

## CINtec® p16 Histology

<b>REF</b>	805-4713	$\Sigma$	50
	06695248001		
<b>REF</b>	825-4713	$\Sigma$	250
	06695256001		
<b>IVD</b>			

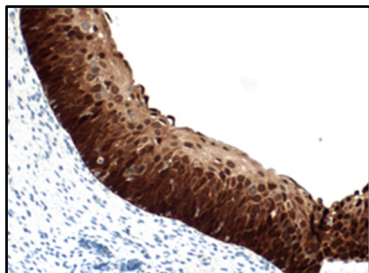


Fig. 1. CINtec p16 Histology-farvning af cervikale pladeepitelceller.

### TILSIGTET ANVENDELSE

CINtec p16 Histology er en immunhistokemisk analyse af den kvalitative detektion af p16<sup>INK4a</sup>-proteinet på formalinfikserede og paraffinindstøbte vævssnit, der er klargjort ud fra cervikal biopsier. Det er indiceret til at blive brugt sammen med H&E-farvede objektglas fremstillet ud fra det samme cervikale vævspræparat som en hjælp til at øge diagnostisk nøjagtighed og inter-observator-overensstemmelse ved diagnosticering

af højgradig cervikal intraepitelial neoplasie.

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

Dette antistof er beregnet til in vitro diagnostisk (IVD) brug.

### RESUMÉ OG FORKLARING

CINtec p16 Histology består af én komponent: anti-p16<sup>INK4a</sup> (E6H4), et monoklonalt primært antistof fra mus.

Som cyclinafhængig kinaseinhibitor spiller p16<sup>INK4a</sup> (p16) en afgørende rolle i celleyklusprogression og cellulær differentiering.<sup>1-4</sup> p16<sup>INK4a</sup>-proteinet styrer den retinoblastomprotein (pRB)-medierede G1-S-faseovergang og udløser standsningen af celleyklus under den cellulære differentieringsproces.<sup>1,5</sup> I normale, terminalt differentierede celler udtrykkes p16<sup>INK4a</sup> ved lave niveauer, der typisk ikke kan detekteres ved immunhistokemi.<sup>1,5</sup> Forskningsforsøg har vist, at stærk overekspression af p16<sup>INK4a</sup> i præcancer- og cancervæv hænger tæt sammen med ekspresionen af det humane papillomavirus (HPV) E7-onkoprotein.<sup>1,3,6,7,8</sup>

IHC-detektion af p16-overekspression kan hjælpe med fortolkningen af cervikale histologiske præparater. Forsøg viser, at p16-proteinet udviser overekspression i neoplastiske pladeepitelceller i cervix uteri, mens det stort set er fraværende i normalt epitel og ikke-neoplastiske læsioner.<sup>1,2,5,6,7</sup> Mange forsøg har undersøgt sammenhængen mellem p16-overekspression og tilstedeværelsen af cervikal intraepitelial neoplasie (CIN).<sup>8,9</sup> Overekspression af p16 er konstateret i stort set alle CIN3-læsioner, størstedelen af CIN2-læsioner, og typisk mellem 40 % og 60 % af placercervikale læsioner klassificeret som CIN1 i H&E-farvede vævssnit.<sup>8-13</sup>

### KLINISK SIGNIFIKANS

Diagnostisk fortolkning af cervikale biopsiprøver fungerer som basis for beslutninger vedr. patientbehandling. CIN1 er den histologiske manifestering af en HPV-infektion. Generelt anbefales det, at patienter, der er diagnosticeret med CIN1-læsioner, vender tilbage til en opfølgende evaluering i løbet af et år.<sup>14</sup> I forbindelse med cervikal sygdom er CIN2 den mest almindelige kliniske behandlingsgrænseværdi.<sup>14</sup> Excisional eller ablativ behandling anbefales til patienter, der er diagnosticeret med CIN2 eller CIN3. Risikoen for excisionsbehandling for patienten i den fødedygtige alder inkluderer negative virkninger på fremtidige graviditeter.<sup>15,16,17</sup> Derfor er præcis diagnose af CIN og især CIN2 og CIN3 vigtige i beslutninger om patienthåndtering.<sup>18</sup>

Morfologisk fortolkning af cervikale biopsipræparater med H&E alene er underlagt interobservatorvariabilitet.<sup>18-25</sup> Adskillige undersøgelser har evalueret den supplerende brug af p16-farvede objektglas og effekten på interobservator-pålidelighed i diagnostisk

fortolkning af cervikale histologiske præparater ved patologer. I alle disse undersøgelser forbedres den diagnostiske overensstemmelse mellem patologer signifikant, når p16-farvede objektglas blev fortolket sammen med H&E-farvede objektglas sammenlignet med fortolkning af det H&E-farvede objektglas alene.<sup>10,11,13,21,22,26,27,28</sup>

Ydermere vurderede flere undersøgelser effekten på diagnostisk nøjagtighed af cervikal histologifortolkning, når p16-farvede objektglas blev brugt sammen med H&E-farvede objektglas. Dijkstra et al. (2010) fremviste en nærmest perfekt overensstemmelse mellem diagnoser på baggrund af p16-farvede objektglas, der er fortolket af én patolog, sammenlignet med supplerende diagnoser foretaget af en panel af patologer ud fra en H&E-farvning alene.<sup>10</sup> Bergeron et al. påviste en markant stigning i diagnostisk nøjagtighed, når fortolkningen omfattede både p16-farvede objektglas og H&E-farvede objektglas, sammenlignet med H&E-farvede objektglas alene ( $p = 0.0004$ ) med en  $\geq$  CIN2-sensitivitet, der steg fra 77 % til 87 %.<sup>11</sup> En ny prospektiv og populationsbaseret undersøgelse foretaget på et amerikansk akademisk klinisk laboratorie med over 1450 fortløbende cervikale biopsitilfælde, konkluderer, at farvning med p16 er »et nyttigt og pålideligt diagnostisk supplement til at skelne mellem biopsier med og uden CIN2+«. <sup>12</sup> Ergo har den supplerende fortolkning af H&E-farvede objektglas med vævssnit fra cervikal biopsi og fortløbende objektglas fra samme vævspræparat, der blev immunfarvet med p16, potentialet til at forbedre den diagnostiske overensstemmelse i fortolkningen af cervikale biopsier markant.

### PROCEDURENS PRINCIP

CINtec p16 Histology er et monoklonalt primært antistof fra mus, der er fremstillet mod p16<sup>INK4a</sup>-proteinet. CINtec p16 Histology binder sig til p16<sup>INK4a</sup>-proteinet i formalinfikserede og paraffinindstøbte (FFPE) vævssnit og udviser et kernefarvningsmønster og/eller cytoplasmisk farvningsmønster. Dette antistof kan visualiseres med et OptiView DAB IHC Detection Kit (kat.nr. 760-700 / 06396500001) eller ultraView Universal DAB Detection Kit (kat.nr. 760-500 / 05269806001). For yderligere oplysninger henvises der til det respektive metodeark.

### LEVERET MATERIALE

CINtec p16 Histology (kat.nr. 805-4713 / 06695248001) indeholder tilstrækkeligt med reagens for 50 tests.

En 5 mL-dispenser med CINtec p16 Histology indeholder ca. 5.0 µg monoklonalt museantistof.

CINtec p16 Histology (kat.nr. 825-4713 / 06695256001) indeholder tilstrækkeligt med reagens for 250 tests.

En 25 mL-dispenser med CINtec p16 Histology indeholder ca. 25.0 µg monoklonalt museantistof.

Dette antistof fortyndes i Tris-HCl med bærerprotein og 0.10 % ProClin 300 som konserveringsmiddel.

Specifik antistofkoncentration er cirka 1.0 µg/mL. Der er ikke observeret nogen kendt, uspecifik antistofreaktivitet i dette produkt.

CINtec p16 Histology-antistof er et rekombinant monoklonalt museantistof oprenset fra cellekultursupernatant.

Se det relevante metodeark til VENTANA-detektionskit for at få yderligere oplysninger om immunhistokemiske farvningsprocedurer: Procedurens princip, Materiale og metoder, Prøvetagning og forberedelse til analyse, Metoder til kvalitetskontrol, Fejlfinding, Fortolkning af resultater og Begrænsninger.

### NOVENDIGE MATERIALER, SOM IKKE MEDFØLGER

Farvereagenser såsom VENTANA-detektionskits og hjælpekomponenter, herunder objektglas med negative og positive kontrolvæv, medfølger ikke.

Det er ikke alle produkter, der er nævnt i indlæggssedlen, som kan fås i alle geografiske områder. Indhent oplysninger hos den lokale supportrepræsentant.

Nedenstående reagenser og materialer kan være påkrævet ved farvning, men medfølger ikke:

1. Anbefalet kontrolvæv
2. Objektglas, positivt ladede
3. Negativ Control (Monoclonal) (kat.nr. 760-2014 / 05266670001)
4. OptiView DAB IHC Detection Kit (kat.nr. 760-700 / 06396500001)
5. ultraView Universal DAB Detection Kit (kat.nr. 760-500 / 05269806001)
6. Antibody Diluent (kat.nr. 251-018 / 05261899001)
7. EZ Prep Concentrate (10X) (kat.nr. 950-102 / 05279771001)

8. Reaction Buffer Concentrate (10X) (kat.nr. 950-300 / 05353955001)
9. LCS (Predilute) (kat.nr. 650-010 / 05264839001)
10. ULTRA LCS (Predilute) (kat.nr. 650-210 / 05424534001)
11. Cell Conditioning Solution (CC1) (kat.nr. 950-124 / 05279801001)
12. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (kat.nr. 950-224 / 05424569001)
13. Hematoxylin II (kat.nr. 790-2208 / 05277965001)
14. Bluing Reagent (kat.nr. 760-2037 / 05266769001)
15. Permanent monteringsmateriale
16. Dækglas
17. Automatiseret dækglas instrument
18. Generelt laboratorieudstyr
19. BenchMark IHC/ISH-instrument

**OPBEVARING OG STABILITET**

Opveares ved 2-8 °C efter modtagelsen, og når de ikke anvendes. Må ikke nedfryses. For at sikre korrekt reagenstillførsel og antistoffets stabilitet skal kapslen sættes på dispenserens igen efter hver brug, og dispenserens skal omgående anbringes i køleskab i opret position.

Hver antistofdispenser er mærket med udløbsdato. Ved korrekt opbevaring er reagenset stabilt indtil den dato, der er angivet på etiketten. Brug ikke reagenset efter udløbsdatoen.

**PRÆPARATFORBEREDELSE**

Rutinemæssigt behandlede FFPE-væv er egnede til brug med dette primære antistof, når det anvendes med VENTANA-detektionskits og BenchMark IHC/ISH-instrumenter. Det anbefalede vævsfixativ er 10 % neutral buffer-formalin.<sup>29</sup> Der skal skæres snit på cirka 4 µm tykkelse, som monteres på positivt ladede objektglas. Objektglassene skal farves omgående, da skårne vævsnitets antigenicitet muligvis mindskes over tid. Bed din lokale Roche-repræsentant om en kopi af "Recommended Slide Storage and Handling" for yderligere oplysninger.

Det anbefales, at der køres positive og negative kontroller samtidig med ukendte præparater.

**ADVARSLER OG FORSIGTIGHEDSREGLER**

1. Til in vitro diagnostisk (IVD) brug.
2. Kun til faglig anvendelse.
3. Brug ikke efter det angivne antal tests.
4. ProClin 300 er brugt som konserveringsmiddel i dette reagens. Det er klassificeret som lokalirriterende og kan forårsage overfølsomhed ved hudkontakt. Der skal tages rimelige forholdsregler ved håndtering. Undgå, at reagenset kommer i berøring med øjne, hud og slimhinder. Bær beskyttelsestøj og handsker.
5. Positivt ladede objektglas kan være modtagelige over for stressfaktorer i det omgivende miljø, hvilket kan medføre uhensigtsmæssig farvning. Bed din Roche-repræsentant om yderligere oplysninger om, hvordan denne type objektglas skal anvendes.
6. Materialer af human eller animalsk oprindelse skal håndteres som biologisk farligt materiale og bortskaffes i henhold til gældende forholdsregler. I tilfælde af eksponering skal de ansvarlige myndigheders sundhedsdirektiver følges.<sup>30,31</sup>
7. Undgå, at reagenser kommer i kontakt med øjne og slimhinder. Vask med rigelige mængder vand, hvis reagenserne kommer i kontakt med følsomme områder.
8. Undgå mikrobiel kontamination af reagenserne, da det kan forårsage fejlbehæftede resultater.
9. For yderligere information om brugen af denne enhed henvises til BenchMark IHC/ISH-instrumentets brugervejledning og brugsanvisningerne til alle nødvendige komponenter, som findes på [navifyportal.roche.com](http://navifyportal.roche.com).
10. Indhent oplysninger hos lokale og/eller statslige myndigheder vedrørende den anbefalede metode til bortskaffelse.
11. Mærkning af produktsikkerhed følger primært EU's GHS-vejledning. Sikkerhedsdatablade er tilgængelige efter anmodning for faglige brugere.
12. For at rapportere mistanke om alvorlige hændelser i forbindelse med denne enhed, skal du kontakte den lokale Roche-repræsentant og den kompetente myndighed i den medlemsstat eller det land, hvor brugeren har etableret sig.

Dette produkt indeholder komponenter klassificeret som følger i henhold til Forordning (EU) nr. 1272/2008:

Tab. 1. Fareoplysninger.

Fare	Kode	Sætning
	H317	Kan forårsage allergisk hudreaktion.
	H412	Skadelig for vandlevende organismer, med langvarige virkninger.
	P261	Undgå at indånde tåge eller dampe.
	P273	Undgå udledning til miljøet.
	P280	Bær beskyttelseshandsker.
	P333 + P313	Ved hudirritation eller udslet: Søg læge.
	P362 + P364	Alt tilsmudset tøj tages af og vaskes inden genanvendelse.
	P501	Indholdet/beholderen bortskaffes i et godkendt affaldsbehandlingsanlæg.

Dette produkt indeholder CAS-nr. 55965-84-9, reaktionsmasse af: 5-chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on og 2-methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1).

**FARVNINGSPROCEDURE**

VENTANA primære antistoffer er blevet udviklet til brug på BenchMark IHC/ISH-instrumenter i kombination med VENTANA-detektionskits og -tilbehør. Se Tab. 2 og Tab. 3 vedrørende anbefalede farvningsprotokoller.

Dette antistof er optimeret til specifikke inkubationstider, men brugeren skal validere resultater, der opnås med dette reagens.

Parametrene for de automatiserede procedurer kan vises, udskrives og redigeres i henhold til den procedure, der er beskrevet i instrumentets brugervejledning. Se det relevante metodeark til VENTANA-detektionskits for at få yderligere oplysninger om immunhistokemiske farvningsprocedurer.

For yderligere oplysninger om korrekt brug af denne enhed henvises til inline-dispenserens metodeark, som hører til P/N 805-4713 eller P/N 825-4713.

Tab. 2. Anbefalet farvningsprotokol for CINtec p16 Histology med *ultraView* Universal DAB Detection Kit på BenchMark IHC/ISH-instrumenter.

Proceduretype	Metode		
	GX	XT	ULTRA eller ULTRA PLUS
Afparaffinerings	Valgt	Valgt	Valgt
Cell Conditioning (Antigenafmaskning)	CC1, Standard	CC1, Standard	ULTRA CC1, 64 minutter 95 °C
Antistof (primært)	24 minutter, 37 °C	16 minutter, 37 °C	20 minutter, 36 °C
ultraBlock*	8 minutter	Ikke relevant	Ikke relevant
Kontrastfarve	Hematoxylin II, 4 minutter		
Efterfølgende kontrastfarve	Bluing, 4 minutter		

\* Brug af Antibody Diluent på ultraBlock-trinnet.

Tab. 3. Anbefalet farvningsprotokol for CINtec p16 Histology med OptiView DAB IHC Detection Kit på BenchMark IHC/ISH-instrumenter.

Proceduretype	Metode		
	GX	XT	ULTRA eller ULTRA PLUS
Afparaffinerings	Valgt	Valgt	Valgt
Cell Conditioning (Antigenafmaskning)	CC1, 32 minutter	CC1, 48 minutter	ULTRA CC1, 48 minutter 100 °C
Præ-primær peroxidaseinhibitor	Valgt	Valgt	Valgt
Antistof (primært)	8 minutter, 37 °C	8 minutter, 37 °C	12 minutter, 36 °C
Post-fiksativ*	8 minutter	Ikke relevant	Ikke relevant
Kontrastfarve	Hematoxylin II, 4 minutter		
Efterfølgende kontrastfarve	Bluing, 4 minutter		

\* Brug af Antibody Diluent på Post-Fixative-trinnet.

På grund af variationer i vævsfiksering og -behandling samt generelle forhold vedrørende laboratorieinstrumenter og -miljø kan det være nødvendigt at øge eller mindske inkubationstiden for det primære antistof, celleforbehandlingen eller proteaseforbehandlingen baseret på individuelle præparater, den anvendte detektion og læserpræferencer. For yderligere information om fikseringsvariabler henvises til »Immunohistochemistry Principles and Advances.«<sup>32</sup>

**NEGATIV REAGENSKONTROL**

Ud over farvning med CINtec p16 Histology skal et andet objektglas farves med det relevante negative kontrolreagens.

**POSITIV VÆVSKONTROL**

Bedst mulig laboratoriepraksis skal omfatte et positivt kontrolsnit på samme objektglas som testvævet. Dette hjælper med at identificere fejl i forbindelse med påføringen af reagens på objektglasset. Væv med svag positiv farvning er bedst egnet til kvalitetskontrol. Kontrolvæv kan indeholde både positive og negative farvningsselementer og kan benyttes både som positiv og negativ kontrol. Kontrolvæv skal være nye obduktions-, biopsi- eller kirurgisk præparat, der er klargjort eller fikseret så hurtigt som muligt på en måde, der er identisk med testsnittene.

Kendte positive vævskontroller må udelukkende benyttes til overvågning af reagensernes og instrumenternes funktion, og ikke som hjælp til at formulere en specifik diagnose for testprøver. Hvis de positive vævskontroller ikke udviser positiv farvning, skal resultaterne for testpræparaterne anses for ugyldige.

Eksempler på positive kontrolvæv for dette antistof er normal pancreas, normal tonsil og cervikalt karcinom.

Inden for normalt tonsilvæv er der cellekernefarvning og/eller cytoplasmisk farvning af spredte pladeepitelceller primært i kryptepitel og spredte follikulære dendritiske celler i germinalcentre og ingen farvning i størstedelen af lymfocytter (farvning af sjældne lymfocytter kan dog observeres).

**FORTOLKNING AF FARVNINGEN / FORVENTEDE RESULTATER**

Cellefarvningsmønstret for CINtec p16 Histology er cellekernefarvning og/eller cytoplasmisk farvning.

Overekspression af p16<sup>INK4a</sup>-biomarkøren i cervikale biopsiprøver vises i form af en diffus, kontinuerlig cellefarvning af basal- og parabasalcellelag i det cervikale pladeepitel, med eller uden farvning af de mellemliggende lag eller mellemlag til overfladelagene. Dette kontinuerlige, diffuse farvningsmønster repræsenterer positiv CINtec p16 Histology-status. Fokal farvning vises i form af ikke-kontinuerlig farvning af isolerede celler eller små celleklynger, især ikke på basal- og parabasalceller. Fokal farvning og ingen p16-farvning indikerer en negativ CINtec p16 Histology-status. p16-farvningsmønstret og CINtec p16 Histology-statuskriterierne fremgår af Tab. 4.

Tab. 4. CINtec p16 Histology-status og p16-farvningsmønstre.

CINtec p16 Histology-status	p16-farvningsmønster	Farvningsbeskrivelse
Positive	Diffust	Kontinuerlig cellefarvning af basal- og parabasalcellelag i det cervikale pladeepitel, med eller uden farvning af de mellemliggende lag eller mellemlag til overfladelagene
Negativ	Fokal	Farvning af isolerede celler eller små celleklynger, dvs. en ikke-kontinuerlig farvning, især ikke af basal- og parabasalceller
	Ingen p16-farvning	Negativ farvningsreaktion i pladeepitlet

**SPECIFIKKE BEGRÆNSNINGER**

CINtec p16 Histology udviser muligvis fibroblastisk og søjleformet epitelfarvning i cervikale væv, hvilket ikke forstyrrer fortolkningen.

OptiView-detektionssystemet er generelt mere følsomt end *ultraView*-detektionssystemet. Brugeren skal validere de resultater, der opnås med disse reagens- og detektionssystemer.

Patientvæv skal farves inden for 24 uger efter, at vævssnittene er udskåret fra vævsblokken. Farvning med CINtec p16 Histology på vævssnit, der har været opbevaret ved stuetemperatur i over 24 uger, er ikke verificeret.

Prøverne skal fikseres mindst 1 time i 10 % NBF, zinkformalin eller Z-fix, eller i mindst 3 timer i AFA. Brug af andre fikseringstider eller fiksativtyper end de anbefalede kan medføre falske negative resultater. Alkoholformalin og PREFER-fiksativ anbefales ikke sammen med denne analyse.

Alle analyser er ikke nødvendigvis registreret på alle instrumenter. Kontakt den lokale Roche-repræsentant for yderligere oplysninger.

**YDEEVNEKARAKTERISTIKA**

**ANALYTISK YDEEVNE**

Farvningsprøver for sensitivitet, specificitet, præcision og nøjagtighed blev udført, og resultaterne er anført nedenfor.

**Sensitivitet og specificitet**

Analytisk sensitivitet og specificitet blev bestemt ved at farve flere tilfælde af normalt og neoplastisk humant væv med CINtec p16 Histology. Resultaterne er anført i Tab. 5 og Tab. 6. Mange normalvæv udviste farvning af få celler eller specifikke celletyper som bemærket. Dette forventes pga. den rolle, som p16<sup>INK4a</sup>-proteinet spiller i cellecycklusregulering.

Tab. 5. Sensitivitet/specificitet for CINtec p16 Histology blev bestemt ved at teste normale FFPE-væv.

Væv	Antal positive tilfælde / tilfælde i alt	Positive celler i normalt væv
Cerebrum	4/4	Glialceller
Cerebellum	3/3	Purkinjeceller
Binyre	3/3	Adrenocorticale epitelceller
Ovarie	3/3	Stromale celler
Pancreas	3/3	Langerhanske øer, acinære celler

Væv	Antal positive tilfælde / tilfælde i alt	Positive celler i normalt væv
Lymfeknude	3/3	Lymfocytter, follikulære dendritiske celler
Glandula parathyroidea	2/3	Primære celler
Glandula pituitaria	3/3	Epitelceller, anterior pituitaria
Testis	3/3	Spermatogene celler, Leydig-celler
Thyroidea	3/3	Follikelceller
Bryst	3/3	Myoepitelceller, lumenale epitelceller, stromale celler
Milt	3/3	Lymfocytter, follikulære dendritiske celler
Tonsil	6/6	Pladeepitelceller, lymfocytter, follikulære dendritiske celler
Thymus	3/3	Retikulære epitelceller, lymfocytter, Hassall's blodlegemer
Knoglemarv	2/3	Myeloide celler
Lunge	3/3	Pneumocytter, bronchiale epitelceller
Hjerte	0/3	Ingen positive celler
Øsofagus	3/3	Pladeepitelceller
Mavesæk	3/3	Epitelceller, fundiske kirtler
Tyndtarm	3/3	Epitelceller
Colon	3/3	Epitelceller
Blindtarm	0/3	Ingen positive celler
Lever	0/3	Ingen positive celler
Spytkirtel	3/3	Stribede ductusepitelceller, serøse acinære celler
Svælg/mundhule	2/3	Respiratoriske epitelceller, stribede ductusepitelceller, acinære celler i slimhinde, serøse acinære celler
Nyre	3/3	Tubulære epitelceller, glomerulimesangiale celler
Prostata	3/3	Acinære celler, basalceller
Blære	3/3	Urotelceller
Endometrium	3/3	Kirtelceller i endometrium, stromale celler
Cervix <sup>a</sup>	1/120	Pladeepitelceller
Skeletmuskulatur	0/3	Ingen positive celler
Hud	0/3	Ingen positive celler
Nerve	4/4	Schwann-celler
Mesothelium	0/3	Ingen positive celler
Bløddel	3/3	Endotelceller, fibroblaster, duktale celler

<sup>a</sup> Væv, der evalueres, omfatter normalt cervix og kronisk cervicitis. Cervixtilfælde blev fortolket ud fra CINtec Histology-scoringalgoritmen, der registrerer normal plade- (fokal farvning), endocervikal eller stromal cellefarvning som negativ.

Tab. 6. Sensitivitet/specificitet for CINtec p16 Histology blev bestemt ved at teste en række forskellige neoplastiske FFPE-væv.

Patologi	Antal positive tilfælde / tilfælde i alt
Glioblastom (cerebrum)	1/1
Meningiom (cerebrum)	1/1
Ependymoma (cerebellum)	1/1
Oligodendrogliom (cerebellum)	1/1
Adenokarcinom (hoved og hals)	1/1
Pladecellekarcinom (hoved og hals)	0/1
Serøst karcinom (ovarie)	1/1
Granulosacelletumor (ovarie)	1/1
Teratom (ovarie)	1/1
Pankreatisk neuroendokrint neoplasme (pancreas)	1/1
Duktalt adenokarcinom (pancreas)	1/1
Seminom (testis)	1/1
Embryonalt karcinom (testis)	1/1
Follikulært karcinom (thyroidea)	1/1
Papillært karcinom (thyroidea)	0/1
Duktalt karcinom in situ (bryst)	1/1
Invasivt duktalt karcinom (bryst)	1/1
Invasivt lobulært karcinom (bryst)	1/1
Adenom (binyre)	1/1
Pheochromocytom (binyre)	1/1
Diffust storcellet B-cellelymfom (milt)	0/1
Pleomorft adenom (spytktitel)	1/1
Warthins tumor (spytktitel)	1/1
Småcellet karcinom (lunge)	1/1
Pladecellekarcinom (lunge)	0/1
Adenokarcinom (lunge)	1/1
Pladecellekarcinom (øsofagus)	0/1
Adenokarcinom (øsofagus)	1/1
Adenokarcinom (mavesæk)	1/1
Gastrointestinal stromal tumor (mavesæk)	1/1
Adenokarcinom (tyndtarm)	0/1
Gastrointestinal stromal tumor (tyndtarm)	1/1
Adenokarcinom (colon)	1/1
Pladecelleadenokarcinom (colon)	1/1
Karcinoid tumor (blindtarm)	1/1
Hepatocellulært karcinom (lever)	1/1
Kolangiokarcinom (lever)	0/1
Renalcellekarcinom (nyre)	1/2
Papillært nyreadenom (nyre)	1/1
Adenokarcinom (prostata)	2/2

Patologi	Antal positive tilfælde / tilfælde i alt
Clear cell-karcinom (uterus)	1/1
Endometrioidt karcinom (uterus)	1/1
Leiomyom (uterus)	0/1
Leiomyosarkom (uterus)	1/1
Cervikal intraepitelial neoplasia I (CIN I) (cervix)	12/37
CIN I-II, grænsetilfælde af lav/høj grad (cervix)	2/8
CIN II (cervix)	52/60
CIN II-III, høj grad (cervix)	1/3
CIN III (cervix)	65/67
Pladecellekarcinom (cervix)	73/76
Pladecelleadenokarcinom (cervix)	2/2
Adenokarcinom (cervix)	1/1
Neuroendokrint karcinom (cervix)	1/1
Alveolar rhabdomyosarkom (muskel)	0/1
Myksom (muskel)	1/1
Basalcellekarcinom (hud)	1/1
Invasivt melanom (hud)	1/1
Pladecellekarcinom (hud)	0/1
Schwannom (perifer nerve)	1/1
Neurofibrosarkom (nerve)	1/1
Anaplastisk storcellet lymfom (lymfeknude)	1/1
Follikulært lymfom (lymfeknude)	1/1
Hodgkin lymfom (lymfeknude)	1/1
Urotelcellekarcinom (blære)	1/1
Pladecellekarcinom (blære)	0/1
Plasmacytom (ekstramedullært)	1/1
Mesotheliom (mesothelium)	1/1
Fibros tumor i pleura (mesothelium)	1/1
Angiosarkom (bløddel)	1/1
Liposarkom (bløddel)	1/1

### Præcision mellem instrumenter

Der blev udført to forsøg for at vurdere præcisionen mellem instrumenter. Det ene forsøg blev udført på et BenchMark XT-instrument og et BenchMark ULTRA-instrument med *ultraView* Universal DAB Detection Kit, og det andet forsøg blev udført på et BenchMark ULTRA-instrument med *OptiView* DAB IHC Detection Kit.

I det første forsøg blev sektionerne fra to multivævsklodser indeholdende cervikalt pladecellekarcinom, tonsil og pancreas farvet på tre BenchMark XT-instrumenter og tre BenchMark ULTRA-instrumenter med *ultraView* Universal DAB Detection Kit (5 sektioner fra hver multivævsklods pr. instrument). p16-farvningsintensiteterne lå inden for 0.5 point af medianscoren i 100 % af alt væv ved farvning på tre BenchMark XT-instrumenter. p16-farvningsintensiteterne lå inden for 0.5 point af medianscoren i 100 % af cervikalt pladecellekarcinom (15/15), 93 % af tonsil (14/15) og 93 % af pancreas (14/15) ved farvning på tre BenchMark ULTRA-instrumenter. Alle væv farvet med CINtec p16 Histology udviste acceptabel baggrundsfarvning.

I andet forsøg blev CINtec p16 Histology-testens præcision besluttet på tre BenchMark ULTRA-instrumenter ved farvning af ens objektglas i 28 cervixtilfælde (otte normal cervix, seks CIN1, seks CIN2, fire CIN3 og fire cervikale karcinomtlfælde) med et *OptiView* DAB IHC-detektionskit. Hver sag blev farvet på hvert af de tre BenchMark ULTRA instrumenter med hvert af de tre lots af CINtec p16 Histology. I alt blev ni CINtec p16 Histology-farvede objektglas fra hvert tilfælde medtaget i forsøget (tre CINtec p16 Histology-lot, tre BenchMark ULTRA-instrumenter). Derefter blev hvert CINtec p16 Histology-farvede objektglas parret med et H&E-farvet objektglas fra samme tilfælde. Alle objektglas blev randomiseret og evalueret af én patolog, der blev blindet for tilfældets diagnose af p16-farvningsintensiteter, positiv eller negativ CINtec p16 Histology-status og -baggrund. Dataene viste, at 97.6 % af vævene havde en score for pletintensitet inden for 0.5 point på tværs af alle instrumenter. Derudover udviste 100 % af vævssnittene farvet med CINtec p16 Histology på tre BenchMark ULTRA-instrumenter den samme CINtec p16 Histology-status. Alle væv farvet med CINtec p16 Histology udviste acceptabel baggrundsfarvning. Mellemprecision mellem instrumenter blev bestemt på tre BenchMark ULTRA PLUS-instrumenter ved farvning af ens objektglas med 24 vævssnit fra cervix (elleve normal cervix, ét CIN1, to CIN2, syv CIN3 og tre pladecellekarcinom). Testobjektglassene blev randomiseret og evalueret af én patolog, der blev blindet for sagsdiagnosen vedrørende p16-farvningsintensiteter, positiv eller negativ CINtec p16 Histology-status og ikke-specifik farvning (baggrund). Den samlede procentoverensstemmelse var 99.3 %. Alle vævstyper farvet med CINtec p16 Histology udviste 100 % acceptabel morfologi og baggrundsfarvning.

### Præcision mellem lot

Præcision mellem lot for CINtec p16 Histology blev evalueret ved at teste tre CINtec p16 Histology-lot på et BenchMark ULTRA-instrument med *OptiView* DAB IHC Detection Kit. Udsnit fra hver af 26 cervikale biopsivævsprøver (seks normal cervix, seks CIN1, seks CIN2, seks CIN3 og to tilfælde af cervikalt karcinom) blev farvet i duplikat ved hjælp af hvert CINtec p16 Histology-lot. Hvert vævsobjektglas farvet med CINtec p16 Histology blev parret med et tilstødende H&E-objektglas og et negativt reagenskontrolobjektglas fra samme sag. Objektglassættene blev randomiseret og evalueret af én patolog, der var blindet for tilfældets diagnose og lotnummer. CINtec p16 Histology-status (positiv = diffus p16-farvning, negativ = fokal eller ingen p16-staining) blev bestemt ud fra CINtec p16 Histology-objektglasset. CIN-kategorierne [CIN2+ (CIN2, CIN3, adenokarcinom in situ eller invasivt karcinom kombineret til én kategori)/CIN1- (ingen CIN eller CIN1 kombineret til én kategori)] blev bestemt ud fra supplerende fortolkning af H&E- og CINtec p16 Histology-objektglassene. Resultaterne viser reproducerbarheden af CINtec p16 Histology på tværs af tre produktionslots af antistoffet. Alle tilfælde viste 100 % positiv og negativ overensstemmelse med CINtec p16 Histology-statusen og 98.7 % overensstemmelse med CIN-kategorien på de tre produktionslot. Der vises et sammendrag af dataene i Tab. 7. Baggrundsfarvningen var acceptabel i 100 % af de farvede vævstyper.

Tab. 7. Det primære antistofes reproducerbarhed mellem lot for CINtec p16 Histology på cervikale prøver i henhold til CINtec p16 Histology-status (positiv/negativ) og CIN-kategori (CIN2+/CIN1-).

Reproducerbarhed	Evaluering	Gennemsnitlig positiv overensstemmelse (n/N)	Gennemsnitlig negativ overensstemmelse (n/N)	Samlet procentvis overensstemmelse (n/N)
Lot til lot	CINtec Histology-status	100.0 % (352/352)	100.0 % (264/264)	100.0 % (308/308)
	CIN-kategori	98.1 % (314/320)	98.0 % (290/296)	98.1 % (302/308)

**Gentagelighed inden for samme dag og præcision mellem dage**

I alt blev der udført tre forsøg for at vurdere gentageligheden inden for samme dag og præcisionen mellem dage. I de første to forsøg evaluerede patologen vævssnit baseret på p16-farvningsintensiteter (0–4), mens der i det tredje forsøg blev evalueret CINtec p16 Histology-status (positiv/negativ) i cervikale biopsier.

I det første forsøg blev sektionerne fra to multivævsklodser indeholdende tre væv (cervikalt pladecellekarcinom, tonsil og pancreas) farvet på tre BenchMark XT-instrumenter med *ultraView* Universal DAB Detection Kit. I det andet forsøg blev to multivævsklodser indeholdende tonsil, pancreas og tre cervikale tilfælde (invasivt pladecellekarcinom, CIN1-, CIN2+) farvet på et BenchMark ULTRA-instrument med OptiView DAB IHC Detection Kit. Gentagelighed inden for samme dag af CINtec p16 Histology blev testet ved at farve 14 replikatsnit fra hver multivævsklods med CINtec p16 Histology. CINtec p16 Histology bestod godkendelseskriterierne med 100 % af vævsfarvningerne med 0.5 point af median farvningsintensitets scoren i begge forsøg. Præcisionen mellem dage blev testet i løbet af 5 ikke-fortløbende dage over en periode på minimum 20 dage. I begge disse forsøg bestod CINtec p16 Histology godkendelseskriterierne med 100 % af vævstypernes farvning inden for 0.5 point af medianfarvningsintensitetscoren for gentagelighed inden for samme dag og præcision mellem dage. Alle væv farvet med CINtec p16 Histology udviste acceptabel baggrund.

Tredje forsøg evaluerede 24 cervikale vævsprøver (tre cervikalt pladecellekarcinom, seks CIN3, seks CIN2, seks CIN1, tre normale cervikaltilfælde) efter CINtec p16 Histology-status (positiv/negativ) på et BenchMark ULTRA-instrument med OptiView DAB IHC Detection Kit. Testen forløb over 5 ikke-fortløbende dage over en periode på minimum 20 dage. Hver forsøgsdag blev to objektglas fra hvert tilfælde farvet med CINtec p16 Histology (150 objektglas i alt), og et objektglas fra hvert tilfælde blev farvet med en negativ reagenskontrol (75 objektglas i alt). Til analyser af gentageligheden inden for samme dag blev CINtec p16 Histology-status (positiv/negativ) sammenlignet mellem to evaluerbare objektglas fra samme tilfælde farvet inden for samme dag. Eftersom dette forsøg omfattede 5 dage, er det samlede antal sammenligninger for hvert tilfælde for gentagelighed inden for samme dag 5. Det samlede antal sammenligninger i præcisionsforsøget mellem dage var 120 (24 tilfælde x 5 sammenligninger pr. tilfælde). Resultaterne viste 100 % gentagelighed inden for samme dag, og 100 % præcision inden for samme dag blev evalueret ud fra CINtec p16 Histology-status. Alle vævssnit farvet med CINtec p16 Histology udviste acceptabel baggrundsfarvning.

Reproducerbarhed indenfor samme kørsel blev desuden bestemt ved farvning af 5 objektglas fra hvert af de 24 vævssnit fra cervix (elleve normal cervix, ét CIN1, to CIN2, syv CIN3 og tre pladecellekarcinom) på et BenchMark ULTRA PLUS-instrument. Testobjektglassene blev randomiseret og evalueret af én patolog, der blev blindet for sagsdiagnosen vedrørende p16-farvningsintensiteter, positiv eller negativ CINtec p16 Histology-status og ikke-specifik farvning (baggrund). Den samlede procentoverensstemmelse var 97.5 %. Alle vævstyper farvet med CINtec p16 Histology udviste 100 % acceptabel morfologi og baggrundsfarvning.

Dag til dag præcision blev desuden bestemt ved farvning af ens objektglas fra 24 vævssnit fra cervix (elleve normal cervix, ét CIN1, to CIN2, syv CIN3 og tre pladecellekarcinom) på et BenchMark ULTRA PLUS-instrument på 5 ikke-sammenhængende dage inden for mindst en 20-dagsperiode. Dag til dag-præcision var 98.8 %. Alle vævstyper farvet med CINtec p16 Histology udviste 100 % acceptabel morfologi og baggrundsfarvning.

**Nøjagtighed mellem platforme og mellem detektionskits**

Analysenøjagtighed blev fastslået på BenchMark ULTRA-, BenchMark XT- og BenchMark GX-platforme med OptiView DAB IHC Detection Kit og *ultraView* Universal DAB Detection Kit. Samlet set blev 186 cervikale tilfælde farvet med CINtec p16 Histology og evalueret for CINtec p16 Histology-status (positiv/negativ) og baggrund (acceptabel/uacceptabel). OPA var 98.3-100 % for hver parvis kombination af platforme inden for samme detektionskit, og hver parvis kombination af detektionskits inden for samme platform. Alle evaluerbare tilfælde farvet med CINtec p16 Histology udviste acceptabel baggrundsfarvning.

En undersøgelse blev desuden udført for at sammenligne farvningspræstationen for CINtec p16 Histology, ved hjælp af OptiView DAB IHC Detection Kit på BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet versus BenchMark ULTRA-instrumentet. Et hundrede og tyve (120) tilfælde af cervikalt væv (60 positive for CINtec p16 Histology og 60 negative for CINtec p16 Histology) blev farvet, og de farvede objektglas blev evalueret af en patolog, som bestemte status for CINtec p16 Histology. Den samlede procentoverensstemmelse var 99.1 %. Alle vævstyper farvet med CINtec p16 Histology udviste 100 % acceptabel morfologi og baggrundsfarvning.

Præcision inden for samme læser og mellem læsere

Præcision inden for samme læser og mellem læsere blev evalueret på 50 cervikale tilfælde (16 normal cervix, 12 CIN1, 12 CIN2, 6 CIN3 og 4 cervikalt karcinom) farvet med CINtec p16 Histology på et BenchMark ULTRA-instrument med OptiView DAB IHC Detection Kit.

Alle objektglas blev randomiseret og efterfølgende evalueret af tre patologer for positiv/negativ CINtec p16 Histology-status. Patologerne blev blindet for diagnosen for det enkelte vævssnit. De CINtec p16 Histology-farvede objektglas blev genrandomiseret med henblik på en sekundær evaluering af CINtec p16 Histology-status af hver af de tre patologer efter en 4 uger lang udvaskningsperiode. Den samlede procentvise overensstemmelse for præcision inden for samme læser og mellem læsere for CINtec p16 Histology-status var 98.7 % som vist i Tab. 8.

I forsøget med præcision inden for samme læser og mellem læsere for CIN-kategori blev hvert CINtec p16 Histology-objektglas parret med et H&E-farvet objektglas samme tilfælde, hvorefter de parrede objektglassæt blev randomiseret. CIN-kategori (CIN2+/CIN1-) blev evalueret af tre patologer ud fra supplerende fortolkning af H&E-farvede og CINtec p16 Histology-farvede objektglas. Efter en udvaskningsperiode på mindst 4 uger blev objektglaspar genrandomiseret, og en anden evaluering af CIN-kategorien blev udført af hver af de tre patologer. Dataene i Tab. 8 viser, at den samlede procentvise overensstemmelse for præcision inden for samme læser og mellem læsere for CIN-kategorien var hhv. 98.0 % og 90 %.

Tab. 8. Præcisionen inden for samme læser og mellem læsere for CINtec p16 Histology-analysen på cervikale prøver ud fra CINtec p16 Histology-status (positiv/negativ) og CIN-kategori (CIN2+/CIN1-).

Læserpræcision	Evaluering	Gennemsnitlig positiv overensstemmelse (95 % CI)	Gennemsnitlig negativ overensstemmelse (95 % CI)	Samlet procentvis overensstemmelse (95 % CI)
For samme læser	CINtec p16 Histology-status	98.7 % (93.9–100.0 %)	98.6 % (93.0-100.0 %)	98.7 % (94.0-100.0 %)
	CIN-kategori	97.4 % (89.1-100.0 %)	98.4 % (92.6-100.0 %)	98.0 % (92.0-100.0 %)
Fra læser til læser	CINtec p16 Histology-status	98.7 % (93.1-100.0 %)	98.6 % (92.3-100.0 %)	98.7 % (93.9–100.0 %)
	CIN-kategori	87.0 % (71.8-97.6 %)	91.9 % (83.0-98.5 %)	90.0 % (80.0-98.0 %)

**Reproducerbarhedsforsøg (forsøg med præcision mellem laboratorier)**

Der blev udført et forsøg med reproducerbarhed mellem laboratorier for CINtec p16 Histology for at påvise analysens reproducerbarhed i at bestemme CINtec p16 Histology-status og CIN-kategori ud fra 27 cervikale tilfælde (10 uden CIN, 5 med CIN1, 5 med CIN2, 5 med CIN3 og 2 tilfælde med cervikalt karcinom), der blev kørt på tre BenchMark ULTRA-instrumenter i løbet af tre ikke-fortløbende dage på tre eksterne laboratorier. Prøverne blev randomiseret og evalueret af i alt seks patologer (to patologer/sted) for både CINtec p16 Histology-status (positiv/negativ) og for CIN-kategori (CIN2+/CIN1-) baseret på supplerende fortolkning af de H&E-farvede og CINtec p16 Histology-farvede objektglas. Patologerne blev blindet for diagnosen for det enkelte vævsnit. Resultaterne af CINtec p16 Histology-status og CIN-kategori fremgår af hhv. Tab. 9 og Tab. 10. Derudover var morfologiacceptabilitetsgraden og baggrundsfarvningsacceptabilitetsgraden for alle seks patologer på alle laboratorier hhv. 96.3 % og 97.1 %. Dataene indikerer fremragende overensstemmelse mellem analysens reproducerbarhed på tværs af laboratorier, dage og patologer.

Tab. 9. Reproducerbarhed mellem laboratorier: overensstemmelsesrate for CINtec p16 Histology-status (positiv/negativ) i cervikale prøver.

Overensstemmelsesrater for Reproducerbarhed mellem laboratorier (CINtec p16 Histology-status)	Gennemsnitlig positiv overensstemmelse	Gennemsnitlig negativ overensstemmelse	Samlet procentvis overensstemmelse
Mellem laboratorier (3 laboratorier)	96.2 % (91.2-99.3 %)	93.9 % (86.3-99.0 %)	95.3 % (90.6-99.2 %)
Mellem dage (3 ikke-fortløbende dage)	98.2 % (95.9-99.7 %)	97.1 % (93.3-99.5 %)	97.8 % (95.5-99.5 %)
Mellem læsere (2 læsere pr. laboratorie)	95.5 % (87.8-100.0 %)	92.9 % (82.6-100.0 %)	94.4 % (87.1-100.0 %)

Tab. 10. Reproducerbarhed mellem laboratorier: overensstemmelsesrate for CIN-kategori (CIN2+/CIN1-) af cervikale prøver ud fra supplerende fortolkning af H&E-farvede og CINtec p16 Histology-farvede objektglas.

Overensstemmelsesrater for Reproducerbarhed mellem laboratorier (CIN-kategori)	Gennemsnitlig positiv overensstemmelse	Gennemsnitlig negativ overensstemmelse	Samlet procentvis overensstemmelse
Mellem laboratorier (3 laboratorier)	94.4 % (86.8-98.8 %)	94.1 % (86.7-98.6 %)	94.3 % (88.5-98.6 %)
Mellem dage (3 ikke-fortløbende dage)	96.9 % (93.1-99.2 %)	96.6 % (93.0-99.1 %)	96.8 % (94.0-99.1 %)
Mellem læsere (2 læsere pr. laboratorie)	95.0 % (87.4-98.9 %)	94.8 % (88.6-98.9 %)	94.9 % (89.3-98.7 %)

**KLINISK PRÆSTATION**

**Diagnostisk overensstemmelse**

CERvical Tissue Adjunctive aNalysis (CERTAIN)-forsøget blev udført for at påvise, at den supplerende læsning af CINtec p16 Histology resulterer i forbedret konsistens i diagnosticeringen af cervikal intraepitelial neoplasia (CIN), overensstemmelsesniveauer mellem Community Pathologists (CP) og Expert Pathologists (XP) aflæsninger af væv fra cervikale udstansningsbiopsier.

Den kliniske undersøgelse CERTAIN blev udført på 1100 retrospektivt indsamlede FFPE cervikale udstansningsbiopsipræparater, som repræsenterer en kolposkopi-henvisningspopulation. En XP-referencediagnose blev fastlagt for hvert forsøgstilfælde ud fra kun H&E-farvede objektglas og ud fra H&E- og CINtec p16 Histology-farvede objektglas. To XP'er udførte hver sin diagnose (ingen CIN, CIN1, CIN2, CIN3, adenokarcinom in situ eller invasivt karcinom) ud fra de H&E-farvede objektglas i hvert af

de 1100 tilfælde. Patologerne fik følgende kliniske oplysninger: patientens alder, Pap-cytologiresultat og HPV-prøveresultat (hvis tilgængeligt). Uoverensstemmende tilfælde blev evalueret af en tredje XP. I tilfælde, hvor en flertalsafgørelse på to ud af tre ikke kunne opnås, blev tilfældet afgjort ved en fællesvurdering med alle tre XP'er. Flertals-/konsensusafgørelser fastlagde XP-referencediagnosen for hvert tilfælde, der skulle evalueres i forsøget (kaldet XP1 eller H&E-referencediagnose). Efter en mindst fire uger lang udvaskningsperiode evaluerede de samme XP'er både de H&E- og CINtec p16 Histology-farvede objektglas med henblik på en diagnose: ingen CIN; LSIL-histologi/CIN1; HSIL-histologi/CIN2; HSIL-histologi/CIN3; adenokarcinom in situ eller invasivt karcinom; (kaldet XP2 eller H&E + CINtec p16 Histology-referencediagnosen). Processen med at etablere majoritetsdiagnoserne var den samme som den, der blev brugt til at etablere referencediagnosen på kun H&E-farvede objektglas. 70 (halvfjerds) certificerede CP'er fra hele USA deltog i forsøget. I første runde (runde 1, CP1) blev de 1100 H&E-farvede tilfælde opdelt i fire aflæsningsæt a 275 tilfælde med ensartede fordelinger af individuelle diagnostiske kategorier pr. referencediagnose. De 70 CP'er blev opdelt i fire grupper a 17 eller 18 patologer. I hvert tilfælde inden for deres tildelte aflæsningsæt fik patologerne følgende kliniske oplysninger: patientens alder, Pap-cytologiresultat og HPV-prøveresultat (hvis tilgængeligt). CP'erne stillede uafhængigt af hinanden deres diagnoser af de H&E-farvede objektglas for hvert tildelte tilfælde: ingen CIN; CIN1; CIN2; CIN3; adenokarcinom in situ eller invasivt karcinom. Hver undersøgelsescase blev individuelt læst af enten 17 eller 18 certificerede patologer.

I anden runde (runde 2, CP2) aflæste CP'erne de H&E-farvede objektglas sammen med de parrede og tilsvarende CINtec p16 Histology-farvede objektglas i samme sæt af tilfælde inden for deres tildelte aflæsningsæt. Efter en mindst 4 uger lang udvaskningsperiode mellem periode 1 og 2 stillede patologerne uafhængigt af hinanden deres diagnoser: ingen CIN; LSIL-histologi/CIN1; HSIL-histologi/CIN2; HSIL-histologi/CIN3; adenokarcinom in situ eller invasivt karcinom. CP'erne bestemte CINtec p16 Histology-status (CINtec p16 Histology positiv = diffus p16-farvning; CINtec p16 Histology negativ = fokal eller ingen p16-farvning), sammen med deres histologiske diagnose ved hjælp af både det H&E-farvede objektglas og det CINtec p16 Histology-farvede objektglas. Det primære formål med dette forsøg var at påvise forbedring af diagnostisk overensstemmelse uden at kompromittere den positive procentvise overensstemmelse, dvs. sandsynligheden for, at et positivt testresultat stemmer overens med en diagnose på  $\geq$  CIN2 (CIN2, CIN3, adenokarcinom in situ eller invasivt karcinom kombineret i en enkelt kategori) eller  $\leq$  CIN1 (ingen CIN eller CIN1 kombineret i en enkelt kategori) baseret på H&E-farvede objektglas (runde 1) sammenlignet med fortolkning af de H&E-farvede objektglas sammen med CINtec p16 Histology-farvede objektglas (runde 2).

**Forbedring af den diagnostiske nøjagtighed hos ekspertpatologer**

Forbedringen af den diagnostiske nøjagtighed hos ekspertpatologer blev bestemt ved at sammenligne ekspertpatologens H&E-referencediagnose (XP1) med ekspertpatologens H&E og CINtec p16 Histology-referencediagnosen (XP2). Analysen blev udført på fortolkningen af alle 1100 cervikale biopsier. Forbedringen af den diagnostiske nøjagtighed mellem H&E-referencediagnosen af ekspertpatologer og H&E- og CINtec p16 Histology-referencediagnosen af ekspertpatologer fremgår af Tab. 11. Ved brug af H&E og CINtec p16 Histology i den diagnostiske fortolkning af cervikale biopsier identificerede XP'erne 23.7 % flere  $\geq$  CIN2-tilfælde sammenlignet med diagnostisk fortolkning kun med H&E.

Tab. 11. Overensstemmelse mellem H&E-referencediagnose og H&E- og CINtec p16 Histology-referencediagnose for alle tilfælde.

		H&E-referencediagnose					I alt
		Ingen CIN	CIN1	CIN2	CIN3	ACIS* eller cancer	
H&E + CINtec p16 Histology-referencediagnose	Ingen CIN	693	13	4	0	0	710
	LSIL-histologi	46	120	4	1	0	171
	HSIL-histologi	30	31	83	69	1	214
	ACIS* eller cancer	0	0	0	0	5	5

	H&E-referencediagnose					I alt
	Ingen CIN	CIN1	CIN2	CIN3	ACIS* eller cancer	
I alt	769	164	91	70	6	1100

\* ACIS: adenokarcinom in situ

**Certificerede patologers fortolkning med H&E versus H&E og CINtec p16 Histology sammenlignet med en H&E-referencediagnose fra en ekspertpatolog**

Den diagnostiske overensstemmelse mellem certificerede patologer blev bestemt ved at sammenligne resultaterne fra de certificerede patologers H&E-diagnoser i runde 1 (CP1) med ekspertpatologens H&E-referencediagnose (XP1) samt de certificerede patologers H&E + CINtec p16 Histology-diagnoser i runde 2 (CP2) med ekspertpatologens H&E-referencediagnose (XP1). Overensstemmelsesrater og konfidensintervallerne (CI) i gennemsnit på tværs af sag og læser er vist i Tab. 12. Der blev observeret en statistisk signifikant stigning i PPA – metoden til detektion af  $\geq$  CIN2-læsioner (+6.8 % med 95 % CI: 4.7 % til 9.0 %). Derudover steg den negative procentoverensstemmelse (NPA) for detektion af  $\leq$  CIN1 med 1.3 % og 95 % CI: 0.5 % til 2.3 %.

Tab. 12. Positive og negative overensstemmelsesrater hos certificerede patologers aflæsninger af H&E-farvede objektglas versus H&E-farvede objektglas og CINtec p16 Histology-farvede objektglas med H&E-referencediagnose fra ekspertpatolog (XP1).

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

Bemærk: Differencen er ikke lig 1.4 % pga. en nedrundingsfejl: H&E = 90.44 %, H&E + CINtec Histology = 91.76 %, difference = 1.32 %.

Fig. 2 viser en graf over den diagnostiske nøjagtighed af de individuelle certificerede patologer ved diagnosticering af  $\geq$  CIN2 versus  $\leq$  CIN1 med H&E-farvede objektglas alene versus H&E-farvede objektglas sammen med CINtec p16 Histology-farvede objektglas sammenlignet med H&E-referencediagnosen fra ekspertpatologen. PPA og NPA (negativ procentoverensstemmelse, dvs. overensstemmelsen mellem et negativt testresultat med  $\leq$  CIN1 af XP1) af fortolkningen for hver patolog i runde 1 (kun H&E-farvede objektglas – blå cirkler) versus runde 2 (H&E-farvede objektglas sammen med CINtec p16 Histology-farvede objektglas – røde trekanter) vises. Prædiktionsellipserne angiver omfanget af PPA- og NPA-udførelse, der forventes for de fleste patologer: 80 % inden for ellipserne, og 20 % uden for ellipserne. Disse data viser, at fortolkningen af cervikale biopsier med H&E sammen med CINtec p16 Histology-farvede objektglas forbedrer den diagnostiske overensstemmelse og reducerer variabiliteten mellem læsere.

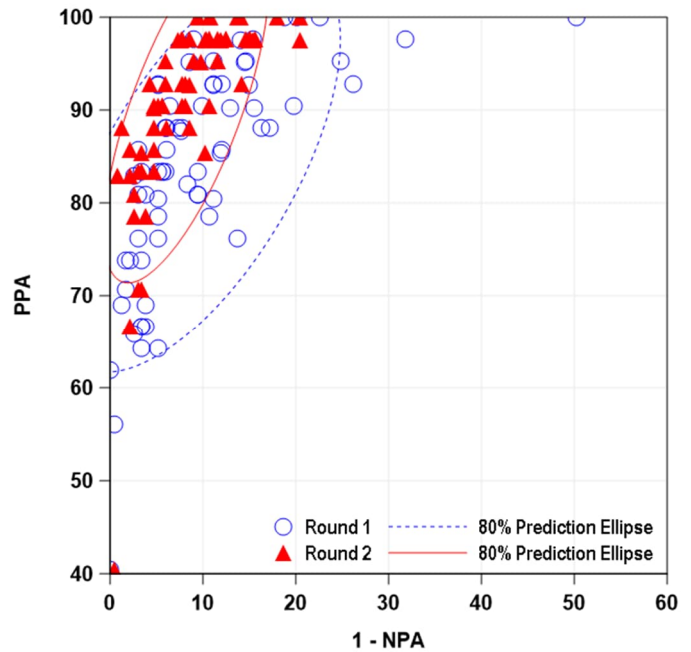


Fig. 2. Oversigtsdiagram over diagnostisk overensstemmelse (PPA versus 1-NPA) for certificerede patologer ved diagnosticering af  $\geq$  CIN2 versus  $\leq$  CIN1 med H&E alene (runde 1) og H&E + CINtec p16 Histology (runde 2) sammenlignet med H&E-referencediagnose fra ekspertpatolog (XP1) (80 %-prædiktionsellipser udarbejdet ud fra antagelsen om bivariat normalitet).

**Certificerede patologers fortolkning med H&E versus H&E og CINtec p16 Histology sammenlignet med en H&E + CINtec p16 Histology-referencediagnose fra en ekspertpatolog**

Dernæst blev aflæsningerne fra de certificerede patologer (H&E + CINtec p16 Histology versus H&E alene) sammenlignet med referencediagnosen (XP2) fra ekspertgynækopatologerne med H&E og CINtec p16 Histology-farvede objektglas. Ekspertpatologerne blev blindet for resultaterne af deres første individuelle aflæsning og H&E-referencediagnosen med konsensus. Processen med at etablere konsensusdiagnoserne var den samme som for at etablere H&E-referencediagnosen ovenfor.

De certificerede patologers aflæsningsresultater med H&E-farvede objektglas alene versus H&E-farvede objektglas sammen med CINtec p16 Histology-farvede objektglas blev analyseret og sammenlignet med ekspertpatologens H&E- og CINtec p16 Histology-referencediagnose (Tab. 13). Disse data viser en statistisk signifikant stigning i PPA (+11.5 % med 95 % CI: 9.3 % til 13.5 %) og NPA (+3.0 % med 95 % CI: 2.2 % til 3.7 %).

Tab. 13. Positive (PPA) og negative (NPA) overensstemmelsesrater for de certificerede patologers aflæsninger af H&E-farvede objektglas versus H&E-farvede objektglas og CINtec p16 Histology-farvede objektglas med ekspertpatologens H&E- og CINtec p16 Histology-referencediagnose (XP2).

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

Fig. 3 viser en graf over den diagnostiske nøjagtighed af de individuelle certificerede patologer ved diagnosticering af  $\geq$  CIN2 versus  $\leq$  CIN1 med H&E-farvede objektglas alene versus H&E-farvede objektglas med CINtec p16 Histology-farvede objektglas

sammenlignet med H&E + CINtec p16 Histology-referencediagnosen fra ekspertpatologen. PPA og NPA for hver patologis fortolkning i runde 1 (kun H&E – blå cirkler) versus runde 2 (H&E og CINtec p16 histologi – røde trekanter) vises. Prædiktionsellipserne angiver omfanget af PPA- og NPA-ydelse, der forventes for de fleste patologer: 80 % inden for ellipserne, og 20 % uden for ellipserne. Disse data viser, at fortolkningen af cervikale biopsier med H&E sammen med CINtec p16 Histology-farvede objektglas forbedrer den diagnostiske konsistens og reducerer variabiliteten mellem læsere.

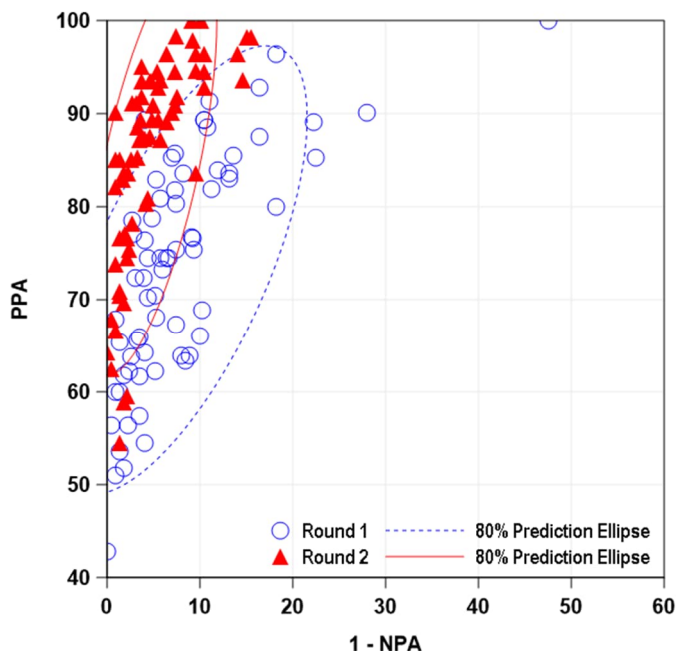


Fig. 3. Oversigtsdiagram over diagnostisk overensstemmelse (PPA versus 1-NPA) for certificerede patologer ved diagnosticering af  $\geq$  CIN2 versus  $\leq$  CIN1 med H&E alene (runde 1) og H&E og CINtec p16 Histology (runde 2) sammenlignet med H&E og CINtec p16 Histology-referencediagnose fra ekspertpatolog (XP2) (80 %-prædiktionsellipser udarbejdet ud fra antagelsen om bivariat normalitet).

**Farvningsydelse med CINtec p16 Histology**

Det sekundære formål med dette forsøg var at vurdere farvning for CINtec p16 Histology-analysen som bestemt af laboratoriepatologer ved gennemgang af de objektglas, der blev anvendt i forsøget. De 70 laboratoriepatologer afgav i alt 19250 CINtec p16 Histology-statusfortolkninger under forsøget. De vurderede farvningskriterier var: samlet farvningsacceptabilitet, baggrundsfarvningsacceptabilitet og morfologisk acceptabilitet. Resultaterne viser en acceptabilitetsprocent på > 99 % for alle farvningskriterier (Tab. 14).

Tab. 14. Farvning med CINtec p16 Histology.

Slutpunkt	Antal fortolkninger – n/N	Procent
Farvningsacceptabilitet	19074 / 19250	99.09 %
Morfologisk acceptabilitet	19249 / 19250	99.99 %
Baggrundsfarvningsacceptabilitet	19249 / 19250	99.99 %

**Konklusioner**

Anvendelsen af CINtec p16 Histology-farvede objektglas som supplement til fortolkningen af H&E-farvede objektglas øger den diagnostiske overensstemmelse ved detektion af høj grad af CIN-læsioner ( $\geq$  CIN2) i cervikale udstansningsbiopsier. Denne forbedrede overensstemmelse er drevet af både stigninger i PPA (overensstemmelsen af et positivt testresultat med  $\geq$  CIN2-diagnose) og NPA (overensstemmelsen af et negativt testresultat

med CIN1 eller ingen CIN-diagnose). Endvidere forbedres konsistensen af diagnoser indbyrdes mellem certificerede patologer og med et ekspertpanel.

**REFERENCER**

- 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.
- Tsoumpou 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.
- 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.
- 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.
- 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.

**BEMÆRK:** Der anvendes altid et punktum i dette dokument som decimaltegn til markering af grænsen mellem det hele tal og de efterfølgende decimaler. Der anvendes ikke tusindtalsseparatorer.

Sammenfatningen af sikkerhed og ydeevne kan findes her:

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

### Symboler

Ventana bruger følgende symboler og tegn ud over dem, der er anført i ISO 15223-1-standard (for USA: Se [elabdoc.roche.com/symbols](https://elabdoc.roche.com/symbols) for yderligere oplysninger).

**GTIN** GTIN (Global Trade Item Number (globalt vareidentifikationsnummer))

Rx only For USA: Forsigtig: Ifølge amerikansk føderal lovgivning må dette udstyr kun sælges af eller efter ordination fra en læge.

### REVISIONSHISTORIK

Rev	Opdateringer
H	Afsnittet Advarsler og forholdsregler er blevet opdateret med Rx only-meddelelse, opdateret til den aktuelle skabelon.

### OPHAVSRET

VENTANA, BENCHMARK, CINTEC, OPTIVIEW og ULTRAVIEW er varemærker tilhørende Roche. Alle andre varemærker tilhører deres respektive ejere.

© 2024 Ventana Medical Systems, Inc.

For USA: Rx only

### KONTAKTOPLYSNINGER



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](http://www.roche.com)



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



0123