

Инструкции за употреба

CINtec[®] Histology Kit

CINtec[®] Histology Kit е имунохистохимичен анализ за качествено откриване на p16^{INK4a} антиген в тъканни срези, подготвени от фиксирани с формалин, включени в парафин тъкани от цервикална биопсия. Той е предназначен за използване заедно с оцветени с H&E предметни стъкла, приготвени от един и същ образец от тъкан на маточната шийка като помощно средство за по-голяма диагностична точност и съгласуваност на заключенията от различни специалисти при диагностициране на трета степен на цервикална интраепителна неоплазия.



Roche mtm laboratories AG
Sandhofer Straße 116
D-68305 Mannheim
Germany
www.roche.com
<https://dialog.roche.com>

REF

9511
06594441001

GTIN

04015630984176



50



2–8 °C



IVD



Съдържание

БЪЛГАРСКИ	3
I. Име на продукта.....	3
II. Предназначение	3
III. Описание на изделиято.....	3
Описание	3
Клинично значение.....	4
Принцип на процедурата	5
IV. Реактиви.....	5
Предоставени материали	5
Съхранение	7
Необходими, но непредоставени материали и реактиви	8
Необходимо оборудване	8
V. Предупреждения и предпазни мерки.....	9
Предупреждение	9
Внимание	10
VI. Процедура.....	10
Подготовка на проба	10
Включени в парафин тъканни проби.....	10
Топлинно индуцирано епитопно възстановяване	11
Процедура на оцветяване	11
1. Подготовка на реактиви.....	11
1.1 Epitope Retrieval Solution.....	11
1.2 Wash Buffer	12
1.3 Разтвор субстрат-хромоген (DAB)	12
1.4 Контрастен оцветител	12
1.5 Среда за закрепване	12
2. Процедура за оцветяване за апарати за автоматично оцветяване	12
2.1 Депарафинизиране и рехидратиране	13
2.2 Протокол за оцветяване за апарати за автоматично оцветяване	13
3. Процедура за оцветяване за ръчна употреба	16
3.1 Депарафинизиране и рехидратиране	16
3.2 Процедура за ръчно оцветяване за ръчна употреба	16
VII. Контрол на качеството.....	19
VIII. Интерпретиране на резултатите	19
IX. Ограничения.....	20
X. Работни характеристики.....	21

XI.	Отстраняване на проблеми.....	27
XII.	Символи	30
XIII.	Производител	30
XIV.	Статус на изданията	30
XV.	Интелектуална собственост	31
	Приложение 1 Препратки	32
	Приложение 2.....	35

I. Име на продукта

CINtec® Histology Kit

II. Предназначение

За ин витро диагностична употреба.

CINtec® Histology Kit е имунохистохимичен анализ за качествено откриване на p16^{INK4a} антиген в тъканни срези, подготвени от фиксирани с формалин, включени в парафин тъкани от цервикална биопсия.

Той е предназначен за използване заедно с оцветени с H&E предметни стъкла, приготвени от един и същ образец от тъкан на маточната шийка като помощно средство за по-голяма диагностична точност и съгласуваност на заключенията от различни специалисти при диагностициране на трета степен на цервикална интраепителна неоплазия.

Тестът е предназначен за ръчна употреба или за употреба на апарати за автоматично оцветяване.

Този анализ трябва да се интерпретира от квалифициран патолог във връзка с хистологично изследване, съответна клинична информация и подходящи контроли.

III. Описание на изделието

Описание

CINtec® Histology Kit е разработен на базата на мише моноклонално антитяло (клон Е6Н4®), насочено срещу човешки p16^{INK4a} протеин.

p16^{INK4a} протеинът е инхибитор на циклин-зависима киназа, който играе основна роля при регулирането на клетъчния цикъл на еукариотните клетки. Той е част от протеин на ретинобластом (pRB) медиация контрол на G1-S фазовия преход и активира спиране на клетъчния цикъл в хода на клетъчните процеси на диференциация. В терминално диференцирани епителни клетки p16^{INK4a} се експресира при нива, които обикновено не могат да бъдат открити от имунохистохимичен анализ.

При различни туморни формации е установено, че генът p16^{INK4a} е функционално инактивиран от генна мутация или промоторно хиперметиране. За инактивирането на гена супресор на тумори p16^{INK4a} е установено, че допринася за разстройването на клетъчния цикъл и за загубата на контрол върху клетъчната пролиферация.

При репликацията на компетентните цервикални епителни клетки обаче, когато високорисковите онкопротеини от човешки папиломен вирус (HR-HPV) са иницирали процеса на клетъчна трансформация, е установено, че експресията на p16^{INK4a} е силно активна [1; 2]. Тази силна свръхекспресия на p16^{INK4a} силно свързана на молекулярно ниво с активността на E7 онкопротеините от HR-HPV. За свръхекспресията на p16^{INK4a} е установено, че отразява E7 онкопротеин медираната инактивация на функционалния комплекс между pRB и фактора на транскрипция E2F, което е едно от ключовите събития по време на HR-HPV индуцирана клетъчна трансформация

[3].

Съществуват различни изследвания в публикациите, които съобщават, че свръхекспресията на протеин p16^{INK4a} е имунохистохимично наблюдавана в много висок дял от случаите на предракова цервикална дисплазия от висока степен (т.е. 80–100 % от CIN2 лезиите и почти всички CIN3 лезии) и на инвазивни ракови заболявания. Цервикалните вътреепителни лезии от ниска степен (CIN1) са демонстрирали свръхекспресия на p16^{INK4a} с променлива честота, обикновено в рамките на 30–60 % [1; 2; 4-16].

При интерпретирането на резултатите трябва да се вземе предвид фактът, че p16^{INK4a} е клетъчен протеин, който може да бъде експресиран при откриваеми нива в цервикални диспластични лезии от висока степен и цервикални ракови заболявания, както и при някои състояния, несвързани с цервикална дисплазия, макар и на различни нива и с различни модели на експресия. Хистологичните тъканни препарати имат интактна тъканна морфология, за да улеснят интерпретирането на положителността на p16^{INK4a} на цервикалните лезии. Препоръчано е дифузен модел на оцветяване, т.е. непрекъснато оцветяване на клетки от базалните и парабазалните клетъчни слоеве, с или без оцветяване на клетки от повърхностните клетъчни слоеве, да се класифицира като положителен тестов резултат за свръхекспресия на p16^{INK4a}. За този модел на оцветяване е установено, че осигурява най-високото ниво на чувствителност и специфичност за CIN от висока степен [1; 4; 5]. А фокален модел на оцветяване (оцветяване на изолирани клетки или малки клетъчни клъстери, т.е. непостоянно оцветяване, частично извън базалните и парабазалните клетки), както и липсата на всякаква имунореактивност, се считат за отрицателен тестов резултат за свръхекспресия на p16^{INK4a} [1; 4; 5].

Интерпретацията на предметните стъкла, оцветени за p16^{INK4a} посредством CINtec® Histology Kit, трябва да бъде изпълнена заедно с оцветени с H&E предметни стъкла, приготвени от същата цервикална тъканна проба. Допълнителната информация, предоставена за предметни стъкла, оцветени със CINtec®, трябва да се съчетава с предварителна морфологично обоснована диагноза, установена върху оцветени с H&E предметни стъкла, за да се направи заключителна диагноза.

Клинично значение

Конюнктивното разчитане на оцветени с H&E предметни стъкла със срези от цервикална биопсия заедно с последователни предметни стъкла от същите тъканни проби и имунооцветени за p16^{INK4a} демонстрират подобряване на диагностичната точност и съгласуваност на заключенията от различни специалисти при диагностициране на цервикална интраепителна неоплазия от висока степен (CIN2+).

Патологичната диагноза, направена върху оцветените с H&E срези на цервикална тъкан, установява база за решението да се продължи лечението. Поради това влиянието, което може да окаже неточната диагноза, е значително. Неточната диагноза може да доведе до неправилно лечение на пациента, т.е. предозиране на по същество здрави жени, или недостатъчно дозиране на жени с диспластични лезии от висока степен.

Диагностичната интерпретация на хистологичните оцветени с H&E тъканни срези често се различава при различни патолози. В различни публикации е съобщавано за ниско ниво на съгласуваност на заключенията от различни специалисти и на съгласуваност между различни заключения от един и същ

специалист в хистологията на маточната шийка [17-20].

Голямо многоцентрово проучване в Съединените щати оцени анкети за интерпретиране на хистологични цервикални проби (2237 колпоскопски биопсии и 535 биопсии с LEEP конизацията), попълнени от множество добре квалифицирани патолози. Възпроизводимостта на хистопатологичните интерпретации беше само умерена (капа = 0.46 за проби от щипкова биопсия и капа = 0.49 за проби от биопсии с LEEP конизацията) [17]. Като е използвана системата за класификация на СЗО и модифицираната система за класификация по Бетезда, се установява, че съгласуваността на заключенията от различни специалисти за шест хистопатолози, изследвали 125 проби от колпоскопска биопсия, е лоша и по двете системи за класифициране [18]. По същия начин, проучване, проведено в Обединеното кралство, показва лоша съгласуваност на заключенията от различни специалисти за осем експертни хистопатолози, изследвали 100 проби от колпоскопска биопсия (непретеглена стойност на капа 0.358) [19].

Чрез добавяне на предметни стъкла, оцветени със CINtec® Histology Kit, към традиционните, оцветени с H&E, предметни стъкла, използвани за установяване на диагнозите, общата точност на тази хистоморфологична диагностична процедура е подобрена [21-39].

Принцип на процедурата

CINtec® Histology Kit съдържа набор от реактиви за имунохистохимично откриване на p16^{INK4a} антигена. Комплектът е предназначен да изпълнява двустъпкова процедура за имунохистохимично оцветяване за фиксирани с формалин, включени в парафин тъканни проби, получени от цервикални биопсии. За откриване на антигена се използва клонът E6H4® на първичното моноклонално мише антитяло, насочен към човешки p16^{INK4a} протеин.

Използва се готов за използване реактив за визуализация, състоящ се от полимерен реактив, конюгиран с хрянова пероксидаза и Fab фрагменти на антимиши антитела. Реактивът за визуализация е подложен на абсорпция на твърдата фаза, за да се елиминира кръстосаната реактивност с човешки имуноглобулини. Реакцията на хромогена се базира на конверсия, медирана от хрянова пероксидаза, на DAB хромоген във видим продукт от реакцията от страната на антигена. След контрастно оцветяване пробата може да бъде покрита с покривно стъкло и резултатите могат да се оценят чрез проверка със светлинна микроскопия.

IV. Реактиви

Предоставени материали

Материалите, посочени по-долу, са включени във всеки комплект и са достатъчни за извършване на 50 теста и 50 отрицателни контролни реакции. Броят на тестовете се дава на базата на използване на 200 µL от реактива за всяко предметно стъкло.

1 Реактив Peroxidase Blocking

Реактив Peroxidase Blocking
2 x 11.5 mL, готов за употреба

3 % водороден пероксид, съдържащ 15 mmol/L натриев азид (NaN₃).

EUN210: Информационен лист за безопасност е наличен при поискване.

2 Mouse anti-Human p16^{INK4a} Antibody

Mouse anti-Human p16^{INK4a} Antibody

11.5 mL, готов за употреба

Моноклонално мише анти-човешко p16^{INK4a} антитяло (~1 µg/mL), клон E6H4™, доставян в 50 mmol/L Tris буфер pH 7.2, съдържащ 15 mmol/L натриев азид (NaN₃) и стабилизиращ протеин.

3 Visualization Reagent

Visualization Reagent

2 x 11.5 mL, готов за употреба



Предупреждение

H317 Може да причини алергична кожна реакция.

P261 Избягвайте вдишването на прах/дим/газ/мъгла/пари/спрей.

P272 Да не се изнася замърсено работно облекло извън работното помещение.

P280 Използвайте предпазни ръкавици.

P333 + P313 При поява на кожно дразнене или обрив на кожата: Потърсете медицински съвет/помощ.

P362 + P364 Свалете замърсеното облекло и го изперете преди повторна употреба.

P501 Изхвърлете съдържанието/контейнера в одобрено депо за обезвреждане на отпадъци.

Съдържа:

26172-54-3 2-метил-2Н-изотиазол-3-он хидрохлорид

55965-84-9 реакционна маса от: 5-хлоро-2-метил-4-изотиазолин-3-он [ЕС no. 247-500-7] и 2-метил-2Н-изотиазол-3-он [ЕС no. 220-239-6] (3:1)

Полимерен реактив, конюгиран с хрянова пероксидаза и афинитетно пречистени кози анти-миши Fab фрагменти на антитела, доставяни в стабилизиращ разтвор, съдържащ консерванти и стабилизиращ протеин.

4 Negative Reagent Control

Negative Reagent Control

11.5 mL, готов за употреба

Моноклонално мише анти-плъхово свързано с окситоцин неврофизиново антитяло (~1 µg/mL), доставяно в 50 mmol/L Tris буфер pH 7.2, съдържащ 15 mmol/L натриев азид (NaN₃) и стабилизиращ протеин. За верификация на специфичността на оцветяването. Свързаният с окситоцин неврофизин от

плъх не присъства в човешките тъкани.

5 DAB Buffered Substrate

DAB Buffered Substrate

31 mL

Буферен разтвор на субстрат, pH 7.5, съдържащ < 0.1 % водороден пероксид, стабилизатори и подобрители.

6 DAB Chromogen

DAB Chromogen

Разтвор на хромоген 0.85 mL, 3,3'-диаминобензидин.



Опасност

H314 Причинява тежки изгаряния на кожата и сериозно увреждане на очите.

H341 Предполага се, че причинява генетични дефекти.

H350 Може да причини рак.

P201 Преди употреба се снабдете със специални инструкции.

P280 Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице.

P303 + P361 + P353 ПРИ КОНТАКТ С КОЖАТА (или косата): Незабавно свалете цялото замърсено облекло. Облейте кожата с вода/вземете душ.

P304 + P340 + P310 ПРИ ВДИШВАНЕ: Изведете пострадалия на чист въздух и го поставете в позиция, улесняваща дишането. Незабавно се обадете в ЦЕНТЪР ПО ТОКСИКОЛОГИЯ или на лекар.

P305 + P351 + P338 + P310 ПРИ КОНТАКТ С ОЧИТЕ: Промивайте внимателно с вода в продължение на няколко минути. Свалете контактните лещи, ако има такива и доколкото това е възможно. Незабавно се обадете в ЦЕНТЪР ПО ТОКСИКОЛОГИЯ или на лекар.

P308 + P313 ПРИ явна или предполагаема експозиция: Потърсете медицински съвет/помощ.

Съдържа 868272-85-9 3,3'-диаминобензидин тетраhydroхлорид хидрат

ЗАБЕЛЕЖКА: Консултирайте се с федералните, държавните или местните разпоредби относно изхвърлянето.

7 Epitope Retrieval Solution 10X

Epitope Retrieval Solution 10X

500 mL, 100 mmol/L Tris буфер pH 9, съдържащ 10 mmol/L EDTA и 15 mmol/L натриев азид (NaN₃).

Съхранение

Съхранявайте при температура 2–8 °C. Не използвайте след срока на годност. Не са генерирани данни за съхранението на реактивите при каквито и да било

условия, различни от посочените по-горе.

След отварянето компонентите на комплекта са стабилни в продължение на 6 месеца, ако се съхраняват при температура 2–8 °C. Разтворите трябва да бъдат изхвърлени, ако са мътни на външен вид.

Разреденият Wash Buffer и разреденият Epitope Retrieval Solution са стабилни до един месец, ако се съхраняват при температура 2–8 °C. Разтворите не трябва да се използват, ако са мътни на външен вид.

Необходими, но непредоставени материали и реактиви

CINtec® Wash Buffer 10X, който да се използва със CINtec® Histology Kit, се предлага с каталожен номер 06595413001 (8550) от Roche, но не е включен в комплекта. За подробности за поръчки вижте уебсайта www.roche.com.

Разтвор на 500 mmol/L Tris буфер с 1.5 mol/L NaCl, pH 7.6, съдържащ детергент и антимикробен агент.



Предупреждение

H317 Може да причини алергична кожна реакция.

R261 Избягвайте вдишването на прах/дим/газ/мъгла/пари/спрей.

R272 Да не се изнася замърсено работно облекло извън работното помещение.

R280 Използвайте предпазни ръкавици.

R333 + R313 При поява на кожно дразнене или обрив на кожата: Потърсете медицински съвет/помощ.

R362 + R364 Свалете замърсеното облекло и го изперете преди повторна употреба.

R501 Изхвърлете съдържанието/контейнера в одобрено депо за обезвреждане на отпадъци.

Съдържа 55965-84-9 реакционна маса от: 5-хлоро-2-метил-4-изотиазолин-3-он [EC no. 247-500-7] и 2-метил-2H -изотиазол-3-он [EC no. 220-239-6] (3:1)

Абсорбиращи кърпички:

Контрастен оцветител Hematoxylin;

Дестилирана или дейонизирана вода (вода за измиване);

Етанол, 95 % и 70 %;

Среда за закрепване;

Положителни и отрицателни тъкани за употреба като контроли на процеса;

Предметни стъкла (SuperFrost® Plus или еквивалентни);

Ксилен;

Покривни стъкла.

Необходимо оборудване

Опция: Сушилнен шкаф с възможност за поддържане на 60 °C или по-малко;

Опция: Апарати Autostainer Dako или LabVision;

Влажна камера (опция);

Светлинен микроскоп (4–40x увеличение на обектива);

Буркани или вани за оцветяване;

Бутилки за измиване;

Таймер (с възможност да отчита интервали от 2–60 минути);

Водна вана с капак (с възможност да поддържа Epitope Retrieval Solution при температура 95–99 °C).

V. Предупреждения и предпазни мерки

Предупреждение

1. Внимание! Някои от реактивите от този комплект съдържат опасни химически вещества. Когато работите с компонентите на този комплект, придържайте се към мерките за безопасност за работа с опасни лабораторни реактиви.
2. Компоненти 1, 2, 4 и 7 на този продукт съдържат натриев азид (NaN_3), който е силно токсичен в неговата пречистена форма. При концентрациите в продукта, макар и да не е класифициран като опасен, натриевият азид може да реагира с оловни и медни водопроводи и да образува силно експлозивни отлагания на метални азиди. При изхвърляне изплакнете с големи количества вода, за да предотвратите отлагането на метален азид във водопровода.
3. Компоненти 2, 3 и 4 съдържат материал от животински произход. Придържайте се към правилни работни процедури, приложими за всеки продукт, получен от биологични източници.
4. Информационен лист за безопасност за комплекта е наличен при поискване.
5. При работа и изхвърляне на хистологични проби, включително всички проби преди и след фиксирането, както и всички материали, които са били в контакт с тях, се придържайте към мерките за безопасност за работа с потенциално заразни материали, както и приложимите изисквания за изхвърляне на отпадъци.
6. Никога не пипетирайте реактиви с уста. Избягвайте контакт на кожата и лигавиците с реактиви и проби. В случай на контакт на реактиви или проби с кожа или лигавица, промийте обилно с вода.
7. Visualization Reagent и DAB Chromogen може да бъдат засегнати неблагоприятно, ако са изложени на прекомерно високи нива на светлина. Не съхранявайте компонентите на комплекта и не изпълнявайте оцветяването при силно осветление, например при пряка слънчева светлина.
8. Използвайте подходящи лични предпазни средства, за да избегнете контакт с очите и кожата, когато боравите с някой от компонентите, включени в или които ще се използват със CIntec® Histology Kit. Вижте информационния лист за безопасност (ИЛБ) за допълнителна информация.
9. Етикетирането за безопасност на продуктите следва основно насоките на ЕС за GHS.



Внимание

1. За ин витро диагностична употреба.
2. Само за професионална употреба.
3. Минимизирайте микробното замърсяване на реактивите, за да се избегне неспецифично оцветяване.
4. Времена, температури или методи на инкубиране, различни от посочените, може да генерират грешни резултати.
5. Не използвайте комплекта, ако опаковката или някой от компонентите е нарушен. Ако опаковката е компрометирана или компонентите са увредени, уведомете незабавно производителя.
6. Изхвърлянето на всички отпадъчни материали трябва да бъде извършено в съответствие с местните указания и разпоредби.
7. Всички реактиви са създадени специално за употреба с този тест. За да се извърши тестът по посочения начин, не трябва да се правят замени.
8. Ако се наблюдава неочаквано оцветяване, което не може да се обясни с вариации в лабораторните процедури и се подозира проблем със CINtec® Histology Kit, за допълнителна информация относно техническата поддръжка незабавно се консултирайте с информацията за контакти, предоставена в раздел XIII.
9. Неправилната работа на продукта поради проблеми с боравенето с него или нестабилността му не проявява очевидни признаци. Следователно, като мярка за контрол на качеството, положителните и отрицателните контроли трябва да се обработват едновременно с пробите на пациента.
10. За да съобщите подозирани сериозни инциденти, свързани с това изделие, свържете се с местния представител на Roche и компетентния орган на държавата членка или държавата, в която е установен потребителят.

VI. Процедура

Подготовка на проба

CINtec® Histology Kit е предназначен за употреба с тъканни проби, консервирани за имунохистохимични процедури. Пробите трябва да бъдат подготвяни по стандартните методи за обработка на тъкани.

За оптимална ефективност се препоръчват положително заредени предметни стъкла, например предметни стъкла SuperFrost® Plus.

Включени в парафин тъканни проби

Неутрално буферирани фиксирани във формалин, включени в парафин тъканни проби, обработени посредством рутинни стандартни методи, са подходящи за употреба с този комплект. Ако пробите са подготвени посредством друг метод за консервиране, потребителят трябва да проверява пригодността на метода.

Пробите от биопсията трябва да бъдат фиксирани за 18–24 часа в неутрално буфериран формалин (препоръчва се 10 %) и да бъдат подготвени в блокчета с дебелина 3 или 4 mm. Тъканните блокчета след това се дехидратират последователно в алкохол и ксилен, последвано от инфилтриране от стопен

парафин, който се поддържа с температура не по-голяма от 60 °C. Всяко тъканно блокче ще бъде нарязано на срези с дебелина 4–5 µm и закрепени на микроскопски предметни стъкла SuperFrost® Plus от хистопатологична лаборатория. Предметните стъкла трябва да бъдат оцветени веднага, тъй като антигенността на нарязаните тъканни срези може да намалее с времето.

Топлинно индуцирано епитопно възстановяване

За топлинно индуцирано епитопно възстановяване тъканните срези, закрепени върху предметни стъкла, трябва да бъдат загряти чрез потапяне в Epitope Retrieval Solution в калибрирана водна вана, която е способна да поддържа Epitope Retrieval Solution с температура 95–99 °C. Лаборатории, разположени на по-голяма надморска височина, трябва да определят най-добрия метод за поддържане на необходимата температура на водната баня. Производителят не препоръчва каквото и да е отклонение от процедурата, описана тук.

След топлинно индуцирано епитопно възстановяване тъканните срези трябва да бъдат охладени до стайна температура за 20 минути преди по-нататъшна обработка. Поради това оцветяването на тъканните срези трябва да бъде извършено незабавно.

Процедура на оцветяване

1. Подготовка на реактиви

Всички реактиви трябва да бъдат темперирани до температура на околната среда (20–25 °C), преди да се използват за имунооцветяване. Съответно всички следващи стъпки трябва да се извършват при температура на околната среда.

Трябва да се внимава и да се избягва изсъхване на пробите по време на процедурата за имунооцветяване, тъй като изсъхването може да доведе до оцветяване на артефакти.

Следващите реактиви трябва да бъдат подготвени преди началото на процедурата за имунооцветяване:

1.1 Epitope Retrieval Solution

Подгответе достатъчно за процедурата за оцветяване, която е планирана, количество Epitope Retrieval Solution чрез разреждане на количеството на флакон 7 (Epitope Retrieval Solution 10X) в съотношение 1:10 с дестилирана или дейонизирана вода.

След разреждането Epitope Retrieval Solution може да бъде съхраняван при температура 2–8 °C до един месец. Разреденият разтвор трябва да бъде изхвърлен, ако е мътен на външен вид.

ЗАБЕЛЕЖКА: Употребата на вода с повишени нива на йони за целите на разреждане на разтвора за епитопно възстановяване може значително да намали работните характеристики на оцветяването на теста. Уверете се, че използвана вода е правилно дейонизирана (т.е. уверете се, че вашата йонообменна колона за производство на дейонизирана вода е инспектирана при рутинно техническо обслужване). Не използвайте чешмяна вода!

1.2 Wash Buffer

Използвайте CINTec® Wash Buffer 10X, каталожен номер 06595413001 (8550), предоставян от Roche заедно със CINTec® Histology Kit. За подробности за поръчки вижте уебсайта www.roche.com.

Подгответе достатъчно за стъпките за измиване на процедурата за оцветяване, която е планирана, количество Wash Buffer чрез разреждане на количество Wash Buffer 10X, каталожен номер 8550 в съотношение 1:10 посредством дестилирана или дейонизирана вода.

След разреждането Wash Buffer може да бъде съхраняван при температура 2–8 °C до един месец. Разреденият разтвор трябва да бъде изхвърлен, ако е мътен на външен вид.

1.3 Разтвор субстрат-хромоген (DAB)

За подготовка на разтвора субстрат-хромоген една капка от DAB Chromogen трябва да се добави към 2 mL DAB Buffered Substrate. Процедирайте по следния начин:

- i) прехвърлете 2 mL DAB Buffered Substrate от флакон 5 в епруветка;
 - ii) добавете една капка (25–30 µL) от DAB Chromogen от флакон 6.
- Смесете и нанесете към тъканните срези с пипета.

2 mL разтвор субстрат-хромоген (DAB), подготвен в съответствие с инструкциите по-горе, обикновено са достатъчни за оцветяване на пет тъканни среза, включително съответстващите пет контролни проби.

ЗАБЕЛЕЖКА: Използвайте подготвения разтвор субстрат-хромоген (DAB) в същия ден.

ЗАБЕЛЕЖКА: Добавянето на излишно количество DAB Chromogen към DAB Buffered Substrate ще доведе до нарушаване на положителния сигнал.

1.4 Контрастен оцветител

Реакцията на оцветяване с DAB води до получаване на водоразтворим оцветен краен продукт. Да контрастно оцветяване може да се използва хематоксилин на алкохолна или водна основа. Ако го използвате, при извършването на контрастното оцветяване се придържайте към инструкциите, предоставени от доставчика на хематоксилин.

1.5 Среда за закрепване

За закрепване на проби върху предметно стъкло след оцветяване се препоръчва неводна среда за постоянно закрепване. Но закрепване с водна среда също е приемливо.

За закрепване с неводна среда се препоръчва Eukitt Mounting Medium. За закрепване с водна среда се препоръчва Aquatex Merck.

2. Процедура за оцветяване за апарати за автоматично оцветяване

CINTec® Histology Kit е адаптиран за употреба на апарати за автоматично оцветяване (Lab Vision Autostainer 480 или Dako Autostainer Plus) в съответствие с очертания по-долу модел. Може да има възможност да се използват други апарати или системи със сравними функции след подходящо валидиране от потребителя. Преди оцветяване на апарат за автоматично оцветяване пробите и реактивите трябва да бъдат подготвени по начина,

описан в раздели 1.1–1.5 и 2.1

2.1 Депарафинизиране и рехидратиране

Преди депарафинизиране поставете предметните стъкла в сушилнен шкаф при температура не по-висока от 60 °C за поне 20 минути, но за не повече от един час, за количествено отстраняване на водата, като по този начин се подобрява адхезията на тъканта към предметното стъкло („изпичане“) и за разтопяване на парафина. Предметните стъкла с тъканта трябва да бъдат депарафинизирани за отстраняване на импрегниращата среда (парафина) и трябва да бъдат рехидратирани, преди да може да се изпълни процедурата за оцветяване. От изключителна важност е да се избегне непълното отстраняване на парафина, тъй като остатъчната импрегнираща среда ще доведе до повишено неспецифично оцветяване. Инкубирайте предметните стъкла при температура на околната среда (20–25 °C), като се изпълнят следните стъпки.

- 5 (± 1) минути в ксиленова вана;
- повторете тази стъпка веднъж с вана с прясно налято вещество;
- отстранете излишната течност;
- 3 (± 1) минути в 95 % етанол;
- повторете тази стъпка веднъж с вана с прясно налято вещество;
- отстранете излишната течност;
- 3 (± 1) минути в 70 % етанол;
- повторете тази стъпка веднъж с вана с прясно налято вещество;
- отстранете излишната течност;
- минимум 30 секунди в дестилирана или дейонизирана вода.

Започнете процедурата за оцветяване, описана в раздел 2.2., стъпка 1: Епитопно възстановяване.

Ксиленовият и алкохолният разтвор не трябва да се използват за повече от 40 предметни стъкла.

ЗАБЕЛЕЖКА: Потребителите трябва да обърнат внимание, че вариации в температурата на оборудването или във времената на експозиция по време на преаналитичната подготовка на пробите може да доведат до непълно отстраняване на парафина от тъканните срези. Остатъчният парафин може да стане причина за непълно оцветяване с хистологичен оцветител, включително с оцветителя CINTec® Histology. Хистопатологичните лаборатории трябва да включат регулярен мониторинг на оборудването, за да се намалят вариациите при подготовката на пробите преди оцветяване. Наблюдаването на строго очертани граници в имунореактивни тъканни зони или други несъответствия в оцветяването в рамките на предметно стъкло може, при всеки един имунохистохимичен оцветител, да бъде индикатор за неоптимално или непълно преаналитично обработване на пробата. Потребителите трябва да обмислят проверка на оборудването и методите за преаналитична подготовка на пробите, ако се наблюдават несъответствия в оцветяването.

2.2 Протокол за оцветяване за апарати за автоматично оцветяване

Стъпка 1: Епитопно възстановяване

- напълнете буркани за оцветяване, *напр.* пластмасови буркани на Coplin,

с разреден Epitope Retrieval Solution (вижте „Процедура“, Раздел 1.1);

- поставете бурканите за оцветяване, съдържащи Epitope Retrieval Solution, във водна вана и затоплете водната вана и Epitope Retrieval Solution до 95–99 °C. Важно е да се коригира нивото на водата във водната вана, за да се обезпечи потапянето на бурканите във водата до ниво от 80 %. За стабилизиране на температурата и избягване на изпаряването покривайте бурканите с капаци;
- потопете депарафинизирани срезци в предварително затопления Epitope Retrieval Solution в бурканите за оцветяване. Тази стъпка обикновено намалява температурата в бурканите до по-малко от 90 °C;
- затоплете водната вана и Epitope Retrieval Solution в бурканите отново до 95–99 °C; проверете температурата на Epitope Retrieval Solution в бурканите;
- инкубирайте в продължение на 10 (± 1) минути при температура 95–99 °C; започнете да отброявате само след като сте проверили, че температурата на Epitope Retrieval Solution в бурканите е достигнала 95–99 °C;
- отстранете целия буркан с предметните стъкла от водната вана;
- изчакайте предметните стъкла да изстинат в Epitope Retrieval Solution 20 (± 1) минути при стайна температура;
- декантирайте Epitope Retrieval Solution и изплакнете срезите в Wash Buffer (вижте „Процедура“, Раздел 1.2);
- за оптимални работни характеристики накиснете срезите в Wash Buffer за 5 минути след епитопното възстановяване и преди оцветяването.

ЗАБЕЛЕЖКА: Epitope Retrieval Solution е предназначен само за еднократна употреба. Не използвайте повторно.

Стъпка 2: Програмиране на инструмента

Преди първа употреба на CIntec® Histology Kit на апарат за автоматично оцветяване трябва да се зададе нов макет. Вижте ръководството на оператора за конкретния апарат за автоматично оцветяване.

Стъпка 3: Процедура на автоматично оцветяване

- прехвърлете реактивите от флаконите на комплекта в градуирани флакони за реактиви на апарата за автоматично оцветяване. Използвайте генерираната от апарата за автоматично оцветяване карта за програмиране на времената и обемите на реактивите (вижте точка 4 за специфичните времена и обеми).
- поставете флаконите за реактиви на апарата за автоматично оцветяване в статива за реактиви в съответствие с компютърно генерираната карта на разположение на реактивите;
- заредете предметните стъкла на апарата за автоматично оцветяване в съответствие с компютърно генерираната Slide Layout Map (Карта за разположение на предметното стъкло);
- за предотвратяване на изсъхването на пробите, те трябва да бъдат напръскани с буфер за измиване след зареждането им в апарата за

автоматично оцветяване;

- Следва схематично показване на изпълнението на програмата:
 - изплакване*;
 - 200 µL реактив Peroxidase Blocking – 5 минути;
 - изплакване*;
 - 200 µL Първично p16^{INK4a} антитяло и Negative Reagent Control – 30 минути;
 - изплакване*;
 - 200 µL Visualization Reagent – 30 минути;
 - изплакване*;
 - изплакване*;
 - изплакване*;
 - преминаване:
 - 200 µL Разтвор субстрат-хромоген (DAB) – 10 минути;
 - изплакване*;
 - изплакнете предметните стъкла в дейонизирана вода след стъпката със субстрат-хромоген.

*използвайте Wash Buffer за съответните стъпки за изплакването.

ЗАБЕЛЕЖКА: Ако апаратът за автоматично оцветяване обикновено изплаква предметните стъкла в буфер, предметните стъкла трябва да бъдат измити с дейонизирана вода след изваждането им от апарата за автоматично оцветяване.

Стъпка 4: Контрастен оцветител (инструкциите се отнасят за хематоксилин)

- потопете предметните стъкла във вана от хематоксилин. Инкубирайте 2–5 минути в зависимост от силата на използвания хематоксилин;
- поставете предметните стъкла във вана с чешмяна вода и внимателно изплакнете под течаща чешмяна вода. Уверете се, че всички остатъци от хематоксилин са почистени;
- за кратко и внимателно изплакнете предметните стъкла във вана с дестилирана или дейонизирана вода;
- Контрастното оцветяване може да се извърши директно на апарата за автоматично оцветяване.

ЗАБЕЛЕЖКА: В зависимост от продължителността на инкубирането и активността на използвания хематоксилин, контрастното оцветяване ще доведе от бледо до тъмносиньо оцветяване на клетъчните ядра. Прекомерното или непълно контрастно оцветяване може да интерферира с правилната интерпретация на резултатите.

Стъпка 5: Закрепване

Препоръчва се неводна среда за постоянно закрепване. Но и закрепване с водна среда също е приемливо. Придържайте се към инструкциите за употреба на доставчика на средата за закрепване.

ЗАБЕЛЕЖКА: За да сведете до минимум избледняването, предпазвайте предметните стъкла от светлина и ги съхранявайте при температура на околната среда (20–25 °C).

3. Процедура за оцветяване за ръчна употреба

ЗАБЕЛЕЖКА: Не допускайте изсъхването на тъканните срези по време на процедурата за оцветяване. Изсъхналите тъканни срези може да причинят повишено неспецифично оцветяване. За забавено инкубиране дръжте тъканите във влажна среда.

Придържайте се към стандартните процедури, използвани при ръчно имунохистохимично оцветяване, когато използвате CINTec® Histology Kit за ръчно оцветяване.

3.1 Депарафинизиране и рехидратиране

Преди депарафинизиране поставете предметните стъкла в сушилня при температура не по-висока от 60 °C за поне 20 минути, но за не повече от един час, за количествено отстраняване на водата, като по този начин се подобрява адхезията на тъканта към предметното стъкло („изпичане“) и за разтопяване на парафина. Предметните стъкла с тъканта трябва да бъдат депарафинизирани за отстраняване на импрегниращата среда (парафина) и трябва да бъдат рехидратирани, преди да може да се изпълни процедурата за оцветяване. От изключителна важност е да се избегне непълното отстраняване на парафина, тъй като остатъчната импрегнираща среда ще доведе до повишено неспецифично оцветяване. Инкубирайте предметните стъкла при температура на околната среда (20–25 °C), като се изпълнят следните стъпки.

- 5 (±1) минути в ксиленова вана;
- Повторете тази стъпка веднъж с вана с прясно налято вещество;
- Отстранете излишната течност;
- 3 (±1) минути в 95 % етанол;
- Повторете тази стъпка веднъж с вана с прясно налято вещество;
- Отстранете излишната течност;
- 3 (±1) минути в 70 % етанол;
- Повторете тази стъпка веднъж с вана с прясно налято вещество;
- Отстранете излишната течност;
- Минимум 30 секунди в дестилирана или дейонизирана вода.

Започнете процедурата за оцветяване, описана в раздел 3.2, стъпка 1: Епитопно възстановяване.

Ксиленовият и алкохолният разтвор не трябва да се използват за повече от 40 предметни стъкла.

3.2 Процедура за ръчно оцветяване за ръчна употреба

Стъпка 1: Епитопно възстановяване

- напълнете буркани за оцветяване, *напр.* пластмасови буркани на Coplin, с разреден Epitope Retrieval Solution (вижте „Процедура“, Раздел 1.1);
- поставете бурканите за оцветяване, съдържащи Epitope Retrieval Solution, във водна вана и затоплете водната вана и Epitope Retrieval Solution до 95–99 °C. В тази стъпка е важно да се коригира нивото на водата във водната вана, за да се обезпечи потапянето на бурканите

във водата до ниво от 80 %. За стабилизиране на температурата и избягване на изпаряването покривайте бурканите с капаци;

- потопете депарафинизирани срезци в предварително затопления Epitope Retrieval Solution в бурканите за оцветяване. Тази стъпка обикновено намалява температурата в бурканите до по-малко от 90°C;
- затоплете водната вана и Epitope Retrieval Solution в бурканите отново до 95–99 °C; проверете температурата на Epitope Retrieval Solution в бурканите;
- инкубирайте в продължение на 10 (± 1) минути при температура 95–99 °C; започнете да отброявате само след като сте проверили, че температурата на Epitope Retrieval Solution в бурканите е достигнала 95–99 °C;
- отстранете целия буркан с предметните стъкла от водната вана;
- изчакайте предметните стъкла да изстинат в Epitope Retrieval Solution 20 (± 1) минути при стайна температура;
- декантирайте Epitope Retrieval Solution и изплакнете срезите в разреден Wash Buffer (вижте „Процедура“, раздел 1.2);
- за оптимални работни характеристики накиснете срезите в Wash Buffer за 5 (± 1) минути след епитопното възстановяване и преди оцветяването.

ЗАБЕЛЕЖКА: Epitope Retrieval Solution е предназначен само за еднократна употреба. Не използвайте повторно.

Стъпка 2: Реактив Peroxidase-Blocking

- нанесете 200 μ L реактив Peroxidase Blocking, за да покрие пробата;
- инкубирайте 5 (± 1) минути;
- изтупайте излишната течност и поставете предметните стъкла във вана с пресен Wash Buffer за 5 (± 1) минути.

Стъпка 3: Първично анти тяло или реактив отрицателна контрола

- отстранете излишния буфер;
- покрийте пробата с 200 μ L първично анти тяло (Mouse Anti-Human p16^{INK4a} или Negative Reagent Control);
- инкубирайте 30 (± 1) минути;
- изтупайте излишната течност и поставете предметните стъкла във вана с пресен Wash Buffer за 5 (± 1) минути.

Стъпка 4: Visualization Reagent

- отстранете излишния буфер;
- покрийте пробата с 200 μ L Visualization Reagent;
- инкубирайте 30 (± 1) минути;
- изтупайте излишната течност и поставете предметните стъкла във вана с пресен буфер за 5 (± 1) минути;

- повторете тази стъпка два пъти с вана с пресен Wash Buffer.

Стъпка 5: Разтвор субстрат-хромоген (DAB)

- покрийте пробата с 200 µL разтвор субстрат-хромоген (DAB), който е приготвен по процедурата, описана в 1.3 по-горе;
- инкубирайте 10 (±1) минути;
- изтупайте излишната течност и внимателно изплакнете с дестилирана или дейонизирана вода.

Съберете отпадъчния разтвор субстрат-хромоген (DAB) в контейнер за опасни материали, за да го изхвърлите по подходящ начин.

Стъпка 6: Контрастен оцветител (инструкциите се отнасят за хематоксилин)

- потопете предметните стъкла във вана от хематоксилин. Инкубирайте 2–5 минути в зависимост от силата на използвания хематоксилин;
- поставете предметните стъкла във вана с чешмяна вода и внимателно изплакнете под течаща чешмяна вода. Уверете се, че всички остатъци от хематоксилин са почистени;
- за кратко и внимателно изплакнете предметните стъкла във вана с дестилирана или дейонизирана вода.

ЗАБЕЛЕЖКА: В зависимост от продължителността на инкубирането и активността на използвания хематоксилин, контрастното оцветяване ще доведе от бледо до тъмносиньо оцветяване на клетъчните ядра. Прекомерното или непълно контрастно оцветяване може да интерферира с правилната интерпретация на резултатите.

Стъпка 7: Закрепване

Препоръчва се неводна среда за постоянно закрепване. За среда за постоянно закрепване на основата на ксилен е необходима процедура за дехидратация, т.е.

- дестилирана или дейонизирана вода
- 3 мин. 70 % етанол
- 3 мин. 70 % етанол
- 3 мин. 96 % етанол
- 3 мин. 99 % етанол
- 5 мин. ксилен
- 5 мин. ксилен

Но и закрепване с водна среда също е приемливо. Придържайте се към инструкциите за употреба на доставчика на средата за закрепване.

ЗАБЕЛЕЖКА: За да сведете до минимум избледняването, предпазвайте предметните стъкла от светлина и ги съхранявайте при температура на околната среда (20–25 °C).

VII. Контрол на качеството

Отклонения от препоръчаните процедури за фиксиране и обработка на пробите в лабораторията на потребителя може да създаде значителна вариабилност в резултатите, налагаща редовно извършване на вътрешен контрол.

Положителна тъканна контрола

Външните материали за положителен контрол трябва да бъдат пресни проби от аутопсия/биопсия/хирургична операция, фиксирани, обработени и включени в парафин възможно най-скоро по същия начин като пациентската(ите) проба(и). Положителните тъканни контроли са индикативни за правилно приготвени тъкани и правилни техники на оцветяване. Една положителна външна тъканна контрола за всяка група от тестови условия трябва да бъде включвана във всеки цикъл на оцветяване. Тъканите, използвани като външни положителни контролни материали, трябва да бъдат избирани от пациентски проби с известно положително оцветяване на p16^{INK4a}. Ако положителните контроли не показват подходящо положително оцветяване, резултатите от тестовите проби трябва да се считат за невалидни.

Отрицателна тъканна контрола

Типове клетки, за които е известно, че са отрицателни за p16^{INK4a}, присъстват в повечето тъканни срези, които могат да се използват от лаборанта като места за вътрешен отрицателен контрол за проверка на работните спецификации на IHC. Ако се появи специфично оцветяване (фалшиво положително оцветяване) в отрицателни контролни проби, резултатът от пациентските проби трябва да се счита за невалиден.

Неспецифичен реактив отрицателна контрола

Използвайте неспецифичен реактив отрицателна контрола вместо първично анти тяло върху срез от всяка пациентска проба за оценка на неспецифично оцветяване, което позволява по-добра интерпретация на специфичното оцветяване на зоната на антигена.

Ако се появи специфично оцветяване (фалшиво положително оцветяване) с неспецифичен реактив отрицателна контрола, резултатът от пациентските проби трябва да се счита за невалиден.

VIII. Интерпретиране на резултатите

Контролни проби, оцветени с Negative Reagent Control като първичен реактив, не трябва да показват специфично оцветяване.

Положително оцветяване с моноклонално мише анти-човешко p16^{INK4a} анти тяло, клон Е6Н4[™] трябва да бъде оценено в контекста на неспецифично фоново оцветяване на Negative Reagent Control. Както при всеки имунохистохимичен тест, отрицателен резултат означава, че антигенът не е открит, а не че специфичният антиген липсва в изследваните клетки/тъкани.

При интерпретирането на резултатите трябва да се вземе предвид фактът, че p16^{INK4a} е клетъчен протеин, който може да бъде експресиран при откриваеми нива в цервикални диспластични лезии от висока степен и цервикални ракови заболявания, както и при някои състояния, несвързани с цервикална дисплазия, макар и на различни нива и с различни модели на експресия.

Оцветените проби на предметни стъкла се оценяват в съответствие с двоичната система за класифициране, съставена от оценки „положителен“ или

„отрицателен“.

Оценката „положителен“ се дава, ако оцветена за p16^{INK4a} проба на предметно стъкло показва непрекъснато оцветяване на клетки на базалния и парабазалния клетъчни слоеве на сквамозния цервикален епител с или без оцветяване на клетки на повърхностните клетъчни слоеве („дифузно оцветяване“). Пример за предметно стъкло, класифицирано като „положителен“ („дифузно оцветяване“) е показан в Приложение 2, Фигура 1.

Оценката „отрицателен“ се дава, оцветена за p16^{INK4a} проба на предметно стъкло показва или отрицателна реакция на оцветяване в сквамозния епител („отрицателно оцветяване“) или оцветяване на изолирани клетки или малки клетъчни групи, т.е. непостоянно оцветяване, частично извън базалните и парабазалните клетки („фокално оцветяване“). Пример за предметно стъкло, класифицирано като „отрицателен“ („дифузно оцветяване“) е показан в Приложение 2, Фигура 2.

Интерпретацията на предметните стъкла, оцветени за p16^{INK4a} посредством CINtec® Histology Kit, трябва да бъде изпълнена заедно с оцветени с H&E предметни стъкла, приготвени от същата цервикална тъканна проба. Допълнителната информация, предоставена за предметни стъкла, оцветени със CINtec®, трябва да се съчетава с предварителна морфологично обоснована диагноза, установена върху оцветени с H&E предметни стъкла, за да се направи заключителна диагноза.

IX. Ограничения

- Само за професионална употреба. Необходимо е специално обучение за изпълнението на имунохистохимични процедури.
- Клиничното интерпретиране на положително или отрицателно оцветяване трябва да бъде направено в контекста на клиничната картина, морфологията и други хистопатологични критерии. Клиничното интерпретиране на положително или отрицателно оцветяване трябва да бъде направено чрез морфологични изследвания посредством подходящи положителни и отрицателни вътрешни и външни контроли, както и с други диагностични тестове. Задължението за всички стъпки, използвани за подготовка и интерпретиране на заключителната ИНС подготовка, е на квалифициран патолог, който е запознат с правилното използване на ИНС антитела, реактиви и методи за интерпретиране.
- Резултатите от оцветяването в имунохистохимичните изследвания силно зависят от качеството на оцветената тъкан. Съответно стъпките за фиксиране, измиване, изсушаване, загряване, срязване или замърсяване с други тъкани значително влияят на цялостния резултат от оцветяването и може да доведат до появата на артефакти, улавяне на антитела или фалшиво отрицателни резултати. Непоследователните резултати може да се дължат на вариации в методите за фиксиране и вграждане или присъщи нередности в тъканта.
- Прекомерното или непълно контрастно оцветяване може да интерферира с правилната интерпретация на резултатите.
- Производителят предоставя тези антитела/реактиви с оптимално разреждане за употреба в съответствие с инструкциите, предоставени тук, за ИНС тестване на подготвените тъканни срези. Всяко отклонение

от препоръчителните тестови процедури може да направи невалидни декларираните очаквани резултати. Трябва да се прилагат и документираните подходящи контроли. Потребителите, които се отклоняват от препоръчаните тестови процедури, трябва да поемат отговорност за интерпретирането на пациентските резултати при тези обстоятелства.

- Фалшиво положителни резултати може да се наблюдават при неимунологично свързване на протеини или продукти от реакция на субстрата. Те може да са причинени също и от псевдопероксидазна активност (еритроцити) и ендогенна пероксидазна активност (циклохром C).
- Реактивите могат да демонстрират неочаквани реакции в нетествани до този момент тъкани. Възможността за неочаквани реакции дори в тествани тъканни групи не може да бъде напълно елиминирана поради биологична променливост на експресията на антигени в неоплазми или други патологични тъкани. Свържете се с Roche mtm laboratories AG, за да съобщите за документирана(и) неочаквана(и) реакция(и). За информация относно техническа помощ, вижте информация за контакти в раздел XIII.
- Не заменяйте реактиви в един комплект с реактиви, носещи други партиден номер или с реактиви на други производители.

X. Работни характеристики

Клинични работни характеристики

Клиничните работни характеристики на CINtec® Histology Kit е оценен в контролирано клинично проучване посредством фиксирани във формалин, включени в парафин проби от цервикална тъкан [21]. Проучването е предназначено да демонстрира пригодността на CINtec® Histology Kit като помощно средство за увеличаване на диагностичната точност и съгласуваност на заключенията от различни специалисти за откриване на цервикална интраепителна неоплазия от висока степен (CIN2+).

Клиничното проучване е проведено върху ретроспективно събрани проби от щипкова биопсия и биопсия с конизация. Общо 500 цервикални проби, получени от две различни европейски патологични лаборатории и обогатени за високостепенна дисплазия на базата на техните първоначални диагнози, са използвани за подготовка на оцветени с H&E предметни стъкла и последователни предметни стъкла, оцветени със CINtec® Histology Kit съгласно инструкциите на производителя.

Три европейски патолози експерти по гинекологични патологии поставиха независими диагнози за всеки случай въз основа на оцветени с H&E предметни стъкла. Случаи с противоречиви резултати бяха подложени на съвместен процес на второ разглеждане по време на срещата за уточняване на експертните заключения и повечето диагнози (консенсусни диагнози, две от три) послужиха като референтни диагнози за проучването.

Дванадесет изследователя (сертифицирани патолози, редовно разглеждащи цервикални патологии) от 4 европейски държави (Франция, Италия, Испания и Германия) участваха като панелни патолози в проучването. При първия кръг от интерпретации на предметните стъкла всички панелни патолози поставиха

своите индивидуални диагнози за всеки от случаите само на базата на оцветените с H&E предметни стъкла. Оригиналните диагнози и референтните диагнози бяха заслепени за патолозите през цялото време. След междинен период от 4 седмици (за изключване на влиянието от предходния преглед на пробите), същият набор от оцветени с H&E предметни стъкла (повторно обозначени) бяха прегледани отново от всички дванадесет панелни патолози, заедно със съответните предметни стъкла за всеки случай, оцветени със CINtec® Histology Kit.

За оценка на подобряването в диагностичната точност за оцветените със CINtec® Histology предметни стъкла с цервикални проби, отчетени съвместно със съответните предметни стъкла, оцветени с H&E, в сравнение с диагнозата на оцветените само с H&E предметни стъкла с цервикални проби. Резултатите от всички отчитания на панелните патолози по двата метода бяха сравнени с консенсусните диагнози, установени като референтни диагнози, от тримата патолози експерти по гинекологични патологии.

Резултати:

Общо 482 случая с направени диагнози от всички патолози от проучването бяха включени в анализа на данни. Броят на случаите във всяка от различните диагностични категории на базата на консенсусните категории от тримата патолози експерти по гинекологични патологии бяха „Отрицателни“ за дисплазия (n=194), CIN1 (n=96), CIN2 (69) и CIN3 (n=123).

Диагностична точност за откриване на CIN2+

Общата чувствителност за идентификация на CIN2+ беше увеличена от 1787 (H&E) до 2018 (H&E плюс CINtec® Histology) действително положителни за CIN2+ резултати само със слабо намаляване в общата специфичност от 3088 (H&E) до 3051 (H&E плюс CINtec® Histology) действително отрицателни за ≤CIN1 резултати.

Таб. 1

Подобрение в диагностичната точност за CIN (CIN2+) от висока степен чрез конюнктивното отчитане на предметни стъкла оцветени с H&E плюс CINtec® Histology в сравнение с оцветени само с H&E-предметни стъкла; дадени са брой на действително положителни, фалшиво отрицателни, фалшиво положителни и действително отрицателни резултати в сравнение с консенсусните диагнози от патолозите експерти по гинекологични патологии (Забележка: общо съответствие с консенсусните диагнози на патолозите експерти по гинекологични патологии би дало 2304 действително положителни резултата (192 случая със CIN2+, x 12 панелни патолози)

	Действително положителни	Фалшиво отрицателни	Фалшиво положителни	Действително отрицателни
H&E	1787	517	392	3088
H&E+CINtec® Histology	2018	286	429	3051

Модел на ANOVA на смесени ефекти за псевдостойности, известен също и като метод на Dorfman-Berbaum-Metz (DBM) се използва в изследването за ефектите на теста CINtec® Histology върху точността.

Нулевата хипотеза, че диагностичната точност на оцветените предметни стъкла с H&E спрямо оцветените предметни стъкла с H&E плюс CINtec® Histology за CIN2+ е еднаква беше отхвърлена с $p=0.0004$ (площ под кривата (AUC) за H&E: 0.877; AUC за H&E плюс CINtec® Histology: 0.925).

Таб. 2

Работни характеристики за конюнктивното отчитане на оцветените с H&E плюс CINtec® Histology предметни стъкла спрямо оцветените само с H&E предметни стъкла за идентификация на CIN (CIN2+) от висока степен; консенсусни диагнози, поставени от трима патолози експерти по гинекологични патологии върху оцветени с H&E предметни стъкла бяха използвани като референтни диагнози

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

95 % CI, 95 % доверителни интервали; PPV, прогностичност за положителен резултат; NPV, прогностичност за отрицателен резултат; DLR+, коефициент на вероятност за положителна диагноза; DLR–, коефициент на вероятност за отрицателна диагноза

Като се използват консенсусните диагнози на тримата патолози експерти по гинекологични патологии като референция, се установява, че чувствителността за откриване на CIN2+ е подобрена относително с 13 % (чувствителността за диагнози с H&E 77.6 % е подобрена до 87.6 % за диагнози, поставени върху оцветени с H&E плюс CINtec® Histology предметни стъкла).

Повишаването в диагностичната точност за откриване на CIN2+ е независимо доказано със статистическа значимост за подгрупите на цервикалните щипкови биопсии ($n=249$; AUC за H&E: 0,895; AUC за H&E плюс CINtec® Histology: 0.929; $p=0.0053$) и проби от цервикални проби с конизация ($n=233$; AUC за H&E: 0,887; AUC за H&E плюс CINtec® Histology: 0.948; $p=0.009$).

Съгласуваност на заключенията от различни специалисти за откриване на CIN2+

За оценка на подобрението на съгласуваността на заключенията от различни специалисти за откриване на CIN2+ между панелните патолози е използван формуляр с многооценъчна скала за статистическата величина капа между диагнози, поставени върху оцветени с H&E предметни стъкла с цервикални проби и диагнози, поставени върху оцветени с H&E предметни стъкла, конюнктивно отчетени с оцветени със CINtec® Histology предметни стъкла с цервикални проби.

Таб. 3

Подобрение в съгласуваността на заключенията от различни специалисти за откриване на CIN2+ чрез конюнктивно отчитане на оцветени с H&E плюс CINtec® Histology предметни стъкла спрямо предметни стъкла, оцветени само с H&E. Посочени са капа стойностите като мярка за корекция на случайностите в съгласуваността

Диагностична категория	Капа H&E	Капа H&E плюс CINtec®	Статистическо значение
CIN2+, всички случаи	0.580	0.756	p < 0.0001
CIN2+, само щипкови биопсии	0.598	0.748	p < 0.0001
CIN2+, само биопсии с конизация	0.548	0.765	p < 0.0001

Статистическата величина капа като мярка за корекция на случайностите в съгласуването между панелните патолози за откриване на CIN2+ беше подобрена значително за отчитанията на оцветените с H&E плюс CINtec® Histology предметни стъкла спрямо отчитанията на предметни стъкла, оцветени само с H&E (Увеличение в стойностите капа за всички случаи от 0.580 до 0.756; p < 0.0001).

Възпроизводимост в класифицирането на модела на оцветяване на p16^{INK4a}

Беше анализирана надеждността за оценка от панелните патолози на модела на оцветяване на p16^{INK4a} в цервикални проби като дифузно положително за p16^{INK4a}, фокално положително за p16^{INK4a} или отрицателно за p16^{INK4a}.

Имаше високо ниво на възпроизводимост между патолозите при категоризирането на модела на оцветяване на p16^{INK4a} като положително (дифузно оцветяване) или отрицателно (фокално оцветяване или неимунореактивно). За стойността Капа (мярка за корекция на случайности в съгласуването) за възпроизводимостта между дванадесетте панелни патолози за класифицирането на модела на оцветяване на p16^{INK4a} като положително (дифузно оцветяване) или отрицателно (фокално оцветяване или неимунореактивно) беше установена, че е отлична (средна капа = 0.899; медианна капа = 0.903).

Аналитични характеристики

Аналитична чувствителност

Изследване за чувствителност беше проведено с комплекти CINtec® Histology Kit от 3 партии. Тридесет и пет цервикални биопсии със CIN3+ бяха анализирани в изследването за чувствителност, включващи 6 биопсии, класифицирани като CIN3, и 29 биопсии, класифицирани като сквамозен клетъчен карцином.

Пет от 6-те (83.3 %) случая, класифицирани като CIN3 демонстрираха интензивно дифузно оцветяване на p16. Един от случаите на биопсии със CIN3 демонстрира слаба експресия на p16, но липсваше ясен положителен за p16 сигнал.

Двадесет и два от 29-те (75.9 %) случая, класифицирани като сквамозен

клетъчен карцином, демонстрираха интензивно дифузно оцветяване на p16. Пет случая на сквамозен клетъчен карцином демонстрира слаба експресия на p16, но липсваше ясен положителен за p16 сигнал. Само 2 от 29-те (6.9 %) случая бяха изцяло отрицателни за p16. Това може да се обясни, тъй като преди това беше докладвано, че 3–8 % от случаите на сквамозен клетъчен карцином са отрицателни за оцветяване на p16 [1; 6]. Това може да отразява малък процент случаи, при които дедиференциацията и хромозомните пренареждания водят до инактивиране или делеция на p16 генния locus.

При всички 3 партии оцветители върху добре характеризирани панел на тъканни срези от плъх с Negative Reagent Control резултатът беше интензивно и специфично оцветяване на отделни неврони в мозък на плъх. В допълнение, някои каналикуларни клетки на бъбреците, единични макрофаги в далака и единични макрофаги и плазмени клетки в тънките черва показват слабо оцветяване. Други тъкани от матрицата с тъкани на плъх бяха напълно отрицателни.

Анти-p16 анти тялото E6H4™ може да покаже непрекъснато оцветяване на клетки на базалния и парабазалния клетъчен слой с или без оцветяване на клетки от междинния или междинния и повърхностния слой на сквамозния епител в цервикални биопсии със CIN от висока степен (CIN2, CIN3). Negative Reagent Control (NRC) може да открива специфични неврони на плъха.

Аналитична специфичност

Специфичността на клон E6H4™ на мише анти-човешко p16^{INK4a} анти тяло е верифицирана чрез Уестърн блот анализ (положителен за лизат на HeLa клетъчната линия, вижте също [1]).

Изследването за специфичност беше проведено с комплекти CINtec® Histology Kit от 3 партии върху добре характеризирани панел на 90 фиксирани в NBF (неутрално буфериран формалин) нормални тъканни проби (30 различни вида тъкани) и 54 туморни проби, с изключение на тъкани от маточната шийка (организираны в многотъканни матрици = MTA).

При оцветяване с използване на p16 специфично анти тяло (клон E6H4™) на нормални тъкани бяха наблюдавани 16 различни отрицателни за p16 тъканни проби [главен мозък, малък мозък, надбъбречна жлеза, щитовидна жлеза, костен мозък, сърце, хранопровод, стомах, черва, дебело черво, черен дроб, бъбреци, напречно набраздена мускулна тъкан, кожа, мезотелиом, маточна шийка] и 14 различни положителни за p16 тъкани [Слабо оцветяване: хипофиза, бели дробове, тимусна жлеза, простата; положително: нерви, тънки черва, сливици, панкреас, далак; силно положително: матка, яйчник, гърда, тестис, паращитовидна жлеза]. При оцветяване с използване на p16 специфично анти тяло (клон E6H4™) върху туморни тъкани, различни от тъкани от маточната шийка, бяха наблюдавани 22 различни случая на тумори, отрицателни за p16, и 32 различни случая на тумори, положителни за p16.

За всички 3 партии CINtec® Histology резултатите бяха отрицателни за всички тъкани (нормални тъкани и туморни тъкани), тествани при използване на Negative Reagent Control. Моноклоналното мише анти-плъхово свързано с окситоцин неврофизиново анти тяло не реагира значително с пробите от човешка нормална тъкан и човешки туморни тъкани.

Възпроизводимост

Междусерийна възпроизводимост

Междусерийната възпроизводимост е определена за CINtec® Histology Kit посредством протокол за ръчна обработка чрез оцветяване на 36 предметни

стъкла, подготвени от тъканни блокчета, диагностицирани като CIN2+. Диспластичните зони на всички срези бяха оцветени със сравнима интензивност (+/- 0.5 в скалата от 0 до 3) във всички серии. Нормалните зони на всички предметни стъкла не демонстрираха специфично оцветяване.

Вътресерийна възпроизводимост

Вътресерийната възпроизводимост беше определена със CINtec® Histology Kit с протокол за ръчна обработка, както и с апарат за автоматично оцветяване, в три различни дни. Общо три тъканни блокчета, диагностицирани като CIN2+, бяха включени. От всяко блокче един сериен срез беше включван всеки ден. Диспластичната зона на срезове от един блок беше оцветена със сравнима интензивност (+/- 0.5 в скалата от 0 до 3) през всички дни, а също и при ръчното и автоматичното оцветяване. Нормалните зони на всички предметни стъкла не демонстрираха специфично оцветяване.

Междупартидна възпроизводимост

За определяне на междупартидната възпроизводимост бяха използвани комплекти CINtec® Histology Kit от 3 различни партии за оцветяване на срези от случаи на CIN2+. Ръчното и автоматичното оцветяване беше извършено в съответствие с протокола, даден в инструкциите за употреба. Диспластичната зона на срезове от един блок беше оцветена със сравнима интензивност (+/- 0.5 в скалата от 0 до 3) с реактивите от трите партии с ръчно и автоматично оцветяване. Нормалните зони на всички предметни стъкла не демонстрираха специфично оцветяване.

Обърнете внимание, че методът за оценка на интензивността на оцветяването със скала от 0 до 3 беше единствено използван за целите на оценка на аналитичните характеристики и не трябва да бъде използван за интерпретиране на оцветяването на тъканните срези в клиничната практика. Вместо това за рутинно интерпретиране трябва да се използва качествената интерпретация на оцветени предметни стъкла, описана в Раздел VIII.

XI. Отстраняване на проблеми

Вижте раздел XIII за информация за контакти в случай на нужда от техническа помощ.

Проблем	Възможна причина	Предложено действие
1. Не се оцветяват предметните стъкла	<u>1a.</u> Отклонение от инструкциите за употреба;	<u>1a.</u> Внимателно прочетете инструкциите за употреба и се придържайте към описаните там процедури;
2. Слабо оцветяване на предметните стъкла	<u>2a.</u> Неподходящо епитопно възстановяване;	<u>2a.</u> Използвайте прясно приготвен Epitope Retrieval Solution и/или се уверете, че Epitope Retrieval Solution достига 95–99 °C за 10 минути и може да се охлади за още 20 минути;
	<u>2b.</u> Неподходящи времена за инкубиране на реактив;	<u>2b.</u> Прегледайте 2.2. /3.2. Препоръки на протокола за оцветяване;
	<u>2c.</u> Неподходящ метод за фиксация;	<u>2c.</u> Уверете се, че пациентската тъкан не е свръхфиксирана и че не е използван алтернативен фиксатор;
	<u>2d.</u> Водата, която е използвана за разреждане на разтвора за епитопно възстановяване, съдържа твърде голяма концентрация на йони;	<u>2d.</u> Йонообменната колона за производство на дейонизирана вода трябва да е проверена и да е проведено рутинно техническо обслужване;

	<u>2е.</u> Неподходяща депарафинизация;	<u>2е.</u> Потребителите трябва да обърнат внимание, че вариации в температурата на оборудването или във времената на експозиция по време на преаналитичната подготовка на пробите може да доведат до непълно отстраняване на парафина от тъканните срези. Остатъчният парафин може да стане причина за непълно оцветяване с хистологичен оцветител, включително с оцветителя CINtec® Histology. Хистопатологичните лаборатории трябва да включат регулярен мониторинг на оборудването, за да се намалят вариациите при подготовката на пробите преди оцветяване. Наблюдаването на строго очертани граници в имунореактивни тъканни зони или други несъответствия в оцветяването в рамките на предметно стъкло може, при всеки един имунохистохимичен оцветител, да бъде индикатор за неоптимално или непълно преаналитично обработване на пробата. Потребителите трябва да обмислят проверка на оборудването и методите за преаналитична подготовка на пробите, ако се наблюдават несъответствия в оцветяването;
3. Прекомерно фоново оцветяване на предметните стъкла	<u>3а.</u> Непълно отстраняване на парафина;	<u>3а.</u> Използвайте вани с пресен ксилен и следвайте процедурата, описана в раздел 2.1. /3.1.;
	<u>3б.</u> Закрепването на срези към предметни стъкла е извършено с нишестени добавки;	<u>3б.</u> Нишестените добавки, използвани в закрепените срези, може да проявят имунореакция и поради това трябва да се избягват;
	<u>3с.</u> Недостатъчно изплакване на предметните стъкла;	<u>3с.</u> Използвайте пресен разтвор в буферните вани и бутилки за измиване;

	3d. Изсъхване на срезите по време на процедурата за оцветяване;	3d. Използвайте овлажнителна камера. Избърсвайте само три от четирите предметни стъкла едновременно, преди да приложите реактив.
	3e. Неподходящ метод за фиксация;	3e. Използвайте само фиксатора, препоръчан тук. Аберентно фиксираната тъкан може да показва прекомерно фоново оцветяване;
	3f. Неспецифично свързване на реактиви към тъканта;	3f. Проверете метода на фиксиране на пробата и за наличие на некроза;
4. Тъканта се отделя от предметните стъкла	4a. Използвате неподходящи предметни стъкла;	4a. Придържайте се към препоръките, дадени тук, и използвайте предметни стъкла SuperFrost®;
5. Прекомерно интензивно специфично оцветяване	5a. Неподходящ метод за фиксация;	5a. Използвайте правилен фиксатор и метод на фиксация;
	5b. Удължени времена инкубиране на реактив;	5b. Прегледайте и се придържайте към протокола за оцветяване, даден в раздели 2.2/3.2 по-горе;
	5c. Неподходящ разтвор за измиване;	5c. Използвайте Wash Buffer (10 x) (каталожен номер 8550).

XII. Символи

Символ:

Обяснение:

	Каталожен номер
	Партиден код
	Глобален номер на търговска единица
	Уникален идентификатор на изделието
	Медицинско изделие за ин витро диагностика
	Производител
	Съдържа достатъчно за <n> теста
	Консултирайте се с инструкциите за употреба
	Срок на годност
	Ограничение на температурата
	Дата на производство
	Не използвайте повторно
	Контакт за техническа помощ (телефон)
	Съдържа материали от животински произход
	Съдържание

XIII. Производител

Произведено от:

Roche mtm laboratories AG
Sandhofer Straße 116
D-68305 Mannheim
Germany
www.roche.com
<https://dialog.roche.com>

Контакт техническа за (телефон): помощ

+800 5505 6606

Резюмето на безопасността и ефективността можете да намерите тук:
<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>

XIV. Статус на изданията

Текущите инструкции за употреба са версия 2.9, публикувани през декември 2022 г.

Промени спрямо предходна версия (2.8, публикувана през май 2021 г.):

- Добавен символ „материал от животински произход“ на заглавната страница
- IV., Необходимо оборудване: добавен Autostainer (по-рано вече описан в VI., 2. Процедура на оцветяване за апарати Autostainer)
- VI., Проби, фиксирани с формалин, включени в парафин: уточнено, че нарязаните срези трябва да бъдат оцветени веднага

- VI., 2. Процедура на оцветяване за апарати Autostainer: уточнено, че само LabVision Autostainer и Dako Autostainer PLUS са валидирани от производителя, но подобни апарати може да бъдат валидирани от потребителя
- Обяснение на допълнителни символи (Раздел XII.)
- Редакционни промени

XV. Интелектуална собственост

CINtec е търговска марка на Roche.

Всички останали търговски марки са собственост на съответните им собственици.

© 2022 Roche

Приложение 1

Препратки

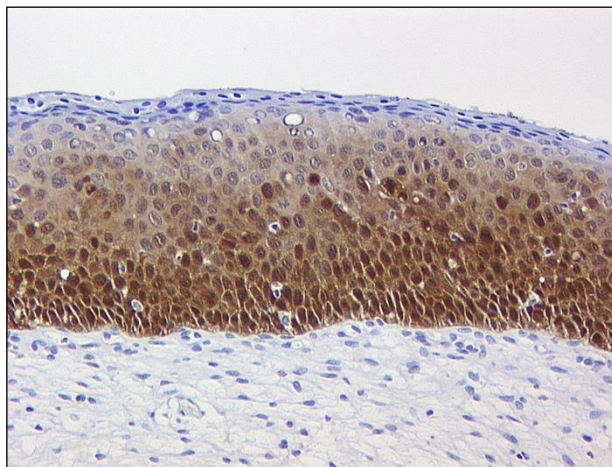
1. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, and von Knebel Doeberitz M. Overexpression of p 16^{INK4a} as a specific marker for dysplasia and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001, 92(2):276-84
2. Sano T, Oyama T, Kashiwabara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

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

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

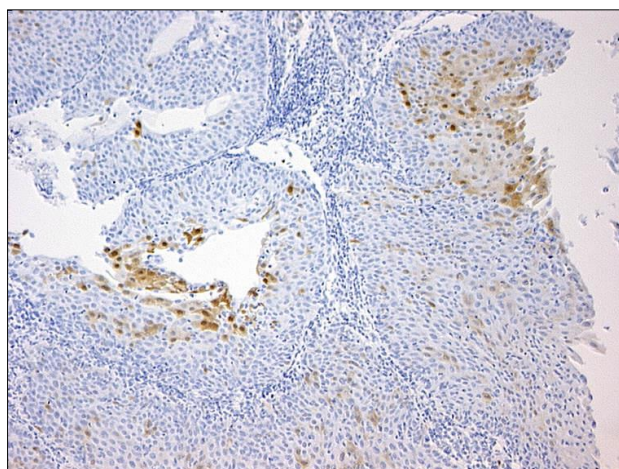
Приложение 2

Пример за дифузно оцветяване



Фиг. 1: CIN 3

Пример за фокално оцветяване



Фиг. 2: Сквамозна метаплазия, зряла