade em lâminas coradas com H&E versus lâminas coradas com H&E e lâminas coradas com CINtec p16 Histology com diagnóstico de referência H&E e CINtec p16 Histology derivado de peritos (XP2).

Parâmetro de avaliação	H&E	H&E + CINtec p16 Histology	Diferença	Valor p
PPA % (CI de 95%)	73.3% (69.6, 76.9)	84.8% (82.1, 87.1)	11.5% (9.3, 13.5)	< .0001
NPA % (CI de 95%)	92.2% (91.3, 93.1)	95.2% (94.4, 96.0)	3.0% (2.2, 3.7)	< .0001

Um diagrama com o resumo da exatidão do diagnóstico dos leitores patologistas da comunidade individualmente em termos de diagnóstico \geq CIN2 versus \leq CIN1 utilizando lâminas coradas com H&E apenas versus lâminas coradas com H&E juntamente com lâminas coradas com CINtec p16 Histology em comparação com o diagnóstico de referência H&E + CINtec p16 Histology derivado de peritos é apresentado na Figura 3. São apresentadas a PPA e a NPA da interpretação feita por cada patologista para a Ronda 1 (H&E apenas – círculos azuis) versus Ronda 2 (H&E e CINtec p16 Histology – triângulos vermelhos). As elipses de previsão indicam o intervalo de desempenho de PPA e NPA esperado para a maioria dos patologistas: 80% deve ficar dentro da elipse e 20% deve ficar fora da elipse. Estes dados demonstram que a interpretação das biopsias de colo do útero utilizando H&E juntamente com lâminas coradas com CINtec p16 Histology melhora a coerência de diagnóstico e reduz a variabilidade entre leitores.

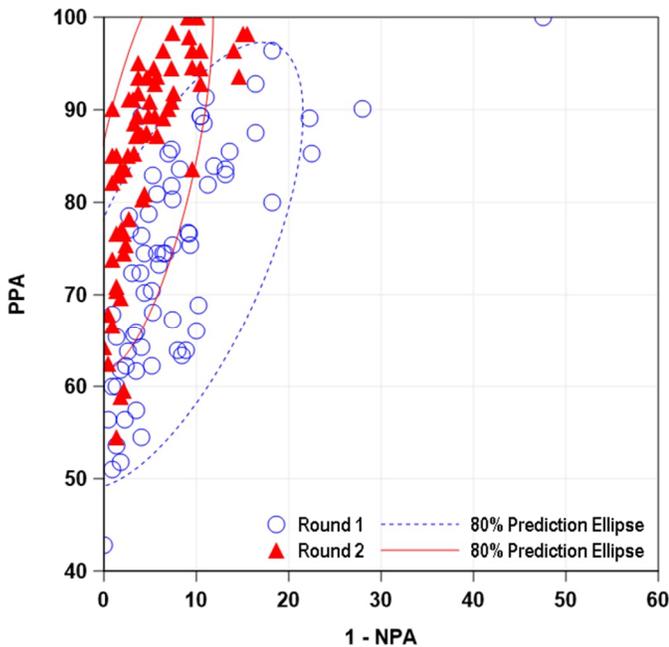


Figura 3. Diagrama resumo da concordância de diagnóstico (PPA versus 1 - NPA) dos patologistas da comunidade, em termos de diagnóstico \geq CIN2 versus \leq CIN1, utilizando apenas H&E (Ronda 1) e H&E e CINtec p16 Histology (Ronda 2), em comparação com o diagnóstico de referência H&E e CINtec p16 Histology derivado de peritos (XP2) (elipse de previsão de 80% gerada presumindo normalidade bivariada).

Desempenho da coloração com CINtec p16 Histology

O objetivo secundário deste estudo avaliou o desempenho da coloração do ensaio CINtec p16 Histology conforme determinado pelos patologistas da comunidade durante a análise das lâminas do estudo. Foram feitas ao todo 19250 interpretações do estado de CINtec p16 Histology durante o estudo pelos 70 patologistas da comunidade. Os critérios de desempenho da coloração avaliados foram: aceitabilidade da coloração global, aceitabilidade da coloração de fundo e aceitabilidade morfológica. Os resultados demonstram taxas de aceitabilidade >99% para todos os critérios de coloração (Tabela 14).

Tabela 14. Desempenho da coloração com CINtec p16 Histology.

Parâmetro de avaliação	Número de interpretações n/N	Taxa
Aceitabilidade da coloração	19074/19250	99.09%
Aceitabilidade morfológica	19249/19250	99.99%
Aceitabilidade da coloração de fundo	19249/19250	99.99%

Conclusões

A utilização de lâminas coradas com CINtec p16 Histology como adjuvante da interpretação de lâminas coradas com H&E aumenta a concordância de diagnóstico na detecção de lesões CIN de alto grau (\geq CIN2) em punções do colo do útero. Esta melhoria da concordância é impulsionada tanto por aumentos na PPA (a concordância de um resultado de teste positivo com o diagnóstico \geq CIN2) e NPA (a concordância de um resultado de teste negativo com o diagnóstico CIN1 ou Sem CIN). Além disso, a coerência dos diagnósticos entre os patologistas da comunidade entre si e com um painel de peritos melhora.

REFERÊNCIAS

- Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, et al. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol.* 1998;153:1741-1748.
- Negri G, Egarter-Vigl E, Kasal A, et al. p16INK4a 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;27:187-193.
- von Knebel Doeberitz M, Vinokurova S. Host factors in HPV-related carcinogenesis: cellular mechanisms controlling HPV infections. *Arch Med Res.* 2009;40(6):435-442.
- Voorhoeve PM, Agami R. The tumor-suppressive functions of the human INK4A locus. *Cancer Cell.* 2003;4:311-319.
- Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, et al. Overexpression of p16(INK4a) as a specific marker for dysplasia and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer.* 2001;92:276-284.
- Negri G, Vittadello F, Romano F, et al. p16INK4a expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Virchows Arch.* 2004;445:616-620.
- Wentzensen N, von Knebel Doeberitz M. Biomarkers in cervical cancer screening. *Dis Markers.* 2007;23(4):315-330.
- Cuschieri K, Wentzensen N. Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17:2536-2545.
- Tsompou I, Arbyn M, Kyrgiou M, et al. p16INK4a immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and metaanalysis. *Cancer Treat Rev.* 2009;35:210-220.
- Dijkstra MG, Heideman DA, de Roy SC, et al. p16(INK4a) immunostaining as an alternative to histology review for reliable grading of cervical intraepithelial lesions. *J Clin Pathol.* 2010;63(11):972-977.
- Bergeron C, Ordi J, Schmidt D, et al. European CINtec Histology Study Group. Conjunctive p16INK4a testing significantly increases accuracy in diagnosing highgrade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol.* 2010;133:395-406.
- Galgano MT, Castle PE, Atkins KA, et al. Using biomarkers as objective standards in the diagnosis of cervical biopsies. *Am J Surg Pathol.* 2010;34:1077-1087.
- Stoler MH, Wright TC, Ferenczy A, et al. Routine Use of Adjunctive p16 Immunohistochemistry Improves Diagnostic Agreement of Cervical Biopsy Interpretation. *Am J Surg Pathol.* 2018;42(8):1001-1009.
- Massad LS, Einstein M, Huh W, et al. 2012 Updated Consensus Guidelines for the management of abnormal cervical cancer screening tests and cancer precursors. *J Low Genit Tract Dis.* 2013;17:S1-S27.
- Arbyn M, Kyrgiou M, Simoons C, et al. Perinatal mortality and other severe adverse pregnancy outcomes associated with treatment of cervical intraepithelial neoplasia: metaanalysis. *BMJ.* 2008;337:a1284.
- Albrechtsen S, Rasmussen S, Thoresen S, et al. Pregnancy outcome in women before and after cervical conisation: population based cohort study. *BMJ.* 2008;337:a1343.
- Sadler L, Saftlas A, Wang W, et al. Treatment for cervical intraepithelial neoplasia and risk of preterm delivery. *JAMA.* 2004;291:2100-2106.
- Park KJ, Soslow RA. Current concepts in cervical pathology. *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133(5):729-738.
- Stoler MH, Schiffman M. Atypical squamous cells of undetermined significance-lowgrade squamous intraepithelial lesion triage study (ALTS) group. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL triage study. *JAMA.* 2001;285:1500-1505.

20. Stoler MH, Ronnett BM, Joste NE, et al. New Mexico HPV Pap registry steering committee. The interpretive variability of cervical biopsies and its relationship to HPV status. *Am J Surg Pathol.* 2015;39(6):729-736.
21. Klaes R, Benner A, Friedrich T, et al. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2002;26:1389-1399.
22. Reuschenbach M, Wentzensen N, Dijkstra MG, et al. p16INK4a immunohistochemistry in cervical biopsy specimens: A systematic review and metaanalysis of the interobserver agreement. *Am J Clin Pathol.* 2014;142(6):767-772.
23. De Vet HCW, Knipschild PG, Schouten HJA, et al. Interobserver variation in histopathological grading of cervical dysplasia. *J Clin Epidemiol.* 1990;43:1395-1398.
24. Creagh T, Bridger JE, Kupek E, et al. Pathologist variation in reporting cervical borderline epithelial abnormalities and cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Pathol.* 1995. 48(1): p. 59-60.
25. Ceballos KM, Chapman W, Daya D, et al. Reproducibility of the histological diagnosis of cervical dysplasia among pathologists from 4 continents. *Int J Gynecol Pathol.* 2008. 27(1): p. 101-107.
26. Gurrola-Díaz CM, Suárez-Rincón AE, Vázquez-Camacho G, et al. p16INK4a immunohistochemistry improves the reproducibility of the histological diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia in cone biopsies. *Gynecol Oncol.* 2008;111:120-124.
27. Horn LC, Reichert A, Oster A, Arndal SF, et al. Immunostaining for p16INK4a used as a conjunctive tool improves interobserver agreement of the histologic diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2008;32:502-512.
28. Sayed K, Korourian S, Ellison DA, et al. Diagnosing cervical biopsies in adolescents: the use of p16 immunohistochemistry to improve reliability and reproducibility. *J Low Genit Tract Dis.* 2007;11:141-146.
29. Carson FL, Cappellano C. *Histotechnology: A Self-Instructional Text*, 5th edition. American Society for Clinical Pathology Press; 2020, 2022.
30. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
31. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 24 June 2020 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
32. Roche PC, Hsi ED. Immunohistochemistry-Principles and Advances. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 6th edition. In: NR Rose, ed. ASM Press; 2002.

NOTA: Neste documento, é sempre utilizado o ponto como separador decimal para marcar o limite entre a parte inteira e as partes fracionais de um número decimal. Não são utilizados separadores de milhares.

O resumo sobre segurança e desempenho está disponível aqui:

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

Símbolos

Ventana utiliza os seguintes símbolos e sinais, além dos listados na norma ISO 15223-1 (para os USA: consultar elabdoc.roche.com/symbols para mais informações):

GTIN Número Global de Item Comercial

Rx only Para os USA: Advertência: A Lei Federal dos EUA restringe a venda deste dispositivo a um médico ou mediante receita médica.

HISTÓRICO DE REVISÕES

Rev	Atualizações
H	Foram feitas atualizações nas secções Avisos e precauções, e foi adicionada a declaração Rx only; foi feita a atualização para o modelo atual.

PROPRIEDADE INTELECTUAL

VENTANA, BENCHMARK, CINTEC, OPTIVIEW e ULTRAVIEW são marcas comerciais de Roche. Todas as restantes marcas comerciais são propriedade dos respetivos titulares

© 2024 Ventana Medical Systems, Inc.

For USA: Rx only

INFORMAÇÕES DE CONTACTO



Ventana Medical Systems, Inc.
1910 E. Innovation Park Drive
Tucson, AZ 85755
USA
+1 520 887 2155
+1 800 227 2155 (USA)

www.roche.com



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim
Germany
+800 5505 6606

