



Instructions for Use / Instrucciones de uso / Instructions d'utilisation

CINtec® PLUS Kit

The CINtec® PLUS Kit is an immunocytochemistry assay for the simultaneous qualitative detection of the p16^{INK4a} and Ki-67 proteins in cervical cytology preparations. The kit is intended to be used in medical cytology laboratories. Interpretation of the test results may only be made by a certified professional in conjunction with the patient's clinical history and additional diagnostic tests that have been performed.

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

Le CINtec® PLUS Kit est un test immunocytochimique permettant la détection qualitative simultanée des protéines p16^{INK4a} et Ki-67 dans les préparations cytologiques cervicales. Il est conçu pour être utilisé dans les laboratoires de cytologie médicale. Les résultats doivent être interprétés par un professionnel certifié, en tenant compte des antécédents cliniques de la patiente ainsi que des résultats des tests diagnostiques complémentaires effectués.

Manufactured by:

Roche mtm laboratories AG
Sandhofer Straße 116
68305 Mannheim
Germany

www.roche.com

<https://dialog.roche.com>

Distributed by:

Ventana Medical Systems, Inc.
1910 E. Innovation Park Drive
Tucson, Arizona 85755
USA

www.roche.com

	9537
	06595383001
	04015630984374
	
	50
	2 – 8°C

Table of Contents / Índice / Table des matières

ENGLISH

I.	Product Name	4
II.	Intended Use.....	4
III.	Summary and Explanation of the Device	4
	Background	4
	Principle of Procedure	5
IV.	Reagents.....	5
	Materials Provided	5
	Storage	8
	Materials and Reagents Required but not Provided	9
	Equipment Required	10
V.	Warnings and Precautions	10
	Warning	10
	Caution	11
VI.	Procedures	11
	Cytological Specimen Preparations	11
	Heat-induced epitope retrieval treatment of specimens prior to staining	13
	Slide Staining Procedures.....	13
	1. Reagent Preparation.....	13
	1.1 Epitope Retrieval Solution.....	13
	1.2 Wash Buffer	13
	1.3 Substrate-Chromogen Solutions (DAB and Fast Red)	14
	1.4 Counterstain	14
	1.5 Mounting Medium	14
	2. Staining Procedure	15
	2.1 Specimen rehydration	15
	2.2 Epitope Retrieval	16
	2.3 Staining Protocols.....	17
	2.3.1 Staining Protocol for Autostainer Instruments (Dako, LabVision)	17
	2.4 Counterstaining with Hematoxylin	19
	2.5 Mounting.....	19
VII.	Quality Control	20
	Positive Control	20
	Negative Control	20
	Assay Verification	20
VIII.	Interpretation of Results	21
IX.	Limitations	21
X.	Troubleshooting	23
XI.	Symbols	26
XII.	Manufacturer	26
XIII.	Revision Status	26
XIV.	Intellectual Property	26
	Annex 1: References	80

ESPAÑOL

I.	Nombre del producto	28
II.	Uso previsto	28
III.	Resumen y explicación del dispositivo	28
	Base científica	28
	Principios del procedimiento	29
IV.	Reactivos	30
	Material suministrado	30
	Almacenamiento	33
	Materiales y reactivos necesarios pero no suministrados	33
	Equipo necesario	34
V.	Advertencias y precauciones	35
	Advertencia	35
	Precauciones	35
VI.	Procedimientos	36
	Preparación de las muestras citológicas	36
	Tratamiento de recuperación del epítipo inducido por calor antes de la tinción de las muestras	38
	Procedimiento de tinción de portaobjetos	38
	1. Preparación de los reactivos	38
	1.1 Solución de recuperación del epítipo	38
	1.2 Tampón de lavado	39
	1.3 Soluciones sustrato-cromógeno (DAB y Fast Red)	39
	1.4 Contratinción	39
	1.5 Medios de montaje	40
	2. Procedimiento de tinción	40
	2.1 Rehidratación de las muestras	40
	2.2 Recuperación del epítipo	41
	2.3 Protocolos de tinción	42
	2.3.1 Protocolo de tinción para Autostainer Instruments (Dako, LabVision)	42
	2.4. Contratinción con hemaxotilina	44
	2.5 Montaje	45
VII.	Control de calidad	46
	Control positivo	46
	Control negativo	46
	Verificación del ensayo	46
VIII.	Interpretación de los resultados	46
IX.	Limitaciones	47
X.	Solución de problemas	49
XI.	Símbolos	52
XII.	Fabricante	52
XIII.	Estado de la revisión	53
XIV.	Propiedad intelectual	53
	Anexo 1: Referencias	80

FRANÇAIS

I.	Nom du produit	54
II.	Utilisation prévue	54
III.	Résumé et explication du dispositif	54
	Contexte	54
	Principe de la procédure	55
IV.	Réactifs	56
	Matériels fournis	56
	Conservation	59
	Matériels et réactifs nécessaires mais non fournis	59
	Équipement nécessaire	60
V.	Mises en garde et précautions.....	61
	Mise en garde	61
	Attention	62
VI.	Procédures.....	62
	Préparation des échantillons cytologiques	62
	Démasquage d'épitope par chauffage sur les échantillons avant coloration.....	64
	Procédures de marquage des lames	64
	1. Préparation des réactifs.....	64
	1.1 Solution de démasquage d'épitope	64
	1.2 Tampon de lavage	65
	1.3 Solutions de substrat et chromogène (DAB et Fast Red)	65
	1.4 Contre-coloration	66
	1.5 Milieu de montage	66
	2. Procédure de marquage	66
	2.1 Réhydratation des échantillons	66
	2.2 Démasquage d'épitope	67
	2.3 Protocoles d'immunomarquage	68
	2.3.1 Protocole d'immunomarquage pour les Autostainers (Dako, LabVision)	68
	2.4 Contre-coloration à l'hématoxyline.....	70
	2.5 Montage	70
VII.	Contrôle de qualité	71
	Contrôle positif.....	71
	Contrôle négatif	72
	Vérification du test	72
VIII.	Interprétation des résultats.....	72
IX.	Limites.....	73
X.	Dépannage.....	74
XI.	Symboles	78
XII.	Fabricant	78
XIII.	Révision.....	78
XIV.	Propriété intellectuelle.....	79
	Annexe 1: Références.....	80

ENGLISH

I. Product Name

CINtec® *PLUS* Kit

II. Intended Use

For in vitro diagnostic use.

The CINtec® *PLUS* Kit is an immunocytochemistry assay for the simultaneous qualitative detection of the p16^{INK4a} and Ki-67 proteins in cervical cytology preparations.

The kit is intended to be used in medical cytology laboratories. Interpretation of the test results may only be made by a certified professional in conjunction with the patient's clinical history and additional diagnostic tests that have been performed.

III. Summary and Explanation of the Device

Background

In eukaryotic cells, control of progression of the cell division cycle is effected by a complex pattern of controlled expression and post-translational modifications (e.g., phosphorylation) of cell-cycle regulating proteins. The p16^{INK4a} protein plays a major role in this mechanism of regulation of the eukaryotic cell cycle. It is part of the retinoblastoma protein (pRb)-mediated control of the G₁-S-phase transition, and it triggers cell cycle arrest in the course of cellular differentiation processes. Thus, p16^{INK4a} provides an anti-proliferative effect when expressed during regular cell cycle progression [1]. In terminally differentiated epithelial cells, p16^{INK4a} expression is down-regulated to levels typically not detectable by immunocytochemistry [2].

In cervical dysplasia, overexpression of p16 is regarded as a surrogate biomarker for transforming HPV infections, reflecting the activation of HPV E6/E7 oncoprotein-driven cell proliferation [2-5]. Detection of p16 in cervical cytology preparations has been proposed as a valuable adjunctive marker to triage women with abnormal Pap cytology results as well as with positive HPV test results [3-5]. However, because p16-specific staining may be observed in individual metaplastic or endocervical cells in which p16 may be expressed to exert its physiological normal, growth-suppressive cellular function, interpretation of p16 single-stained cervical cytology preparations requires identification of p16 immunoreactive cells and further classification of these cells regarding signs of morphologic abnormalities [2-4].

The combined simultaneous detection of p16 and the proliferation marker Ki-67 within the same cell by ICC has been shown to be a valuable tool to identify dysplastic cervical cells in cytology preparations without the need for morphologic interpretation [3,6,7]. Ki-67 is a nuclear and nucleolar protein strictly associated with cell proliferation and is undetectable by standard immunostaining methods in resting (G₀) cells [8]. Under normal physiologic conditions, expression of the proliferation-associated protein Ki-67 is mutually exclusive of the anti-proliferative protein p16. In contrast, cells where the retinoblastoma protein (pRB)-mediated pathway controlling the cell-cycle progression is abrogated upstream of the tumor suppressor function of p16 (such as in epithelial cells expressing the high-risk HPV E6/E7 oncoproteins) may proliferate and thus may express Ki-67 in the presence of functional p16 [2,3].

Therefore, the detection of individual cells in cervical cytology preparations that simultaneously co-express p16 and Ki-67 may serve as a morphology-independent indicator of cells with cell cycle dysregulation and thus may be used as an indicator of the presence of transforming HPV infections and underlying cervical intraepithelial neoplasia [2,3]. In the recent past, numerous studies have been performed and published evaluating the potential value and clinical usefulness of p16/Ki-67 dual-stained cytology for the identification of women that may benefit from referral to colposcopy based on various primary cervical cancer screening results, including for the triage of women with Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance (ASC-US) or Low grade Squamous Intraepithelial Lesion (LSIL) Pap cytology results, women who are high-risk HPV positive in primary HPV screening, or women who are Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy (NILM)/HPV positive in clinical settings where Pap cytology/HPV co-testing is used for primary screening [6,7;9-25].

Principle of Procedure

The CINtec® *PLUS* Kit contains a set of reagents for the immunocytochemical detection of the p16^{INK4a} and Ki-67 antigens. The kit is designed to perform a two-step immunocytochemical staining procedure for cytological specimens obtained from the cervix uteri. For the detection of the antigens, a primary monoclonal mouse antibody clone E6H4™ directed to human p16^{INK4a} protein and a primary monoclonal rabbit antibody clone 274-11 AC3V1 directed against human Ki-67 protein are used.

Ready-to-use visualization reagents comprising (i) a polymer reagent conjugated to horseradish peroxidase and goat anti-mouse Fab' antibody fragments, and (ii) a polymer reagent conjugated to alkaline phosphatase and goat anti-rabbit Fab' antibody fragments are used. The visualization reagents have been subjected to solid-phase absorption to eliminate cross reactivity with human immunoglobulins.

The chromogen reactions are based on horseradish peroxidase-mediated conversion of a DAB chromogen, and alkaline phosphatase-mediated conversion of Fast Red chromogen to visible reaction products at the respective antigen sites. After counterstaining, a two step mounting protocol must be applied: in a first step, an aqueous mounting of the specimens using an aqueous mounting medium provided with the kit must be used. Subsequently, the slides may be cover-slipped using e.g. a permanent mounting medium. The results can be evaluated by light microscopy inspection.

IV. Reagents

Materials Provided

The materials listed below are included in each kit and are sufficient to perform 50 tests. The number of tests is based on the use of 200 µL of the reagents per slide.

1 Peroxidase Blocking Reagent

Peroxidase Blocking Reagent

11.5 mL, ready-to-use

3% hydrogen peroxide, containing 15 mmol/L sodium azide (NaN₃).

2 Primary Antibodies Solution

Primary Antibodies Solution

11.5 mL, ready-to-use

Monoclonal mouse anti-Human p16^{INK4a} antibody, Clone E6H4™, and monoclonal rabbit anti-Human Ki-67 antibody Clone 274-11 AC3, supplied in 50 mM Tris buffer pH 7.2, containing 15 mmol/L sodium azide (NaN₃) and stabilizing protein.

3 Visualization Reagent HRP

Visualization Reagent HRP

11.5 mL, ready-to-use



Warning

H317 May cause an allergic skin reaction.

P261 Avoid breathing dust/ fume/ gas/ mist/ vapours/ spray.

P272 Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace.

P280 Wear protective gloves.

P333 + P313 If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/ attention.

P362 + P364 Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

P501 Dispose of contents/ container to an approved waste disposal plant.

Contains

26172-54-3 2-methyl-2H-isothiazol-3-one hydrochloride

55965-84-9 reaction mass of: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

Polymer reagent conjugated with horseradish peroxidase and affinity purified goat anti-Mouse Fab' antibody fragments, supplied in stabilizing solution comprising preservatives and stabilizing protein.

Contains 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane that may produce an allergic reaction.

4 Visualization Reagent AP

Visualization Reagent AP

11.5 mL, ready-to-use



Warning

H317 May cause an allergic skin reaction.

P261 Avoid breathing dust/ fume/ gas/ mist/ vapours/ spray.

P272 Contaminated work clothing should not be allowed out of the work-

place.

P280 Wear protective gloves.

P333 + P313 If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/ attention.

P362 + P364 Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

P501 Dispose of contents/ container to an approved waste disposal plant.

Contains 26172-54-3 2-methyl-2H-isothiazol-3-one hydrochloride

Polymer reagent conjugated with alkaline phosphatase and affinity purified goat anti-rabbit Fab' antibody fragments, supplied in stabilizing solution comprising preservatives and stabilizing protein.

Contains 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane that may produce an allergic reaction.

5

DAB Buffered Substrate

DAB Buffered Substrate

16.0 mL,

Substrate buffer solution, pH 7.5, containing < 0.1% hydrogen peroxide, stabilizers and enhancers.

6

DAB Chromogen

DAB Chromogen

0.85 mL, 3,3'-diaminobenzidine chromogen solution.



Danger

H314 Causes severe skin burns and eye damage.

H341 Suspected of causing genetic defects.

H350 May cause cancer.

P201 Obtain special instructions before use.

P280 Wear protective gloves/ protective clothing/ eye protection/ face protection.

P303 + P361 + P353 IF ON SKIN (or hair): Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water.

P304 + P340 + P310 IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing. Immediately call a POISON CENTER/doctor.

P305 + P351 + P338 + P310 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. Immediately call a POISON CENTER/doctor.

P308 + P313 IF exposed or concerned: Get medical advice/attention.

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

NOTE: Consult Federal, State, or local regulations for disposal.

7 **Naphthol Phosphate Substrate**

Naphthol Phosphate Substrate

25.0 mL,

Substrate buffer solution, pH 9.2 containing Naphthol AS-TR Phosphate Substrate, stabilizers and enhancers.

8 **Fast Red Chromogen**

Fast Red Chromogen

1.33 mL, Fast Red chromogen solution.



Danger

H314 Causes severe skin burns and eye damage.

P280 Wear protective gloves/ protective clothing/ eye protection/ face protection.

P301 + P330 + P331 IF SWALLOWED: Rinse mouth. Do NOT induce vomiting.

P303 + P361 + P353 IF ON SKIN (or hair): Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water.

P304 + P340 + P310 IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing. Immediately call a POISON CENTER/doctor.

P305 + P351 + P338 + P310 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. Immediately call a POISON CENTER/doctor.

P501 Dispose of contents/ container to an approved waste disposal plant.

9 **Epitope Retrieval Solution 10 x**

Epitope Retrieval Solution 10 x

500 mL, 100 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 9.0, containing 15 mmol/L sodium azide (NaN_3).

10 **CINtec® PLUS Mount**

CINtec® PLUS Mount

18.0 mL, aqueous based permanent mounting medium for the permanent preservation of slide preparations stained with peroxidase and alkaline phosphatase based visualization systems. Contains 7.7 mmol/L sodium azide (NaN_3)

Storage

Store at 2 – 8 °C. Do not use after the expiration date. No data has been generated respective to the storage of the reagents under any conditions other than those stated above.

After opening, kit components are stable for 6 months if stored at 2 – 8 °C. Solutions must be discarded if cloudy in appearance.

The CINtec® *PLUS* Mount vial (Vial 10) should be removed from the kit box after the kit has been opened for the first time and may be further stored at ambient temperature (2 – 30°C).

Diluted Wash Buffer and diluted Epitope Retrieval Solution are stable for up to one month if stored at 2 – 8 °C to reduce viscosity and to facilitate usage. Solutions must not be used if cloudy in appearance.

Materials and Reagents Required but not Provided

CINtec® Wash Buffer 10X to be used with the CINtec® *PLUS* Kit is available under catalog number 06595421001 (8557) from Roche but is not included in the kit. For order details please refer to the website www.roche.com.

500 mmol/L Tris buffer solution with 1.5 mol/L NaCl, pH 7.6, containing detergent and an antimicrobial agent.



Warning

H317 May cause an allergic skin reaction.

P261 Avoid breathing dust/ fume/ gas/ mist/ vapours/ spray.

P272 Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace.

P280 Wear protective gloves.

P333 + P313 If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/ attention.

P362 + P364 Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

P501 Dispose of contents/ container to an approved waste disposal plant.

Contains 55965-84-9 Mixture of: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-methyl-2H -isothiazol-3-one (3:1)

Alcohol-free hematoxylin for counterstaining;

Distilled or deionized water;

PreservCyt® Solution; may be required to prepare ThinPrep® slides from residual sample volume remaining in the original ThinPrep® vial. Sample volume must be at least 17 ml to prepare another slide according to the ThinPrep® 2000 System Operator's Manual, Instrument Troubleshooting, pg. 6.27;

SurePath™ Preservative Fluid; is required for preparing SurePath slides intended for CINtec *PLUS* Cytology staining. See section VI. Procedures, Cytological Specimen Preparations for details;

Ethanol, 99%

Xylene-based mounting medium for glass coverslipping;

Slides: SuperFrost® *PLUS*, ThinPrep® Microscopy Slides; BD SurePath™ PreCoat slides

Xylene;

Glass or film coverslips;

Process controls e.g. ThinPrep® slides produced from the residual specimen vial:

- Positive control: ThinPrep® slide from (pooled) specimen(s) with Pap

cytology result confirmed as High-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL);

- Negative control: ThinPrep® slide from (pooled) specimen(s) with Pap cytology result confirmed as Negative for intraepithelial lesion or malignancy (NILM).

Equipment Required

Light microscope (10 - 40x objective magnification);

Heat resistant staining jars (plastic);

Measuring cylinders;

Squirt bottle (to be filled with wash buffer);

Timer (capable of 30 seconds - 60 minutes intervals);

Water bath with lid (capable of maintaining Epitope Retrieval Solution at 95 – 99°C);

Thermometer;

Optional: Drying oven capable of maintaining a temperature of 37 or 60°C;

Optional: Drying oven capable of maintaining a temperature of 37 or 60°C;

Optional: Dako or LabVision Autostainer instrument;

V. Warnings and Precautions

Warning

1. Caution! Some of the reagents comprised in this kit contain hazardous chemicals. When handling the components of this kit, adhere to safety precautions for handling hazardous laboratory reagents.
2. Components 1, 2, 9 and 10 of this product contain sodium azide (NaN_3), which is highly toxic in its pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.
3. Components 2, 3 and 4 contain material of animal origin. Adhere to proper handling procedures as is applicable to any product derived from biological sources.
4. Safety Data Sheet for the kit is available upon request.
5. When handling and disposing of cytological specimens, including all specimens before and after fixation, as well as all materials exposed to them, adhere to the safety precautions for handling potentially infectious material as well as applicable waste disposal requirements.
6. Never pipette reagents by mouth. Avoid contacting the skin and mucous membranes with reagents and specimens. In the event that reagents or specimens come in contact with skin or mucous membranes, wash with copious amounts of water.
7. The Visualization reagents, DAB Chromogen and Fast Red Chromogen may be affected adversely if exposed to excessive light levels. Do not store kit components or perform staining in strong light, such as direct sunlight.

8. Wear appropriate personal protective equipment to avoid contact with eyes and skin when handling any of the components included or to be used in conjunction with the CINtec® PLUS Kit. Refer to the Safety Data Sheet for additional information.
9. Product safety labeling primarily follows EU GHS guidance.

Caution

1. For in vitro diagnostic use.
2. For professional use only.
3. Minimize microbial contamination of reagents to avoid non-specific staining.
4. Incubation times, temperatures, or methods other than those specified may give erroneous results.
5. Do not use the kit if the packaging of any of its components is damaged. Should packaging be compromised or components damaged, please notify the manufacturer without delay.
6. Disposal of all waste materials must be in accordance with local guidelines and regulations.
7. All reagents are formulated specifically for use with this test. In order for the test to perform as specified, no substitutions should be made.
8. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the CINtec® PLUS Kit is suspected, immediately refer to the contact information provided in section XII. for further information on technical support.
9. Malfunction of the product due to handling problems or to instability does not result in obvious signs. Therefore, as a quality control measure, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens.

VI. Procedures

Cytological Specimen Preparations

Cytological specimens must be adequately handled to preserve the specimens for immunocytochemical procedures. All specimens should be subjected to standard methods of cell processing.

ThinPrep® (Hologic™ Inc.) slides prepared on a ThinPrep® 2000 Processor (Hologic™ Inc.) according to the manufacturer's protocol, BD SurePath™ (BD Diagnostics) slides prepared according to the manufacturer's protocol, as well as manually prepared slides (conventional smears) are suitable for use.

Notes:

1. ThinPrep® sample preparation:

Please note that the use of the ThinPrep® 3000 Processor is not recommended, as the spray fixation procedure provided by the instrument may lead to substantial cell loss.

2. BD SurePath™ sample preparation:

As it has been occasionally reported that storing the residual cell material

after the enrichment process in water may have a negative impact on the intensity of the immunocytochemical signal, we strongly recommend to follow the instructions outlined below when preparing slides for CINtec® PLUS testing to avoid any risk of signal loss:

- a. Slide preparation **directly** after processing the Pap slide
 - i. A second slide for each case can be prepared immediately after the Pap staining of the corresponding BD SurePath™ slide is completed.
 - ii. Place a second set of labeled slides into slide racks.
 - iii. On the PrepStain™ using the GYN version 1.1 or 1.2, Slide Preparation, select program „Transfer only“.
- b. Slide preparation **from the enriched cell pellet** after preparation of Pap slide at a later time
 - i. Remove the tube racks from the PrepStain™ System and add approximately 2 mL of BD SurePath™ Preservative Fluid to each tube.
 - ii. Cap each tube and store at room temperature for up to 4 weeks or refrigerated (2 – 8°C) for up to 6 months.
 - iii. If a slide for CINtec® PLUS is to be made on a stored sample, allow the sample to adapt to room temperature for 1 hour. Start with the second centrifugation step of the GYN Enrichment Process and carry through the remainder of the Prep procedure.
- c. Slide preparation **from left-over sample material** remaining in the original sample vial (approximately 2 mL)
 - i. Add 8mL of BD SurePath™ Preservative Fluid to the residual sample in the BD SurePath™ vial (approx. 2 mL).
 - ii. The diluted sample should be processed on the PrepMate™ using the standard technique and on the PrepStain™ using the GYN version 1.1 or 1.2, Slide Preparation, program „Transfer only“.

Immediately after preparation, ThinPrep® or BD SurePath™ slides should be fixed in 99% ethanol for 10 minutes to 1 hour and air-dried for 20 minutes to 16 hours (over night). **ThinPrep® or BD SurePath™ cytology preparation must not be fixed with cytological spray fixation reagent containing polyethylene glycol (e.g. Merckofix®, Merck).**

Conventional smears should be fixed with cytological spray fixation reagent containing polyethylene glycol (e.g. Merckofix®, Merck) immediately after sample collection.

Before beginning the immunostaining procedure, all specimens must be rehydrated following specific protocols described in Section 2.1.

NOTE: Ethanol with minimal impurities is needed for fixation of ThinPrep® liquid based cytology slides to prevent background staining. During the preparation of ThinPrep® slides that are intended to be used for immunostaining renew the ethanol bath after fixation of every 25 ThinPrep® slides.

Heat-induced epitope retrieval treatment of specimens prior to staining

Heat-induced epitope retrieval (HIER) using the Epitope Retrieval Solution included in the kit is necessary for optimal assay performance. Deviation from the described procedure may affect results!

For heat-induced epitope retrieval, the cytological specimen must be heated by immersing into the Epitope Retrieval Solution in a calibrated water bath capable of maintaining the Epitope Retrieval Solution at a temperature of 95 – 99°C. Laboratories located at higher elevations should determine the best method of maintaining the required water bath temperature. Manufacturer does not recommend any deviation from the procedure described herein.

After heat-induced epitope retrieval, the cytological specimen must be kept at ambient temperature for 20 minutes or longer until the temperature has cooled down to 50°C or below before further processing. Thereafter, staining of the cytological specimen must be performed without delay.

Slide Staining Procedures

The kit contains reagent volume which is sufficient to perform 50 tests. The number of tests is based on the use of 200 µL of the reagents per slide.

200 µL per slide is recommended to process ThinPrep® or BD SurePath™ cytological preparations on Dako or LabVision Autostainer instruments (two drop zones per slide with 100 µL each).

To ensure complete coverage of conventional smears on Dako or LabVision Autostainer instruments the use of 300 µL per slide (100 µL for all three available drop zones) is recommended.

1. Reagent Preparation

It is recommended to prepare the following reagents, except the Fast Red working solution, before starting with the staining procedure. All reagents should be equilibrated to room temperature (20 – 25°C) prior to immunostaining.

1.1 Epitope Retrieval Solution

Prepare the amount of Epitope Retrieval Solution sufficient for the staining procedure that is planned by dilution of a quantity of Vial 9 (Epitope Retrieval Solution 10 x) 1:10 using distilled or deionized water.

After dilution, the Epitope Retrieval Solution may be stored at 2 – 8°C for up to one month. The diluted solution must be discarded if it is cloudy in appearance.

NOTE: Use of water with elevated levels of ions for dilution of the epitope retrieval solution may significantly reduce the staining performance of the test. Please make sure that the water used is properly distilled or deionized (i.e. ensure that your ion exchange column for producing deionized water has been checked by routine maintenance). **Do NOT use tap water!**

1.2 Wash Buffer

Use Wash Buffer (10 x), Catalog number 06595413001 (8557), provided by Roche mtm laboratories AG in combination with the CINtec® PLUS Kit. For order details please refer to the website www. Roche.com.

Prepare an amount of Wash Buffer sufficient for the wash steps of the staining procedure that is planned by diluting of a quantity of the Wash Buffer (10 x) 1:10 using distilled or deionized water.

After dilution the Wash Buffer may be stored at 2 – 8°C for up to one month. The diluted solution must be discarded if it is cloudy in appearance.

1.3 Substrate-Chromogen Solutions (DAB and Fast Red)

Ensure that both Chromogenes and Substrates are equilibrated to room temperature (20 – 25°C). Addition of excess Chromogen to the Substrate will result in deterioration of the positive signal.

A) Preparation of the DAB working solution prior to the staining run

The DAB working solution is stable for 8 hours after preparation.

Prepare the DAB working solution as follows:

- i) Transfer 1 mL of the DAB Substrate Solution (Vial 5) into a clean reaction tube;
- ii) Add one drop (25 – 30 µL) of the DAB Chromogen (Vial 6) and mix gently by inverting the tube (do not vortex);
- iii) When using the Autostainer, transfer the DAB working solution into an Autostainer Reagent Vial before starting the staining run and load it on the appropriate Autostainer rack position.

B) Preparation of the Fast Red working solution directly before use

Prepare the Fast Red working solution directly before use, as otherwise decreased staining intensity and thus loss of sensitivity may result. Do not vortex the Fast Red working solution as this may result in formation of precipitates.

Prepare the Fast Red working solution as follows:

- i) Transfer 1 mL of the Naphthol Phosphate Substrate Solution (Vial 7) into a clean reaction tube;
- ii) Add one drop (40 – 45 µL) of the Fast Red Chromogen (Vial 8) and mix gently by inverting the tube (do not vortex);
- iii) When using the Autostainer, prepare the Fast Red working solution when requested by the Autostainer software. Then transfer the working solution into an Autostainer Reagent Vial and load it on the appropriate Autostainer rack position. Avoid delay of the “substrate batch” step during the Autostainer run to minimize the risk of drying artefacts.

1.4 Counterstain

The DAB and Fast Red staining reactions result in water insoluble coloured end-product (DAB: brown; Fast Red: red).

NOTE: Alcohol-free hematoxylin must be used for counterstaining, as the use of alcohol may negatively impact the intensity of the signal generated by the Fast Red, or remove it completely. If used, adhere to the instructions provided by the supplier of the hematoxylin for performing the counterstaining.

1.5 Mounting Medium

For mounting slide specimens after staining a two-step mounting procedure is

needed as described below.

First CINtec® *PLUS* Mount (Vial 10), an aqueous-based permanent mounting medium, is applied manually in a thin coat and allowed to dry (“liquid coverslipping”). In a second step a glass coverslip is applied onto the dried surface of the aqueous mounting media using xylene-based mounting medium.

Equilibrate CINtec® *PLUS* Mount at room temperature before use and store it at ambient temperature for further use.

2. Staining Procedure

The CINtec® *PLUS* Kit has been validated for use on Autostainer Instruments (LabVision Autostainer 480 or Dako Autostainer PLUS) according to the template outlined below (see Section 2.3.1). It may be possible to use other instruments or systems with comparable function after appropriate validation by the user.

Prior to staining, the specimens and reagents should be prepared as stated in Sections 1.1-1.3 and 2.1.

All reagents should be equilibrated to ambient temperature (20 – 25°C) prior to performing the immuno-staining procedure.

Likewise, all steps should be performed at ambient temperature. Do not allow specimens to dry during the staining procedure. Dried specimens may display increased non-specific staining. If prolonged incubations are used, place specimens in a humid environment.

2.1 Specimen rehydration

For all cytological specimens a rehydration step is necessary prior to staining. This step should be performed at ambient temperature (20 - 25°C).

A) ThinPrep® liquid based cytology slides & conventional smears

- Place slides in distilled or deionized water and incubate for 10 (±3) minutes;
- Commence staining procedure as outlined in Section 2.2, Step 1: Epitope retrieval.

B) BD SurePath™ cytology slides

Alcohol fixed BD SurePath™ cytology slides have to undergo a special rehydration procedure to make specially coated glass slides compatible with liquid coverslip medium.

- Make sure that the slides have been completely air-dried;
- Place slides in a fresh bath of 100% xylene (use xylene-resistant jars); dip the slides a couple times and incubate for 2 minutes;
- Transfer the slides into a fresh bath of 99% ethanol and incubate for 2 minutes;
- Transfer the slides into a fresh bath of 70% ethanol and incubate for 2 minutes;
- Transfer the slides in distilled or deionized water and incubate for 2 minutes

Note: Replace the baths used for the dehydration after processing of 50 slides or once a week if a smaller quantity of slides is processed.

2.2 Epitope Retrieval

A) ThinPrep® liquid based cytology slides & conventional smears:

- Fill heat resistant staining jars (plastic) with the diluted Epitope Retrieval Solution (see Procedure, Section 1.1);
- Place staining jars containing Epitope Retrieval Solution in water bath and heat water bath and the Epitope Retrieval Solution to 95 – 99°C. The temperature has to be measured inside the staining jars. It is important to adjust the level of the water in the water bath to make sure that the jars are immersed in the water to a level of 80%. To stabilize the temperature and avoid evaporation, cover jars with lids;
- When the temperature of 95 – 99°C has been reached immerse the re-hydrated cytology slides into the preheated Epitope Retrieval Solution in the staining jars; this step usually will lower the temperature in the jars to less than 90°C. Keep the temperature probe in the jars and close the lid of the staining jars as good as possible.
- Bring the temperature of the water bath and the Epitope Retrieval Solution in the jars back to 95 – 99°C; check the temperature of the Epitope Retrieval Solution in the jars;
- Incubate for 10 (±1) minutes at 95 – 99°C; start counting down only after the temperature of the Epitope Retrieval Solution in the jars has been verified to have reached a temperature of 95 – 99°C;
- Remove the entire jar with slides from the water bath;
- Remove the lid off the staining jars and allow the slides to cool in the Epitope Retrieval Solution for 20 (±1) minutes at ambient temperature until it has reached 50°C or below;
- Transfer the slides into a staining jar filled with Wash Buffer (see Procedure, Section 1.2) and incubate for 5 (±1) minutes prior to loading the slides onto the programmed Autostainer instrument.

B) BD SurePath™ cytology slides

- Fill heat resistant staining jars (plastic) with the diluted Epitope Retrieval Solution (see Procedure, Section 1.1). Please note that when using jars that are not made of heat-resistant plastic, but e.g. metal or heat-resistant glass the time for the epitope retrieval must be modified on an individual basis;
- Immerse slides into the cold Epitope Retrieval Solution; close the lid of the staining jar;
- Place the staining jar in a cold water bath and bring the temperature of the water bath and the Epitope Retrieval Solution to 95 – 99°C and incubate for 15 minutes as soon as the temperature has been reached; please note that the time period for heating up the solution to 95 – 99°C should be no longer than 40 minutes at maximum;
- Remove the entire jar with slides from the water bath;
- Remove the lid off the staining jars and allow the slides to cool in the Epitope Retrieval Solution for 20 (±1) minutes at ambient temperature until it has reached 50°C or below;
- Transfer the slides into a staining jar filled with Wash Buffer (see Procedure,

Section 1.2) and incubate for 5 ($\pm$ 1) minutes prior to loading the slides onto the programmed Autostainer instrument.

NOTE: The Epitope Retrieval Solution is designed for single use application only. Do not re-use.

2.3 Staining Protocols

2.3.1 Staining Protocol for Autostainer Instruments (Dako, LabVision)

Prior to the first application of the CINtec® *PLUS* Kit on an Autostainer Instrument, a new template needs to be set up and the CINtec® *PLUS* Kit reagents need to be added to the Autostainer “Reagent List”. Please refer to the Operator’s Manual for the dedicated Autostainer Instrument.

The use of 200 μ L per slide is recommended to process ThinPrep® or BD SurePath™ cytological preparations. For conventional smears on Dako or LabVision Autostainer instruments the use of 300 μ L of the reagents per slide may be required.

The following is an outline of the program run:

Program Step	ThinPrep® cytological preparations & Conventional Smears	BD Surepath™ cytological preparations
1	rinse*	rinse*
2	Peroxidase-Blocking Reagent 5 minutes	Peroxidase-Blocking Reagent 5 minutes
3	rinse*	rinse*
4	Primary Antibodies Solution 30 minutes	Primary Antibodies Solution 30 minutes
5	rinse*	rinse*
6	Visualization Reagent HRP 15 minutes	Visualization Reagent HRP 15 minutes
7	rinse*	rinse*
8	rinse*	rinse*
9	rinse*	rinse*
10	Visualization Reagent AP 15 minutes	Visualization Reagent AP 15 minutes
11	rinse*	rinse*
12	rinse*	rinse*
13	rinse*	rinse*
14	switch	switch
15	“Substrate” step: DAB 10 minutes	“Substrate” step: DAB 10 minutes
16	rinse with distilled or deionized water	rinse with distilled or deionized water
17	rinse*	rinse*
18	“Substrate-batch” step: Fast Red 15 minutes	“Substrate-batch” step: Fast Red 15 minutes
19	rinse*	rinse*
20	---	For LabVision Autostainer: “Substrate-batch” step: Fast Red 15 minutes For Dako Autostainer: “Substrate” step: Fast Red 15 minutes
21	----	rinse*
22	rinse with distilled or deionized water	rinse with distilled or deionized water
23	switch	switch

*use Wash Buffer for the respective rinsing steps.

NOTE: If the Autostainer Instrument that is used for the staining procedure rinses slides with buffer, the slides must be rinsed with distilled or deionized water after they have been removed from the Autostainer.

Subsequent to programming proceed as follows:

- Transfer the reagents from the kit bottles into Autostainer Reagent Vials. Use the Autostainer-generated map for program times and reagent volumes;
- Place the Autostainer reagent vials into the Autostainer Reagent Rack according to the “Reagent Layout Map”;
- Load the slides onto the Autostainer according to the “Slide Layout Map” and rinse the slides with Wash Buffer to prevent specimen from drying out.

2.4 Counterstaining with Hematoxylin

- Immerse slides in a bath of **alcohol-free hematoxylin**. Incubate for 2 - 10 minutes, depending on the potency of the alcohol-free hematoxylin used;

NOTE: The use of alcohol-free hematoxylin is absolutely mandatory.

- For bluing place slides in a tap water bath or alkaline solution such as a weak ammonia solution (NH₄OH, 0.08% in deionized water) and incubate for 30 seconds - 2 minutes;
- To ensure that all residual hematoxylin has been cleared, subsequently replace the tap water in the jar several times (3 – 5x) with fresh tap water until no stain residue can be observed any more;
- Briefly incubate slides in a bath of distilled or deionized water.

NOTE: Depending on the incubation length and potency of the hematoxylin used, counterstaining will result in a pale to dark blue coloration of the nuclei of the cells. Excessive or incomplete counterstaining may interfere with proper interpretation of results.

2.5 Mounting

To maintain optimal sensitivity and to prevent fading of Fast Red Chromogen a two-step mounting procedure is needed.

After counterstaining & bluing the slides will be mounted following a two-step protocol. Steps A and B have to be performed subsequently:

A) Liquid coverslipping

- Incubate slides in distilled or deionized water for at least 1 min;
- Remove slides from distilled or deionized water without further drying;
- Tap off excess liquid without allowing drying of specimens; carefully wipe the bottom side of the slides with a paper towel to remove water;
- Apply 4 drops of CINtec® PLUS Mount (1 drop corresponds to 35 – 40 µL of this aqueous mounting medium) per LBC slide and 8 drops per conventional smear, respectively. Avoid the generation of air bubbles. To prevent formation of tiny bubbles the first drop can be discarded onto a paper towel before applying CINtec® PLUS Mount on the specimen;

- Gently tilt and rotate the glass slide to generate a thin layer of mounting medium and to fully cover the specimen (Do NOT yet apply a glass or film coverslip!); check the distribution of the mounting medium on the slide by visual inspection;
- For drying place slides in a horizontal position:
 - Incubate ThinPrep® or BD SurePath™ samples at 37-60°C for 1 hour, or alternatively overnight at ambient temperature;
 - Incubate Conventional smears at 37°C for 4 hours, or at 60°C for 1 hour, or alternatively overnight at ambient temperature;

B) Glass or film coverslipping

- After complete drying of the aqueous mount, incubate slides in xylene for a minimum of 1 minute and up to a maximum of 20 minutes. Then, coverslip the slides using a xylene-based mounting medium.

NOTE: Sildes **must not** be dehydrated by ascending series of alcohol before being glass or film coverslipped.

- Let the xylene-based mounting medium dry at room-temperature;

NOTE: To minimize fading, protect slides from light and store at room temperature (20 – 25°C).

VII. Quality Control

Deviations from the recommended procedures for fixation and further processing of the cervical cytological specimens may produce substantial variability in results, necessitating regular performance of in-house controls.

Positive Control

Specimens processed in the same manner as the patient sample(s) should be used as positive controls. Positive controls are indicative of correctly prepared specimens and proper staining techniques. One positive control should be included in each staining run.

Known positive controls should only be utilized for monitoring the correct performance of processed specimens and test reagents, rather than as an aid in formulating a specific diagnosis of patient samples. If the positive controls fail to demonstrate appropriate positive staining, results with the test specimens should be considered invalid.

Negative Control

Use a negative control processed in a manner identical to the patient sample(s) with each staining run to verify the specificity of the staining procedure and to provide an indication of background staining. A variety of different cell types present in representative cervical cytology specimens and that are known to be negative for the expression of the p16^{INK4a} and Ki-67 antigens (such as e.g. superficial cells) may serve as an additional internal negative control to assess any background staining (this should be verified by the user).

Assay Verification

Prior to initial use of an antibody or staining system in a diagnostic procedure, the user should verify the antibody's specificity by testing it on a series of in-house specimens with known immunocytochemical performance characteristics represent-

ing known positive and negative specimens. Refer to the quality control procedures previously outlined in this section of the product insert and to the quality control requirements of the CAP Certification Program for Immunocytochemistry and/or CLSI (NCCLS) Quality Assurance for Immunocytochemistry, Approved Guideline.

VIII. Interpretation of Results

The CINtec® *PLUS* procedure causes two distinct coloured reaction products: a brown precipitate at the p16^{INK4a} antigen sites, and a red precipitate at the Ki-67 antigen sites. Brown staining of cells (cytoplasm and/or nuclei) indicates p16^{INK4a} over-expression. Red staining of cells (nuclei) indicates expression of Ki-67. Cells stained for both antigens exhibit brown cytoplasmic staining with typically pronounced red nuclei. A qualified pathologist/cytologist experienced in immunocytochemical procedures and trained on the interpretation of CINtec® *PLUS* stained slides must evaluate positive and negative controls before interpreting results. Interpretation of results must be made within the context of the patient's history and other diagnostic tests by a certified professional.

For the interpretation of cervical cytology slides stained with the CINtec® *PLUS* Kit the slides should be evaluated with regard to the presence of cervical epithelial cells showing both cytoplasmic brown and nuclear red staining indicative of simultaneous p16 and Ki-67 expression.

The presence of one or more cervical epithelial cells with co-localization of brown cytoplasmic immuno-staining AND red nuclear immuno-staining within the same cell is regarded as a positive CINtec® *PLUS* test result.

In case there is no cervical epithelial cell showing simultaneous brown cytoplasmic immuno-staining AND red nuclear immuno-staining the CINtec® *PLUS* test result is considered negative.

Please note that the presence of cervical epithelial cells that do show a single immuno-reactivity only for one of the two markers (such as e.g. brown staining for p16 only, or red staining for Ki-67 only) is not considered as a positive test result for the CINtec® *PLUS* Kit, even when both potential types of cervical cells showing single immuno-reactivity only are present in the same cytology slide.

In case of the presence of cells showing morphological signs of severe dyskaryosis, but no dual staining for p16 and Ki-67, morphological interpretation criteria should not be disregarded.

IX. Limitations

- For professional use only. Special training is required for the performance of immunocytochemical procedures.
- The clinical interpretation of any positive or negative staining should be evaluated within the context of clinical presentation and cytological criteria. The clinical interpretation of any positive or negative staining should be complemented by morphological studies using proper positive and negative controls as well as other diagnostic tests. It is the responsibility of a qualified pathologist/cytologist who is familiar with the proper use of antibodies, reagents, and methods to interpret all of the steps used to prepare and interpret the final immunocytochemistry preparation.
- The staining results in immunocytochemistry are strongly influenced by the quality of the cells stained. Accordingly, the appropriate handling of the protocol steps for fixation, washing, drying, or heating of the slides, as well as the avoidance of the use of reagents contaminated with bacteria

will significantly contribute to the overall result of the staining procedure. Deviations from the protocol may lead to artefacts, antibody trapping, or false-negative results. Inconsistent results may be due to variations in fixation or non-adequate sampling.

- Excessive or incomplete counterstaining may interfere with proper interpretation of results.
- The manufacturer provides these antibodies/reagents at optimal dilution for use according to the instructions provided herein, for immunocytochemistry testing on prepared liquid-based cytology (LBC) slides or conventional smears. Any deviation from the recommended test procedures may invalidate declared expected results; appropriate controls must be employed and documented. Users who deviate from the recommended test procedures must accept responsibility for interpretation of patient results under these circumstances.
- False-positive results may be seen due to non-immunological binding of proteins or substrate reaction products. They may also be caused by pseudoperoxidase activity (erythrocytes) and endogenous peroxidase activity (e.g. cytochrome C).
- Do not replace kit reagents with reagents carrying different lot numbers or with reagents from other manufacturers.

X. Troubleshooting

Refer to section XII. for contact details in case technical assistance is required.

Problem	Probable Cause	Suggested Action
1. No staining of slides	<u>1a.</u> Deviation from Instructions for Use;	<u>1a.</u> Carefully read Instructions for Use and adhere to the procedures outlined therein;
	<u>1b.</u> Reagent vials were not loaded in the correct locations in the reagent racks;	<u>1b.</u> Check the Reagent Map to verify the proper location of the reagent vials;
	<u>1c.</u> Insufficient reagent in vial;	<u>1c.</u> Ensure that enough reagent is loaded into the vials prior to commencing the run. Refer to Reagent Map for volumes required;
	<u>1d.</u> Missing Wash Buffer for Dako or LabVision Autostainers;	<u>1d.</u> Check that there is sufficient buffer. If not, then fill the container with buffer and prime the pump; Check if the clear plastic tubing around the syringe (placed on the left side of the moving arm) contains air bubbles - if so removal of the bubbles may solve the problem;
2. Weak staining of slides	<u>2a.</u> Inadequate epitope retrieval;	<u>2a.</u> Use freshly prepared Epitope Retrieval Solution and / or make sure that Epitope Retrieval Solution reaches 95 - 99°C for a full 10 minutes and is allowed to cool down for - additional 20 minutes; Ensure that no water slops over into the heat resistant staining jars during epitope retrieval procedure. Review 2.2 for recommendations;
	<u>2b.</u> Inadequate reagent incubation times;	<u>2b.</u> Review 2.3.1 / 2.3.2 Staining protocol recommendations;
	<u>2c.</u> Inappropriate fixation method;	<u>2c.</u> Ensure that cytology preparations are fixed as outlined in Section VII or that no alternative fixative was used;
	<u>2d.</u> Water that has been used to dilute the epitope-retrieval solution contains an ion concentration that is too high;	<u>2d.</u> Ensure that the ion exchange column for producing deionized water has been checked by routine maintenance;
	<u>2e.</u> Missing Wash Buffer for Dako or LabVision Autostainers;	<u>2e.</u> Refer to troubleshooting Section 1d;

3. No or weak Ki-67 staining (red) on positive control slides	3a. Use of alcohol containing Hematoxylin (e.g. Harris');	3a. Fast Red is soluble in EtOH therefore, the use of alcohol-free Hematoxylin is mandatory to prevent fading of Fast Red dye (Ki-67 signal);
	3b. Slides were dehydrated using ascending series of alcohol before being glass or film coverslipped;	3b. Follow the 2-step mounting protocol using CINtec <i>PLUS</i> Mount followed by permanent glass or film coverslipping; Review 2.5 for recommendations;
	3c. Fast Red working solution was not prepared according to the recommendations;	3c. Prepare Fast Red working solution immediately before use; apply the solution to the slides within 15 minutes of preparation, as otherwise a decrease in signal intensity and test sensitivity may occur;
4. Excessive background staining of slides	4a. Incomplete removal of spray fixation reagent (polyethylene glycol) when using conventional smears;	4a. Follow procedure as outlined in Section 2.1.;
	4b. Insufficient rinsing of slides;	4b. Use fresh solution in buffer baths and wash bottles; For Autostainer Instrument, ensure that before running the instrument is primed properly and that sufficient amounts of buffer are available for the whole run; use fresh solutions of buffers and reagents;
	4c. Drying of specimen during staining procedure;	4c. When using the Autostainer Instrument, ensure that the amount of reagent supplied is sufficient and that the hood of the instrument is closed during the run; Do not expose slides to elevated temperatures or to dry environment; Consider whether the programmed reagent volume and dispense location (drop zone) were adequate to cover all areas on a slide which contain cell materials; Check that there is sufficient buffer. If not, then fill the container with buffer and prime the pump; Check if the clear plastic tubing around the syringe (placed on the left side of the moving arm) contains air bubbles - if so removal of the bubbles may solve the problem; Avoid delay of the Fast Red working solution incubation step during autostainer run to minimize the risk of drying artefacts;

	<u>4d.</u> Inappropriate fixation method;	<u>4d.</u> Use only fixatives as recommended herein. Aberrantly fixed cells may exhibit excessive background staining;
	<u>4e.</u> Non-specific binding of reagents to cells;	<u>4e.</u> Check fixation method used for the specimen;
	<u>4f.</u> Drying of specimens during set up of Autostainer Instrument;	<u>4f.</u> Keep specimens covered with reagent (buffer) while initiating the run;
5. Excessively strong specific staining	<u>5a.</u> Inappropriate fixation method;	<u>5a.</u> Ensure proper fixative and fixation method;
	<u>5b.</u> Prolonged reagent incubation times;	<u>5b.</u> Review and adhere to staining protocol given in Sections 2.3.1 / 2.3.2 above;
	<u>5c.</u> Inappropriate wash solution;	<u>5c.</u> Use the Wash Buffer (catalog number 8557);
6. Evaluation of double-immuno-reactive cells not possible	<u>6a.</u> Hematoxylin counterstain too strong;	<u>6a.</u> Reduce incubation time for hematoxylin and/or bluing in tap water or ammonia water;
7. Glass or film coverslipping is not adequate	<u>7a.</u> Glass or film coverslip cannot be applied correctly;	<u>7a.</u> Prevent formation of air-bubbles when applying CIntec® PLUS Mount (aqueous coverslip); Adhere to recommended drying time for liquid coverslip;
8. Crack formation after mounting the slides with xylene-based mounting medium	<u>8a.</u> Insufficient drying of CIntec® PLUS Mount before mounting the slides with xylene-based mounting medium;	<u>8a.</u> Dry slides which have been covered with CIntec® PLUS Mount over night at room temperature or at least for 4h at 37°C. CIntec® PLUS Mount has to be dried completely.

XI. Symbols

Symbol:	Explanation:
	Catalog number
	Batch code
	Global Trade Item Number
	Unique Device Identifier
	In vitro diagnostic medical device
	Manufacturer
	Contains sufficient for <n> tests
	Consult instructions for use
	Use by
	Temperature limitation
	Date of manufacturing
	Do not re-use

XII. Manufacturer

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

Contact for technical support (Telephone): +800 5505 6606

XIII. Revision Status

The current Instructions for use represent Version 1.7 released July 2022.

Changes to previous version (1.6, released May 2021):

- III., Principle of Procedure: antibody clone 274-11 AC3 corrected to 274-11 AC3V1
- IV., Storage, CINtec® PLUS Mount: explanation added regarding storage at ambient temperature
- IV., Equipment Required: Autostainer added (previously already listed in VI., 2. Staining Procedure)
- VI., 1.5: Storage CINtec *PLUS* Mount: harmonised to ambient temperature (previously room temperature)
- VI., 2. Staining Procedure: clarified that only LabVision Autostainer and Dako Autostainer PLUS have been validated by manufacturer, but similar instruments may be validated by user
- Editorial changes

XIV. Intellectual Property

CINtec and E6H4 are trademarks of Roche.

All other trademarks are the property of their respective owners.

© 2022 Roche

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^{INK4a} y Ki-67 en preparaciones citológicas cervicales.

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.

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^{INK4a} 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 G1 a S y provoca la detención del ciclo celular durante el proceso de diferenciación celular. Por lo tanto, p16^{INK4a} 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^{INK4a} 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].

Principios del procedimiento

CINtec® *PLUS* Kit contiene un grupo de reactivos para la detección inmunocitoquímica de los antígenos p16^{INK4a} 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^{INK4a} 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 (NaN₃).

EUH210 Puede solicitarse la ficha de datos de seguridad.

2 Primary Antibodies Solution

Solución de anticuerpos primarios

11,5 mL, listo para su uso

Anticuerpo monoclonal de ratón antihumano p16^{INK4a}, clon E6H4 y anticuerpo monoclonal de conejo antihumano Ki-67, clon 274-11 AC3, suministrado en 50 mM de tampón Tris, pH 7,2, que contiene 15 mmol/L azida de sodio (NaN₃) 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.
Contiene 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxano y puede causar reacciones alérgicas.

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.

Contiene 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxano y puede causar reacciones alérgicas.

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

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

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, 100 mM de EDTA, pH 8,0, que contiene 15 mmol/L de azida de sodio (NaN_3).

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_3).

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 06595421001 (8557), pero está disponible en Roche. Para pedidos por favor visite la web www.roche.com.

500 mmol/L Tris Solución de tampón con 1.5 mol/L NaCl, pH 7.6, que contiene detergentes 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 Mixture of: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-methyl-2H - isothiazol-3-one (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 operador 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;

Etanol, 99%;

Medio de montaje con xileno para cubreobjetos de cristal;

Portaobjetos SuperFrost® PLUS, portaobjetos del sistema ThinPrep® para microscopios, portaobjetos del sistema BD 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.

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 (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 es-

pecificados 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 XII. 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.

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®:

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™:

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 BD 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 BD SurePath™ a cada tubo.
 - ii. Tape los tubos y los podrá almacenar a temperatura ambiente hasta 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 BD SurePath™ al material restante en el vial BD 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.

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 pre-

tenden 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 ThinPrep® o BD SurePath™ con el instrumento Dako o LabVision Autostainer (2 zonas de goteo por porta con 100 µL cada una).

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 con-

trolada durante el proceso de mantenimiento habitual). **¡NO use agua corriente!**

1.2 Tampón de lavado

Utilice el tampón de lavado (10x), referencia 06595421001 (8557), suministrado por Roche mtm laboratories AG conjuntamente con el CINTec® PLUS Kit. Para pedidos por favor visite la web 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 durante 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 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 riesgo de artefactos por sequedad.

1.4 Contratinción

El producto final coloreado de la reacción de tinción de DAB y Fast Red es insoluble 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). 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 la-

vado (véase Procedimiento, Sección 1.2) e incúbalos durante 5 ($\pm$ 1) minutos antes de introducir los portaobjetos en el Autostainer programado.

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 alcanzado 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 ($\pm$ 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 ($\pm$ 1) minutos antes de introducir los portaobjetos en el Autostainer programado.

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 μ L 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 μ L 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* (<i>Lavado</i>)	rinse* (<i>Lavado</i>)
2	Peroxidase-Blocking Reagent	Peroxidase-Blocking Reagent

	(Reactivo de bloqueo de la per-oxidasa) 5 minutos	(Reactivo de bloqueo de la per-oxidasa) 5 minutos
3	rinse* (Lavado)	rinse* (Lavado)
4	Primary Antibodies Solution (Solución de Anticuerpo Primario) 30 minutos	Primary Antibodies Solution (Solución de Anticuerpo Primario) 30 minutos
5	rinse* (Lavado)	rinse* (Lavado)
6	Visualization Reagent HRP (Reactivo de visualización HRP) 15 minutos	Visualization Reagent HRP (Reactivo de visualización HRP) 15 minutos
7	rinse* (Lavado)	rinse* (Lavado)
8	rinse* (Lavado)	rinse* (Lavado)
9	rinse* (Lavado)	rinse* (Lavado)
10	Visualization Reagent AP (Reactivo de visualización AP) 15 minutos	Visualization Reagent AP (Reactivo de visualización AP) 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 (Paso "Sustrato": DAB) 10 minutos	"Substrate" step: DAB (Paso "Sustrato": DAB) 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 (Paso "petición de sustrato": Fast Red) 15 minutos	"Substrate-batch" step: Fast Red (Paso "petición de sustrato": Fast Red) 15 minutos
19	rinse* (Lavado)	rinse* (Lavado)
20	---	Autostainer LabVision: "Substrate-batch" step: Fast Red (Paso "petición de sustrato": Fast Red) 15 minutos Autostainer Dako: "Substrate" step: Fast Red (Paso "Sustrato": Fast red) 15 minutos
21	----	rinse* (Lavado)
22	rinse (con agua destilada o desio-	rinse (con agua destilada o desio-

	nizada)	nizada)
23	switch (<i>Cambio</i>)	switch (<i>Cambio</i>)

* 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.

2.4. 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 amoniacal débil (NH₄OH, 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^{INK4a} 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 analizando 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^{INK4a} 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^{INK4a}. 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 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 do-

cumentar 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).
- No sustituya los reactivos del kit por otros reactivos con números de catálogos diferentes o por reactivos de otros fabricantes.

X. Solución de problemas

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

Problema	Causa probable	Solución sugerida
1. No se produce tinción de los portaobjetos.	1a. No se han seguido los pasos de las instrucciones de uso correctamente;	1a. Lea atentamente las instrucciones de uso y siga los procedimientos descritos;
	1b. Los viales de los reactivos no se cargaron correctamente en los lugares correctos en los racks de reactivos;	1b. Compruebe el Reagent Map para verificar que los viales de reactivos están en el sitio adecuado;
	1c. Insuficiente reactivo en el vial;	1c. Asegúrese de que haya reactivo suficiente cargado en los viales antes de comenzar la sesión. Consulte en el Reagent Map los volúmenes necesarios;
	1d. Falta de tampón de lavado para Dako o LabVision Autostainers;	1d. 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;
2. Se produce una tinción débil de los portaobjetos.	2a. La recuperación del epítipo no ha sido adecuada;	2a. 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;
	2b. Los tiempos de incubación de los reactivos no han sido adecuados;	2b. Revise las recomendaciones del protocolo de tinción indicadas en las secciones 2.3.1/2.3.2;
	2c. El método de fijación utilizado no es adecuado;	2c. 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;

	2d. El agua empleada para diluir la solución de recuperación del epítipo presenta una concentración iónica demasiado alta;	2d. Cerciérese de que la columna de intercambio iónico haya sido controlada durante el proceso de mantenimiento rutinario;
	2e. Falta de tampón de lavado para Dako o LabVision Autostainers;	2e. Consulte la solución del problema de la sección 1d;
3. No se produce tinción Ki-67 (rojo) o sólo una tinción débil de los portaobjetos positivos de control	3a. Empleo de una hematoxilina con alcohol (p.ej. Harris');;	3a. 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);
	3b. Deshidratación de los portaobjetos con series ascendentes de alcohol antes de cubrirse con cristal o lámina;	3b. 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;
	3c. La solución de tratamiento Fast Red no se ha preparado siguiendo las recomendaciones;	3c. 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;
4. La tinción de fondo de los portaobjetos es excesiva.	4a. No se ha eliminado todo el reactivo de fijación pulverizable (polietilenglicol) en caso de uso de frotis convencionales;	4a. Siga el procedimiento descrito en la sección 2.1.
	4b. No se han lavado o enjuagado bien los portaobjetos;	4b. 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;

	4c. Se han secado las muestras durante el procedimiento de tinción;	4c. 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; 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; Cerciórese que la cantidad de tampón sea la adecuada. Si no fuera así, llene el depósito con tampón 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; 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;
	4d. Se ha utilizado un método de fijación inadecuado;	4d. Asegúrese que se ha utilizado un agente de fijación recomendado. Otros agentes de fijación pueden causar una tinción de fondo excesiva;
	4e. Se ha producido una unión inespecífica de los reactivos a las células;	4e. Compruebe el método de fijación de la muestra;
	4f. Las muestras se han secado durante la configuración del Autostainer;	4f. Asegúrese de que las muestras permanezcan cubiertas con reactivo (tampón) mientras configura la sesión;

5. La tinción específica es excesivamente fuerte.	5a. Se ha utilizado un método de fijación inadecuado;	5a. Asegúrese de que se han utilizado los agentes y los métodos de fijación adecuados;
	5b. Los tiempos de incubación de los reactivos son demasiado prolongados;	5b. Revise y siga las recomendaciones del protocolo de tinción indicadas en las secciones 2.3.1 / 2.3.2;
	5c. Se ha utilizado una solución de lavado inadecuada;	5c. Utilice el tampón de lavado (referencia 8557);
6. La evaluación de las células inmunoreactivas dobles no es posible	6a. La contratinción con hematoxilina ha sido demasiado fuerte;	6a. Reduzca el tiempo de incubación de la hematoxilina y/o lavado en el paso del viraje a azul con agua corriente o agua amoniacal;
7. El cubreobjetos de cristal o lámina no es el adecuado	7a. El cubreobjetos de cristal o lámina no se puede aplicar de la manera correcta;	7a. Evite la formación de burbujas de aire mientras aplica CINtec® PLUS Mount (cubreobjetos acuoso); Observe el tiempo de secado recomendado para cubreobjetos líquidos;
8. Formación de grietas después del montaje de los portaobjetos con un medio de montaje a base de xileno	8a. Secado insuficiente de CINtec® PLUS Mount antes del montaje de los portaobjetos con un medio de montaje a base de xileno;	8a. 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.

XI. 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

XII. Fabricante

Fabricado por:

Roche mtm laboratories AG
 Sandhofer Straße 116
 68305 Mannheim
 Alemania
www.roche.com
<https://dialog.roche.com>
 +800 5505 6606

Contacto del soporte técnico (Teléfono):

XIII. Estado de la revisión

Las instrucciones de uso actuales pertenecen a la Versión 1.7 publicada en julio de 2022.

Cambios a la versión anterior (1.6, publicados en mayo de 2021):

- III., Principio del procedimiento: clon del anticuerpo 274-11 AC3·se ha corregido con 274-11 AC3V1
- IV., Almacenamiento, montaje en CINtec® PLUS: se ha añadido una explicación sobre el almacenamiento a temperatura ambiente
- IV., Equipo necesario: se han añadido los sistemas Autostainer (enumerados ya previamente en VI., 2. Procedimiento de tinción
- VI., 1.5: Almacenamiento del montaje en CINtec® PLUS: se ha unificado al término temperatura ambiente
- VI., 2. Procedimiento de tinción: se ha aclarado que el fabricante únicamente ha validado los sistemas LabVision Autostainer y Dako Autostainer PLUS, pero que es posible utilizar instrumentos equivalentes que haya validado el usuario

XIV. Propiedad intelectual

CINtec y E6H4 son marcas registradas de Roche.

Todas las demás marcas comerciales pertenecen a sus respectivos propietarios.

© 2022 Roche

FRANÇAIS

I. Nom du produit

CINtec® PLUS Kit

II. Utilisation prévue

Pour utilisation en diagnostic in vitro.

Le CINtec® PLUS Kit est un test immunocytochimique permettant la détection qualitative simultanée des protéines p16^{INK4a} et Ki-67 dans les préparations cytologiques cervicales.

Il est conçu pour être utilisé dans les laboratoires de cytologie médicale. Les résultats doivent être interprétés par un professionnel certifié, en tenant compte des antécédents cliniques de la patiente ainsi que des résultats des tests diagnostiques complémentaires effectués.

III. Résumé et explication du dispositif

Contexte

Dans les cellules eucaryotes, la progression du cycle de la division cellulaire est contrôlée par un mécanisme complexe d'expression contrôlée et de modifications post-translationnelles (phosphorylation par exemple) des protéines régulant le cycle cellulaire. La protéine p16^{INK4a} joue un rôle crucial dans ce mécanisme de régulation du cycle cellulaire eucaryote. Elle fait partie du contrôle, médié par la protéine du rétinoblastome (pRb), de la transition de phase G₁-S et déclenche l'interruption du cycle cellulaire au cours des processus de différenciation cellulaire. Elle joue donc un rôle antiprolifératif lorsqu'elle est exprimée dans le processus normal du cycle cellulaire [1]. Dans les cellules épithéliales définitivement différenciées, l'expression p16^{INK4a} est régulée à la baisse à des niveaux qui ne sont habituellement pas détectables par immunocytochimie [2].

Dans la dysplasie cervicale, la surexpression de p16 est considérée comme un biomarqueur de substitution des infections transformantes à HPV reflétant l'activation de la prolifération cellulaire induite par les oncoprotéines HPV E6/E7 [2-5]. Il a été proposé que la détection de p16 dans les préparations cytologiques cervicales est un marqueur complémentaire précieux pour le triage des femmes avec des résultats de frottis cervical anormaux ainsi qu'avec des résultats positifs au test de dépistage du HPV [3-5]. Cependant, comme le marquage spécifique de p16 peut être observé dans des cellules métaplasiques ou endocervicales individuelles dans lesquelles p16 peut être exprimée pour exercer sa fonction cellulaire physiologique normale de suppression de la croissance, l'interprétation des préparations cytologiques cervicales avec une simple marquage de p16 nécessite l'identification des cellules immunoréactives pour p16 et leur classification en fonction de signes d'anomalies morphologiques [2-4].

La détection simultanée de p16 et du marqueur de prolifération Ki-67 dans une même cellule par ICC s'est avérée un outil précieux pour identifier les cellules cervicales dysplasiques dans les préparations cytologiques sans devoir recourir à une interprétation morphologique [3,6,7]. Ki-67 est une protéine nucléaire et nucléolaire

strictement associée à la prolifération cellulaire qui est indétectable par les méthodes d'immunomarquage classiques dans les cellules quiescentes (G0) [8]. Dans des conditions physiologiques normales, l'expression de la protéine Ki-67 associée à la prolifération est incompatible avec celle de la protéine p16 antiproliférative. En revanche, les cellules dont la voie de contrôle de la progression du cycle cellulaire médiée par la protéine du rétinoblastome (pRB) est bloquée en amont de la fonction suppresseur de tumeur de p16 (comme dans les cellules épithéliales exprimant les oncoprotéines E6/E7 d'HPV à haut risque) peuvent proliférer et ainsi exprimer Ki-67 en présence de p16 fonctionnelle [2,3].

Par conséquent, la détection de cellules individuelles dans les préparations cytologiques cervicales qui coexpriment simultanément p16 et Ki-67 peut servir d'indicateur des cellules présentant un dérèglement du cycle cellulaire, indépendamment de leur morphologie, et peut donc être utilisée comme indicateur de la présence d'infections transformantes à HPV et de néoplasies intraépithéliales cervicales sous-jacentes [2,3]. Récemment, de nombreuses études ont été réalisées et publiées sur l'évaluation de l'intérêt potentiel et de l'utilité clinique de la cytologie à double marquage de p16/Ki-67 pour l'identification des femmes pouvant bénéficier d'une colposcopie en fonction de divers résultats du dépistage primaire du cancer du col de l'utérus, notamment pour le triage :

- des femmes qui ont des résultats de frottis cervical montrant des cellules malpighiennes atypiques de signification indéterminée (ASC-US) ou une lésion malpighienne intraépithéliale de bas grade (LSIL) ;
- des femmes qui sont positives pour un HPV à haut risque lors du dépistage primaire du HPV ;
- ou des femmes qui présentent une absence de lésion intraépithéliale ou maligne (NILM) et qui sont HPV positives dans un contexte clinique où le dépistage primaire implique un cotest HPV et frottis cervical [6,7;9-25].

Principe de la procédure

Le CINtec® *PLUS* Kit contient une série de réactifs requis pour la détection immunocytochimique des antigènes p16^{INK4a} et Ki-67. Le kit est conçu pour effectuer une procédure de coloration immunocytochimique en deux étapes pour des échantillons cytologiques issus du col de l'utérus. Pour la détection des antigènes, le kit utilise un clone d'anticorps monoclonal primaire de souris E6H4™ visant la protéine p16^{INK4a} humaine et un clone d'anticorps monoclonal primaire de lapin 274-11 AC3V1 visant la protéine Ki-67 humaine.

Les réactifs de visualisation prêts à l'emploi comprennent (i) un réactif polymère conjugué à de la peroxydase de raifort et à des fragments d'anticorps Fab' anti-souris de chèvre, et (ii) un réactif polymère conjugué à de la phosphatase alcaline et à des fragments d'anticorps Fab' anti-lapin de chèvre. Les réactifs de visualisation ont été purifiés par absorption sur phase solide afin d'éliminer toute réactivité croisée avec les immunoglobulines humaines.

Les réactions chromogènes se basent sur une conversion du chromogène DAB médiée par la peroxydase de raifort et une conversion du chromogène Fast Red médiée par la phosphatase alcaline pour donner des produits de réaction visibles sur les sites des antigènes correspondants. Après la contre-coloration, un protocole de montage en deux temps doit être suivi : un montage aqueux des échantillons est d'abord réalisé avec un milieu de montage aqueux fourni avec le kit. Les lames peuvent ensuite être couvertes, par exemple avec un produit de montage permanent. Les résultats peuvent être évalués sous microscope optique.

IV. Réactifs

Matériels fournis

Les matériels répertoriés ci-dessous sont inclus dans chaque kit et suffisent pour réaliser 50 tests. Le nombre de tests est calculé sur la base de 200 µL de réactifs par lame.

1 Peroxidase Blocking Reagent

Réactif de blocage de la peroxydase

11,5 mL, prêt à l'emploi

Peroxyde d'hydrogène à 3%, contenant 15 mol/l d'azide de sodium (NaN_3).

EUH210 Fiche de données de sécurité disponible sur demande.

2 Primary Antibodies Solution

Solution d'anticorps primaires

11,5 mL, prêt à l'emploi

Anticorps monoclonal de souris anti-p16^{INK4a} humaine, clone E6H4™, et anti-corps monoclonal de lapin anti-Ki-67 humaine, clone 274-11 AC3, fournis dans un tampon Tris à 50 mM de pH 7,2 contenant 15 mmol/l d'azide de sodium (NaN_3) et une protéine stabilisante.

3 Visualization Reagent HRP

Réactif de visualisation HRP

11,5 mL, prêt à l'emploi



Attention

H317 Peut provoquer une allergie cutanée.

P261 Éviter de respirer les poussières/ fumées/ gaz/brouillards/ vapeurs/ aérosols.

P272 Les vêtements de travail contaminés ne devraient pas sortir du lieu de travail.

P280 Porter des gants de protection.

P333 + P313 En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: consulter un médecin.

P362 + P364 Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.

P501 Éliminer le contenu/récipient dans une installation d'élimination des déchets agréée.

Composants dangereux:

26172-54-3 2-méthyl-2H-isothiazole-3-one, chlorhydrate

55965-84-9 masse de réaction: 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one [no CE 247-500-7] et 2-méthyl-2H-isothiazolin-3-one [no CE 220-239-6] (3:1)

Réactif polymère conjugué à de la peroxydase de raifort et à des fragments d'anticorps Fab' anti-souris de chèvre isolés par affinité, dans une solution sta-

bilisante contenant des conservateurs et une protéine stabilisante.
Contient du 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane, susceptible de provoquer des réactions allergiques.

4 Visualization Reagent AP

Réactif de visualisation AP

11,5 mL, prêt à l'emploi



Attention

H317 Peut provoquer une allergie cutanée.

P261 Éviter de respirer les poussières/ fumées/ gaz/brouillards/ vapeurs/ aérosols.

P272 Les vêtements de travail contaminés ne devraient pas sortir du lieu de travail.

P280 Porter des gants de protection.

P333 + P313 En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: consulter un médecin.

P362 + P364 Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.

P501 Éliminer le contenu/récipient dans une installation d'élimination des déchets agréée.

Composants dangereux:

26172-54-3 2-méthyl-2H-isothiazole-3-one, chlorhydrate

Réactif polymère conjugué à de la phosphatase alcaline et à des fragments d'anticorps Fab' anti-lapin de chèvre isolés par affinité, dans une solution stabilisante contenant des conservateurs et une protéine stabilisante.

Contient du 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane, susceptible de provoquer des réactions allergiques.

5 DAB Buffered Substrate

Substrat tamponné pour DAB

16,0 mL

Solution de substrat tamponnée à pH 7,5, contenant moins de 0,1% de peroxyde d'hydrogène, des stabilisants et des amplificateurs.

6 DAB Chromogen

Chromogène DAB

0,85 mL, solution chromogène de 3,3'-diaminobenzidine



Danger

H314 Provoque des brûlures de la peau et de graves lésions des yeux.

H341 Susceptible d'induire des anomalies génétiques.

H350 Peut provoquer le cancer.

P201 Se procurer les instructions spéciales avant utilisation.

P280 Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/ du visage.

P303 + P361 + P353 EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux): Enlever immédiatement tous les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau.

P304 + P340 + P310 EN CAS D'INHALATION: transporter la personne à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON/un médecin.

P305 + P351 + P338 + P310 EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON/un médecin.

P308 + P313 EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée: consulter un médecin.

Composant dangereux:

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

REMARQUE : Consulter les réglementations nationales ou locales en matière d'élimination.

7 Naphthol Phosphate Substrate

Substrat naphthol-phosphate

25,0 mL

Solution de substrat tamponnée à pH 9,2, contenant du substrat Naphthol AS-TR phosphate, des stabilisants et des amplificateurs.

8 Fast Red Chromogen

Chromogène Fast Red

1,33 mL, solution de chromogène Fast Red



Danger

H314 Provoque des brûlures de la peau et de graves lésions des yeux.

P280 Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/ du visage.

P301 + P330 + P331 EN CAS D'INGESTION: Rincer la bouche. NE PAS faire vomir.

P303 + P361 + P353 EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux): Enlever immédiatement tous les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau.

P304 + P340 + P310 EN CAS D'INHALATION: transporter la personne à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON/un médecin.

P305 + P351 + P338 + P310 EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: Rin-

cer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON/un médecin.

P501 Éliminer le contenu/récipient dans une installation d'élimination des déchets agréée.

9 Epitope Retrieval Solution 10 x

Solution de démasquage d'épitope 10 x

500 mL, Tris 10 mM, EDTA 10 mM, pH 9,0, contenant 15 mmol/L d'azide de sodium (NaN_3).

10 CIntec® PLUS Mount

CIntec® PLUS Mount

18,0 mL, milieu de montage permanent aqueux pour la conservation permanente de préparations sur lames marquées avec des systèmes de visualisation à base de peroxydase et de phosphatase alcaline. Contient 7,7 mmol/L de sodium azide (NaN_3).

Conservation

Conserver entre 2° et 8°C. Ne pas utiliser après la date de péremption. Aucune donnée de conservation des réactifs n'est connue dans d'autres conditions que celles indiquées ci-dessus.

Après ouverture, les composants du kit restent stables pendant 6 mois, s'ils sont conservés entre 2 et 8°C. Jeter les solutions troubles.

Le flacon de CIntec® PLUS Mount (Flacon 10) doit être retiré de la boîte après la première ouverture du kit et peut être conservé à température ambiante (2-30°C) afin de diminuer la viscosité et de faciliter l'utilisation.

Le tampon de lavage dilué et la solution de démasquage d'épitope diluée restent stables pendant 1 mois au maximum s'ils sont conservés entre 2 et 8°C. Ne pas utiliser les solutions troubles.

Matériels et réactifs nécessaires mais non fournis

CIntec Wash Buffer 10X (le tampon de lavage) à utiliser avec le CIntec® PLUS Kit est disponible dans le Catalogue, numéro de code 06595421001 (8557) auprès de Roche, mais n'est pas inclus dans ce kit. Pour vos commandes, consulter notre site www.roche.com.

500 mmol/L Tris tampon avec 1.5 mol/L NaCl, pH 7.6, contenant des détergents et un agent antimicrobien.



Attention

H317 Peut provoquer une allergie cutanée.

P261 Éviter de respirer les poussières/ fumées/ gaz/brouillards/ vapeurs/ aérosols.

P272 Les vêtements de travail contaminés ne devraient pas sortir du lieu de travail.
P280 Porter des gants de protection.
P333 + P313 En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: consulter un médecin.
P362 + P364 Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.
P501 Éliminer le contenu/récipient dans une installation d'élimination des déchets agréée.

Composants dangereux:

55965-84-9 Mélange de: 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one et 2-méthyl-4-isothiazolin-3-one (3:1)

Hématoxyline sans alcool pour la contre-coloration;

Eau distillée ou désionisée ;

PreservCyt® Solution : peut être nécessaire pour préparer des lames ThinPrep® à partir du volume d'échantillon résiduel restant dans le flacon ThinPrep® initial. Le volume d'échantillon doit être d'au moins 17 mL pour préparer une autre lame conformément à la section « Dépannage » p. 6.27 du manuel d'utilisation du ThinPrep® 2000 System ;

SurePath™ Preservative Fluid : est nécessaire pour préparer des lames SurePath en vue d'une coloration pour CINtec PLUS Cytology. Voir section VI. Procédures, préparation des échantillons cytologiques pour plus de détails ;

Éthanol à 99% ;

Produit de montage à base de xylène pour le montage en lamelle en verre ;

Lames : lames de microscopie SuperFrost® PLUS, ThinPrep®; lames BD SurePath™ PreCoat

Xylène ;

Lamelles en verre ou film ;

Lames de contrôle, par exemple lames ThinPrep® obtenues à partir des résidus du flacon de prélèvement :

- Contrôle positif : lame ThinPrep® provenant d'un ou plusieurs échantillons (regroupés) de cytologie de statut HSIL confirmé (lésion intraépithéliale malpighienne de haut grade) ;
- Contrôle négatif : lame ThinPrep® provenant d'un ou plusieurs échantillons (regroupés) de cytologie confirmés négatifs pour les lésions intraépithéliales et tumeurs malignes (NILM).

Équipement nécessaire

Microscope optique (agrandissement de 10 à 40 x) ;

Cuves de coloration résistantes à la chaleur (en plastique) ;

Eprouvettes graduées ;

Pissettes (à remplir de tampon de lavage) ;

Chronomètre (réglable sur des intervalles de 30 secondes à 60 minutes) ;

Bain-marie avec couvercle (pouvant maintenir la solution de démasquage d'épitope à une température comprise entre 95 et 99°C) ;

Thermomètre ;

Matériel facultatif : étuve de séchage capable de maintenir une température de 37 ou 60 °C.

Matériel facultatif : instrument Autostainer de Dako ou LabVision.

V. Mises en garde et précautions

Mise en garde

1. Attention ! Certains réactifs compris dans ce kit contiennent des produits chimiques dangereux. Respecter les consignes de sécurité relatives aux réactifs de laboratoire dangereux pour la manipulation des composants du kit.
2. Les composants 1, 2, 9 et 10 de ce produit contiennent de l'azide de sodium (NaN_3) qui est hautement toxique dans sa forme pure. Bien qu'il ne soit pas considéré comme dangereux à la concentration présente dans les produits, l'azide de sodium peut réagir avec les tuyauteries en plomb et en cuivre et former des azides métalliques à des concentrations explosives. Lors de l'élimination des produits, rincer abondamment à l'eau afin d'empêcher l'accumulation d'azides métallique dans les tuyauteries.
3. Les composants 2, 3 et 4 contiennent des substances d'origine animale. Respecter les instructions de manipulation applicables aux produits issus de sources biologiques.
4. La fiche de sécurité du kit est disponible sur demande.
5. Respecter les consignes de sécurité relatives à la manipulation de produits potentiellement infectieux et les règles d'élimination des déchets correspondantes pour la manipulation et l'élimination de tous les échantillons cytologiques que ce soit avant ou après fixation, ainsi que de tous les matériaux venus en contact avec ceux-ci.
6. Ne jamais pipeter les réactifs à la bouche. Éviter tout contact des réactifs et des échantillons avec la peau et les muqueuses. En cas de contact des réactifs ou des échantillons avec la peau ou les muqueuses, rincer abondamment à l'eau.
7. Le réactif de visualisation et le chromogène DAB peuvent être altérés par l'exposition à une forte lumière. Ne pas stocker les composants du kit ni effectuer la coloration sous une lumière vive, telle que la lumière directe du soleil.
8. Porter un vêtement de protection approprié pour éviter tout contact avec les yeux et la peau lors de la manipulation des composants inclus dans le CINtec® PLUS Kit ou devant être utilisés avec celui-ci. Consulter la Fiche de sécurité (SDS) pour plus de précisions.
9. Les étiquettes de sécurité suivent principalement les directives du SGH de l'UE.

Attention

1. Pour utilisation en diagnostic in vitro.
2. Réservé à l'usage professionnel.
3. Réduire au minimum la contamination microbienne des réactifs afin d'éviter toute coloration non spécifique.
4. Toute durée, température ou méthode d'incubation autre que celle indiquée peut entraîner des résultats erronés.
5. Ne pas utiliser le kit si l'emballage de l'un de ses composants est endommagé. Si l'emballage ou les composants sont endommagés, informer le fabricant dans les meilleurs délais.
6. L'élimination de tous les déchets doit être conforme aux directives et réglementations locales.
7. Tous les réactifs sont formulés spécifiquement pour être utilisés avec ce test. Aucun d'entre eux ne doit être remplacé par un autre produit, faute de quoi le test peut ne pas donner les résultats spécifiés.
8. En cas de coloration inattendue ne pouvant être expliquée par un changement des procédures du laboratoire, si un défaut de fonctionnement du CINtec® PLUS Kit est suspecté, se reporter immédiatement aux coordonnées fournies dans la section XII pour plus d'informations sur l'assistance technique
9. Les dysfonctionnements du produit dus à des problèmes de manipulation ou à une instabilité ne produisent aucun signe évident. Il importe donc, par mesure de contrôle de la qualité, de tester des contrôles positifs et négatifs en même temps que les échantillons des patientes.

VI. Procédures

Préparation des échantillons cytologiques

Les échantillons cytologiques doivent être manipulés de façon à les conserver en vue des tests immunocytochimiques. Tous les échantillons doivent être traités selon les méthodes standard de traitement des cellules.

On peut utiliser pour cela des lames ThinPrep® (Hologic™ Inc.) préparées sur un ThinPrep® 2000 Processor (Hologic™ Inc.) selon les instructions du fabricant, des lames BD SurePath™ (BD Diagnostics) préparées selon les instructions du fabricant, ou des lames préparées manuellement (frottis conventionnels).

Notes :

1. Préparation des lames ThinPrep® :

Veuillez noter qu'il est déconseillé d'utiliser ThinPrep® 3000 Processor car la méthode de fixation par pulvérisation utilisée par l'instrument peut entraîner une perte importante de cellules.

2. Préparation des lames BD SurePath™ :

Comme il a parfois été reporté que le fait de stocker du matériel cellulaire résiduel après le processus d'enrichissement dans l'eau peut avoir des conséquences négatives sur l'intensité du signal immunocytochimique, nous recommandons vivement de suivre les instructions exposées ci-après lors de la préparation des lames du test CINtec® PLUS pour éviter tout risque de perte de signal :

- a. Préparation de la lame **immédiatement** après réalisation du premier frottis
 - i. On peut préparer une seconde lame pour chaque cas immédiatement après le marquage de la lame BD SurePath™ correspondante.
 - ii. Placez une seconde série de lames étiquetées dans les porte-lames.
 - iii. Sur le PrepStain™ en utilisant GYN version 1.1 ou 1.2, Préparation des lames, sélectionnez le programme « Transfer only »
- b. Préparation de la lame **à partir du culot cellulaire enrichi** après la préparation de la lame de frottis réalisée plus tard
 - i. Retirez les porte-tubes du système PrepStain™ et ajoutez approximativement 2 mL de BD SurePath™ Preservative Fluid (solution de conservation BD SurePath™) dans chaque tube.
 - ii. Rebouchez chaque tube et stockez les tubes à température ambiante pendant une durée maximale de 4 semaines ou au réfrigérateur (2 – 8°C) pendant une durée maximale de 6 mois.
 - iii. Si une lame pour CINtec® PLUS doit être réalisée sur un échantillon stocké, laissez l'échantillon à température ambiante pendant 1 heure. Commencez par la deuxième étape de centrifugation du Processus d'enrichissement GYN et exécutez les étapes suivantes de la procédure de préparation.
- c. Préparation de la lame **à partir de matériel cellulaire résiduel** provenant du flacon de prélèvement de l'échantillon d'origine (approximativement 2 mL)
 - i. Ajoutez 8mL de BD SurePath™ Preservative Fluid (solution de conservation BD SurePath™) au matériel cellulaire résiduel dans le flacon BD SurePath™ (environ 2 mL).
 - ii. L'échantillon dilué doit être traité sur le PrepMate™ en utilisant la technique standard et sur le PrepStain™ en utilisant GYN version 1.1 ou 1.2, Préparation des lames, programme « Transfer only » .

Immédiatement après la préparation, les lames ThinPrep® ou BD SurePath™ doivent être fixées dans de l'éthanol à 99% pendant 10 minutes à 1 heure puis séchées à l'air pendant 20 minutes à 16 heures (jusqu'au lendemain). **Les lames ThinPrep® ou BD SurePath™ ne doivent pas être fixés avec un réactif de fixation cytologique en aérosol contenant du polyéthylène-glycol (par ex. Merckofix®, Merck).**

Les frottis conventionnels doivent être fixés avec un réactif de fixation cytologique en aérosol contenant du polyéthylène-glycol (par ex. Merckofix®, Merck) immédiatement après le prélèvement de l'échantillon.

Tous les échantillons doivent être réhydratés selon les procédures spécifiques décrites au chapitre 2.1 avant la procédure d'immunomarquage.

REMARQUE : Afin d'éviter une coloration de fond, l'éthanol utilisé pour la fixation des lames de cytologie en phase liquide ThinPrep® doit contenir le moins possible d'impuretés. Le bain d'éthanol servant à la préparation de

lames ThinPrep® destinées à un immunomarquage doit être renouvelé toutes les 25 lames.

Démasquage d'épitope par chauffage sur les échantillons avant coloration

Afin d'obtenir des performances de dosage optimales, un démasquage antigénique par chauffage doit être réalisé à l'aide de la solution de démasquage d'épitope incluse dans le kit. Le non respect de la procédure décrite peut affecter les résultats.

Pour le démasquage par chauffage, les échantillons cytologiques doivent être chauffés par immersion dans la solution de démasquage d'épitope dans un bain-marie étalonné pouvant maintenir la solution de démasquage à une température comprise entre 95 et 99°C. Les laboratoires situés en altitude doivent déterminer la méthode la plus adaptée pour maintenir la température requise du bain-marie. Le fabricant conseille de ne pas s'écarter de la procédure décrite.

Après le démasquage des épitopes par chauffage, l'échantillon cytologique doit être maintenu à température ambiante pendant 20 minutes ou plus, jusqu'à ce qu'il ait refroidi à 50°C ou moins, avant la suite du traitement. Le marquage de l'échantillon cytologique doit ensuite être effectué sans tarder.

Procédures de marquage des lames

Le kit contient un volume de réactif suffisant pour 50 tests. Le nombre de tests est calculé sur la base de 200 µL de réactifs par lame.

Il est conseillé d'utiliser 200 µL de réactifs par lame pour le traitement des préparations cytologiques sur ThinPrep® ou BD SurePath™ avec les appareils Dako ou LabVision Autostainer (deux zones de dépôt de 100µL).

Il est conseillé d'utiliser 300 µL par lame (100 µL pour les trois zones de dépôt disponibles) pour assurer la couverture complète des frottis conventionnels sur les appareils Autostainer Dako ou LabVision.

1. Préparation des réactifs

Il est recommandé de préparer les réactifs suivants avant le marquage à l'exception de la solution de travail Fast Red. Tous les réactifs doivent être équilibrés à température ambiante (20 à 25°C) avant l'immunomarquage.

1.1 Solution de démasquage d'épitope

Préparer une quantité suffisante de la solution de démasquage d'épitope pour la procédure de marquage prévue, en diluant une quantité du Flacon 9 (Solution de démasquage d'épitope 10 x) au 1:10 avec de l'eau distillée ou désionisée.

Après dilution, la solution de démasquage d'épitope peut être conservée entre 2 et 8°C pendant un mois au maximum. Jeter la solution diluée si elle semble trouble.

NOTE : L'utilisation d'eau fortement ionisée pour la dilution de la solution de démasquage d'épitope peut réduire considérablement la performance de marquage du test. Veuillez vous assurer que vous utilisez de l'eau correctement distillée ou désionisée (c'est-à-dire que votre colonne d'échange d'ions pour produire de l'eau désionisée a été contrôlée lors d'un entretien de routine). **N'utilisez pas l'eau du robinet !**

1.2 Tampon de lavage

Utiliser le tampon de lavage (10 x) de Roche mtm laboratories AG, code catalogue 06595421001 (8557), avec le CINtec® PLUS Kit. Pour vos commandes, consulter notre site www.rocke.com.

Préparer une quantité suffisante de tampon de lavage pour les étapes de lavage de la procédure de coloration prévue, en diluant une quantité du tampon de lavage (10 x) au 1:10 avec de l'eau distillée ou désionisée.

Après dilution, le tampon de lavage peut être conservé entre 2 et 8°C pendant un mois au maximum. Jeter la solution diluée si elle semble trouble.

1.3 Solutions de substrat et chromogène (DAB et Fast Red)

Assurez que les chromogènes et substrats soient équilibrés à température ambiante (20-25°C). L'addition d'une quantité excessive de chromogènes aux substrats résultera dans une détérioration du signal positif.

A) Préparation de la solution de travail DAB avant la coloration

La solution de travail DAB reste stable pour une durée de 8 heures après préparation.

Préparez la solution de travail DAB de la façon suivante :

- i) Déposez 1 mL du substrat DAB (flacon 5) dans un tube à essais propre ;
- ii) Ajoutez une goutte (25-30 µL) du DAB chromogène (flacon 6) et mélangez doucement en renversant le tube (ne pas agiter sur un vortex) ;
- iii) En utilisant l'Autostainer, transférez la solution de travail DAB dans un flacon de réactif de l'Autostainer avant de démarrer la coloration et placez le flacon dans la position appropriée de l'Autostainer rack.

B) Préparez la solution de travail Fast Red immédiatement avant l'utilisation

Préparez la solution de travail Fast Red immédiatement avant l'utilisation car autrement l'intensité de la coloration pourrait être diminuée ce qui résultera dans un taux de réussite réduit. Ne pas agiter la solution de travail Fast Red sur un vortex pour éviter des précipités.

Préparez la solution de travail Fast Red de la façon suivante :

- i) Transférez 1 mL du substrat Naphtol Phosphate (flacon 7) dans un tube à essais propre ;
- ii) Ajoutez une goutte (40-45 µL) du Fast Red chromogène (flacon 8) et mélangez doucement en renversant le tube (ne pas agiter sur un vortex) ;
- iii) En utilisant l'Autostainer, préparez la solution de travail Fast Red sur demande du logiciel de l'Autostainer. Transférez la solution de travail dans un flacon de réactif de l'Autostainer et placez le flacon dans la position appropriée de l'Autostainer rack. Ne pas retarder l'étape de préparation des lots de substrats sur l'Autostainer afin de réduire le risque d'artefacts de séchage.

1.4 Contre-coloration

La réaction de coloration par la DAB et le Fast Red donne un produit final coloré insoluble dans l'eau (DAB : marron ; Fast Red : rouge).

REMARQUE : Utiliser de l'hématoxyline sans alcool pour la contre-coloration. La présence d'alcool peut réduire l'intensité du signal produit par le Fast Red, voire supprimer complètement ce signal. Respecter les instructions données par le fabricant de l'hématoxyline pour la contre-coloration.

1.5 Milieu de montage

Le montage des échantillons sur lames après la coloration nécessite une procédure de montage en deux temps qui est décrite ci-dessous.

Appliquer tout d'abord à la main une fine couche de CINtec® PLUS Mount (Flacon 10), un produit de montage permanent à base aqueuse, et laisser sécher (« couverture liquide »). Poser ensuite une lamelle en verre par-dessus la surface du produit de montage aqueux séché, à l'aide d'un produit de montage à base de xylène.

Stabiliser le CINtec® PLUS à température ambiante avant utilisation et le conserver à température ambiante s'il doit encore être utilisé.

2. Procédure de marquage

Le CINtec® PLUS Kit a été validé avec les instruments Autostainer (par ex. l'Autostainer 480 de LabVision ou l'Autostainer PLUS de Dako) selon le schéma indiqué ci-dessous (point 2.3.1). Il peut être possible d'utiliser d'autres instruments ou systèmes de fonction équivalente s'ils sont validés de façon appropriée par l'utilisateur.

Avant le marquage, préparer les échantillons et les réactifs de la manière indiquée dans les sections 1.1 à 1.3 et 2.1.

Tous les réactifs doivent être équilibrés à température ambiante (20 à 25°C) avant l'immunocoloration.

De même, toutes les étapes doivent être réalisées à température ambiante. Veiller à ce que les échantillons ne sèchent pas pendant la procédure de marquage. Les échantillons séchés peuvent présenter une coloration non spécifique plus importante. Si la durée d'incubation est prolongée, placer les échantillons dans un environnement humide.

2.1 Réhydratation des échantillons

Tous les échantillons cytologiques doivent être réhydratés avant le marquage. Cette étape doit être réalisée à température ambiante (20-25°C).

A) Lames de cytologie en phase liquide ThinPrep® et frottis conventionnels :

- Déposer les lames dans de l'eau distillée ou désionisée et incuber pendant 10 (±3) minutes ;
- Commencer la procédure de marquage de la manière indiquée au point 2.2, étape 1 : Démasquage d'épitope.

B) Lames de cytologie BD SurePath™

Les lames de cytologie BD SurePath™ fixées à l'alcool nécessitent une méthode de réhydratation particulière pour les rendre compatibles avec le milieu de montage

liquide :

- Vérifier que les lames sont complètement sèches (séchage à l'air) ;
- Déposer les lames dans un bain neuf de xylène à 100% (utiliser des bacs résistants au xylène); plonger les lames deux ou trois fois dans le bain et les incuber 2 minutes ;
- Transférer les lames dans un bain neuf d'éthanol à 99% et incuber pendant 2 minutes ;
- Transférer les lames dans un bain neuf d'éthanol à 70% et incuber pendant 2 minutes ;
- Transférer les lames dans de l'eau distillée ou désionisée et incuber pendant 2 minutes.

Remarque : Renouveler les bains de réhydratation toutes les 50 lames ou une fois par semaine si une plus petite quantité de lames a été techniquée.

2.2 Démasquage d'épitope

A) Lames de cytologie en phase liquide ThinPrep® et frottis conventionnels :

- Remplir des cuves de coloration résistantes à la chaleur avec la solution de démasquage d'épitope diluée (voir le point 1.1 de la procédure) ;
- Placer les cuves de coloration contenant la solution de démasquage d'épitope dans un bain-marie et chauffer l'eau et la solution de démasquage à 95-99°C. La température doit être mesurée à l'intérieur des cuves. Il est important d'ajuster le niveau du bain-marie de façon que les cuves soient immergées dans l'eau à 80% de leur hauteur. Couvrir les cuves avec leur couvercle pour stabiliser la température et éviter l'évaporation ;
- Quand la température de 95-99°C est atteinte, plonger les lames de cytologie réhydratées dans la solution de démasquage d'épitope préchauffée dans les cuves de coloration ; cette opération abaisse la température dans les cuves à moins de 90°C. Laisser la sonde de température dans la cuve et refermer la cuve avec son couvercle aussi bien que possible ;
- Réchauffer le bain-marie et la solution de démasquage d'épitope dans les cuves à 95-99°C ; vérifier la température de la solution dans les cuves ;
- Incuber pendant 10 (±1) minutes à 95-99°C ; le décompte du temps ne doit commencer que lorsqu'il est confirmé que la température de la solution de démasquage d'épitope dans les cuves a bien atteint 95-99°C ;
- Retirer la cuve contenant les lames du bain-marie ;
- Enlever le couvercle des cuves de coloration et laisser les lames refroidir dans la solution de démasquage d'épitope à température ambiante pendant 20 (±1) minutes, jusqu'à ce qu'elles aient atteint 50°C ou moins ;
- Transférer les lames dans une cuve de coloration remplie de tampon de lavage (voir le point 1.2 de la procédure) et incuber pendant 5 (±1) minutes avant de charger les lames dans l'Autostainer programmé.

B) Lames de cytologie BD SurePath™

- Remplir des cuves de coloration résistantes à la chaleur (en plastique) avec

la solution de démasquage d'épitope diluée (voir le point 1.1 de la procédure). Note : en cas d'utilisation de cuves en verre résistant à la chaleur ou en métal, le temps de démasquage doit être adapté individuellement ;

- Plonger les lames dans la solution de démasquage d'épitope froide. Fermer la cuve avec son couvercle ;
- Placer la cuve de coloration dans un bain-marie froid. Chauffer l'eau du bain-marie et la solution de démasquage d'épitope à 95-99°C, puis incuber pendant 15 minutes dès que la température est atteinte. Note : le temps de chauffage de la solution jusqu'à 95-99°C ne doit pas dépasser 40 minutes ;
- Retirer la cuve contenant les lames du bain-marie ;
- Enlever le couvercle des cuves de coloration et laisser les lames refroidir dans la solution de démasquage d'épitope à température ambiante pendant 20 (±1) minutes, jusqu'à ce qu'elles aient atteint 50°C ou moins ;
- Transférer les lames dans une cuve de coloration remplie de tampon de lavage (voir le point 1.2 de la procédure) et incuber pendant 5 (±1) minutes avant de charger les lames dans l'Autostainer programmé.

REMARQUE : La solution de démasquage d'épitope est à usage unique. Elle ne doit pas être réutilisée.

2.3 Protocoles d'immunomarquage

2.3.1 Protocole d'immunomarquage pour les Autostainers (Dako, Lab-Vision)

Avant la première utilisation du CIntec® *PLUS* Kit sur un Autostainer, il faut créer un nouveau modèle et les réactifs du CIntec® *PLUS* Kit doivent être ajoutés à la liste de réactifs de l'Autostainer. Voir le manuel d'utilisation de l'Autostainer en question.

Il est conseillé d'utiliser 200 µL de réactifs par lame pour traiter les préparations cytologiques ThinPrep® ou BD SurePath™. Pour les frottis conventionnels, il peut être nécessaire d'utiliser 300 µL de réactifs sur les Autostainers Dako ou LabVision.

Voici un résumé du cycle de programme :

Étape du programme	ThinPrep® et frottis cytologiques conventionnels	BD SurePath™ frottis cytologiques
1	rinçage*	rinçage*
2	Réactif de blocage à la peroxydase 5 minutes	Réactif de blocage à la peroxydase 5 minutes
3	rinçage*	rinçage*
4	Solution d'anticorps primaires 30 minutes	Solution d'anticorps primaires 30 minutes
5	rinçage*	rinçage*
6	Réactif de visualisation HRP 15 minutes	Réactif de visualisation HRP 15 minutes
7	rinçage*	rinçage*
8	rinçage*	rinçage*
9	rinçage*	rinçage*
10	Réactif de visualisation AP 15 minutes	Réactif de visualisation AP 15 minutes
11	rinçage*	rinçage*
12	rinçage*	rinçage*
13	rinçage*	rinçage*
14	Switch	Switch
15	Étape « substrat » : DAB 10 minutes	Étape « substrat » : DAB 10 minutes
16	rincer les lames à l'eau distillée ou désionisée	rincer les lames à l'eau distillée ou désionisée
17	rinçage*	rinçage*
18	Étape « substrat-batch » : Fast Red 15 minutes	Étape « substrat-batch » : Fast Red 15 minutes
19	rinçage*	rinçage*
20	---	Pour Autostainer LabVision : Étape « substrat-batch » : Fast Red 15 minutes Pour Autostainer Dako : Étape « substrat » : Fast Red 15 minutes
21	----	rinçage*
22	rincer les lames à l'eau distillée ou désionisée	rincer les lames à l'eau distillée ou désionisée
23	changement	changement

* Utiliser du tampon de lavage pour les différentes étapes de rinçage.

REMARQUE : Si l'Autostainer employé pour la procédure utilise du tampon pour les rinçages, les lames doivent être rincées à l'eau distillée ou désionisée après avoir été retirées de l'appareil.

Veuillez procéder comme suit après la programmation :

- Transférer les réactifs des flacons du kit aux flacons de réactif de l'Autostainer. Utiliser la carte générée par l'Autostainer pour programmer les durées et les volumes de réactifs ;
- Placer les flacons de réactifs dans le rack de réactifs de l'Autostainer, selon la carte de disposition des réactifs ;
- Charger les lames dans l'Autostainer selon la carte de disposition des lames et rincer les lames avec du tampon de lavage pour empêcher le dessèchement des échantillons.

2.4 Contre-coloration à l'hématoxyline

- Immerger les lames dans un bain d'**hématoxyline sans alcool**. Incuber pendant 2 à 10 minutes, en fonction de la puissance de l'hématoxyline sans alcool utilisée ;

REMARQUE : L'utilisation d'hématoxyline sans alcool est absolument obligatoire.

- Pour le bleuissement, placer les lames dans un bain d'eau du robinet ou une solution alcaline telle qu'une solution diluée d'ammoniaque (NH_4OH , 0,08% dans l'eau désionisée) et incuber pendant 30 secondes à 2 minutes ;
- Pour s'assurer que tous les résidus d'hématoxyline ont été éliminés, changer l'eau du robinet de la cuve 3 à 5 fois jusqu'à complète disparition de l'hématoxyline ;
- Incuber brièvement les lames dans un bain d'eau distillée ou désionisée.

REMARQUE : En fonction de la durée d'incubation et de la puissance de l'hématoxyline utilisée, la contre-coloration donne une coloration bleu clair à bleu foncé des noyaux cellulaires. Une contre-coloration excessive ou incomplète peut conduire à une interprétation erronée des résultats.

2.5 Montage

Afin d'obtenir une sensibilité optimale et d'empêcher la décoloration du chromogène Fast Red, l'opération de montage doit être réalisée en deux temps.

Après la contre-coloration et le bleuissement, les lames seront montées en deux étapes. Les étapes A et B doivent être exécutées dans l'ordre:

A) Couverture liquide

- Incuber les lames dans l'eau distillée ou désionisée pendant au moins 1 minute ;
- Retirer les lames de l'eau distillée ou désionisée sans les sécher ;
- Tapoter pour enlever l'excédent de liquide sans laisser sécher les échantillons. Essuyer soigneusement le dessous des lames avec un essuie-tout pour enlever l'eau ;

- Déposer 4 gouttes de CINtec® *PLUS* Mount (1 goutte correspond à 35 – 40µL de ce produit de montage aqueux) par lame pour les échantillons de cytologie en phase liquide et 8 gouttes par lame pour les frottis conventionnels. Éviter la formation de bulles d'air. Pour empêcher la formation de minuscules bulles, la première goutte peut être jetée sur un essuie-tout avant l'application du CINtec® *PLUS* Mount sur l'échantillon ;
- Incliner et tourner doucement la lame pour former une mince couche de produit de montage et couvrir complètement l'échantillon (ne pas recouvrir avec une lamelle ou un film). Vérifier visuellement la bonne répartition du milieu sur la lame ;
- Pour le séchage, poser les lames horizontalement :
 - Incuber les échantillons ThinPrep® ou BD SurePath™ à 37-60°C pendant 1 heure, ou une nuit à température ambiante ;
 - Incuber les frottis conventionnels à 37°C pendant 4 heures, ou à 60°C pendant 1 heure, ou une nuit à température ambiante.

B) Couverture avec lamelle en verre ou film

- Après le séchage complet du produit de montage aqueux, incuber les lames dans le xylène pendant au minimum 1 minute et au maximum 20 minutes. Recouvrir ensuite les lames avec un produit de montage à base de xylène.

REMARQUE : Les lames **ne doivent pas** être déshydratées avec une série d'alcools de concentration ascendante avant de les couvrir avec une lamelle ou un film.

- Laisser le produit de montage à base de xylène sécher à température ambiante.

REMARQUE : Afin de minimiser les décolorations, protéger les lames de la lumière et les conserver à température ambiante (20-25°C).

VII. Contrôle de qualité

Les écarts par rapport aux procédures recommandées de fixation et de traitement des échantillons cytologiques cervicaux peuvent entraîner une variabilité importante des résultats, nécessitant des contrôles internes réguliers.

Contrôle positif

Des échantillons traités de la même manière que le ou les échantillons des patientes doivent être utilisés comme contrôles positifs. Les contrôles positifs indiquent si les échantillons ont été correctement préparés et si les techniques de marquage appropriées ont été utilisées. Un contrôle positif doit être inclus dans chaque cycle de marquage.

Les contrôles positifs connus ne doivent être utilisés que pour vérifier les résultats corrects des échantillons traités et des réactifs de test et non pour établir un diagnostic spécifique des échantillons des patientes. Si les contrôles positifs ne présentent pas le marquage positif approprié, les résultats des échantillons à analyser doivent être considérés comme non valides.

Contrôle négatif

Utiliser un contrôle négatif traité de la même manière que le ou les échantillons des patientes avec chaque cycle de marquage pour vérifier la spécificité de la procédure de marquage et obtenir une indication du bruit de fonds. Différents types cellulaires présents dans les échantillons de cytologie cervicale représentatifs et notoirement négatifs pour l'expression des antigènes p16^{INK4a} et Ki-67 (par exemple les cellules superficielles) peuvent être utilisées comme contrôle négatif interne pour évaluer le bruit de fonds (à vérifier par l'utilisateur).

Vérification du test

Avant la première utilisation d'un anticorps ou d'un système de marquage dans une procédure de diagnostic, l'utilisateur doit vérifier la spécificité de l'anticorps en le testant sur une série d'échantillons produits en interne ayant des caractéristiques immunocytochimiques connues et représentant des échantillons positifs et négatifs connus. Voir les procédures de contrôle de qualité précédemment décrites dans cette partie de la notice, ainsi que les exigences de contrôle de qualité du Programme de certification en immunochimie CAP et/ou la directive approuvée d'Assurance qualité pour l'immunocytochimie du CLSI (NCCLS).

VIII. Interprétation des résultats

Le test CINtec® PLUS donne deux produits de réaction colorés distincts : un précipité marron sur les sites de l'antigène p16^{INK4a} et un précipité rouge sur les sites de l'antigène Ki-67. Une coloration marron des cellules (cytoplasme et/ou noyau) indique une surexpression de la p16^{INK4a}. Une coloration rouge (du noyau) indique l'expression de Ki-67. Les cellules associant les deux antigènes présentent une coloration cytoplasmique brune avec un noyau rouge typique bien marqué. Les contrôles positifs et négatifs doivent être examinés par un pathologiste ou cytologiste ayant l'expérience des procédures immunocytochimiques et de l'interprétation des lames colorées avec CINtec® PLUS avant toute interprétation des résultats. Les résultats doivent être interprétés par un professionnel qualifié en tenant compte des antécédents cliniques de la patiente et des résultats des autres tests de diagnostic.

En ce qui concerne l'interprétation des lames de cytologie cervicale marquées par le CINtec® PLUS Kit, leur analyse doit porter sur la présence de cellules épithéliales cervicales présentant à la fois une coloration brune du cytoplasme et rouge du noyau indiquant l'expression simultanée de p16 et Ki-67.

La présence d'une ou plusieurs cellules épithéliales présentant conjointement un immunomarquage du cytoplasme brun ET un immunomarquage du noyau rouge est considérée comme un résultat de test CINtec® PLUS positif.

Dans le cas où il n'y a pas de cellule épithéliale cervicale présentant un immunomarquage simultané brun du cytoplasme ET rouge du noyau, le résultat du test CINtec® PLUS est considéré comme négatif.

Veuillez noter que la présence de cellules épithéliales cervicales présentant une immunoréactivité uniquement pour l'un des deux marqueurs (par exemple, une coloration brune pour p16 uniquement ou une coloration rouge pour Ki-67 uniquement) n'est pas considérée comme un résultat de test positif au CINtec® PLUS Kit, même lorsque les deux types de cellules cervicales présentant une seule immunoréactivité sont présents dans la même lame de cytologie.

Dans le cas où l'on observe la présence de cellules avec des signes morphologiques de dyscaryose sévère mais pas de double marquage pour p16 et Ki-67, les critères d'interprétation morphologique doivent être pris en compte.

IX. Limites

- Réservé à l'usage professionnel. Une formation spéciale est requise pour l'exécution des procédures d'immunocytochimie.
- L'interprétation clinique d'un marquage positif ou négatif doit être évaluée dans le contexte du tableau clinique et des critères cytologiques. L'interprétation clinique d'un marquage positif ou négatif doit être complétée par des études morphologiques utilisant des contrôles positifs et négatifs appropriés ainsi que d'autres tests de diagnostic. Un pathologiste ou cytologiste qualifié, sachant correctement utiliser les anticorps, les réactifs et les méthodes, doit être chargé d'interpréter toutes les étapes de préparation et d'interprétation de la préparation finale d'ICC.
- Les résultats des marquages en immunocytochimie dépendent fortement de la qualité des cellules colorées. Le respect des instructions des différentes étapes de fixation, lavage, séchage ou chauffage des lames contribuera donc significativement au résultat général de la procédure de marquage, pour laquelle il importe de ne pas utiliser de réactifs contaminés par des bactéries. Les écarts par rapport au protocole peuvent provoquer des artefacts, une rétention de l'anticorps ou des faux négatifs. Les variations dans les méthodes de fixation ou un échantillonnage inapproprié peuvent donner des résultats incohérents.
- Une contre-coloration excessive ou incomplète peut conduire à une interprétation erronée des résultats.
- Le fabricant fournit les anticorps et les réactifs à une dilution optimale pour leur utilisation selon les instructions données dans les présentes, dans le cadre de tests d'immunocytochimie sur des lames de cytologie en phase liquide préparées ou des frottis conventionnels. Tout écart par rapport aux procédures de test recommandées peut invalider les résultats obtenus. Des contrôles appropriés doivent être utilisés et documentés. Les utilisateurs qui ne respecteraient pas les procédures de test recommandées seront tenus responsables de l'interprétation des résultats obtenus dans ces conditions.
- Des faux positifs peuvent être obtenus en cas de liaison non immunologique de protéines ou de produits de réaction du substrat, ou encore d'une activité pseudoperoxydasique (érythrocytes) ou d'une activité de la peroxydase endogène (cytochrome C par exemple).
- Ne pas remplacer les réactifs du kit par des réactifs portant d'autres numéros de lot ou par des réactifs provenant d'autres fabricants.

X. Dépannage

Voir la section XII pour les coordonnées si vous avez besoin d'une assistance technique.

Problème	Cause probable	Mesures suggérées
1. Pas de marquage des lames	1a. Non respect des instructions d'utilisation ;	1a. Lire attentivement les instructions et respecter la procédure exposée ;
	1b. Les flacons de réactifs n'ont pas été chargés au bon endroit dans les racks de réactifs ;	1b. Vérifier la bonne disposition des flacons de réactifs à l'aide de la carte des réactifs ;
	1c. Pas assez de réactif dans le flacon ;	1c. Veiller à charger suffisamment de réactifs dans les flacons avant de commencer la procédure. Consulter la carte des réactifs pour connaître les volumes requis ;
	1d. Pas de tampon de lavage pour les Autostainers Dako ou LabVision ;	1d. Vérifier qu'il y a suffisamment de tampon. Dans le cas contraire, remplir le réservoir de tampon et amorcer la pompe ; Regarder si le tube en plastique transparent entourant la seringue (à gauche du bras mobile) ne contient pas des bulles d'air ; dans ce cas, il peut suffire de chasser les bulles pour résoudre le problème ;
2. Marquage insuffisant des lames	2a. Démasquage des épitopes insuffisant ;	2a. Utiliser une solution de démasquage d'épitope préparée extemporanément et/ou veiller à ce que la solution de démasquage d'épitope chauffe à 95-99°C pendant 10 minutes et la laisser refroidir ensuite pendant encore 20 minutes ; Veiller à éviter les débordements d'eau dans les cuves de coloration résistantes à la chaleur pendant la procédure de démasquage des épitopes. Voir les recommandations du point 2.2 ;
	2b. Temps d'incubation des réactifs incorrect ;	2b. Voir les recommandations du protocole de coloration, points 2.3.1/2.3.2 ;
	2c. Méthode de fixation incorrecte ;	2c. Veiller à ce que les préparations cytologiques soient fixées de la manière décrite dans la section VII. Vérifier qu'aucun autre fixateur n'a été utilisé ;
	2d. L'eau qui a été utilisée pour diluer la solution de démasquage d'épitope est trop fortement ionisée ;	2d. Assurez-vous que la colonne d'échange d'ions visant à produire de l'eau désionisée a été contrôlée lors d'un entretien de routine ;
	2e. Pas de tampon de lavage pour les Autostainers Dako ou LabVision ;	2e. Voir le point 1d des conseils de dépannage ;

3. Aucun ou faible marquage (rouge) sur les lames control positif.	<u>3a.</u> Présence d'alcool dans l'hématoxyline utilisée (par ex. hématoxyline de Harris) ;	<u>3a.</u> Le Fast Red est soluble dans l'éthanol. Il est donc obligatoire d'utiliser de l'hématoxyline sans alcool afin d'éviter une décoloration du colorant Fast Red (perte du signal de Ki-67) ;
	<u>3b.</u> Lames déshydratées avec une série de concentrations croissantes d'alcool avant d'être couvertes avec une lamelle ou un film ;	<u>3b.</u> Respecter le protocole de montage en deux temps avec le CIntec® PLUS Mount puis une couverture sous lamelle ou film. Voir les recommandations du point 2.5 ;
	<u>3c.</u> Non respect des recommandations pour la préparation de la solution de travail de Fast Red ;	<u>3c.</u> Préparer la solution de Fast Red immédiatement avant l'emploi. Appliquer la solution sur les lames dans les 15 minutes suivant sa préparation. Au-delà, l'intensité du signal et la sensibilité du test peuvent se dégrader ;
4. Coloration de fond des lames excessive	<u>4a.</u> Le réactif de fixation en aérosol des frottis conventionnels (polyéthylène-glycol) n'a pas été complètement enlevé ;	<u>4a.</u> Suivre les instructions du point 2.1 ;
	<u>4b.</u> Les lames ne sont pas bien rincées ;	<u>4b.</u> Utiliser une nouvelle solution dans les bains de tampon et les flacons de lavage ; Pour l'instrument Autostainer, vérifier avant la mise en route que l'instrument est correctement amorcé et que la quantité de tampon suffira pour toute la procédure. Utiliser des solutions neuves de tampons et de réactifs ;

	<u>4c.</u> Les échantillons ont séché au cours de la procédure de coloration ;	<u>4c.</u> Avec un Autostainer, vérifier que la quantité de réactif dans l'appareil est suffisante et que le capot de l'instrument est fermé pendant la procédure. Ne pas exposer les lames à des températures élevées ni à un environnement sec ; Vérifier si le volume de réactif programmé et les points de dépose convenaient pour couvrir toutes les zones des lames contenant des cellules ; Vérifier qu'il y a suffisamment de tampon. Dans le cas contraire, remplir le réservoir de tampon et amorcer la pompe ; Regarder si le tube en plastique transparent entourant la seringue (à gauche du bras mobile) ne contient pas des bulles d'air ; dans ce cas, il peut suffire de chasser les bulles pour résoudre le problème ; Éviter de retarder l'étape d'incubation de la solution de travail Fast Red dans l'Autostainer, afin de limiter le risque d'artefacts de séchage ;
	<u>4d.</u> Méthode de fixation incorrecte ;	<u>4d.</u> Utiliser uniquement les fixateurs recommandés dans les présentes instructions. Les cellules fixées de manière anormale peuvent présenter une coloration de fond excessive ;
	<u>4e.</u> Liaison non spécifique des réactifs aux cellules ;	<u>4e.</u> Vérifier la méthode de fixation de l'échantillon ;
	<u>4f.</u> Séchage des échantillons pendant l'installation de l'Autostainer ;	<u>4f.</u> Recouvrir les échantillons de réactif (tampon) tout en préparant la procédure ;

5. Marquage spécifique trop fort	5a. Méthode de fixation incorrecte ;	5a. Veiller à utiliser un fixateur approprié et une méthode de fixation adéquate ;
	5b. Temps d'incubation des réactifs prolongé ;	5b. Vérifier et respecter le protocole de coloration décrit aux points 2.3.1/2.3.2 ci-dessus ;
	5c. Solution de lavage inadéquate ;	5c. Utiliser le Tampon de lavage (Code catalogue 8557 ;
6. Évaluation des cellules à double réactivité impossible	6a. Contre-coloration trop intense par l'hématoxyline ;	6a. Réduire le temps d'incubation pour l'hématoxyline et/ou bleuissement dans l'eau du robinet ou l'eau ammoniacquée ;
7. Couverture par lamelle ou film inadéquate	7a. La lamelle ou le film de couverture ne peut pas être appliqué correctement ;	7a. Éviter la formation de bulles d'air lors de l'application du CINtec® PLUS Mount (film de couverture aqueux) ; Respecter le temps de séchage recommandé pour le film de couverture aqueux ;
8. Formation de crevasses après le montage des lames avec un produit de montage à base de xylène	8a. Séchage insuffisant du CINtec® PLUS Mount avant le montage des lames avec le produit de montage à base de xylène ;	8a. Laisser sécher les lames couvertes de CINtec® PLUS Mount pendant une nuit à température ambiante ou au moins 4 heures à 37°C. Le CINtec® PLUS Mount doit être complètement sec.

XI. Symboles

Symbole :



Explication :

Numéro de code

Code du lot

Code article international

Identifiant unique des dispositifs

Dispositif médical de diagnostic in vitro

Fabricant

Quantité suffisante pour <n> tests

Consulter les instructions d'utilisation

Utiliser avant

Limites de température

Date de fabrication

Ne pas réutiliser

XII. Fabricant

Fabriqué par :

Roche mtm laboratories AG

Sandhofer Straße 116

68305 Mannheim

Allemagne

www. Roche . com

<https://dialog. Roche . com>

+800 5505 6606

**Coordonnées de
l'assistance tech-
nique (téléphone) :**

XIII. Révision

Ces instructions d'utilisation représentent la version 1.7, parue en juillet 2022.

Modifications par rapport à la version précédente (1.6, sortie en mai 2021) :

- Modifications par rapport à la version précédente (2.5, parue en mai 2021) :
- III., Principe de la procédure : correction du clone d'anticorps 274-11 AC3 en 274-11 AC3V1
- IV., Conservation, CIntec® PLUS Mount : addition d'une explication concernant le stockage à température ambiante
- IV., Équipement nécessaire : addition des Autostainer (précédemment indiqués dans VI., 2. Procédure de marquage)
- VI., 1.5 : Conservation de CIntec PLUS Mount : harmonisation de la température avec température ambiante (précédemment gamme de température)
- VI., 2. Procédure de marquage : clarification spécifiant que l'Autostainer de LabVision et l'Autostainer PLUS de Dako ont été validés par le fabricant, mais que des instruments équivalents peuvent être validés par l'utilisateur

XIV. Propriété intellectuelle

CINtec et E6H4 sont des marques commerciales de Roche.

Toutes les autres marques commerciales appartiennent à leurs propriétaires respectifs.

© 2022 Roche

Annex 1 / Anexo 1 / Annexe 1

References / Bibliografia / Références

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, Grillo-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):djv257.
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.

