

## Gebrauchsanweisung

# CINtec<sup>®</sup> Histology Kit

Das CINtec<sup>®</sup> Histology Kit ist ein immunhistochemischer Assay für die qualitative Bestimmung des p16<sup>INK4a</sup>-Antigens in histologischen Schnitten Formalin-fixierter, Paraffin-eingebetteter zervikaler Biopsien. Es ist vorgesehen für die Verwendung in Verbindung mit H&E-gefärbten Schnitten desselben zervikalen Gewebepräparates zur Erhöhung der diagnostischen Genauigkeit und der Übereinstimmung zwischen einzelnen Untersuchern bei der Diagnose von hochgradigen zervikalen intraepithelialen Neoplasien.



Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Strasse 116  
68305 Mannheim  
Germany

<https://navifyportal.roche.com>

**REF** 10213370001

**GTIN** 07613336230350

 50

 2 – 8 °C



**CE**  
0123

**IVD**



## Inhalt

DEUTSCH.....	2
I. Produktname .....	2
II. Verwendungszweck.....	2
III. Zusammenfassung und Erklärung des Tests.....	2
Zusammenfassung und Erklärung.....	2
Klinische Signifikanz .....	3
Verfahrensprinzip.....	4
IV. Reagenzien .....	4
Mitgelieferte Materialien .....	4
Aufbewahrung.....	6
Benötigte, aber nicht mitgelieferte Materialien und Reagenzien .....	7
Benötigte Apparate .....	7
V. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen.....	8
Warnung .....	8
Achtung.....	8
VI. Verfahren.....	9
Vorbereitung der Probe.....	9
Paraffinschnitte .....	9
Epitopdemaskierung durch Wärmebehandlung.....	10
Färbeverfahren .....	10
1. Reagenzvorbereitung.....	10
1.1 Demaskierungslösung .....	10
1.2 Waschpuffer .....	10
1.3 Substrat-Chromogenlösung (DAB) .....	11
1.4 Gegenfärbung.....	11
1.5 Eindecken.....	11
2. Färbeverfahren für Autostainer-Geräte .....	11
2.1 Entparaffinierung und Rehydrierung .....	11
2.2 Färbeprotokoll für Autostainer-Geräte.....	12
3. Manuelles Färbeverfahren .....	14
3.1 Entparaffinierung und Rehydrierung .....	14
3.2 Färbeprotokoll für manuelles Verfahren.....	15
VII. Qualitätskontrolle.....	17
VIII. Auswertung der Ergebnisse .....	18
IX. Beschränkungen.....	18
X. Leistungsmerkmale .....	19
XI. Fehlersuche und –behebung .....	25
XII. Erklärung der Symbole .....	27
XIII. Hersteller .....	27
XIV. Revisionsstand.....	27
XV. Geistiges Eigentum .....	28
Anhang 1 Literatur .....	29
Anhang 2 Abbildungen.....	32

# DEUTSCH

## I. Produktname

CINtec® Histology Kit

## II. Verwendungszweck

Zum in-vitro diagnostischen Gebrauch

Das CINtec® Histology Kit ist ein immunhistochemischer Assay für die qualitative Bestimmung des p16<sup>INK4a</sup>-Antigens in histologischen Schnitten Formalin-fixierter, Paraffin-eingebetteter zervikaler Biopsien.

Es ist vorgesehen für die Verwendung in Verbindung mit H&E-gefärbten Schnitten desselben zervikalen Gewebepreparates zur Erhöhung der diagnostischen Genauigkeit und der Übereinstimmung zwischen einzelnen Untersuchern bei der Diagnose von hochgradigen zervikalen intraepithelialen Neoplasien.

Der Test ist für manuelle Anwendung oder Anwendung mit Autostainern vorgesehen.

Dieser Test sollte durch einen qualifizierten Pathologen zusammen mit histologischer Untersuchung, relevanter klinischer Information und angemessenen Kontrollen beurteilt werden.

## III. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

### Zusammenfassung und Erklärung

Das CINtec® Histology Kit basiert auf einem monoklonalen Maus-Antikörper (Klon E6H4®), welcher gegen das humane p16<sup>INK4a</sup>-Protein gerichtet ist.

Das p16<sup>INK4a</sup>-Protein ist ein zyklinabhängiger Kinaseinhibitor, welcher eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Zellzyklus eukaryotischer Zellen spielt. Es ist ein Bestandteil der durch das Retinoblastomprotein (pRB) vermittelten Steuerung der G<sub>1</sub>-S-Transition und löst im Lauf der Zelldifferenzierungsprozesse einen Zellzyklusarrest aus. In vollständig ausdifferenzierten Epithelzellen ist die p16<sup>INK4a</sup>-Expression so weit herunterreguliert, dass sie in der Regel immunhistochemisch nicht nachweisbar ist.

In vielen Tumoren ist das Tumorsuppressor-Gen p16<sup>INK4a</sup> durch Genmutation oder Promotor-Hypermethylierung funktionell inaktiviert. Es hat sich gezeigt, dass diese Inaktivierung des Tumorsuppressor-Gens p16<sup>INK4a</sup> zu einer Zellzyklus-Dysregulation und zum Verlust der Zellproliferationskontrolle beiträgt.

In replikationskompetenten Zervixepithelzellen jedoch, in denen Onkoproteine des humanen Papillomavirus vom „high-risk“-Typ (HR-HPV) den Prozess der Zelltransformation eingeleitet haben, zeigte sich eine starke Hochregulierung und somit eine starke Überexpression des p16<sup>INK4a</sup>-Proteins [1; 2]. Diese starke p16<sup>INK4a</sup>-Überexpression konnte auf molekularer Ebene direkt mit der Aktivität des E7-Onkoproteins der HR-HPV-Typen in Verbindung gebracht werden. Es hat sich gezeigt, dass die Inaktivierung des funktionellen Komplexes aus pRB und dem

Transkriptionsfaktor E2F durch das E7-Onkoprotein als einer der wesentlichen Mechanismen der HR-HPV-induzierten zellulären Transformation die p16<sup>INK4a</sup>-Überexpression bedingt [3].

Es gibt zahlreiche veröffentlichte Studien, in denen aufgezeigt wird, dass die Überexpression des p16<sup>INK4a</sup>-Proteins immunhistochemisch in einer sehr hohen Anzahl von Fällen hochgradiger präkanzeröser zervikaler Dysplasien (d. h. in 80 – 100% der CIN2-Läsionen und in nahezu allen CIN3-Läsionen) und invasiven Karzinomen nachgewiesen wurde. Bei niedriggradigen zervikalen intraepithelialen Läsionen (CIN1) wurde die p16<sup>INK4a</sup>-Überexpression in ungefähr 30 – 60% der Fälle nachgewiesen [1; 2; 4-16].

Bei der Auswertung der Ergebnisse muss die Tatsache in Betracht gezogen werden, dass p16<sup>INK4a</sup> ein zelluläres Protein ist, welches in hochgradig dysplastischen Läsionen und Karzinomen der Cervix uteri sowie in manchen Zuständen, die nicht mit zervikaler Dysplasie in Verbindung stehen, nachweisbar exprimiert werden kann, obgleich in unterschiedlichen Konzentrationen und mit verschiedenen Expressionsmustern. In histologischen Gewebepreparaten zervikaler Läsionen ist für die Auswertung der p16<sup>INK4a</sup>-Positivität die Bewertung der Färbung im Zusammenhang mit der Bewertung der Gewebearchitektur nötig. Ein diffuses Färbemuster, d. h. eine kontinuierliche Färbung der Zellen der basalen und parabasalen Zellschichten, mit oder ohne Färbung der Zellen der oberen Zellschichten, deutet auf ein positives Testergebnis für die p16<sup>INK4a</sup>-Überexpression hin. Bei diesem Färbemuster zeigt sich ein sehr hoher Grad sowohl an Sensitivität als auch an Spezifität in hochgradigen CIN-Läsionen [1; 4; 5]. Im Gegensatz hierzu wird ein fokales Färbemuster (Färbung isolierter Zellen oder kleiner Zell-Cluster, d. h. keine kontinuierliche Färbung, insbesondere nicht der basalen und parabasalen Zellen) sowie das Ausbleiben jeglicher Immunreaktivität, als negatives Testergebnis für die p16<sup>INK4a</sup>-Überexpression angesehen [1; 4; 5].

Die Auswertung von Schnitten, die mit dem CINtec<sup>®</sup> Histology Kit zum Nachweis der Überexpression von p16<sup>INK4a</sup> gefärbt wurden, sollte in Verbindung mit H&E-gefärbten Schnitten desselben zervikalen Gewebepreparates durchgeführt werden. Die zusätzliche Information, die durch die CINtec<sup>®</sup>-gefärbten Schnitte zur Verfügung gestellt wird, sollte mit der parallel durchgeführten Morphologie-basierten Diagnose der H&E-gefärbten Schnitte kombiniert werden, um eine endgültige Diagnose zu erstellen.

### **Klinische Signifikanz**

Die gemeinsame Auswertung H&E-gefärbter Schnitte zusammen mit CINtec<sup>®</sup>-gefärbten Parallelschnitten desselben zervikalen Gewebepreparates hat eine Verbesserung der diagnostischen Genauigkeit und eine Erhöhung der Inter-Observer-Übereinstimmung in der Diagnose hochgradiger zervikaler intraepithelialer Neoplasien (CIN2+) gezeigt.

Die pathologische Diagnose anhand der H&E-gefärbten zervikalen Gewebeschnitte bildet die Entscheidungsbasis für weitere Behandlungen. Aus diesem Grund können die Auswirkungen einer nicht-akkuraten Diagnose erheblich sein. Eine ungenaue Diagnose kann zu einer nicht-angemessenen Behandlung der Patientin führen, d.h. einer Überbehandlung von Frauen, die keine hochgradig dysplastische Läsion der Zervix aufweisen, oder das fälschliche Unterlassen der Behandlung von Frauen mit hochgradig dysplastischen Läsionen.

Die diagnostische Auswertung von H&E-gefärbten Gewebeschnitten unterliegt einem relativ hohen Maß an Variabilität zwischen den Pathologen, wie speziell

auch für die Beurteilung von Zervixhistologien in verschiedenen Veröffentlichungen berichtet worden ist [17-20].

Bei einer großen multizentrischen Studie in den Vereinigten Staaten wurden histologische zervikale Proben durch mehrere erfahrene Pathologen untersucht (2237 kolposkopische Knippsbiopsien und 535 LEEP-Konisationspräparate). Die Reproduzierbarkeit der histopathologischen Auswertungen war nur durchschnittlich (Kappa=0,46 bei Punch-Biopsien, und 0,49 bei LEEP-Biopsieproben) [17]. In einer anderen Studie wurde eine schlechte Übereinstimmung zwischen sechs Histopathologen berichtet, die 125 kolposkopische Biopsieproben untersuchten, sowohl bei Benutzung der WHO-Klassifikation, als auch bei Benutzung eines für die Histologie modifizierten Bethesda-Systems [18]. In ähnlicher Weise zeigte eine in Grossbritannien durchgeführte Studie eine niedrige Übereinstimmung zwischen acht histopathologischen Experten, welche 100 kolposkopische Biopsieproben untersuchten (ungewichteter Kappa-Wert von 0,358) [19].

Die Verwendung von Schnitten, die mit dem CINtec® Histology Kit gefärbt wurden, zusätzlich zu der Betrachtung der konventionell H&E-gefärbten Schnitten verbessert insgesamt die Genauigkeit dieses histomorphologischen, diagnostischen Verfahrens [21-39].

## **Verfahrensprinzip**

Das CINtec® Histology Kit enthält einen Satz von Reagenzien für den Nachweis des p16<sup>INK4a</sup> Antigens. Mit dem Kit kann man ein immunhistochemisches Zweischnitt-Färbeverfahren an Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Gewebeproben aus Zervixbiopsien durchführen. Zum Nachweis des Antigens wird ein primärer monoklonaler Maus-Antikörper (E6H4®) gegen das humane p16<sup>INK4a</sup> Protein verwendet.

Es wird ein gebrauchsfertiges Visualisierungsreagenz auf der Basis eines Polymer-Reagenzes mit konjugierter Meerrettichperoxidase und Ziege-Anti-Maus-Antikörperfragmenten verwendet. Die Möglichkeit einer Kreuzreaktivität des Visualisierungsreagenz mit humanen Immunglobulinen wurde durch Festphasen-Absorption ausgeschlossen. Die Chromogen-Reaktion basiert auf der Meerrettich-Peroxidase-vermittelten Umwandlung eines DAB-Chromogens an denjenigen Stellen, an denen sich das Antigen befindet. Nach Gegenfärbung kann die Probe mit einem Deckgläschen eingedeckt und das Ergebnis lichtmikroskopisch ausgewertet werden.

## **IV. Reagenzien**

### **Mitgelieferte Materialien**

Jedes Kit enthält die nachstehend aufgeführten Materialien, die für 50 Tests und 50 Negativkontrollreaktionen ausreichen. Die Kalkulation der Anzahl der Tests beruht auf der Verwendung von 200 µl der Reagenzien pro Objektträger.

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

##### **Peroxidase-Blockierungsreagenz**

2 x 11,5 mL, gebrauchsfertig

3 % Wasserstoffperoxid, enthält 15 mmol/l Natriumazid (NaN<sub>3</sub>).

EUH210: Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.

## 2 Mouse anti-Human p16<sup>INK4a</sup> Antibody

### **Maus Anti-Human p16<sup>INK4a</sup> Antikörper**

11,5 mL, gebrauchsfertig

Monoklonaler Maus-Antikörper (~1 µg/ml), Klon E6H4™, gegen das Humanprotein p16<sup>INK4a</sup> geliefert in 50 mmol/L Tris-Puffer, pH 7,2, enthält 15 mmol/l Natriumazid (NaN<sub>3</sub>) und eine stabilisierende Proteinkomponente.

## 3 Visualization Reagent

### **Visualisierungsreagenz**

2 x 11,5 mL, gebrauchsfertig



Achtung

H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.

P261 Einatmen von Staub/ Rauch/ Gas/ Nebel/ Dampf/Aerosol vermeiden.

P272 Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.

P280 Schutzhandschuhe tragen.

P333 + P313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P362 + P364 Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

P501 Inhalt/ Behälter einer anerkannten Abfallentsorgungsanlage zuführen.

Enthält

26172-54-3 2-Methyl-2H-isothiazol-3-onhydrochlorid

55965-84-9 Reaktionsmasse aus: 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on [EG-Nr. 247-500-7] und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on [EG-Nr. 220-239-6] (3:1)

Polymer-Reagenz konjugiert mit Meerrettichperoxidase und affinitätsgereinigten Ziege-Anti-Maus-Antikörperfragmenten, geliefert in Stabilisatorlösung mit Konservierungsmittel und stabilisierender Proteinkomponente.

## 4 Negative Reagent Control

### **Negative Reagenzienkontrolle**

11,5 mL, gebrauchsfertig

Monoklonaler Maus-Anti-Ratte, Oxytocin-verwandtes Neurophysin Antikörper (~1 µg/ml), geliefert in 50 mmol/L Tris-Puffer, pH 7,2; enthält 15 mmol/l Natriumazid (NaN<sub>3</sub>) und Stabilisatorprotein. Zur Überprüfung der Spezifität der Färbung. Das Oxytocin-verwandte Neurophysin von Ratten kommt im menschlichen Gewebe nicht vor.

## 5 DAB Buffered Substrate

### DAB Substratlösung, gepuffert

31 mL

Substratpufferlösung, pH 7,5, enthält < 0,1 % Wasserstoffperoxid, Stabilisatoren und Beschleuniger.

## 6 DAB Chromogen

### DAB Chromogen

0,85 mL, 3,3'-Diaminobenzidin-Chromogenlösung.



Gefahr

H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

H341 Kann vermutlich genetische Defekte verursachen.

H350 Kann Krebs erzeugen.

P201 Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.

P280 Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.

P303 + P361 + P353 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen.

P304 + P340 + P310 BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen. Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen.

P305 + P351 + P338 + P310 BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen.

P308 + P313 BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Enthält 868272-85-9 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate

**HINWEIS:** Entsprechend kommunalen, landesrechtlichen oder bundesrechtlichen Vorschriften entsorgen.

## 7 Epitope Retrieval Solution 10X

### Demaskierungslösung 10X

500 mL, 100 mmol/L Tris-Puffer pH 9, enthält 10 mmol/L EDTA und 15 mmol/L Natriumazid (NaN<sub>3</sub>).

## Aufbewahrung

Bei 2 – 8 °C aufbewahren. Nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden. Für Abweichungen von den vorstehenden Aufbewahrungsbedingungen für die Reagenzien liegen keine Erfahrungswerte vor.

Nach Öffnen des Kits ist der Inhalt bei 2 – 8°C 6 Monate lang stabil. Bei Auftreten von Trübungen dürfen die Lösungen nicht mehr verwendet werden.

Der verdünnte Wash Buffer (Waschpuffer) und die verdünnte Demaskierungslösung sind bei 2 – 8°C bis zu einem Monat lang stabil. Bei Auftreten von Trübungen dürfen die Lösungen nicht mehr verwendet werden.

### **Benötigte, aber nicht mitgelieferte Materialien und Reagenzien**

**CINtec® Wash Buffer 10X** (Waschpuffer) zur Verwendung mit dem CINtec® Histology Kit kann unter der Bestellnummer 10215364001 von Roche bezogen werden, ist jedoch im Kit nicht enthalten. Für Informationen zu Bestellungen besuchen Sie bitte unsere Website [www.roche.com](http://www.roche.com).

500 mmol/L Tris Pufferlösung mit 1.5 mol/L NaCl, pH 7.6, enthält Detergenz und Konservierungsmittel.



Achtung

H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.

P261 Einatmen von Staub/ Rauch/ Gas/ Nebel/ Dampf/Aerosol vermeiden.

P272 Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.

P280 Schutzhandschuhe tragen.

P333 + P313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P362 + P364 Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

P501 Inhalt/ Behälter einer anerkannten Abfallentsorgungsanlage zuführen.

Enthält 55965-84-9 Reaktionsmasse aus: 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on [EG-Nr. 247-500-7] und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on [EG-Nr. 220-239-6] (3:1)

Absorbierende Tücher;

Hämatoxylin;

Destilliertes oder entionisiertes Wasser (Waschflüssigkeit);

Ethanol, 95 % und 70 %;

Fixiermittel;

Positive und negative Kontrollgewebe zur Verfahrenskontrolle;

Objekträger (SuperFrost® Plus oder gleichwertig);

Xylol;

Deckgläser;

### **Benötigte Apparate**

Optional: Trockenschrank, geeignet zur Aufrechterhaltung einer Temperatur von bis zu 60°C;

Optional: Dako oder LabVision Autostainer;

Feuchtigkeitskammer (optional);

Lichtmikroskop (4fache bis 40fache Vergrößerung);

Färbeschalen oder –bäder;

Waschflaschen;

Zeitmesser (muss Intervalle von 2 – 60 Minuten anzeigen können);

Wasserbad mit Deckel (muss die Temperatur der Demaskierungslösung bei 95 - 99°C halten können).

## V. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

### **Warnung**

1. Achtung! Einige Komponenten dieses Kits enthalten Gefahrstoffe. Beachten Sie beim Umgang mit den Komponenten des Kits die Sicherheitsvorschriften für den Umgang mit Gefahrstoffen.
2. Die Komponenten 1, 2, 4 und 7 dieses Produkts enthalten Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ), eine in reiner Form hochtoxische Substanz. Bei den in diesem Produkt vorliegenden Konzentrationen kann Natriumazid, obwohl nicht als gefährlich klassifiziert, mit in Wasserleitungen vorhandenem Blei und Kupfer reagieren und zur Bildung von hochexplosiven Metallazid-Anreicherungen führen. Bei der Entsorgung deshalb mit reichlich Wasser nachspülen, um Azidanreicherungen in Rohrleitungen zu verhindern.
3. Die Komponenten 2, 3 und 4 enthalten Material tierischen Ursprungs. Wie bei allen aus biologischen Materialien gewonnen Produkten müssen die ordnungsgemäßen Handhabungsverfahren eingehalten werden.
4. Auf Anfrage ist ein Sicherheitsdatenblatt für das Kit erhältlich.
5. Sowohl vor als auch nach der Fixierung sind beim Umgang mit histologischen Proben und allen Materialien, die damit in Berührung gekommen sind, die Vorsichtsmaßnahmen für die Handhabung potentiell infektiösen Materials und die einschlägigen Vorschriften für deren Entsorgung einzuhalten.
6. Die Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Haut- und Schleimhautkontakt mit den Reagenzien und Proben vermeiden. Haut- oder Schleimhaut nach Kontakt mit Reagenzien mit reichlich Wasser spülen.
7. Starke Lichteinwirkung kann das Visualisierungsreagenz und das DAB-Chromogen schädigen. Kit-Komponenten nicht bei starker Lichteinwirkung lagern und keine Färbungen bei hellem Licht, wie z.B. direktem Sonnenlicht, vornehmen.
8. Geeignete Schutzkleidung tragen, um beim Umgang mit den im CINtec® Histology Kit enthaltenen oder in Verbindung mit diesem zu verwendenden Komponenten Augen- und Hautkontakt zu vermeiden. Weitere Informationen bitte dem Sicherheitsdatenblatt entnehmen.
9. Die Produktsicherheitskennzeichnung folgt primär den EU GHS Vorgaben.

### **Achtung**

1. Zum in-vitro diagnostischen Gebrauch.

2. Nur zur Anwendung durch Fachpersonal.
3. Die mikrobielle Kontamination der Reagenzien muss so gering wie möglich gehalten werden, um unspezifische Färbungen zu vermeiden.
4. Inkubationszeiten, Temperaturen oder Methoden, die hier nicht ausdrücklich beschrieben sind, können die Ergebnisse beeinträchtigen.
5. Nicht verwenden, falls die Verpackung von Komponenten des Kits beschädigt ist. Falls die Verpackung nicht in Ordnung ist oder Komponenten beschädigt sind, bitte den Hersteller unverzüglich informieren.
6. Sämtliche Abfälle sind gemäß den örtlichen Richtlinien und Vorschriften zu entsorgen.
7. Alle Reagenzien wurden speziell für den Gebrauch in diesem Test entwickelt. Damit der Test wie beschrieben funktioniert, sollten die Komponenten nicht ausgewechselt werden.
8. Falls es zu einer unerwarteten Färbung kommt, die sich nicht durch abweichende Laborverfahren erklären lässt, sondern auf ein Problem mit dem CINtec® Histology Kit hindeutet, kontaktieren Sie bitte unverzüglich den technischen Kundendienst (Kontaktinformation siehe Abschnitt XIII.).
9. Da Anzeichen für Fehlfunktionen aufgrund unsachgemäßer Handhabung oder Instabilität des Produkts nicht offensichtlich zu Tage treten, sollten Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit der Untersuchung der Patientenproben durchgeführt werden.
10. Um Verdachtsfälle schwerwiegender Vorkommnisse in Verbindung mit diesem Produkt zu melden, kontaktieren Sie Ihren lokalen Roche-Ansprechpartner und die zuständigen Behörden des Mitgliedstaats oder Landes des Nutzers.

## **VI. Verfahren**

### **Vorbereitung der Probe**

Das CINtec® Histology Kit ist zur Durchführung von immunhistochemischen Verfahren an Gewebeschnitten bestimmt. Histologische Proben sollten gemäß den Standardverfahren zur Gewebeaufbereitung behandelt werden.

Positiv geladene Objektträger, wie SuperFrost® Plus, werden empfohlen, um die optimale Funktionsweise zu gewährleisten.

### **Paraffinschnitte**

Das Kit ist für die Färbung von mit neutral-gepuffertem Formalin fixierten, in Paraffin eingebetteten, gemäß Routine-Standardmethoden verarbeiteten Gewebeproben ausgelegt. Bei Verwendung von anders aufbereiteten Proben muss der Anwender die Eignung des jeweils angewendeten Aufbereitungsverfahrens überprüfen.

Biopsieproben sollten in neutral-gepuffertem Formalin (10 % empfohlen) 18 – 24 Stunden lang fixiert werden und in Blöcke von 3 oder 4 mm gebracht werden. Die Gewebelöcke werden dann in einer Reihe von Alkoholen und Xylol dehydriert und anschließend bei höchstens 60°C mit geschmolzenem Paraffin infiltriert. Aus dem Paraffin-eingebetteten Blockmaterial werden in einem Histopathologie-Labor 4 – 5 µm dicke Schnitte hergestellt und auf SuperFrost® Plus-Objektträger aufgebracht. Die Objektträger sollten sofort gefärbt werden, da die Antigenizität

geschnittener Gewebepräparate im Laufe der Zeit abnehmen kann.

## **Epitopdemaskierung durch Wärmebehandlung**

Zur Demaskierung werden die auf Objektträgern fixierten Gewebeschnitte in einem kalibrierten Wasserbad, das die Demaskierungslösung in einem Temperaturbereich von 95 – 99°C halten kann, in die Demaskierungslösung eingetaucht. Höher gelegene Labors sollten das beste Verfahren zur kontinuierlichen Gewährleistung der erforderlichen Temperatur des Wasserbads selbst ermitteln. Der Hersteller empfiehlt die strikte Einhaltung des hier beschriebenen Verfahrens.

Nach der hitzeinduzierten Epitopdemaskierung müssen die Gewebeschnitte 20 Minuten bei Zimmertemperatur abgekühlt werden, bevor sie weiter verarbeitet werden. Danach sind die Gewebeschnitte unverzüglich zu färben.

## **Färbeverfahren**

### **1. Reagenzvorbereitung**

Alle Reagenzien sollten vor der Immunfärbung auf Umgebungstemperatur (20 – 25°C) gebracht werden. Dementsprechend sollten auch alle weiteren Schritte bei Umgebungstemperatur erfolgen.

Wichtig ist, dass die Proben während der gesamten Immunfärbeprozedur nicht austrocknen, da ansonsten vermehrt unspezifische Färbung auftreten können.

Es wird empfohlen, folgende Reagenzien vor Beginn des Färbeverfahrens anzusetzen:

#### **1.1 Demaskierungslösung**

Für das geplante Färbeverfahren eine ausreichende Menge des Inhalts von Fläschchen 7 (Epitope Retrieval Solution 10X – Demaskierungslösung) mit destilliertem oder entionisiertem Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnen.

Unverbrauchte verdünnte Demaskierungslösung kann bei 2 – 8 °C einen Monat lang aufbewahrt werden. Bei Auftreten von Trübungen darf die verdünnte Lösung nicht mehr verwendet werden.

**HINWEIS:** Der Einsatz von Wasser mit einem hohen Ionengehalt zur Verdünnung der Demaskierungslösung kann die Färbungsleistung des Tests wesentlich vermindern. Stellen Sie sicher, dass das verwendete Wasser entionisiert ist (d.h. dass die Ionenaustauschsäule zur Gewinnung von entionisiertem Wasser ordnungsgemäß gewartet wurde). Kein Leitungswasser verwenden!

#### **1.2 Waschpuffer**

CINtec® Wash Buffer 10X – Waschpuffer, Bestellnummer 10215364001 von Roche in Verbindung mit dem CINtec® Histology Kit verwenden. Für Informationen zu Bestellungen besuchen Sie bitte unsere Website [www.roche.com](http://www.roche.com).

Eine für die Waschvorgänge des Färbeverfahrens ausreichende Menge an Wash Buffer 10X mit destilliertem oder entionisiertem Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnen.

Unverbrauchter verdünnter Waschpuffer kann bei 2 – 8 °C bis zu einem Monat lang aufbewahrt werden. Bei Auftreten von Trübungen darf der verdünnte Puffer nicht mehr verwendet werden.

### 1.3 Substrat-Chromogenlösung (DAB)

Zur Zubereitung der Substrat-Chromogenlösung wird pro 2 mL der DAB Substratlösung ein Tropfen DAB Chromogen zugegeben. Verfahren Sie wie folgt:

Schritt 1: 2 mL DAB Substratlösung aus Fläschchen 5 in ein Reagenziengefäß geben;

Schritt 2: Einen Tropfen (25 – 30 µl) DAB Chromogen aus Fläschchen 6 zugeben. Mischen und mit einer Pipette auf Gewebeschnitte aufbringen;

2 mL der wie vorstehend beschrieben angesetzten Substrat-Chromogenlösung (DAB) reichen gewöhnlich, um fünf Gewebeproben inklusive der zugehörigen fünf Kontrollreaktionen zu färben.

**HINWEIS:** Die angesetzte Substrat-Chromogenlösung (DAB) ist innerhalb eines Tages zu verwenden.

**HINWEIS:** Die Zugabe einer zu grossen Menge an DAB Chromogen zur DAB-Substratlösung führt zur Abschwächung des positiven Signals.

### 1.4 Gegenfärbung

Das gefärbte Endprodukt der DAB-Färbungsreaktion ist sowohl in Wasser als auch in Alkohol unlöslich. Zur Gegenfärbung kann Hämatoxylin auf Alkohol- oder wässriger Basis verwendet werden. Bei der Anwendung von Hämatoxylin für die Gegenfärbung sind die Anweisungen des Hämatoxylin-Herstellers zu beachten.

### 1.5 Eindecken

Empfohlen wird ein nicht-wässriges Medium zum permanenten Eindecken. Es kann aber auch wässrig eingedeckt werden.

Zum Eindecken mit einem nicht-wässrigen Medium wird Eukitt Mounting Medium empfohlen. Zum Eindecken mit einem wässrigen Medium wird Aquatex Merck empfohlen.

## 2. Färbeverfahren für Autostainer-Geräte

Das CINtec® Histology Kit wurde für die Verwendung mit Autostainer-Geräten gemäß nachstehendem Ablaufschema optimiert (dem Autostainer 480 von Lab Vision oder dem Autostainer Plus von Dako). Verwendung anderer Geräte oder Systeme kann nach angemessener Validierung durch die Nutzer möglich sein. Vor dem Färben mit einem Autostainer sollten Proben und Reagenzien wie in den Abschnitten 1.1 – 1.5 und 2.1 angegeben vorbereitet werden.

### 2.1 Entparaffinierung und Rehydrierung

Vor dem Entparaffinieren müssen die Objektträger mindestens 20 Minuten, aber nicht mehr als eine Stunde bei maximal 60 °C im Trockenschrank liegen, um einerseits Wasserreste zu entfernen, was die Anhaftung des Gewebes an den Objektträger verbessert („Anbacken“), und um andererseits das Paraffin zu schmelzen. Zur Entfernung des Einbettungsmediums müssen die Gewebeschnitte vor dem Färben entparaffiniert und anschließend rehydriert werden. Unvollständiges Entfernen von Paraffin muss unbedingt vermieden werden, da Überreste des Einbettungsmediums zu unspezifischer Färbung führen können. Die

Objektträger bei Umgebungstemperatur (20 – 25 °C) gemäß folgendem Ablaufschema inkubieren:

- 5 ( $\pm$ 1) Minuten in ein Xylolbad legen;
- Vorgang mit einem frischen Bad wiederholen;
- überschüssige Flüssigkeit entfernen;
- 3 ( $\pm$ 1) Minuten in 95 %iges Ethanol tauchen;
- Vorgang mit einem frischen Bad wiederholen;
- überschüssige Flüssigkeit entfernen;
- 3 ( $\pm$ 1) Minuten in 70 %iges Ethanol tauchen;
- Vorgang mit einem frischen Bad wiederholen;
- überschüssige Flüssigkeit entfernen;
- mindestens 30 Sekunden in destilliertes oder entionisiertes Wasser tauchen;

Das Färbeverfahren entsprechend Abschnitt 2.2, Schritt 1: Epitopdemaskierung beginnen.

Xylol und Alkohollösungen nach 40 Objektträgern auswechseln.

**HINWEIS:** Der Anwender sollte sich bewusst sein, dass Abweichungen in der Temperatur der Apparate oder in der Einwirkungsdauer während der präanalytischen Vorbereitung der Proben zu einer unvollständigen Entfernung des Paraffins von den Gewebeschnitten führen können. Paraffinreste können die Färbung von Gewebeproben beeinträchtigen – auch die Färbung mit dem CINtec® Histology Kit. Histopathologie-Labors sollten ihre Apparate regelmäßig überprüfen, um Variationen in der Probenvorbereitung vor dem Einfärben zu minimieren. Bei einer immunhistochemischen Färbung kann das Auftreten scharfer Übergänge in immunreaktiven Gewebebereichen sowie anderer Unregelmäßigkeiten in der Färbung einer Probe auf eine suboptimale oder unvollständige Vorbereitung der Probe hindeuten. Im Falle solcher Unregelmäßigkeiten sollte der Anwender seine Apparate sowie die Schritte zur präanalytischen Bearbeitung der Proben überprüfen.

## 2.2 Färbeprotokoll für Autostainer-Geräte

### Schritt 1: Epitopdemaskierung

- Färbeschalen, z.B. Coplin-Schalen, mit der verdünnten Demaskierlösung füllen (siehe Verfahren, Abschnitt 1.1);
- Die Färbeschalen mit der Demaskierlösung in ein Wasserbad stellen. Das Wasserbad mit der Demaskierlösung auf 95 – 99 °C erwärmen. Es ist wichtig den Wasserstand des Wasserbades so einzustellen, dass die Färbeschalen zu 80% im Wasser eingetaucht sind. Zur Temperaturstabilisierung und um Verdunstung zu vermeiden, Schalen mit Deckeln abdecken;
- Die entparaffinierten Gewebeschnitte in die vorgewärmte Demaskierlösung in den Färbeschalen eintauchen; dieser Schritt wird üblicherweise die Temperatur in den Färbeschalen auf unter 90°C senken;
- Die Temperatur von Wasserbad **und** Demaskierlösung in der Färbeschale wieder auf 95 – 99 °C bringen; die Temperatur der

Demaskierungslösung in der Färbeschale muss überprüft werden;

- 10 ( $\pm 1$ ) Minuten bei 95 – 99 °C inkubieren; der count down darf erst gestartet werden, nachdem überprüft wurde, dass die Temperatur der Demaskierungslösung in der Färbeschale 95 – 99°C erreicht hat;
- Die Färbeschalen mit den Objektträgern aus dem Wasserbad nehmen;
- Die Objektträger in der Demaskierungslösung bei Raumtemperatur 20 ( $\pm 1$ ) Minuten abkühlen lassen;
- Die Demaskierungslösung vorsichtig abgießen und Schnitte in verdünntem Waschpuffer spülen (siehe Verfahren, Abschnitt 1.2);
- Um eine optimale Funktionsweise zu gewährleisten wird empfohlen, die Schnitte nach der Demaskierung und vor dem Färben 5 ( $\pm 1$ ) Minuten im Waschpuffer liegen zu lassen;

**HINWEIS:** Die Demaskierungslösung ist nur für den einmaligen Gebrauch bestimmt. Nicht wiederverwenden.

## **Schritt 2: Programmieren des Geräts**

Vor der erstmaligen Anwendung des CINtec® Histology Kits mit einem Autostainer-Gerät ist eine neue Protokollvorlage zu erstellen. Bitte das Benutzerhandbuch für den jeweils verwendeten Färbeautomaten beachten.

## **Schritt 3: Autostainer-Verfahren**

- Die Reagenzien aus den Fläschchen des Kits in die Autostainer-Reaktionsgefäße mit Messskala umfüllen. Das vom Autostainer generierte Schema für Programmzeiten und Mengen der Reagenzien verwenden (siehe Punkt 4 zu spezifischen Zeiten und Mengen);
- Die Autostainer-Reaktionsgefäße entsprechend dem vom Computer generierten Positionierungsschema in den Reagenzständer des Autostainers stellen;
- Die Objektträger entsprechend dem vom Computer generierten Positionierungsschema in den Autostainer einlegen;
- Um das Austrocknen der Gewebeschnitte zu verhindern, sollten die Schnitte nach Einbringen in das Autostainer Gerät mit Waschpuffer betropft werden;
- Nachstehend eine Übersicht über den Programmablauf:
  - Spülen\*;
  - 200  $\mu$ l Peroxidase-Blockierungsreagenz - 5 Minuten;
  - Spülen\*;
  - 200  $\mu$ l Primärantikörper (Maus-Anti-Human p16<sup>INK4a</sup> Antikörper oder Negative Reagenzienkontrolle) - 30 Minuten;
  - Spülen\*;
  - 200  $\mu$ l Visualisierungsreagenz - 30 Minuten;
  - Spülen\*;
  - Spülen\*;
  - Spülen\*;
  - Switch;

- 200 µl Substrat-Chromogenlösung (DAB) - 10 Minuten;
  - Spülen\*;
  - Objektträger nach dem Substrat-Chromogenlösung-Schritt in entionisiertem Wasser spülen;
- \*Wash Buffer für die jeweiligen Spül-Schritte verwenden.

**HINWEIS:** Wenn das verwendete Autostainer-Gerät Objektträger mit Pufferlösung spült, müssen die Objektträger nach Entnahme aus dem Autostainer mit entionisiertem Wasser gespült werden.

#### **Schritt 4: Gegenfärbung (Anweisungen für Hämatoxylin)**

- Objektträger in ein Hämatoxylin-Bad eintauchen. Je nach Stärke des benutzten Hämatoxylins 2 – 5 Minuten inkubieren;
- Objektträger in Leitungswasser einlegen oder vorsichtig unter laufendem Leitungswasser spülen. Alle Hämatoxylinreste müssen vollständig entfernt werden;
- Objektträger kurz und vorsichtig in destilliertem oder entionisiertem Wasser spülen;
- Die Gegenfärbung mit Hämatoxylin kann auch direkt auf Autostainer-Geräten erfolgen;

**HINWEIS:** Je nach Inkubationszeit und Wirkstärke des verwendeten Hämatoxylins führt die Gegenfärbung zu einer hell- bis dunkelblauen Färbung der Zellkerne. Übermäßige oder unvollständige Gegenfärbung kann die Auswertung der Ergebnisse beeinträchtigen.

#### **Schritt 5: Eindecken**

Empfohlen wird ein nicht-wässriges Medium zum permanenten Eindecken. Es kann aber auch wässrig eingedeckt werden.

**HINWEIS:** Objektträger im Dunkeln bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) aufbewahren, um Ausbleichen zu vermeiden.

### **3. Manuelles Färbeverfahren**

**HINWEIS:** Gewebeschnitte dürfen während der Färbung nicht austrocknen. Ausgetrocknete Gewebeschnitte können vermehrt unspezifische Färbungen aufweisen. Falls längere Inkubationszeiten erforderlich sind, für eine feuchte Umgebung der Schnitte sorgen.

Bei Verwendung des CINtec® Histology Kits Standardverfahren für manuelles Färben von immunhistochemischen Präparaten anwenden.

#### **3.1 Entparaffinierung und Rehydrierung**

Vor dem Entparaffinieren müssen die Objektträger mindestens 20 Minuten, aber nicht mehr als eine Stunde bei maximal 60 °C im Trockenschrank liegen, um einerseits Wasserreste zu entfernen, was die Anhaftung des Gewebes an den Objektträger verbessert („Anbacken“), und um andererseits das Paraffin zu schmelzen. Zur Entfernung des Einbettungsmediums müssen die Gewebeschnitte vor dem Färben entparaffiniert und anschließend rehydriert werden. Unvollständiges Entfernen von Paraffin muss unbedingt vermieden werden, da

Überreste des Einbettungsmediums vermehrt zu unspezifischer Färbung führen wird. Inkubieren der Objektträger bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) gemäß den folgenden Verfahrensschritten:

- 5 ( $\pm$ 1) Minuten in ein Xylolbad legen;
- Diesen Vorgang mit einem frischen Bad wiederholen;
- Überschüssige Flüssigkeit entfernen;
- 3 ( $\pm$ 1) Minuten in 95 %iges Ethanol tauchen;
- Diesen Vorgang mit einem frischen Bad wiederholen;
- Überschüssige Flüssigkeit entfernen;
- 3 ( $\pm$ 1) Minuten in 70 %iges Ethanol tauchen;
- Diesen Vorgang mit einem frischen Bad wiederholen;
- Überschüssige Flüssigkeit entfernen;
- Mindestens 30 Sekunden in destilliertes oder entionisiertes Wasser tauchen;

Das Färbeverfahren entsprechend Abschnitt 3.2, Schritt 1 Epitopdemaskierung, beginnen:

Xylol und Alkohollösungen nach 40 Objektträgern auswechseln.

### **3.2 Färbeprotokoll für manuelles Verfahren**

#### **Schritt 1: Epitopdemaskierung.**

- Die Färbeschalen, z.B. Coplin-Schalen, mit der verdünnten Demaskierungslösung füllen (siehe Verfahren, Abschnitt 1.1);
- Die Färbeschalen mit der Demaskierungslösung in ein Wasserbad stellen. Das Wasserbad mit der Demaskierungslösung auf 95 – 99 °C erwärmen. Es ist wichtig den Wasserstand des Wasserbades so einzustellen, dass die Färbeschalen zu 80% im Wasser eingetaucht sind. Zur Temperaturstabilisierung und um Verdunstung zu vermeiden, Schalen mit Deckeln abdecken;
- Entparaffinierte Gewebeschnitte in die vorgewärmte Demaskierungslösung in den Färbeschalen eintauchen; dieser Schritt wird üblicherweise die Temperatur in den Färbeschalen auf unter 90°C senken;
- Die Temperatur von Wasserbad **und** Demaskierungslösung in der Färbeschale wieder auf 95 – 99 °C bringen; die Temperatur der Demaskierungslösung in der Färbeschale muss überprüft werden;
- 10 ( $\pm$ 1) Minuten bei 95 – 99 °C inkubieren; der count down darf erst gestartet werden, nachdem überprüft wurde, dass die Temperatur der Demaskierungslösung in der Färbeschale 95 – 99°C erreicht hat;
- Die Färbeschalen mit den Objektträgern aus dem Wasserbad nehmen;
- Die Objektträger in der Demaskierungslösung bei Raumtemperatur 20 ( $\pm$ 1) Minuten abkühlen lassen;
- Demaskierungslösung vorsichtig abgießen und Schnitte in verdünntem Waschpuffer spülen (siehe Verfahren, Abschnitt 1.2);

- Um eine optimale Funktionsweise zu gewährleisten wird empfohlen, die Schnitte nach der Demaskierung und vor dem Färben 5 ( $\pm 1$ ) Minuten im Waschpuffer liegen zu lassen;

**HINWEIS:** Die Demaskierungslösung ist nur für den einmaligen Gebrauch bestimmt. Nicht wiederverwenden.

### **Schritt 2: Peroxidase-Blockierungsreagenz**

- 200  $\mu$ l Peroxidase-Blockierungsreagenz zugeben und Probe damit bedecken;
- 5 ( $\pm 1$ ) Minuten inkubieren;
- Überschüssige Flüssigkeit abklopfen und Objektträger 5 ( $\pm 1$ ) Minuten in ein frisches Pufferbad legen;

### **Schritt 3: Primärantikörper- oder Negative Reagenzienkontrolle**

- Überschüssigen Puffer entfernen;
- Probe mit 200  $\mu$ l Primärantikörper (Maus-Anti-Human p16<sup>INK4a</sup> oder Negative Reagenzienkontrolle) bedecken;
- 30 ( $\pm 1$ ) Minuten inkubieren;
- Überschüssige Flüssigkeit abklopfen und Objektträger 5 ( $\pm 1$ ) Minuten in ein frisches Pufferbad legen;

### **Schritt 4: Visualisierungsreagenz**

- Überschüssigen Puffer entfernen;
- Probe mit 200  $\mu$ l des Visualisierungsreagenz bedecken;
- 30 ( $\pm 1$ ) Minuten inkubieren;
- Überschüssige Flüssigkeit abklopfen und Objektträger 5 ( $\pm 1$ ) Minuten in ein frisches Pufferbad legen;
- Diesen Vorgang zweimal mit einem frischen Bad wiederholen;

### **Schritt 5: Substrat-Chromogenlösung (DAB)**

- Probe mit 200  $\mu$ l der Substrat-Chromogenlösung (DAB) bedecken, die gemäß dem in Abschnitt 1.3 beschriebenen Verfahren angesetzt wurde;
- 10 ( $\pm 1$ ) Minuten inkubieren;
- Überschüssige Flüssigkeit abklopfen und vorsichtig mit destilliertem oder entionisiertem Wasser spülen;

Abfälle der Substrat-Chromogenlösung (DAB) in einem Sondermüllbehälter auffangen und entsprechend entsorgen.

### **Schritt 6: Gegenfärbung (Anweisungen für Hämatoxylin)**

- Objektträger in ein Hämatoxylin-Bad eintauchen. Je nach Stärke des benutzten Hämatoxylins 2 – 5 Minuten inkubieren;

- Objektträger in Leitungswasser einlegen oder vorsichtig unter laufendem Leitungswasser spülen. Alle Hämatoxylinreste müssen vollständig entfernt werden;
- Objektträger kurz und vorsichtig in destilliertem oder entionisiertem Wasser spülen;

**HINWEIS:** Je nach Inkubationszeit und Wirkstärke des verwendeten Hämatoxylins führt die Gegenfärbung zu einer hell- bis dunkelblauen Färbung der Zellkerne. Übermäßige oder unvollständige Gegenfärbung kann die Auswertung der Ergebnisse beeinträchtigen.

### **Schritt 7: Eindecken**

Empfohlen wird ein nicht-wässriges Medium zum permanenten Eindecken. Für Xylol basierende Medien zum permanenten Eindecken ist ein Protokoll zur Dehydrierung notwendig, z.B.:

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- 3 min 70% Ethanol
- 3 min 70% Ethanol
- 3 min 96% Ethanol
- 3 min 99% Ethanol
- 5 min Xylol
- 5 min Xylol

Es kann aber auch wässrig eingedeckt werden. Folgen Sie der Gebrauchsanleitung des Herstellers des Eideck-Mediums.

**HINWEIS:** Objektträger im Dunkeln bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) aufbewahren, um Ausbleichen zu vermeiden.

## **VII. Qualitätskontrolle**

Da Abweichungen von den empfohlenen Verfahren zur Fixierung und Verarbeitung von Proben im Labor des Anwenders zu deutlich unterschiedlichen Ergebnissen führen können, müssen regelmäßige Kontrollen vor Ort durchgeführt werden.

### **Positive Gewebekontrolle**

Als externe Positiv-Kontrollmaterialien sollten Gewebeproben verwendet werden, die auf die gleiche Weise wie die Patientenprobe(n) fixiert, verarbeitet und eingebettet worden sind. Positive Gewebekontrollen zeigen die sachgemäße Bereitstellung der Gewebeproben und eine korrekte Färbetechnik an. In jedem Färbedurchlauf sollte für jede Reihe von Testbedingungen eine externe positive Gewebekontrolle durchgeführt werden. Die Gewebe für die externe Positivkontrolle sollten von Patientenproben mit bekannter p16<sup>INK4a</sup>-Positivfärbung ausgewählt werden. Falls die Positivkontrollen keine angemessene positive Färbung aufweisen, sollten die Ergebnisse der Testproben als ungültig angesehen werden.

### **Negative Gewebekontrolle**

Zelltypen mit bekannter p16<sup>INK4a</sup>-Negativität, die in den meisten Gewebeproben vorhanden sind, können in den Laboratorien als interne Negativkontrolle zur Verifizierung der IHC-Leistungsspezifikation verwendet werden. Falls die negative

Gewebekontrolle eine spezifische Färbung (falsch positive Färbung) aufweist, sollten die Ergebnisse der Patientenproben als ungültig angesehen werden.

### **Nicht-spezifische negative Reagenzienkontrolle**

Anstelle des Primärantikörpers kann die nicht-spezifische negative Reagenzienkontrolle mit einem Gewebeschnitt jeder Patientenprobe verwendet werden, um eine unspezifische Färbung zu beurteilen und eine bessere Interpretation der spezifischen Färbung an der Antigenstelle zu ermöglichen.

Falls eine spezifische Färbung (falsch-positive Färbung) mit der negativen Reagenzienkontrolle auftritt, sollten die Ergebnisse der Patientenproben als ungültig angesehen werden.

## **VIII. Auswertung der Ergebnisse**

Mit der negativen Reagenzienkontrolle als Primärantikörper gefärbte Kontrollgewebeprobe dürfen keine spezifische Färbung aufweisen.

Eine positive Färbung mit dem monoklonalen Maus-Anti-Human-Antikörper p16<sup>INK4a</sup>, Klon E6H4®, sollte unter Berücksichtigung etwaiger unspezifischer Hintergrundfärbung des negativen Kontrollgewebes bewertet werden. Wie bei allen immunhistochemischen Tests bedeutet ein negatives Ergebnis, dass das Antigen nicht gefunden wurde, nicht aber, dass das Antigen in den geprüften Zellen/dem geprüften Gewebe nicht vorlag.

Bei der Auswertung der Ergebnisse muss die Tatsache in Betracht gezogen werden, dass p16<sup>INK4a</sup> ein zelluläres Protein ist, welches in hochgradig dysplastischen Läsionen und Karzinomen der Cervix uteri sowie in manchen Zuständen, die nicht mit zervikaler Dysplasie in Verbindung stehen, nachweisbar exprimiert werden kann, obgleich in unterschiedlichen Konzentrationen und mit verschiedenen Expressionsmustern.

Die gefärbten Gewebeprobe werden mittels eines binären Bewertungssystems, das aus den Beurteilungen „positiv“ und „negativ“ besteht, bewertet.

Eine Bewertung ist positiv, wenn die mit p16<sup>INK4a</sup> gefärbte Gewebeprobe eine durchgehende Zellfärbung der Basal- und Parabasalzellschichten oder des zervikalen Plattenepithels aufweist, mit oder ohne Zellfärbung der oberflächlichen Zellschichten („diffuses Färbemuster“). Ein Beispiel für eine positive Bewertung der Gewebeprobe („diffuses Färbemuster“) wird in Anhang 2, Abbildung 1 gezeigt.

Eine Bewertung ist negativ, wenn die mit p16<sup>INK4a</sup> gefärbte Gewebeprobe entweder eine negative Färbereaktion im Plattenepithel („negatives Färbemuster“) aufweist, oder eine Färbung isolierter Zellen oder kleiner Zell-Cluster, d.h. keine durchgehende Färbung, insbesondere nicht der Basal- und der Parabasalzellen („fokales Färbemuster“). Ein Beispiel für eine negative Bewertung der Gewebeprobe („fokales Färbemuster“) wird in Anhang 2, Abbildung 2 gezeigt.

Die Auswertung von Gewebeschnitten, die mit dem CINtec® Histology Kit auf p16<sup>INK4a</sup> gefärbt wurden, sollte in Verbindung mit H&E-gefärbten Schnitten desselben zervikalen Gewebepreparates durchgeführt werden. Die zusätzliche Information, die durch die mit CINtec® gefärbten Schnitte zur Verfügung gestellt wird, sollte mit der parallel durchgeführten, Morphologie-basierten Diagnose der H&E-gefärbten Schnitte kombiniert werden, um eine finale Diagnose zu erstellen.

## **IX. Beschränkungen**

- Nur für Fachpersonal bestimmt. Die Durchführung immunhistochemischer

Verfahren erfordert spezielle Fachkenntnisse.

- Die klinische Auswertung von positiven oder negativen Färbungen ist unter Berücksichtigung des klinischen Bildes, der Morphologie und sonstiger histopathologischer Kriterien durchzuführen. Die klinische Interpretation von positiven und negativen Färbungen sollte unter Verwendung geeigneter positiver und negativer, interner und externer Kontrollen vorgenommen werden und durch zusätzliche morphologische Untersuchungen sowie sonstige diagnostische Tests ergänzt werden. Die Bewertung aller in der Herstellung und Auswertung des endgültigen immunhistochemischen Präparates verwendeter Verfahrensschritte obliegt einem qualifizierten Pathologen, der mit der korrekten Verwendung von Antikörpern, immunhistochemischen Reagenzien und Verfahren vertraut ist.
- Die Ergebnisse von Färbungen von immunhistochemischen Präparaten sind stark von der Qualität der gefärbten Gewebeproben abhängig. Entsprechend tragen die einzelnen Vorgänge des Fixierens, Spülens, Trocknens, Erwärmens, Schneidens, oder der Kontamination mit anderem Gewebe erheblich zum Gesamtergebnis der Färbung bei und können zu Artefakten, Bindung der Antikörper (antibody trapping), oder falsch-negativen Ergebnissen führen. Widersprüchliche Ergebnisse können auf Verfahrensabweichungen beim Fixieren oder Einbetten oder auf inhärente Unregelmäßigkeiten im Gewebe zurückzuführen sein.
- Übermäßige oder unvollständige Gegenfärbung kann die richtige Auswertung der Ergebnisse beeinträchtigen.
- Der Hersteller liefert diese Antikörper/Reagenzien in optimaler Verdünnung zur Verwendung gemäß den hier aufgeführten Anweisungen in immunhistochemischen Tests an aufbereiteten Gewebeschnitten. Abweichungen vom empfohlenen Testverfahren können postulierte erwartete Ergebnisse ungültig machen; geeignete Kontrollen sind zu verwenden und zu dokumentieren. Anwender, die von den empfohlenen Testverfahren abweichen, sind selbst für die Auswertung der Patientenergebnisse unter solchen Umständen verantwortlich.
- Aufgrund der nicht-immunologischen Bindung von Proteinen oder Substrat-Reaktionsprodukten können falsch-positive Resultate auftreten. Sie können aber auch durch Pseudoperoxidaseaktivität (Erythrozyten) oder endogene Peroxidaseaktivität (Zytochrom C) hervorgerufen werden.
- An bisher noch nicht getestetem Gewebe können die Reagenzien zu unerwarteten Ergebnissen führen. Aufgrund der biologischen Variabilität der Antigen-Expression in Neoplasmen oder sonstigem pathologischen Gewebe lässt sich die Möglichkeit unerwarteter Reaktionen in getestetem Gewebe nicht völlig ausschließen. Bitte Roche mtm laboratories AG zu dokumentierten unerwarteten Reaktionen kontaktieren. Kontaktinformationen des technischen Kundendienstes finden Sie in Abschnitt XIII.
- Die Reagenzien des Kits dürfen nicht durch Reagenzien mit anderen Chargennummern oder Reagenzien anderer Hersteller ersetzt werden.

## **X. Leistungsmerkmale**

### Klinische Leistungsmerkmale

Die klinische Performance des CINtec® Histology Kits wurde in einer kontrollierten klinischen Studie unter Verwendung Formalin-fixierter, Paraffin-eingebetteter

Gewebeproben der Cervix uteri evaluiert [21]. Die Studie sollte die Eignung des CINtec® Histology Kits zur Verbesserung der diagnostischen Genauigkeit und Übereinstimmung zwischen den Untersuchern bei der Diagnose von hochgradigen zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN2+) zeigen.

Die klinische Studie wurde an retrospektiv gesammelten Knippsbiopsien und Konisationspräparaten durchgeführt. Es wurden insgesamt 500 zervikale Proben von zwei verschiedenen europäischen Pathologielabors verwendet. Von diesen Proben wurden H&E-gefärbte Schnitte und mit dem CINtec® Histology Kit gefärbte Schnitte desselben Gewebepräparats gemäß den Anweisungen des Herstellers hergestellt.

Drei europäische Gynäkopathologie-Experten erstellten unabhängig voneinander eine Diagnose auf Basis der H&E-gefärbten Schnitte. Fälle mit diskrepanten Ergebnissen wurden ein zweites Mal von den drei Pathologen gemeinsam überprüft. Die Konsensusdiagnosen (zwei von drei übereinstimmende Diagnosen) dienen dann als Referenzdiagnosen für die Studie.

Zwölf Untersucher (zertifizierte Pathologen, die regelmäßig histopathologische Befundungen an zervikalen Gewebeproben durchführen) aus 4 europäischen Ländern (Frankreich, Italien, Spanien und Deutschland) nahmen als Panel-Pathologen an der Studie teil. In einer ersten Runde diagnostizierten alle Panel-Pathologen individuell jeden Fall ausschliesslich auf der Basis der H&E-gefärbten Schnittpräparate. Nach einer Wash-Out-Periode von mehr als 4 Wochen wurde derselbe, mit einer neuen Nummerierung versehene Satz an H&E-gefärbten Schnitten zusammen mit den dazugehörigen Parallelschnitten, die mit dem CINtec® Histology Kit gefärbt wurden, von allen 12 Panel-Pathologen erneut beurteilt. Die Pathologen kannten zu keiner Zeit die ursprünglichen Diagnosen und Referenzdiagnosen.

Um die Verbesserung der diagnostischen Genauigkeit durch die Verwendung der CINtec® Histology-gefärbten Gewebeschnitte zusätzlich zu den H&E-gefärbten Schnitten im Vergleich zur alleinigen Beurteilung der H&E-gefärbten Gewebsschnitten zu messen, wurden die Ergebnisse jedes Panel-Pathologen für beiden Methoden mit den Konsensusdiagnosen der drei Expertenpathologen als Referenzdiagnosen verglichen.

### Ergebnisse:

Insgesamt wurden 482 Fälle mit vollständigen Diagnosen aller Studienpathologen in die Datenanalyse aufgenommen. Basierend auf den Konsensusdiagnosen der Expertenpathologen ergab sich folgende Verteilung für die verschiedenen diagnostischen Kategorien: Negativ für Dysplasie (n=194), CIN1 (n=96), CIN2 (n=69), CIN3 (n=123).

### Diagnostische Genauigkeit für den Nachweis von CIN2+

Insgesamt wurde die Sensitivität für den Nachweis von CIN2+ von 1787 (H&E) auf 2018 (H&E plus CINtec® Histology) richtig-positive CIN2+ Ergebnisse erhöht, verbunden mit einer insgesamt lediglich geringfügigen Abnahme der Spezifität von 3088 (H&E) auf 3051 (H&E plus CINtec® Histology) richtig-negative  $\leq$  CIN1 Ergebnissen.

### *Tabelle 1*

Verbesserung der diagnostischen Genauigkeit für hochgradige (CIN2+) CIN-Läsionen durch die Beurteilung von H&E-gefärbten Schnitten in Verbindung

mit CINtec® Histology-gefärbten Schnitten im Vergleich zur alleinigen Beurteilung von H&E-gefärbten Schnitten. Die Anzahl von richtig-positiven und richtig-negativen Ergebnissen und die Anzahl von falsch-negativen und falsch-positiven Ergebnissen sind in der Tabelle im Vergleich zur Konsensusdiagnose der Experten-Pathologen abgebildet. (Anmerkung: Bei einer vollkommenen Übereinstimmung mit der Konsensusdiagnose der Experten-Pathologen müssten insgesamt 2304 (192 CIN2+ Fälle x 12 Panel-Pathologen) richtig-positive Ergebnisse vorliegen).

	Richtig Positiv	Falsch Negativ	Falsch Positiv	Richtig Negativ
H&E	1787	517	392	3088
H&E+CINtec®	2018	286	429	3051

Das Mixed-Effects-ANOVA-Modell für Jackknife-Pseudowerte, das als Dorfman-Berbaum-Metz (DBM) Methode bekannt ist, wurde für den Test der Genauigkeit des CINtec® Histology Kits verwendet.

Die Nullhypothese, dass die diagnostische Genauigkeit basierend auf H&E-gefärbten Schnitten im Vergleich zu H&E- plus CINtec®-gefärbten Schnitten bei CIN2+ Läsionen gleich ist, wurde mit den Werten  $p=0,0004$  (AUC bei H&E: 0,877; AUC for H&E plus CINtec®: 0,925) zurückgewiesen.

*Tabelle 2*

Leistungswerte für die gemeinsame Auswertung von H&E- gefärbten Schnitten und CINtec® Histology-gefärbten Schnitten zur Identifizierung hochgradiger CIN-Läsionen (CIN2+) im Vergleich zur alleinigen Beurteilung von H&E-gefärbten Schnitten. Die H&E-basierten Konsensusdiagnosen der drei Experten wurden als Referenzdiagnose verwendet.

	H&E % (95% CI)	H&E plus CINtec® Histology % (95% CI)
<b>Sensitivität</b>	77.6% (75.8, 79.3)	87.6% (86.2, 88.9)
<b>Spezifität</b>	88.7% (87.6, 89.8)	87.7% (86.5, 88.8)
<b>PPV</b>	82.0% (80.3, 83.6)	82.5% (80.9, 84.0)
<b>NPV</b>	85.7% (84.5, 86.8)	91.4% (90.4, 92.4)
<b>DLR+</b>	6.885 (6.256, 7.578)	7.105 (6.494, 7.773)
<b>DLR-</b>	0.253 (0.234, 0.273)	0.142 (0.127, 0.158)

95% CI, 95% Konfidenzintervalle; PPV, positive predictive value (positiver prädiktiver Wert); NPV, negative predictive value (negativer prädiktiver Wert); DLR+, positive diagnostic likelihood ratio (positives Likelihood-Verhältnis); DLR-, negative diagnostic likelihood ratio (negatives Likelihood-Verhältnis)

Die Konsensusdiagnosen der drei Gynäkopathologieexperten wurden als Referenz verwendet. Die Sensitivität für den Nachweis von CIN2+ wurde um 13% (relativ) verbessert: die Sensitivität für CIN2+ auf Basis der H&E-Diagnosen allein lag bei 77,6 % und wurde durch die Hinzufügung von CINtec®-gefärbten Schnitten bei der wiederholten Auswertung derselben H&E-gefärbten Präparate auf 87,6 % erhöht.

Die Erhöhung der diagnostischen Genauigkeit für den Nachweis von CIN2+ wurde unabhängig mit statistischer Signifikanz für die Untergruppen der zervikalen Knipps-Biopsien (n=249; AUC for H&E: 0,895; AUC für H&E plus CINtec® Histology: 0,929; p=0,0053) und zervikalen Konisationspräparaten (n=233; AUC for H&E: 0,887; AUC für H&E plus CINtec® Histology: 0,948; p=0,0009) bewiesen.

Übereinstimmung zwischen unterschiedlichen Untersuchern für den Nachweis von CIN2+

Zur Beurteilung der Verbesserung der Übereinstimmung zwischen den Panel-Pathologen beim Nachweis von CIN2+ durch die Interpretation von H&E-Schnitten gemeinsam mit CINtec®-gefärbten Präparaten wurde eine Multiple-Rater Form der Kappa-Statistik verwendet.

*Tabelle 3*

Verbesserung der Übereinstimmung zwischen den Untersuchern für den Nachweis von CIN2+ durch Beurteilung von H&E-gefärbten Schnitten in Verbindung mit CINtec®-gefärbten Schnitten im Vergleich zur alleinigen Beurteilung von H&E-gefärbten Schnitten. Ungewichtete Kappa-Werte.

Diagnostische Kategorie	Kappa H&E	Kappa H&E plus CINtec®	Statistische Signifikanz
CIN2+, alle Fälle	0,580	0,756	p<0,0001
CIN2+, nur Knipps-Biopsien	0,598	0,748	p<0,0001
CIN2+, nur Konisationspräparate	0,548	0,765	p<0,0001

Die Kappa-Statistik als ein um Zufallswerte korrigiertes Maß für die Übereinstimmung zwischen den Panel-Pathologen für den Nachweis von CIN2+ wurde durch die Beurteilung von H&E-gefärbten Schnitten zusammen mit CINtec®-gefärbten Schnitten im Vergleich zur Beurteilung von H&E-gefärbten Schnitten alleine deutlich verbessert (Erhöhung der Kappa-Werte unter Berücksichtigung aller Fälle von 0,580 auf 0,756; p<0,0001).

Reproduzierbarkeit in der Beurteilung des p16<sup>INK4a</sup> Färbemusters

Die Übereinstimmung unter den Panel-Pathologen hinsichtlich der Beurteilung des p16<sup>INK4a</sup>-Färbemusters in zervikalen Gewebeproben als entweder diffus p16<sup>INK4a</sup>-positiv, fokal p16<sup>INK4a</sup>-positiv, oder p16<sup>INK4a</sup>-negativ wurde evaluiert.

Es wurde eine hohe Reproduzierbarkeit zwischen den Pathologen hinsichtlich der Beurteilung des p16<sup>INK4a</sup>-Färbemusters als entweder positiv (diffuses Färbemuster), oder negativ (fokales Färbemuster, oder keine Immunreaktivität) verzeichnet. Der Kappa-Wert (ein um Zufallswerte korrigiertes Maß für die Übereinstimmung) für die Reproduzierbarkeit zwischen den zwölf Panel-Pathologen hinsichtlich der Beurteilung des p16<sup>INK4a</sup>-Färbemusters als entweder positiv (diffuses Färbemuster), oder negativ (fokales Färbemuster, oder keine Immunreaktivität) hat sich als hervorragend erwiesen (Kappa-Mittelwert = 0,899; Kappa-Median = 0,903).

Analytische Leistung

Analytische Sensitivität

Die Sensitivitäts-Studie wurde mit CINtec® Histology Kits aus 3 lots durchgeführt.

35 zervikale Biopsien mit CIN3+, einschließlich 6 als CIN3 klassifizierter und 29 als Plattenzell-Karzinome klassifizierter Biopsien, wurden untersucht.

Fünf von 6 (83,3%) der als CIN3 klassifizierten Fälle zeigten starke diffuse p16-Färbung. Ein CIN3 Biopsie-Fall zeigte schwache p16-Färbung, aber kein klar p16-positives Signal.

22 von 29 (75,9%) der als Plattenzell-Karzinom klassifizierten Fälle zeigten starke diffuse p16-Färbung. Fünf Fälle von Plattenzell-Karzinomen zeigten schwache p16-Färbung, aber kein klar p16-positives Signal. Nur 2/29 (6,9%) der Fälle waren bezüglich p16 vollkommen negativ. Dies ist erklärbar, da es bereits zuvor Berichte gab dass 3 – 8 % der Plattenzellkarzinom-Fälle bezüglich p16-Färbung negativ sind [1; 6]. Dies kann die kleine Anzahl von Fällen widerspiegeln, in denen Dedifferenzierung und chromosomale Umordnungen zu einer Inaktivierung oder Entfernung des p16-Genlokus geführt haben.

Für alle lots führte Färbung einer gut charakterisierten Auswahl von Ratten-Gewebeschnitten unter Verwendung des Negativ-Kontrollreagenzes (Negative Reagent Control) zu starker und spezifischer Färbung einzelner Neuronen in Rattengehirn. Zusätzlich zeigten einige canaliculare Nierenzellen, einzelne Makrophagen in der Milz und einzelne Makrophagen und Plasmazellen im Dünndarm schwache Färbung. Die anderen Ratten-Gewebe waren vollständig negativ.

Der anti-p16-Antikörper E6H4™ kann eine durchgehende Färbung von Zellen der basalen und parabasalen Schichten bewirken, mit oder ohne Färbung der Zellen der superfacialen Schichten des Plattenepithels in zervikalen Biopsien mit hochgradigen CIN (CIN2, CIN3). Das Negativkontroll-Reagenz (Negative Reagent Control) kann spezifisch Ratten-Neuronen detektieren.

### Analytische Spezifität

Die Spezifitäts-Studie wurde mit CINtec Histology Kits aus 3 lots an einer gut charakterisierten Auswahl von 90 NBF (neutral gepuffertes Formalin)-fixierten normalen Gewebeproben (30 verschiedene Gewebetypen) und 54 Tumorgeweben mit Ausnahme von Gebärmutterhalskrebs durchgeführt (angeordnet in Multi Tissue Arrays = MTAs).

Bei Färbung von normalen Geweben mit dem p16-spezifischen Antikörper (Klon E6H4) wurden 16 verschiedene p16-negative Gewebe [Großhirn, Kleinhirn, Nebennieren, Schilddrüse, Knochenmark, Herz, Speiseröhre, Magen, Darm, Dickdarm, Leber, Niere, quergestreifte Muskulatur, Haut, Mesothelium, Gebärmutterhals] und 14 verschiedene p16-positive Gewebe [Schwache Färbung: Hypophyse, Lunge, Thymusdrüse, Postata; positiv: Nerven, Dünndarm, Mandeln, Pankreas, Milz; stark positiv: Uterus, Eierstock, Brust, Hoden, Nebenschilddrüse] beobachtet. Bei Färbung von Tumor-Geweben (die nicht Gewebe des Gebärmutterhalses sind) mit dem p16-spezifischen Antikörper (Klon E6H4) wurden 22 verschiedene p16-negative und 32 verschiedene p16-positive Tumorfälle beobachtet.

Für alle drei lots CINtec Histology wurde bei Färbung aller Gewebe (normale und Tumor-Gewebe) mit dem Negativkontrollreagenz ein negatives Ergebnis erhalten. Der monoklonale Maus-anti-Ratte Oxytocin-verwandte Neurophysin-Antikörper reagiert nicht in signifikantem Ausmaß mit normalen humanen Gewebeproben und humanen Tumor-Geweben.

### Reproduzierbarkeit

### Inter-Run-Reproduzierbarkeit

Die Inter-Run-Reproduzierbarkeit wurde mit dem CINtec® Histology Kit anhand des manuellen Protokolls durch Färben von 36 Schnitten, die von Gewebeblöcken mit CIN2+ Diagnose hergestellt wurden, bestimmt. Die dysplastischen Bereiche der Schnitte wurden mit vergleichbarer Intensität in allen Durchläufen gefärbt (+/-0,5 auf einer Skala von 0 bis 3). Die normalen Bereiche aller Schnitte zeigten keine spezifische Färbung.

### Intra-Run-Reproduzierbarkeit

Die Intra-Run-Reproduzierbarkeit wurde mit dem CINtec® Histology Kit an drei verschiedenen Tagen anhand des manuellen Protokolls und mit dem Autostainer durchgeführt. Insgesamt wurden drei Gewebeblöcke mit CIN2+ Diagnose verwendet. Von jedem Block wurde jeden Tag ein Konsekutivschnitt verwendet. Der dysplastische Bereich des Gewebeschnitts eines Blocks wurde ebenso mit vergleichbarer Intensität jeden Tag manuell und mit dem Autostainer gefärbt (+/-0,5 auf einer Skala von 0 bis 3). Die normalen Bereiche aller Schnitte zeigten keine spezifische Färbung.

### Inter-Chargen-Reproduzierbarkeit

Zur Bestimmung der Inter-Chargen-Reproduzierbarkeit wurden CINtec® Histology Kits von drei unabhängigen Chargen zum Färben der Schnitte der CIN2+ Proben verwendet. Gemäß dem Protokoll in der Gebrauchsanweisung wurde manuell und mit dem Autostainer gefärbt. Der dysplastische Bereich der Schnitte eines Blocks wurde mit vergleichbarer Intensität (+/- 0,5 auf einer Skala von 0 bis 3) mit den Reagenzien aller drei Lots sowohl manuell als auch mit dem Autostainer gefärbt. Die normalen Bereiche aller Schnitte zeigten keine spezifische Färbung.

Die Skala von 0 bis 3 zur Beurteilung der Färbeintensität wurde ausschließlich für Zwecke im Rahmen der analytischen Leistungsbewertung verwendet, und soll nicht für die Auswertung von Gewebefärbungen in der Routinepraxis verwendet werden. Stattdessen soll die in Kapitel VIII beschriebene qualitative Interpretation angewendet werden.

## XI. Fehlersuche und –behebung

Siehe Abschnitt XIII. für Kontakt zum Kundenservice, falls technische Unterstützung benötigt wird.

Problem	Mögliche Ursache	Empfohlene Maßnahme
<b>1. Keine Färbung der Objektträger</b>	<b>1a.</b> Gebrauchsanweisung wurde nicht befolgt;	<b>1a.</b> Gebrauchsanweisung sorgfältig lesen und beschriebenes Verfahren einhalten;
<b>2. Schwache Färbung der Objektträger</b>	<b>2a.</b> Unzureichende Demaskierung;	<b>2a.</b> Frisch angesetzte Demaskierungslösung verwenden, bzw. sicherstellen, dass die Demaskierungslösung 10 Minuten lang eine Temperatur von 95 – 99 °C aufweist und weitere 20 Minuten Zeit zum Abkühlen hat;
	<b>2b.</b> Unzureichende Inkubationszeiten der Reagenzien;	<b>2b.</b> Empfehlungen für Färbeprotokoll unter 2.2 / 3.2 überprüfen;
	<b>2c.</b> Ungeeignete Fixationsmethode;	<b>2c.</b> Patientengewebe darf nicht zu stark fixiert sein, korrektes Fixationsmittel verwenden;
	<b>2d.</b> Das zur Verdünnung der Demaskierungslösung verwendete Wasser hat eine zu hohe Ionenkonzentration;	<b>2d.</b> Sicherstellen, dass die zur Gewinnung von entionisiertem Wasser verwendete Ionenaustauschsäule ordnungsgemäß gewartet wurde;
	<b>2e.</b> Unsachgemäße Entparaffinierung;	<b>2e.</b> Der Anwender sollte sich bewusst sein, dass Abweichungen in der Temperatur der Apparate oder in der Einwirkungsdauer während der präanalytischen Vorbereitung der Proben zu einer unvollständigen Entfernung des Paraffins von den Gewebeschnitten führen können. Paraffinreste können die Färbung von Gewebeproben beeinträchtigen – auch die Färbung mit dem CINtec® Histology Kit.  Histopathologie-Labors sollten ihre Apparate regelmäßig überprüfen, um Variationen in der Probenvorbereitung vor dem Einfärben zu minimieren. Bei einer immunhistochemischen Färbung kann das Auftreten scharfer Übergänge in immunreaktiven Gewebebereichen sowie anderer Unregelmäßigkeiten in der Färbung einer Probe auf eine suboptimale oder unvollständige Vorbereitung der Probe hindeuten. Im Falle solcher Unregelmäßigkeiten sollte der Anwender seine Apparate sowie die Schritte zur präanalytischen Bearbeitung der Proben überprüfen;

<b>3. Zu starke Hintergrundfärbung der Objektträger</b>	<b>3a.</b> Paraffin nicht vollständig entfernt;	<b>3a.</b> Frische Xylobäder verwenden und in Abschnitt 2.1 / 3.1 dargestelltes Verfahren einhalten;
	<b>3b.</b> Beim Aufbringen der Schnitte auf die Objektträger wurden Stärkezusätze verwendet;	<b>3b.</b> Keinerlei Stärkezusätze zur Haftung der Schnitte auf dem Objektträger verwenden. Viele dieser Zusätze sind immunreaktiv;
	<b>3c.</b> Objektträger nicht gründlich gespült;	<b>3c.</b> In Puffer-Bädern und Waschflaschen frische Lösungen verwenden;
	<b>3d.</b> Schnitte sind während der Färbung ausgetrocknet;	<b>3d.</b> Sog. „Feuchte Kammer“ verwenden. Nur drei bis vier Objektträger auf einmal abschütten, bevor das Reagenz zugegeben wird;
	<b>3e.</b> Ungeeignete Fixationsmethode;	<b>3e.</b> Korrektes Fixationsmittel benutzen. Andere Fixationsmittel können zu übermäßiger Hintergrundfärbung führen;
	<b>3f.</b> Unspezifische Bindung der Reagenzien an Gewebe;	<b>3f.</b> Proben auf vorschriftsmäßige Fixation und eventuelle Nekrose überprüfen;
<b>4. Gewebeschnitte lösen sich vom Objektträger</b>	<b>4a.</b> Verwendung ungeeigneter Objektträger;	<b>4a.</b> Hier aufgeführte Empfehlungen befolgen und SuperFrost® Plus als Objektträger verwenden;
<b>5. Übermäßig starke spezifische Färbung</b>	<b>5a.</b> Ungeeignete Fixationsmethode;	<b>5a.</b> Korrektes Fixationsmittel und -methode benutzen;
	<b>5b.</b> Reagenzien zu lange inkubiert;	<b>5b.</b> Empfehlungen für Färbeprotokoll unter 2.2 / 3.2 überprüfen und befolgen;
	<b>5c.</b> Ungeeignete Waschlösung;	<b>5c.</b> Korrekten Waschlösung (10 x) verwenden (Bestellnummer 10215364001).

## XII. Erklärung der Symbole

Symbol:	Erklärung:
	Bestellnummer
	Chargenbezeichnung
	Globale Artikelnummer GTIN
	Einmalige Produktkennung
	In-Vitro-Diagnostikum
	Hersteller
	Inhalt ausreichend für <n> Tests
	Gebrauchsanweisung beachten
	Verwendbar bis
	Zulässiger Temperaturbereich
	Herstelldatum
	Nicht wiederverwenden
	Kontakt für technische Unterstützung (Telefon)
	Enthält Material tierischen Ursprungs
	Inhalt

## XIII. Hersteller

**Hergestellt von:** Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Strasse 116  
68305 Mannheim  
Deutschland

<https://navifyportal.roche.com>

**Kontakt für technische Unterstützung (Telefon):** +800 5505 6606

Der Kurzbericht über Sicherheit und Leistung (summary of safety and performance) kann hier abgerufen werden:

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

## XIV. Revisionsstand

Die aktuelle Gebrauchsanweisung liegt in der Version 1.0 vor und ist im Juni 2024 herausgegeben.

Änderungen im Vergleich zur vorangegangenen Version für Produkt 9511 / 06594441001 (2.9, Dezember 2022 herausgegeben):

- Änderung Hersteller von Roche mtm laboratories AG zu Roche Diagnostics GmbH; daher neue Produktnummer, 10213370001, vergeben
- Editorische Änderungen

## **XV. Geistiges Eigentum**

CINtec und E6H4 sind Warenzeichen im Eigentum von Roche.

Alle anderen Warenzeichen sind Eigentum der jeweiligen Inhaber.

© 2024 Roche

## Anhang 1 Literatur

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

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

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

## Anhang 2 Abbildungen

### Beispiel für diffuses Färbemuster

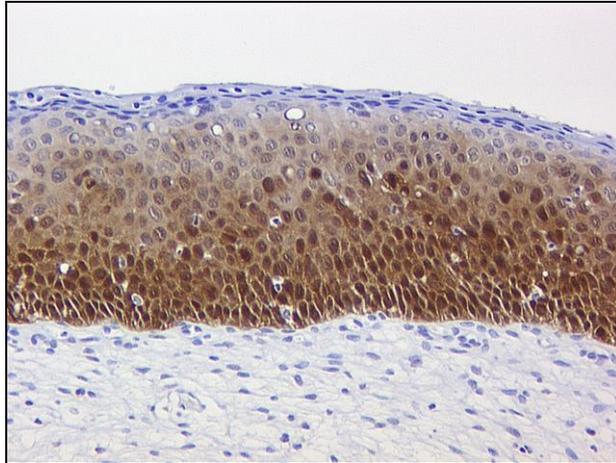


Fig. 1: CIN 3

### Beispiel für fokales Färbemuster

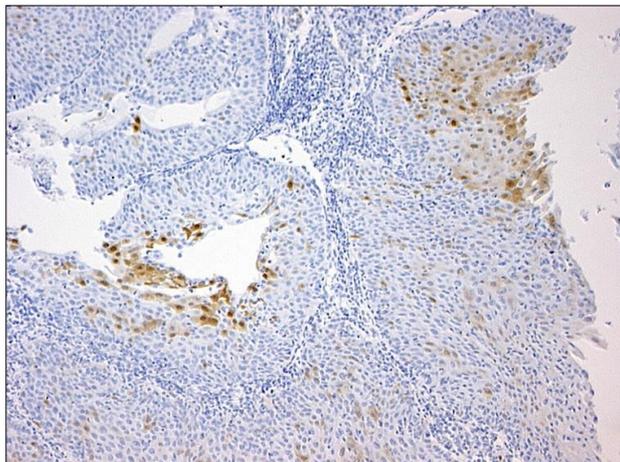


Fig. 2: Reife Plattenepithelmetaplasie