

CINtec® PLUS Cytology Kit

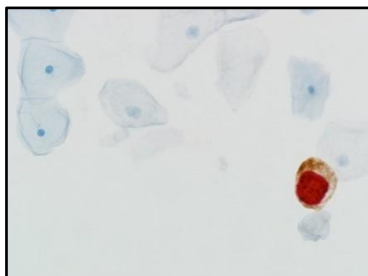
REF

605-100

06889565001

IVD

100



Obrázok 1. Cervikálna epiteliálna bunka pozitívna na p16^{INK4a} (hnedé cytoplazmatické farbenie) a na Ki-67 (červené nukleárne farbenie).

URČENÉ POUŽITIE

Súprava CINtec PLUS Cytology Kit je imunocytochemická analýza určená na laboratórne použitie na simultánnu kvalitatívnu detekciu proteínov p16^{INK4a} a Ki-67 v preparátoch z cervikálnej cytologie farbených v prístroji BenchMark IHC/ISH. Je určená na používanie ako pomôcka pri identifikácii žien s cervikálnymi intraepiteliálnymi léziami vysokého stupňa u skríningovej populácie a u podskupín pacientov s výsledkom Pap cytologie ASC-US (atypické skvamózne bunky neurčeného významu) alebo LSIL (skvamózna intraepiteliálna lézia nízkého stupňa),

pripadne u pacientov s pozitívnymi výsledkami testu na vysokorizikový ľudský papilomavírus.

Výsledky testov môže interpretovať výlučne certifikovaný odborník v spojení s klinickou anamnézou pacienta a ďalšími vykonanými diagnostickými testami.

Produkt je určený na diagnostické použitie in vitro (IVD).

SÚHRN A VYSVETLENIE

V eukaryotických bunkách je kontrola priebehu cyklu delenia buniek regulovaná komplexným vzorom kontrolovanej expzie a posttranslačnými modifikáciami proteínov regulujúcich bunkový cyklus. Hlavnú úlohu v tomto mechanizme regulácie eukaryotického bunkového cyklu zohráva proteín p16^{INK4a}. Je súčasťou kontroly fázového prechodu G1 na S, ktorú sprostredkovať proteín retinoblastómu (pRb), a spúšťa zastavenie bunkového cyklu v priebehu procesov bunkovej diferenciácie. p16^{INK4a} tak zabezpečuje antiproliferačný účinok počas bežnej progresie bunkového cyklu.¹ V terminálne diferencovaných epiteliálnych bunkách je expresia p16^{INK4a} znížená na úroveň, ktorá sa zvyčajne nedá detegovať imunocytochémiou (ICC).²

Pri dysplázii krčka maternice sa nadmerná expresia p16 považuje za náhradný biomarker transformujúcich sa infekcií HPV, ktorý odráža aktiváciu proliferácie buniek riadenej onkoproteínom HPV E6/E7.^{2,3,4,5} Detekcia p16 v preparátoch cervikálnej cytologie bola navrhnutá ako cenný doplnkový marker na triáž žien s abnormálnymi výsledkami Pap cytologie, ako aj s pozitívnymi výsledkami HPV testov.^{3,4,5} Avšak vzhľadom na to, že farbenie špecifické pre p16 možno pozorovať v jednotlivých metaplastických alebo endocervikálnych bunkách, v ktorých môže byť p16 exprimovaný, aby mohol vykonávať svoju normálnu fyziologickú bunkovú funkciu potláčajúcu rast, interpretácia preparátov cervikálnej cytologie s jedným farbením p16 vyžaduje identifikáciu imunoreaktívnych buniek p16 a ďalšiu klasifikáciu týchto buniek vzhľadom na znaky morfológických abnormalít.^{2,3,4}

Kombinovaná súbežná detekcia p16 a proliferáčného markera Ki-67 v tej istej bunke pomocou ICC sa ukázala ako cenný nástroj na identifikáciu dysplastických buniek krčka maternice v cytologických preparátoch bez potreby morfologickej interpretácie.^{3,7,8} Ki-67 je jadrový a jadrový proteín striktné spojený s proliferáciou buniek a v pokojových (G0) bunkách je štandardnými imunofarbiacimi metódami nedetegovateľný.⁶ Za normálnych fyziologických podmienok sa expresia proteínu Ki-67 spojeného s proliferáciou navzájom vylučuje s antiproliferačným proteínom p16. Naopak, bunky, v ktorých sa dráha sprostredkovaná retinoblastómovým proteínom (pRb) kontrolujúca progresiu bunkového cyklu naruší pred funkciou nádorového supresora p16 (ako napríklad v epiteliálnych bunkách exprimujúcich vysokorizikové onkoproteíny HPV E6/E7), môžu proliferovať, a teda exprimovať Ki-67 v prítomnosti funkčného p16.^{2,3}

Detekcia jednotlivých buniek v preparátoch cervikálnej cytologie, ktoré súčasne exprimujú p16 a Ki-67, môže slúžiť ako morfológicky nezávislý indikátor buniek s dysreguláciou bunkového cyklu. Táto spoločná expresia proteínov p16 a Ki-67 sa môže využiť ako ukazovateľ prítomnosti transformujúcich sa infekcií HPV a základnej cervikálnej intraepiteliálnej neoplázie.^{2,3} Pred krátkym časom boli vykonané a zverejnené početné štúdie hodnotiace potenciálnu hodnotu a klinickú užitočnosť cytologie proteínov p16/Ki-67 s dvojitém farbením pri identifikácii žien, pre ktoré môže byť prínosom odporúčanie na kolposkopiu na základe rôznych primárnych skríningových výsledkov rakoviny krčka maternice. Tieto výsledky zahŕňajú triáž žien s výsledkami Pap cytologie Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance (ASC-US) alebo Low grade Squamous Intraepithelial Lesion (LSIL), ženy, ktoré sú pozitívne na vysokorizikový ľudský papilomavírus v primárnom skríningu HPV, alebo ženy, ktoré sú Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy (NILM)/pozitívne na HPV v klinických podmienkach, kde sa na primárny skríning používa ktestovanie Pap cytologie/HPV.⁷⁻²⁵

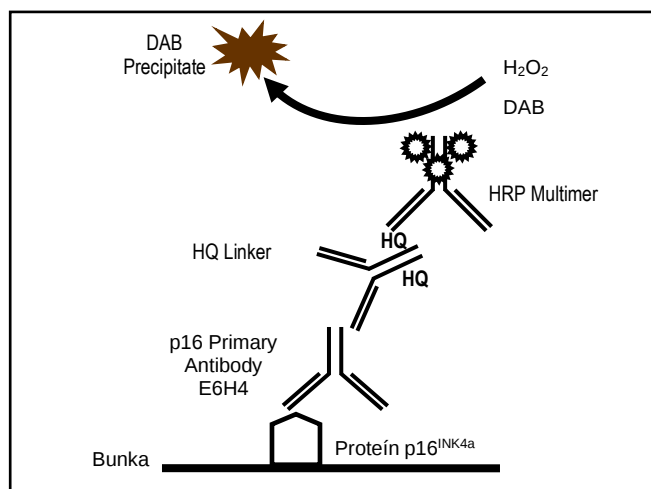
PRINCÍP POSTUPU

Súprava CINtec PLUS Cytology Kit obsahuje súpravu reagentov na simultánnu imunocytochemickú detekciu proteínov p16^{INK4a} a Ki-67 v cytologických vzorkách získaných z krčka maternice. Proteíny sa detegujú pomocou koktailu primárnych monoklonálnych protilátok pripraveného na použitie, ktorý obsahuje myšiu rekombinantnú monoklonálnu protilátku namierenú proti ľudskému proteínu p16^{INK4a} (klon E6H4TM) a primárnu rekombinantnú králičiu protilátku namierenú proti ľudskému proteínu Ki-67 (klon 274-11AC3V1). Po úprave buniek, inhibícii endogénnej aktivity peroxidázy a inkubácii s koktailom primárnych protilátok test využíva dva detekčné systémy pripravené na použitie, optimalizované na použitie na vzorkách cervikálnej cytologie:

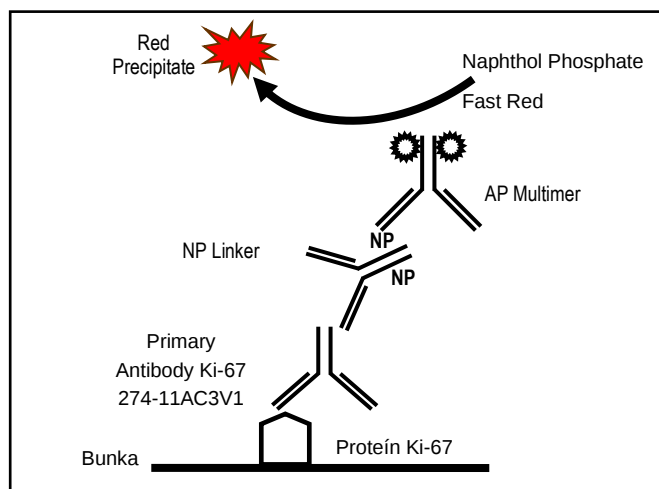
- Kozia anti-myšia sekundárna protilátka kovalentne naviazaná na HQ haptény (proprietárny haptén) a anti-HQ haptén, terciárna protilátka konjugovaná s chrenovou peroxidázou (HRP) optimalizovaná na detekciu monoklonálnej myšej protilátky klonu E6H4;
- Kozia antikráličia sekundárna protilátka kovalentne naviazaná na NP haptény (proprietárny haptén) a anti-NP haptén, terciárna protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatázou (AP) optimalizovaná na detekciu králičej rekombinantnej protilátky klonu 274-11AC3V1.

Chromogénne reakcie sú založené na konverzii 3,3'-diaminobenzidín tetrahydrochloridu (DAB) sprostredkovanou HRP a konverzii Fast Red sprostredkovanou AP s Naphthol Phosphate, ktorých výsledkom je hnedá zrazenina v mieste antigénu p16^{INK4a} a červená zrazenina v mieste antigénu Ki-67.

Po automatickom kontrastnom farbení a farbení modrou nasleduje dvojstupňový postup montáže. Najprv sa namontuje sklčko pomocou vodného montážneho média. Potom sa na sklčko umiestni krycie sklčko pomocou permanentného montážneho média. Výsledky farbenia sa vyhodnotia kontrolou svetelnou mikroskopiou.



Obrázok 2. Detekcia ľudského proteínu p16^{INK4a}.



Obrázok 3. Detekcia ľudského proteínu Ki-67.

DODÁVANÝ MATERIÁL

Cytologická súprava CINtec PLUS Cytology Kit obsahuje dostatok reagensie na 100 testov.

Jeden 10 mL dávka	CINtec PLUS Cytology Primary Antibody Cocktail (p16/Ki-67) obsahuje koktail klonu rekombinantnej myšej monoklonálnej protilátky E6H4 namierenej proti ľudskému proteínu p16 ^{INK4a} a primárnej rekombinantnej králičej protilátky klonu 274-11AC3V1 namierenej proti ľudskému proteínu Ki-67 (< 5 µg/mL) v pufrí obsahujúcom proteín s konzervačnou látkou ProClin 300.
Jeden 10 mL dávka	CINtec PLUS Cytology Red anti-Rabbit NP Linker obsahuje kozí protikráličí IgG značený NP (< 10 µg/mL, NP je registrovaný haptén kovalentne viazaný na koziu protilátku) v pufrí s obsahom proteínu a konzervačnej látky ProClin 300.
Jeden 10 mL dávka	CINtec PLUS Cytology Red AP Multimer obsahuje myšiu monoklonálnu terciárnu protilátku značenú AP anti-NP (< 20 µg/mL) v pufrí obsahujúcom proteín s konzervačnou látkou ProClin 300.
Jeden 10 mL dávka	CINtec PLUS Cytology Red Naphthol Phosphate obsahuje Naphthol Phosphate (< 1 %) s konzervačnou látkou ProClin 300.
Jeden 10 mL dávka	CINtec PLUS Cytology Fast Red obsahuje Fast Red (< 1 %) v acetátovom pufrí s konzervačnou látkou ProClin 300.
Jeden 10 mL dávka	CINtec PLUS Cytology DAB Peroxidase Inhibitor obsahuje roztok peroxidu vodíka (< 5 %).
Jeden 10 mL dávka	CINtec PLUS Cytology DAB anti-Mouse HQ Linker obsahuje kozí antímyšiaci IgG značený HQ (< 40 µg/mL, HQ je registrovaný haptén kovalentne viazaný na koziu protilátku) v pufrí s obsahom proteínu a konzervačnej látky ProClin 300.
Jeden 10 mL dávka	CINtec PLUS Cytology DAB HRP Multimer obsahuje terciárnu HRP myšiu monoklonálnu protilátku značenú HQ (< 10 µg/mL) v pufrí s obsahom proteínu a konzervačnej látky ProClin 300.
Jeden 10 mL dávka	CINtec PLUS Cytology DAB obsahuje 3,3'-diaminobenzidín tetrahydrochlorid (< 1 %) v registrovanom roztoku stabilizátora s registrovanou konzervačnou látkou.
Jeden 10 mL dávka	CINtec PLUS Cytology DAB H ₂ O ₂ obsahuje peroxid vodíka (< 1 %) v roztoku fosfátového pufru.

REKONŠTITÚCIA, MIEŠANIE, RIEDENIE, TITRÁCIA

Cytologická súprava CINtec PLUS Cytology Kit je optimalizovaná na používanie v prístrojoch BenchMark IHC/ISH. Nevyžaduje sa žiadna rekonštitúcia, miešanie, riedenie ani titrácia reagensii súpravy.

Odkýlenie sa od odporúčaných postupov fixácie a ďalšieho spracovania cervikálnych cytologických vzoriek môže spôsobiť podstatnú variabilitu výsledkov, čo si vyžaduje pravidelné vykonávanie interných kontrol.

Ďalšie informácie o kontrolách sú uvedené v časti Kontrola kvality.

POTREBNÉ MATERIÁLY, KTORÉ NIE SÚ SÚČASŤOU DODÁVKY

Farbiace reagensie, napr. detekčné súpravy VENTANA, a pomocné komponenty vrátane sklíčok na negatívnu a pozitívnu kontrolu tkaniva nie sú súčasťou dodávky.

Nie všetky produkty uvedené v metodickom liste musia byť dostupné vo všetkých regiónoch. Obráťte sa na miestneho zástupcu podpory.

Na farbenie sú potrebné nasledujúce reagensie a materiály, ktoré však nie sú súčasťou detekčnej súpravy:

1. Vhodné kontroly (voliteľné, pozrite si časť Kontrola kvality)
2. Hematoxylin Counterstain (kat. č. 760-2021 / 05266726001)
3. Bluing Reagent (kat. č. 760-2037 / 05266769001)
4. Reaction Buffer Concentrate (10X) (kat. č. 950-300 / 05353955001)
5. Cell Conditioning Solution (CC1) (kat. č. 950-124 / 05279801001)
6. Cell Conditioning Solution (CC2) (kat. č. 950-123 / 05279798001)
7. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (kat. č. 950-224 / 05424569001)
8. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC2) (kat. č. 950-223 / 05424542001)
9. LCS (Predilute) (kat. č. 650-010 / 05264839001)
10. ULTRA LCS (Predilute) (kat. č. 650-210 / 05424534001)
11. Denaturovaný Reagent Grade Ethanol (čistota ≥ 95 %)
12. Prístroj BenchMark IHC/ISH
13. Na konvenčné stery sa odporúčajú mikroskopické sklíčka Superfrost Plus (Thermo Fisher Scientific)
14. Mikroskopické sklíčka ThinPrep Arcless (Hologic REF 70126-002) alebo mikroskopické sklíčka Superfrost Plus (VWR REF 48311-703)
15. Roche Cell Collection Medium (REF 07994753190)
16. PreservCyt® Solution (Hologic REF 234004)
17. Sklíčka BD SurePath PreCoat (súčasť súpravy SurePath GYN)
18. SurePath™ Preservative Fluid (BD REF 490522)
19. Vodné montážne médium CC/Mount (Roche REF 7342098001; Diagnostic BioSystems P/N: K 002; Sigma-Aldrich P/N: C9368)
20. Voliteľné: Sušička schopná udržiavať teplotu 60 °C ± 5 °C.
21. Univerzálne laboratórne vybavenie

SKLADOVANIE A STABILITA

Po prijatí a vtedy, keď sa nepoužíva, skladujte pri teplote 2 – 8 °C. Nezmrazujte.

Používateľ musí odôvodniť iné skladovacie podmienky než tie uvedené v metodickom liste. Túto detekčnú súpravu možno používať okamžite po vybratí z chladničky.

Po každom použití je nutné opätovne nasadiť uzáver dávkačova a dávkačovi umiestniť hneď do chladničky vo vertikálnej polohe, aby ste zaistili správnu dodávku reagensie a stabilitu reagensii.

Na každej detekčnej súprave je uvedený dátum expirácie. Ak sa produkt správne skladuje, zachováva si svoje vlastnosti až do dátumu uvedeného na štítku. Nepoužívajte tento produkt po dátume expirácie pre predpísaný spôsob skladovania. Neexistujú žiadne definitívne znaky, ktoré by indikovali nestabilitu tohto produktu, cyklus pozitívnej kontroly je potrebné vykonať súčasne s neznámymi vzorkami. Ak spozorujete náznaky nestability reagensie okamžite sa obráťte na miestneho zástupcu podpory.

VAROVANIA A BEZPEČNOSTNÉ OPATRENIA

1. Určené na diagnostické použitie in vitro (IVD).
2. Určené len pre odborníkov.
3. Nepoužívajte po vykonaní stanoveného počtu testov.
4. V prípade poškodenia balenia alebo akýchkoľvek komponentov produkt nepoužívajte. Ak je porušené balenie alebo poškodené komponenty, okamžite informujte miestneho zástupcu podpory.
5. Roztok ProClin 300 sa v tomto roztoku používa ako konzervačná látka. Táto látka je zaradená ako dráždivá látka a pri kontakte s kožou môže spôsobiť senzibilizáciu. Pri

- manipulácii dodržiavajte primerané bezpečnostné opatrenia. Zabráňte kontaktu reagensí s očami, kožou a so sliznicami. Používajte ochranný odev a rukavice.
6. S materiálmi ľudského alebo živočíšneho pôvodu je potrebné zaobchádzať ako s potenciálne biologicky nebezpečným materiálom a ich likvidácia sa uskutočňuje v súlade s náležitými bezpečnostnými opatreniami. V prípade expozície je potrebné dodržiavať zdravotné pokyny zodpovedných orgánov.^{26,27}
 7. Pri manipulácii s reagensiami dodržiavajte primerané bezpečnostné opatrenia. Zabráňte kontaktu reagensí s očami, kožou a so sliznicami. Zabráňte vdychnutiu reagensí. Pri manipulácii s materiálmi s podozrením na karcinogénny alebo toxický materiál používajte jednorazové rukavice a vhodný ochranný odev.
 8. Ak sa čídiel dostanú do kontaktu s citlivými oblasťami, zmyte ich veľkým množstvom vody.
 9. Zabráňte mikrobiálnej kontaminácii čídiel, pretože to môže spôsobiť nesprávne výsledky.
 10. Ďalšie informácie o používaní tejto pomôcky nájdete v používateľskej príručke k prístroju BenchMark IHC/ISH a v návodoch na použitie všetkých potrebných komponentov na stránke navifyportal.roche.com.
 11. Informácie o odporúčanom spôsobe likvidácie získate od miestnych a/alebo štátnych orgánov.
 12. Pri manipulácii a likvidácii cytologických vzoriek vrátane všetkých vzoriek pred a po fixácii, ako aj všetkých materiálov, ktoré sú im vystavené, dodržiavajte bezpečnostné opatrenia pre manipuláciu s potenciálne infekčným materiálom, ako aj príslušné požiadavky na likvidáciu odpadu.
 13. Označenie bezpečnosti produktov v prvom rade zodpovedá usmerneniu GHS EÚ. Na požiadanie možno profesionálnemu používateľovi poskytnúť kartu bezpečnostných údajov.
 14. Pri hlásení podozrenia na závažné incidenty spojené s touto pomôckou kontaktujte miestneho zástupcu spoločnosti Roche a kompetentný orgán členského štátu alebo krajiny, v ktorej má používateľ sídlo.

Táto detekčná súprava obsahuje komponenty klasifikované v súlade s nariadením (ES) č. 1272/2008 takto:

Tabuľka 1. Informácie o nebezpečnosti.

Nebezpečnosť	Kód	Upozornenie
	H317	Môže vyvolať alergickú kožnú reakciu.
	H350	Môže spôsobiť rakovinu.
	H412	Škodlivé pre vodné organizmy s dlhodobými účinkami.
	P201	Pred použitím sa oboznámte s osobitnými pokynmi.
	P261	Zabráňte vdychovaniu hmly alebo páru.
	P273	Nevypúšťajte do prostredia.
	P280	Používajte ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre/ochranu sluchu.
	P308 + P313	V prípade vystavenia pôsobeniu alebo obáv: Vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť.
	P333 + P313	Ak sa prejaví podráždenie kože alebo sa vytvoria výrážky: Vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť.

Tento produkt obsahuje č. CAS:

- 868272-85-9: 3,3'-diaminobenzidín tetrahydrochlorid hydrát
- 2682-20-4: 2-metyl-2H-izotiazol-3-ón
- 55965-84-9, reakčná zmes: 5-chlór-2-metyl-2H-izotiazol-3-ón a 2-metyl-2H-izotiazol-3-ón (3:1)

PRÍPRAVA VZORIEK

S cytologickými vzorkami zaobchádzajte vhodným spôsobom, aby ste ich zachovali na imunocytochemické postupy. Všetky vzorky musia podliehať štandardným spôsobom spracovania buniek.

Aby sa predišlo zakrývajúcim prvkom, ako je krv a hlien, a aby sa zabezpečila adekvátna vzorka podľa usmernení Bethesda Guidelines²⁸, musia lekári dodržiavať odporúčané techniky odberu vzoriek.

Na použitie s cytologickou súpravou CINtec PLUS Cytology Kit sú vhodné nasledujúce spôsoby prípravy skličiek:

- Sklička ThinPrep (Hologic Inc.) pripravené na ThinPrep 2000 alebo 5000 Processor (Hologic Inc.) s použitím skličiek ThinPrep Arcless Microscope alebo skličiek Superfrost Plus podľa odporúčaní výrobcu.
- Sklička BD SurePath (BD Diagnostics) pripravené podľa odporúčania výrobcu.
- Manuálne pripravené sklička (sklička s konvenčným sterom).

Odporúča sa vykonať vhodné kontroly súčasne so vzorkami pacientov (ďalšie informácie sú uvedené v časti Kontrola kvality).

Príprava vzoriek pomocou Roche Cell Collection Medium

Cytologické vzorky odobraté zdravotníckym pracovníkom a resuspendované v médiu Roche Cell Collection Medium (RCCM) určené na imunocytochemické farbenie pomocou CINtec PLUS Cytology Kit sa môžu skladovať 6 týždňov pri teplote 15 – 30 °C a ďalších 12 týždňov chladené pri teplote 2 – 8 °C.

Sklička ThinPrep Arcless Microscope alebo sklička Superfrost Plus sú potrebné na imunocytochemické farbenie pomocou CINtec PLUS Cytology Kit na prístrojoch BenchMark IHC/ISH.

Príprava skličiek zo vzoriek odobratých v médiu Roche Cell Collection Medium pomocou prístroja ThinPrep 2000 Processor

Sklička sa pripravuje zo vzoriek odobratých v médiu Roche Cell Collection Medium pomocou prístroja ThinPrep 2000 Processor. Po dokončení sekvencie v prístroji ThinPrep 2000 Processor sa spracované sklička ukladajú v skúmavke s fixatívom, ktorá obsahuje ≥ 95 % etanolový roztok v kvalite reagensie. Vyberte skúmavku z držiaka fixačného kúpeľa prístroja ThinPrep 2000 Processor a preneste spracované skličko zo skúmavky do nádoby na sklička naplnenej ≥ 95 % etanolovým roztokom v kvalite reagensie. Sklička inkubuje v etanole minimálne 15 minút až maximálne 60 minút. Etanolový roztok v skúmavke s fixatívom a koši na sklička po každých 20 pripravených skličkách. Po uplynutí času inkubácie vyberte sklička z etanolového roztoku a vysušte ich uložené v horizontálnej polohe na rovnom povrchu v priebehu najmenej 60 minút. Vysušené sklička možno skladovať pri izbovej teplote chránené pred svetlom a musia byť farbené pomocou cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit v rámci 7-dňovej prípravy.

Príprava skličiek zo vzoriek odobratých v médiu Roche Cell Collection Medium pomocou prístroja ThinPrep 5000 Processor

Sklička sa pripravuje zo vzoriek odobratých v médiu Roche Cell Collection Medium pomocou prístroja ThinPrep 5000 Processor. Po dokončení sekvencie v prístroji ThinPrep 5000 Processor sa spracované sklička ukladajú v stojane na sklička, ktorý sa ponorí do ≥ 95 % etanolového roztoku stupňa reagensie s fixačným kúpeľom. Vyberte fixačný kúpeľ alebo koš na sklička z prístroja ThinPrep 5000 Processor a inkubujte sklička minimálne ďalších 15 minút až maximálne 60 minút. Etanolový roztok v koši na sklička vymeňte po každom cykle. Po uplynutí času inkubácie vyberte sklička z etanolového roztoku a vysušte ich uložené v horizontálnej polohe na rovnom povrchu v priebehu najmenej 60 minút. Vysušené sklička možno skladovať pri izbovej teplote chránené pred svetlom a musia byť farbené pomocou cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit v rámci 7-dňovej prípravy.

Pred imunocytochemickým farbením cytologickou súpravou CINtec PLUS Cytology Kit odstráňte pôvodný štítok sklička používaný prístrojom ThinPrep 5000 Processor.

Príprava vzoriek pomocou PreservCyt

Cytologická vzorka v roztoku PreservCyt Solution (PC) určená na imunocytochemické farbenie pomocou CINtec PLUS Cytology Kit sa môže skladovať 6 týždňov pri teplote 15 – 30 °C a ďalších 12 týždňov chladená pri teplote 2 – 8 °C.

Sklička ThinPrep Arcless Microscope alebo sklička Superfrost Plus sú potrebné na imunocytochemické farbenie pomocou CINtec PLUS Cytology Kit na prístrojoch BenchMark IHC/ISH.

Príprava skličiek Slide Preparation zo vzoriek odobratých v PreservCyt pomocou prístroja ThinPrep 2000 Processor

Sklička sa pripravuje s cytologickými vzorkami odobratými zdravotníckym pracovníkom a resuspendovanými v PreservCyt pomocou prístroja ThinPrep 2000 Processor. Po dokončení sekvencie v prístroji ThinPrep 2000 Processor sa spracované sklička ukladajú v skúmavke s fixatívom, ktorá obsahuje ≥ 95 % etanolový roztok v kvalite reagensie. Vyberte skúmavku z držiaka fixačného kúpeľa prístroja ThinPrep 2000 Processor a

prenešte spracované skličko zo skúmavky do nádoby na sklička naplnenej $\geq 95\%$ etanolovým roztokom v kvalite reagentie. Sklička inkubujte v etanole minimálne 15 minút až maximálne 60 minút. Etanolový roztok v skúmavke s fixatívom a koši na sklička po každých 20 pripravených skličkách. Po uplynutí času inkubácie vyberte sklička z etanolového roztoku a vysušte ich uložené v horizontálnej polohe na rovnom povrchu v priebehu najmenej 60 minút. Vysušené sklička možno skladovať pri teplote $15 - 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ chránené pred svetlom a musia byť farbené pomocou cytologickej súpravy CIntec PLUS Cytology Kit v rámci 7-dňovej prípravy.

Príprava skličiek Slide Preparation zo vzoriek odobratých v PreservCyt pomocou prístroja ThinPrep 5000 Processor

Sklička sa pripravujú z cytologických vzoriek odobratých zdravotníckym pracovníkom a resuspendovaných v PreservCyt pomocou prístroja ThinPrep 5000 Processor. Po dokončení sekvencie v prístroji ThinPrep 5000 Processor sa spracované sklička ukladajú v stojane na sklička, ktorý sa ponorí do $\geq 95\%$ etanolového roztoku stupňa reagentie s fixačným kúpeľom. Vyberte fixačný kúpeľ alebo kôš na sklička z prístroja ThinPrep 5000 Processor a inkubujte sklička minimálne ďalších 15 minút až maximálne 60 minút. Etanolový roztok v koši na sklička vymeňte po každom cykle. Po uplynutí času inkubácie vyberte sklička z etanolového roztoku a vysušte ich uložené v horizontálnej polohe na rovnom povrchu v priebehu najmenej 60 minút. Vysušené sklička možno skladovať pri izbovej teplote chránené pred svetlom a musia byť farbené pomocou cytologickej súpravy CIntec PLUS Cytology Kit v rámci 7-dňovej prípravy.

Pri imunocytochemickom farbení cytologickou súpravou CIntec PLUS Cytology Kit odstráňte pôvodný štítok sklička používaný prístrojom ThinPrep 5000 Processor.

Príprava vzoriek pomocou sklička BD SurePath

Cytologické vzorky odobraté zdravotníckym pracovníkom a resuspendované v tekutine SurePath Preservative Fluid určené na imunocytochemické farbenie pomocou cytologickej súpravy CIntec PLUS Cytology Kit sa môžu skladovať až 4 týždne pri teplote $15 - 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ alebo 6 mesiacov v chladničke pri teplote $2 - 10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Príprava sklička Slide Preparation pomocou BD SurePath bezprostredne po spracovaní Pap sklička

Po vytvorení obohatenej bunkovej pelety na prípravu sklička na farbenie Pap ju možno použiť okamžite na prípravu druhého sklička určeného na farbenie cytologickou súpravou CIntec PLUS Cytology Kit. Postupujte podľa odporúčania výrobcu na používanie v „Slide Preparation“ [možnosť 2] pre GYN vzorky v prístroji PrepStain™. Objem resuspendného roztoku je potrebné zmeniť na 0 mL v možnosti ponuky „Change Sample/Stain Parameters“.

Príprava sklička Slide Preparation pomocou BD SurePath z konzervovanej bunkovej pelety

Obohatené bunkové pelety je možné konzervovať pridaním približne 2 mL konzervačnej tekutiny SurePath Preservative Fluid a uzavretím skúmaviek so vzorkami na uskladnenie (podrobné informácie sú uvedené v pokynoch výrobcu). Od dátumu odobratia vzoriek môžu byť bunkové pelety resuspendované v konzervačnej tekutine skladované až 4 týždne pri teplote $15 - 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ alebo 6 mesiacov v chladničke pri udržiavanej teplote $2 - 10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Skličko spracujete pre cytologickú súpravu CIntec PLUS Cytology Kit, ak ho najprv v priebehu 60 minút zahrejete na izbovú teplotu. Začnite druhým krokom centrifugácie v procese obohacovania GYN a pokračujte zvyšnými krokmi predbežného spracovania, ako je uvedené v návode výrobcu na opätovné spracovanie konzervovaných bunkových peliet. Postupujte podľa odporúčania výrobcu na používanie v „Slide Preparation“ [možnosť 2] pre GYN vzorky v prístroji PrepStain.

Pri všetkých možnostiach prípravy uvedených vyššie vyberte stojan na sklička z prístroja PrepStain po dokončení kroku prenosu vzoriek. Na stečenie tekutiny otočte stojan hore nohami. Do každej usadzovacej komory pipetou naneste 2 mL $\geq 95\%$ etanolového roztoku kvality reagentie a okamžite nechajte stiecť. Prepláchnite 2 mL $\geq 95\%$ roztoku etanolu kvality reagentie po druhýkrát a inkubujte v priebehu 10 minút. Stojan otočte a nechajte stiecť druhýkrát. Zložte usadzovacie komory zo skličiek a nechajte ich vyschnúť uložením do horizontálnej polohy na rovnom povrchu najmenej na 60 minút. Vysušené sklička možno skladovať pri izbovej teplote chránené pred svetlom a musia byť farbené pomocou cytologickej súpravy CIntec PLUS Cytology Kit v rámci 7-dňovej prípravy.

Používanie konvenčných sterov

Konvenčné stery musia byť okamžite po odbere vzorky fixované cytologickou rozprašovacou fixačnou reagensiou s obsahom polyetylén glykolu (napr. Safetex Cytology Fixative, Andwin Scientific). Sklička s konvenčným sterilom fixované rozprašovaním možno skladovať pri izbovej teplote chránené pred svetlom a musia byť farbené pomocou cytologickej súpravy CIntec PLUS Cytology Kit v rámci 7-dňovej prípravy.

Pri vložení skličiek do prístroja BenchMark IHC/ISH sa nevyžaduje žiadne ďalšie predbežné spracovanie.

POSTUP FARBENIA

Cytologická súprava CIntec PLUS Cytology Kit bola vyvinutá na používanie v prístrojoch BenchMark IHC/ISH v kombinácii s pomocnými reagensiami a príslušenstvom VENTANA. Cytologická súprava CIntec PLUS Cytology Kit bola optimalizovaná pomocou parametrov uvedených v tabuľkách 2, 3 a 4; používateľ musí overiť výsledky získané pomocou tejto súpravy.

Parametre automatizovaných protokolov sa môžu zobrazovať, tlačiť a editovať podľa pokynov uvedených v používateľskej príručke k prístroju.

Tabuľka 2. Odporúčaný protokol farbenia pre pripravené sklička so sterilom ThinPrep, SurePath a bežné sklička so sterilom v prístroji BenchMark GX i.

Postup farbenia	GX CIntec PLUS Cytology		
	Typ prípravy sklička Slide Preparation		
	RCCM/ThinPrep	SurePath	Konvenčné
ThinPrep	Zvolené	Nezvolené	Nezvolené
SurePath	Nezvolené	Zvolené	Nezvolené
Iné	Nezvolené	Nezvolené	Zvolené
Možnosť Cell Conditioning	Nemožno zvoliť	Nemožno zvoliť	16 min
Inkubačný čas protilátky	16 min	20 min	16 min
Inkubačný čas HQ Linker Inc	12 min	16 min	12 min
Inkubačný čas HRP Multimer Inc	6 min	8 min	8 min
Inkubačný čas NP Linker Inc	8 min	16 min	8 min
Inkubačný čas AP Multimer Inc	8 min	8 min	8 min
Hematoxylin	8 min	8 min	8 min
Farbenie modrou	4 min	4 min	4 min

Tabuľka 3. Odporúčaný protokol farbenia pre pripravené ThinPrep, SurePath a konvenčné sklička sterov v prístroji BenchMark XT.

Postup farbenia	XT CIntec PLUS Cytology		
	Typ prípravy sklička Slide Preparation		
	RCCM/ThinPrep	SurePath	Konvenčné
ThinPrep	Zvolené	Nezvolené	Nezvolené
SurePath	Nezvolené	Zvolené	Nezvolené
Iné	Nezvolené	Nezvolené	Zvolené
Možnosť Cell Conditioning	Nemožno zvoliť	Nemožno zvoliť	16 min
Inkubačný čas protilátky	16 min	20 min	16 min
Inkubačný čas HQ Linker Inc	12 min	16 min	12 min
Inkubačný čas HRP Multimer Inc	8 min	8 min	8 min
Inkubačný čas NP Linker Inc	8 min	16 min	8 min

Postup farbenia	XT CINtec PLUS Cytology		
Voliteľné možnosti	Typ prípravy sklička Slide Preparation		
	RCCM/ThinPrep	SurePath	Konvenčné
Inkubačný čas AP Multimer Inc	8 min	8 min	8 min
Hematoxylin	8 min	8 min	8 min
Farbenie modrou	4 min	4 min	4 min

Tabuľka 4. Odporúčaný protokol farbenia pre pripravené sklička so sterom ThinPrep, SurePath a bežné sklička so sterom v prístroji BenchMark ULTRA alebo BenchMark ULTRA PLUS.

Postup farbenia	U CINtec PLUS Cytology		
Voliteľné možnosti	Typ prípravy sklička Slide Preparation		
	RCCM/ThinPrep	SurePath	Konvenčné
ThinPrep	Zvolené	Nezvolené	Nezvolené
SurePath	Nezvolené	Zvolené	Nezvolené
Iné	Nezvolené	Nezvolené	Zvolené
Možnosť Cell Conditioning	Nemožno zvoliť	Nemožno zvoliť	16 min
Inkubačný čas protilátky	16 min	16 min	16 min
Inkubačný čas HQ Linker Inc	12 min	16 min	12 min
Inkubačný čas HRP Multimer Inc	8 min	8 min	8 min
Inkubačný čas NP Linker Inc	8 min	16 min	8 min
Inkubačný čas AP Multimer Inc	8 min	8 min	8 min
Hematoxylin	8 min	8 min	8 min
Farbenie modrou	4 min	4 min	4 min

POSTUP PO SPRACOVANÍ – MONTÁŽ A PRIKRYTIE KRYCÍM SKLIČKOM

Na zachovanie optimálnej citlivosti a zabránenie vyblednutiu chromogénov sa vyžaduje dvojkrokový montážny postup.

Vyberte sklička z prístroja BenchMark IHC/ISH a jemne ich pomiešajte a prepláchnite deionizovanou alebo destilovanou vodou z vodovodu a jemným prostriedkom na umývanie riadu, kým zo skličiek celkom neodstránite LCS.

POZNÁMKA: Nedovoľte, aby voda tiekla priamo na sklička. Voda musí dopadať na sklička s minimálnou intenzitou.

Sklička budú namontované podľa dvojkrokového protokolu, pričom nasledujúce kroky musia byť vykonané postupne:

Vodná montáž:

1. Inkubujte sklička v destilovanej alebo deionizovanej vode najmenej 1 min.
2. Sklička, ktoré nie sú prikrýté krycím skličkom, musia počas aplikovania vodného montážneho média CC/Mount na ďalšie sklička zostať v destilovanej alebo deionizovanej vode.
3. Vyberte jedno skličko z destilovanej alebo deionizovanej vody a dôkladne utrite zadnú stranu sklička papierovou utierkou, aby ste odstránili nadmernú vodu. Nesušte ani neutierajte vodu z prednej časti sklička (strana so vzorkou).
4. Podržte skličko pod miernym uhlom a naneste 4 – 6 kvapiek vodného montážneho média CC/Mount na skličko ThinPrep alebo SurePath a 8 kvapiek na skličko konvenčného steru. Zabráňte vytvoreniu vzduchových bublín. Aby ste predišli tvorbe bublín, môžete prvú kvapku pred nanosením média CC/Mount na oblasť prípravy vzorky na skličko kvapnúť na papierovú utierku.

5. Skličko jemne nakloňte a otočte, aby sa vytvorila tenká vrstva montážneho média, ktorá úplne prekryje oblasť prípravy vzorky (ešte neaplikujte sklenené ani tekuté krycie skličko), vizuálne skontrolujte rozloženie montážneho média na skličko.
6. Nadmerné vodné montážne médium CC/Mount na zadnej strane a okrajoch sklička zotrite. V prípade potreby použite vlhkú papierovú utierku.
7. Pripravené sklička vysušte umiestnením do horizontálnej polohy.
 - Inkubujte pripravené sklička ThinPrep alebo SurePath pri teplote 37 – 60 °C v priebehu 1 hodiny, prípadne cez noc pri izbovej teplote.
 - Inkubujte sklička konvenčných sterov teplote 37 °C v priebehu 4 hodín, prípadne pri teplote 60 °C v priebehu 1 hodiny, alebo cez noc pri izbovej teplote.

Prikrytie skleneným krycím skličkom alebo krycím skličkom vo forme filmu:

1. Po úplnom vysušení vodného montážneho média CC/Mount nechajte sklička vyvážať pri izbovej teplote, ak je to potrebné. Sklička inkubujte v xyléne minimálne 1 minútu až maximálne 20 minút. Potom prikryte sklička skleneným krycím skličkom pomocou montážneho média na báze xylénu alebo metódou krycieho sklička vo forme filmu na báze xylénu.

POZNÁMKA: Sklička sa nesmú dehydrovať vzostupnou sériou alkoholu pred zakrytím sklom alebo filmom.

2. Montážne médium na báze xylénu nechajte vyschnúť pri izbovej teplote.

POZNÁMKA: Aby sa minimalizovalo blednutie, chráňte sklička pred svetlom a skladujte ich pri izbovej teplote.

KONTROLA KVALITY

Odhýlenie sa od odporúčaných postupov fixácie a ďalšieho spracovania cervikálnych cytologických vzoriek môže spôsobiť podstatnú variabilitu výsledkov. Zlyhanie produktu z dôvodu problémov pri manipulácii alebo s nestabilitou nevedie k zjavným znakom. Preto je potrebné vykonávať vhodné kontroly súčasne so vzorkami pacientov.

Pozitívna kontrola

Ako pozitívne kontroly sa majú používať vzorky spracované rovnakým spôsobom ako vzorky pacientov. Pozitívne kontroly indikujú správne pripravené vzorky a správne techniky farbenia. Pri každom cykle farbenia sa má použiť jedna pozitívna kontrola.

Známe pozitívne kontroly sa majú používať iba na monitorovanie správneho výkonu spracovaných vzoriek a testovacích reagencií, nie ako pomôcka pri stanovení konkrétnej diagnózy zo vzoriek pacientov. Ak pozitívne kontroly nepreukážu vhodné pozitívne farbenie, výsledky testovacích vzoriek treba považovať za neplatné.

Negative Control

Rôzne typy buniek prítomné v reprezentatívnych vzorkách cervikálnej cytológie, o ktorých je známe, že sú negatívne na expresiu antigénov p16^{INK4a} a Ki-67 (napríklad povrchové bunky), môžu slúžiť ako vnútorná negatívna kontrola na posúdenie farbenia pozadia.

Overenie analýzy

Pred prvým použitím cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit v diagnostickom postupe musí používateľ overiť jej výkon na pozitívnych a negatívnych vzorkách so známou charakteristikou výkonu.

INTERPRETÁCIA FARBenIA/OČAKÁVANÉ VÝSLEDKY

Pri farbení súpravou CINtec PLUS Cytology Kit vznikajú dva odlišné farebné reakčné produkty: hnedá zrazenina v miestach antigénu p16^{INK4a} a červená zrazenina v miestach antigénu Ki-67. Hnedé farbenie buniek (cytoplazmatické a/alebo jadrové) naznačuje nadmernú expresiu p16^{INK4a}. Farbenie buniek Red (jadrá) indikuje expresiu proteínu Ki-67. Bunky farbené na oba antigény vykazujú hnedé cytoplazmatické farbenie s typicky výraznými červenými jadrami. Pred interpretáciou výsledkov musí kontroly vyhodnotiť kvalifikovaný patológ/cytotechnológ so skúsenosťami v imunocytochemických postupoch a vyškolený v interpretácii skličiek farbených cytologickou súpravou CINtec PLUS Cytology Kit.

Výsledky testov môže interpretovať výlučne certifikovaný odborník v spojení s klinickou anamnézou pacienta a ďalšími vykonanými diagnostickými testami.

Pri interpretácii skličiek so vzorkou z cervikálnej cytológie farbených súpravou CINtec PLUS Cytology Kit by sa mali sklička hodnotiť z hľadiska prítomnosti epitelálnych buniek krčka maternice, ktoré vykazujú cytoplazmatické hnedé a nukleárne červené farbenie naznačujúce súčasnú expresiu p16^{INK4a} a Ki-67. Okrem toho by sa podobne ako pri vykazovaní výsledkov Pap cytológie mala pri vykazovaní výsledkov testu CINtec PLUS Cytology Kit posúdiť primeranosť vzorky podľa Bethesda Guidelines 2015 (alebo TBS)²⁸.

Pozitívny výsledok testu

Prítomnosť jednej alebo viacerých cervikálnych epiteliálnych buniek a spoločné umiestnenie špecifického hnedého cytoplazmatického imunofarbenia a špecifického červeného nukleárneho imunofarbenia v jednej bunke sa považuje za pozitívny výsledok testu cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit bez ohľadu na cytomorfologické vlastnosti.

Negatívny výsledok testu

Ak hnedé cytoplazmatické imunofarbenie a červené nukleárne imunofarbenie nevykazujú žiadne cervikálne epiteliálne bunky, musí sa výsledok testu cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit považovať za negatívny.

Prítomnosť epiteliálnych buniek krčka maternice, ktoré vykazujú imunoreaktivitu len pre jeden, ale nie pre oba markery (napríklad hnedé farbenie len pre p16^{INK4a} alebo červené farbenie len pre Ki-67), sa nepovažuje za pozitívny výsledok cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit.

ŠPECIFICKÉ OBMEDZENIA

1. Určené len pre odborníkov. Na vykonanie imunocytochemických postupov sa vyžaduje špeciálne zaškolenie.
2. Hodnotenie mikroskopických sklíčok farbených cytologickou súpravou CINtec PLUS Cytology Kit má vykonávať iba certifikovaný odborník vyškolený v interpretácii týchto výsledkov testu.
3. Klinická interpretácia akéhokoľvek pozitívneho alebo negatívneho farbenia musí byť zhodnotená v súvislosti s klinickým prejavom a cytologickými kritériami.
4. Interpretácia výsledkov farbenia cytologickou súpravou CINtec PLUS Cytology Kit závisí od intenzity a kvality kontrastného farbenia hematoxylinom. Odchýlenie sa od odporúčaných reagentov a časov inkubácie musí potvrdiť zákazník, pretože nadmerné alebo neúplné kontrastné farbenie môže narušiť správnu interpretáciu výsledkov.
5. Cervikálne vzorky často vykazujú viditeľne detegovateľnú úroveň celej krvi. Ak koncentrácia celej krvi presiahne 1.0 %, musí sa vzorka rozpustiť v ľadovej kyseline octovej (GAA) podľa protokolu ThinPrep pred prípravou sklíčka.
6. Sklíčka konvenčných sterov určené na farbenie cytologickou súpravou CINtec PLUS Cytology Kit sa musia pripraviť pomocou mikroskopických sklíčok Superfrost Plus a Safetex Cytology Fixative (Andwin Scientific), čo je cytologická rozprašovacia fixačná reagentia s obsahom polyetylén glykolu. Odchýlka od tohto odporúčania vyžaduje potvrdenie zo strany zákazníka.
7. Používanie prístroja ThinPrep 3000 Processor na prípravu vzoriek ThinPrep sa neodporúča, pretože postup rozprašovacej fixácie vykonávaný týmto prístrojom môže viesť k podstatnej strate buniek, ak sú pripravené sklíčka farbené cytologickou súpravou CINtec PLUS Cytology Kit.
8. Sklíčka ThinPrep Arcless Microscope Slides na špeciálne spracovanie alebo mikroskopické sklíčka Superfrost Plus sú potrebné na prípravu vzoriek ThinPrep na imunohistochemické farbenie pomocou CINtec PLUS Cytology Kit na prístrojoch BenchMark IHC/ISH. Mikroskopické sklíčka ThinPrep s potlačenou skríningovou oblasťou môžu viesť k nekonzistentným výsledkom farbenia.
9. Výrobca dodáva tieto protilátky/reagencie optimálne zriedené na používanie podľa pokynov uvedených v tomto dokumente na imunocytochemické testovanie pripravených cytologických sklíčok na báze tekutiny (LBC). Akékoľvek odchýlenie sa od odporúčaných postupov testu môže spôsobiť neplatnosť deklarovaných očakávaných výsledkov, je potrebné využiť a zdokumentovať vhodné kontroly. Používatelia, ktorí sa odchýlia od odporúčaných postupov testovania, musia prevziať zodpovednosť za interpretáciu výsledkov pacientov za daných okolností.
10. Všetky analýzy sa nemusia zaregistrovať na každom prístroji. Ak chcete získať ďalšie informácie, obráťte sa na miestneho zástupcu spoločnosti Roche.

CHARAKTERISTIKA VÝKONU

ANALYTICKÁ ÚČINNOSŤ

Výkon cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit bol hodnotený prostredníctvom analytickej štúdie reprodukovateľnosti a iných príslušných štúdií.

Analytická citlivosť a špecifickosť

Analytická citlivosť a špecifickosť primárnych protilátok p16 a Ki-67 boli testované v rámci analýzy Wester blot a analýzy inhibície peptidov.

Analýzy Western blot využívajú lyzáty z bunkových línii reprezentujúcich škálu intenzity farbenia. Protilátka proti p16^{INK4a} (E6H4) dokázala v preparáte purifikovaného

rekombinantného proteínu p16^{INK4a} detegovať pás s veľkosťou približne 15 – 20 kD. Ďalej sa protilátka špecificky naviazala na purifikovaný rekombinantný proteín p16^{INK4a} a nie na ekvivalentné množstvo nepríbuzného rekombinantného proteínu. Ukázalo sa tiež, že protilátka viaže endogénny proteín p16^{INK4a} exprimovaný v lyzátach získaných z bunkových línii HeLa, SK Mel 28 a DU145 a nie v p16^{INK4a} negatívnej bunkovej línii MDA MB 231. Relatívne hladiny proteínu p16^{INK4a} detegované v lyzátach zo všetkých štyroch bunkových línii na Western Blote zodpovedali údajom z farbenia IHC, čo dokazuje citlivosť detekcie protilátky anti-p16^{INK4a} (E6H4). Väzba klonu protilátky proti Ki-67 (274-11AC3V1) sa otestovala v analýze Western Blotu s použitím celobunkových lyzátov pripravených z bunkových línii L428 (Hodgkinov lymfóm pozitívny na antigén Ki-67; DSMZ ATCC 197) a LNCaP (bunková línia karcinómu prostaty s nízkou expresiou proteínu Ki-67; ATCC CRL-1740). Protilátka bola schopná detegovať endogénny proteín Ki-67 v bunkových lyzátach aj pri nízkych hladinách expzie a intenzita pásu korelovala s farbením IHC na Ki-67 v týchto bunkových líniiach. Primárna protilátka Ki-67 cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit (274-11AC3V1) sa viazala na fragment purifikovaného rekombinantného proteínu Ki-67, nie na ekvivalentné množstvo nesúvisiaceho rekombinantného proteínu negatívnej kontroly. Väzba v tejto analýze nebola detegovaná v bunkovej línii LNCaP s nízkou expresiou Ki-67. Relatívna hladina proteínu Ki-67 detegovaná v lyzátach z týchto bunkových línii v analýze Western blot koreluje s údajmi o IHC farbení a údajmi o expresii mRNA. Výsledky analýzy Western blot preukazujú, že primárna protilátka Ki-67 používaná v cytologickej súprave CINtec PLUS Cytology Kit dokáže detegovať endogénny proteín Ki-67 v bunkových lyzátach a fragmente rekombinantného proteínu Ki-67 v purifikovanej forme.

Pri analýzach inhibície peptidov sa použili roztoky obsahujúce špecifické peptidy p16 alebo Ki-67. Zmes primárnych protilátok bola zriedená v pomere objemov 1:1 s roztokmi peptidov špecifických pre p16 alebo roztokmi peptidov Ki-67 rôznych koncentrácií pokrývajúcich rozsah molárných pomerov: približne 1-násobný, 10-násobný, 100-násobný, 1000-násobný a 10000-násobný molárny nadbytok peptidu v porovnaní s konečnou koncentráciou protilátky v roztoku. Koktail primárnych protilátok obsahujúci peptid špecifický pre p16 slúžil ako nešpecifická kontrola pre protilátku proti Ki-67 a nepríbuzný peptid Alk-a slúžil ako nešpecifická kontrola pre protilátku proti p16. Každým roztokom bolo farbené jedno sklíčko z každej vzorky (tri skupiny cervikálnych cytologických vzoriek a jedna skupina buniek CaSki). Výsledky tejto štúdie ukázali, že protilátka proti proteínu p16 viaže špecificky proteín p16 a že protilátka proti Ki-67 viaže špecificky proteín Ki-67. Podľa očakávania boli intenzity farbenia proteínu p16 a Ki-67 zredukované vo všetkých vzorkách po farbení roztokmi s obsahom príslušných špecifických peptidov v koncentrácií s molovým pomerom 1 M, kompletná inhibícia sa dosiahla s roztokmi s obsahom ≥ 10 M a žiadne obmedzenie intenzity farbenia p16 nebolo pozorované po farbení roztokmi s obsahom nešpecifického peptidu alebo bez peptidu.

Opakovateľnosť a stredná presnosť

Štúdie presnosti týkajúce sa cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit pri farbení cervikálnych vzoriek ThinPrep boli vykonané s cieľom preukázať:

- Celkovú presnosť – Percento výsledkov rovnakých ako pri väčšine skupiny bolo vypočítané pre každú z 12 skupín cervikálnej cytológie (3 skupiny HSIL/HPV+, 1 skupina LSIL/HPV+, 1 skupina ASC-US/HPV+, 1 skupina NILM/HPV+, 3 skupiny NILM/HPV-LBC a 3 negatívne skupiny bunkových línii T24) farbenej 3 šaržami cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit v 5 po sebe nenasledujúcich dňoch pomocou 2 replikátov sklíčok z každej skupiny a hodnotených 3 tímami čitateľov.
- Presnosť medzi dňami – Percento výsledkov rovnakých ako pri väčšine skupiny bolo vypočítané pre každý deň (1. deň – 5. deň), pričom sa zhrnuli údaje z 12 skupín cervikálnej cytológie (3 skupiny HSIL/HPV+, 1 skupina LSIL/HPV+, 1 skupina ASC-US/HPV+, 1 skupina NILM/HPV+, 3 skupiny NILM/HPV-LBC a 3 negatívne skupiny bunkových línii T24), 3 šarže cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit, 2 replikáty sklíčok z každej skupiny a 3 tímy čitateľov.
- Presnosť medzi šaržami – Percento výsledkov rovnakých ako pri väčšine skupiny bolo vypočítané pre každú šaržu CINtec PLUS Cytology Kit (šarža 1 – 3), pričom sa zhrnuli údaje z 12 skupín cervikálnej cytológie (3 skupiny HSIL/HPV+, 1 skupina LSIL/HPV+, 1 skupina ASC-US/HPV+, 1 skupina NILM/HPV+, 3 skupiny NILM/HPV-LBC a 3 negatívne skupiny bunkových línii T24), 5 po sebe nenasledujúcich dní, 2 replikáty a 3 tímy čitateľov.

Všetky sklíčka boli zaslepené, randomizované a hodnotené podľa interpretácie farbenia CINtec PLUS Cytology Kit. Sklíčka hodnotili tri tímy čitateľov, pričom každý tím pozostával z cytotechnológa a patológa. Ako referenčná hodnota na určenie percenta výsledkov rovnakých ako väčšina skupiny bol použitý výsledok za väčšinu skupiny alebo na úrovni skupiny (pozitívny alebo negatívny). Percento výsledkov rovnakých ako väčšina skupiny sa rovná hodnote PPA, ak je väčšina výsledkov skupiny pozitívna, a hodnote NPA, ak je

väčšina výsledkov skupiny negatívna. Výsledky sú zhrnuté v Tabuľka 5, Tabuľka 6 a Tabuľka 7. Všetky intervaly spoľahlivosti (CI) boli 95 % obojstranné intervaly spoľahlivosti. CI boli vypočítané percentilovou metódou bootstrap okrem prípadov, v ktorých bol bodový odhad na úrovni 100 %. Vtedy bola použitá metóda Wilsonovho skóre.

Tabuľka 5. Štúdia presnosti v rámci laboratória – celková presnosť

Kategória skupiny	Počet hodnotení	Režim výsledkov cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit (väčšina skupiny)	Percento výsledkov rovnakých ako väčšina skupiny	95 % interval spoľahlivosti
Bunková línia T24	270	Negatívne	100.0 %	(98.6, 100.0)
NILM/HPV-	270	Negatívne	94.1 %	(90.7, 97.0)
NILM/HPV+	90	Pozitívne	61.1 %	(47.2, 74.4)
ASC-US/HPV+	90	Pozitívne	93.3 %	(88.9, 97.8)
LSIL/HPV+	90	Pozitívne	100.0 %	(95.9, 100.0)
HSIL/HPV+	270	Pozitívne	98.9 %	(96.7, 100.0)

Tabuľka 6. Štúdia presnosti v rámci laboratória – presnosť medzi dňami

Kategória skupiny	Počet hodnotení	Režim výsledkov cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit (väčšina skupiny)	Percento výsledkov rovnakých ako Väčšina skupiny				
			1. deň	2. deň	3. deň	4. deň	5. deň
Bunková línia T-24	270	Negatívne	100.0 %	100.0 %	100.0 %	100.0 %	100.0 %
NILM/HPV-	270	Negatívne	88.9 %	90.7 %	98.1 %	98.1 %	94.4 %
NILM/HPV+	90	Pozitívne	44.4 %	50.0 %	77.8 %	66.7 %	66.7 %
ASC-US/HPV+	90	Pozitívne	94.4 %	88.9 %	88.9 %	94.4 %	100.0 %
LSIL/HPV+	90	Pozitívne	100.0 %	100.0 %	100.0 %	100.0 %	100.0 %
HSIL/HPV+	270	Pozitívne	100.0 %	94.4 %	100.0 %	100.0 %	100.0 %

Tabuľka 7. Štúdia presnosti v rámci laboratória – presnosť medzi šaržami

Kategória skupiny	Počet hodnotení	Režim výsledkov cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit (väčšina skupiny)	Percento výsledkov rovnakých ako väčšina skupiny		
			1. šarža	2. šarža	3. šarža
Bunková línia T24	270	Negatívne	100.0 %	100.0 %	100.0 %
NILM/HPV-	270	Negatívne	92.2 %	93.3 %	96.7 %
NILM/HPV+	90	Pozitívne	46.7 %	70.0 %	66.7 %
ASC-US/HPV+	90	Pozitívne	90.0 %	96.7 %	93.3 %
LSIL/HPV+	90	Pozitívne	100.0 %	100.0 %	100.0 %
HSIL/HPV+	270	Pozitívne	100.0 %	100.0 %	96.7 %

Presnosť čitateľa

Na vyhodnotenie presnosti čitateľa hodnotili tri tímy čitateľov, z ktorých každý pozostával z cytotechnológa a patológa, všetky sklíčka farbené na účely štúdií presnosti vrátane 2 replikátov 12 skupín cervikálnej cytológie (3 skupiny HSIL/HPV+, 1 skupina LSIL/HPV+, 1 skupina ASC-US/HPV+, 1 skupina NILM/HPV+, 3 skupiny NILM/HPV- LBC a 3 negatívne skupiny bunkovej línie T24), 3 šarže cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit v priebehu 5 po sebe nasledujúcich dní. Percento výsledkov zhodných s väčšinou skupiny sa vypočítalo zo súhrnných výsledkov medzi tímami čitateľov a je zhrnuté v Tabuľka 8.

Tabuľka 8. Štúdia presnosti v rámci laboratória – presnosť medzi čitateľmi

Kategória skupiny	Počet hodnotení	Režim výsledkov cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit (väčšina skupiny)	Percento výsledkov rovnakých ako väčšina skupiny		
			1. tím čitateľov	2. tím čitateľov	3. tím čitateľov
Bunková línia T-24	270	Negatívne	100.0 %	100.0 %	100.0 %
NILM/HPV-	270	Negatívne	95.6 %	91.1 %	95.6 %
NILM/HPV+	90	Pozitívne	70.0 %	63.3 %	50.0 %
ASC-US/HPV+	90	Pozitívne	100.0 %	90.0 %	90.0 %
LSIL/HPV+	90	Pozitívne	100.0 %	100.0 %	100.0 %
HSIL/HPV+	270	Pozitívne	98.9 %	98.9 %	98.9 %

Reprodukovateľnosť

Štúdie reprodukovateľnosti v prípade cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit boli vykonané s cieľom preukázať:

- Reprodukovateľnosť medzi šaržami u cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit (Tabuľka 9),
- Reprodukovateľnosť v rámci cyklu (Tabuľka 10) a medzi cyklami (Tabuľka 11) v prístrojoch BenchMark GX, XT a ULTRA
- Reprodukovateľnosť v rámci platformy v prístrojoch BenchMark GX, XT and ULTRA (Tabuľka 12),
- Reprodukovateľnosť medzi platformami v prístrojoch BenchMark GX, XT a ULTRA (0).

Tabuľka 9. Reprodukovateľnosť medzi šaržami u cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit.

Typ vzorky	Percento celkovej zhody
ThinPrep	100.0
SurePath	100.0

Tabuľka 10. Reprodukovateľnosť v rámci cyklu u cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit.

Typ vzorky	Percento celkovej zhody		
	GX	XT	ULTRA
ThinPrep	100.0	100.0	100.0
SurePath	93.8	96.3	92.6

Tabuľka 11. Reprodukovateľnosť medzi cyklami u cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit.

Typ vzorky	Percento celkovej zhody		
	GX	XT	ULTRA
ThinPrep	100.0	96.2	100.0
SurePath	100.0	92.6	100

Tabuľka 12. Reprodukovateľnosť v rámci platformy u cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit.

Typ vzorky	Percento celkovej zhody		
	GX	XT	ULTRA
ThinPrep	100.0	100.0	100.0
SurePath	100.0	100.0	96.3

Tabuľka 13. Interplatformová reprodukovateľnosť súpravy CINtec PLUS Cytology Kit.

Typ vzorky	Percento celkovej zhody
ThinPrep	100.0
SurePath	96.3

Tieto štúdie boli vykonané na cervikálnych vzorkách ThinPrep a SurePath. Všetky štúdie splnili svoje vopred stanovené kritériá prijateľnosti.

Štúdie zhody

Výkon súpravy CINtec PLUS Cytology Kit na použitie v prístrojoch BenchMark GX, XT a ULTRA sa hodnotil porovnaním so súpravou CINtec PLUS Kit (predikátne zariadenie, Roche mtm laboratories AG, Mannheim), ktorá v minulosti preukázala vysokú citlivosť a špecifickosť na prítomnosť predrakovinového a rakovinového ochorenia vo vzorkách z cervikálnej cytológie vzhľadom na prítomnosť jednotlivých epitelálnych buniek krčka maternice vykazujúcich pozitívny výsledok dvojitého farbenia na p16^{INK4a} a Ki-67.^{7-15,18,20,23,25-28}

Štúdie zhody sa vykonali s použitím vzoriek pacientov z populácie pre určené použitie s výsledkom Pap cytológie NILM (negatívna intraepiteliálna lézia alebo malignita), ASC-US, LSIL a HSIL pre každú z jednotlivých metód prípravy cervikálnej cytológie: ThinPrep, BD SurePath a sklička s konvenčnými stermi. Pre vzorky LBC sa z každej vzorky pacienta pripravili dve sklička. V prípade konvenčných sterov boli pripravené dve sklička od jedného pacienta na rovnakej návšteve, pričom materiál vzorky bol rozdelený medzi dve sklička („technika delenia vzoriek“). Jedno skličko bolo testované cytologickou súpravou CINtec PLUS Cytology Kit na prístroji BenchMark IHC/ISH a jedno skličko bolo farbené schválenou pomôckou.

Algoritmus odčítavania vzoriek LBC:

Každé skličko odčítavali dvaja kvalifikovaní čitatelia. Ak sa na výsledku zhodli, považoval sa za konečný výsledok daného sklička. Ak sa na výsledku nezhodli, vykonal posúdenie odčítania tretí čitateľ a väčšinový výsledok sa stal konečným výsledkom pre dané skličko.

Algoritmus odčítania pre sklička konvenčných sterov:

Každé skličko odčítavali dvaja kvalifikovaní čitatelia. Ak obaja čitatelia vyhodnotili skličko ako pozitívne, bol konečný výsledok pre dané skličko pozitívny. Ak sa na výsledku nezhodli, skontrolovali skličko traja čitatelia, ktorí predstavovali komisiu, ktorá mala poskytnúť spoločné hodnotenie, a jeho výsledok sa stal konečným výsledkom pre dané skličko. Ak obaja čitatelia vyhodnotili skličko ako negatívne, bolo odčítané tretím čitateľom, aby sa potvrdil negatívny výsledok. Ak aj tretí čitateľ potvrdil negatívny výsledok, bol konečný výsledok pre dané skličko negatívny. Ak tretí čitateľ vyhodnotil skličko ako pozitívne, bolo predložené komisii, aby sa dosiahol spoločný výsledok, ktorý sa stal konečným výsledkom pre dané skličko.

Zhoda výsledkov testov sa uvádza ako percento pozitívnej zhody (PPA) a percento negatívnej zhody (NPA) $\pm$ 95 % interval spoľahlivosti (CI) medzi súpravou CINtec PLUS Cytology Kit na použitie v prístroji BenchMark IHC/ISH a schválenou pomôckou.

Tabuľka 14. Zhoda výsledkov testov medzi súpravou CINtec PLUS Cytology Kit a predikativným zariadením na preparátoch sklička z cervikálnej cytológie ThinPrep.

		Schválená pomôcka	
		+	-
CINtec PLUS Cytology Kit	+	140	25
	-	17	147
Spolu		157	172
PPA (n/N) (95 % CI) = 140/157 x 100 % = 89.2 % (83.3 – 93.1 %)			
NPA (n/N) (95 % CI) = 147/172 x 100 % = 85.5 % (79.4 – 90.0 %)			

Tabuľka 15. Zhoda výsledkov testov medzi súpravou CINtec PLUS Cytology Kit a predikativným zariadením na preparátoch sklička z cervikálnej cytológie SurePath.

		Schválená pomôcka	
		+	-
CINtec PLUS Cytology Kit	+	56	3
	-	9	108
Spolu		65	111
PPA (n/N) (95 % CI) = 56/65 x 100 % = 86.2 % (75.7 – 92.5 %)			
NPA (n/N) (95 % CI) = 108/111 x 100 % = 97.3 % (92.4 – 99.1 %)			

Tabuľka 16. Zhoda výsledkov testu medzi cytologickou súpravou CINtec PLUS Cytology Kit a schválenou pomôckou v prípade prípravkov na cervikálnu cytológiu sklíčok s konvenčnými stermi.

		Schválená pomôcka	
		+	-
CINtec PLUS Cytology Kit	+	98	17
	-	20	72
Spolu		118	89
PPA (n/N) (95 % CI) = 98/118 x 100 % = 83.1 % (75.3 – 88.8 %)			
NPA (n/N) (95 % CI) = 72/89 x 100 % = 80.9 % (71.5 – 87.7 %)			

Štúdia média Roche Cell Collection Medium

Výkon média Roche Cell Collection Medium v porovnaní s roztokom PreservCyt bol hodnotený farbením 616 párov cervikálnych vzoriek (prípady) pomocou cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit. Pre každý prípad sa pripravilo po jednom skličku z príslušných skúmaviek PC alebo RCCM. Všetky sklička odčítal tím tvorený cytotechnológom a patológom, ktorí nepoznali totožnosť sklíčok. Výsledky testu so súpravou CINtec PLUS Cytology Kit porovnávajúce jednotlivé médiá (PC a RCCM) sú zhrnuté v Tabuľka 17. Miera pozitívy bola vypočítaná vydelením počtu pozitívnych prípadov celkovým počtom vhodných prípadov pri každom médiu. Výsledky ukazujú rozdiel medzi dvoma mierami pozitívy v hodnote 2.4 % (1.5, 6.3).

Tabuľka 17. Ekvivalencia pre miery pozitivity súpravy CINtec PLUS Cytology Kit Roche Cell Collection Medium (RCCM) a PreservCyt (PC).

Výsledok CINtec PLUS Cytology Kit pre PC			
Výsledok CINtec PLUS Cytology Kit pre RCCM	Pozitívne	Negatívne	Spolu
Pozitívne	170	48	218
Negatívne	37	204	241
Spolu	207	252	459
Miera pozitivity RCCM, n/N (%):	218/459 (47.5 %)		
Miera pozitivity PC, n/N (%):	207/459 (45.1 %)		
Rozdiel v miere pozitivity, n/N (%):	11/459 (2.4 %; 95 % CI: -1.5, 6.3)		

Súhrn výsledkov cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit v prípade adekvátnosti bunkovosti porovnávajúce PreservCyt a Roche Cell Collection Medium je uvedená Tabuľka 18. Miery adekvátnej bunkovosti sa vypočítali vydelením počtu prípadov s adekvátnou bunkovosťou celkovým počtom prípadov pre každé médium. Výsledky ukazujú rozdiel medzi dvoma mierami dostatočnej bunkovosti v hodnote 3.2 % (-0.0, 6.6).

Tabuľka 18. Porovnanie adekvátnosti bunkovosti súpravy CINtec PLUS Cytology Kit pre Roche Cell Collection Medium (RCCM) a PreservCyt (PC).

Adekvátnosť bunkovosti CINtec PLUS Cytology Kit pre PC			
Adekvátnosť bunkovosti CINtec PLUS Cytology Kit pre RCCM	Áno	Nie	Spolu
Áno	468	63	531
Nie	43	42	85
Spolu	511	105	616
Miera adekvátnosti RCCM, n/N (%):	531/616 (86.2 %)		
Miera adekvátnosti PC, n/N (%):	511/616 (83.0 %)		
Rozdiel v miere dostatočnosti, n/N (%):	20/616 (3.2 %; 95 % CI: -0.0, 6.6)		

Štúdia reprodukovateľnosti medzi laboratóriami na farbiacej platforme BenchMark ULTRA PLUS

Vykonala sa štúdia reprodukovateľnosti na hodnotenie testu CINtec PLUS Cytology v prístroji BenchMark ULTRA PLUS na duálnu imunocytochemickú detekciu p16^{INK4a} a Ki-67 v cytologických vzorkách. Štúdia zahŕňala 2 rôzne kultúry buniek T24 a 10 skupín vzoriek pochádzajúcich od pacientov (2 skupiny HSIL/HPV+, 2 skupiny LSIL/HPV+, 2 skupiny ASC-US/HPV+, 2 skupiny NILM/HPV+ a 2 skupiny NILM/HPV- LBC). Bunkové kultúry T24 boli pripravené z jednej pracovnej bunkovej banky. Každému z 3 pracovísk skúšania sa poskytli alikvóty každej skupiny vzoriek, bunkovej kultúry T24 a kontrolnej skupiny s dostatočným objemom na podporu testovania plánovaného na každom pracovisku. V každom z piatich dní farbenia pracoviská pripravili testovacie sklíčko z každého alikvótu poskytnutého RTD pomocou procesora sklíčok ThinPrep 2000 alebo ThinPrep 5000. Po príprave sklíčka každé pracovisko zafarbilo približne 13 sklíčok v prístroji BenchMark ULTRA PLUS. Päť dní farbenia nenásledovalo za sebou a trvalo najmenej 20 dní. Na každom pracovisku 2 tímy čitateľov, každý zložený z cytotechnológa a patológa, nezávisle hodnotili sklíčka farbené na ich pracovisku na prítomnosť alebo neprítomnosť dvojitého farbenia a priradili sklíčku pozitívny, negatívny alebo nevyhovujúci výsledok v teste CINtec PLUS Cytology. Tímy čitateľov boli zaslepené voči akémukoľvek predchádzajúcemu stanoveniu stavu HPV, stavu Pap cytologie, výsledku testu CINtec PLUS Cytology alebo iným klinickým informáciám.

Údaje sa priamo zadali do klinickej databázy a analyzovali s cieľom určiť reprodukovateľnosť testu na viacerých pracoviskách, počas viacerých dní a v rámci viacerých tímov čitateľov. Miery prijateľnosti pozadia a bunkovosti dosiahli vo všetkých

prípadoch a na všetkých prístrojoch 100 %. Výsledky sú zhrnuté v Tabuľka 19 a Tabuľka 20.

Tabuľka 19. Štúdia reprodukovateľnosti medzi laboratóriami v prístroji BenchMark ULTRA PLUS – reprodukovateľnosť medzi pracoviskami

Kategória skupiny	Počet hodnotení	Režim výsledkov cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology (väčšina skupiny)	Percento rovnakých výsledkov ako väčšina skupiny		
			Pracovisko A	Pracovisko B	Pracovisko C
Bunková línia T24	60	Negatívne	95.0 %	100.0 %	100.0 %
NILM/HPV-	60	Negatívne	100.0 %	95.0 %	100.0 %
NILM/HPV+	60	Pozitívne	90.0 %	80.0 %	95.0 %
ASC-US/HPV+	60	Pozitívne	100.0 %	95.0 %	100.0 %
LSIL/HPV+	60	Pozitívne	100.0 %	95.0 %	100.0 %
HSIL/HPV+	60	Pozitívne	100.0 %	100.0 %	100.0 %

Tabuľka 20. Štúdia reprodukovateľnosti medzi laboratóriami v prístroji BenchMark ULTRA PLUS – celková presnosť

Kategória skupiny	Režim výsledkov cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology (väčšina skupiny)	Percento výsledkov rovnakých ako väčšina skupiny	n/N	95 % interval spoľahlivosti
Bunková línia T24	Negatívne	98.3 %	59/60	(96.7, 100.0)
NILM/HPV-	Negatívne	98.3 %	59/60	(96.7, 100.0)
NILM/HPV+	Pozitívne	88.3 %	53/60	(86.7, 90.0)
ASC-US/HPV+	Pozitívne	98.3 %	59/60	(96.7, 100.0)
LSIL/HPV+	Pozitívne	98.3 %	59/60	(96.7, 100.0)
HSIL/HPV+	Pozitívne	100.0 %	60/60	(94.0, 100.0)

Zhoda medzi prístrojmi BenchMark ULTRA PLUS a BenchMark ULTRA (vzorky ThinPrep)

Tri laboratória sa zúčastnili štúdie zhody medzi prístrojom BenchMark ULTRA a prístrojom BenchMark ULTRA PLUS. V tejto štúdii sa použilo 220 skupín z deidentifikovaných cervikálnych vzoriek ThinPrep LBC pripravených v Roche Tissue Diagnostics (RTD) v nasledujúcich kategóriách: 88 pozitívnych skupín, 22 hranične pozitívnych skupín, 22 negatívnych stredných skupín a 88 negatívnych skupín bunkovej kultúry T24. Súbor 4 sklíčok z každej vzorky bol pripravený v RTD pomocou procesora sklíčok ThinPrep 2000 alebo ThinPrep 5000. Prvé pripravené sklíčko z každého súboru sa farbilo v prístroji BenchMark ULTRA v RTD. Každému pracovisku skúšania sa poskytlo jedno z 3 zvyšných sklíčok na farbenie testom CINtec PLUS Cytology v prístroji BenchMark ULTRA PLUS. Sklíčko BenchMark ULTRA farbené v RTD sa vyhodnotilo na prítomnosť alebo neprítomnosť dvojitého farbenia a výsledok pozitívny, negatívny alebo nevyhovujúci priradený tímom čitateľov RTD, ktorý pozostával z cytotechnológa a patológa, aby sa stanovilo referenčné skóre. Na každom pracovisku tímy čitateľov skúšania nezávisle vyhodnotili sklíčka farbené v prístroji BenchMark ULTRA pre výsledok testu CINtec PLUS Cytology. Sklíčka farbené v prístroji BenchMark ULTRA PLUS na každom pracovisku hodnotil tímy čitateľov pracoviska na výsledok testu CINtec PLUS Cytology. Preto každý tímy čitateľov na pracovisku hodnotil jedno sklíčko farbené v prístroji BenchMark ULTRA a jedno sklíčko farbené v prístroji BenchMark ULTRA PLUS. Čítania sklíčok farbených v prístroji BenchMark ULTRA a BenchMark ULTRA PLUS boli oddelené dvojtyždňovým vymývacím obdobím. Všetky tímy čitateľov boli zaslepené voči akémukoľvek

predchádzajúcemu stanoveniu stavu HPV, stavu Pap cytológie, výsledku testu CINtec PLUS Cytology alebo iným klinickým informáciám.

Rovnocennosť výkonu analýzy CINtec PLUS Cytology sa považovala za prijateľnú v prístroji BenchMark ULTRA PLUS, ak miera PPA a NPA mala dolnú hranicu obojstranného 95 % intervalu spoľahlivosti najmenej 85 %. Na to, aby bola štúdia úspešná, sa vyžadovalo, aby miera prijateľnosti pre pozadie a bunkovosť testovacích sklíčok farbených pomocou CINtec PLUS Cytology v prístroji BenchMark ULTRA PLUS bola prijateľná u ≥ 90 % všetkých testovacích sklíčok. Miery prijateľnosti pozadia a bunkovosti dosiahli na všetkých testovacích sklíčkach 99.7 % a 99.4 %. V Tabuľka 21 nižšie je zhrnutá miery zhody stavu CINtec PLUS Cytology medzi prístrojmi BenchMark ULTRA a BenchMark ULTRA PLUS.

Tabuľka 21. Štúdia zhody medzi prístrojmi BenchMark ULTRA a BenchMark ULTRA PLUS – súhrnná zhoda stavu CINtec PLUS Cytology medzi platformami (ThinPrep)

Stav CINtec PLUS Cytology						
BenchMark ULTRA PLUS	BenchMark ULTRA			Zhoda		
	Pozitívne	Negatívne	Spolu	Miera	% (n/N)	95 % CI
Pozitívne	314	13	327	PPA	95.7 (314/328)	(92.8, 98.1)
Negatívne	14	317	331	NPA	96.1 (317/330)	(93.5, 98.1)
Spolu	328	330	658	OPA	95.9 (631/658)	(94.1, 97.4)

Poznámka: Súhrnné miery zhody zhrňajú všetky vzorky a tímy čitateľov pre ULTRA PLUS.

Poznámka: PPA = percento pozitívnej zhody; NPA = percento negatívnej zhody; OPA = percento celkovej zhody

Štúdia reprodukovateľnosti v rámci laboratória na farbiacej platforme BenchMark ULTRA PLUS

Vykonal sa štúdia reprodukovateľnosti v rámci laboratória s cieľom vyhodnotiť opakovateľnosť v rámci jedného cyklu, strednú presnosť medzi dňami a strednú presnosť medzi prístrojmi testu CINtec PLUS Cytology na vzorkách SurePath. Štúdia zahŕňala 2 rôzne kultúry buniek T24 a 9 skupín vzoriek pochádzajúcich od pacientov SurePath (3 CINtec pozitívne/HPV+, 3 hraničné a 3 CINtec negatívne/HPV-). Testovacie sklička sa pripravili v prístroji na prípravu sklíčok BD Totalys v každom z piatich dní farbenia, ktoré nasledovali po sebe a trvali najmenej 20 dní. Na vyhodnotenie reprodukovateľnosti medzi prístrojmi sa použili tri prístroje BenchMark ULTRA PLUS. Testovacie sklička hodnotil tím čitateľov pozostávajúci z cytotechnológa a patológa vyskoleného na hodnotenie CINtec PLUS Cytology. Zhoda testovacích sklíčok sa určila porovnaním stavu CINtec PLUS Cytology testovacích sklíčok so stavom na úrovni skupiny (Pool-Level Mode, PLM), ktorý je definovaný ako najčastejší výsledok stavu spomedzi všetkých hodnotení súhrnných údajov skupiny zo všetkých prístrojov, všetkých dní a všetkých opakovaní danej skupiny. Miery prijateľnosti pozadia a bunkovosti dosiahli na všetkých testovacích sklíčkach 99.4 % a 99.7 %. Výsledky sú zhrnuté v Tabuľka 22, Tabuľka 23, Tabuľka 24 a Tabuľka 25 nižšie.

Tabuľka 22. Štúdia presnosti v rámci laboratória – celková presnosť pravých pozitívnych a pravých negatívnych vzoriek SurePath

Stav na úrovni skupiny						
Stav CINtec PLUS	BenchMark ULTRA			Zhoda		
	Pozitívne	Negatívne	Spolu	Mieranie	% (n/N)	95 % CI
Pozitívne	89	0	89	PPA	100.0 (89/89)	(95.9, 100.0)

Stav na úrovni skupiny						
Stav CINtec PLUS	BenchMark ULTRA			Zhoda		
	Pozitívne	Negatívne	Spolu	Meranie	% (n/N)	95 % CI
Negatívne	0	90	90	NPA	100.0 (90/90)	(95.9, 100.0)
Spolu	89	90	179	OPA	100.0 (179/179)	(97.9, 100.0)

Tabuľka 23. Štúdia presnosti medzi laboratóriami – stredná presnosť medzi dňami

Deň	Rovnaký výsledok ako PLM, n (%)	Odišný výsledok od PLM, n (%)	Celkom, n (%)
1. deň	36 (100.0)	0 (0.0)	36 (100.0)
2. deň	35 (100.0)	0 (0.0)	35 (100.0)
3. deň	36 (100.0)	0 (0.0)	36 (100.0)
4. deň	36 (100.0)	0 (0.0)	36 (100.0)
5. deň	36 (100.0)	0 (0.0)	36 (100.0)

Tabuľka 24. Štúdia presnosti medzi laboratóriami – opakovateľnosť v rámci cyklu

Opakovanie	Rovnaký výsledok ako PLM, n (%)	Odišný výsledok od PLM, n (%)	Celkom, n (%)
Opakovanie 1	90 (100.0)	0 (0.0)	90 (100.0)
Opakovanie 2	89 (100.0)	0 (0.0)	89 (100.0)

Tabuľka 25. Štúdia presnosti medzi laboratóriami – stredná presnosť medzi prístrojmi

Prístroj	Rovnaký výsledok ako PLM, n (%)	Odišný výsledok od PLM, n (%)	Celkom, n (%)
Prístroj 1	60 (100.0)	0 (0.0)	60 (100.0)
Prístroj 2	60 (100.0)	0 (0.0)	60 (100.0)
Prístroj 3	59 (100.0)	0 (0.0)	59 (100.0)

Zhoda medzi farbiacimi platformami BenchMark ULTRA PLUS a BenchMark ULTRA (vzorky SurePath)

Vykonal sa interná štúdia zhody s cieľom overiť rovnocenný výkon farbenia súpravy CINtec PLUS Cytology medzi farbiacimi platformami BenchMark ULTRA a ULTRA PLUS na vzorkách SurePath. Štúdia zahŕňala 88 skutočne pozitívnych, 26 hranične pozitívnych, 26 stredne negatívnych a 88 skutočne negatívnych kultúr bunkovej línie T24. Z každej vzorky sa v prístroji na prípravu sklíčok BD Totalys pripravili dve testovacie sklička, ktoré sa potom farbili pomocou CINtec PLUS Cytology v prístroji BenchMark ULTRA alebo BenchMark ULTRA PLUS. Testovacie sklička hodnotil tím čitateľov pozostávajúci z cytotechnológa a patológa vyskoleného na hodnotenie CINtec PLUS Cytology. Rovnocennosť výkonu analýzy CINtec PLUS Cytology sa považovala za prijateľnú v prístroji BenchMark ULTRA PLUS, ak miera PPA a NPA mala dolnú hranicu obojstranného 95 % intervalu spoľahlivosti najmenej 85 %. Na to, aby bola štúdia úspešná, sa vyžadovalo, aby miera prijateľnosti pre pozadie a bunkovosť testovacích sklíčok farbených pomocou CINtec PLUS Cytology v prístroji BenchMark ULTRA PLUS bola prijateľná u ≥ 90 % všetkých testovacích sklíčok. Miery prijateľnosti pozadia a

bunkovosti dosiahli na všetkých testovacích sklíčkach 99.6 % a 99.1 %. Výsledky sú zhmútené v Tabuľka 26 nižšie.

Tabuľka 26. Štúdia zhody medzi prístrojmi BenchMark ULTRA a BenchMark ULTRA PLUS (SurePath)

Stav ULTRA PLUS	Stav ULTRA			Zhoda		
	Pozitívne	Negatívne	Spolu	Meranie	% (n/N)	95 % CI
Pozitívne	94	2	96	PPA	92.2 (94/102)	(85.3, 96.0)
Negatívne	8	119	127	NPA	98.3 (119/121)	(94.2, 99.5)
Spolu	102	121	223	OPA	95.5 (213/223)	(91.9, 97.5)

KLINICKÁ ÚČINNOSŤ

Prospektívna multicentrická štúdia (IMPACT, IMproved Primary screening And Colposcopy Triage – vylepšený primárny skríning a kolposkopická triáž) bola navrhnutá na zhodnotenie klinickej účinnosti súpravy CINtec PLUS Cytology Kit v prístroji BenchMark ULTRA s použitím klinicky odobratých vzoriek z krčka maternice do roztoku PreservCyt® na identifikáciu ochorenia krčka maternice vysokého štádia. Štúdia bola navrhnutá na hodnotenie výkonu cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit ako reflexného testu u žien vo veku ≥ 25 rokov, ktoré boli pozitívne na HPV v teste cobas® 4800 HPV Test alebo cobas® 6800/8800 HPV Test. Údaje z tejto štúdie podporujú použitie cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit ako pomôcky pri identifikácii žien s intraepiteliálnymi léziami krčka maternice vysokého stupňa u pacientov s pozitívnym výsledkom testu HR-HPV.

Charakteristika výkonu cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit v porovnaní s Pap cytológiou u žien vo veku 25 – 65 rokov s cobas® 6800/8800 HPV Test alebo cobas® 4800 HPV Test, pozitívne výsledky

Porovnávací výkon cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit v porovnaní s Pap cytológiou u pozitívnych žien v prípade cobas® 6800/8800 HPV Test a cobas® 4800 HPV Test je uvedený v nasledujúcich tabuľkách pre populáciu 12 iných HR HPV+ (Tabuľka 27), populáciu HPV16+ (Tabuľka 28) a populáciu HPV18+ (Tabuľka 29). V troch skupinách genotypov sa pozorovalo zvýšenie citlivosti a zníženie špecifickosti na detekciu ochorenia krčka maternice vysokého stupňa v prípade cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit v porovnaní s Pap cytológiou (Tabuľka 27, Tabuľka 28 a Tabuľka 29).

Medzi pozitívnymi ženami v prípade cobas® 6800/8800 HPV Test a cobas® 4800 HPV Test sa pozoroval maximálny nárast citlivosti (rozdiel = 23.1 %, resp. 24.2 %) a minimálny pokles špecifickosti (rozdiel = 7.9 %, resp. 8.7 %) v porovnaní s Pap cytológiou v populácii 12 iných HR HPV+ (Tabuľka 27).

Vo všetkých prípadoch viedlo použitie cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit k podstatnému zníženiu rizika ochorenia pri negatívnych výsledkoch CINtec PLUS Cytology Kit v porovnaní s NILM Pap cytológiou. Medzi pozitívnymi ženami v prípade cobas® 6800/8800 HPV Test bolo 1-NPV o 3.7 %, 6.1 % a 1.2 % nižšie pre ≥ CIN2 a o 0.9 %, 3.3 % a 0.3 % nižšie pre ≥ CIN3 v populácii 12 iných HR HPV+, HPV16+ a HPV18+. Medzi pozitívnymi ženami v prípade cobas® 4800 HPV Test bolo 1-NPV o 3.4 %, 9.1 % a 3.3 % nižšie pre ≥ CIN2 a o 0.8 %, 5.1 % a 0.5 % nižšie pre ≥ CIN3 v populácii 12 iných HR HPV+, HPV16+ a HPV18+.

Tabuľka 27. Účinnosť cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit v porovnaní s Pap cytológiou u žien v populácii 12 iných HR HPV+ vo veku 25 – 65 rokov.

cobas® 6800/8800 system, 12 iných HR HPV+			
Výkon Meranie	Diagnóza CPR ≥ CIN2		
	CINtec PLUS Cytology	Pap cytológia	Rozdiel
Citlivosť (%)	83.0 (254/306) (78.4, 86.8)	58.8 (180/306) (53.2, 64.2)	24.2 (18.3, 29.9)
Špecifickosť (%)	56.8 (1373/2416) (54.8, 58.8)	65.5 (1583/2416) (63.6, 67.4)	-8.7 (-10.9, -6.4)
PPV (%)	19.6 (254/1297) (18.5, 20.6)	17.8 (180/1013) (16.2, 19.3)	1.8 (0.0, 3.3)
1 - NPV (%)	3.6 (52/1425) (2.9, 4.6)	7.4 (126/1709) (6.5, 8.3)	-3.7 (-4.5, -2.4)
Prevalencia (%)	11.2 (306/2722)		
Výkon Meranie	Diagnóza CPR ≥ CIN3		
	CINtec PLUS Cytology	Pap cytológia	Rozdiel
Citlivosť (%)	86.0 (80/93) (77.5, 91.6)	66.7 (62/93) (56.6, 75.4)	19.4 (10.0, 28.7)
Špecifickosť (%)	53.7 (1412/2629) (51.8, 55.6)	63.8 (1678/2629) (62.0, 65.6)	-10.1 (-12.3, -8.0)
PPV (%)	6.2 (80/1297) (5.6, 6.6)	6.1 (62/1013) (5.2, 6.9)	0.0 (-0.8, 0.8)
1 - NPV (%)	0.9 (13/1425) (0.5, 1.5)	1.8 (31/1709) (1.3, 2.4)	-0.9 (-1.4, -0.3)
Prevalencia (%)	3.4 (93/2722)		
cobas® 4800 system, 12 iných HR HPV+			
Výkon Meranie	Diagnóza CPR ≥ CIN2		
	CINtec PLUS Cytology	Pap cytológia	Rozdiel
Citlivosť (%)	82.1 (256/312) (77.4, 85.9)	59.0 (184/312) (53.4, 64.3)	23.1 (17.3, 28.7)
Špecifickosť (%)	58.6 (1520/2594) (56.7, 60.5)	66.5 (1726/2594) (64.7, 68.3)	-7.9 (-10.1, -5.8)
PPV (%)	19.2 (256/1330) (18.1, 20.3)	17.5 (184/1052) (15.9, 19.0)	1.8 (0.2, 3.3)
1 - NPV (%)	3.6 (56/1576) (2.8, 4.4)	6.9 (128/1854) (6.0, 7.8)	-3.4 (-4.4, -2.3)
Prevalencia (%)	10.7 (312/2906)		
Výkon Meranie	Diagnóza CPR ≥ CIN3		
	CINtec PLUS Cytology	Pap cytológia	Rozdiel
Citlivosť (%)	86.2 (81/94) (77.8, 91.7)	67.0 (63/94) (57.0, 75.7)	19.1 (9.8, 28.4)
Špecifickosť (%)	55.6 (1563/2812) (53.7, 57.4)	64.8 (1823/2812) (63.0, 66.6)	-9.2 (-11.3, -7.2)
PPV (%)	6.1 (81/1330) (5.5, 6.5)	6.0 (63/1052) (5.1, 6.8)	0.1 (-0.7, 0.9)
1 - NPV (%)	0.8 (13/1576) (0.5, 1.3)	1.7 (31/1854) (1.2, 2.2)	-0.8 (-1.3, -0.3)
Prevalencia (%)	3.2 (94/2906)		
Poznámka: CPR = centrálna patologická kontrola, PPV = pozitívna prediktívna hodnota, NPV = negatívna prediktívna hodnota, čísla v zátvorkách sú (n/N) a 2-stranné 95 % intervaly spoľahlivosti.			

Tabuľka 28. Účinnosť cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit v porovnaní s Pap cytológiou u žien v populácii HPV16+ vo veku 25 – 65 rokov.

cobas® 6800/8800 system, HPV16+			
Výkon Meranie	Diagnóza CPR ≥ CIN2		
	CINtec PLUS Cytology	Pap cytológia	Rozdiel
Citlivosť (%)	92.6 (176/190) (88.0, 95.6)	75.8 (144/190) (69.2, 81.3)	16.8 (10.7, 23.2)
Špecifickosť (%)	57.2 (349/610) (53.3, 61.1)	68.5 (418/610) (64.7, 72.1)	-11.3 (-15.4, -7.2)
PPV (%)	40.3 (176/437) (37.9, 42.7)	42.9 (144/336) (39.4, 46.3)	-2.6 (-5.7, 0.8)
1 - NPV (%)	3.9 (14/363) (2.3, 6.2)	9.9 (46/464) (7.8, 12.3)	-6.1 (-7.1, -2.6)
Prevalencia (%)	23.8 (190/800)		
Výkon Meranie	Diagnóza CPR ≥ CIN3		
	CINtec PLUS Cytology	Pap cytológia	Rozdiel
Citlivosť (%)	92.5 (111/120) (86.4, 96.0)	77.5 (93/120) (69.2, 84.1)	15.0 (7.7, 22.8)
Špecifickosť (%)	52.1 (354/680) (48.3, 55.8)	64.3 (437/680) (60.6, 67.8)	-12.2 (-16.0, -8.3)
PPV (%)	25.4 (111/437) (23.6, 27.2)	27.7 (93/336) (24.8, 30.5)	-2.3 (-4.7, 0.3)
1 - NPV (%)	2.5 (9/363) (1.3, 4.4)	5.8 (27/464) (4.2, 7.8)	-3.3 (-4.7, -1.1)
Prevalencia (%)	15.0 (120/800)		
cobas® 4800 system, HPV16+			
Výkon Meranie	Diagnóza CPR ≥ CIN2		
	CINtec PLUS Cytology	Pap cytológia	Rozdiel
Citlivosť (%)	93.6 (176/188) (89.2, 96.3)	76.6 (144/188) (70.0, 82.1)	17.0 (10.9, 23.5)
Špecifickosť (%)	44.8 (182/406) (40.1, 49.7)	60.1 (244/406) (55.3, 64.7)	-15.3 (-20.6, -9.8)
PPV (%)	44.0 (176/400) (41.7, 46.4)	47.1 (144/306) (43.5, 50.6)	-3.1 (-6.6, 0.5)
1 - NPV (%)	6.2 (12/194) (3.6, 10.2)	15.3 (44/288) (12.0, 19.0)	-9.1 (-13.4, -4.8)
Prevalencia (%)	31.6 (188/594)		
Výkon Meranie	Diagnóza CPR ≥ CIN3		
	CINtec PLUS Cytology	Pap cytológia	Rozdiel
Citlivosť (%)	94.0 (110/117) (88.2, 97.1)	78.6 (92/117) (70.4, 85.1)	15.4 (7.9, 23.4)
Špecifickosť (%)	39.2 (187/477) (34.9, 43.7)	55.1 (263/477) (50.6, 59.5)	-15.9 (-20.7, -11.0)
PPV (%)	27.5 (110/400) (25.7, 29.2)	30.1 (92/306) (27.1, 32.9)	-2.6 (-5.4, 0.2)
1 - NPV (%)	3.6 (7/194) (1.8, 7.0)	8.7 (25/288) (6.2, 11.8)	-5.1 (-8.3, -1.7)
Prevalencia (%)	19.7 (117/594)		
Poznámka: CPR = centrálna patologická kontrola, PPV = pozitívna prediktívna hodnota, NPV = negatívna prediktívna hodnota, čísla v zátvorkách sú (n/N) a 2-stranné 95 % intervaly spoľahlivosti.			

Tabuľka 29. Účinnosť cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit v porovnaní s Pap cytológiou u žien v populácii HPV18+ vo veku 25 – 65 rokov.

cobas® 6800/8800 system, HPV18+			
Výkon Meranie	Diagnóza CPR ≥ CIN2		
	CINtec PLUS Cytology	Pap cytológia	Rozdiel
Citlivosť (%)	83.8 (31/37) (68.9, 92.3)	73.0 (27/37) (57.0, 84.6)	10.8 (-6.7, 27.8)
Špecifickosť (%)	62.7 (205/327) (57.3, 67.8)	73.1 (239/327) (68.0, 77.6)	-10.4 (-16.1, -4.6)
PPV (%)	20.3 (31/153) (16.8, 23.4)	23.5 (27/115) (18.6, 28.2)	-3.2 (-8.2, 1.8)
1 - NPV (%)	2.8 (6/211) (1.4, 5.4)	4.0 (10/249) (2.3, 6.3)	-1.2 (-3.6, 1.3)
Prevalencia (%)	10.2 (37/364)		
Výkon Meranie	Diagnóza CPR ≥ CIN3		
	CINtec PLUS Cytology	Pap cytológia	Rozdiel
Citlivosť (%)	87.5 (14/16) (64.0, 96.5)	81.3 (13/16) (57.0, 93.4)	6.3 (-19.6, 31.6)
Špecifickosť (%)	60.1 (209/348) (54.8, 65.1)	70.7 (246/348) (65.7, 75.2)	-10.6 (-16.1, -5.0)
PPV (%)	9.2 (14/153) (6.7, 10.8)	11.3 (13/115) (8.0, 13.9)	-2.2 (-5.2, 0.8)
1 - NPV (%)	0.9 (2/211) (0.3, 2.7)	1.2 (3/249) (0.4, 2.7)	-0.3 (-1.7, 1.1)
Prevalencia (%)	4.4 (16/364)		
cobas® 4800 system, HPV18+			
Výkon Meranie	Diagnóza CPR ≥ CIN2		
	CINtec PLUS Cytology	Pap cytológia	Rozdiel
Citlivosť (%)	87.5 (28/32) (71.9, 95.0)	71.9 (23/32) (54.6, 84.4)	15.6 (-3.6, 33.9)
Špecifickosť (%)	53.4 (102/191) (46.3, 60.3)	62.3 (119/191) (55.3, 68.9)	-8.9 (-16.6, -1.0)
PPV (%)	23.9 (28/117) (19.9, 27.6)	24.2 (23/95) (18.8, 29.3)	-0.3 (-5.8, 5.3)
1 - NPV (%)	3.8 (4/106) (1.5, 8.2)	7.0 (9/128) (4.0, 11.0)	-3.3 (-8.1, 1.3)
Prevalencia (%)	14.3 (32/223)		
Výkon Meranie	Diagnóza CPR ≥ CIN3		
	CINtec PLUS Cytology	Pap cytológia	Rozdiel
Citlivosť (%)	86.7 (13/15) (62.1, 96.3)	80.0 (12/15) (54.8, 93.0)	6.7 (-20.5, 33.2)
Špecifickosť (%)	50.0 (104/208) (43.3, 56.7)	60.1 (125/208) (53.3, 66.5)	-10.1 (-17.5, -2.5)
PPV (%)	11.1 (13/117) (8.1, 13.2)	12.6 (12/95) (8.8, 15.6)	-1.5 (-5.1, 2.0)
1 - NPV (%)	1.9 (2/106) (0.5, 5.2)	2.3 (3/128) (0.8, 5.2)	-0.5 (-3.4, 2.3)
Prevalencia (%)	6.7 (15/223)		
Poznámka: CPR = centrálna patologická kontrola, PPV = pozitívna prediktívna hodnota, NPV = negatívna prediktívna hodnota, čísla v zátvorkách sú (n/N) a 2-stranné 95 % intervaly spoľahlivosti.			

Charakteristika výkonu u populácie testu cobas® 6800/8800 HPV Test alebo cobas® 4800 HPV Test, pozitívne výsledky, ženy vo veku 30 – 65 rokov s výsledkami Pap cytologie NILM

Výkon cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit pri detegovaní ≥ CIN2 a ≥ CIN3 u žien v populácii 12 iných HR HPV+ s Pap cytológiou NILM je uvedený v Tabuľka 30.

V populácii cobas® 6800/8800 system, teda ženy v populácii 12 iných HR HPV+ s Pap cytológiou NILM, dosiahla citlivosť a špecifickosť pri detegovaní ≥ CIN2 hodnoty jednotlivo 66.7 % a 69.7 % (jednotlivo 62.5 % a 67.8 % v prípade ≥ CIN3). Hodnoty PPV v tejto skupine boli 13.0 % v prípade ≥ CIN2 a 2.6 % v prípade ≥ CIN3, kým riziko ochorenia u žien s negatívnymi výsledkami CINtec PLUS Cytology Kit (1-NPV) bolo 3.1 % v prípade ≥ CIN2 a 0.8 % v prípade ≥ CIN3.

V populácii cobas® 4800 system, teda ženy v populácii 12 iných HR HPV+ s Pap cytológiou NILM, dosiahla citlivosť a špecifickosť pri detegovaní ≥ CIN2 hodnoty jednotlivo 64.9 % a 71.0 % (jednotlivo 66.7 % a 69.4 % v prípade ≥ CIN3). Hodnoty PPV v tejto skupine boli 12.0 % v prípade ≥ CIN2 a 2.5 % v prípade ≥ CIN3, kým riziko ochorenia u žien s negatívnymi výsledkami CINtec PLUS Cytology Kit (1-NPV) bolo 2.9 % v prípade ≥ CIN2 a 0.6 % v prípade ≥ CIN3.

Tabuľka 30. Účinnosť cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit u žien v populácii 12 iných HR HPV+ vo veku 30 – 65 rokov s cytológiou NILM.

Meranie výkonu	cobas® 6800/8800 system, 12 Other HR HPV+/NILM		cobas® 4800 system, 12 Other HR HPV+/NILM	
	Diagnóza CPR ≥ CIN2	Diagnóza CPR ≥ CIN3	Diagnóza CPR ≥ CIN2	Diagnóza CPR ≥ CIN3
Citlivosť (%)	66.7 (50/75) (55.4, 76.3)	62.5 (10/16) (38.6, 81.5)	64.9 (48/74) (53.5, 74.8)	66.7 (10/15) (41.7, 84.8)
Špecifickosť (%)	69.7 (772/1108) (66.9, 72.3)	67.8 (791/1167) (65.0, 70.4)	71.0 (864/1217) (68.4, 73.5)	69.4 (885/1276) (66.8, 71.8)
Prevalencia (%)	6.3 (75/1183)	1.4 (16/1183)	5.7 (74/1291)	1.2 (15/1291)
PPV (%)	13.0 (50/386) (10.8, 14.9)	2.6 (10/386) (1.6, 3.4)	12.0 (48/401) (9.9, 13.9)	2.5 (10/401) (1.6, 3.2)
NPV (%)	96.9 (772/797) (95.8, 97.8)	99.2 (791/797) (98.8, 99.6)	97.1 (864/890) (96.2, 97.9)	99.4 (885/890) (99.0, 99.7)
1 - NPV (%)	3.1 (25/797) (2.2, 4.2)	0.8 (6/797) (0.4, 1.2)	2.9 (26/890) (2.1, 3.8)	0.6 (5/890) (0.3, 1.0)
PLR	2.20 (1.79, 2.59)	1.94 (1.19, 2.58)	2.24 (1.81, 2.65)	2.18 (1.35, 2.82)
NLR	0.48 (0.34, 0.64)	0.55 (0.27, 0.91)	0.49 (0.35, 0.66)	0.48 (0.22, 0.84)
Miera pozitivity (%)	32.6 (386/1183) (30.0, 35.3)		31.1 (401/1291) (28.6, 33.5)	
Poznámka: CPR = centrálna patologická kontrola, PPV = pozitívna prediktívna hodnota, NPV = negatívna prediktívna hodnota, PLR = pozitívny pomer pravdepodobnosti, NLR = negatívny pomer pravdepodobnosti, čísla v zátvorkách sú (n/N) a 2-stranné 95 % intervaly spoľahlivosti.				

Výkon cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit pri detegovaní ≥ CIN2 a ≥ CIN3 u žien v populácii HPV16+ s Pap cytológiou NILM je uvedený v Tabuľka 31.

V populácii cobas® 6800/8800 system, teda ženy v populácii HPV16+ s Pap cytológiou NILM, dosiahla citlivosť a špecifickosť v prípade ≥ CIN2 hodnoty jednotlivo 76.3 % a 72.5 % a v prípade ≥ CIN3 jednotlivo 75.0 % a 70.5 %. Hodnoty PPV v tejto skupine boli 23.8 % v prípade ≥ CIN2 a 14.8 % v prípade ≥ CIN3, kým riziko ochorenia u žien s negatívnymi výsledkami CINtec PLUS Cytology Kit (1-NPV) bolo 3.5 % v prípade ≥ CIN2 a 2.4 % v prípade ≥ CIN3.

V populácii cobas® 4800 system, teda ženy v populácii HPV16+ s Pap cytológiou NILM, dosiahla citlivosť a špecifickosť v prípade ≥ CIN2 hodnoty jednotlivo 80.6 % a 61.7 % a v prípade ≥ CIN3 jednotlivo 81.8 % a 59.0 %. Hodnoty PPV v tejto skupine boli 27.9 % v prípade ≥ CIN2 a 17.3 % v prípade ≥ CIN3, kým riziko ochorenia u žien s negatívnymi výsledkami CINtec PLUS Cytology Kit (1-NPV) bolo 5.5 % v prípade ≥ CIN2 a 3.1 % v prípade ≥ CIN3.

Tabuľka 31. Účinnosť cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit u žien v populácii HPV16+ vo veku 30 – 65 rokov s cytológiou NILM.

Meranie výkonu	cobas® 6800/8800 system, HPV16+/NILM		cobas® 4800 system, HPV16+/NILM	
	Diagnóza CPR ≥ CIN2	Diagnóza CPR ≥ CIN3	Diagnóza CPR ≥ CIN2	Diagnóza CPR ≥ CIN3
Citlivosť (%)	76.3 (29/38) (60.8, 87.0)	75.0 (18/24) (55.1, 88.0)	80.6 (29/36) (65.0, 90.2)	81.8 (18/22) (61.5, 92.7)
Špecifickosť (%)	72.5 (245/338) (67.5, 77.0)	70.5 (248/352) (65.5, 75.0)	61.7 (121/196) (54.8, 68.3)	59.0 (124/210) (52.3, 65.5)
Prevalencia (%)	10.1 (38/376)	6.4 (24/376)	15.5 (36/232)	9.5 (22/232)
PPV (%)	23.8 (29/122) (19.1, 28.2)	14.8 (18/122) (11.0, 18.1)	27.9 (29/104) (22.8, 32.7)	17.3 (18/104) (13.2, 20.8)
NPV (%)	96.5 (245/254) (94.2, 98.0)	97.6 (248/254) (95.8, 98.9)	94.5 (121/128) (90.5, 97.2)	96.9 (124/128) (93.5, 98.7)
1 - NPV (%)	3.5 (9/254) (2.0, 5.8)	2.4 (6/254) (1.1, 4.2)	5.5 (7/128) (2.8, 9.5)	3.1 (4/128) (1.3, 6.5)
PLR	2.77 (2.10, 3.49)	2.54 (1.81, 3.24)	2.11 (1.61, 2.64)	2.00 (1.45, 2.50)
NLR	0.33 (0.18, 0.54)	0.35 (0.17, 0.64)	0.31 (0.16, 0.57)	0.31 (0.12, 0.66)
Miera pozitivity (%)	32.4 (122/376) (28.0, 36.9)		44.8 (104/232) (38.7, 50.9)	
Poznámka: CPR = centrálna patologická kontrola, PPV = pozitívna prediktívna hodnota, NPV = negatívna prediktívna hodnota, PLR = pozitívny pomer pravdepodobnosti, NLR = negatívny pomer pravdepodobnosti, čísla v zátvorkách sú (n/N) a 2-stranné 95 % intervaly spoľahlivosti.				

Výkon cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit pri detegovaní $\geq$ CIN2 a $\geq$ CIN3 u žien v populácii HPV18+ s Pap cytológiou NILM je uvedený v Tabuľka 32.

V populácii cobas® 6800/8800 system, teda ženy v populácii HPV18+ s Pap cytológiou NILM, dosiahla citlivosť a špecifickosť v prípade $\geq$ CIN2 hodnoty jednotlivo 75.0 % a 73.3 % a v prípade $\geq$ CIN3 66.7 % a 72.1 %. Hodnoty PPV boli 9.7 % v prípade $\geq$ CIN2 a 3.2 % v prípade $\geq$ CIN3, kým riziko ochorenia u žien s negatívnymi výsledkami CINtec PLUS Cytology Kit (1-NPV) bolo 1.3 % v prípade $\geq$ CIN2 a 0.6 % v prípade $\geq$ CIN3.

V populácii cobas® 4800 system, teda ženy v populácii HPV18+ s Pap cytológiou NILM, dosiahla citlivosť a špecifickosť v prípade $\geq$ CIN2 hodnoty jednotlivo 85.7 % a 68.3 % a v prípade $\geq$ CIN3 66.7 % a 65.7 %. Hodnoty PPV boli 15.8 % v prípade $\geq$ CIN2 a 5.3 % v prípade $\geq$ CIN3, kým riziko ochorenia u žien s negatívnymi výsledkami CINtec PLUS Cytology Kit (1-NPV) bolo 1.4 % v prípade oboch medzných hodnôt ochorenia.

Tabuľka 32. Účinnosť cytologickej súpravy CINtec PLUS Cytology Kit u žien v populácii HPV18+ vo veku 30 – 65 rokov s cytológiou NILM.

Meranie výkonu	cobas® 6800/8800 system, HPV18+/NILM		cobas® 4800 system, HPV18+/NILM	
	Diagnóza CPR ≥ CIN2	Diagnóza CPR ≥ CIN3	Diagnóza CPR ≥ CIN2	Diagnóza CPR ≥ CIN3
Citlivosť (%)	75.0 (6/8) (40.9, 92.9)	66.7 (2/3) (20.8, 93.9)	85.7 (6/7) (48.7, 97.4)	66.7 (2/3) (20.8, 93.9)
Špecifickosť (%)	73.3 (154/210) (67.0, 78.9)	72.1 (155/215) (65.7, 77.7)	68.3 (69/101) (58.7, 76.6)	65.7 (69/105) (56.2, 74.1)
Prevalencia (%)	3.7 (8/218)	1.4 (3/218)	6.5 (7/108)	2.8 (3/108)
PPV (%)	9.7 (6/62) (5.4, 13.1)	3.2 (2/62) (1.0, 5.0)	15.8 (6/38) (9.2, 21.1)	5.3 (2/38) (1.7, 8.3)
NPV (%)	98.7 (154/156) (97.0, 99.6)	99.4 (155/156) (98.5, 99.9)	98.6 (69/70) (95.0, 99.7)	98.6 (69/70) (96.6, 99.7)
1 - NPV (%)	1.3 (2/156) (0.4, 3.0)	0.6 (1/156) (0.1, 1.5)	1.4 (1/70) (0.3, 5.0)	1.4 (1/70) (0.3, 3.4)
PLR	2.81 (1.49, 3.97)	2.39 (0.73, 3.74)	2.71 (1.46, 3.87)	1.94 (0.59, 3.18)
NLR	0.34 (0.10, 0.81)	0.46 (0.09, 1.11)	0.21 (0.04, 0.76)	0.51 (0.09, 1.24)
Miera pozitivity (%)	28.4 (62/218) (22.6, 34.3)		35.2 (38/108) (26.5, 43.8)	
Poznámka: CPR = centrálna patologická kontrola, PPV = pozitívna prediktívna hodnota, NPV = negatívna prediktívna hodnota, PLR = pozitívny pomer pravdepodobnosti, NLR = negatívny pomer pravdepodobnosti, čísla v zátvorkách sú (n/N) a 2-stranné 95 % intervaly spoľahlivosti.				

RIEŠENIE PROBLÉMOV

1. Ak dávkovač reagencie nedávkuje tekutinu, skontrolujte, či v plniacej komore alebo menisku nie sú cudzie materiály alebo častice, ako sú vlákna alebo zrazeniny. Ak je dávkovač upchatý, nepoužívajte ho a obráťte sa na svojho miestneho zástupcu podpory. V opačnom prípade naplňte znova dávkovač tak, že ho nasmerujete nad nádobu na odpad, zložíte uzáver dýzy a stlačíte hornú časť dávkovača.
2. Príležitostne možno na dávkovači CINtec PLUS Red Naphthol Phosphate pozorovať kryštalizáciu. Skúmanie preukázalo, že nedochádza k žiadnemu zasahovaniu kryštálov do interpretácie výsledkov. Ak kryštály spozorujete na sklíčkach, vyčistite hrot dýzy a naplňte dávkovač, aby ste zabezpečili odstránenie kryštalických zvyškov. Ak kryštály pretrvávajú, prestaňte dávkovač používať a požiadajte miestneho zástupcu podpory o výmenu.
3. Ak pozitívna kontrola vykáže slabšie farbenie, než sa očakávalo, skontrolujte, či sa zvolený protokol zhoduje so špecifickým typom vzorky, napríklad cytologické prípravky SurePath si vyžadujú dlhšiu úpravu buniek ako sklíčka ThinPrep alebo prípravky s konvenčnými stermi. Okrem toho skontrolujte, či sú všetky nádoby dávkovača čisté od zvyškov.
4. Ak je pozitívna kontrola negatívna, je potrebné skontrolovať, či má sklíčko správny štítok s čiarovým kódom. Ak je sklíčko označené správne, skontrolujte, či sú všetky nádoby dávkovača čisté od zvyškov.
5. Ak spozorujete vysoké pozadie, skráťte inkubačný čas protokolov farbenia. Okrem toho skontrolujte, či bol veľkoobjemový roztok Reaction Buffer správne pripravený.
6. Ak spozorujete slabé farbenie, predĺžte inkubačný čas protokolov farbenia. Inkubačný čas úpravy buniek je možné nastaviť aj na sklíčku s konvenčným sterom.
7. Červená zrazenina používaná na indikovanie exprese proteínu Ki-67 je rozpustná v alkohole. Ak je farbenie Ki-67 slabé alebo nie je prítomné, uistite sa, že nebol použitý hematoxylin obsahujúci alkohol a že bol dodržaný odporúčaný postup následného spracovania podľa pokynov v časti Postup po spracovaní – Montáž a automat na krycie sklíčka.
8. Ak sa vzorka zmýva zo sklíčka, je potrebné sklíčka skontrolovať, aby sa zabezpečilo, že vzorka bola pripravená správne podľa časti Príprava vzoriek a bol použitý odporúčaný typ mikroskopického sklíčka.
9. Informácie o nápravných opatreniach sú uvedené v časti Postup farbenia v používateľskej príručke prístroja alebo sa obráťte na miestneho zástupcu podpory.

10. Ak sa stratí uzáver vzorky RCCM alebo ak je skúmavka so vzorkou netesná, je možné objednať náhradné uzávery (voľné, 250 kusov/vrecko, REF 08037230190 alebo 8 zásobníkov po 48 kusov/škafuľa, REF 06913512001).

LITERATÚRA

1. Kim WY, Sharpless NE. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. Cell. 2006 Oct 20;127(2):265-75.
2. Wentzensen N, von Knebel Doeberitz M. Biomarkers in cervical cancer screening. Dis Markers. 2007;23:315-30.
3. 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(10):2536-2545.
4. Roelens J, Reuschenbach M, von Knebel Doeberitz M, et al. p16^{INK4a} immunocytochemistry versus human papillomavirus testing for triage of women with minor cytologic abnormalities: a systematic review and meta-analysis. Cancer Cytopathol. 2012;120(5):294-307.
5. Carozzi F, Gillio-Tos A, Confortini M, et al. Risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia during follow-up in HPV-positive women according to baseline p16-INK4a results: a prospective analysis of a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. Lancet Oncol. 2013;14(2):168-76.
6. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. J Cell Physiol. 2000;182:311-22.
7. Schmidt D, Bergeron C, Denton KJ, et al. p16/Ki-67 Dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL Papanicolaou cytology: Results from the European equivocal or mildly abnormal Papanicolaou cytology study. Cancer Cytopathol. 2011;119(3):158-66.
8. Petry KU, Schmidt D, Scherbring S, et al. Triage of Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. Gynecol Oncol. 2011;121(3):505-9.
9. Ravarino A, Nemolato S, Macciocci E, et al. CINtec PLUS immunocytochemistry as a tool for the cytologic diagnosis of glandular lesions of the cervix uteri. Am J Clin Pathol. 2012;138(5):652-6.
10. Singh M, Mockler D, Akalin A, et al. Immunocytochemical colocalization of p16(INK4a) and Ki-67 predicts CIN2/3 and AIS/adenocarcinoma. Cancer Cytopathol. 2012;120(1):26-34.

11. Ikenberg H, Bergeron C, Schmidt D, et al. Screening for Cervical Cancer Precursors with p16/Ki-67 Dual-stained Cytology: Results of the PALMS Study. J Natl Cancer Inst. 2013;105(20):1550-7.
12. Wentzensen N, Fetterman B, Castle PE, et al. p16/Ki-67 Dual Stain Cytology for Detection of Cervical Precancer in HPV-Positive Women. J Natl Cancer Inst. 2015 Sep 15;107(12):djv257.
13. Uijterwaal MH, Polman NJ, Witte BI, et al. Triaging HPV-positive women with normal cytology by p16/Ki-67 dual-stained cytology testing: baseline and longitudinal data. Int J Cancer. 2015;136(10):2361-68.
14. Wentzensen N, Schwartz L, Zuna RE, et al. Performance of p16/Ki-67 immunostaining to detect cervical cancer precursors in a colposcopy referral population. Clin Cancer Res. 2012;18(15):4154-62.
15. Bergeron C, Ikenberg H, Sideri M, et al. Prospective evaluation of p16/Ki-67 dual-stained cytology for managing women with abnormal Papanicolaou cytology: PALMS study results. Cancer Cytopathol. 2015. 123(6):373-81.
16. Dona MG, Vocaturo A, Giuliani M, et al. p16/Ki-67 dual staining in cervico-vaginal cytology: Correlation with histology, Human Papillomavirus detection and genotyping in women undergoing colposcopy. Gynecol Oncol. 2012;126(2):198-202.
17. Allia E, Ronco G, Coccia A, et al. Interpretation of p16(INK4a) /Ki-67 dual immunostaining for the triage of human papillomavirus-positive women by experts and nonexperts in cervical cytology. Cancer Cytopathol. 2015;123(4):212-218.
18. Gustinucci D, Giorgi Rossi P, Cesarini E, et al. Use of cytology, E6/E7 mRNA, and p16^{INK4a}-Ki-67 to define the management of human papillomavirus (HPV)-positive women in cervical cancer screening. Am J Clin Pathol. 2016; 145(1):35-45.
19. Rossi P, Borghi L, Ferro R, Mencarelli R. A population of 1136 HPV DNA-HR positive women: expression of p16(INK4a)/Ki67 Dual-Stain Cytology and cytological diagnosis. Histological correlations and cytological follow up. Pathologica. 2015;107(3-4):185-191.
20. Wright TC Jr, Behrens CM, Ranger-Moore J, et al. Triaging HPV-positive women with p16/Ki-67 dual-stained cytology: Results from a sub-study nested into the ATHENA trial. Gynecol Oncol. 2017;144:51-56.
21. Clarke MA, Cheung LC, Castle PE, et al. Five-Year Risk of Cervical Precancer Following p16/Ki-67 Dual-Stain Triage of HPV-Positive Women. JAMA Oncol. 2019;5(2):181-186.
22. Wentzensen N, Clarke MA, Bremer R, et al. Clinical Evaluation of Human Papillomavirus Screening With p16/Ki-67 Dual Stain Triage in a Large Organized Cervical Cancer Screening Program. JAMA Intern Med. 2019;179(7):881-888.
23. Wentzensen N, Fetterman B, Tokugawa D, et al. Interobserver reproducibility and accuracy of p16/Ki-67 dual-stain cytology in cervical cancer screening. Cancer Cytopathol. 2014;122(12):914-20.
24. Arean-Cuns C, Mercado-Gutierrez M, Paniello-Alastruey I, et al. Dual staining for p16/Ki67 is a more specific test than cytology for triage of HPV-positive women. Virchows Arch. 2018;473(5):599-606.
25. Ebisch RMF, van der Horst J, Hermens M, et al. Evaluation of p16/Ki-67 dual-stained cytology as triage test for high-risk human papillomavirus-positive women. Mod Pathol. 2017;30(7): 1021-1031.
26. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
27. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 24 June 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
28. Nayar R and Wilbur DC, eds. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology: Definitions, Criteria, and Explanatory Notes. 3rd ed. 2015, Springer International Publishing: Switzerland.

POZNÁMKA: Na označenie hranice medzi celým číslom a zlomkovými časťami desatinnej číslice sa v celom tomto dokumente namiesto desatinnej čiarky používa bodka. Na oddelenie tisícov sa nepoužívajú žiadne znaky.

Súhrn informácií o bezpečnosti a výkone nájdete tu:

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

Symbody

Spoločnosť Ventana používa okrem symbolov a značiek uvedených v norme ISO 15223-1 aj nasledujúce symboly a značky (ďalšie informácie pre USA: pozrite si elabdoc.roche.com/symbols).

GTIN

Globálne číslo obchodnej jednotky

Rx only

Pre USA: Upozornenie: Federálny zákon obmedzuje predaj tejto pomôcky iba prostredníctvom alebo na objednávku lekára.

HISTÓRIA REVÍZIÍ

Rev.	Aktualizácie
J	Aktualizácia šablóny a označenia. Pridanie BenchMark ULTRA PLUS.

DUŠEVNÉ VLASTNÍCTVO

VENTANA, BENCHMARK, CINTEC a COBAS sú ochranné známky spoločnosti Roche. Všetky ostatné názvy produktov a ochranné známky sú majetkom ich príslušných vlastníkov.

© 2025 Ventana Medical Systems, Inc.

For USA: Rx only

KONTAKTNÉ ÚDAJE



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

www.roche.com



0123