

CINtec® PLUS Cytology Kit

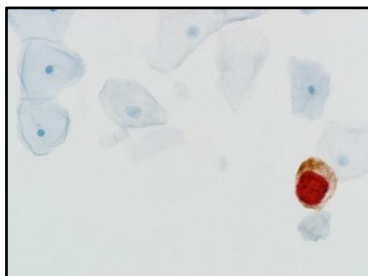
REF

605–100

06889565001

IVD

100



Obr. 1. Cervikální epitelová buňka pozitivní na p16^{INK4a} (hnědý cytoplazmatické zbarvení) a na Ki-67 (červený jaderné zbarvení).

URČENÉ POUŽITÍ

Souprava CINtec PLUS Cytology Kit je imunohistochemický test určený k laboratornímu použití pro simultánní kvalitativní detekci proteinů p16^{INK4a} a Ki-67 v cervikálních cytologických preparátech obarvených na přístroji BenchMark IHC/ISH. Je indikována k použití jako pomůcka při identifikaci žen s cervikálními intraepiteliálními lézemi vysokého stupně u screeningové populace a v podskupinách pacientek s výsledkem cytologického stěru Pap ASC-US (atypické skvamózní buňky neurčeného významu) nebo LSIL (skvamózní intraepiteliální léze nízkého

stupně) nebo u pacientek s pozitivními, vysoce rizikovými výsledky testu HPV.

Interpretaci výsledků testů může provést pouze certifikovaný odborník ve spojení s klinickou anamnézou pacientky a dalšími provedenými diagnostickými testy.

Tento produkt je určen pro diagnostické použití in vitro (IVD).

SOUHRN A VYSVĚTLENÍ

V eukaryotických buňkách je řízení progresu cyklu buněčného dělení regulováno složitým vzorem řízené exprese a posttranslačních modifikací proteinů regulujících buněčný cyklus. V tomto mechanismu regulace eukaryotického buněčného cyklu hraje klíčovou roli protein p16^{INK4a}. Je součástí regulace fázového přechodu G1/S, zprostředkovaného proteinem retinoblastomu (pRb), a spouští zastavení buněčného cyklu v průběhu procesů buněčné diferenciace. Proto má p16^{INK4a} během pravidelné progresu buněčného cyklu antiproliferační účinek.¹ V terminálně diferencovaných epitelových buňkách je exprese p16^{INK4a} snížena na úroveň, která obvykle není detekovatelná pomocí imunocytochemie (ICC).²

U dysplazie děložního čípku je nadměrná exprese p16 považována za náhradní biomarker pro transformující HPV infekce, který odráží aktivaci HPV E6/E7 onkoproteinem řízené buněčné proliferace.^{2,3,4,5} Detekce p16 v cervikálních cytologických preparátech byla navržena jako cenný pomocný marker pro třídění žen s abnormálními výsledky cytologie Pap i s pozitivními výsledky testu HPV.^{3,4,5} Protože však barvení specifické pro p16 může být pozorováno v jednotlivých metaplastických nebo endocervikálních buňkách, v nichž může být p16 exprimován, aby mohl vykonávat svou fyziologickou normální, růst suprimující buněčnou funkci, vyžaduje interpretace cervikálních cytologických preparátů s jedním barvením p16 identifikaci imunoreaktivních buněk p16 a další klasifikaci těchto buněk s ohledem na známky morfologických abnormalit.^{2,3,4}

Kombinovaná současná detekce p16 a proliferačního markeru Ki-67 v rámci jedné buňky pomocí ICC se ukázala jako cenný nástroj pro identifikaci dysplastických buněk děložního hrdla v cytologických preparátech bez nutnosti morfologické interpretace.^{3,7,8} Ki-67 je jaderný a nukleolární protein striktně spojený s buněčnou proliferací a v klidových buňkách (G0) není standardními metodami imunologického barvení detekovatelný.⁶ Za normálních fyziologických podmínek se exprese proteinu Ki-67 spojeného s proliferací vzájemně vylučuje s expresí antiproliferačního proteinu p16. Naproti tomu buňky, u nichž je dráha zprostředkovaná retinoblastomovým proteinem (pRb) a kontrolující progresi buněčného cyklu přerušena před nádorově supresorovou funkcí p16 (například u epitelových buněk exprimujících vysoce rizikové onkoproteiny HPV E6/E7), mohou proliferovat, a tedy exprimovat Ki-67 v přítomnosti funkčního p16.^{2,3}

Proto může detekce jednotlivých buněk v cervikálních cytologických preparátech, které současně exprimují p16 a Ki-67, sloužit jako morfologicky nezávislý indikátor buněk s dysregulací buněčného cyklu. Tato koexprese proteinů p16 a Ki-67 může být použita

jako indikátor přítomnosti transformujících se HPV infekcí a skryté cervikální intraepiteliální neoplazie.^{2,3} V nedávné minulosti byly provedeny a publikovány četné studie hodnotící potenciální hodnotu a klinickou užitečnost cytologie s dvojitým barvením p16/Ki-67 pro identifikaci žen, které mohou mít prospěch z doporučení ke kolposkopii na základě různých výsledků primárního screeningu rakoviny děložního čípku. Tyto výsledky zahrnují třídění žen s výsledky cytologie Pap Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance (ASC-US) nebo Low grade Squamous Intraepithelial Lesion (LSIL) žen, které vykazují vysoké riziko HPV positivity v primárním HPV screeningu, nebo žen, které jsou Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy (NILM) / HPV pozitivní v klinických prostředích, kde se pro primární screening používá společné testování cytologie Pap / HPV.⁷⁻²⁵

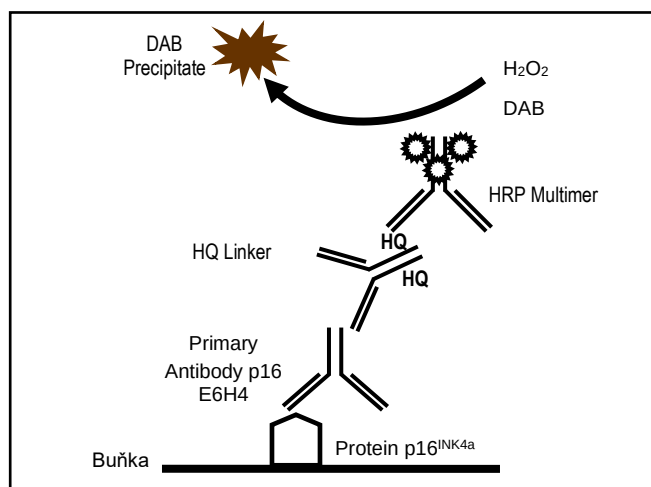
PRINCIP POSTUPU

Souprava CINtec PLUS Cytology Kit obsahuje sadu reagentů pro simultánní imunocytochemickou detekci proteinů p16^{INK4a} a Ki-67 v cytologických vzorcích získaných z děložního hrdla. Proteiny se detekují pomocí koktejlu primárních monoklonálních protilátek připraveného k použití, který obsahuje rekombinantní myši monoklonální protilátku namířenou proti lidskému proteinu p16^{INK4a} (klon E6H4TM) a primární králíčí rekombinantní protilátku namířenou proti lidskému proteinu Ki-67 (klon 274-11AC3V1). Po úpravě buněk, inhibici aktivity endogenní peroxidázy a inkubaci s koktejlem primárních protilátek test využívá dva detekční systémy připravené k použití a optimalizované pro použití na cervikálních cytologických vzorcích:

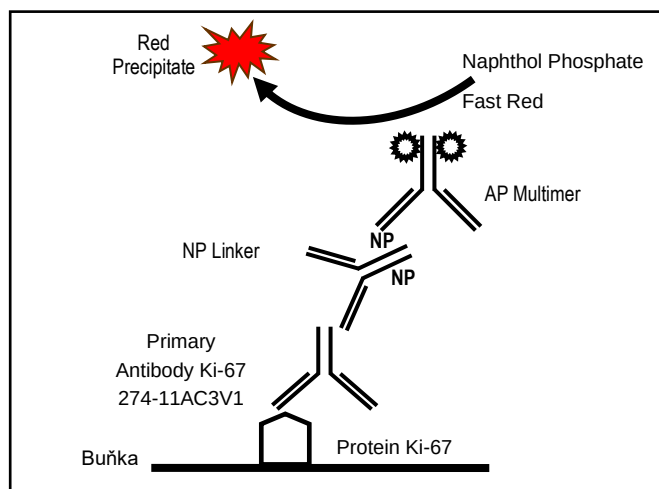
- Kozí anti-myši sekundární protilátka kovalentně navázaná na HQ hapteny (patentovaný hapten) a anti-HQ hapten, terciární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou (HRP) optimalizovaná pro detekci monoklonální myši protilátky klonu E6H4;
- Kozí anti-králíčí sekundární protilátka kovalentně navázaná na NP hapteny (patentovaný hapten) a anti-NP hapten, terciární protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatázou (AP) optimalizovaná pro detekci rekombinantní králíčí protilátky klonu 274-11AC3V1.

Chromogenní reakce jsou založeny na konverzi 3,3'-diaminobenzidinu tetrahydrochloridu (DAB) zprostředkované HRP a konverzi Fast Red zprostředkované AP s Naphthol Phosphate, jejichž výsledkem je hnědý precipitát v místě antigenu p16^{INK4a}, respektive červený precipitát v místě antigenu Ki-67.

Po automatickém kontrastním barvení a modření následuje dvoustupňový postup fixace. Nejprve se skličko fixuje pomocí vodného fixačního média. Následně je skličko překryto krycím sklíčkem pomocí trvalého fixačního média. Výsledky barvení se vyhodnocují kontrolou světelnou mikroskopií.



Obr. 2. Detekce lidského proteinu p16^{INK4a}.



Obr. 3. Detekce lidského proteinu Ki-67.

DODÁVANÝ MATERIÁL

Souprava CINtec PLUS Cytology Kit obsahuje dostatečné množství reagentů pro 100 testů.

Jeden 10mL dávkovač	CINtec PLUS Cytology Primary Antibody Cocktail (p16/Ki-67) obsahuje koktejl rekombinantní monoklonální myši protilátky klonu E6H4 namířené proti lidskému proteinu p16 ^{INK4a} a primární rekombinantní králičí protilátky klonu 274-11AC3V1 namířené proti lidskému proteinu Ki-67 (< 5 µg/mL) v pufru obsahujícím protein s konzervačním prostředkem ProClin 300.
Jeden 10mL dávkovač	CINtec PLUS Cytology Red anti-Rabbit NP Linker obsahuje NP značený kozí anti-králičí IgG (< 10 µg/mL; NP je patentovaný hapten kovalentně navázaný na kozí protilátku) v pufru obsahujícím protein s konzervačním prostředkem ProClin 300.
Jeden 10mL dávkovač	CINtec PLUS Cytology Red AP Multimer obsahuje myši monoklonální anti-NP terciární protilátku značenou AP (< 20 µg/mL) v pufru obsahujícím protein s konzervačním prostředkem ProClin 300.
Jeden 10mL dávkovač	CINtec PLUS Cytology Red Naphthol Phosphate obsahuje Naphthol Phosphate (< 1 %) s konzervačním prostředkem ProClin 300.
Jeden 10mL dávkovač	CINtec PLUS Cytology Fast Red obsahuje Fast Red (< 1 %) v acetátovém pufru s konzervačním prostředkem ProClin 300.
Jeden 10mL dávkovač	CINtec PLUS Cytology DAB Peroxidase Inhibitor obsahuje roztok peroxidu vodíku (< 5 %).
Jeden 10mL dávkovač	CINtec PLUS Cytology DAB anti-Mouse HQ Linker obsahuje HQ značený kozí anti-myši IgG (< 40 µg/mL; HQ je patentovaný hapten kovalentně navázaný na kozí protilátku) v pufru obsahujícím protein s konzervačním prostředkem ProClin 300.
Jeden 10mL dávkovač	CINtec PLUS Cytology DAB HRP Multimer obsahuje myši monoklonální anti-HQ značenou HRP terciární protilátku (< 10 µg/mL) v pufru obsahujícím protein s konzervačním prostředkem ProClin 300.
Jeden 10mL dávkovač	CINtec PLUS Cytology DAB obsahuje 3,3'-diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (< 1 %) v patentovaném stabilizačním roztoku s patentovaným konzervačním prostředkem.
Jeden 10mL dávkovač	CINtec PLUS Cytology DAB H ₂ O ₂ obsahuje peroxid vodíku (< 1 %) v roztoku fosforečnanového pufru.

REKONSTITUCE, MÍSENÍ, ŘEDĚNÍ, TITRACE

CINtec PLUS Cytology Kit je optimalizována k použití na přístrojích BenchMark IHC/ISH. Nevyžaduje se rekonstituce, mísení, ředění ani titrace reagentů ze soupravy.

Odhylky od doporučených postupů pro fixaci a další zpracování cervikálních cytologických vzorků mohou způsobit podstatnou variabilitu výsledků, což si vyžaduje pravidelné provádění interních kontrol.

Další informace o kontrolách najdete v části Kontrola kvality.

POTŘEBNÉ MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY

Barvicí reagentie, například detekční soupravy VENTANA a pomocné materiály, včetně sklíček pro negativní a pozitivní kontrolu tkáně, nejsou součástí dodávky.

Všechny produkty uvedené v metodickém listu nemusejí být dostupné ve všech zeměpisných oblastech. Obrátte se na místní servisní zastoupení.

Následující reagentie a materiály jsou při barvení potřebné, nejsou však součástí dodávky detekční soupravy:

1. Příslušné kontroly (volitelné, viz část Kontrola kvality)
2. Hematoxylin Counterstain (kat. č. 760-2021 / 05266726001)
3. Bluing Reagent (kat. č. 760-2037 / 05266769001)
4. Reaction Buffer Concentrate (10X) (kat. č. 950-300 / 05353955001)
5. Cell Conditioning Solution (CC1) (kat. č. 950-124 / 05279801001)
6. Cell Conditioning Solution (CC2) (kat. č. 950-123 / 05279798001)
7. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (kat. č. 950-224 / 05424569001)
8. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC2) (kat. č. 950-223 / 05424542001)
9. LCS (Predilute) (kat. č. 650-010 / 05264839001)
10. ULTRA LCS (Predilute) (kat. č. 650-210 / 05424534001)
11. Reagent Grade Ethanol, denaturovaný (čistota ≥ 95 %)
12. Přístroj BenchMark IHC/ISH
13. Pro konvenční stěry se doporučují mikroskopická sklička Superfrost Plus (Thermo Fisher Scientific)
14. Mikroskopická sklička ThinPrep Arcless (Hologic REF 70126-002) nebo mikroskopická sklička Superfrost Plus (VWR REF 48311-703)
15. Roche Cell Collection Medium (REF 07994753190)
16. PreservCyt® Solution (Hologic REF 234004)
17. Sklička BD SurePath PreCoat (součástí soupravy SurePath GYN)
18. SurePath™ Preservative Fluid (BD REF 490522)
19. Vodné fixační médium CC/Mount (Roche REF 7342098001; Diagnostic BioSystems P/N: K 002; Sigma-Aldrich P/N: C9368)
20. Volitelné: Sušicí pec schopná udržovat teplotu 60 °C ± 5 °C
21. Obecné laboratorní vybavení

SKLADOVÁNÍ A STABILITA

Po přijetí a mezi použitím uchovávejte při teplotě 2–8 °C. Nezmrazujte. Uživatel musí validovat veškeré skladovací podmínky, které se liší od podmínek uvedených v metodickém listu. Tuto detekční soupravu lze použít okamžitě po vyjmutí z chladničky. Aby byla zajištěna správná funkčnost reagentie a stabilita reagentů, musejí se dávkovatele po každém použití uzavřít víčkem a okamžitě umístit ve svislé poloze do chladničky. Každá detekční souprava má stanovenou dobu expirace. Při správném skladování zůstane produkt stabilní do data uvedeného na štítku. Po uplynutí data expirace pro předepsanou metodu skladování produkt nepoužívejte. Neexistují žádné jednoznačné známky nestability tohoto produktu, proto je vyšetření neznámých vzorků třeba provádět souběžně s pozitivní kontrolou. V případě jakýchkoli známek nestability reagentie je třeba okamžitě kontaktovat vaše místní servisní zastoupení.

VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

1. Určeno k diagnostickému použití in vitro (IVD).
2. Pouze k odbornému použití.
3. Nepoužívejte nad rámec specifikovaného počtu testů.
4. Nepoužívejte produkt, pokud je poškozený obal jakékoli z jeho součástí. Pokud došlo k porušení obalu nebo poškození součástí, neprodleně o tom informujte místní servisní zastoupení.
5. Roztok ProClin 300 je v tomto roztoku použit jako konzervační prostředek. Je klasifikován jako dráždivý a při styku s kůží může způsobit senzibilizaci. Při

- manipulaci dodržujte příslušná bezpečnostní opatření. Zamezte kontaktu reagiencí s očima, kůží a sliznicemi. Používejte ochranný oděv a rukavice.
- S materiálem lidského nebo živočišného původu je třeba nakládat jako s potenciálně nebezpečným biologickým materiálem a likvidovat jej v souladu s platnými bezpečnostními opatřeními. V případě expozice je potřeba se řídit zdravotnickými směrnicemi odpovědných orgánů.^{26,27}
 - Při manipulaci s reagiencemi dodržujte příslušná bezpečnostní opatření. Zamezte kontaktu reagiencí s očima, kůží a sliznicemi. Zabraňte vdechování reagiencí. Při manipulaci s možnými karcinogeny nebo toxickými materiály používejte jednorázové rukavice a vhodný ochranný oděv.
 - Jestliže se reagencie dostanou do kontaktu s citlivými oblastmi, omyjte zasažené oblasti vydatným množstvím vody.
 - Zabraňte mikrobiální kontaminaci reagiencí, mohla by způsobit nepřesnost výsledků.
 - Další informace o používání tohoto prostředku obsahuje uživatelská příručka přístroje BenchMark IHC/ISH a návody k použití všech nezbytných součástí, které naleznete na internetových stránkách navifyportal.roche.com.
 - Doporučené metody likvidace jsou uvedeny v celostátních a/nebo místních předpisech.
 - Při manipulaci s cytologickými vzorky a jejich likvidací, včetně všech vzorků před a po fixaci, jakož i v všech materiálech, které jsou jim vystaveny, dodržujte bezpečnostní opatření pro manipulaci s potenciálně infekčním materiálem, jakož i příslušné požadavky na likvidaci odpadu.
 - Označení produktu bezpečnostními štítky se řídí hlavně pokyny GHS EU. Pro profesionální uživatele je na vyžádání k dispozici bezpečnostní list.
 - Pro nahlášení podezřelých závažných incidentů týkajících se tohoto prostředku se obraťte na místního zástupce společnosti Roche a kompetentní orgány členského státu nebo země, ve které uživatel provozuje činnost.

Tato detekční souprava obsahuje součásti klasifikované následovně podle směrnice (ES) č. 1272/2008:

Tab. 1. Informace o rizicích.

Riziko	Kód	Věta
	H317	Může vyvolat alergickou kožní reakci.
	H350	Může způsobit rakovinu.
	H412	Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky.
	P201	Před použitím si obzvláště pozorně přečtěte pokyny.
	P261	Zamezte vdechování mlhy a par.
	P273	Zabraňte uvolnění do životního prostředí.
	P280	Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít / ochranu sluchu.
	P308 + P313	PŘI expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.
	P333 + P313	Při podráždění kůže nebo vyrážce: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.

Tento produkt obsahuje látku s č. CAS:

- 868272-85-9: 3,3'-diaminobenzidín-tetrahydrochlorid hydrát
- 2682-20-4: 2-methyl-2H-isothiazol-3-on
- 55965-84-9, reakční směs: 5-chlor-2-methyl-2H-isothiazolin-3-onu a 2-methyl-2H-isothiazol-3-onu (3 : 1)

PŘÍPRAVA VZORKŮ

S cytologickými vzorky je nutné zacházet odpovídajícím způsobem, aby byly vzorky uchovány pro imunocytochemické postupy. Všechny vzorky by měly být podrobeny standardním metodám zpracování buněk.

Aby se zabránilo znečištění pomocí látek, jako je krev a hlen, a zajistilo se, že vzorek bude odpovídat pokynům Bethesda Guidelines²⁸, je třeba, aby lékaři dodržovali doporučené techniky odběru vzorků.

Pro použití se soupravou CINtec PLUS Cytology Kit jsou vhodné následující způsoby přípravy sklíček:

- sklíčka ThinPrep (Hologic Inc.) připravená na zařízení ThinPrep 2000 nebo 5000 Processor (Hologic Inc.) pomocí sklíček ThinPrep Arcless Microscope nebo Superfrost Plus podle doporučení výrobce;
- BD SurePath (BD Diagnostics) sklíčka připravená podle doporučení výrobce.
- ručně připravená sklíčka (konvenční sklíčka na stěry).

Příslušné kontroly doporučujeme provádět současně s patientskými vzorky (další podrobnosti najdete v části Kontrola kvality).

Příprava vzorků Roche Cell Collection Medium

Cytologické vzorky odebrané zdravotníkem a resuspendované v roztoku Roche Cell Collection Medium (RCCM), určené pro imunocytochemické barvení pomocí soupravy CINtec PLUS Cytology Kit, lze skladovat při teplotě 15–30 °C po dobu 6 týdnů, s dalšími 12 týdny v chladničce při teplotě 2–8 °C.

Pro imunocytochemické barvení pomocí soupravy CINtec PLUS Cytology Kit na přístrojích BenchMark IHC/ISH jsou zapotřebí sklíčka ThinPrep Arcless Microscope nebo Superfrost Plus.

Příprava sklíček ze vzorků odebraných do média Roche Cell Collection Medium pomocí zařízení ThinPrep 2000 Processor

Sklíčka jsou připravována ze vzorků odebraných do média Roche Cell Collection Medium pomocí zařízení ThinPrep 2000 Processor. Po dokončení sekvence zařízení ThinPrep 2000 Processor se zpracované sklíčko umístí do lahvičky s fixativem obsahující ≥ 95 % roztok ethanolu třídy čistoty pro reagencie. Vyměňte lahvičku z držáku fixační lázně zařízení ThinPrep 2000 Processor a přeneste zpracované sklíčko z lahvičky do nádoby na sklíčka naplněné ≥ 95 % roztokem ethanolu. Inkubujte sklíčko (sklíčka) v ethanolu po dobu minimálně 15 minut až maximálně 60 minut. Po každých 20 připravených sklíčcích ethanolový roztok v lahvičce s fixativem a v nádobě na sklíčka vyměňte. Po skončení doby inkubace vyměňte sklíčko (sklíčka) z roztoku ethanolu, položte je vodorovně na rovný povrch a nechte schnout po dobu alespoň 60 minut. Osušená sklíčka mohou být skladována při teplotě místnosti, chráněná před světlem a musejí být obarvena soupravou CINtec PLUS Cytology Kit do 7 dnů od přípravy.

Příprava sklíček ze vzorků odebraných do média Roche Cell Collection Medium pomocí zařízení ThinPrep 5000 Processor

Sklíčka jsou připravována ze vzorků odebraných do média Roche Cell Collection Medium pomocí zařízení ThinPrep 5000 Processor. Po dokončení sekvence zařízení ThinPrep 5000 Processor jsou zpracovaná sklíčka umístěna do stojanu na sklíčka, který je ponořen do fixační lázně s obsahem ≥ 95 % ethanolového roztoku třídy čistoty pro reagencie. Vyměňte fixační lázeň nebo nádobu se sklíčky ze zařízení ThinPrep 5000 Processor a inkubujte sklíčka dalších minimálně 15 minut až maximálně 60 minut. Ethanolový roztok v nádobě se sklíčky po každém cyklu vyměňte. Po skončení doby inkubace vyměňte sklíčka z roztoku ethanolu, položte je vodorovně na rovný povrch a nechte schnout po dobu alespoň 60 minut. Osušená sklíčka mohou být skladována při teplotě místnosti, chráněná před světlem a musejí být obarvena soupravou CINtec PLUS Cytology Kit do 7 dnů od přípravy.

Před imunocytochemickým barvením pomocí soupravy CINtec PLUS Cytology Kit odstraňte původní štítek sklíčka používaný zařízením ThinPrep 5000 Processor.

Příprava vzorků PreservCyt

Cytologický vzorek v roztoku PreservCyt Solution (PC), určený pro imunocytochemické barvení pomocí soupravy CINtec PLUS Cytology Kit, lze skladovat při teplotě 15–30 °C po dobu 6 týdnů, s dalšími 12 týdny v chladničce při teplotě 2–8 °C.

Pro imunocytochemické barvení pomocí soupravy CINtec PLUS Cytology Kit na přístrojích BenchMark IHC/ISH jsou zapotřebí sklíčka ThinPrep Arcless Microscope nebo Superfrost Plus.

Příprava sklíček Slide Preparation ze vzorků odebraných do roztoku PreservCyt pomocí zařízení ThinPrep 2000 Processor

Sklíčka jsou připravována z cytologických vzorků odebraných zdravotníkem a resuspendovaných do roztoku PreservCyt pomocí zařízení ThinPrep 2000 Processor. Po dokončení sekvence zařízení ThinPrep 2000 Processor se zpracované sklíčko umístí do lahvičky s fixativem obsahující ≥ 95 % roztok ethanolu třídy čistoty pro reagencie. Vyměňte lahvičku z držáku fixační lázně zařízení ThinPrep 2000 Processor a přeneste zpracované sklíčko z lahvičky do nádoby na sklíčka naplněné ≥ 95 % roztokem ethanolu. Inkubujte sklíčko (sklíčka) v ethanolu po dobu minimálně 15 minut až maximálně 60 minut. Po každých 20 připravených sklíčcích ethanolový roztok v lahvičce s fixativem a v nádobě na sklíčka vyměňte. Po skončení doby inkubace vyměňte sklíčko (sklíčka) z roztoku

ethanolu, položte je vodorovně na rovný povrch a nechte schnout po dobu alespoň 60 minut. Osušená sklička mohou být skladována při teplotě 15–30 °C, chráněná před světlem a musejí být obarvena soupravou CIntec PLUS Cytology Kit do 7 dnů od přípravy.

Příprava sklíček Slide Preparation ze vzorků odebraných do roztoku PreservCyt pomocí zařízení ThinPrep 5000 Processor

Sklička jsou připravována z cytologických vzorků odebraných zdravotníkem a resuspendovaných do roztoku PreservCyt pomocí zařízení ThinPrep 5000 Processor. Po dokončení sekvence zařízení ThinPrep 5000 Processor jsou zpracovaná sklička umístěna do stojanu na sklička, který je ponořen do fixační lázně s obsahem $\geq 95\%$ ethanolového roztoku třídy čistoty pro reagentie. Vyjměte fixační lázeň nebo nádobu se skličky ze zařízení ThinPrep 5000 Processor a inkubujte sklička dalších minimálně 15 minut až maximálně 60 minut. Ethanolový roztok v nádobě se skličky po každém cyklu vyměňte. Po skončení doby inkubace vyjměte sklička z roztoku ethanolu, položte je vodorovně na rovný povrch a nechte schnout po dobu alespoň 60 minut. Osušená sklička mohou být skladována při teplotě místnosti, chráněná před světlem a musejí být obarvena soupravou CIntec PLUS Cytology Kit do 7 dnů od přípravy.

Před imunocytochemickým barvením pomocí soupravy CIntec PLUS Cytology Kit odstraňte původní štítek sklička používaný zařízením ThinPrep 5000 Processor.

Příprava vzorků BD SurePath

Cytologické vzorky odebrané zdravotníkem a resuspendované v roztoku konzervační tekutiny SurePath Preservative Fluid, určené pro imunocytochemické barvení pomocí soupravy CIntec PLUS Cytology Kit, lze skladovat při teplotě 15–30 °C po dobu 4 týdnů a po dobu 6 měsíců v chladničce při teplotě 2–10 °C.

Příprava sklička BD SurePath Slide Preparation bezprostředně po zpracování sklička Pap

Jakmile je vytvořena obohacená buněčná peleta pro přípravu sklička pro barvení Pap, lze ji okamžitě použít k přípravě druhého sklička, které má být barveno se soupravou CIntec PLUS Cytology Kit. Řiďte se doporučením výrobce pro použití možnosti „Slide Preparation“ [volba 2] u gynekologických (GYN) vzorků na přístroji PrepStain™. V nabídce „Change Sample/Stain Parameters“ je třeba objem resuspendování změnit na 0 mL.

Příprava sklička BD SurePath Slide Preparation z konzervované buněčné pelety

Obohacené buněčné pelety lze konzervovat přidáním přibližně 2 mL konzervační tekutiny SurePath Preservative Fluid a uzavřením zkumavek se vzorky pro účely skladování (podrobnosti naleznete v pokynech od výrobce). Od data odběru vzorku mohou být buněčné pelety, které byly resuspendovány v konzervační tekutině, skladovány po dobu až 4 týdnů při teplotě 15–30 °C nebo po dobu 6 měsíců v chladničce udržované při teplotě 2–10 °C. Chcete-li zpracovat skličko pro soupravu CIntec PLUS Cytology Kit, nejprve vzorek temperovat 60 minut při teplotě místnosti. Začněte druhým krokem centrifugace v procesu obohacování GYN a proveďte zbývající kroky předběžného zpracování, jak je uvedeno v návodu výrobce pro opětovné zpracování konzervovaných buněčných pelet. Řiďte se doporučením výrobce pro použití možnosti „Slide Preparation“ [volba 2] u gynekologických (GYN) vzorků na přístroji PrepStain.

Po dokončení kroku přenosu vzorků vyjměte u všech výše uvedených možností přípravy z přístroje PrepStain stojan na sklička. Otočte stojan a slijte kapalinu. Napipetujte 2 mL ethanolového roztoku $\geq 95\%$ třídy čistoty pro reagentie do každé usazovací komory a ihned dekantujte. Podruhé opláchněte 2 mL $\geq 95\%$ ethanolového roztoku třídy čistoty pro reagentie a inkubujte po dobu 10 minut. Obrácením stojanu podruhé slijte vodu. Vyjměte usazovací komory ze sklíček, sklička položte vodorovně na rovný povrch a nechte je schnout po dobu alespoň 60 minut. Osušená sklička mohou být skladována při teplotě místnosti, chráněná před světlem a musejí být obarvena soupravou CIntec PLUS Cytology Kit do 7 dnů od přípravy.

Použití běžných stěrů

Běžné stěry by měly být fixovány ihned po odběru vzorku cytologickým aerosolovým fixačním činidlem obsahujícím polyethylenglykol (např. Safetex Cytology Fixative, Andwin Scientific). Konvenční sklička na stěry, fixovaná aerosolem, mohou být skladována při teplotě místnosti, chráněná před světlem a musejí být obarvena soupravou CIntec PLUS Cytology Kit do 7 dnů od přípravy.

Před vložením sklíček do přístroje BenchMark IHC/ISH není nutné žádné další předběžné zpracování.

POSTUP BARVENÍ

Souprava CIntec PLUS Cytology Kit byla vyvinuta pro použití na přístrojích BenchMark IHC/ISH ve spojení s přidávanými reagentii a příslušenstvím VENTANA.

Souprava CIntec PLUS Cytology Kit byla optimalizována s parametry uvedenými v tabulkách 2, 3 a 4; uživatel však musí výsledky získané pomocí této soupravy validovat. Parametry automatických protokolů lze zobrazit, vytisknout a upravovat podle instrukcí uvedených v uživatelské příručce přístroje.

Tab. 2. Doporučený barvicí protokol pro připravená sklička ThinPrep, SurePath a sklička s konvenčními stěry na přístroji BenchMark GX i.

Postup barvení	GX CIntec PLUS Cytology		
Volitelné možnosti	Typ Slide Preparation		
	RCCM/ThinPrep	SurePath	Konvenční
ThinPrep	Zvoleno	Nezvoleno	Nezvoleno
SurePath	Nezvoleno	Zvoleno	Nezvoleno
Jiné	Nezvoleno	Nezvoleno	Zvoleno
Cell Conditioning Option	Nelze vybrat	Nelze vybrat	16 minut
Doba ink. protilátky	16 minut	20 minut	16 minut
Doba ink. HQ Linker Inc	12 minut	16 minut	12 minut
Doba ink. HRP Multimer Inc	6 minut	8 minut	8 minut
Doba ink. NP Linker Inc	8 minut	16 minut	8 minut
Doba ink. AP Multimer Inc	8 minut	8 minut	8 minut
Hematoxylin	8 minut	8 minut	8 minut
Bliuing	4 minuty	4 minuty	4 minuty

Tab. 3. Doporučený barvicí protokol pro připravená sklička ThinPrep, SurePath a konvenční sklička na stěry na přístroji BenchMark XT.

Postup barvení	XT CIntec PLUS Cytology		
Volitelné možnosti	Typ Slide Preparation		
	RCCM/ThinPrep	SurePath	Konvenční
ThinPrep	Zvoleno	Nezvoleno	Nezvoleno
SurePath	Nezvoleno	Zvoleno	Nezvoleno
Jiné	Nezvoleno	Nezvoleno	Zvoleno
Cell Conditioning Option	Nelze vybrat	Nelze vybrat	16 minut
Doba ink. protilátky	16 minut	20 minut	16 minut
Doba ink. HQ Linker Inc	12 minut	16 minut	12 minut
Doba ink. HRP Multimer Inc	8 minut	8 minut	8 minut
Doba ink. NP Linker Inc	8 minut	16 minut	8 minut
Doba ink. AP Multimer Inc	8 minut	8 minut	8 minut
Hematoxylin	8 minut	8 minut	8 minut
Bliuing	4 minuty	4 minuty	4 minuty

Tab. 4. Doporučený barvicí protokol pro připravená sklička ThinPrep, SurePath a sklička s konvenčními stěry na přístrojích BenchMark ULTRA nebo BenchMark ULTRA PLUS.

Postup barvení	U CIntec PLUS Cytology		
Volitelné možnosti	Typ Slide Preparation		
	RCCM/ThinPrep	SurePath	Konvenční
ThinPrep	Zvoleno	Nezvoleno	Nezvoleno
SurePath	Nezvoleno	Zvoleno	Nezvoleno
Jiné	Nezvoleno	Nezvoleno	Zvoleno
Cell Conditioning Option	Nelze vybrat	Nelze vybrat	16 minut
Doba ink. protilátky	16 minut	16 minut	16 minut
Doba ink. HQ Linker Inc	12 minut	16 minut	12 minut
Doba ink. HRP Multimer Inc	8 minut	8 minut	8 minut
Doba ink. NP Linker Inc	8 minut	16 minut	8 minut
Doba ink. AP Multimer Inc	8 minut	8 minut	8 minut
Hematoxylin	8 minut	8 minut	8 minut
Bliuing	4 minuty	4 minuty	4 minuty

POSTUP ZPRACOVÁNÍ PO BARVENÍ – FIXACE A PŘILOŽENÍ KRYCÍHO SKLIČKA

Aby zůstala zachována optimální senzitivita a zabránilo se vyblednutí chromogenu je vyžadován dvoustupňový postup fixace.

Vyjměte sklička z přístroje BenchMark IHC/ISH a jemně jimi zatřepejte; sklička pak oplachujte vodovodní, deionizovanou nebo destilovanou vodou a jemným čistícím prostředkem, dokud ze skliček není zcela odstraněn LCS.

POZNÁMKA: Nedovolte, aby voda tekla přímo na povrch skliček. Nechte vodu téct minimálním proudem.

Sklička budou fixována podle dvoustupňového protokolu a následující kroky je nutné provést postupně:

Vodná fixace:

1. Inkubujte sklička v destilované nebo deionizované vodě po dobu nejméně 1 minuty.
2. Sklička, která nejsou krycím sklíčkem, by měla během nanášení vodního fixačního média CC/Mount na ostatní sklička zůstat v destilované nebo deionizované vodě.
3. Z destilované nebo deionizované vody vyjměte jedno skličko a opatrně otřete zadní stranu sklička papírovým ručníkem, abyste odstranili přebytečnou vodu. Neodstraňujte ani neutřítejte vodu z přední části sklička (strana vzorku).
4. Držte skličko v mírném úhlu a naneste 4–6 kapek vodního fixačního média CC/Mount na jedno skličko ThinPrep nebo SurePath a 8 kapek na jedno konvenční skličko na stěry. Zabraňte tvorbě vzduchových bublin. Aby se zabránilo tvorbě bublin, lze před nanesením fixačního média CC/Mount na plochu pro přípravu vzorku na skličko první kapku vyhodit na papírový ručník.
5. Jemně skličko nakloňte a otáčejte jím, aby se vytvořila tenká vrstva fixačního média, která zcela zakryje plochu přípravy vzorku (ještě nepoužívejte krycí skličko ani fólii s funkcí krycího sklička); vizuálně zkontrolujte distribuci fixačního média na skličku.
6. Očistěte přebytečné vodní fixační médium CC/Mount ze zadní strany a okrajů sklička. V případě potřeby použijte navlhčený papírový ručník.
7. Za účelem sušení umístíte připravená sklička do vodorovné polohy.
 - Připravená sklička ThinPrep nebo SurePath inkubujte po dobu 1 hodiny při teplotě 37–60 °C nebo alternativně přes noc při teplotě místnosti.
 - Konvenční sklička na stěry inkubujte při teplotě 37 °C po dobu 4 hodin nebo při teplotě 60 °C po dobu 1 hodiny, případně přes noc při teplotě místnosti.

Přiložení krycího sklička nebo fólie s funkcí krycího sklička:

1. Po úplném usušení vodního fixačního média CC/Mount nechejte sklička v případě potřeby vytemperovat na teplotu místnosti. Inkubujte sklička v xylenu po dobu minimálně 1 minuty a maximálně 20 minut. Dále na sklička přiložte skleněná krycí sklička s použitím fixačního média na bázi xylenu nebo s fólií s funkcí krycího sklička na bázi xylenu.

POZNÁMKA: Sklička nesmí být před aplikací krycího sklička nebo filmu dehydratována vzestupnou řadou alkoholu.

2. Fixační médium na bázi xylenu nechte uschnout při teplotě místnosti.

POZNÁMKA: Pro minimalizaci vyblednutí chraňte sklička před světlem a skladujte je při pokojové teplotě.

KONTROLA KVALITY

Odhylky od doporučených postupů pro fixaci a další zpracování cervikálních cytologických vzorků mohou způsobit podstatnou variabilitu výsledků. Nesprávná funkce produktu v důsledku problémů s manipulací nebo nestabilitou nevykazuje zjevné známky. Proto by měly být současně s patientskými vzorky prováděny příslušné kontroly.

Pozitivní kontrola

Jako pozitivní kontroly by měly být použity vzorky zpracované stejným způsobem jako vzorky patientské. Pozitivní kontroly jsou ukazatelem správně připravených vzorků a správné techniky barvení. Do každého barvicího cyklu je třeba zařadit jednu pozitivní kontrolu.

Známe pozitivní kontroly by se měly používat pouze ke sledování správné funkce zpracovaných vzorků a testovacích reagentů, nikoli jako pomůcka ke stanovení konkrétní diagnózy patientských vzorků. Pokud pozitivní kontroly příslušné pozitivní zbarvení nevykazují, měly by být veškeré výsledky u testovaných vzorků považovány za neplatné.

Negative Control

Různé typy buněk přítomné v reprezentativních cervikálních cytologických vzorcích, o nichž je známo, že jsou negativní na expresi antigenů p16^{INK4a} a Ki-67 (např. povrchové buňky), mohou sloužit jako interní negativní kontrola pro posouzení barvení pozadí.

Ověření testu

Uživatel by měl před prvním použitím v diagnostickém postupu výkonnost soupravy CIntec PLUS Cytology Kit ověřit na pozitivních a negativních vzorcích se známými funkčními charakteristikami.

INTERPRETACE BARVENÍ / OČEKÁVANÉ VÝSLEDKY

Při barvení soupravou CIntec PLUS Cytology Kit vznikají dva barevně odlišné reakční produkty: hnědý precipitát v místech antigenu p16^{INK4a} a červený precipitát v místech antigenu Ki-67. Hnědý zbarvení buněk (cytoplazma a/nebo jádra) znamená nadměrnou expresi p16^{INK4a}. Červené Red zbarvení buněk (jádra) indikuje expresi Ki-67. Buňky obarvené na oba antigeny vykazují hnědé cytoplazmatické zbarvení s typicky výraznými červenými jádry. Je třeba, aby před interpretací výsledků vyhodnotil kontroly kvalifikovaný patolog/cytotechnolog se zkušenostmi s imunocytochemickými postupy a vyškolený v interpretaci skliček obarvených se soupravou CIntec PLUS Cytology Kit.

Interpretaci výsledků testů může provést pouze certifikovaný odborník ve spojení s klinickou anamnézou pacientky a dalšími provedenými diagnostickými testy.

Při interpretaci cervikálních cytologických skliček obarvených pomocí soupravy CIntec PLUS Cytology Kit je třeba sklička hodnotit z hlediska přítomnosti epitelových buněk děložního hrdla, které vykazují jak cytoplazmatické hnědé, tak jaderné červené zbarvení svědčící o současné expresi p16^{INK4a} a Ki-67. Navíc, podobně jako při hlášení výsledků cytologie Pap, by vzorky měly být posouzeny z hlediska adekvátnosti vzorku podle Bethesda Guidelines 2015 (nebo TBS)²⁸ při hlášení výsledků testu soupravy CIntec PLUS Cytology Kit.

Pozitivní výsledek testu

Přítomnost jedné nebo více cervikálních epitelových buněk se společnou lokalizací specifického hnědého cytoplazmatického imunologického barvení a specifického červeného jaderného imunologického barvení ve stejné buňce je považována za pozitivní výsledek testu se soupravou CIntec PLUS Cytology Kit bez ohledu na cytomorfológické rysy.

Negativní výsledek testu

Pokud žádná cervikální epitelová buňka nevykazuje současně hnědé cytoplazmatické imunologické barvení a červené jaderné imunologické barvení, je výsledek testu se soupravou CIntec PLUS Cytology Kit považován za negativní.

Přítomnost epitelových buněk děložního hrdla, které vykazují imunoreaktivitu pouze pro jeden, ale ne pro oba markery (např. hnědé barvení pouze pro p16^{INK4a} nebo červené barvení pouze pro Ki-67), se nepovažuje za pozitivní výsledek testu soupravy CINtec PLUS Cytology Kit.

SPECIFICKÁ OMEZENÍ

1. Pouze k odbornému použití. Pro provádění imunocytochemických postupů je vyžadováno speciální školení.
2. Vyhodnocování mikroskopických sklíček obarvených soupravou CINtec PLUS Cytology Kit by měl provádět pouze certifikovaný odborník, který byl k interpretaci výsledků těchto testů vyškolen.
3. Klinická interpretace pozitivního nebo negativního zabarvení musí být vyhodnocena v kontextu klinické prezentace a cytologických kritérií.
4. Interpretace výsledků barvení se soupravou CINtec PLUS Cytology Kit závisí na intenzitě a kvalitě kontrastního barvení hematoxylinem. Odchylka od doporučených reagentů a dob inkubace vyžaduje validaci ze strany zákazníka, protože nadměrné nebo neúplné kontrastní barvení může narušit správnou interpretaci výsledků.
5. Cervikální vzorky často vykazují viditelné detekovatelné hladiny plné krve. Pokud koncentrace plné krve překročí 1.0 %, měl by být vzorek před přípravou sklíčka podroben léze ledovou kyselinou octovou (glacial acetic acid, GAA) podle protokolu ThinPrep.
6. Konvenční sklíčka na stěry určená k barvení pomocí soupravy CINtec PLUS Cytology Kit se připravují pomocí mikroskopických sklíček Superfrost Plus a fixativa Safetex Cytology Fixative (Andwin Scientific), což je aerosolová fixační reagentie obsahující polyethylenglykol. Odchylní od tohoto doporučení vyžaduje potvrzení ze strany zákazníka.
7. Použití zařízení ThinPrep 3000 Processor se pro přípravu vzorků ThinPrep nedoporučuje, protože postup aerosolové fixace prováděný přístrojem může vést k podstatné ztrátě buněk, když jsou připravená sklíčka obarvena se soupravou CINtec PLUS Cytology Kit.
8. Pro přípravu vzorků pro ThinPrep pro imunocytochemické barvení pomocí soupravy CINtec PLUS Cytology Kit na přístrojích BenchMark IHC/ISH jsou zapotřebí sklíčka ThinPrep Arcless Microscope nebo sklíčka pro speciální zpracování ThinPrep Microscope Slides nebo mikroskopická sklíčka Superfrost Plus. Mikroskopická sklíčka ThinPrep s potlačenou screeningovou oblastí mohou vést k nekonzistentním výsledkům barvení.
9. Výrobce poskytuje tyto protilátky/reagentie v optimálním ředění pro použití podle zde uvedených pokynů pro imunocytochemické testování na připravených sklíčkách pro cytologii na bázi kapaliny (liquid-based cytology, LBC). Jakákoli odchylka od doporučených postupů testu může zneplatnit deklarované očekávané výsledky; proto by měly být použity a zdokumentovány příslušné kontroly. Uživatelé, kteří se odchýlí od doporučených postupů testu, přijímají odpovědnost za interpretaci výsledků u pacientů za těchto okolností.
10. Všechny testy nemusejí být registrovány na každém přístroji. Pro více informací kontaktujte místního zástupce společnosti Roche.

FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY

ANALYTICKÁ VÝKONNOST

Výkonnost soupravy CINtec PLUS Cytology Kit byla hodnocena prostřednictvím analytické reprodukovatelnosti a dalšími relevantními studii.

Analytická senzitivita a specifita

Analytická senzitivita a specifita primárních protilátek p16 a Ki-67 byly testovány v testech Western blot a peptidové inhibice.

Testy Western blot používaly lyzáty z buněčných linií představující řadu intenzit barvení. Protilátka anti-p16^{INK4a} (E6H4) byla schopna v purifikovaném přípravku rekombinantního proteinu p16^{INK4a} detekovat pás o velikosti přibližně 15–20 kD. Dále se protilátka specificky vázala na purifikovaný rekombinantní protein p16^{INK4a} a nikoli na ekvivalentní množství nepříbuzného rekombinantního proteinu. Bylo také prokázáno, že protilátka váže endogenní protein p16^{INK4a} exprimovaný v lyzátech odvozených z buněčných linií HeLa, SK Mel 28 a DU145 a neváže se na p16^{INK4a} negativní buněčnou linii MDA MB 231. Relativní hladiny proteinu p16^{INK4a} zjištěné v lyzátech ze všech čtyř buněčných linií v testu Western Blot odpovídaly údajům z barvení IHC, což prokazuje senzitivitu detekce protilátky anti-p16^{INK4a} (E6H4). Vazba klonu protilátky Ki-67 (274-11AC3V1) byla testována pomocí testu Western Blot s použitím celobuněčných lyzátů připravených z buněčných linií L428 (Hodgkinův lymfom pozitivní na antigen Ki-67; DSMZ ATCC 197) a LNCaP (buněčná linie karcinomu prostaty s nízkou expresí proteinu Ki-67; ATCC CRL-1740).

Protilátka byla schopna detekovat endogenní protein Ki-67 v buněčných lyzátech i při nízkých úrovních exprese a intenzita bandu korelovala s barvením IHC na Ki-67 v těchto buněčných liniích. Primární protilátka Ki-67 ze soupravy CINtec PLUS Cytology Kit (274-11AC3V1) se váže na purifikovaný rekombinantní proteinový fragment Ki-67, a ne na ekvivalentní množství nepříbuzného rekombinantního negativního kontrolního proteinu. Vazba v tomto testu nebyla zjištěna u buněčné linie LNCaP s nízkou expresí Ki-67. Relativní hladiny proteinu Ki-67 detekované v lyzátech z těchto buněčných linií v testu Western blot korelují s údaji z barvení IHC a údaji o expresi mRNA. Výsledky testu Western blot ukazují, že primární protilátka Ki-67 použitá v soupravě CINtec PLUS Cytology Kit může detekovat endogenní protein Ki-67 v buněčných lyzátech a fragment rekombinantního proteinu Ki-67 v purifikované formě.

Při testech inhibice peptidů byly použity roztoky obsahující specifické peptidy p16 nebo Ki-67. Koktejl s primární protilátkou byl zředěn v objemovém poměru 1 : 1 s roztoky peptidů specifických pro p16 či Ki-67 o různých koncentracích tak, aby pokrývaly rozmezí molárních poměrů: přibližně 1-, 10-, 100-, 1000- a 10000násobný molární přebytek peptidu ve srovnání s konečnou koncentrací protilátky v roztoku. Koktejl primárních protilátek obsahující peptid specifický pro p16 sloužil jako nespecifická kontrola pro protilátku anti-Ki-67 a nepříbuzný peptid Alk-a sloužil jako nespecifická kontrola pro protilátku anti-p16. Jedno sklíčko z každého vzorku (tři pooly cervikálních cytologických vzorků a jeden buněk CaSki) bylo obarveno každým roztokem. Výsledky této studie ukázaly, že protilátka anti-p16 specificky váže protein p16 a že protilátka anti-Ki-67 specificky váže protein Ki-67. Jak se dalo očekávat, intenzity barvení p16 a Ki-67 byly sníženy u všech vzorků po barvení s roztoky obsahujícími příslušné specifické peptidy v koncentraci 1 M; úplná inhibice byla dosažena u roztoků obsahujících ≥ 10 M, zatímco snížení intenzity barvení p16 po barvení s roztoky obsahujícími nespecifický peptid nebo žádný peptid nebylo vůbec pozorováno.

Opakovatelnost a mezilehlá preciznost

U cervikálních vzorků ThinPrep byly provedeny studie preciznosti barvení se soupravou CINtec PLUS Cytology Kit, aby se prokázalo:

- Celková preciznost – procento výsledků stejných jako majoritní call bylo vypočteno pro každý z 12 cervikálních cytologických poolů (3 pooly HSIL/HPV+, 1 pool LSIL/HPV+, 1 pool ASC-US/HPV+, 1 pool NILM/HPV+, 3 pooly NILM/HPV- LBC a 3 negativní pooly buněčné linie T24), které byly barveny 3 šaržemi soupravy CINtec PLUS Cytology Kit 5 po sobě nenásledujících dnů s použitím 2 replikátů sklíček z každého poolu a vyhodnocené 3 týmy hodnotitelů.
- Preciznost mezi dny – procento výsledků stejných jako majoritní call bylo vypočteno pro každý den (1.–5. den), přičemž byla shrnuta data z 12 cervikálních cytologických poolů (3 pooly HSIL/HPV+, 1 pool LSIL/HPV+, 1 pool ASC-US/HPV+, 1 pool NILM/HPV+, 3 pooly NILM/HPV- LBC a 3 negativní pooly buněčné linie T24), 3 šarže soupravy CINtec PLUS Cytology Kit, 2 replikáty sklíček z každého poolu a 3 týmy hodnotitelů.
- Preciznost mezi šaržemi – procento výsledků stejných jako majoritní call bylo vypočteno pro každou soupravu CINtec PLUS Cytology Kit (šarže 1–3), přičemž byla shrnuta data z 12 cervikálních cytologických poolů (3 pooly HSIL/HPV+, 1 pool LSIL/HPV+, 1 pool ASC-US/HPV+, 1 pool NILM/HPV+, 3 pool NILM/HPV- LBC a 3 negativní pooly buněčné linie T24), 5 po sobě nenásledujících dnů, 2 replikáty a 3 týmy hodnotitelů.

Všechna sklíčka byla zaslepena a randomizována a hodnocena pomocí interpretace barvení CINtec PLUS Cytology Kit. Sklíčka byla hodnocena třemi týmy hodnotitelů, z nichž každý sestával z cytotechnologa a patologa. Výsledek pro režim majoritního callu nebo pro režim na úrovni poolu (pozitivní nebo negativní) byl použit jako reference k určení procenta výsledků stejných jako majoritní call. Procento výsledků stejných jako majoritní call je ekvivalentní PPA, když je majoritní call pozitivní, a NPA, když je majoritní call negativní. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 5, Tab. 6 a Tab. 7. Všechny intervaly spolehlivosti (CI) byly oboustranné 95 % intervaly spolehlivosti. Interval spolehlivosti byl vypočítán s použitím metody percentilového bootstrapu; v případech, kdy byl odhad bodu 100 %, byla použita metoda Wilsonova skóre.

Tab. 5. Studie preciznosti v rámci laboratoře – celková preciznost

Kategorie poolu	Počet hodnocení	Režim výsledků pro soupravu CINtec PLUS Cytology Kit (majoritní call)	Procento výsledků stejných jako majoritní call	95 % interval spolehlivosti
Buněčná linie T24	270	Negativní	100.0 %	(98.6, 100.0)
NILM/HPV-	270	Negativní	94.1 %	(90.7, 97.0)
NILM/HPV+	90	Pozitivní	61.1 %	(47.2, 74.4)
ASC-US/HPV+	90	Pozitivní	93.3 %	(88.9, 97.8)
LSIL/HPV+	90	Pozitivní	100.0 %	(95.9, 100.0)
HSIL/HPV+	270	Pozitivní	98.9 %	(96.7, 100.0)

Tab. 6. Studie preciznosti v rámci laboratoře – preciznost mezi dny

Kategorie poolu	Počet hodnocení	Režim výsledků pro soupravu CINtec PLUS Cytology Kit (majoritní call)	Procento výsledků stejných jako majoritní call				
			1. den	2. den	3. den	4. den	5. den
Buněčná linie T-24	270	Negativní	100.0 %	100.0 %	100.0 %	100.0 %	100.0 %
NILM/HPV-	270	Negativní	88.9 %	90.7 %	98.1 %	98.1 %	94.4 %
NILM/HPV+	90	Pozitivní	44.4 %	50.0 %	77.8 %	66.7 %	66.7 %
ASC-US/HPV+	90	Pozitivní	94.4 %	88.9 %	88.9 %	94.4 %	100.0 %
LSIL/HPV+	90	Pozitivní	100.0 %	100.0 %	100.0 %	100.0 %	100.0 %
HSIL/HPV+	270	Pozitivní	100.0 %	94.4 %	100.0 %	100.0 %	100.0 %

Tab. 7. Studie preciznosti v rámci laboratoře – preciznost mezi šaržemi

Kategorie poolu	Počet hodnocení	Režim výsledků pro soupravu CINtec PLUS Cytology Kit (majoritní call)	Procento výsledků stejných jako majoritní call		
			Šarže 1	Šarže 2	Šarže 3
Buněčná linie T24	270	Negativní	100.0 %	100.0 %	100.0 %
NILM/HPV-	270	Negativní	92.2 %	93.3 %	96.7 %
NILM/HPV+	90	Pozitivní	46.7 %	70.0 %	66.7 %
ASC-US/HPV+	90	Pozitivní	90.0 %	96.7 %	93.3 %
LSIL/HPV+	90	Pozitivní	100.0 %	100.0 %	100.0 %
HSIL/HPV+	270	Pozitivní	100.0 %	100.0 %	96.7 %

Preciznost hodnotitele

Za účelem posouzení preciznosti hodnotitele vyhodnocovaly tři týmy hodnotitelů, každý složený z cytotechnologa a patologa, všechna sklíčka obarvená pro studie preciznosti, včetně 2 replikátů z 12 cervikálních cytologických poolů (3 pooly HSIL/HPV+, 1 pool LSIL/HPV+, 1 pool ASC-US/HPV+, 1 pool NILM/HPV+, 3 pooly NILM/HPV- LBC a 3 negativní pooly buněčné linie T24); 3 šarže soupravy CINtec PLUS Cytology Kit, 5 po

sobě následujících dnů. Procento výsledků shodných jako majoritní call bylo vypočteno ze souhrnných výsledků mezi týmy hodnotitelů a je shrnuto v Tab. 8.

Tab. 8. Studie preciznosti v rámci laboratoře – preciznost mezi hodnotiteli

Kategorie poolu	Počet hodnocení	Režim výsledků pro soupravu CINtec PLUS Cytology Kit (majoritní call)	Procento výsledků stejných jako majoritní call		
			Tým hodnotitelů 1	Tým hodnotitelů 2	Tým hodnotitelů 3
Buněčná linie T-24	270	Negativní	100.0 %	100.0 %	100.0 %
NILM/HPV-	270	Negativní	95.6 %	91.1 %	95.6 %
NILM/HPV+	90	Pozitivní	70.0 %	63.3 %	50.0 %
ASC-US/HPV+	90	Pozitivní	100.0 %	90.0 %	90.0 %
LSIL/HPV+	90	Pozitivní	100.0 %	100.0 %	100.0 %
HSIL/HPV+	270	Pozitivní	98.9 %	98.9 %	98.9 %

Reprodukovatelnost

Studie reprodukovatelnosti pro soupravu CINtec PLUS Cytology Kit byly provedeny za účelem prokázání:

- Reprodukovatelnosti mezi šaržemi soupravy CINtec PLUS Cytology Kit (Tab. 9),
- Reprodukovatelnosti v rámci cyklu (Tab. 10) a mezi cykly (Tab. 11) na přístrojích BenchMark GX, XT a ULTRA,
- Reprodukovatelnosti v rámci platformy na přístrojích BenchMark GX, XT a ULTRA (Tab. 12),
- Reprodukovatelnosti mezi platformami na přístrojích BenchMark GX, XT a ULTRA (Tab. 13).

Tab. 9. Reprodukovatelnosti mezi šaržemi soupravy CINtec PLUS Cytology Kit.

Typ vzorku	Celková procentuální shoda
ThinPrep	100.0
SurePath	100.0

Tab. 10. Reprodukovatelnost v rámci cyklu pro soupravu CINtec PLUS Cytology Kit.

Typ vzorku	Celková procentuální shoda		
	GX	XT	ULTRA
ThinPrep	100.0	100.0	100.0
SurePath	93.8	96.3	92.6

Tab. 11. Reprodukovatelnost mezi cykly pro soupravu CINtec PLUS Cytology Kit.

Typ vzorku	Celková procentuální shoda		
	GX	XT	ULTRA
ThinPrep	100.0	96.2	100.0
SurePath	100.0	92.6	100

Tab. 12. Reprodukovatelnost v rámci platformy pro soupravu CINtec PLUS Cytology Kit.

Typ vzorku	Celková procentuální shoda		
	GX	XT	ULTRA
ThinPrep	100.0	100.0	100.0
SurePath	100.0	100.0	96.3

Tab. 13. Reprodukovatelnost mezi platformami pro soupravu CINtec PLUS Cytology Kit.

Typ vzorku	Celková procentuální shoda
ThinPrep	100.0
SurePath	96.3

Tyto studie byly provedeny na cervikálních vzorcích ThinPrep i SurePath. Všechny studie splnily předem stanovená kritéria přijatelnosti.

Studie shody

Výkonnost soupravy CINtec PLUS Cytology Kit pro použití na přístrojích BenchMark GX, XT a ULTRA byla hodnocena srovnáním se soupravou CINtec PLUS Kit (predikátové zařízení, Roche mtm laboratories AG, Mannheim), která již dříve prokázala vysokou senzitivitu a specifitu pro přítomnost prekanceróz a karcinomů v cervikálních cytologických vzorcích s ohledem na přítomnost jednotlivých epitelových buněk děložního hrdla vykazujících pozitivní výsledek duálního barvení na p16^{INK4a} a Ki-67. 7–15,18,20,23,25–28

Studie shody byly provedeny s použitím vzorků odebraných od pacientek v zamýšlené populaci s výsledkem cytologie Pap NILM (negativní na intraepiteliální lézi nebo malignitu), ASC-US, LSIL a HSIL pro každou z jednotlivých metod přípravy cervikální cytologie: sklička ThinPrep, BD SurePath a konvenční stěr. Pro vzorky LBC byly z každého vzorku pacientky připraveny dva preparáty. U běžných stěrů byla připravena dvě sklička od stejné pacientky v rámci téže návštěvy, přičemž byl odebraný vzorek rozdělen na dvě sklička („technika děleného vzorku“). Jedno skličko bylo testováno se soupravou CINtec PLUS Cytology Kit na přístroji BenchMark IHC/ISH a jedno skličko bylo obarveno predikátovým zařízením.

Algoritmus hodnocení pro vzorky LBC:

Každé skličko přečetli dva kvalifikovaní hodnotitelé. Pokud se na výsledku shodli, byl tento považován za konečný výsledek pro dané skličko. Pokud se na výsledku neshodli, provedl rozhodující čtení třetí hodnotitel a většinový výsledek se stal konečným výsledkem pro dané skličko.

Algoritmus hodnocení pro konvenční sklička na stěry:

Každé skličko přečetli dva kvalifikovaní hodnotitelé. Pokud oba hodnotitelé vyhodnotili skličko jako pozitivní, konečný výsledek pro dané skličko byl pozitivní. Pokud se na výsledku neshodli, skličko bylo přezkoumáno třetími hodnotiteli coby panelem pro konsensuální přezkum a výsledek se stal konečným výsledkem pro dané skličko. Pokud oba hodnotitelé vyhodnotili skličko jako negativní, skličko přečetl třetí hodnotitel, aby se negativní výsledek potvrdil. Pokud třetí hodnotitel negativní výsledek potvrdil, byl konečný výsledek pro dané skličko negativní. Pokud třetí hodnotitel vyhodnotil skličko jako pozitivní, skličko bylo předloženo panelovému přezkumu pro shodu, jehož výsledek se stal konečným výsledkem pro dané skličko.

Shoda výsledků testů se uvádí jako pozitivní procentuální shoda (PPA) a negativní procentuální shoda (NPA) $\pm$ 95 % interval spolehlivosti (CI) mezi soupravou CINtec PLUS Cytology Kit pro použití na přístroji BenchMark IHC/ISH a predikátovým zařízením.

Tab. 14. Shoda výsledků testů mezi soupravou CINtec PLUS Cytology Kit a predikátovým zařízením u preparátů na skličkách preparátů pro cervikální cytologii ThinPrep.

		Predikátové zařízení	
		+	-
CINtec PLUS Cytology Kit	+	140	25
	-	17	147
Celkem		157	172
PPA (n/N) (95 % CI) = $140/157 \times 100 \% = 89.2 \% (83.3-93.1 \%)$			
NPA (n/N) (95 % CI) = $147/172 \times 100 \% = 85.5 \% (79.4-90.0 \%)$			

Tab. 15. Shoda výsledků testů mezi soupravou CINtec PLUS Cytology Kit a predikátovým zařízením u preparátů na skličkách preparátů pro cervikální cytologii SurePath.

		Predikátové zařízení	
		+	-
CINtec PLUS Cytology Kit	+	56	3
	-	9	108
Celkem		65	111
PPA (n/N) (95 % CI) = $56/65 \times 100 \% = 86.2 \% (75.7-92.5 \%)$			
NPA (n/N) (95 % CI) = $108/111 \times 100 \% = 97.3 \% (92.4-99.1 \%)$			

Tab. 16. Shoda výsledků testů mezi soupravou CINtec PLUS Cytology Kit a predikátovým zařízením u preparátů na konvenčních skličkách pro cervikální cytologické stěry.

		Predikátové zařízení	
		+	-
CINtec PLUS Cytology Kit	+	98	17
	-	20	72
Celkem		118	89
PPA (n/N) (95 % CI) = $98/118 \times 100 \% = 83.1 \% (75.3-88.8 \%)$			
NPA (n/N) (95 % CI) = $72/89 \times 100 \% = 80.9 \% (71.5-87.7 \%)$			

Studie Roche Cell Collection Medium

Výkonnost média Roche Cell Collection Medium ve srovnání s roztokem PreservCyt byla hodnocena barvením 616 párů cervikálních vzorků (případů) pomocí soupravy CINtec PLUS Cytology Kit. Pro každý případ bylo připraveno po jednom skličce z příslušných lahviček PC nebo RCCM. Všechna sklička byla přečtena týmem cytotechnologů/patologů, kteří identitu skliček neznali. Výsledky testů soupravy CINtec PLUS Cytology Kit porovnávající média (PC a RCCM) jsou shrnuty v Tab. 17. Míry pozitivity byly vypočítány vydělením počtu pozitivních případů celkovým počtem adekvátních případů pro každé médium. Výsledky ukazují rozdíl mezi dvěma mírami pozitivity 2.4 % (1.5; 6.3).

Tab. 17. Ekvivalence míry pozitivity soupravy CINtec PLUS Cytology Kit pro médium Roche Cell Collection Medium (RCCM) a PreservCyt (PC).

Výsledky soupravy CINtec PLUS Cytology Kit pro PC			
Výsledky soupravy CINtec PLUS Cytology Kit pro RCCM	Pozitivní	Negativní	Celkem
Pozitivní	170	48	218
Negativní	37	204	241
Celkem	207	252	459
Míra pozitivity RCCM, n/N (%):	218/459 (47.5 %)		
Míra pozitivity PC, n/N (%):	207/459 (45.1 %)		
Rozdíl v mírách pozitivity, n/N (%):	11/459 (2.4 %; 95 % CI: - 1.5, 6.3)		

Výsledky u soupravy CINtec PLUS Cytology Kit pro adekvátnost buněčnosti se srovnáním médií PreservCyt a Roche Cell Collection Medium jsou shrnuty v Tab. 18. Míry adekvátní buněčnosti byly vypočítány vydělením počtu případů s adekvátní buněčností celkovým počtem případů pro každé médium. Výsledky ukazují rozdíl mezi dvěma mírami adekvátnosti buněčnosti 3.2 % (-0.0, 6.6).

Tab. 18. Srovnání adekvátnosti buněčnosti soupravy CINtec PLUS Cytology Kit pro médium Roche Cell Collection Medium (RCCM) a PreservCyt (PC).

Adekvátnost buněčnosti soupravy CINtec PLUS Cytology Kit pro RCCM	Adekvátnost buněčnosti soupravy CINtec PLUS Cytology Kit pro PC		
	Ano	Ne	Celkem
Ano	468	63	531
Ne	43	42	85
Celkem	511	105	616
Míra adekvátnosti RCCM, n/N (%):	531/616 (86.2 %)		
Míra adekvátnosti PC, n/N (%):	511/616 (83.0 %)		
Rozdíl v mírách adekvátnosti, n/N (%):	20/616 (3.2 %; 95 % CI: - 0.0, 6.6)		

Studie reprodukovatelnosti mezi laboratořemi na barvicí platformě BenchMark ULTRA PLUS

Studie reprodukovatelnosti byla provedena za účelem vyhodnocení testu CINtec PLUS Cytology na přístroji BenchMark ULTRA PLUS pro duální imunocytochemickou detekci p16^{INK4a} a Ki-67 v cytologických vzorcích. Studie zahrnovala 2 různé kultury buněk T24 a 10 poolů vzorků získaných od pacientek (2 pooly HSIL/HPV+, 2 pooly LSIL/HPV+, 2 pooly ASC-US/HPV+, 2 pooly NILM/HPV+ a 2 pooly NILM/HPV- LBC). Buněčné kultury T24 byly připraveny z jedné pracovní buněčné banky. Každému ze 3 pracovišť provádějících studii byly poskytnuty alikvotní části každého poolu vzorků, buněčné kultury T24 a kontrolní pool obsahující dostatečný objem pro testování plánované na každém pracovišti. V každém z pěti dnů barvení připravila pracoviště z každé alikvotní dávky poskytnuté společnosti RTD testovací skličko pomocí zařízení pro zpracování sklíček ThinPrep 2000 nebo ThinPrep 5000. Po přípravě sklíček se na každém pracovišti obarvila jedna sada 13 sklíček na přístroji BenchMark ULTRA PLUS. 5 dnů barvení na sebe nenavazovalo – byly rozděleny do období alespoň 20 dní. Na každém pracovišti byly sestaveny 2 týmy hodnotitelů (cytotechnolog + patolog), které nezávisle vyhodnotily sklíčka obarvená na jejich pracovišti na přítomnost nebo nepřítomnost dvojího barvení a přiřadily sklíčku výsledek testu CINtec PLUS Cytology pozitivní, negativní nebo neuspokojivý. Tyto týmy hodnotitelů nebyly obeznámeny s žádným předchozím stanovením stavu HPV, stavu cytologie Pap, výsledky testu CINtec PLUS Cytology ani jinými klinickými informacemi.

Data byla přímo zadána do klinické databáze a analyzována za účelem stanovení reprodukovatelnosti testu na více pracovištích, ve více dnech a u více týmů hodnotitelů. Míra přijatelnosti pozadí a buněčnosti pro všechny případy byla u všech přístrojů 100 %. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 19 a Tab. 20.

Tab. 19. Studie reprodukovatelnosti mezi laboratořemi na přístroji BenchMark ULTRA PLUS – reprodukovatelnost mezi pracovišti

Kategorie poolu	Počet hodnocení	Režim výsledků pro soupravu CINtec PLUS Cytology (majoritní call)	Procento stejných výsledků jako majoritní call		
			Pracoviště A	Pracoviště B	Pracoviště C
Buněčná linie T24	60	Negativní	95.0 %	100.0 %	100.0 %
NILM/HPV-	60	Negativní	100.0 %	95.0 %	100.0 %
NILM/HPV+	60	Pozitivní	90.0 %	80.0 %	95.0 %
ASC-US/HPV+	60	Pozitivní	100.0 %	95.0 %	100.0 %
LSIL/HPV+	60	Pozitivní	100.0 %	95.0 %	100.0 %
HSIL/HPV+	60	Pozitivní	100.0 %	100.0 %	100.0 %

Tab. 20. Studie reprodukovatelnosti mezi laboratořemi na přístroji BenchMark ULTRA PLUS – celková přesnost

Kategorie poolu	Režim výsledků pro soupravu CINtec PLUS Cytology (majoritní call)	Procento výsledků stejných jako majoritní call	n/N	95% intervaly spolehlivosti
Buněčná linie T24	Negativní	98.3 %	59/60	(96.7, 100.0)
NILM/HPV-	Negativní	98.3 %	59/60	(96.7, 100.0)
NILM/HPV+	Pozitivní	88.3 %	53/60	(86.7, 90.0)
ASC-US/HPV+	Pozitivní	98.3 %	59/60	(96.7, 100.0)
LSIL/HPV+	Pozitivní	98.3 %	59/60	(96.7, 100.0)
HSIL/HPV+	Pozitivní	100.0 %	60/60	(94.0, 100.0)

Shoda mezi přístroji BenchMark ULTRA PLUS a BenchMark ULTRA (vzorky ThinPrep)

Studie shody mezi přístrojem BenchMark ULTRA PLUS a přístrojem BenchMark ULTRA se zúčastnily tři laboratoře. V této studii bylo použito 220 poolů z deidentifikovaných vzorků ThinPrep LBC z děložního hrdla, připravených ve společnosti Roche Tissue Diagnostics (RTD), a to v následujících kategoriích: 88 pozitivních poolů, 22 hraničné pozitivních poolů, 22 negativních mezilehlých poolů a 88 negativních poolů buněčné kultury T24. Sada 4 sklíček z každého vzorku byla připravena ve společnosti RTD pomocí zařízení na zpracování sklíček ThinPrep 2000 nebo ThinPrep 5000. První připravené sklíčko z každé sady bylo obarveno na přístroji BenchMark ULTRA ve společnosti RTD. Jedno ze zbývajících 3 sklíček bylo poskytnuto jednotlivým pracovištím provádějícím studii, aby jej obarvila pomocí testu CINtec PLUS Cytology na přístroji BenchMark ULTRA PLUS. Sklíčko obarvené na přístroji BenchMark ULTRA ve společnosti RTD vyhodnotil na přítomnost nebo nepřítomnost dvojího barvení tým hodnotitelů, sestávající z cytotechnologa a patologa, ze společnosti RTD a přiřadil sklíčku výsledek pozitivní, negativní nebo nevyhovující, aby mohlo být stanoveno referenční skóre. Na každém pracovišti tým hodnotitelů studie nezávisle vyhodnotil sklíčka obarvená na přístroji BenchMark ULTRA z hlediska výsledku testu CINtec PLUS Cytology. Sklíčka obarvená na přístroji BenchMark ULTRA PLUS na jednotlivých pracovištích hodnotil z hlediska výsledku testu CINtec PLUS Cytology tým hodnotitelů daného pracoviště. Tým hodnotitelů jednotlivých pracovišť tedy pro každý vzorek vyhodnotil jedno sklíčko obarvené na přístroji BenchMark ULTRA a jedno sklíčko obarvené na přístroji BenchMark ULTRA PLUS. Hodnocení sklíček obarvených na přístroji BenchMark ULTRA a obarvených na přístroji BenchMark ULTRA PLUS bylo odděleno dvoutýdenním eliminačním obdobím. Žádný tým hodnotitelů nebyl obeznámen z žádným předchozím stanovením stavu HPV, stavu cytologie Pap, výsledky testu CINtec PLUS Cytology ani jinými klinickými informacemi. Rovnocennost výkonu testu CINtec PLUS Cytology byla považována za přijatelnou na přístroji BenchMark ULTRA PLUS, pokud míry PPA a NPA měly spodní hranici dvoustranných 95 % intervalů spolehlivosti alespoň 85 %. Aby byla studie úspěšná, musela být míra přijatelnosti pro pozadí a buněčnost testovaných sklíček obarvených pomocí testu CINtec PLUS Cytology na přístroji BenchMark ULTRA PLUS přijatelná u ≥ 90 % všech testovaných sklíček. Míra přijatelnosti pro pozadí byla na všech testovaných sklíčkách 99.7 %, míra přijatelnosti pro buněčnost pak byla 99.4 %. Tab. 21

uvedená níže shrnuje míru shody stavu podle testu CINtec PLUS Cytology mezi přístroji BenchMark ULTRA a BenchMark ULTRA PLUS.

Tab. 21. Studie shody mezi přístroji BenchMark ULTRA a BenchMark ULTRA PLUS – souhrnná shoda pro stav dle testu CINtec PLUS Cytology mezi platformami (ThinPrep)

Stav CINtec PLUS Cytology						
BenchMark ULTRA PLUS	BenchMark ULTRA			shoda		
	Pozitivní	Negativní	Celkem	Míra	% (n/N)	95 % CI
Pozitivní	314	13	327	PPA	95.7 (314/328)	(92.8, 98.1)
Negativní	14	317	331	NPA	96.1 (317/330)	(93.5, 98.1)
Celkem	328	330	658	OPA	95.9 (631/658)	(94.1, 97.4)

Poznámka: Souhrnné míry shody spojují všechny vzorky a týmy hodnotitelů pro ULTRA PLUS.

Poznámka: PPA = pozitivní procentuální shoda; NPA = negativní procentuální shoda; OPA = celková procentuální shoda

Studie vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti na barvicí platformě BenchMark ULTRA PLUS

Studie vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti byla provedena za účelem vyhodnocení opakovatelnosti v rámci cyklu, mezilehlé preciznosti mezi dny a mezilehlé preciznosti mezi přístroji u testu CINtec PLUS Cytology na vzorcích SurePath. Studie zahrnovala 2 různé kultury buněk T24 a 9 poolů vzorků SurePath získaných od pacientek (3 pooly pozitivní na CINtec / HPV+, 3 pooly hraniční a 3 pooly negativní na CINtec / HPV-). Testovaná sklička byla připravena na přístroji BD Totalys pro přípravu skliček v každém z pěti barvicích dnů, které na sebe nenavazovaly a byly rozděleny do období alespoň 20 dní. K vyhodnocení reprodukovatelnosti mezi přístroji byly použity tři přístroje BenchMark ULTRA PLUS. Testovaná sklička hodnotil tým hodnotitelů sestávající z cytotechnologa a patologa vyškolených k hodnocení testu CINtec PLUS Cytology. Shoda testovaných skliček byla určena porovnáním stavu testovaných skliček dle testu CINtec PLUS Cytology s režimem na úrovni poolu (PLM), který je definován jako nejčastější výsledek stavu mezi všemi hodnoceními pooly, který shrnuje údaje ze všech přístrojů, všech dnů a všech replikátů pro daný pool. Míra přijatelnosti pro pozadí byla na všech testovaných skličkách 99.4 % a míra přijatelnosti pro buněčnost pak byla 99.7 %. Výsledky jsou shrnuty níže v Tab. 22, Tab. 23, Tab. 24 a Tab. 25.

Tab. 22. Studie vnitrolaboratorní preciznosti – celková preciznost skutečně pozitivních a skutečně negativních vzorků SurePath

Modální stav na úrovni poolu			shoda			
Stav CINtec PLUS	Pozitivní	Negativní	Celkem	Míra	% (n/N)	95 % CI
Pozitivní	89	0	89	PPA	100.0 (89/89)	(95.9, 100.0)
Negativní	0	90	90	NPA	100.0 (90/90)	(95.9, 100.0)
Celkem	89	90	179	OPA	100.0 (179/179)	(97.9, 100.0)

Tab. 23. Studie vnitrolaboratorní preciznosti – mezilehlá preciznost mezi dny

Den	Stejný výsledek s PLM, n (%)	Odlišný výsledek od PLM, n (%)	Celkem, n (%)
1. den	36 (100.0)	0 (0.0)	36 (100.0)
2. den	35 (100.0)	0 (0.0)	35 (100.0)
3. den	36 (100.0)	0 (0.0)	36 (100.0)
4. den	36 (100.0)	0 (0.0)	36 (100.0)
5. den	36 (100.0)	0 (0.0)	36 (100.0)

Tab. 24. Studie vnitrolaboratorní preciznosti – opakovatelnost v rámci cyklu

Replikát	Stejný výsledek s PLM, n (%)	Odlišný výsledek od PLM, n (%)	Celkem, n (%)
Replikát 1	90 (100.0)	0 (0.0)	90 (100.0)
Replikát 2	89 (100.0)	0 (0.0)	89 (100.0)

Tab. 25. Studie vnitrolaboratorní preciznosti – mezilehlá preciznost mezi přístroji

Přístroj	Stejný výsledek s PLM, n (%)	Odlišný výsledek od PLM, n (%)	Celkem, n (%)
Přístroj 1	60 (100.0)	0 (0.0)	60 (100.0)
Přístroj 2	60 (100.0)	0 (0.0)	60 (100.0)
Přístroj 3	59 (100.0)	0 (0.0)	59 (100.0)

Shoda mezi barvicími platformami BenchMark ULTRA PLUS a BenchMark ULTRA (vzorky SurePath)

Interní studie shody byla provedena za účelem ověření rovnocennosti výkonu barvení se soupravou CINtec PLUS Cytology mezi barvicími platformami BenchMark ULTRA a ULTRA PLUS na vzorcích SurePath. Studie zahrnovala 88 skutečně pozitivních, 26 hraničně pozitivních, 26 negativních mezilehlých a 88 skutečně negativních kultur buněčných linií T24. Z každého vzorku byla na přístroji BD Totalys pro přípravu skliček připravena dvě zkušební sklička, která byla následně obarvena pomocí testu CINtec PLUS Cytology na přístroji BenchMark ULTRA nebo BenchMark ULTRA PLUS. Testovaná sklička hodnotil tým hodnotitelů sestávající z cytotechnologa a patologa vyškolených k hodnocení testu CINtec PLUS Cytology. Rovnocennost výkonu testu CINtec PLUS Cytology byla považována za přijatelnou na přístroji BenchMark ULTRA PLUS, pokud míry PPA a NPA měly spodní hranici dvoustranných 95 % intervalů spolehlivosti alespoň 85 %. Aby byla studie úspěšná, musela být míra přijatelnosti pro pozadí a buněčnost testovaných skliček obarvených pomocí testu CINtec PLUS Cytology na přístroji BenchMark ULTRA PLUS přijatelná u ≥ 90 % všech testovaných skliček. Míra přijatelnosti pro pozadí byla na všech testovaných skličkách 99.6 % a míra přijatelnosti pro buněčnost pak byla 99.1 %. Výsledky jsou shrnuty níže v Tab. 26.

Tab. 26. Studie shody mezi přístroji BenchMark ULTRA a BenchMark ULTRA PLUS (SurePath)

Stav ULTRA			shoda			
Stav ULTRA PLUS	Pozitivní	Negativní	Celkem	Míra	% (n/N)	95 % CI
Pozitivní	94	2	96	PPA	92.2 (94/102)	(85.3, 96.0)
Negativní	8	119	127	NPA	98.3 (119/121)	(94.2, 99.5)
Celkem	102	121	223	OPA	95.5 (213/223)	(91.9, 97.5)

KLINICKÁ VÝKONNOST

Prospektivní multicentrická studie (IMPACT, IMproved Primary screening And Colposcopy Triage – vylepšený primární screening a kolposkopické třídění) byla navržena tak, aby hodnotila klinickou výkonnost soupravy CINtec *PLUS* Cytology Kit na přístroji BenchMark ULTRA s použitím klinicky odebraných vzorků děložního hrdla do roztoku PreservCyt® za účelem identifikace onemocnění děložního hrdla vysokého stupně. Cílem studie bylo vyhodnotit účinnost soupravy CINtec *PLUS* Cytology Kit jako reflexního testu u žen ≥ 25 let, které byly pozitivní na HPV dle testu **cobas**® 4800 HPV Test nebo **cobas**® 6800/8800 HPV Test. Údaje z této studie podporují použití soupravy CINtec *PLUS* Cytology Kit jako pomůcky při identifikaci žen s intraepiteliálními lézemi děložního hrdla vysokého stupně u pacientek s pozitivními výsledky HR-HPV testu.

Funkční charakteristiky soupravy CINtec *PLUS* Cytology Kit vs. cytologie Pap u žen ve věku 25–65 let s pozitivními výsledky testu **cobas**® 6800/8800 HPV Test nebo **cobas**® 4800 HPV Test

Srovnání výkonnosti soupravy CINtec *PLUS* Cytology Kit vs. cytologie Pap u žen s pozitivním testem **cobas**® 6800/8800 HPV Test a **cobas**® 4800 HPV Test jsou uvedeny v následujících tabulkách pro populaci 12 dalších HR HPV+ (Tab. 27), populaci HPV16+ (Tab. 28) a populaci HPV18+ (Tab. 29). Ve všech třech skupinách genotypů bylo pozorováno zvýšení senzitivity a snížení specifity pro detekci onemocnění děložního hrdla vysokého stupně u soupravy CINtec *PLUS* Cytology Kit oproti cytologii Pap (Tab. 27, Tab. 28 a Tab. 29).

Mezi ženami s pozitivním testem **cobas**® 6800/8800 HPV Test a **cobas**® 4800 HPV Test byl zaznamenán maximální nárůst senzitivity (rozdíl = 23.1 %, resp. 24.2 %) a minimální pokles specifity (rozdíl = 7.9 %, resp. 8.7 %) oproti cytologii Pap u populace 12 dalších HR HPV+ (Tab. 27).

Ve všech případech vedlo použití soupravy CINtec *PLUS* Cytology Kit k podstatnému snížení rizika onemocnění v případě negativních výsledků soupravy CINtec *PLUS* Cytology Kit oproti cytologii Pap NILM. V rámci testu **cobas**® 6800/8800 HPV Test, pozitivní ženy, 1-NPV bylo o 3.7 %, 6.1 % a 1.2 % nižší pro $\geq$ CIN2 a o 0.9 %, 3.3 % a 0.3 % nižší pro $\geq$ CIN3 u populace 12 dalších HR HPV+, HPV16+ a HPV18+ (v daném pořadí). V rámci testu **cobas**® 4800 HPV Test, pozitivní ženy, 1-NPV bylo o 3.4 %, 9.1 % a 3.3 % nižší pro $\geq$ CIN2 a o 0.8 %, 5.1 % a 0.5 % nižší pro $\geq$ CIN3 u populace 12 dalších HR HPV+, HPV16+ a HPV18+ (v daném pořadí).

Tab. 27. Výkonnost soupravy CINtec PLUS Cytology Kit versus cytologické stěry Pap u žen 12 dalších HR HPV+ ve věku 25–65 let.

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

Tab. 28. Výkonnost soupravy CINtec PLUS Cytology Kit versus cytologické stěry Pap u žen s HPV16+ ve věku 25–65 let.

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

Tab. 29. Výkonnost soupravy CINtec PLUS Cytology Kit versus cytologické stěry Pap u žen s HPV18+ ve věku 25–65 let.

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

Funkční charakteristiky v populaci u testu cobas® 6800/8800 HPV Test nebo cobas® 4800 HPV Test, pozitivní výsledky, ženy ve věku 30–65 let s výsledky cytologie Pap NILM

Výkonnost soupravy CINtec PLUS Cytology Kit pro detekci ≥ CIN2 a ≥ CIN3 u s 12 dalšími HR HPV+ s cytologií Pap NILM je uvedena v Tab. 30.

V populaci u systému cobas® 6800/8800 byly u žen s 12 dalšími HR HPV+ s cytologií Pap NILM senzitivita a specifická pro detekci ≥ CIN2 66.7 %, respektive 69.7 % (62.5 %, respektive 67.8 % pro ≥ CIN3). PPV v této skupině byly 13.0 % pro ≥ CIN2 a 2.6 % pro ≥ CIN3, zatímco riziko onemocnění u žen s negativními výsledky ze soupravy CINtec PLUS Cytology Kit (1-NPV) bylo 3.1 % pro ≥ CIN2 a 0.8 % pro ≥ CIN3.

V populaci u systému cobas® 4800 byly u žen s 12 dalšími HR HPV+ s cytologií Pap NILM senzitivita a specifická pro detekci ≥ CIN2 64.9 %, respektive 71.0 % (66.7 %, respektive 69.4 % pro ≥ CIN3). PPV v této skupině byly 12.0 % pro ≥ CIN2 a 2.5 % pro ≥ CIN3, zatímco riziko onemocnění u žen s negativními výsledky ze soupravy CINtec PLUS Cytology Kit (1-NPV) bylo 2.9 % pro ≥ CIN2 a 0.6 % pro ≥ CIN3.

Tab. 30. Výkonnost soupravy CINtec PLUS Cytology Kit u žen s 12 dalšími HR HPV+ ve věku 30–65 let s cytologií NILM.

Měření výkonnosti	cobas® 6800/8800 system, 12 dalších HR HPV+/NILM		cobas® 4800 system, 12 dalších HR HPV+/NILM	
	Diagnóza CPR ≥ CIN2	Diagnóza CPR ≥ CIN3	Diagnóza CPR ≥ CIN2	Diagnóza CPR ≥ CIN3
Senzitivita (%)	66.7 (50/75) (55.4, 76.3)	62.5 (10/16) (38.6, 81.5)	64.9 (48/74) (53.5, 74.8)	66.7 (10/15) (41.7, 84.8)
Specifická (%)	69.7 (772/1108) (66.9, 72.3)	67.8 (791/1167) (65.0, 70.4)	71.0 (864/1217) (68.4, 73.5)	69.4 (885/1276) (66.8, 71.8)
Prevalence (%)	6.3 (75/1183)	1.4 (16/1183)	5.7 (74/1291)	1.2 (15/1291)
PPV (%)	13.0 (50/386) (10.8, 14.9)	2.6 (10/386) (1.6, 3.4)	12.0 (48/401) (9.9, 13.9)	2.5 (10/401) (1.6, 3.2)
NPV (%)	96.9 (772/797) (95.8, 97.8)	99.2 (791/797) (98.8, 99.6)	97.1 (864/890) (96.2, 97.9)	99.4 (885/890) (99.0, 99.7)
1-NPV (%)	3.1 (25/797) (2.2, 4.2)	0.8 (6/797) (0.4, 1.2)	2.9 (26/890) (2.1, 3.8)	0.6 (5/890) (0.3, 1.0)
PLR	2.20 (1.79, 2.59)	1.94 (1.19, 2.58)	2.24 (1.81, 2.65)	2.18 (1.35, 2.82)
NLR	0.48 (0.34, 0.64)	0.55 (0.27, 0.91)	0.49 (0.35, 0.66)	0.48 (0.22, 0.84)
Míra pozitivity (%)	32.6 (386/1183) (30.0, 35.3)		31.1 (401/1291) (28.6, 33.5)	
Poznámka: CPR = centrální patologický posudek; PPV = pozitivní prediktivní hodnota; NPV = negativní prediktivní hodnota; PLR = pozitivní pravděpodobnostní poměr; NLR = negativní pravděpodobnostní poměr, čísla v závorkách jsou (n/N) a dvoustranné 95 % intervaly spolehlivosti.				

Výkonnost soupravy CINtec PLUS Cytology Kit pro detekci ≥ CIN2 a ≥ CIN3 u žen s HPV16+ s cytologií Pap NILM je uvedena v Tab. 31.

V populaci u systému cobas® 6800/8800 byly u žen s HPV16+ s cytologií Pap NILM senzitivita a specifická 76.3 %, respektive 72.5 % pro ≥ CIN2 a 75.0 %, respektive 70.5 % pro ≥ CIN3. PPV v této skupině byly 23.8 % pro ≥ CIN2 a 14.8 % pro ≥ CIN3, zatímco riziko onemocnění u žen s negativními výsledky ze soupravy CINtec PLUS Cytology Kit (1-NPV) bylo 3.5 % pro ≥ CIN2 a 2.4 % pro ≥ CIN3.

V populaci u systému cobas® 4800 byly u žen s HPV16+ s cytologií Pap NILM senzitivita a specifická 80.6 %, respektive 61.7 % pro ≥ CIN2 a 81.8 %, respektive 59.0 % pro ≥ CIN3. PPV v této skupině byly 27.9 % pro ≥ CIN2 a 17.3 % pro ≥ CIN3, zatímco riziko onemocnění u žen s negativními výsledky ze soupravy CINtec PLUS Cytology Kit (1-NPV) bylo 5.5 % pro ≥ CIN2 a 3.1 % pro ≥ CIN3.

Tab. 31. Výkonnost soupravy CINtec PLUS Cytology Kit u žen s HPV16+ ve věku 30–65 let s cytologií NILM.

Měření výkonnosti	cobas® 6800/8800 system, HPV16+/NILM		cobas® 4800 system, HPV16+/NILM	
	Diagnóza CPR ≥ CIN2	Diagnóza CPR ≥ CIN3	Diagnóza CPR ≥ CIN2	Diagnóza CPR ≥ CIN3
Senzitivita (%)	76.3 (29/38) (60.8, 87.0)	75.0 (18/24) (55.1, 88.0)	80.6 (29/36) (65.0, 90.2)	81.8 (18/22) (61.5, 92.7)
Specifická (%)	72.5 (245/338) (67.5, 77.0)	70.5 (248/352) (65.5, 75.0)	61.7 (121/196) (54.8, 68.3)	59.0 (124/210) (52.3, 65.5)
Prevalence (%)	10.1 (38/376)	6.4 (24/376)	15.5 (36/232)	9.5 (22/232)
PPV (%)	23.8 (29/122) (19.1, 28.2)	14.8 (18/122) (11.0, 18.1)	27.9 (29/104) (22.8, 32.7)	17.3 (18/104) (13.2, 20.8)
NPV (%)	96.5 (245/254) (94.2, 98.0)	97.6 (248/254) (95.8, 98.9)	94.5 (121/128) (90.5, 97.2)	96.9 (124/128) (93.5, 98.7)
1-NPV (%)	3.5 (9/254) (2.0, 5.8)	2.4 (6/254) (1.1, 4.2)	5.5 (7/128) (2.8, 9.5)	3.1 (4/128) (1.3, 6.5)
PLR	2.77 (2.10, 3.49)	2.54 (1.81, 3.24)	2.11 (1.61, 2.64)	2.00 (1.45, 2.50)
NLR	0.33 (0.18, 0.54)	0.35 (0.17, 0.64)	0.31 (0.16, 0.57)	0.31 (0.12, 0.66)
Míra pozitivity (%)	32.4 (122/376) (28.0, 36.9)		44.8 (104/232) (38.7, 50.9)	
Poznámka: CPR = centrální patologický posudek; PPV = pozitivní prediktivní hodnota; NPV = negativní prediktivní hodnota; PLR = pozitivní pravděpodobnostní poměr; NLR = negativní pravděpodobnostní poměr, čísla v závorkách jsou (n/N) a dvoustranné 95 % intervaly spolehlivosti.				

Výkonnost soupravy CINtec PLUS Cytology Kit pro detekci $\geq$ CIN2 a $\geq$ CIN3 u žen s HPV18+ s cytologií Pap NILM je uvedena v Tab. 32.

V populaci u systému **cobas® 6800/8800** byly u žen s HPV18+ s cytologií Pap NILM senzitivita a specifická 75.0 %, respektive 73.3 % pro $\geq$ CIN2 a 66.7 %, respektive 72.1 % pro $\geq$ CIN3. PPV byly 9.7 % pro $\geq$ CIN2 a 3.2 % pro $\geq$ CIN3, zatímco riziko onemocnění u žen s negativními výsledky ze soupravy CINtec PLUS Cytology Kit (1-NPV) bylo 1.3 % pro $\geq$ CIN2 a 0.6 % pro $\geq$ CIN3.

V populaci u systému **cobas® 4800** byly u žen s HPV18+ s cytologií Pap NILM senzitivita a specifická 85.7 %, respektive 68.3 % pro $\geq$ CIN2 a 66.7 %, respektive 65.7 % pro $\geq$ CIN3. PPV byly 15.8 % pro $\geq$ CIN2 a 5.3 % pro $\geq$ CIN3 a míry, zatímco riziko onemocnění u žen s negativními výsledky ze soupravy CINtec PLUS Cytology Kit (1-NPV) bylo 1.4 % pro obě mezní hodnoty onemocnění.

Tab. 32. Výkonnost soupravy CINtec PLUS Cytology Kit u žen s HPV18+ ve věku 30–65 let s cytologií NILM.

Měření výkonnosti	cobas® 6800/8800 system, HPV18+ /NILM		cobas® 4800 system, HPV18+ /NILM	
	Diagnóza CPR ≥ CIN2	Diagnóza CPR ≥ CIN3	Diagnóza CPR ≥ CIN2	Diagnóza CPR ≥ CIN3
Senzitivita (%)	75.0 (6/8) (40.9, 92.9)	66.7 (2/3) (20.8, 93.9)	85.7 (6/7) (48.7, 97.4)	66.7 (2/3) (20.8, 93.9)
Specifická (%)	73.3 (154/210) (67.0, 78.9)	72.1 (155/215) (65.7, 77.7)	68.3 (69/101) (58.7, 76.6)	65.7 (69/105) (56.2, 74.1)
Prevalence (%)	3.7 (8/218)	1.4 (3/218)	6.5 (7/108)	2.8 (3/108)
PPV (%)	9.7 (6/62) (5.4, 13.1)	3.2 (2/62) (1.0, 5.0)	15.8 (6/38) (9.2, 21.1)	5.3 (2/38) (1.7, 8.3)
NPV (%)	98.7 (154/156) (97.0, 99.6)	99.4 (155/156) (98.5, 99.9)	98.6 (69/70) (95.0, 99.7)	98.6 (69/70) (96.6, 99.7)
1-NPV (%)	1.3 (2/156) (0.4, 3.0)	0.6 (1/156) (0.1, 1.5)	1.4 (1/70) (0.3, 5.0)	1.4 (1/70) (0.3, 3.4)
PLR	2.81 (1.49, 3.97)	2.39 (0.73, 3.74)	2.71 (1.46, 3.87)	1.94 (0.59, 3.18)
NLR	0.34 (0.10, 0.81)	0.46 (0.09, 1.11)	0.21 (0.04, 0.76)	0.51 (0.09, 1.24)
Míra pozitivity (%)	28.4 (62/218) (22.6, 34.3)		35.2 (38/108) (26.5, 43.8)	
Poznámka: CPR = centrální patologický posudek; PPV = pozitivní prediktivní hodnota; NPV = negativní prediktivní hodnota; PLR = pozitivní pravděpodobnostní poměr; NLR = negativní pravděpodobnostní poměr, čísla v závorkách jsou (n/N) a dvoustranné 95 % intervaly spolehlivosti.				

ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ

- Pokud dávkovač reagencie nedávkuje tekutinu, zkontrolujte, jestli v napouštěcí komůrce nebo na menisku nejsou cizorodé materiály či pevné částičky, jako např. vlákna nebo precipitáty. Pokud je dávkovač zablokovaný, dávkovač nepoužívejte a kontaktujte své místní servisní zastoupení. Jinak znovu naplňte dávkovač a míte jím nad odpadní nádobu, odstraňte víčko trysky a zatlačte na horní stranu dávkovače směrem dolů.
- Občas je možné zaznamenat krystalizaci pocházející z dávkovače CINtec PLUS Red Naphthol Phosphate. Šetření a testování neprokázalo, že by tyto krystaly jakkoli narušovaly interpretaci výsledků. Pokud jsou na sklíčkách pozorovány krystaly, očistěte špičku trysky a naplňte dávkovač, abyste odstranili veškeré krystalické nečistoty. Pokud krystaly přetrvávají, přestaňte dávkovač používat a požádejte místního servisního zastoupení o výměnu dávkovače.
- Pokud pozitivní kontrola vykazuje slabší zbarvení, než se očekávalo, zkontrolujte, zda vybraný protokol odpovídá konkrétnímu typu vzorku; například cytologické preparáty SurePath vyžadují delší dobu úpravy buněk než sklíčka ThinPrep anebo preparáty běžných stěrů. Dále zkontrolujte, zda válce dávkovače neobsahují nečistoty.
- Pokud je pozitivní kontrola negativní, je třeba ji zkontrolovat, aby bylo zajištěno, že má sklíčko správný štítek s čárovým kódem. Pokud je sklíčko správně označeno, zkontrolujte, zda válce dávkovače neobsahují nečistoty.
- Pokud je zaznamenána vysoká hodnota pozadí, zkrátte v barvicích protokolech doby inkubace. Kromě toho zkontrolujte, zda byl správně připraven velkoobjemový roztok pufru Reaction Buffer.
- Pokud je zaznamenáno slabé zbarvení, prodlužte v barvicích protokolech doby inkubace. Na konvenčním sklíčku na stěry lze také upravit dobu inkubace úpravy buněk.
- Červený precipitát používaný k indikaci exprese proteinu Ki-67 je rozpustný v alkoholu. Pokud je barvení Ki-67 slabé nebo není přítomno, ujistěte se, že nebyl použit hematoxylin obsahující alkohol a že byl dodržen doporučený postup následného zpracování podle pokynů k postupu následného zpracování – fixace a krytí.
- Pokud se vzorek ze sklíčka vymyje, je třeba sklíčka zkontrolovat a ujistit se, že byl vzorek připraven správně podle části Příprava vzorků a že byl použit doporučený typ mikroskopického sklíčka.

- Nápravná opatření najdete v uživatelské příručce přístroje v části Postup barvení, případně se obraťte na místní servisní zastoupení.
- Pokud dojde ke ztrátě uzávěru vzorku RCCM nebo pokud lahvička se vzorkem netěsní, lze objednat náhradní uzávěry (volné, 250 ks / sáček, REF 08037230190 nebo 8 zásobníků po 48 ks / krabice, REF 06913512001).

LITERATURA

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

10. Singh M, Mockler D, Akalin A, et al. Immunocytochemical colocalization of p16(INK4a) and Ki-67 predicts CIN2/3 and AIS/adenocarcinoma. *Cancer Cytopathol.* 2012;120(1):26-34.
11. Ikenberg H, Bergeron C, Schmidt D, et al. Screening for Cervical Cancer Precursors with p16/Ki-67 Dual-stained Cytology: Results of the PALMS Study. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(20):1550-7.
12. Wentzensen N, Fetterman B, Castle PE, et al. p16/Ki-67 Dual Stain Cytology for Detection of Cervical Precancer in HPV-Positive Women. *J Natl Cancer Inst.* 2015 Sep 15;107(12):djv257.
13. Uijterwaal MH, Polman NJ, Witte BI, et al. Triaging HPV-positive women with normal cytology by p16/Ki-67 dual-stained cytology testing: baseline and longitudinal data. *Int J Cancer.* 2015;136(10):2361-68.
14. Wentzensen N, Schwartz L, Zuna RE, et al. Performance of p16/Ki-67 immunostaining to detect cervical cancer precursors in a colposcopy referral population. *Clin Cancer Res.* 2012;18(15):4154-62.
15. Bergeron C, Ikenberg H, Sideri M, et al. Prospective evaluation of p16/Ki-67 dual-stained cytology for managing women with abnormal Papanicolaou cytology: PALMS study results. *Cancer Cytopathol.* 2015. 123(6):373-81.
16. Dona MG, Vocaturo A, Giuliani M, et al. p16/Ki-67 dual staining in cervico-vaginal cytology: Correlation with histology, Human Papillomavirus detection and genotyping in women undergoing colposcopy. *Gynecol Oncol.* 2012;126(2):198-202.
17. Allia E, Ronco G, Coccia A, et al. Interpretation of p16(INK4a) /Ki-67 dual immunostaining for the triage of human papillomavirus-positive women by experts and nonexperts in cervical cytology. *Cancer Cytopathol.* 2015;123(4):212-218.
18. Gustinucci D, Giorgi Rossi P, Cesarini E, et al. Use of cytology, E6/E7 mRNA, and p16^{INK4a}-Ki-67 to define the management of human papillomavirus (HPV)-positive women in cervical cancer screening. *Am J Clin Pathol.* 2016; 145(1):35-45.
19. Rossi P, Borghi L, Ferro R, Mencarelli R. A population of 1136 HPV DNA-HR positive women: expression of p16(INK4a)/Ki67 Dual-Stain Cytology and cytological diagnosis. Histological correlations and cytological follow up. *Pathologica.* 2015;107(3-4):185-191.
20. Wright TC Jr, Behrens CM, Ranger-Moore J, et al. Triaging HPV-positive women with p16/Ki-67 dual-stained cytology: Results from a sub-study nested into the ATHENA trial. *Gynecol Oncol.* 2017;144:51-56.
21. Clarke MA, Cheung LC, Castle PE, et al. Five-Year Risk of Cervical Precancer Following p16/Ki-67 Dual-Stain Triage of HPV-Positive Women. *JAMA Oncol.* 2019;5(2):181-186.
22. Wentzensen N, Clarke MA, Bremer R, et al. Clinical Evaluation of Human Papillomavirus Screening With p16/Ki-67 Dual Stain Triage in a Large Organized Cervical Cancer Screening Program. *JAMA Intern Med.* 2019;179(7):881-888.
23. Wentzensen N, Fetterman B, Tokugawa D, et al. Interobserver reproducibility and accuracy of p16/Ki-67 dual-stain cytology in cervical cancer screening. *Cancer Cytopathol.* 2014;122(12):914-20.
24. Arian-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, Hermesen M, et al. Evaluation of p16/Ki-67 dual-stained cytology as triage test for high-risk human papillomavirus-positive women. *Mod Pathol.* 2017;30(7): 1021-1031.
26. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
27. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 24 June 2020 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
28. Nayar R and Wilbur DC, eds. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology: Definitions, Criteria, and Explanatory Notes. 3rd ed. 2015, Springer International Publishing: Switzerland.

POZNÁMKA: V tomto dokumentu se jako symbol pro oddělování celého čísla a desetinných míst používá vždy tečka. Oddělovače pro tisíce se nepoužívají.

Souhm bezpečnosti a funkčnosti naleznete zde:

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

Symbody

Společnost Ventana používá následující symboly a znaky nad rámec uvedený v normě ISO 15223-1 (pro USA: další informace naleznete na internetových stránkách elabdoc.roche.com/symbols).



Globální číslo obchodní položky

Rx only

Pro USA: Upozornění: Federální zákony omezují prodej tohoto prostředku pouze lékařům nebo na jejich objednávku.

HISTORIE REVIZÍ

Rev.	Aktualizace
J	Aktualizace šablon a značení. Doplnění přístroje BenchMark ULTRA PLUS.

DUŠEVNÍ VLASTNICTVÍ

VENTANA, BENCHMARK, CINTEC a COBAS jsou ochranné známky společnosti Roche. Všechny ostatní názvy produktů a ochranné známky jsou majetkem příslušných vlastníků.
© 2025 Ventana Medical Systems, Inc.

For USA: Rx only

KONTAKTNÍ ÚDAJE



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

www.roche.com

