

# CINtec<sup>®</sup> PLUS

CYTOLOGY

## Instrucciones de uso

### CINtec<sup>®</sup> PLUS Kit

El CINtec<sup>®</sup> PLUS Kit es un ensayo inmunocitoquímico para determinar cualitativa-mente y de manera simultánea las proteínas p16<sup>INK4a</sup> y Ki-67 en preparaciones citológicas cervicales. El uso de este kit está previsto como ayuda en la identificación de mujeres con lesiones intraepiteliales de alto grado, tanto en cribado primario como en el subgrupo de las pacientes que tienen un resultado de citología de ASCUS (células escamosas atípicas de significado indeterminado), LSIL (lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado) o pacientes con resultados positivos a un test de VPH de alto riesgo.



Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Strasse 116  
68305 Mannheim  
Germany

<https://navifyportal.roche.com>

**REF** 10215348001

**GTIN** 07613336230374

 50

 2 – 8°C



**CE**  
0123

**IVD**



# Índice

## ESPAÑOL

|       |   |    |
|-------|---|----|
| I.    | Nombre del producto.....  | 2  |
| II.   | Uso previsto .....  | 2  |
| III.  | Resumen y explicación del dispositivo.....  | 2  |
|       | Base científica .....   | 2  |
|       | Significado clínico .....   | 3  |
|       | Principios del procedimiento.....   | 5  |
| IV.   | Reactivos .....   | 5  |
|       | Material suministrado.....  | 5  |
|       | Almacenamiento .....  | 9  |
|       | Materiales y reactivos necesarios pero no suministrados .....   | 9  |
|       | Equipo necesario .....  | 10 |
| V.    | Advertencias y precauciones .....   | 11 |
|       | Advertencia.....  | 11 |
|       | Precauciones.....   | 11 |
| VI.   | Procedimientos .....  | 12 |
|       | Preparación de las muestras citológicas .....   | 12 |
|       | Tratamiento de recuperación del epítipo inducido por calor antes<br>de la tinción de las muestras ..... | 14 |
|       | Procedimiento de tinción de portaobjetos.....   | 15 |
|       | 1. Preparación de los reactivos .....   | 15 |
|       | 1.1 Solución de recuperación del epítipo .....  | 15 |
|       | 1.2 Tampón de lavado.....   | 15 |
|       | 1.3 Soluciones sustrato-cromógeno (DAB y Fast Red).....   | 15 |
|       | 1.4 Contratinción .....   | 16 |
|       | 1.5 Medios de montaje .....   | 16 |
|       | 2. Procedimiento de tinción .....   | 17 |
|       | 2.1 Rehidratación de las muestras .....   | 17 |
|       | 2.2 Recuperación del epítipo .....  | 18 |
|       | 2.3 Protocolos de tinción .....   | 19 |
|       | 2.3.1 Protocolo de tinción para Autostainer Instruments (Dako, LabVision) ...                           | 19 |
|       | 2.3.2 Protocolo de tinción para el sistema Shandon Coverplate™ .....                                    | 21 |
|       | 2.4. Contratinción con hemaxotilina .....   | 22 |
|       | 2.5 Montaje.....  | 23 |
| VII.  | Control de calidad .....  | 24 |
|       | Control positivo .....  | 24 |
|       | Control negativo.....   | 24 |
|       | Verificación del ensayo.....  | 24 |
| VIII. | Interpretación de los resultados .....  | 24 |
| IX.   | Limitaciones .....  | 25 |
| X.    | Características del rendimiento.....  | 26 |
| XI.   | Solución de problemas.....  | 35 |
| XII.  | Símbolos .....  | 38 |
| XIII. | Fabricante .....  | 39 |
| XIV.  | Estado de la revisión.....  | 39 |
| XV.   | Propiedad intelectual.....  | 39 |
|       | Anexo 1 Referencias .....   | 40 |
|       | Anexo 2 Tablas .....  | 42 |

# ESPAÑOL

## I. Nombre del producto

CINtec® PLUS Kit

## II. Uso previsto

Para uso en diagnóstico in vitro.

El CINtec® PLUS Kit es un ensayo inmunocitoquímico para determinar cualitativamente y de manera simultánea las proteínas p16<sup>INK4a</sup> y Ki-67 en preparaciones citológicas cervicales.

El uso de este kit está previsto como ayuda en la identificación de mujeres con lesiones intraepiteliales de alto grado, tanto en cribado primario como en el subgrupo de las pacientes que tienen un resultado de citología de ASCUS (células escamosas atípicas de significado indeterminado), LSIL (lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado) o pacientes con resultados positivos a un test de VPH de alto riesgo.

El uso de este kit está previsto para laboratorios de citología. La interpretación de los resultados debe realizarla un profesional certificado basándose en la historia clínica del paciente y en otras pruebas diagnósticas realizadas.

La prueba está diseñada para su uso manual o para su uso en los instrumentos Autostainer.

## III. Resumen y explicación del dispositivo

### Base científica

El control de la progresión de la división del ciclo celular eucariótico está efectuado por un complejo mecanismo de expresiones controladas y modificaciones postraduccionales (p. ej., fosforilación) de las proteínas que regulan el ciclo celular. La proteína p16<sup>INK4a</sup> tiene una función crucial en la regulación del ciclo celular eucariótico. Es parte del control mediado por la proteína retinoblastoma (pRB) de la transición de las fases G<sub>1</sub> a S y provoca la detención del ciclo celular durante el proceso de diferenciación celular. Por lo tanto, p16<sup>INK4a</sup> tiene un efecto antiproliferativo cuando se expresa durante la progresión del ciclo celular [1]. En células epiteliales terminales diferenciadas, la expresión de la proteína p16<sup>INK4a</sup> se regula a niveles que normalmente no se pueden detectar mediante la inmunocitoquímica. [2]

En la displasia cervical, la sobreexpresión de p16 se considera un biomarcador sustituto para transformar las infecciones por VPH, lo que refleja la activación de la proliferación celular impulsada por las oncoproteínas E6/E7 del VPH [2-5]. La detección de p16 en preparaciones de citología cervical se ha propuesto como un valioso marcador complementario para clasificar a las mujeres con resultados anómalos en la citología de Papanicolaou, así como con resultados positivos de la prueba del VPH [3-5]. Sin embargo, dado que se puede observar una tinción específica de p16 en células metaplásicas o endocervicales individuales en las que se puede expresar que p16 ejerce su función celular fisiológica normal, supresora del crecimiento, para la interpretación de las preparaciones de citología cervical de tinción simple p16 es necesario identificar las células inmunorreactivas p16 y la clasificación adicional de estas células con respecto a las señales de anomalías morfológicas [2-4].

La detección simultánea combinada de p16 y el marcador de proliferación Ki-67 dentro de la misma célula mediante el método de ICQ ha demostrado ser una herramienta valiosa para identificar células cervicales displásicas en preparaciones de citología sin necesidad de interpretación morfológica [3,6,7]. La Ki-67 es una proteína nuclear y nucleolar estrictamente asociada con la proliferación celular y los métodos estándares de inmunotinción en células en reposo no pueden detectarla (G0) [8]. En condiciones fisiológicas normales, la expresión de la proteína asociada a la proliferación Ki-67 es mutuamente excluyente de la proteína antiproliferativa p16. Por el contrario, las células donde se interrumpe la vía mediada por la proteína del retinoblastoma (pRB) que controla la progresión del ciclo celular en una fase posterior de la función supresora del tumor de p16 (como en las células epiteliales que expresan las oncoproteínas E6/E7 del VPH de alto riesgo) pueden proliferar y, por tanto, puede expresar Ki-67 en presencia de p16 funcional [2, 3].

Por lo tanto, la detección de células individuales en preparaciones de citología cervical que coexpresan simultáneamente p16 y Ki-67 puede servir como un indicador independiente de la morfología de las células con desregulación del ciclo celular y, por lo tanto, puede usarse como un indicador de la presencia de la transformación de las infecciones por VPH y la neoplasia intraepitelial cervical subyacente [2,3]. En los últimos tiempos, se han realizado y publicado numerosos estudios que evalúan el valor potencial y la utilidad clínica de la citología de doble tinción p16/Ki-67 para la identificación de mujeres que pueden beneficiarse de la derivación a la colposcopia en función de varios resultados primarios de detección del cáncer cervical, incluso para la clasificación de mujeres con un resultado de citología de Papanicolaou con células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS) o lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LSIL), mujeres con alto riesgo de VPH positivo en la detección primaria del VPH o mujeres con resultado negativo para lesión intraepitelial o cáncer (NILM)/resultado positivo en VPH en entornos clínicos donde la citología de Papanicolaou/prueba conjunta de VPH se utiliza para el examen primario [6,7; 9-25].

### **Significado clínico**

La interpretación de las preparaciones citológicas cervicales con inmunotinción para la detección simultánea de la expresión de la proteína reguladora del ciclo celular p16<sup>INK4a</sup>, y del marcador Ki-67 de proliferación celular ha demostrado su utilidad para identificar a las mujeres con neoplasia cervical intraepitelial de alto grado (CIN de alto grado), con alto nivel de sensibilidad y especificidad, cuando se empleó:

- en un grupo de cribado en combinación con las pruebas rutinarias de citología de Papanicolaou,
- en el subgrupo de pacientes con resultados de citología Pap de ASCUS o LSIL,
- en el subgrupo de pacientes que tienen un resultado de citología Pap negativo, pero un resultado VPH positivo.

Es un gran desafío para la sanidad pública poder identificar de manera eficaz a las mujeres que padecen CIN de alto grado de entre un grupo de cribado de cáncer cervical rutinario. Debido a la baja prevalencia de las lesiones precancerosas (generalmente menos del 1% de las mujeres en un grupo de cribado sin síntomas), es de gran importancia disponer de pruebas de cribado y procedimientos con un alto nivel de sensibilidad y especificidad que permitan identificar a las mujeres con CIN de alto grado [26].

A lo largo de las últimas décadas, las pruebas de citología de Papanicolaou para la detección de anomalías morfológicas han mostrado ser, en los países que han establecido un protocolo para el cribado del cáncer cervical, un método eficaz para la reducción de la morbilidad y mortalidad provocada por el cáncer cervical. No obstante, a pesar de este logro positivo, continúa existiendo un nivel de sensibilidad insatisfactorio en la prueba de citología de Papanicolaou evaluada de forma aislada (generalmente sensibilidad alrededor del 50-70% [27]), que obliga a fijar cortos intervalos entre los cribados para compensar dicha falta de sensibilidad en los resultados de la prueba citológica en cuestión. Al mismo tiempo, se ha comprobado que la especificidad de la prueba de citología de Papanicolaou alcanza un nivel relativamente alto, aunque esto varía según las características del grupo de cribado, incluyendo la edad, la prevalencia del VPH, las diferentes metodologías de la prueba de Papanicolaou (frotis convencionales vs. portaobjetos citológicos en base líquida), las tecnologías empleadas (p. ej., interpretación manual vs. citología/lectura asistida por ordenador), y también según la experiencia del especialista que realiza la interpretación de los resultados.

Las pruebas de detección del VPH han tenido una buena aceptación como enfoque alternativo al cribado actual de cáncer cervical y sus lesiones precursoras, en comparación con la citología [28-30]. La prueba del VPH se usa actualmente junto con la prueba de citología de Papanicolaou en mujeres de 30 años o más, o como prueba de detección primaria en mujeres de 25 años o más [28-30].

Además de la posibilidad de implementar nuevas tecnologías para mejorar el cribado y sus algoritmos, existen otras áreas de interés en el ámbito del cribado de cáncer cervical que precisan una optimización de las tecnologías existentes para mejorar la precisión en la identificación de CIN de alto grado, o incluso situaciones en las que, hasta el momento, se carece completamente de herramientas adecuadas para su manejo. La clasificación de los resultados de citología Papanicolaou indeterminados (ASCUS, células atípicas de significado indeterminado) o ligeramente anormales (LSIL, lesión intraepitelial escamosa de bajo grado) forman parte de estas situaciones, así como el manejo de las mujeres a partir de los 30 años que se hayan realizado las pruebas de Papanicolaou y del VPH y cuyos resultados hayan sido clasificados en la prueba Pap como negativos para lesiones intraepiteliales o malignidad (NILM, por sus siglas en inglés), pero como positivos en la prueba del VPH de alto riesgo.

Para la clasificación de anomalías citológicas ASCUS, se ha demostrado que una estrategia de clasificación que incluya la detección del VPH dentro del grupo de ASCUS brinda una buena sensibilidad para la detección de CIN de alto grado subyacente. Sin embargo, la especificidad de la clasificación ASCUS basada en VPH es relativamente baja y depende de la edad [31,32]. Por otro lado, en una amplia mayoría de los casos de LSIL, el VPH da un resultado positivo a la presencia de diferentes tipos del VPH de alto riesgo [33], por lo que la clasificación de las pacientes mediante pruebas del VPH no es una estrategia muy efectiva para el tratamiento de aquellas pacientes que presenten estos resultados en las pruebas de citología de Papanicolaou.

Como los servicios de colposcopia son limitados y los costes de estos servicios, así como del posterior tratamiento de las lesiones de bajo grado, son relativamente altos, existe un gran interés por disponer de pruebas de clasificación para mujeres con ASCUS y LSIL que brinden un mejor rendimiento, en particular un mayor nivel de especificidad. Una prueba basada en un biomarcador con un elevado nivel de sensibilidad y especificidad a la vez, que sea capaz de identificar a las pacientes con enfermedades cervicales de alto grado, es beneficiosa para el manejo de mu-

eres con anomalías citológicas indeterminadas y de bajo grado para: 1) clasificar mejor a las pacientes con resultados de citología de Papanicolaou de ASCUS; y 2) posibilitar la clasificación eficaz de resultados de citología de LSIL.

De la misma manera que la situación en la clasificación de los resultados de citología de LSIL, actualmente solo existen opciones limitadas para la clasificación de los resultados negativos en la prueba de citología, pero positivos en la prueba del VPH de alto riesgo. Estos resultados constituyen entre el 5-7% de los resultados de las pruebas de Pap/VPH y son, por consiguiente, un importante grupo que precisaría un seguimiento completo con colposcopia para poder sacar provecho del mayor grado de detección de la prueba del VPH frente a la citología. No obstante, como dentro de este grupo la tasa de resultados que indiquen lesiones subyacentes de alto grado es relativamente baja, es muy deseable disponer de un medio de clasificación eficaz, lo cual permitiría el manejo eficaz de mujeres con citología negativa y resultado positivo de la prueba del VPH. Entre las opciones de clasificación actuales se incluyen el genotipo HPV16/18 y la repetición de pruebas para otras 12 mujeres con alto riesgo de VPH positivo o la clasificación de la citología de Papanicolaou de todas las mujeres con VPH positivo [30,34].

### **Principios del procedimiento**

CINtec® PLUS Kit contiene un grupo de reactivos para la detección inmunocitoquímica de los antígenos p16<sup>INK4a</sup> y Ki-67. Este kit está diseñado para realizar el procedimiento de tinción inmunocitoquímica de muestras citológicas procedentes del cuello uterino que consta de dos pasos. Para la detección de los antígenos se emplea un anticuerpo primario de ratón monoclonal, clon E6H4™, frente a la proteína humana p16<sup>INK4a</sup> y un anticuerpo primario de conejo monoclonal, clon 274-11 AC3V1, frente a la proteína humana Ki-67.

Se utilizan reactivos de visualización listos para su uso compuestos de (i) un reactivo de polímeros conjugado con peroxidasa de rábano picante y fragmentos Fab de anticuerpos de cabra anti-ratón y (ii) un reactivo de polímeros conjugado con fosfatasa alcalina de rábano picante y fragmentos Fab de anticuerpos de cabra anti-conejo. Mediante la absorción de la fase sólida, se ha eliminado la reacción cruzada de los reactivos de visualización con las inmunoglobulinas humanas.

La reacción del cromógeno se basa en la transformación de un cromógeno DAB mediado por la peroxidasa de rábano picante y la transformación de un cromógeno Fast Red mediada por la fosfatasa alcalina que forman productos de reacción visibles en el lugar del antígeno respectivo. Después de la contratinción, se debe aplicar un protocolo de montaje de dos pasos: en el primer paso es imprescindible realizar un montaje acuoso de las muestras empleando el medio de montaje acuoso proporcionado con el kit. A continuación, los portaobjetos se deberán cubrir empleando, p. ej., un medio de montaje permanente. Los resultados pueden ser evaluados mediante una inspección al microscopio.

## **IV. Reactivos**

### **Material suministrado**

Cada kit incluye los siguientes materiales suficientes para realizar 50 pruebas. El número de las pruebas se basa en el uso de 200 µL de los reactivos por cada portaobjetos.

## 1 Peroxidase-Blocking Reagent

### Reactivo de bloqueo de la peroxidasa

11,5 mL, listo para su uso

Peróxido de hidrógeno al 3% que contiene 15 mmol/L de azida de sodio (NaN<sub>3</sub>).  
EUH210 Puede solicitarse la ficha de datos de seguridad.

## 2 Primary Antibodies Solution p16/Ki-67

### Solución de anticuerpos primarios p16/Ki-67

11,5 mL, listo para su uso

Anticuerpo monoclonal de ratón antihumano p16<sup>INK4a</sup> (< 5 µg/mL), clon E6H4™ y anticuerpo monoclonal de conejo antihumano Ki-67, clon 274-11 AC3V1 (< 1 µg/mL), suministrado en 50 mM de tampón Tris, pH 7,2, que contiene 15 mmol/L azida de sodio (NaN<sub>3</sub>) y proteína estabilizante.

## 3 Visualization Reagent HRP

### Reactivo de visualización HRP

11,5 mL, listo para su uso



Atención

H317 Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

P261 Evitar respirar el polvo/el humo/ el gas/ la niebla/ los vapores/el aerosol.

P272 Las prendas de trabajo contaminadas no podrán sacarse del lugar de trabajo.

P280 Llevar guantes de protección.

P333 + P313 En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

P362 + P364 Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

P501 Eliminar el contenido/el recipiente en una planta de eliminación de residuos autorizada.

Componentes del peligro:

26172-54-3 2-metil-2H-isotiazol-3-ona, clorhidrato

55965-84-9 Masa de reacción de: 5-cloro-2- metil-4-isotiazolin-3-ona [n.o CE 247-500-7] y 2-metil-2H -isotiazol-3- ona [n.o CE 220-239-6] (3:1)

Reactivo de polímero conjugado con peroxidasa de rábano picante y fragmentos FAB de anticuerpos de cabra anti-ratón purificados, suministrado en una solución estabilizante con conservantes y proteína estabilizante.

## 4 Visualization Reagent AP

### Reactivo de visualización AP

11,5 mL, listo para su uso



Atención

H317 Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

P261 Evitar respirar el polvo/ el humo/ el gas/ la niebla/ los vapores/ el aerosol.

P272 Las prendas de trabajo contaminadas no podrán sacarse del lugar de trabajo.

P280 Llevar guantes de protección.

P333 + P313 En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

P362 + P364 Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

P501 Eliminar el contenido/ el recipiente en una planta de eliminación de residuos autorizada.

Componentes del peligro:

26172-54-3 2-metil-2H-isotiazol-3-ona, clorhidrato

Reactivo de polímero conjugado con fosfatasa alcalina y fragmentos FAB de anticuerpos de cabra anti-conejo purificados, suministrado en una solución estabilizante con conservantes y proteína estabilizante.

5

**DAB Buffered Substrate**

**Sustrato tamponado DAB**

16,0 mL

Solución de tampón sustrato, pH 7,5, que contiene peróxido de hidrógeno < 0,1%, estabilizantes y potenciadores.

6

**DAB Chromogen**

**Cromógeno DAB**

0,85 mL

Solución de cromógeno 3,3'-diaminobencidina.



Peligro

H290 Puede ser corrosivo para los metales.

H314 Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves.

H341 Se sospecha que provoca defectos genéticos.

H350 Puede provocar cáncer.

P201 Solicitar instrucciones especiales antes del uso.

P280 Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P303 + P361 + P353 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitar inmediatamente toda la ropa contaminada. Enjuagar la piel con agua.

P304 + P340 + P310 EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la persona al aire libre y mantenerla en una posición que le facilite la respiración. Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico.

P305 + P351 + P338 + P310 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado. Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico.

P308 + P313 EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico.

Componentes del peligro:

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

**NOTA:** Consulte las normas nacionales, regionales o locales para la eliminación del producto.

## 7 Naphthol Phosphate Substrate

### Sustrato naftol fosfato

25,0 mL,

Solución de tampón sustrato, pH 9,2, que contiene naftol-AS-TR-fosfato como sustrato, estabilizantes y potenciadores.

## 8 Fast Red Chromogen

### Cromógeno Fast Red

1,33 mL, solución de cromógeno Fast Red.



Peligro

H290 Puede ser corrosivo para los metales.

H314 Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves.

P280 Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P301 + P330 + P331 EN CASO DE INGESTIÓN: Enjuagar la boca. NO provocar el vómito.

P303 + P361 + P353 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitar inmediatamente toda la ropa contaminada. Enjuagar la piel con agua.  
P304 + P340 + P310 EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la persona al aire libre y mantenerla en una posición que le facilite la respiración. Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico.

P305 + P351 + P338 + P310 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado. Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico.

P501 Eliminar el contenido/ el recipiente en una planta de eliminación de residuos autorizada.

## 9 Epitope Retrieval Solution 10X

## Solución de recuperación del epítopo 10X

500 mL, tris 100 mM, EDTA 10 mM, pH 9,0; contiene 15 mmol/L de azida de sodio (NaN<sub>3</sub>).

### 10 CINtec® PLUS Mount

#### Montaje CINtec® PLUS

18,0 mL, medio de montaje permanente con una base acuosa para la conservación permanente de los preparados en portaobjetos con tinción con peroxidasa y fosfatasa alcalina como sistemas de visualización. Contiene 7,7 mmol/L de azida sódica (NaN<sub>3</sub>)

#### Almacenamiento

Almacénese a una temperatura de entre 2 y 8 °C. No utilice el producto después de la fecha de caducidad. No se dispone de datos relativos al almacenamiento de reactivos en condiciones distintas a las establecidas anteriormente.

Después de proceder a la apertura, los componentes del kit son estables durante 6 meses si se almacenan a una temperatura de entre 2 y 8 °C. Deseche la solución diluida si está turbia.

El vial de montaje CINtec® PLUS Mount (Vial 10) deberá ser extraído de la caja del kit, una vez que este se haya abierto por primera vez, y se deberá almacenar a temperatura ambiente (2 – 30 °C) para reducir la viscosidad y facilitar su uso.

El tampón de lavado diluido y la solución de recuperación del epítopo son estables hasta un mes si se almacenan a una temperatura de entre 2 y 8 °C. No utilice las soluciones diluidas si están turbias.

#### Materiales y reactivos necesarios pero no suministrados

En el CINtec® PLUS Kit no se incluye el tampón de lavado (**CINtec Wash Buffer 10X**), con referencia 10215364001, pero está disponible en Roche. Para pedidos por favor visite la web [www.roche.com](http://www.roche.com).

Solución tampón de 500 mmol/L de tris con 1,5 mol/L de NaCl, pH 7,6; contiene detergente y un agente antimicrobiano.



Atención

H317 Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

P261 Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.

P272 Las prendas de trabajo contaminadas no podrán sacarse del lugar de trabajo.

P280 Llevar guantes de protección.

P333 + P313 En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

P362 + P364 Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

P501 Eliminar el contenido/el recipiente en una planta de eliminación de residuos autorizada.

Componentes del peligro:

55965-84-9 Masa de reacción de: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona [n.o CE 247-500-7] y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona [n.o CE 220-239-6] (3:1)

**Hematoxilina sin alcohol** para contratinción;

Agua destilada o desionizada;

La solución PreservCyt®; puede necesitar que se preparen los portaobjetos ThinPrep® a partir del volumen de muestra residual que queda en el vial original de ThinPrep®. El volumen de la muestra debe ser de al menos 17 ml para preparar otro portaobjetos de acuerdo con la Resolución de problemas del Manual del operario del sistema ThinPrep® 2000, pág. 6.27;

Es necesario utilizar el líquido conservante SurePath™ para preparar los portaobjetos SurePath destinados a la tinción de la citología CINtec® PLUS. Consulte la sección VI. Procedimientos, preparaciones de muestras citológicas para obtener más detalles;

Etol, 99%;

Medio de montaje con xileno para cubreobjetos de cristal;

Portaobjetos SuperFrost® PLUS, portaobjetos del sistema ThinPrep® para microscopios, portaobjetos del sistema SurePath® PreCoat para microscopios;

Xileno;

Cubreobjetos de cristal o film;

Controles del procedimiento, p.ej. portaobjetos ThinPrep® realizados con las muestras residuales de los viales:

- Control positivo: portaobjetos ThinPrep® de muestra(s) (pools) con un resultado de citología Pap confirmado como lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (HSIL);
- Control negativo: portaobjetos ThinPrep® de muestra(s) (pools) con un resultado de citología Pap confirmado como negativo ante lesiones intraepiteliales o malignidad (NILM).

## **Equipo necesario**

Microscopio (aumento de 10 – 40x);

Contenedores de tinción resistentes al calor (plástico);

Probetas graduadas;

Botella de lavado (para rellenar con el tampón de lavado);

Cronómetro (capaz de medir intervalos de 30 segundos – 60 minutos);

Baño con tapa (capaz de mantener la solución de recuperación del epítipo a una temperatura de 95 – 99°C)

Termómetro;

Opcional: Horno de secado, capaz de mantener una temperatura de 37 o 60°C.

Opcional: Instrumento Autostainer Dako o LabVision;

Opcional: Sistema Shandon Cover-plate™.

## V. Advertencias y precauciones

### Advertencia

1. ¡Atención! Algunos de los reactivos de este kit contienen compuestos químicos peligrosos. Los componentes incluidos en este kit deben manipularse de acuerdo con las precauciones de seguridad para reactivos peligrosos de laboratorio.
2. Los componentes 1, 2, 9 y 10 de este producto contienen azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ), un compuesto químico altamente tóxico en su forma pura. Aunque a las concentraciones presentes en el producto no está clasificada como peligrosa, la azida de sodio puede reaccionar con cañerías de plomo y cobre formando acumulaciones de azidas metálicas altamente explosivas. Una vez desechado el producto, deje correr una cantidad abundante de agua para evitar acumulaciones de azidas metálicas en las cañerías.
3. Los componentes 2, 3 y 4 contienen materiales de origen animal. Al igual que con cualquier producto de origen biológico, deberán aplicarse los procedimientos de manipulación adecuados.
4. Para este kit se encuentra disponible una ficha de datos de seguridad bajo petición.
5. Las muestras citológicas, antes y después de la fijación, así como todos los materiales expuestos a ellas, deben manipularse como si fuesen potencialmente infecciosas y deben eliminarse de acuerdo con las precauciones adecuadas.
6. No pipetee nunca los reactivos con la boca y evite el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y las membranas mucosas. En caso de que los reactivos o las muestras entren en contacto con la piel o con las membranas mucosas, deben lavarse con agua abundante.
7. Los reactivos de visualización, el cromógeno DAB y el cromógeno Fast Red pueden resultar afectados negativamente si se exponen a luz intensa. No almacene los componentes del kit ni realice el procedimiento de tinción con luz intensa, como la luz solar directa.
8. Cuando manipule los componentes incluidos en el CINtec® PLUS Kit o aquellos componentes que se utilicen conjuntamente, utilice un equipo de protección personal adecuado para evitar el contacto con los ojos y la piel. Le rogamos que consulte la ficha de datos de seguridad para obtener una información más detallada.
9. El etiquetado de seguridad del producto sigue principalmente las directrices de la UE sobre el SMA.

### Precauciones

1. Para uso en diagnóstico in vitro.
2. Sólo para uso profesional.
3. Evite la contaminación microbiana de los reactivos con el fin de impedir una tinción inespecífica.
4. El uso de tiempos de incubación, temperaturas o métodos diferentes a los especificados puede causar resultados incorrectos.

5. No utilice el kit si el embalaje de alguno de sus componentes presentara daños. Si el embalaje o los componentes presentaran daños, póngase en contacto inmediatamente con el fabricante.
6. La eliminación de todos los residuos debe efectuarse de acuerdo con las normativas y directrices locales vigentes.
7. Todos los reactivos están específicamente formulados para su uso con este ensayo. Con el fin de realizar dicho ensayo de la forma especificada, no deberá sustituirse ningún reactivo.
8. Si observa una tinción inesperada que no puede explicarse por variaciones en los procedimientos del laboratorio o si sospecha de la existencia de un problema con el CINtec® PLUS Kit, consulte inmediatamente la información de contacto proporcionada en la sección XIII. para obtener más información sobre el servicio técnico.
9. Un mal funcionamiento del producto debido a problemas de manipulación o de inestabilidad no presentará signos evidentes. Por lo tanto, como medida de control de calidad, los controles positivo y negativo deberán analizarse de manera simultánea con las muestras de los pacientes.
10. Para comunicar la sospecha de incidentes graves relacionados con este dispositivo, póngase en contacto con su representante local de servicio Roche y con la autoridad competente del Estado o País Miembro de residencia del usuario.

## VI. Procedimientos

### Preparación de las muestras citológicas

Las muestras citológicas deben manipularse de manera adecuada para conservar adecuadamente dichas muestras para procedimientos de inmunocitoquímica. Sobre las muestras se deben realizar los métodos habituales de procesamiento celular.

Se pueden usar los portaobjetos ThinPrep® (Hologic™ Inc.) preparados de acuerdo con el protocolo del fabricante en un procesador de portaobjetos del sistema ThinPrep® 2000, (Hologic™ Inc.) o portaobjetos del sistema BD SurePath™ (BD Diagnostics) preparados de acuerdo con el protocolo del fabricante, así como portaobjetos preparados manualmente (frotis convencionales).

Notas:

1. Preparación de las muestras ThinPrep®:

Las muestras citológicas que se encuentran en la solución PreservCyt Solution (PC) destinadas a la tinción inmunocitoquímica con CINtec® PLUS se pueden conservar a una temperatura de entre 15 – 30°C durante seis semanas y hasta 12 semanas más si se refrigeran a temperaturas de entre 2 – 8°C.

Los portaobjetos secos se pueden almacenar a temperatura ambiente protegidas de la luz y se deben teñir con el kit CINtec PLUS® en un plazo máximo de siete días desde el momento de la preparación.

Por favor tenga en cuenta que no se recomienda el empleo del procesador ThinPrep® 3000, ya que el procedimiento de fijación con espray realizado con este instrumento podría generar la pérdida masiva de células.

## 2. Preparación de las muestras BD SurePath™:

Las muestras citológicas que se encuentran en la solución conservante SurePath™ Preservative Fluid destinadas a la tinción inmunocitoquímica con CINtec® PLUS se pueden conservar a una temperatura de entre 15 – 30°C durante cuatro semanas o hasta seis meses si se refrigeran a temperaturas de entre 2 – 8°C.

Los portaobjetos secos se pueden almacenar a temperatura ambiente protegidas de la luz y se deben teñir con el kit CINtec PLUS® en un plazo máximo de siete días desde el momento de la preparación.

Se ha comunicado ocasionalmente que el almacenamiento del material celular posterior al procedimiento de enriquecimiento en agua, puede tener un efecto negativo sobre la señal inmunocitoquímica; recomendamos que durante la preparación de los portaobjetos para la prueba con CINtec® PLUS respete siempre las instrucciones expuestas a continuación para evitar cualquier riesgo de pérdida de señal:

- a. Preparación de los portaobjetos **directamente** después del procesamiento de los portaobjetos con papanicolaou
  - i. En cuanto se haya realizado la tinción papanicolaou del respectivo portaobjetos SurePath™, se podrá preparar un segundo portaobjetos para cada caso.
  - ii. Coloque un segundo set de portaobjetos etiquetados en los soportes para portaobjetos.
  - iii. Si emplea el PrepStain™ con versión GYN 1.1 ó 1.2 para la preparación de portaobjetos, seleccione el programa "Sólo transferencia" ("Transfer only").
- b. Preparación posterior **de portaobjetos con pellets celulares enriquecidos** tras la preparación de portaobjetos Pap
  - i. Retire los soportes con los tubos del sistema PrepStain™ y añada aproximadamente 2 mL de líquido conservante SurePath™ a cada tubo.
  - ii. Tape los tubos y los podrá almacenar a temperatura ambiente durante 4 semanas o refrigerados (2 – 8°C) hasta 6 meses.
  - iii. Si va a preparar un portaobjetos para CINtec® PLUS con una muestra almacenada, esta deberá atemperarse previamente durante 1 hora a temperatura ambiente. Comience con el segundo paso de centrifugado del proceso de enriquecimiento GYN y realice el resto de los pasos del procedimiento de preparación.
- c. Preparación de portaobjetos **con el material de muestra restante** que permaneció en el vial de muestra original (aproximadamente 2 mL)
  - i. Añada 8 mL de líquido conservante SurePath™ al material restante en el vial SurePath™ (aprox. 2 mL)

- ii. La muestra diluida se debe procesar con el PrepMate™ usando las técnicas convencionales y en el PrepStain™ usando la versión GYN 1.1 ó 1.2 para la preparación de portaobjetos con el programa "Sólo transferencia" ("Transfer only")

Inmediatamente después de la preparación, los portaobjetos ThinPrep® o BD SurePath™ deben fijarse en etanol al 99% durante 10 minutos hasta 1 hora y dejar secar durante 20 minutos hasta 16 horas (durante la noche). **Las preparaciones citológicas ThinPrep® o BD SurePath™ no deben ser fijadas con reactivo de fijación pulverizable para muestras citológicas (spray) que contenga polietilenglicol (p. ej., Merckofix®, Merck).**

Los frotis convencionales deben fijarse con reactivo de fijación pulverizable (spray) para muestras citológicas que contenga polietilenglicol (p. ej., Merckofix®, Merck) inmediatamente después de la recogida de las muestras. Los portaobjetos con frotis convencionales con fijación pulverizable (spray) se pueden almacenar a temperatura ambiente protegidas de la luz y se deben teñir con CINtec PLUS® en un plazo máximo de siete días desde el momento de la preparación.

Antes de comenzar con el procesamiento de inmunotinción, se deberán rehidratar todas las muestras siguiendo el protocolo específico expuesto en el apartado 2.1.

**NOTA: Se precisa etanol con un nivel de impurezas mínimo para la fijación de los portaobjetos citológicos en base líquida ThinPrep® para evitar la tinción de fondo. Durante la preparación de los portaobjetos ThinPrep® que se pretenden utilizar para la inmunotinción, se deberá renovar el baño de etanol después de la fijación de 25 portaobjetos ThinPrep®.**

### **Tratamiento de recuperación del epítipo inducido por calor antes de la tinción de las muestras**

Para obtener un rendimiento óptimo, es necesario utilizar un método específico de recuperación por calor del epítipo (HIER) con la solución de recuperación del epítipo suministrada en el kit. Si no se cumple el procedimiento descrito, los resultados pueden verse afectados.

El método de recuperación por calor del epítipo supone el calentamiento de las muestras citológicas sumergidas en la solución de recuperación del epítipo en un baño calibrado capaz de mantener la temperatura necesaria (95 – 99 °C). Los laboratorios situados a alturas elevadas deberían determinar el método adecuado para mantener la temperatura apropiada del baño. El fabricante no recomienda alterar el procedimiento indicado.

Después de la recuperación por calor del epítipo, las muestras citológicas se deben mantener a temperatura ambiente durante 20 minutos o más hasta que la temperatura haya bajado y alcanzado los 50°C o menos antes de proseguir. A continuación, se debe realizar inmediatamente la tinción de las muestras citológicas.

## **Procedimiento de tinción de portaobjetos**

El kit incluye la cantidad de reactivos suficiente para realizar 50 pruebas. El número de las pruebas se basa en el uso de 200 µL de los reactivos por cada portaobjetos.

Se recomienda emplear 200 µL para procesar preparaciones citológicas de Thin-Prep® o BD SurePath™ con el instrumento Dako o LabVision Autostainer (2 zonas de goteo por porta con 100 µL cada una) o si se utiliza el sistema Shandon Coverplate™ (Thermo Fisher Scientific Inc.).

También se recomienda emplear 200 µL por portaobjetos si se preparan frotis convencionales utilizando el sistema Shandon Coverplate™. Sin embargo, para asegurar la cobertura completa de frotis convencionales en Dako o los instrumentos LabVision Autostainer se recomienda utilizar 300 µL por portaobjetos (100 µL para las tres zonas de goteo accesibles).

### **1. Preparación de los reactivos**

Antes de realizar la tinción, se deben preparar los siguientes reactivos, a excepción de la Solución Fast Red. Todos los reactivos se deben equilibrar a una temperatura ambiente (20 – 25°C) antes de la inmunotinción.

#### **1.1 Solución de recuperación del epítipo**

Prepare la cantidad suficiente de solución de recuperación del epítipo para el procedimiento de tinción previsto mediante la dilución 1:10 de una cantidad del Vial 9 (solución de recuperación del epítipo 10X) con agua destilada o desionizada.

Después de realizar la dilución, la solución de recuperación del epítipo puede almacenarse a 2 – 8°C durante un mes. Deseche la solución diluida si está turbia.

NOTA: El uso de agua con un nivel elevado de iones para la disolución de la solución de recuperación del epítipo puede reducir significativamente la intensidad de la tinción de la prueba. Por favor, cerciórese de que el agua empleada esté debidamente destilada o desionizada (es decir, asegúrese de que la columna de intercambio iónico que emplea para la elaboración de agua desionizada haya sido controlada durante el proceso de mantenimiento habitual). **¡No use agua corriente!**

#### **1.2 Tampón de lavado**

Utilice el tampón de lavado (**CINtec Wash Buffer 10X**), referencia 10215364001, suministrado por Roche conjuntamente con el CINtec® PLUS Kit. Para pedidos por favor visite la web [www.roche.com](http://www.roche.com).

Prepare una cantidad de tampón de lavado suficiente para completar los pasos de lavado del procedimiento de tinción previsto, mediante la dilución 1:10 de tampón de lavado (10X) con agua destilada o desionizada.

Después de realizar la dilución, el tampón de lavado puede almacenarse a 2 – 8°C hasta un mes. Deseche la solución diluida si está turbia.

#### **1.3 Soluciones sustrato-cromógeno (DAB y Fast Red)**

Asegúrese que tanto los Cromógenos como los Sustratos están equilibrados a temperatura ambiente (20 – 25°C). La adición de un exceso de Cromógeno al Sustrato producirá un deterioro de la señal positiva.

##### **A) Preparación de la Solución de trabajo DAB antes de comenzar el proceso de tinción**

La Solución de trabajo DAB es estable durante 8 horas tras su preparación.

Prepare la Solución de trabajo DAB de la siguiente forma:

- i) Transfiera 1 mL de la Solución Substrato DAB (Vial 5) en un tubo de ensayo limpio;
- ii) Añada una gota (25 – 30 µL) de Cromógeno DAB y mezcle suavemente invirtiendo el tubo (no agitar con vortex);
- iii) Si emplea el Autostainer, transfiera la Solución de trabajo DAB a los Viales de Reactivos (Autostainer Reagent Vials) antes de comenzar el procesamiento en el sistema, colocándolo en la posición adecuada del rack de reactivos Autostainer.

#### **B) Preparación de la Solución de trabajo Fast Red justo antes de ser usada**

Prepare la solución de trabajo Fast Red directamente justo antes de ser utilizada, ya que de otra manera decrecerá la intensidad de la tinción y por lo tanto puede producirse una pérdida de sensibilidad. No agite con vortex la solución de trabajo Fast Red, porque puede dar lugar a la formación de precipitados.

Prepare la Solución de trabajo Fast Red de la siguiente forma:

- i) Transfiera 1 mL de la Solución Substrato Naftol Fosfato (Vial 7) en un tubo de ensayo limpio;
- ii) Añada una gota (40 – 45 µL) de Cromógeno Fast red (Vial 8) y mezcle suavemente invirtiendo el tubo (no agitar con vortex);
- iii) Si emplea el Autostainer, coloque la Solución de trabajo Fast Red cuando lo solicite el Autostainer. En ese momento, transfiera la Solución Fast Red a los Viales de Reactivos (Autostainer Reagent Vials) y colóquelo en la posición adecuada del rack de reactivos Autostainer. Evite retrasos en el paso de colocación del sustrato (“substrate batch”) durante el procesamiento del Autostainer para minimizar el riego de artefactos por sequedad.

### **1.4 Contratinción**

Los productos finales coloreados de la reacción de tinción de DAB y Fast Red son insolubles en agua (DAB: marrón; Fast Red: rojo)

**NOTA: Para la contratinción es imprescindible usar hematoxilina sin alcohol** ya que el alcohol podría tener un impacto negativo sobre la intensidad de la señal generada por Fast Red o incluso impedirla por completo. Realice la contratinción de acuerdo con las instrucciones de uso de la hematoxilina suministradas por el proveedor.

### **1.5 Medios de montaje**

Para el montaje de portaobjetos de muestras después de la tinción, deberá seguir el siguiente procedimiento de dos pasos.

Aplique primero, manualmente, una fina capa de CINtec® PLUS Mount (Vial 10), un medio de montaje permanente con una base acuosa, y deje que se seque (“cubreobjetos líquido”). En un segundo paso se aplicará un cubreobjetos de cristal sobre la superficie seca del medio de montaje acuoso, empleando un medio de montaje con xileno.

Se debe equilibrar el CINtec® PLUS Mount a temperatura ambiente antes de usarlo, y además, deberá almacenarse a temperatura ambiente para posteriores usos.

## 2. Procedimiento de tinción

Se ha adaptado el CINtec® PLUS Kit tanto para su uso con los instrumentos Autostainer (p. ej., Lab Vision Autostainer 480 o Dako Autostainer PLUS) de acuerdo con la plantilla abajo descrita (véase sección 2.3.1) como con el sistema Shandon Coverplate™ (véase sección 2.3.2). Se pueden utilizar otros sistemas o instrumentos con funciones equivalentes una vez que el usuario los haya validado adecuadamente.

Antes de la tinción, deberán prepararse las muestras y los reactivos de la forma descrita en las secciones 1.1 – 1.3 y 2.1

**Todos los reactivos se deben equilibrar a temperatura ambiente (20 – 25°C) antes de realizar el procedimiento de inmunotinción.**

Asimismo, todos los pasos se deben llevar a cabo a temperatura ambiente. Evite que las muestras se sequen durante el procedimiento de tinción. Las muestras secas pueden causar un aumento de la tinción inespecífica. Si se utilizan tiempos de incubación prolongados, coloque las muestras en un entorno húmedo.

### 2.1 Rehidratación de las muestras

Para todas las muestras citológicas es necesario realizar un paso de rehidratación antes de llevar a cabo el procedimiento de tinción. Este paso se debe llevar a cabo a temperatura ambiente (20 – 25°C).

#### A) ThinPrep® portaobjetos citológicos en base líquida y frotis convencionales:

- Coloque los portaobjetos en agua destilada o desionizada e incúbelos durante 10 (±3) minutos;
- Comience el procedimiento de tinción como se indica en la sección 2.2, Paso 1: Recuperación del epítipo.

#### B) BD SurePath™ portaobjetos citológicos

Para los portaobjetos citológicos BD SurePath™ fijados con alcohol debe realizarse un procedimiento de rehidratación especial con el objetivo de hacer compatibles los portaobjetos de cristal con recubrimiento especial, con el cubreobjetos en medio líquido:

- Cerciórese de que los portaobjetos se han secado completamente al aire;
- Posicione los portaobjetos en un baño fresco de xileno 100% (use contenedores resistentes al xileno); sumerja los portaobjetos un par de veces e incúbelos durante 2 minutos;
- Transfiera los portaobjetos a un baño fresco de etanol al 99% e incúbelos durante 2 minutos;
- Transfiera los portaobjetos a un baño fresco de etanol al 70% e incúbelos durante 2 minutos;
- Coloque los portaobjetos en agua destilada o desionizada e incúbelos durante 2 minutos

**Nota:** Renueve los baños utilizados para la rehidratación después de haber procesado 50 portaobjetos o una vez a la semana si se procesa un menor número de muestras.

## 2.2 Recuperación del epítipo

### A) ThinPrep® portaobjetos citológicos en base líquida y frotis convencionales:

- Llene los contenedores de tinción resistentes al calor (plástico) con la solución de recuperación del epítipo diluida (véase Procedimiento, sección 1.1);
- Coloque los contenedores de tinción con la Solución de Recuperación del Epítipo en un Baño y caliente el baño y la solución de recuperación del epítipo a 95 – 99°C. Se debe controlar la temperatura dentro de los recipientes de tinción. Es muy importante ajustar el nivel de agua en el baño para asegurar que los recipientes se encuentre sumergidos al 80% en el agua. Tape los recipientes para estabilizar la temperatura y evitar la evaporación;
- Cuando la temperatura alcance los 95 – 99°C sumerja las muestras citológicas rehidratadas en la solución de recuperación del epítipo precalentada en los contenedores de tinción; por lo general, este paso reduce la temperatura dentro de los contenedores a menos de 90°C. Mantenga la sonda del termómetro dentro de los contenedores cerrando la tapa de los contenedores de tinción lo mejor que pueda;
- Lleve la temperatura del baño y de la solución de recuperación del epítipo nuevamente hasta 95 – 99°C.; controle la temperatura de la solución de recuperación del epítipo en los recipientes;
- Incube durante 10 ( $\pm 1$ ) minutos a 95 – 99°C; no comience la cuenta atrás hasta que no haya verificado que la temperatura de la solución de recuperación del epítipo dentro de los recipientes haya vuelto a alcanzar una temperatura de 95 – 99°C;
- Retire el contenedor con los portaobjetos del baño;
- Retire la tapa de los contenedores de tinción y deje que los portaobjetos se enfríen en la solución de recuperación del epítipo durante 20 ( $\pm 1$ ) minutos a temperatura ambiente hasta alcanzar una temperatura de 50°C o menor;
- Transfiera los portaobjetos a un recipiente de tinción lleno de tampón de lavado (véase Procedimiento, Sección 1.2) e incúbalos durante 5 ( $\pm 1$ ) minutos antes de introducir los portaobjetos en el Autostainer programado. Si usa el sistema Shandon Coverplate™, reúna los portaobjetos y coverplates siguiendo el protocolo REF 2010-953-009ES (disponible en Roche mtm laboratories AG).

### B) BD SurePath™ portaobjetos citológicos

- Llene los contenedores de tinción resistentes al calor (plástico) con la solución de recuperación del epítipo diluida (véase Procedimiento, sección 1.1). Por favor, tenga en cuenta que cuando se usen contenedores que no están fabricados en plástico resistente al calor, por ejemplo de metal o cristal resistente al calor, el tiempo de recuperación antigénica debe ser modificado de forma individual;
- Sumerja las muestras citológicas en la Solución de Recuperación del Epítipo fría. Cierre la tapa del recipiente de tinción;
- Coloque los contenedores de tinción con la Solución de Recuperación del Epítipo en un Baño frío y caliente el baño y la solución de recuperación del epítipo a 95 – 99°C, e incube durante 15 minutos una vez que se haya al-

canzado dicha temperatura; por favor, tenga en cuenta que el tiempo necesario para calentar la solución a 95 – 99°C no debería ser superior a 40 minutos como máximo;

- Retire el contenedor con los portaobjetos del baño;
- Retire la tapa de los contenedores de tinción y deje que los portaobjetos se enfríen en la solución de recuperación del epítipo durante 20 (±1) minutos a temperatura ambiente hasta alcanzar una temperatura de 50°C o menor;
- Transfiera los portaobjetos a un contenedor de tinción lleno de tampón de lavado (véase Procedimiento, Sección 1.2) e incúbalos durante 5 (±1) minutos antes de introducir los portaobjetos en el Autostainer programado. Si usa el sistema Shandon Coverplate™, reúna los portaobjetos y coverplates siguiendo el protocolo REF 2010-953-009ES (disponible en Roche mtm laboratories AG).

**NOTA:** La solución de recuperación del epítipo está diseñada exclusivamente para un único uso. No la reutilice.

## 2.3 Protocolos de tinción

### 2.3.1 Protocolo de tinción para Autostainer Instruments (Dako, LabVision)

Antes de la primera utilización del CIntec® PLUS Kit en el Autostainer, debe crearse una nueva plantilla e incluir los reactivos del CIntec® PLUS Kit en la "Lista de reactivos" del Autostainer. Consulte el Manual del usuario del Equipo Autostainer correspondiente.

Se recomienda el uso de 200 µL por portaobjetos si se procesan preparaciones citológicas ThinPrep® o BD SurePath™. Si se emplean frotis convencionales con Dako o LabVision Autostainer puede ser necesario emplear 300 µL de los reactivos por portaobjetos.

A continuación se adjunta el resumen de la programación:

| Paso del programa | Preparaciones citológicas ThinPrep® y frotis convencionales  | Preparaciones citológicas BD Surepath™   |
|-------------------|--|--|
| 1                 | rinse* (Lavado)  | rinse* (Lavado)  |
| 2                 | Peroxidase-Blocking Reagent<br>(Reactivo de bloqueo de la peroxidasa)<br>5 minutos                 | Peroxidase-Blocking Reagent<br>(Reactivo de bloqueo de la peroxidasa)<br>5 minutos                 |
| 3                 | rinse* (Lavado)  | rinse* (Lavado)  |
| 4                 | Primary Antibodies Solution p16/Ki-67<br>(Solución de Anticuerpo Primario p16/Ki-67)<br>30 minutos | Primary Antibodies Solution p16/Ki-67<br>(Solución de Anticuerpo Primario p16/Ki-67)<br>30 minutos |
| 5                 | rinse* (Lavado)  | rinse* (Lavado)  |
| 6                 | Visualization Reagent HRP<br>(Reactivo de visualización HRP)<br>15 minutos                         | Visualization Reagent HRP<br>(Reactivo de visualización HRP)<br>15 minutos                         |
| 7                 | rinse* (Lavado)  | rinse* (Lavado)  |

| Paso del programa | Preparaciones citológicas Thin-Prep® y frotis convencionales                              | Preparaciones citológicas BD Surepath™  |
|-------------------|---|---|
| 8                 | rinse* (Lavado)   | rinse* (Lavado)   |
| 9                 | rinse* (Lavado)   | rinse* (Lavado)   |
| 10                | Visualization Reagent AP<br>(Reactivo de visualización AP)<br>15 minutos                  | Visualization Reagent AP<br>(Reactivo de visualización AP)<br>15 minutos  |
| 11                | rinse* (Lavado)   | rinse* (Lavado)   |
| 12                | rinse* (Lavado)   | rinse* (Lavado)   |
| 13                | rinse* (Lavado)   | rinse* (Lavado)   |
| 14                | Switch (cambio)   | Switch (cambio)   |
| 15                | “Substrate” step: DAB<br>(Paso “Sustrato”: DAB)<br>10 minutos                             | “Substrate” step: DAB<br>(Paso “Sustrato”: DAB)<br>10 minutos   |
| 16                | rinse (con agua destilada o desionizada)  | Rinse (con agua destilada o desionizada)  |
| 17                | rinse* (Lavado)   | rinse* (Lavado)   |
| 18                | “Substrate-batch” step: Fast Red<br>(Paso “petición de sustrato”: Fast Red)<br>15 minutos | “Substrate-batch” step: Fast Red<br>(Paso “petición de sustrato”: Fast Red)<br>15 minutos   |
| 19                | rinse* (Lavado)   | rinse* (Lavado)   |
| 20                | ---   | <b>Autostainer LabVision:</b><br>“Substrate-batch” step: Fast Red<br>(Paso “petición de sustrato”: Fast Red)<br>15 minutos<br><b>Autostainer Dako:</b><br>“Substrate” step: Fast Red<br>(Paso “Sustrato”: Fast red)<br>15 minutos |
| 21                | ----  | rinse* (Lavado)   |
| 22                | rinse (con agua destilada o desionizada)  | rinse (con agua destilada o desionizada)  |
| 23                | switch (Cambio)   | switch (Cambio)   |

\* utilice el tampón de lavado para los pasos de lavado (rinse)

**NOTA:** Si el equipo Autostainer utilizado para el procedimiento de tinción lava los portaobjetos con tampón, los portaobjetos deben aclararse con agua destilada o desionizada después de retirarlos del Autostainer.

Después de la programación proceder de la siguiente forma:

- Transfiera los reactivos de los frascos del kit a los Autostainer Reagent Vials graduados. Utilice el mapa generado por el Autostainer para los tiempos de programación y los volúmenes de reactivo;
- Coloque los Autostainer Reagent Vials en el rack de reactivos Autostainer de acuerdo con el Plantilla de Reactivos (Reagent Layout Map);

- Cargue los portaobjetos en el Autostainer de acuerdo con la Plantilla de reactivos (Slide Layout Map) y lave los portaobjetos con tampón de lavado para prevenir que las muestras se sequen.

### 2.3.2 Protocolo de tinción para el sistema Shandon Coverplate™

Ensamble los portaobjetos uno por uno con los coverplates siguiendo el protocolo REF 2010-953-009EN (disponible por Roche mtm laboratories AG) y colóquelos en posición vertical en los racks para portaobjetos.

Controle el montaje correcto del sistema Shandon Coverplate™ llenando el depósito de reactivos con agua destilada o desionizada (2 mL) e incúbelo durante 5 minutos para permitir que el agua recorra todo el espacio. El sistema ensamblado portaobjetos-coverplate es a prueba de fugas cuando el agua recorre lentamente el espacio formado entre el portaobjetos y el coverplate.

1. Equilibrado: Llene el depósito de reactivo con tampón de lavado (2 mL) e incúbelo durante 5 minutos para permitir que el tampón de lavado recorra todo el espacio.

**Repita este paso otra vez;**

2. Aplique 200 µL de reactivo de bloqueo de la peroxidasa. Incube durante 5 minutos;
3. Llene el depósito de reactivo con tampón de lavado (2 mL) e incúbelo durante 5 minutos para permitir que el tampón de lavado recorra todo el espacio;
4. Aplique 200 µL de solución de anticuerpos primarios p16/Ki-67 (p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67). Incube durante 30 minutos;
5. Llene el depósito de reactivo con tampón de lavado (2 mL) e incúbelo durante 5 minutos para permitir que el tampón de lavado recorra todo el espacio;
6. Aplique 200 µL de reactivo de visualización HRP. Incube durante 15 minutos;
7. Llene el depósito de reactivo con tampón de lavado (2 mL) e incúbelo durante 5 minutos para permitir que el tampón de lavado recorra todo el espacio;

**Repita este paso dos veces;**

8. Aplique 200 µL de reactivo de visualización AP. Incube durante 15 minutos;
9. Llene el depósito de reactivo con tampón de lavado (2 mL) e incúbelo durante 5 minutos para permitir que el tampón de lavado recorra todo el espacio;

**Repita este paso dos veces;**

10. Aplique 200 µL de solución de tratamiento de sustrato cromógeno **DAB** preparada siguiendo el procedimiento descrito más arriba en el apartado 1.3. Incube durante 10 minutos;
11. Llene el depósito de reactivo con agua destilada o desionizada (2 mL) e incúbelo durante 5 minutos para permitir que el agua recorra todo el espacio;
12. Llene el depósito de reactivo con tampón de lavado (2 mL) e incúbelo durante 5 minutos para permitir que el tampón de lavado recorra todo el espacio;
13. Aplique 200 µL de la solución de sustrato cromógeno **Fast Red** preparada siguiendo el procedimiento descrito más arriba bajo el apartado 1.3. Incube durante 15 minutos;

Nota: Si emplea portaobjetos BD SurePath™ deberá repetir otra vez más este paso.

14. Llene el depósito de reactivo con agua destilada o desionizada (2 mL) e incúbelo durante 5 minutos para permitir que el agua recorra todo el espacio;

**Repita este paso otra vez.**

Para volver a recuperar los portaobjetos saque el portaobjetos/coverplate ensamblados con cuidado del rack de portaobjetos empleando el pulgar y el índice en la parte posterior y tire suavemente para sacar el portaobjetos del coverplate. Idealmente este proceso se haría sumergiéndolo en agua.

Coloque los portaobjetos en agua destilada o desionizada y continúe con la contratinción.

## **2.4. Contratinción con hemaxotilina**

- Sumerja los portaobjetos en un baño de **hematoxilina sin alcohol**. Incúbelos durante 2 – 10 minutos dependiendo de la potencia de la hematoxilina sin alcohol empleada.

**NOTA:** Es absolutamente obligatorio emplear hematoxilina sin alcohol.

- Para el viraje a azul, coloque los portaobjetos en un baño de agua corriente o una solución alcalina como por ejemplo una solución amoniaca débil (NH<sub>4</sub>OH, 0,08% en agua desionizada) e incubar de 30 segundos a 2 minutos;
- Para asegurar que toda la hematoxilina residual ha sido eliminada, a continuación reemplace el agua corriente del contenedor varias veces (3 – 5 veces) con agua corriente nueva hasta que no se puedan observar más residuos de tinción;
- Incube ligeramente los portaobjetos en un baño de agua destilada o desionizada.

**NOTA:** Dependiendo del tiempo de incubación y de la potencia de la hematoxilina utilizada, la contratinción puede causar una coloración de color azul pálido a oscuro en los núcleos celulares. Una contratinción excesiva o incompleta puede influir negativamente en la interpretación adecuada de los resultados.

## 2.5 Montaje

Para mantener un nivel óptimo de sensibilidad y evitar que se destiña el cromógeno Fast Red se tiene que realizar un procedimiento de montaje de dos pasos.

Después de la contratinción y el viraje a azul los portaobjetos deben ser montados utilizando un protocolo de montaje en dos pasos. Los pasos A y B deben realizarse de forma secuencial.

### A) Cubreobjetos líquido

- Incubar los portaobjetos en agua destilada o desionizada durante al menos 1 minuto;
- Retirar los portaobjetos del agua destilada o desionizada sin realizar un secado posterior;
- Elimine el exceso de líquido sin permitir que las muestras se sequen; seque la parte inferior de los portaobjetos con cuidado con una toallita de papel para eliminar el agua;
- Aplique 4 gotas de CINtec® PLUS Mount (1 gota equivale a 35 – 40 µL de este medio de montaje acuoso) por portaobjetos de citología líquida (LBC) y 8 gotas por frotis convencional, respectivamente. Evite la formación de burbujas de aire. Para evitar la formación de pequeñas burbujas se puede desechar la primera gota del medio de montaje sobre una toallita de papel antes de aplicar CINtec® PLUS Mount sobre las muestras;
- Incline y mueva levemente el portaobjetos de cristal para crear una capa fina de medio de montaje y cubrir plenamente la muestra (¡NO aplique todavía un cubreobjetos de cristal o film!); Revise la distribución del medio de montaje líquido sobre el portaobjetos mediante una inspección visual.
- Para el secado, coloque los portaobjetos en posición horizontal:
  - a. Incube las muestras ThinPrep® o BD SurePath™ a una temperatura de 37 – 60°C durante 1 hora, o como alternativa puede dejarlos a temperatura ambiente durante toda la noche
  - b. Incube los frotis convencionales a una temperatura de 37°C durante 4 horas o a 60°C durante 1 hora, o como alternativa puede dejarlos a temperatura ambiente durante toda la noche

### B) Cubreobjetos de cristal o film

- Después del secado completo de la solución de montaje acuosa, incubar los portaobjetos en xileno durante como mínimo 1 minuto y máximo 20 minutos. Posteriormente, cubrir los portaobjetos con un medio de montaje con una base de xileno;

NOTA: Los portaobjetos no se deben deshidratar con series ascendentes de alcohol antes de cubrirse con cristal o lámina.

- El medio de montaje con base de xileno deberá secar a temperatura ambiente.

**NOTA:** Para minimizar la pérdida de intensidad, proteja los portaobjetos de la luz y almacénelos en un lugar a temperatura ambiente (20 – 25°C).

## VII. Control de calidad

Las desviaciones en los procedimientos recomendados para la fijación y el posterior procesamiento de las muestras citológicas de cuello uterino pueden causar variaciones notables en los resultados, por lo que es necesario que se realicen regularmente controles internos.

### Control positivo

Se deberían usar como controles positivos muestras procesadas de la misma forma que las muestras de pacientes. Los controles positivos indican si las muestras se han preparado correctamente y las técnicas de tinción son adecuadas. En cada sesión de tinción deberá incluirse un control positivo.

Los controles positivos sólo deben utilizarse para la monitorización del rendimiento adecuado del procesamiento de las muestras y los reactivos del ensayo, no como ayuda para realizar un diagnóstico específico de las muestras de pacientes. Si los controles positivos no muestran una tinción positiva adecuada, los resultados de las muestras deberán considerarse como inválidos.

### Control negativo

Analice un control negativo procesado de la misma forma que las muestras de pacientes con cada sesión de tinción para verificar la especificidad del procedimiento de tinción y para proporcionar una indicación de la tinción de fondo. Una variedad de los diferentes tipos de células presentes en la mayor parte de las muestras citológicas cervicales de las que se sabe que son negativas para la expresión de los antígenos p16<sup>INK4a</sup> y Ki-67 (como p. ej. células superficiales) pueden proporcionar puntos de control interno negativo necesarios para evaluar la tinción de fondo (el usuario deberá verificarlo).

### Verificación del ensayo

Antes del uso inicial de un anticuerpo o de un sistema de tinción en un procedimiento diagnóstico, el usuario deberá verificar la especificidad del anticuerpo analizándolo en una serie de muestras internas con características conocidas de rendimiento inmunocitoquímico, tanto muestras positivas como negativas. Consulte los procedimientos de control de calidad indicados previamente en esta sección de las instrucciones de uso y los requisitos de control de calidad del programa de certificación CAP para inmunohistoquímica y/o la directriz CLSI (NCCLS) de control de calidad para inmunohistoquímica, guías aprobadas.

## VIII. Interpretación de los resultados

El procedimiento del CINtec® PLUS Kit genera dos productos de reacción de distinto color: uno marrón que se precipita en el lugar donde hay antígeno p16<sup>INK4a</sup> y uno rojo que se precipita en el lugar donde hay antígeno Ki-67. La tinción de células con color marrón (citoplasma y/o núcleo) indica la sobreexpresión de la p16<sup>INK4a</sup>. La tinción de células con color rojo (núcleo) indica la expresión de Ki-67. Las células con ambas tinciones mostrarán una tinción marrón citoplasmática con un núcleo típicamente de color rojo intenso. Antes de interpretar los resultados, un patólogo/citotécnico cualificado con experiencia en procedimientos inmunocitoquímicos y formado en la in-

interpretación de los portaobjetos de tinción de CINtec® *PLUS* debe evaluar los controles positivos y negativos. La interpretación de los resultados debe realizarla un profesional certificado dentro del contexto de la historia clínica del paciente y de otras pruebas diagnósticas.

La interpretación de las muestras citológicas cervicales con tinción de CINtec® *PLUS* Kit, se deberá realizar evaluando la presencia de las células cervicales epiteliales que muestran ambas tinciones, la tinción marrón citoplasmática y la tinción roja del núcleo, que son indicativos de una expresión simultánea de p16 y Ki-67.

La presencia de una o más células cervicales epiteliales con la presencia de ambas tinciones, la inmunotinción marrón citoplasmática y la inmunotinción roja del núcleo dentro de la misma célula, se interpreta como un resultado positivo del test CINtec® *PLUS*.

Si no se detectan células cervicales epiteliales con la presencia de ambas, la inmunotinción marrón citoplasmática y la inmunotinción roja del núcleo, se interpreta con un resultado negativo del test CINtec® *PLUS*.

Por favor tenga en cuenta que la presencia de células cervicales epiteliales que muestren inmunoreactividad a tan sólo uno de los dos marcadores (como por ejemplo sólo la tinción marrón por p16 o sólo la tinción roja por Ki-67) no se considerarán un resultado positivo del test CINtec® *PLUS*; incluso si ambos tipos de células cervicales que muestran una inmunoreactividad se encuentran en la misma muestra citológica.

Si se detectaran células con indicación de discariosis severa que no presenten la tinción de ambos marcadores, p16 y Ki-67, los criterios morfológicos de interpretación no se deben ignorar.

## IX. Limitaciones

- Sólo para uso profesional. Para llevar a cabo los procedimientos de inmunocitoquímica se requiere contar con una formación especializada.
- La interpretación clínica de una tinción positiva o negativa se debe evaluar dentro del contexto de una presentación clínica y otros criterios citológicos. Toda interpretación clínica de una tinción positiva o negativa se debe complementar con estudios morfológicos mediante el uso de controles positivos y negativos adecuados, así como otras pruebas diagnósticas. Un patólogo/citotécnico cualificado con experiencia en el uso adecuado de anticuerpos, reactivos y métodos debe interpretar todos los pasos utilizados para la preparación y la interpretación de la preparación inmunocitoquímica final.
- La calidad de la tinción de las células influye en gran medida en los resultados de tinción de la inmunocitoquímica. De este modo, el seguimiento apropiado de los pasos de fijación, lavado, secado o calentamiento de los portaobjetos, así como el evitar la contaminación de los reactivos con bacterias contribuyen significativamente al resultado global de la tinción. Las desviaciones del protocolo pueden generar artefactos, la captura de anticuerpos o falsos resultados negativos. Los resultados inconsistentes pueden deberse a variaciones en los métodos de fijación o a una toma de muestra inadecuada.
- Una contratinción excesiva o incompleta puede influir negativamente en la interpretación adecuada de los resultados.

- El fabricante suministra estos anticuerpos/reactivos en una disolución óptima para que se utilicen de acuerdo con las instrucciones proporcionadas, para los ensayos inmunocitoquímicos en portaobjetos de citologías preparadas en base líquida (LBC) o frotis convencionales. Las desviaciones de los procedimientos de ensayo recomendados pueden invalidar los resultados esperados que se describen en este documento; se deben utilizar y documentar los controles apropiados. Los usuarios que se desvíen de los procedimientos de ensayo son responsables de la interpretación de los resultados del paciente de acuerdo con estas circunstancias.
- Los resultados falsos positivos se pueden deber a la unión no inmunitaria de proteínas o los productos de reacción del sustrato. Esto puede derivar también de la actividad pseudoperoxidasa (eritrocitos) y la actividad de la peroxidasa endógena (p. ej., citocromo C).
- La presencia de leucocitos, mucosa o desodorante vaginal en la muestra puede repercutir en la celularidad de la preparación del portaobjetos y, por tanto, dar lugar a efectos negativos en el rendimiento general de CINtec® PLUS.
- Las muestras del cuello de útero pueden presentar niveles visibles y detectables de sangre. Si la cantidad de sangre en la muestra es excesiva, es necesario llevar a cabo un lisado previo a la preparación del portaobjetos con ácido acético glacial (GAA) según el protocolo ThinPrep.
- No sustituya los reactivos del kit por otros reactivos con números de catálogos diferentes o por reactivos de otros fabricantes.

## X. Características del rendimiento

### Rendimiento clínico

El rendimiento clínico del CINtec® PLUS Kit ha sido evaluado en tres estudios clínicos independientes:

- a. El estudio PALMS – Primary ASC-US LSIL Marker Study
- b. El estudio EEMAPS – European Equivocal or Mildly Abnormal Pap Cytology Study
- c. El estudio Wolfsburg – Un subestudio del Wolfsburg Pap/VPH co-testing project

### Descripción de los estudios:

#### **a. PALMS – Primary ASC-US LSIL Marker Study**

El estudio PALMS se diseñó como un estudio de diagnóstico clínico prospectivo, multinacional y multicéntrico. El objetivo principal de este estudio fue mostrar la utilidad del CINtec® PLUS Kit como ayuda para la identificación de mujeres con neoplasia cervical intraepitelial de alto grado (i.e CIN2 o superior, CIN2+) (a) de entre las mujeres que acuden a un cribado rutinario de cáncer cervical, (b) en el subgrupo de pacientes con resultados de citología Pap de ASCUS (células escamosas atípicas de significado indeterminado), o (c) en el subgrupo de pacientes con resultados de citología Pap de LSIL (lesión intraepitelial escamosa de bajo grado).

Los objetivos fundamentales del estudio fueron:

1. Evaluar la sensibilidad y especificidad del CINtec® PLUS Kit en la identificación de neoplasia cervical intraepitelial de alto grado (CIN2+)
  - como prueba de cribado primario de cáncer cervical

- en mujeres con resultados de citología Pap de ASCUS
  - en mujeres con resultados de citología Pap de LSIL.
2. Evaluar la sensibilidad y especificidad del CINtec® PLUS Kit en la identificación de neoplasia cervical intraepitelial de alto grado (CIN2+) en comparación con las pruebas de citología Pap (cribado) y las pruebas del VPH (clasificación de ASCUS y LSIL), cribado.

El estudio se realizó sobre un total de 27.349 mujeres de cinco países europeos (Alemania, Bélgica, Francia, España e Italia) que acudían a realizarse el cribado de cáncer cervical rutinario y pasaron a formar parte del estudio tras haber dado su consentimiento por escrito. Durante el cribado se tomaron dos muestras cervicales de cada una de las participantes.

- La primera muestra cervical se tomó con un dispositivo de toma de muestras tipo cepillo y se empleó para realizar una prueba de citología Pap, bien preparando un frotis sobre un portaobjetos de cristal para el análisis convencional de Pap o transfiriendo el material cervical a un vial en base líquida (ThinPrep® Pap Test, Hologic™, Marlborough, MA; o SurePath™, BD Diagnostics, Burlington, NC) para su posterior preparación para la prueba Pap. Asimismo, se preparó un segundo portaobjetos de todas las muestras, o del material restante en el dispositivo de toma de muestras empleado para la preparación de la citología Pap convencional (técnica de "división de muestras") o del respectivo material del vial de base líquida, que se empleó para realizar la prueba de citología de doble tinción p16/Ki-67.
- La segunda muestra de citología cervical de las participantes se tomó con el dispositivo de recogida de ADN para Pap (Qiagen, Hilden, Alemania), un dispositivo de toma de muestras tipo cepillo, combinado con un medio de recogida, especialmente diseñado para la recogida de muestras para la prueba del VPH. Estas muestras se emplearon, después, para determinar la presencia de infecciones de VPH-AR con la prueba digene HC2 High-Risk HPV DNA Test® (Qiagen).

Las pruebas de Pap se realizaron localmente en un total de 16 laboratorios europeos de citología y se usó el sistema de clasificación Bethesda [35].

Las pruebas con la doble tinción p16/Ki-67 se realizaron de manera centralizada siguiendo los pasos de los protocolos incluidos en las instrucciones de uso del CINtec® PLUS Kit (Roche mtm laboratories AG). Para su interpretación, un grupo independiente, constituido por 8 citotécnicos contratados para la interpretación de las muestras en el transcurso de los estudios técnicos, evaluó la presencia de células cervicales con doble tinción en los portaobjetos. Todas las citologías con resultado positivo a la doble tinción fueron revisadas y los resultados confirmados por los miembros de un grupo de 5 patólogos europeos.

Las pruebas del VPH se realizaron en un total de 6 laboratorios clínicos independientes en Francia, Alemania e Italia.

Todo resultado positivo, es decir un resultado de citología Pap de ASCUS o superior y/o un resultado positivo del test CINtec® PLUS y/o un resultado positivo en la prueba hc2 VPH-AR (en este caso en mujeres a partir de los 30 años) conllevó la realización de una colposcopia. Durante la colposcopia, se tomaron, si estaba clínicamente recomendado, biopsias. Los diagnósticos histológicos se basaron en los cortes de tejido con tinción H&E, fijados en formol e incluidos en parafina. El resultado patológico local de cada caso se comparó con el resultado de un patólogo europeo independiente responsable del control de calidad. Toda discrepancia entre

el resultado local y el resultado de la primera prueba de control de calidad, así como todo diagnóstico CIN2 o de grado superior (CIN2+) dio lugar a una revisión completa de control de calidad realizada por un equipo de patólogos europeos, considerados expertos en la patología ginecológica. Los consensos diagnósticos con una mayoría de dos de tres o los diagnósticos de consenso en los casos en los que no se pudo alcanzar una mayoría se usaron como patrón de referencia para los objetivos del estudio. Los resultados histológicos se confirmaron mediante la evaluación independiente de la tinción inmunohistoquímica con p16 en los cortes preparados de los bloques de tejido y su inmunotinción se realizó con el CINtec® Histology Kit (Roche mtm laboratories AG, REF 9511). Sólo en los casos en los que la tinción de p16 no apoyó el diagnóstico histológico alcanzado usando los portaobjetos teñidos con H&E, se realizó una revisión por parte del panel de control de calidad integrado por 3 patólogos para hacer un diagnóstico definitivo, revisando tanto de los cortes de tejido teñidos con H&E como de los cortes de tejido con tinción p16.

Todos los datos del estudio PALMS se reportaron tras la correspondiente corrección estadística de los errores sistemáticos debidos a algunas diferencias en los procedimientos de seguimiento colposcópico, y por lo tanto, en la determinación de los resultados positivos de las tres pruebas en cuestión, las pruebas de citología, CINtec® PLUS, o VPH.

#### **b. EEMAPS – European Equivocal or Mildly Abnormal Pap Cytology Study**

El estudio EEMAPS se diseñó como un estudio clínico, multinacional y multicéntrico y se usaron preparaciones citológicas cervicales en base líquida recopiladas retrospectivamente (ThinPrep®, Hologic™). El estudio fue diseñado para demostrar la utilidad de la prueba CINtec® PLUS como ayuda para la identificación de mujeres que albergan enfermedades subyacentes del grado CIN2+ en el subgrupo de pacientes con resultados de citología Pap de ASCUS o LSIL, de acuerdo con el sistema de clasificación Bethesda [35] y con material residual disponible en el vial de muestras citológicas en base líquida ThinPrep®. Los casos se han seleccionado teniendo en cuenta la disponibilidad de las muestras de tejido histológico correspondiente que se había obtenido en procesos de seguimiento en un periodo máximo de 6 meses tras las pruebas de citología Pap. Las muestras citológicas de tejido tenían su correspondiente biopsia cervical con pinza, biopsia en cono o muestras de legrado endocervical.

Los objetivos fundamentales del estudio fueron:

1. Evaluar la sensibilidad y especificidad del CINtec® PLUS Kit para identificar las enfermedades CIN2+ en mujeres cuyos resultados de la citología Pap sean ASCUS o LSIL;
2. Evaluar la sensibilidad y especificidad de la detección de lesiones CIN2+ mediante el CINtec® PLUS Kit en comparación con la sensibilidad y especificidad del digene HC2 High-Risk HPV DNA Test® (Qiagen) para mujeres cuyos resultados de citología Pap sean ASCUS o LSIL.

Las pruebas de VPH se realizaron de forma centralizada en un laboratorio clínico cualificado y acreditado de Alemania y según las indicaciones del fabricante.

Para las pruebas con doble tinción de p16/Ki-67 se empleó el material residual disponible en el vial de muestras citológicas en base líquida ThinPrep® para preparar portaobjetos frescos mediante el T2000 ThinPrep® Processor (Hologic™). Los por-

taobjetos fueron inmunoteñidos posteriormente según el protocolo expuesto en las instrucciones de uso del CINtec® *PLUS* Kit.

Todos los portaobjetos fueron evaluados por un citotécnico independiente para estudiar la posible presencia de células cervicales con doble tinción. Todos los casos identificados por el citotécnico que presentaban una o varias células con doble tinción, fueron evaluados y confirmados por un experto en patología antes de determinar el resultado final de la prueba de citología de doble tinción.

El diagnóstico histológico establecido mediante las muestras de tejido cortadas del bloque se usó como patrón de referencia para el estudio (por ejemplo como criterio de precisión diagnóstica) y los resultados de la pruebas con la doble tinción y de la prueba VPH se compararon con él.

Se estableció un consenso diagnóstico para cada caso por parte de dos o más patólogos, miembros del grupo responsable del control de calidad, compuesto por cinco patólogos. Los revisores no conocían el resultado original de la histología realizado localmente por el centro que participaba en el estudio del que se habían recibido las muestras, ni el resto de los resultados de otras pruebas. Los patólogos revisores, miembros del grupo responsable del control de calidad, realizaron una revisión combinada de los portaobjetos con tinción H&E y de los portaobjetos con tinción p16 realizada con el CINtec® Histology Kit (Roche mtm laboratories AG).

Se dispuso de un total de 776 casos para el análisis, 361 casos de ASCUS y 415 casos de LSIL.

### **c. Estudio Wolfsburg – Un subestudio del Wolfsburg Pap/VPH co-testing project**

El objetivo principal del estudio fue evaluar la utilidad clínica del CINtec® *PLUS* Kit como prueba de cribado y como prueba reflejo para resultados Pap negativos y VPH positivos en mujeres a partir de los 30 años. La evaluación de las características de rendimiento del CINtec® *PLUS* Kit en la identificación de mujeres con lesiones cervicales intraepiteliales de alto grado (CIN de alto grado) se realizó en un subestudio incluido en el Wolfsburg Pap/VPH co-testing project.

Los objetivos fundamentales del estudio fueron:

1. Evaluar la sensibilidad y especificidad de la citología utilizando la doble tinción p16/Ki-67 para la detección de CIN de alto grado como prueba de cribado de cáncer cervical;
2. Evaluar la sensibilidad y especificidad de la citología utilizando la doble tinción p16/Ki-67 para la detección de CIN de alto grado como prueba de cribado de cáncer cervical en comparación con la sensibilidad y especificidad de las pruebas de citología Pap en base líquida y la prueba del VPH respectivamente;
3. Evaluar el rendimiento diagnóstico de la citología utilizando la doble tinción p16/Ki-67 en la clasificación de resultados con citología Pap negativa y VPH positivo en pruebas de cribado.

El estudio se diseñó como un estudio diagnóstico multicéntrico y retrospectivo, sobre muestras tomadas que se habían tomado de forma prospectiva. El estudio contó con la participación de mujeres mayores de 30 años que, previamente, habían dado su consentimiento por escrito.

Durante el cribado se tomó la primera muestra de citología cervical, empleando una espátula/cepillo o un dispositivo de toma de muestras tipo cepillo, y ésta se transfirió directamente a un vial de muestras Pap ThinPrep® (Hologic™). A continuación, se tomó la segunda muestra de citología cervical con el dispositivo de recogida de ADN Pap Cervical Sampler™ (Qiagen) y su respectivo vial de muestras para la realización posterior de la prueba del VPH, empleando el High-risk VPH hc2 Test® (Qiagen).

La citología Pap (ThinPrep® Pap test) se realizó de manera centralizada en un laboratorio independiente, inmediatamente después de la primera visita de la paciente. El primer portaobjetos con muestra realizado con material del vial de base líquida se empleó para la prueba Pap. Las pruebas de VPH se realizaron de forma centralizada en un laboratorio clínico en Wolfsburg.

Sólo se recomendó la colposcopia a aquellas mujeres cuyos resultados de citología Pap y de la prueba del VPH coincidan con los requisitos del algoritmo del estudio:

- A las mujeres con resultados positivos tanto en la citología Pap (Pap II, usando la nomenclatura Munich (prácticamente equivalente a ASCUS)), como en la prueba de VPH se las envió inmediatamente a realizar una colposcopia;
- Las mujeres con o un resultado Pap positivo y un resultado de VPH negativo o un resultado Pap negativo y un resultado VPH positivo, sólo se enviaron a colposcopia si, o bien el resultado Pap, o bien el resultado de VPH, continuó siendo positivo de forma persistente tras una o más repeticiones de las pruebas realizadas en un periodo de seguimiento de entre 6-12 meses;
- Las mujeres que mostraron resultados negativos tanto en la citología Pap como en la prueba del VPH no tuvieron que acudir a las pruebas de cribado de cáncer cervical durante un periodo de 5 años.

Las pruebas de citología usando la doble tinción p16/Ki-67 se realizaron de manera retrospectiva tras un periodo de almacenamiento de los viales ThinPrep® de entre 1 y 2 años. La preparación de los portaobjetos y la inmunotinción se realizó de manera centralizada en el laboratorio del patrocinador. Los miembros de un grupo independiente, constituido por 8 citotécnicos contratados para la interpretación de las pruebas en el transcurso de los estudios PALMS y Wolfsburg, interpretaron los resultados evaluando la presencia de células cervicales con doble tinción en los portaobjetos. Todas las citologías que mostraron un resultados positivo a la doble tinción, fueron revisados y los diagnósticos confirmados por un patólogo independiente.

Los diagnósticos histológicos de los materiales de las biopsias sirvieron como patrón de referencia. Todos los resultados locales de histología se comprobaron por los miembros de un grupo independiente responsable del control de calidad compuesto por seis patólogos europeos; los expertos no disponían de información sobre la interpretación inicial del centro clínico o resultados de otras pruebas. El proceso de revisión de calidad se realizó de forma analoga al proceso establecido para las pruebas del estudio PALMS (véase más arriba).

Para realizar un análisis transversal del grupo de cribado en mujeres a partir de los 30 años, se seleccionaron al azar 4.246 casos de entre los posibles 7.946 que durante los años 2007 y 2008 participaban en el estudio Wolfsburg y tenían bastante material celular residual en vial de base líquida. Para evaluar la utilidad de la prueba

CINtec® PLUS en la clasificación de mujeres con resultados negativos en la prueba de citología Pap, pero positivos en la prueba del VPH, se incluyeron todos los casos de entre las 7.976 mujeres que tenían dichos resultados (n=425) en sus pruebas de cribado.

## **Resultados:**

**LAS TABLAS Y LA FIGURA 1 SE ENCUENTRAN EN EL ANEXO 2.**

### **CRIBADO DE CÁNCER CERVICAL: RENDIMIENTO CLÍNICO DE CINtec® PLUS EN EL CRIBADO**

La tabla 1 muestra que las tasas de positividad de CINtec® PLUS son comparables con las tasas de positividad en la citología Pap (ASCUS o superior; ASCUS +) y alcanzan aproximadamente la mitad de los ratios de positividad que las pruebas del VPH-AR, independientemente del grupo de edad.

En la Tabla 2, se presentan las tasas de sensibilidad y especificidad, así como otras características de rendimiento de diagnóstico, como los valores predictivos positivos (PPV) y los valores predictivos negativos (NPV) y los cocientes de verosimilitud diagnóstica positivo (DLR+) y negativo (DLR-) para la prueba CINtec® PLUS en una población seleccionada como confirmada en el ensayo PALMS. La sensibilidad de la prueba CINtec® PLUS para la detección de casos con CIN2+ en todos los grupos de edades alcanza el 90,1%, notablemente superior al nivel de sensibilidad de la citología Pap (66,4%; un aumento del 36%,  $p < 0,0005$ ). La sensibilidad de la prueba VPH para la detección de CIN2+ es del 96,4%. El nivel de especificidad de la prueba CINtec® PLUS (95,3) alcanza el mismo nivel que la prueba de citología Pap (95,4%), mientras que la especificidad de la prueba del VPH fué del 90,2% incluyendo todos los grupos de edad. Las diferencias en las tasas de especificidad de CINtec® PLUS o la citología Pap en comparación con la prueba del VPH son estadísticamente significativas ( $p < 0,0005$ ), con tasas de resultados falsos positivos de más del doble para la prueba del VPH en todos los grupos de edad, tanto en el grupo de <30 como en el de  $\geq 30$  años.

Los resultados de la evaluación de sensibilidad, especificidad, PPV, NPV, DLR+ y DLR- de CINtec® PLUS vs. la citología Pap y la prueba del VPH, respectivamente, determinados en el estudio de Wolfsburg se muestran en la Tabla 3. Los altos niveles de sensibilidad y especificidad de CINtec® PLUS para la detección de CIN de alto grado determinados en el estudio PALMS (véase Tabla 2) se confirmaron, de manera independiente, mediante los resultados del estudio de Wolfsburg realizado en mujeres de a partir de los 30 años.

### **RESULTADOS CITOLÓGICOS DE ASCUS: RENDIMIENTO CLÍNICO DE CINtec® PLUS PARA SELECCIONAR MUJERES PARA COLPOSCOPIA**

La sensibilidad y especificidad de CINtec® PLUS para la detección de casos de CIN 2+ confirmados por las biopsias realizadas durante la colposcopia y para el triaje de casos de citología ASCUS, en mujeres de todas las edades, alcanzaron en el estudio PALMS niveles del 94,6% y del 77,5%, respectivamente (Tabla 4), y en el estudio EEMAPS del 92,2% y del 80,6%, respectivamente (Tabla 5).

La prueba del VPH proporciona niveles de sensibilidad comparables (100% en PALMS y 90,9% en EEMAPS), pero niveles de especificidad considerablemente inferiores (60,7% en PALMS y 36,3% en EEMAPS). Este aumento de especificidad fue aún más notable en los grupos de menor edad (por ejemplo en mujeres menores

de 30 años) como muestra la Tabla 5, aunque la especificidad de CINtec® PLUS también duplicó el nivel alcanzado por la prueba del VPH (85,5% vs. 43,6 %) en los grupos de mayor edad (≥30 años).

Las tasas de positividad de CINtec® PLUS en la categoría de ASCUS en el estudio PALMS son del 25,6% en comparación con el 41,9% de las pruebas del VPH; la prueba CINtec® PLUS ofrece una clasificación más eficaz de los casos de ASCUS, brindando una sensibilidad comparable al HPV para la detección de lesiones subyacentes de alto grado, pero remitiendo a colposcopia un número inferior de mujeres.

### **RESULTADOS CITOLÓGICOS DE LSIL: RENDIMIENTO CLÍNICO DE CINtec® PLUS PARA SELECCIONAR MUJERES PARA COLPOSCOPIA**

Las tasas de positividad de CINtec® PLUS en casos citológicos clasificados como LSIL en los estudios PALMS y EEMAPS, se muestran en la Tabla 6 y Tabla 7 y se comparan con las tasas de positividad de la prueba del VPH. La tasa de positividad para la prueba CINtec® PLUS fue del 52,4% (en PALMS, 52,3% en EEMAPS), una tasa de positividad notablemente inferior a la de la prueba del VPH-AR que fue del 83,9% (en PALMS, 86,2% en EEMAPS) y muestra el potencial de test CINtec® PLUS como herramienta eficaz para la clasificación mujeres con resultados citológicos de LSIL.

La sensibilidad y especificidad de CINtec® PLUS para la detección de casos de CIN 2+ confirmados por biopsias realizadas durante la colposcopia y para el triaje de casos de citología LSIL, en mujeres de todas las edades, alcanzaron en el estudio PALMS niveles del 85,4% y del 53,9% respectivamente (Tabla 6), y en el estudio EEMAPS del 94,2% y del 68,0% respectivamente (Tabla 7).

### **RESULTADO NEGATIVO EN CITOLOGÍA Y POSITIVO EN TEST DE VPH: RENDIMIENTO CLÍNICO DE CINtec® PLUS PARA SELECCIONAR MUJERES PARA COLPOSCOPIA**

La Figura 1 muestra la tasa de positividad de CINtec® PLUS en la clasificación de casos de mujeres con un resultado negativo en la citología de Papanicolaou y positivo en el test de VPH-AR. Aproximadamente la cuarta parte (n= 108; 25,4%) de los casos con citología negativa y VPH positivo mostraron célula(s) cervicales epiteliales con doble tinción de p16 y Ki-67, mientras 317 de 425 casos (74,6%) tuvieron un resultado negativo a la doble tinción de p16 y Ki-67.

En el grupo de casos que eran positivos a CINtec® PLUS, se detectaron más del 90% de las lesiones subyacentes de grado CIN 2 o más, en concreto 34 de los 37 casos de CIN 2+ confirmados por biopsias durante el periodo de seguimiento (se refiere a un periodo de seguimiento de 12,5 meses). La sensibilidad, la especificidad, el PPV, el NPV y los cocientes de verosimilitud diagnóstica positiva y negativa (DLR+ y DLR-) para CINtec® PLUS para la detección de CIN2+ y CIN3+ se muestran en la Tabla 8.

#### **Desempeño analítico:**

##### **Sensibilidad analítica:**

Un grupo de muestras de cada una de las muestras ThinPrep® y SurePath™ clasificadas como negativas para lesión intraepitelial y cáncer (NILM), respectivamente, se dividió inicialmente en 5 alícuotas. El primer grupo de NILM se enriqueció con 100, el segundo con 50, el tercero con 20 y el cuarto con 10 células C4.I por ml,

respectivamente. La alícuota restante del grupo de NILM se usó como control negativo y las existencias de C4.I ThinPrep como control positivo. La dilución con 10 células C4.I doblemente inmunorreactivas por ml reflejaba el «límite de detección».

Tanto para ThinPrep® como SurePath™, se encontró al menos 1 célula en 1 de las 2 muestras con cada lote en dilución con 10 células C4.I doblemente inmunorreactivas por ml y se detectó al menos una célula C4.I doblemente inmunorreactiva en todas las muestras con más de 20 células C4.I por ml.

Por lo tanto, se verificó que el kit CINtec® PLUS es capaz de detectar células doblemente inmunorreactivas que muestran una sobreexpresión de p16<sup>INK4a</sup> y Ki-67 dentro de la misma célula.

### **Especificidad analítica:**

La especificidad del anticuerpo p16<sup>INK4a</sup>, clon E6H4 se ha verificado en el curso de los estudios de verificación que comprenden el análisis de inmunohistoquímica (IHQ), inmunocitoquímica (ICQ) e inmunotransferencia tipo Western. La especificidad del anticuerpo Ki-67 se ha demostrado mediante IHQ e ICQ, así como por análisis de inmunotransferencia tipo Western.

Con el fin de demostrar que las células doblemente inmunorreactivas se detectan mediante este ensayo, se usaron dos grupos ThinPrep® y dos SurePath™ que están formados por material del paciente clasificado principalmente como HSIL como control positivo (tinción realizada con tres lotes diferentes de CINtec® PLUS). Además, se incluyeron como controles preparaciones citológicas ThinPrep® y SurePath™ de células C4.I doblemente inmunorreactivas y células Jurkat negativas para p16/positivas para Ki-67. Para los controles de agrupación HSIL, la colocación de la expresión p16 y Ki-67 se restringió solamente a células displásicas. Para la tinción de una biopsia cervical fijada en formol y embebida en parafina (FFEP) (categorizada como CIN2/3; secciones de tejido histológico de un tejido) se detectaron células proliferativas displásicas (inmunoreactividad simultánea de p16 y Ki-67) dentro de la lesión.

Además, se verificó que las células epiteliales normales de la muestra citológica no eran doblemente inmunorreactivas tanto para p16 como para Ki-67. No se detectaron células doblemente inmunorreactivas para todas las muestras citológicas clasificadas como NILM con ninguno de los tres lotes.

### **Precisión entre lotes y entre análisis:**

El objetivo del estudio entre procesos y entre lotes (realizado dentro del mismo estudio) fue verificar que el kit CINtec® PLUS proporciona resultados de tinción comparables dentro del intervalo aceptable. El estudio se realizó mediante una tinción de preparaciones de citología de base líquida (CBL) ThinPrep® y Sure-Path™ que consisten en muestras agrupadas clasificadas como HSIL con 3 lotes consecutivos de CINtec® PLUS.

La intensidad de tinción para las células de control C4.I preparadas como muestras ThinPrep® o SurePath™ no difirió significativamente ( $\pm 0.5$  en una escala de 0 a 3) entre los portaobjetos individuales ThinPrep® y Sure-Path™ entre todos los lotes. Se cumplieron todos los criterios de aceptación, lo que demuestra que el kit CINtec® PLUS proporciona resultados de tinción comparables dentro del mismo ciclo de tinción y entre diferentes lotes.

### **Precisión entre procesos:**

El objetivo del estudio entre procesos fue verificar que el kit CINtec® PLUS proporciona resultados de tinción comparables dentro del intervalo aceptable cuando un operario procesa muestras idénticas (3 portaobjetos preparados a partir de los mismos viales de muestra) en un instrumento de tinción automática en tres días

diferentes. El estudio se realizó mediante tinción de preparaciones CBL ThinPrep® y SurePath™ que consisten en muestras agrupadas clasificadas como HSIL con un lote CINtec® PLUS.

La intensidad de la tinción de p16 no varió significativamente ( $\pm 0.5$  en una escala de 0 a 3) y tampoco la puntuación para la tinción de Ki-67, lo que, en este sentido, demuestra su reproducibilidad. Se cumplieron todos los criterios de aceptación, lo que demuestra que el kit CINtec® PLUS proporciona resultados de tinción comparables entre varios procesos en varios días, cuando todas las demás variables (operario, instrumento, etc.) se mantienen igual.

#### **Precisión entre operarios:**

La reproducibilidad entre operarios se probó utilizando el procedimiento de tinción manual y el procedimiento LabVision Autostainer. Ambos métodos se probaron con tres operarios cada uno.

La intensidad de tinción entre todas las pruebas de tinción no difirió significativamente ( $\pm 0.5$  en una escala de 0 a 3) para ambos tipos de muestra (ThinPrep®, Sure Path™) utilizada. Se cumplieron todos los criterios de aceptación, lo que demuestra una buena reproducibilidad del kit CINtec® PLUS cuando lo utilizan diferentes operarios.

#### **Precisión entre métodos:**

La reproducibilidad entre métodos se verificó comparando los resultados de tinción de un lote CINtec® PLUS en el Lab Vision Autostainer con el sistema Coverplate™. Las pruebas se han realizado utilizando muestras ThinPrep® y SurePath™. Especialmente para las preparaciones con SurePath™ donde se deben aplicar dos pasos de sustrato Fast Red, se comparó la «configuración del software Dako® Autostainer» (dos pasos Fast Red, pero la solución de trabajo solo se puede preparar una vez por ejecución) con el Lab Vision Autostainer (dos pasos Fast Red con solución de trabajo recién preparada) y los resultados manuales (Shandon Coverplate).

La intensidad de tinción para las células de control C4.I entre todas las pruebas de tinción no difirió significativamente ( $\pm 0.5$  en una escala de 0 a 3) para cada tipo de muestra (ThinPrep®, Sure Path™) utilizada. Todos los criterios de aceptación se cumplieron, demostrando suficiente reproducibilidad entre métodos.

#### **Precisión entre instrumentos:**

El objetivo del estudio entre instrumentos fue verificar que el kit CINtec® PLUS proporciona resultados de tinción comparables dentro del intervalo aceptable cuando un operario procesa muestras idénticas (2 portaobjetos preparados a partir de los mismos viales de muestra) en dos instrumentos Autostainer diferentes. El estudio se realizó mediante tinción de preparaciones CBL ThinPrep® y SurePath™ que consisten en muestras agrupadas clasificadas como HSIL con un lote CINtec® PLUS.

La intensidad de tinción entre procesos de tinción en ambos instrumentos no difirió significativamente ( $\pm 0.5$  en una escala de 0 a 3) para ambos tipos de muestra (ThinPrep®, Sure Path™) utilizados. Se cumplieron todos los criterios de aceptación, lo que demuestra una buena reproducibilidad del kit CINtec® PLUS, cuando se utiliza en diferentes instrumentos.

Cabe destacar que el método de puntuación de la intensidad de la tinción con una escala de 0 a 3 se utilizó únicamente con fines de evaluación del rendimiento analítico y no debe servir para la interpretación de la tinción en la práctica clínica. En su lugar, para la interpretación rutinaria debe utilizarse la interpretación cualitativa de los portaobjetos con tinción que se describe en la sección VIII.

## XI. Solución de problemas

En caso de necesitar asistencia técnica, consulte la sección XIII para obtener la información de contacto.

| Problema  | Causa probable  | Solución sugerida  |
|---|---|--|
| <b>1. No se produce tinción de los portaobjetos.</b>        | <b>1a.</b> No se han seguido los pasos de las instrucciones de uso correctamente;   | <b>1a.</b> Lea atentamente las instrucciones de uso y siga los procedimientos descritos;   |
|   | <b>1b.</b> Los viales de los reactivos no se cargaron correctamente en los lugares correctos en los racks de reactivos;           | <b>1b.</b> Compruebe el Reagent Map para verificar que los viales de reactivos están en el sitio adecuado;   |
|   | <b>1c.</b> Insuficiente reactivo en el vial;  | <b>1c.</b> Asegúrese de que haya reactivo suficiente cargado en los viales antes de comenzar la sesión. Consulte en el Reagent Map los volúmenes necesarios;   |
|   | <b>1d.</b> Falta de tampón de lavado para Dako o LabVision Autostainers;  | <b>1d.</b> Asegúrese de que dispone de bastante tampón. Si no fuera así, rellene el depósito con tampón de lavado y accione la bomba; Controle si el tubo de plástico transparente alrededor de la jeringuilla (posicionado en la parte izquierda del brazo movedizo) muestra burbujas de aire - si fuera así, la eliminación de las burbujas debería resolver el problema;  |
| <b>2. Se produce una tinción débil de los portaobjetos.</b> | <b>2a.</b> La recuperación del epítipo no ha sido adecuada;   | <b>2a.</b> Utilice la solución de recuperación del epítipo recién preparada y/o verifique que la solución de recuperación del epítipo alcance una temperatura de 95 – 99°C durante 10 minutos y que se deja enfriar durante otros 20 minutos; Asegúrese de que no entre agua en los contenedores de tinción resistentes al calor durante el procedimiento de recuperación del epítipo. Repase la sección 2.2 para más recomendaciones; |
|   | <b>2b.</b> Los tiempos de incubación de los reactivos no han sido adecuados;  | <b>2b.</b> Revise las recomendaciones del protocolo de tinción indicadas en las secciones 2.3.1/2.3.2;   |
|   | <b>2c.</b> El método de fijación utilizado no es adecuado;  | <b>2c.</b> Asegúrese de que las preparaciones citológicas se hayan fijado tal como se describe en la sección VII o que no se haya utilizado un agente de fijación alternativo;   |
|   | <b>2d.</b> El agua empleada para diluir la solución de recuperación del epítipo presenta una concentración iónica demasiado alta; | <b>2d.</b> Cerciórese de que la columna de intercambio iónico haya sido controlada durante el proceso de mantenimiento rutinario;  |

| Problema   | Causa probable  | Solución sugerida   |
|--|---|---|
|  | <b>2e.</b> Falta de tampón de lavado para Dako o LabVision Autostainers;  | <b>2e.</b> Consulte la solución del problema de la sección 1d;  |
|  | <b>2f.</b> Disolución de los componentes del kit con el tampón de lavado debido a un tiempo de espera inadecuado después de los pasos de lavado para el sistema Shandon Coverplate; | <b>2f.</b> Espere 5 minutos antes de añadir el tampón de lavado al conducto del sistema Shandon Coverplate y compruebe que no quede residuos de tampón de lavado en el conducto que pudieran generar la disolución del reactivo siguiente;  |
| <b>3. No se produce tinción Ki-67 (rojo) o sólo una tinción débil de los portaobjetos positivos de control</b> | <b>3a.</b> Empleo de una hematoxilina con alcohol (p.ej. Harris');  | <b>3a.</b> El cromógeno Fast Red es soluble en EtOH por lo tanto, es obligatorio emplear una hematoxilina sin alcohol para impedir la disolución del tinte Fast Red (señal Ki-67);  |
|  | <b>3b.</b> Deshidratación de los portaobjetos con series ascendentes de alcohol antes de cubrirse con cristal o lámina;   | <b>3b.</b> Siga el protocolo de montaje de dos pasos utilizando CINtec® PLUS Mount y a continuación un cubreobjetos permanente de cristal o lámina; Revise la sección 2.5 para más recomendaciones;   |
|  | <b>3c.</b> La solución de tratamiento Fast Red no se ha preparado siguiendo las recomendaciones;  | <b>3c.</b> Prepare la solución de tratamiento Fast Red inmediatamente antes de su uso; aplique la solución sobre los portaobjetos en los 15 minutos siguientes a la preparación, de otra manera podrían disminuir la intensidad de la señal y la sensibilidad del test;   |
| <b>4. La tinción de fondo de los portaobjetos es excesiva.</b>   | <b>4a.</b> No se ha eliminado todo el reactivo de fijación pulverizable (polietilenglicol) en caso de uso de frotis convencionales;   | <b>4a.</b> Siga el procedimiento descrito en la sección 2.1.  |
|  | <b>4b.</b> No se han lavado o enjuagado bien los portaobjetos;  | <b>4b.</b> Utilice una solución reciente en los baños de tampón y los frascos de lavado. Asegúrese de que se ha purgado adecuadamente el Autostainer Instrument antes de la sesión. Compruebe que se haya suministrado el tampón adecuado durante toda la sesión. Utilice soluciones frescas de tampones y reactivos; |

| Problema  | Causa probable  | Solución sugerida   |
|---|---|---|
|   | <p><b>4c.</b> Se han secado las muestras durante el procedimiento de tinción;</p>               | <p><b>4c.</b> Si utiliza el Autostainer Instrument, cerciórese de que la cantidad de reactivo empleado sea la suficiente y que la tapa del instrumento permanezca cerrada durante el procedimiento; no exponga los portaobjetos a temperaturas elevadas o ambientes secos;<br/>Compruebe si el volumen de reactivo programado y la zona de administración (zona de goteo) son adecuados para cubrir todas las áreas de un portaobjetos que contiene material celular;<br/>Cerciórese que la cantidad de tampón sea la adecuada. Si no fuera así, llene el depósito con tampón y accione la bomba;<br/>Controle si el tubo de plástico transparente alrededor de la jeringuilla (posicionado en la parte izquierda del brazo movedido) muestra burbujas de aire - si fuera así, la eliminación de las burbujas debería resolver el problema;<br/>Evite el retraso en el paso de incubación de la solución de tratamiento Fast Red mientras el Autostainer esté en marcha para minimizar el riesgo de artefactos secos;</p> |
|   | <p><b>4d.</b> Se ha utilizado un método de fijación inadecuado;</p>                             | <p><b>4d.</b> Asegúrese que se ha utilizado un agente de fijación recomendado. Otros agentes de fijación pueden causar una tinción de fondo excesiva;</p>   |
|   | <p><b>4e.</b> Se ha producido una unión inespecífica de los reactivos a las células;</p>        | <p><b>4e.</b> Compruebe el método de fijación de la muestra;</p>  |
|   | <p><b>4f.</b> Las muestras se han secado durante la configuración del Autostainer;</p>          | <p><b>4f.</b> Asegúrese de que las muestras permanezcan cubiertas con reactivo (tampón) mientras configura la sesión;</p>   |
|   | <p><b>4g.</b> Las muestras se han secado durante el montaje del sistema Shandon Coverplate;</p> | <p><b>4g.</b> Llene un bol plano con agua destilada o desionizada. Saque un portaobjetos de la solución de recuperación del epítipo y una el portaobjetos con el coverplate sumergido en el bol (bajo agua);</p>  |
| <p><b>5. La tinción específica es excesivamente fuerte.</b></p> | <p><b>5a.</b> Se ha utilizado un método de fijación inadecuado;</p>                             | <p><b>5a.</b> Asegúrese de que se han utilizado los agentes y los métodos de fijación adecuados;</p>  |
|   | <p><b>5b.</b> Los tiempos de incubación de los reactivos son demasiado prolongados;</p>         | <p><b>5b.</b> Revise y siga las recomendaciones del protocolo de tinción indicadas en las secciones 2.3.1 / 2.3.2;</p>  |

| Problema  | Causa probable   | Solución sugerida   |
|---|--|---|
|   | <b>5c.</b> Se ha utilizado una solución de lavado inadecuada;  | <b>5c.</b> Utilice el tampón de lavado (referencia 10215364001);  |
| <b>6. La evaluación de las células inmunoreactivas dobles no es posible</b>                                     | <b>6a.</b> La contratinción con hematoxilina ha sido demasiado fuerte;   | <b>6a.</b> Reduzca el tiempo de incubación de la hematoxilina y/o lavado en el paso del viraje a azul con agua corriente o agua amoniacal;  |
| <b>7. El cubreobjetos de cristal o lámina no es el adecuado</b>   | <b>7a.</b> El cubreobjetos de cristal o lámina no se puede aplicar de la manera correcta;  | <b>7a.</b> Evite la formación de burbujas de aire mientras aplica CINtec® PLUS Mount (cubreobjetos acuoso); Observe el tiempo de secado recomendado para cubreobjetos líquidos;   |
| <b>8. Tinción desigual o esporádica después del uso del sistema Shandon Coverplate</b>                          | <b>8a.</b> Se han formado burbujas de aire entre el portaobjetos y el coverplate;  | <b>8a.</b> Ensamble el portaobjeto y coverplate siguiendo el protocolo REF 2010-953-009EN (disponible por Roche mtm laboratories AG); Posibles burbujas de aire sobre el portaobjetos se deberán eliminar antes de la realizar el ensamblaje; |
| <b>9. Formación de grietas después del montaje de los portaobjetos con un medio de montaje a base de xileno</b> | <b>9a.</b> Secado insuficiente de CINtec® PLUS Mount antes del montaje de los portaobjetos con un medio de montaje a base de xileno; | <b>9a.</b> Deje que los portaobjetos que se hayan cubierto con CINtec® PLUS Mount se sequen durante la noche a temperatura ambiente o durante 4 horas a 37°C. CINtec® PLUS Mount tiene que estar completamente seco.                          |

## XII. Símbolos

**Símbolo:**

**Explicación:**



Referencia



Código del lote



Número mundial de artículo comercial



Identificación única del producto



Dispositivo médico para diagnóstico in vitro



Fabricante



Contenido suficiente para <n> ensayos



Consultar las instrucciones de uso



Fecha de caducidad



Limitación de temperatura



Fecha de fabricación



No reutilizar



Contacto de soporte técnico (teléfono)



Contiene materiales de origen animal



Contenido

### **XIII. Fabricante**

**Fabricado por:** Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Strasse 116  
68305 Mannheim  
Alemania

<https://navifyportal.roche.com>

**Contacto del soporte técnico (Teléfono):** +800 5505 6606

El resumen de la información sobre seguridad y rendimiento se encuentra en la página:

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

### **XIV. Estado de la revisión**

Las instrucciones de uso actuales pertenecen a la versión 2.0 publicadas en noviembre de 2025.

Cambios con respecto a la versión anterior (1.0, publicada en junio de 2024):

- Se ha añadido H290
- Cambios editoriales

### **XV. Propiedad intelectual**

CINtec y E6H4 son marcas registradas de Roche.

Todas las demás marcas comerciales pertenecen a sus respectivos propietarios.

© 2025 Roche

## Anexo 1 Referencias

1. Kim WY, Sharpless NE. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell*. 2006 Oct 20;127(2):265-275.
2. Wentzensen N, von Knebel Doeberitz M. Biomarkers in cervical cancer screening. *Dis Markers*. 2007;23(4):315-330.
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. p16INK4a 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, Grillio-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):168–176.
6. Schmidt D, Bergeron C, Denton KJ, et al. p16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASC-US and LSIL papanicolaou cytology: results from the European equivocal or mildly abnormal Papanicolaou cytology study. *Cancer Cytopathol*. 2011;119(3):158–166.
7. Petry KU, Schmidt D, Scherbring S, et al. Triage Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. *Gynecol Oncol*. 2011;121(3):505–509.
8. Scholzen T, Gerdes, J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J. Cell. Physiol*. 2000;182:311–322.
9. Ravarino A, Nemolato S, Macciocu 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):652–656.
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):1550-1557.
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):d1v257.
13. Uijterwaal MH, Polman NJ, Witte BI, et al. Triage HPV-positive women with normal cytology by p16/Ki-67 dual-stained cytology testing: baseline and longitudinal data. *Int J Cancer*. 2015;136(10):2361-2368.
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):4154-4162.
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):373-381.
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 p16INK4a-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):914-920.
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, Hermsen 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. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, et al. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2007;370:890-907.
27. Nanda K, McCrory DC, Myers ER, et al. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med*. 2000;132:810-9.
28. Schiffman M, Wentzensen N, Wacholder S, et al. Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2011 Mar 2;103(5):368-83.
29. Huh WK, Ault KA, Chelmow D, et al. Use of primary high-risk human papillomavirus testing for cervical cancer screening: interim clinical guidance. *Gynecol Oncol*. 2015 Feb;136(2):178-82.
30. Perkins RB, Guido RS, Castle PE, et al. 2019 ASCCP Risk-Based Management Consensus Guidelines for Abnormal Cervical Cancer Screening Tests and Cancer Precursors. *J Low Genit Tract Dis*. 2020 Apr;24(2):102-131.
31. Solomon D, Schiffman M, Tarone R. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93:293-9.
32. Wright JD, Rader JS, Davila R, et al. Human papillomavirus triage for young women with atypical squamous cells of undetermined significance. *Obstet Gynecol*. 2006;107:822-9.
33. Schiffman M, Solomon D. Findings to date from the ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS). *Arch Pathol Lab Med*. 2003 Aug;127(8):946-9.
34. Wentzensen N, Schiffman M, Palmer T, Arbyn M. Triage of HPV positive women in cervical cancer screening. *J Clin Virol*. 2016 Mar;76 Suppl 1(Suppl 1):S49-S55.
35. 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.

## Anexo 2 Tablas

### Glosario para las tablas y la figura 1

**Woman aged xx–xx years:**

Mujeres de xx-xx años

**Pap cytology:**

Citología Pap

**ASC-US or higher:**

ASCUS o superior

**Sensitivity:**

Sensibilidad

**Specificity:**

Especificidad

**PPV:**

Positive predictive value / Valor predictivo positivo

**NPV:**

Negative predictive value / Valor predictivo negativo

**DLR+:**

Positive diagnostic likelihood ratio / Cociente de verosimilitud diagnóstica positivo

**DLR–:**

Negative diagnostic likelihood ratio / Cociente de verosimilitud diagnóstica negativo

**CI:**

Confidence Interval / Intervalo de Confianza

**Referral to colposcopy:**

Derivación a colposcopia

**HGCIN:**

High-grade cervical intraepithelial neoplasia / Lesiones cervicales intraepiteliales de alto grado

**Table 1:**

*Estudio PALMS:* Las tasas de positividad de la prueba CINTec® PLUS en el grupo de cribado, en comparación con los resultados de citología Pap (i.e ASCUS o niveles superiores), y la prueba HC2 High-Risk VPH DNA, respectivamente.

|  | Pap cytology,<br>ASC-US or higher |             | CINTec® PLUS<br>Positive |             | HPV<br>Positive |              |
|--|-----------------------------------|-------------|--------------------------|-------------|-----------------|--------------|
|  | n                                 | %           | n                        | %           | n               | %            |
| <b>Women aged 18-65 years</b><br>n= 27,248 | 1,407                             | <b>5.2%</b> | 1,462                    | <b>5.4%</b> | 2,918           | <b>10.7%</b> |
| <b>Women aged 18-29 years</b><br>n= 6,798  | 563                               | <b>8.3%</b> | 605                      | <b>8.9%</b> | 1,376           | <b>20.2%</b> |
| <b>Women aged 30-65 years</b><br>n= 20,450 | 844                               | <b>4.1%</b> | 857                      | <b>4.2%</b> | 1,542           | <b>7.5%</b>  |

**Table 2:**

*Estudio PALMS:* Sensibilidad, especificidad, PPV, NPV y cocientes de verosimilitud diagnóstica positivo y negativo (DLR+, DLR-) para CINtec® PLUS en la población seleccionada para la detección de CIN2+. Los resultados de la citología Pap y la prueba HC2 High-Risk VPH DNA se muestran a modo de comparación.

|   | <b>CINtec® PLUS</b><br>(95% CI) | <b>Pap cytology</b><br>(95% CI) | <b>HPV</b><br>(95% CI)       |
|---|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| <b>Women aged 18-65 years</b> (n=25,577; 205 CIN2+, prevalence = 0.80%) |                                 |                                 |                              |
| Sensitivity   | <b>90.1%</b><br>(85.3, 93.5)    | <b>66.4%</b><br>(59.5, 72.6)    | <b>96.4%</b><br>(93.1, 98.3) |
| Specificity   | <b>95.3%</b><br>(95.0, 95.6)    | <b>95.5%</b><br>(95.2, 95.7)    | <b>90.2%</b><br>(88.1, 92.4) |
| PPV   | <b>18.4%</b>                    | <b>14.6%</b>                    | <b>10.2%</b>                 |
| NPV   | <b>99.9%</b>                    | <b>99.6%</b>                    | <b>99.9%</b>                 |
| DLR+  | <b>19.219</b>                   | <b>14.573</b>                   | <b>9.850</b>                 |
| DLR-  | <b>0.104</b>                    | <b>0.352</b>                    | <b>0.040</b>                 |
| <b>Women aged 18-29 years</b> (n=6,372; 82 CIN2+, prevalence = 1.29%)   |                                 |                                 |                              |
| Sensitivity   | <b>93.3%</b><br>(85.7, 97.0)    | <b>67.7%</b><br>(56.3, 77.4)    | <b>97.4%</b><br>(91.3, 99.5) |
| Specificity   | <b>92.3%</b><br>(91.6, 93.0)    | <b>92.8%</b><br>(92.1, 93.4)    | <b>81.4%</b><br>(77.3, 85.7) |
| PPV   | <b>19.7%</b>                    | <b>16.0%</b>                    | <b>9.7%</b>                  |
| NPV   | <b>99.9%</b>                    | <b>99.3%</b>                    | <b>99.9%</b>                 |
| DLR+  | <b>12.092</b>                   | <b>9.359</b>                    | <b>5.234</b>                 |
| DLR-  | <b>0.073</b>                    | <b>0.348</b>                    | <b>0.032</b>                 |
| <b>Women aged 30-65 years</b> (n=19,205; 123 CIN2+, prevalence = 0.64%) |                                 |                                 |                              |
| Sensitivity   | <b>87.8%</b><br>(80.8, 92.5)    | <b>64.9%</b><br>(56.0, 72.9)    | <b>95.6%</b><br>(89.0, 98.3) |
| Specificity   | <b>96.3%</b><br>(96.0, 96.6)    | <b>96.3%</b><br>(96.0, 96.6)    | <b>93.1%</b><br>(92.7, 93.5) |
| PPV   | <b>17.6%</b>                    | <b>13.7%</b>                    | <b>10.5%</b>                 |
| NPV   | <b>99.9%</b>                    | <b>99.7%</b>                    | <b>99.9%</b>                 |
| DLR+  | <b>23.765</b>                   | <b>17.676</b>                   | <b>13.851</b>                |
| DLR-  | <b>0.127</b>                    | <b>0.364</b>                    | <b>0.047</b>                 |

**Table 3:**

*Estudio de Wolfsburg:* Sensibilidad, especificidad, PPV, NPV y cocientes de verosimilitud diagnóstica positivo y negativo (DLR+, DLR-) para CINtec® PLUS en la selección de mujeres de 30 años y mayores para la detección de CIN2+. Los resultados de la citología Pap y la prueba HC2 High-Risk VPH DNA se muestran a modo de comparación.

|   | <b>CINtec® PLUS</b><br>(95% CI)   | <b>Pap cytology</b><br>(95% CI)   | <b>HPV</b><br>(95% CI)            |
|---|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| <b>Women aged 30-65 years</b> (n=4,246; 40 CIN2+, prevalence = 0.94%) |                                   |                                   |                                   |
| Sensitivity   | <b>92.5%</b><br>(79.6, 98.4)      | <b>65.0%</b><br>(48.3, 79.4)      | <b>100%</b><br>(91.2, 100)        |
| Specificity   | <b>97.5%</b><br>(97.0, 97.9)      | <b>98.7%</b><br>(98.3, 99.0)      | <b>94.1%</b><br>(93.3, 94.8)      |
| PPV   | <b>25.9%</b><br>(18.9, 33.9)      | <b>32.1%</b><br>(22.2, 43.4)      | <b>13.8%</b><br>(10.1, 18.4)      |
| NPV   | <b>99.9%</b><br>(99.8, 99.9)      | <b>99.7%</b><br>(99.4, 99.8)      | <b>100%</b><br>(99.9, 100)        |
| DLR+  | <b>36.703</b><br>(29.821, 45.173) | <b>49.707</b><br>(35.122, 70.350) | <b>16.892</b><br>(14.974, 19.054) |
| DLR-  | <b>0.077</b><br>(0.026, 0.228)    | <b>0.355</b><br>(0.232, 0.541)    | <b>0.0</b><br>(NA)                |

**Table 4:**

Estudio PALMS: Prueba de positividad (tasa de referencia de colposcopia), sensibilidad, especificidad, PPV, NPV y cocientes de verosimilitud diagnóstica positivo y negativo (DLR+, DLR-) para CINtec® PLUS en la clasificación de los resultados en la citología de Papanicolaou de ASCUS para la detección de CIN2+. Los resultados de la prueba HC2 High-Risk VPH DNA se muestran a modo de comparación.

|  | <b>CINtec® PLUS</b><br>(95% CI) | <b>HPV</b><br>(95% CI)       |
|--|---------------------------------|------------------------------|
| <b>Women aged 18-65 years, ASC-US (n=575; CIN2+ prevalence = 4.3%)</b> |                                 |                              |
| Referral to colposcopy   | <b>25.6%</b>                    | <b>41.9%</b>                 |
| Sensitivity  | <b>94.6%</b><br>(70.2, 99.2)    | <b>100%</b><br>(81.5, 100)   |
| Specificity  | <b>77.5%</b><br>(73.7, 80.9)    | <b>60.7%</b><br>(56.5, 64.7) |
| PPV  | <b>15.8%</b>                    | <b>10.2%</b>                 |
| NPV  | <b>99.7%</b>                    | <b>100%</b>                  |
| DLR+   | <b>4.207</b>                    | <b>2.543</b>                 |
| DLR-   | <b>0.069</b>                    | <b>0.000</b>                 |
| <b>Women aged 18-29 years, ASC-US (n=219; CIN2+ prevalence = 6.8%)</b> |                                 |                              |
| Referral to colposcopy   | <b>32.0%</b>                    | <b>57.7%</b>                 |
| Sensitivity  | <b>100%</b><br>(69.2, 100)      | <b>100%</b><br>(69.2, 100)   |
| Specificity  | <b>73.0%</b><br>(66.2, 78.8)    | <b>45.5%</b><br>(38.8, 52.5) |
| PPV  | <b>21.1%</b>                    | <b>11.7%</b>                 |
| NPV  | <b>100%</b>                     | <b>100%</b>                  |
| DLR+   | <b>3.698</b>                    | <b>1.836</b>                 |
| DLR-   | <b>0.000</b>                    | <b>0.000</b>                 |
| <b>Women aged 30-65 years, ASC-US (n=356; CIN2+ prevalence = 2.8%)</b> |                                 |                              |
| Referral to colposcopy   | <b>21.6%</b>                    | <b>32.3%</b>                 |
| Sensitivity  | <b>87.2%</b><br>(45.7, 98.2)    | <b>100%</b><br>(63.1, 100)   |
| Specificity  | <b>80.3%</b><br>(75.6, 84.2)    | <b>69.7%</b><br>(64.6, 74.3) |
| PPV  | <b>11.3%</b>                    | <b>8.7%</b>                  |
| NPV  | <b>99.5%</b>                    | <b>100%</b>                  |
| DLR+   | <b>4.417</b>                    | <b>3.295</b>                 |
| DLR-   | <b>0.160</b>                    | <b>0.000</b>                 |

**Table 5:**

*Estudio EEMAPS:* Prueba de positividad (tasa de referencia de colposcopia), sensibilidad, especificidad, PPV, NPV y cocientes de verosimilitud diagnóstica positivo y negativo (DLR+, DLR-) para CINtec® PLUS en la clasificación de los resultados en la citología de Papanicolaou de ASCUS para la detección de CIN2+. Los resultados de la prueba HC2 High-Risk VPH DNA se muestran a modo de comparación.

|   | <b>CINtec® PLUS</b><br>(95% CI) | <b>HPV</b><br>(95% CI)      |
|---|---------------------------------|-----------------------------|
| <b>Women aged 18-65 years, ASC-US (n=361; CIN2+ prevalence = 21.3%)</b> |                                 |                             |
| Referral to colposcopy  | <b>34.8%</b>                    | <b>69.6%</b>                |
| Sensitivity   | <b>92.2%</b> (83.8, 97.1)       | <b>90.9%</b> (82.2, 96.3)   |
| Specificity   | <b>80.6%</b> (75.6, 85.1)       | <b>36.3%</b> (30.7, 42.2)   |
| PPV   | <b>56.4%</b> (47.2, 65.2)       | <b>27.9%</b> (22.4, 33.9)   |
| NPV   | <b>97.5%</b> (94.5, 99.1)       | <b>93.6%</b> (87.3, 97.4)   |
| DLR+  | <b>4.761</b> (3.723, 6.089)     | <b>1.426</b> (1.274, 1.596) |
| DLR-  | <b>0.097</b> (0.045, 0.209)     | <b>0.251</b> (0.122, 0.516) |
| <b>Women aged 18-29 years, ASC-US (n=136; CIN2+ prevalence = 22.8%)</b> |                                 |                             |
| Referral to colposcopy  | <b>43.1%</b>                    | <b>81.8%</b>                |
| Sensitivity   | <b>96.8%</b> (83.3, 99.9)       | <b>100%</b> (88.8, 100)     |
| Specificity   | <b>72.4%</b> (62.8, 80.7)       | <b>23.8%</b> (16.0, 33.1)   |
| PPV   | <b>50.9%</b> (37.5, 64.1)       | <b>27.9%</b> (19.8, 37.2)   |
| NPV   | <b>98.7%</b> (93.0, 99.97)      | <b>100%</b> (86.3, 100)     |
| DLR+  | <b>3.504</b> (2.554, 4.807)     | <b>1.313</b> (1.179, 1.461) |
| DLR-  | <b>0.045</b> (0.006, 0.308)     | <b>0.0</b> (N/A)            |
| <b>Women aged 30-65 years, ASC-US (n=225; CIN2+ prevalence = 20.4%)</b> |                                 |                             |
| Referral to colposcopy  | <b>29.8%</b>                    | <b>62.2%</b>                |
| Sensitivity   | <b>89.1%</b> (76.4, 96.4)       | <b>84.8%</b> (71.1, 93.7)   |
| Specificity   | <b>85.5%</b> (79.5, 90.3)       | <b>43.6%</b> (36.2, 51.2)   |
| PPV   | <b>61.2%</b> (48.5, 72.9)       | <b>27.9%</b> (20.6, 36.1)   |
| NPV   | <b>96.8%</b> (92.8, 99.0)       | <b>91.8%</b> (83.8, 96.6)   |
| DLR+  | <b>6.136</b> (4.241, 8.879)     | <b>1.503</b> (1.258, 1.795) |
| DLR-  | <b>0.127</b> (0.055, 0.292)     | <b>0.349</b> (0.173, 0.705) |

**Table 6:**

*Estudio PALMS:* Prueba de positividad (tasa de referencia de colposcopia), sensibilidad, especificidad, PPV, NPV y cocientes de verosimilitud diagnóstica positivo y negativo (DLR+, DLR-) para CINtec® PLUS en la clasificación de resultados en la citología de Papanicolaou de LSIL para la detección de CIN2+. Los resultados de la citología Pap y la prueba HC2 High-Risk VPH DNA se muestran a modo de comparación.

|   | <b>CINtec® PLUS</b><br>(95% CI) | <b>HPV</b><br>(95% CI)       |
|---|---------------------------------|------------------------------|
| <b>Women aged 18-65 years, LSIL (n=529; CIN2+ prevalence = 15.9%)</b> |                                 |                              |
| Referral to colposcopy  | <b>52.4%</b>                    | <b>83.9%</b>                 |
| Sensitivity   | <b>85.4%</b><br>(74.5, 92.2)    | <b>98.1%</b><br>(87.9, 99.7) |
| Specificity   | <b>53.9%</b><br>(49.1, 58.6)    | <b>18.8%</b><br>(15.4, 22.7) |
| PPV   | <b>26.0%</b>                    | <b>18.6%</b>                 |
| NPV   | <b>95.1%</b>                    | <b>98.1%</b>                 |
| DLR+  | <b>1.853</b>                    | <b>1.208</b>                 |
| DLR-  | <b>0.271</b>                    | <b>0.101</b>                 |
| <b>Women aged 18-29 years, LSIL (n=250; CIN2+ prevalence = 15.2%)</b> |                                 |                              |
| Referral to colposcopy  | <b>54.8%</b>                    | <b>88.0%</b>                 |
| Sensitivity   | <b>84.2%</b><br>(65.1, 93.9)    | <b>95.3%</b><br>(73.7, 99.3) |
| Specificity   | <b>50.5%</b><br>(43.6, 57.3)    | <b>13.3%</b><br>(9.3, 18.7)  |
| PPV   | <b>23.3%</b>                    | <b>16.4%</b>                 |
| NPV   | <b>94.7%</b>                    | <b>94.1%</b>                 |
| DLR+  | <b>1.700</b>                    | <b>1.099</b>                 |
| DLR-  | <b>0.313</b>                    | <b>0.354</b>                 |
| <b>Women aged 30-65 years, LSIL (n=279; CIN2+ prevalence = 16.4%)</b> |                                 |                              |
| Referral to colposcopy  | <b>50.2%</b>                    | <b>80.3%</b>                 |
| Sensitivity   | <b>86.0%</b><br>(70.7, 94.0)    | <b>100%</b><br>(90.5, 100)   |
| Specificity   | <b>56.9%</b><br>(50.2, 63.3)    | <b>23.6%</b><br>(18.5, 29.5) |
| PPV   | <b>28.2%</b>                    | <b>20.5%</b>                 |
| NPV   | <b>95.4%</b>                    | <b>100%</b>                  |
| DLR+  | <b>1.994</b>                    | <b>1.309</b>                 |
| DLR-  | <b>0.246</b>                    | <b>0.000</b>                 |

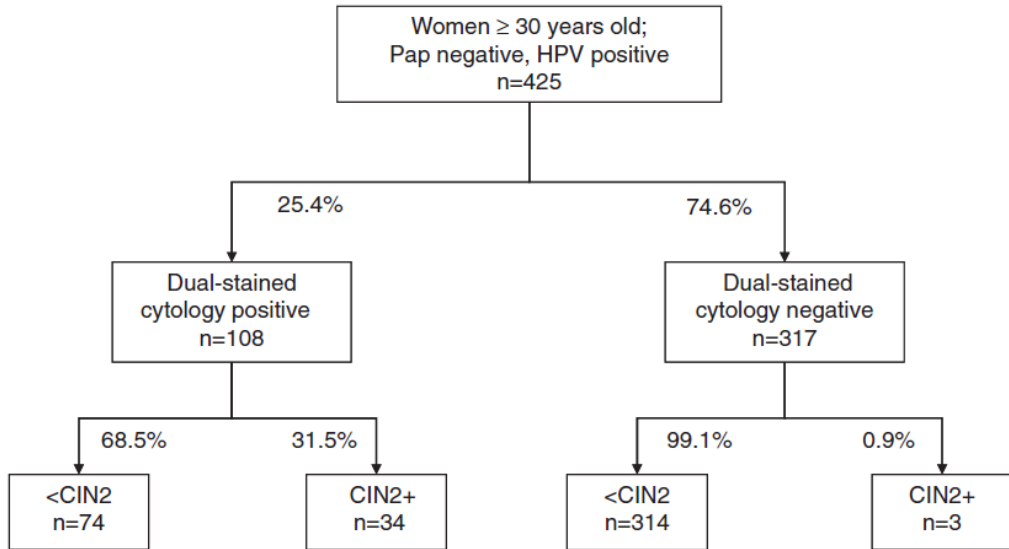
**Table 7:**

*Estudio EEMAPS:* Prueba de positividad (tasa de referencia de colposcopia), sensibilidad, especificidad, PPV, NPV y cocientes de verosimilitud diagnóstica positivo y negativo (DLR+, DLR-) para CINtec® PLUS en la clasificación de resultados en la citología de Papanicolaou de LSIL para la detección de CIN2+. Los resultados de la citología y la prueba HC2 High-Risk VPH DNA se muestran a modo de comparación.

|   | <b>CINtec® PLUS</b><br>(95% CI) | <b>HPV</b><br>(95% CI)      |
|---|---------------------------------|-----------------------------|
| <b>Women aged 18-65 years, LSIL (n=415; CIN2+ prevalence = 33.0%)</b> |                                 |                             |
| Referral to colposcopy  | <b>52.3%</b>                    | <b>86.2%</b>                |
| Sensitivity   | <b>94.2%</b> (88.8, 97.5)       | <b>96.4%</b> (91.7, 98.8)   |
| Specificity   | <b>68.0%</b> (62.2, 73.4)       | <b>19.1%</b> (14.6, 24.2)   |
| PPV   | <b>59.2%</b> (52.3, 65.8)       | <b>37.0%</b> (21.0, 42.2)   |
| NPV   | <b>95.9%</b> (92.2, 98.2)       | <b>91.4%</b> (81.0, 97.1)   |
| DLR+  | <b>2.941</b> (2.466, 3.508)     | <b>1.190</b> (1.115, 1.271) |
| DLR-  | <b>0.086</b> (0.044, 0.169)     | <b>0.191</b> (0.078, 0.468) |
| <b>Women aged 18-29 years, LSIL (n=142; CIN2+ prevalence = 38.7%)</b> |                                 |                             |
| Referral to colposcopy  | <b>60.6%</b>                    | <b>87.3%</b>                |
| Sensitivity   | <b>96.4%</b> (87.5, 99.6)       | <b>94.6%</b> (84.9, 98.9)   |
| Specificity   | <b>62.1%</b> (51.0, 72.3)       | <b>17.2%</b> (10.0, 26.8)   |
| PPV   | <b>61.6%</b> (50.5, 71.9)       | <b>41.9%</b> (33.1, 51.1)   |
| NPV   | <b>96.4%</b> (87.7, 99.6)       | <b>83.3%</b> (58.6, 96.4)   |
| DLR+  | <b>2.540</b> (1.932, 3.340)     | <b>1.142</b> (1.018, 1.282) |
| DLR-  | <b>0.059</b> (0.015, 0.231)     | <b>0.316</b> (0.096, 1.043) |
| <b>Women aged 30-65 years, LSIL (n=273; CIN2+ prevalence = 30.0%)</b> |                                 |                             |
| Referral to colposcopy  | <b>48.4%</b>                    | <b>85.3%</b>                |
| Sensitivity   | <b>92.7%</b> (84.8, 97.3)       | <b>97.6%</b> (91.5, 99.7)   |
| Specificity   | <b>70.7%</b> (63.7, 77.0)       | <b>19.9%</b> (14.5, 26.3)   |
| PPV   | <b>57.6%</b> (48.7, 66.1)       | <b>34.3%</b> (28.3, 40.8)   |
| NPV   | <b>95.7%</b> (91.0, 98.4)       | <b>95.0%</b> (83.1, 99.4)   |
| DLR+  | <b>3.161</b> (2.516, 3.972)     | <b>1.218</b> (1.126, 1.317) |
| DLR-  | <b>0.104</b> (0.048, 0.225)     | <b>0.123</b> (0.030, 0.496) |

**Figure 1:**

Estudio de Wolfsburg: El organigrama muestra la distribución de los casos de CIN 2+ confirmados por biopsias en mujeres a partir de los 30 años y con resultados Pap negativos y VPH positivos dentro de los grupos de CINtec® PLUS positivo vs. negativo, respectivamente.



**Table 8:**

*Estudio de Wolfsburg:* Sensibilidad, especificidad, PPV, NPV y cocientes de verosimilitud diagnóstica positivo y negativo (DLR+, DLR-) para CINtec® PLUS en la clasificación de resultados de pruebas de Papanicolaou negativas, VPH, positivas para la detección de CIN2+ y CIN3+. Los números se basan en la evaluación de 132 casos con biopsias colposcópicas reunidos durante el periodo principal de seguimiento de 12,5 meses.

| <b>CINtec® PLUS</b>   | <b>CIN2+</b><br>(95% CI)       | <b>CIN3+</b><br>(95% CI)       |
|---|--------------------------------|--------------------------------|
| <b>Women aged 30-65 years, HPV pos/Pap neg, with biopsy results (n=132)</b> |                                |                                |
| Referral to colposcopy  | <b>34.8%</b>                   | <b>69.6%</b>                   |
| Sensitivity   | <b>91.9%</b><br>(78.1, 98.3)   | <b>96.4%</b><br>(81.7, 99.9)   |
| Specificity   | <b>82.1%</b><br>(72.9, 89.2)   | <b>76.9%</b><br>(67.6, 84.6)   |
| PPV   | <b>66.7%</b><br>(52.1, 79.2)   | <b>52.9%</b><br>(38.5, 67.1)   |
| NPV   | <b>96.3%</b><br>(89.6, 99.2)   | <b>98.8%</b><br>(93.3, 99.9)   |
| DLR+  | <b>5.135</b><br>(3.303, 7.983) | <b>4.179</b><br>(2.921, 5.978) |
| DLR-  | <b>0.099</b><br>(0.033, 0.293) | <b>0.046</b><br>(0.007, 0.319) |