

Инструкция по применению

Гистологический набор CINtec[®] Histology Kit

Гистологический набор CINtec[®] Histology Kit — это иммуногистохимическая тест-система для качественного обнаружения антигена p16^{INK4a} в фиксированных формалином и залитых в парафин тканевых срезах, полученных путем биопсии шейки матки. Он предназначен для использования в сочетании с окрашенными гематоксилином и эозином (H&E) микропрепаратами, приготовленными из того же образца ткани шейки матки, что позволяет повысить диагностическую точность и согласованность заключений различных исследователей при диагностике цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки высокой степени дедифференцировки.



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

REF

9511
06594441001

GTIN

04015630984176



50



2–8 °C



0123

IVD



Содержание

РУССКИЙ.....	3
I. Название продукта.....	3
II. Назначение	3
III. Сводная информация и пояснения к изделию.....	3
Сводная информация и пояснения	3
Клиническое значение	4
Принцип процедуры	5
IV. Реагенты	6
Предоставляемые материалы	6
Хранение	8
Необходимые материалы и реагенты, не входящие в комплект набора	8
Необходимое оборудование	9
V. Предупреждения и меры предосторожности	9
Осторожно!	9
Внимание!	10
VI. Процедура.....	11
Приготовление образцов	11
Образцы тканей, залитых в парафин.....	11
Высокотемпературная демаскировка антигена	11
Процедура окрашивания	12
1. Приготовление реагентов.....	12
1.1. Раствор для демаскировки антигена	12
1.2. Промывочный буфер	12
1.3. Раствор субстрат-хромогена (DAB)	12
1.4. Контрокрашивание.....	13
1.5. Заливочная среда.....	13
2. Процедура окрашивания с использованием приборов для автоматического окрашивания.....	13
2.1. Депарафинизация и регидратация	13
2.2. Протокол окрашивания с использованием приборов для автоматического окрашивания	14
3. Процедура ручного окрашивания.....	16
3.1. Депарафинизация и регидратация	17
3.2. Протокол ручного окрашивания	17
VII. Контроль качества	20
VIII. Интерпретация результатов	20

IX.	Ограничения.....	21
X.	Рабочие характеристики	22
XI.	Поиск и устранение неисправностей	29
XII.	Символы.....	32
XIII.	Производитель	32
XIV.	Статус редакции.....	32
XV.	Интеллектуальная собственность	33
	Приложение 1 Источники	34
	Приложение 2.....	37

РУССКИЙ

I. Название продукта

Гистологический набор CINtec® Histology Kit

II. Назначение

Для диагностики *in vitro*.

Гистологический набор CINtec® Histology Kit — это иммуногистохимическая тест-система для качественного обнаружения антигена p16^{INK4a} в фиксированных формалином и залитых в парафин тканевых срезах, полученных путем биопсии шейки матки.

Он предназначен для использования в сочетании с окрашенными гематоксилином и эозином (H&E) микропрепаратами, приготовленными из того же образца ткани шейки матки, что позволяет повысить диагностическую точность и согласованность заключений различных исследователей при диагностике цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки высокой степени дедифференцировки.

Тест предназначен для ручного использования или применения в приборах для автоматического окрашивания.

Интерпретация результатов анализа должна осуществляться квалифицированным патоморфологом с применением гистологического исследования, соответствующих клинических данных и надлежащих мер контроля.

III. Сводная информация и пояснения к изделию

Сводная информация и пояснения

Гистологический набор CINtec® Histology Kit изготовлен на основе моноклональных мышинных антител (клон E6H4®) к человеческому белку p16^{INK4a}.

Белок p16^{INK4a} является ингибитором циклин-зависимой киназы, который играет важную роль в регуляции клеточного цикла эукариотических клеток. Он является частью опосредованного белком ретинобластомы (pRB) контроля фазового перехода G1-S и инициирует остановку клеточного цикла в ходе процессов клеточной дифференциации. В окончательно дифференцированных эпителиальных клетках p16^{INK4a} экспрессируется на уровнях, которые обычно не обнаруживаются методом иммуногистохимического исследования.

Обнаружено, что в различных опухолевых образованиях ген p16^{INK4a} функционально инактивируется за счет генной мутации или гиперметилирования промоторов. Показано, что такая инактивация гена онкосупрессора p16^{INK4a} способствует нарушению регуляции клеточного цикла и потере контроля над пролиферацией клеток.

Показано, что в способных к репликации эпителиальных клетках шейки матки, в которых онкобелки вируса папилломы человека высокого риска (ВПЧ-ВР) запустили процесс клеточной трансформации, экспрессия p16^{INK4a}

значительно повышается [1; 2]. Такая сильная сверхэкспрессия p16^{INK4a} тесно связана на молекулярном уровне с активностью онкобелков E7 ВПЧ-ВР. Показано, что сверхэкспрессия p16^{INK4a} отражает опосредованную онкобелками E7 инактивацию функционального комплекса между pRB и фактором транскрипции E2F, что является одним из ключевых событий при клеточной трансформации, индуцируемой ВПЧ-ВР [3].

Согласно опубликованным данным многочисленных исследований, сверхэкспрессия белка p16^{INK4a} наблюдалась иммуногистохимически в очень многих случаях при предраковой дисплазии шейки матки высокой степени дедифференцировки (а именно в 80–100 % случаев CIN2 и практически во всех случаях CIN3), а также при инвазивном раке. Продемонстрировано, что цервикальные интраэпителиальные поражения низкой степени дедифференцировки (CIN1) имеют сверхэкспрессию p16^{INK4a} разного уровня, обычно в диапазоне 30–60 % [1; 2; 4–16].

При интерпретации результатов следует учитывать тот факт, что p16^{INK4a} является клеточным белком, который может экспрессироваться на обнаруживаемых уровнях при диспластических поражениях шейки матки высокой степени дедифференцировки и раке шейки матки, а также при некоторых состояниях, не связанных с дисплазией шейки матки, хотя и на разных уровнях и с разной картиной экспрессии. Гистологические препараты позволяют оценить также морфологию неповрежденной ткани, что помогает определить, является ли цервикальное поражение положительным в отношении p16^{INK4a}. Картину диффузного окрашивания, то есть непрерывное окрашивание клеток базального и парабазального слоев с окрашиванием или без окрашивания клеток поверхностных слоев, предлагается оценивать как положительный результат анализа на сверхэкспрессию p16^{INK4a}. Показано, что такая картина окрашивания обеспечивает наивысший уровень как чувствительности, так и специфичности по отношению к CIN высокой степени дедифференцировки [1; 4; 5]. И наоборот, картина очагового окрашивания (окрашивание отдельных клеток или небольших скоплений клеток, т. е. прерывистое окрашивание, особенно если не окрашиваются клетки базального и парабазального слоев), а также отсутствие иммунореактивности расцениваются как отрицательный результат анализа на сверхэкспрессию p16^{INK4a} [1; 4; 5].

Результаты микропрепаратов, окрашенных для анализа на p16^{INK4a} с использованием гистологического набора CINtec® Histology Kit, следует интерпретировать вместе с результатами микропрепаратов, окрашенными Н&Е, приготовленными из того же образца цервикальной ткани. При постановке окончательного диагноза дополнительная информация, полученная с помощью микропрепаратов, окрашенных набором CINtec®, должна рассматриваться в сочетании с основанным на морфологии предварительным диагнозом, поставленным по результатам исследования микропрепаратов, окрашенных Н&Е.

Клиническое значение

Показано, что совместное считывание результатов микропрепаратов, окрашенных Н&Е, содержащих срезы биопсийного материала из шейки матки, вместе с последовательными результатами микропрепаратов из того же образца ткани и иммуноокрашенных на p16^{INK4a}, повышает диагностическую точность и согласованность заключений различных исследователей при диагностике цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки

высокой степени дедифференцировки (CIN2+).

Морфологический диагноз, поставленный по срезам ткани шейки матки, окрашенных Н&Е, служит основой для принятия решения о последующем лечении. Следовательно, неточный диагноз ведет к серьезным последствиям. Неточный диагноз может повлечь за собой неправильное лечение пациентки, т. е. ненужное лечение практически здоровой женщины или недостаточное лечение женщины с развившимися диспластическими поражениями высокой степени дедифференцировки.

Диагностическая интерпретация гистологических срезов тканей, окрашенных Н&Е, характеризуется частыми расхождениями в заключениях патологов. В различных публикациях сообщается о низкой согласованности заключений, полученных одним и тем же исследователем, а также различными исследователями при гистологическом анализе тканей шейки матки [17-20].

В крупном многоцентровом исследовании, проводившемся в США, оценивалась интерпретация гистологических данных образцов шейки матки (2237 кольпоскопических биопсий и 535 образцов, взятых при конизации шейки матки методом ПЭЭ) несколькими квалифицированными патологами; воспроизводимость гистопатологических интерпретаций была умеренной (каппа = 0,46 для образцов, взятых методом прицельной биопсии, и каппа = 0,49 для образцов, взятых при ПЭЭ) [17]. При использовании классификации ВОЗ и модифицированной классификации Бетесда согласованность заключений шести гистопатологов, оценивающих 125 образцов кольпоскопической биопсии, оказалась неудовлетворительной для обеих классификаций [18]. Аналогичным образом исследование, проведенное в Великобритании, показало низкий уровень согласованности заключений восьми специалистов-гистопатологов, которые исследовали 100 образцов кольпоскопической биопсии (невзвешенный коэффициент каппа составил 0,358) [19].

Добавление микропрепаратов, окрашенных с помощью гистологического набора CINtec® Histology Kit, к обычным микропрепаратам, окрашенным Н&Е и используемым для постановки диагноза, повышает общую точность данной процедуры гистоморфологической диагностики [21–39].

Принцип процедуры

Гистологический набор CINtec® Histology Kit содержит набор реагентов для иммуногистохимического обнаружения антигена p16^{INK4a}. Набор предназначен для выполнения двухэтапной процедуры иммуногистохимического окрашивания фиксированных формалином и залитых в парафин образцов ткани, полученных из биопсии шейки матки. Для обнаружения антигена используются первичные моноклональные мышинные антитела клона Е6Н4® к человеческому белку p16^{INK4a}.

Используется готовый к применению проявляющий реагент, содержащий полимерный реагент, конъюгированный с пероксидазой хрена и Fab'-фрагментами козьих антимышиных антител. Проявляющий реагент подвергнулся твердофазной абсорбции для устранения перекрестной реактивности с человеческими иммуноглобулинами. Хромогенная реакция основана на опосредованном пероксидазой хрена превращении хромогена DAB в видимый продукт реакции на участке антигена. После контрастного окрашивания образец можно накрыть покровным стеклом, а результаты отправить на исследование методом световой микроскопии.

IV. Реагенты

Предоставляемые материалы

Перечисленные ниже материалы включены в каждый набор в количестве, достаточном для проведения 50 тестов и 50 реакций с отрицательным контролем. Количество тестов дано из расчета использования 200 мкл реагентов на один микропрепарат.

1 Реагент, блокирующий пероксидазу

Реагент, блокирующий пероксидазу

2 x 11,5 мл, готовый к использованию

3%-й пероксид водорода, содержащий 15 ммоль/л азиды натрия (NaN_3).

EUN210: Паспорт безопасности предоставляется по запросу.

2 Мышинные антитела к человеческому p16^{INK4a}

Мышинные антитела к человеческому p16^{INK4a}

11,5 мл, готовый к использованию

Моноклональные мышинные антитела к человеческому p16^{INK4a} (~ 1µг/мл), клон Е6Н4™, поставляются в трис-буфере концентрацией 50 ммоль/л с рН 7,2, содержащем 15 ммоль/л азиды натрия (NaN_3) и стабилизирующий белок.

3 Проявляющий реагент

Проявляющий реагент

2 x 11,5 мл, готовый к использованию



Осторожно!

H317 Может вызывать аллергическую кожную реакцию.

R261 Избегать вдыхания пыли/дыма/газа/тумана/паров/вещества в распыленном состоянии.

R272 Запрещается выносить загрязненную одежду с рабочего места.

R280 Пользоваться защитными перчатками.

R333 + R313 Если возникает раздражение кожи или появляется сыпь: Обратиться за медицинской помощью.

R362 + R364 Снять загрязненную одежду и постирать ее перед повторным использованием.

R501 Утилизировать содержимое/емкость на специализированном заводе по переработке мусора.

Содержит:

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

55965-84-9 реакционная масса: 5-хлор-2-метил-4-изотиазолин-3-он [№ ЕС 247-500-7] и 2-метил-2Н-изотиазол-3-он [№ ЕС 220-239-6] (3:1)

Полимерный реагент, конъюгированный с пероксидазой хрена, и аффинноочищенные фрагменты козьего антимышиного антитела Fab поставляются в стабилизирующем растворе, содержащем консерванты и стабилизирующий белок.

4 Реагент отрицательного контроля

Реагент отрицательного контроля

11,5 мл, готовый к использованию

Моноклональные мышинные антитела к окситоцин-ассоциированному нейрофизину крысы (~ 1µг/мл) поставляются в трис-буфере концентрацией 50 ммоль/л с рН 7,2, содержащем 15 ммоль/л азиды натрия (NaN₃) и стабилизирующий белок. Для проверки специфичности окрашивания. Окситоцин-ассоциированный нейрофизин крысы не содержится в тканях человека.

5 Буферный субстрат DAB

Буферный субстрат DAB

31 мл

Буферный раствор субстрата с рН 7,5 содержит < 0,1 % перекиси водорода, стабилизаторы и усилители.

6 Хромоген DAB

Хромоген DAB

0,85 мл, раствор хромогена 3,3'-диаминобензидина.



Опасно!

H314 Вызывает серьезные ожоги кожи и повреждения глаз.

H341 Подозревается в причинной связи с генетическими дефектами.

H350 Может вызывать рак.

P201 Перед использованием получить специальные инструкции.

P280 Пользоваться защитными перчатками/защитной одеждой/средствами защиты глаз и лица.

P303 + P361 + P353 ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ (или волосы): Немедленно снять всю загрязненную одежду. Промыть кожу водой.

P304 + P340 + P310 ПРИ ВДЫХАНИИ: Вынести пострадавшего на свежий воздух и обеспечить ему полный покой в удобном для дыхания положении. Немедленно обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР/к врачу.

P305 + P351 + P338 + P310 ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если Вы пользуетесь ими и если это легко сделать. Немедленно обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР/к врачу.

P308 + P313 В СЛУЧАЕ воздействия или обеспокоенности: Обратиться за медицинской помощью.

Содержит 868272-85-9 3,3'-диаминобензидин тетрагидрохлорид гидрат

ПРИМЕЧАНИЕ. Информацию об утилизации см. в федеральных, государственных или местных нормативных документах.

7 Раствор для демаскировки антигена, 10 шт.

Раствор для демаскировки антигена, 10 шт.

500 мл трис-буфера концентрацией 100 ммоль/л с pH 9, содержащий 10 ммоль/л ЭДТА и 15 ммоль/л азиды натрия (NaN₃).

Хранение

Хранить при температуре 2–8 °С. Не использовать после истечения срока годности. Данных относительно хранения реагентов в условиях, отличающихся от перечисленных выше, нет.

После вскрытия компоненты набора сохраняют стабильность в течение 6 месяцев при хранении при температуре 2–8 °С. При помутнении растворы необходимо утилизировать.

Разведенный промывочный буфер и разведенный раствор для демаскировки антигена сохраняют стабильность в течение одного месяца при хранении при температуре 2–8 °С. Запрещается использовать растворы при помутнении.

Необходимые материалы и реагенты, не входящие в комплект набора

Промывочный буфер CINtec®, 10 X, для использования с гистологическим набором CINtec® Histology Kit не входит в комплект поставки набора, но его можно заказать у компании Roche по номеру каталога 06595413001 (8550). Подробную информацию о заказе см. на веб-сайте по адресу: www.roche.com.

раствор трис-буфера концентрацией 500 ммоль/л с 1,5 ммоль/л NaCl, pH 7,6, содержащий моющее средство и противомикробное средство.



Осторожно!

H317 Может вызывать аллергическую кожную реакцию.

P261 Избегать вдыхания пыли/дыма/газа/тумана/паров/вещества в распыленном состоянии.

P272 Запрещается выносить загрязненную одежду с рабочего места.

P280 Пользоваться защитными перчатками.

P333 + P313 Если возникает раздражение кожи или появляется сыпь: Обратиться за медицинской помощью.

P362 + P364 Снять загрязненную одежду и постирать ее перед повторным использованием.

P501 Утилизировать содержимое/емкость на специализированном заводе по переработке мусора.

Содержит 55965-84-9, смесь следующего состава: 5-хлор-2-метил-4-изотиазолин-3-он [№ ЕС 247-500-7] и 2-метил-2Н -изотиазол-3-он [№ ЕС 220-239-6] (3:1)

Впитывающие салфетки

Гематоксилин для контрокрашивания

Дистиллированная или деионизированная вода (вода для промывки)

Этиловый спирт, 95 % и 70 %

Заливочная среда

Положительные и отрицательные ткани для использования в качестве контролей

Стекла для изготовления микропрепаратов (SuperFrost® Plus или аналоги)

Ксилол

Покровные стекла

Необходимое оборудование

Дополнительно: Сушильная печь, способная поддерживать температуру 60 °С или ниже

Дополнительно: прибор для автоматического окрашивания Dako или LabVision

Камера влажности (дополнительно)

Световой микроскоп (объектив с коэффициентом увеличения в 4–40 раз)

Емкости или ванны для окрашивания

Флаконы для промывания

Таймер (поддерживающий интервалы 2–60 минут)

Водяная баня с крышкой (способная поддерживать температуру раствора для демаскировки антигена на уровне 95–99 °С).

V. Предупреждения и меры предосторожности

Осторожно!

1. Внимание! Некоторые реагенты, входящие в состав этого набора, содержат опасные химические вещества. При работе с компонентами данного набора соблюдайте меры предосторожности при работе с опасными лабораторными реагентами.
2. Компоненты 1, 2, 4 и 7 данного продукта содержат азид натрия (NaN_3), который в чистом виде очень токсичен. В концентрациях продукта, которые не классифицируются как опасные, азид натрия может вступать в реакцию со свинцовыми и медными элементами водопроводной системы и образовывать чрезвычайно взрывоопасные накопления азидов металлов. Во время утилизации реагент следует смывать большим количеством воды, чтобы предотвратить накопления азидов металлов в канализационных трубах.
3. Компоненты 2, 3 и 4 содержат материал животного происхождения. Соблюдайте надлежащие процедуры обращения, относящиеся к любым

продуктам биологического происхождения.

4. Паспорт безопасности набора предоставляется по запросу.
5. При работе с гистологическими образцами и их утилизации, включая все образцы до и после фиксации, а также все материалы, контактирующие с ними, соблюдайте меры безопасности при работе с потенциально инфекционными материалами, а также соблюдайте установленные требования по утилизации отходов.
6. Никогда не всасывайте реагенты в пипетку ртом. Избегайте контакта реагентов и образцов с кожей и слизистыми оболочками. В случае попадания реагента или образца на кожу или слизистую оболочку смойте его большим количеством воды.
7. Избыточный уровень освещения может негативно влиять на проявляющий реагент и хромоген DAB. Не храните компоненты набора и не проводите процедуру окрашивания при ярком освещении, например под прямыми солнечными лучами.
8. Используйте соответствующие средства индивидуальной защиты, чтобы избежать попадания веществ в глаза и на кожу при работе с любыми компонентами, которые входят в набор или будут использоваться вместе с гистологическим набором CINtec® Histology Kit. Подробная информация содержится в паспорте безопасности (ПБ).
9. Маркировка безопасности продукции в первую очередь соответствует директивам ЕС по СГС.

Внимание!

1. Для диагностики in vitro.
2. Только для профессионального использования.
3. Для того чтобы избежать неспецифического окрашивания, сведите к минимуму микробное загрязнение реагентов.
4. Время инкубации, температура или методы, отличные от описанных в данном документе, могут привести к получению ошибочных результатов.
5. Не используйте набор, если упаковка любого из его компонентов повреждена. Если целостность упаковки повреждена или какие-либо компоненты повреждены, незамедлительно сообщите об этом производителю.
6. Утилизация всех отходов должна производиться в соответствии с местными руководствами и правовыми нормами.
7. Все реагенты разработаны специально для использования в этом тесте. Для того чтобы тест прошел в соответствии с указаниями, не следует заменять какие-либо его компоненты.
8. Если наблюдаются неожиданные результаты окрашивания, которые не могут быть объяснены различиями лабораторных методик, а также есть подозрение на проблему, связанную с гистологическим набором CINtec® Histology Kit, незамедлительно обратитесь за технической поддержкой, контактную информацию которой можно найти в разделе XIII.
9. Продукт, пришедший в негодность из-за неправильного обращения или нестабильности, не имеет явных признаков порчи. Поэтому в качестве меры контроля качества одновременно с исследованием образца

пациента следует провести определение на положительном и отрицательном контролях.

10. Чтобы сообщить о предполагаемых серьезных происшествиях, связанных с этим изделием, обратитесь к местному представителю компании Roche, а также в компетентный орган государства-члена или страны, в которой зарегистрирован пользователь.

VI. Процедура

Приготовление образцов

Гистологический набор CINtec® Histology Kit предназначен для использования с образцами тканей, законсервированными для иммуногистохимических процедур. Образцы следует готовить в соответствии со стандартными методами обработки тканей.

Для оптимальных результатов рекомендуется использовать положительно заряженные предметные стекла, такие как SuperFrost® Plus.

Образцы тканей, залитых в парафин

Для работы с данным набором подходят образцы тканей, фиксированные нейтральным забуференным раствором формалина, залитые в парафин и обработанные с использованием стандартных методов. Если образцы приготовлены с использованием другого метода консервации, то пользователь должен проверить пригодность этого метода.

Образцы биопсии следует фиксировать на 18–24 часа нейтральным забуференным раствором формалина (рекомендуется 10 %) и сформировать блоки толщиной 3 или 4 мм. Затем тканевые блоки обезживаются последовательной промывкой спиртами и ксилолом с последующей инфильтрацией расплавленным парафином при температуре не выше 60 °С. Из каждого тканевого блока формируются срезы толщиной 4–5 мкм, которые помещаются на предметные стекла SuperFrost® Plus в гистопатологической лаборатории. Окрашивание предметных стекол следует выполнять немедленно, поскольку антигенность срезов тканей может со временем снижаться.

Высокотемпературная демаскировка антигена

Для высокотемпературной демаскировки антигена срезы тканей, помещенные на предметные стекла, нагревают путем погружения в раствор для демаскировки антигена в откалиброванной водяной бане, способной поддерживать температуру раствора для демаскировки антигена на уровне 95–99 °С. Лаборатории, расположенные высоко над уровнем моря, должны определить наилучший метод поддержания требуемой температуры водяной бани. Производитель не рекомендует отклоняться от описанной здесь процедуры.

После высокотемпературной демаскировки антигена срезы ткани остужают при комнатной температуре в течение 20 минут перед дальнейшей обработкой. После этого необходимо незамедлительно провести окрашивание срезов ткани.

Процедура окрашивания

1. Приготовление реагентов

Перед иммуноокрашиванием все реагенты следует довести до комнатной температуры (20–25 °С). Соответственно, все последующие этапы должны выполняться при комнатной температуре.

Следует проявлять особую осторожность, чтобы не допускать высыхания образцов во время процедуры иммуноокрашивания, поскольку высыхание может привести к появлению артефактов окрашивания.

Перед началом процедуры окрашивания необходимо подготовить следующие реагенты.

1.1. Раствор для демаскировки антигена

Приготовьте раствор для демаскировки антигена в объеме, достаточном для планируемой процедуры окрашивания, путем разведения содержимого флакона 7 (раствор для демаскировки антигена, 10 шт.) дистиллированной или деионизированной водой в пропорции 1:10.

После разведения раствор для демаскировки антигена можно хранить при температуре 2–8 °С в течение одного месяца. В случае помутнения разведенного раствора его следует утилизировать.

ПРИМЕЧАНИЕ. Разведение раствора для демаскировки антигена водой с повышенным уровнем ионов может значительно ухудшить окрашивающие характеристики тест-системы. Убедитесь, что используемая вода деионизирована должным образом (т.е. убедитесь, что ионообменная колонка для получения деионизированной воды проверена в ходе планового технического обслуживания). Не используйте водопроводную воду!

1.2. Промывочный буфер

Используйте промывочный буфер CINtec® (10 шт.), номер по каталогу — 06595413001 (8550), поставляемый компанией Roche вместе с гистологическим набором CINtec® Histology Kit. Подробную информацию о заказе см. на веб-сайте по адресу: www.roche.com.

Приготовьте промывочный буфер в количестве, достаточном для всех этапов промывки планируемой процедуры окрашивания, путем разведения определенного количества промывочного буфера (10 шт.), номер по каталогу — 8550, дистиллированной или деионизированной водой в пропорции 1:10.

После разведения промывочный буфер можно хранить при температуре 2–8 °С в течение одного месяца. В случае помутнения разведенного раствора его следует утилизировать.

1.3. Раствор субстрат-хромогена (DAB)

Для приготовления раствора субстрат-хромогена добавьте одну каплю хромогена DAB к 2 мл буферного субстрата DAB. Выполните следующие действия:

- i) перенесите 2 мл буферного субстрата DAB из флакона 5 в пробирку;
 - ii) добавьте одну каплю (25–30 мкл) хромогена DAB из флакона 6.
- Перемешайте и нанесите на срезы тканей с помощью пипетки.

2 мл раствора субстрат-хромогена (DAB), приготовленного в соответствии с приведенной выше инструкцией, обычно достаточно для окрашивания пяти срезов тканей, включая соответствующие пять контрольных образцов.

ПРИМЕЧАНИЕ. Используйте приготовленный раствор субстрат-хромогена (DAB) в тот же день.

ПРИМЕЧАНИЕ. Добавление в буферный субстрат DAB избыточного количества хромогена DAB приведет к ухудшению положительного сигнала.

1.4. Контрокрашивание

Реакция окрашивания DAB дает окрашенный конечный продукт, который не растворяется в воде. Для контрокрашивания можно использовать спирт или водный гематоксилин. При использовании гематоксилина придерживайтесь инструкций поставщика гематоксилина по контрокрашиванию.

1.5. Заливочная среда

Для заливки микропрепаратов после окрашивания рекомендуется использовать безводную заливочную среду для постоянной фиксации. Однако допускается также заливка на водной основе.

Для безводной заливки рекомендуется использовать заливочную среду Eukitt. Для водной заливки рекомендуется использовать заливочную среду Aquatech Merck.

2. Процедура окрашивания с использованием приборов для автоматического окрашивания

Гистологический набор CINtec® Histology Kit адаптирован для использования на приборах для автоматического окрашивания (на приборе Lab Vision Autostainer 480 или Dako Autostainer Plus) согласно инструкции, представленной ниже. Существует возможность использования других приборов и систем с аналогичными функциями после проведения надлежащей валидации пользователем. Перед окрашиванием на приборе для автоматического окрашивания образцы и реагенты следует приготовить в соответствии с указаниями в разделах 1.1–1.5 и 2.1.

2.1. Депарафинизация и регидратация

Перед депарафинизацией выдержите микропрепараты в сушильном шкафу при температуре не выше 60 °C не менее 20 минут, но не более одного часа, чтобы количественно удалить воду и тем самым улучшить прилипание ткани к предметному стеклу («запекание»), а также расплавить парафин. Перед выполнением процедуры окрашивания микропрепараты тканей следует депарафинизировать, чтобы удалить заливочную среду, а затем регидратировать. Крайне важно не допускать неполного удаления парафина, поскольку остатки заливочной среды приводят к усилению неспецифического окрашивания. Инкубируйте микропрепараты при комнатной температуре (20–25 °C) в соответствии со следующими этапами:

- 5 (±1) минут в ванне с ксилолом;
- повторите этот этап один раз со свежей ванной;
- удалите лишнюю жидкость;
- 3 (±1) минуты в 95%-м этиловом спирте;

- повторите этот этап один раз со свежей ванной;
- удалите лишнюю жидкость;
- 3 (± 1) минуты в 70%-м этиловом спирте;
- повторите этот этап один раз со свежей ванной;
- удалите лишнюю жидкость;
- выдержите не менее 30 секунд в дистиллированной или деионизированной воде.

Начните процедуру окрашивания, как описано в разделе 2.2, этапе 1. Демаскировка антигена.

Одни и те же растворы ксилола и спирта не следует использовать для обработки более 40 микропрепаратов.

ПРИМЕЧАНИЕ. Пользователям следует учитывать тот факт, что различия в температуре оборудования или времени воздействия во время преаналитической подготовки образца могут привести к неполному удалению парафина из микропрепаратов тканей. Присутствие остатков парафина может привести к неполному окрашиванию при использовании любого гистологического красителя, в том числе гистологического красителя CIntec® Histology stain. В гистопатологических лабораториях следует проводить регулярный мониторинг оборудования, чтобы уменьшить вариативность условий процедуры приготовления образцов перед окрашиванием. Наблюдение четко определенных границ на иммунореактивных участках ткани и другие неоднородности окрашивания микропрепарата при использовании любого иммуногистохимического красителя могут быть показателями неоптимальной или неполной преаналитической обработки образца. При выявлении неоднородности окрашивания пользователям следует рассмотреть возможность проверки оборудования и методов преаналитической подготовки образцов.

2.2. Протокол окрашивания с использованием приборов для автоматического окрашивания

Этап 1. Демаскировка антигена

- Заполните емкости для окрашивания, например пластиковые емкости Коплина, разведенным раствором для демаскировки антигена (см. «Процедура», раздел 1.1.).
- Поместите емкости для окрашивания с раствором для демаскировки антигена в водяную баню и нагрейте водяную баню и раствор для демаскировки антигена до температуры 95–99 °С. Важно скорректировать уровень воды в водяной бане таким образом, чтобы емкости были погружены в воду на 80 %. Чтобы стабилизировать температуру и не допускать испарения, накройте емкости крышками.
- Погрузите депарафинизированные срезы в предварительно нагретый раствор для демаскировки антигена в емкостях для окрашивания; на этом этапе температура в емкостях обычно опускается ниже 90 °С.
- Доведите температуру водяной бани и раствора для демаскировки антигена в емкостях опять до температуры 95–99 °С; проверьте температуру раствора для демаскировки в емкостях.
- Инкубируйте образцы в течение 10 (± 1) минут при температуре 95–

99 °С; начинайте обратный отсчет только после того, как будет подтверждено, что температура раствора для демаскировки антигена в емкостях достигла 95–99 °С.

- Достаньте всю емкость с микропрепаратами из водяной бани.
- Остудите микропрепараты в растворе для демаскировки антигена в течение 20 (±1) минут при комнатной температуре.
- Слейте раствор для демаскировки антигена и промойте срезы в промывочном буфере (см. «Процедура», раздел 1.2).
- Для получения оптимальных результатов вымачивайте срезы в промывочном буфере в течение 5 минут после демаскировки антигена и перед окрашиванием.

ПРИМЕЧАНИЕ. Раствор для демаскировки антигена предназначен только для одноразового применения. Только для одноразового применения.

Этап 2. Программирование прибора

Перед первым использованием гистологического набора CINtec® Histology Kit на приборе для автоматического окрашивания необходимо настроить новый шаблон. Более подробную информацию см. в руководстве пользователя конкретного автоматического прибора для окрашивания.

Этап 3. Порядок работы с прибором для автоматического окрашивания

- Перенесите реагенты из флаконов набора в мерные флаконы для реагентов прибора для автоматического окрашивания. Определите время для программы и объемы реагентов по карте, созданной прибором для автоматического окрашивания (см. пункт 4 для конкретных значений времени и объемов).
- Поместите флаконы с реагентами прибора для автоматического окрашивания на штатив для реагентов прибора для автоматического окрашивания в соответствии с картой-схемой расположения реагентов, сформированной компьютером.
- Загрузите микропрепараты в прибор для автоматического окрашивания в соответствии с картой-схемой расположения микропрепаратов, сформированной компьютером.
- Для предотвращения высыхания образцов их необходимо сбрызнуть промывочным буфером после загрузки в прибор для автоматического окрашивания.
- Ниже приводится схема выполнения программы.
 - Ополаскивание*
 - 200 мкл реагента, блокирующего пероксидазу, — 5 минут
 - Ополаскивание*
 - 200 мкл первичных антител к p16^{INK4a} или отрицательного контроля реагента — 30 минут
 - Ополаскивание*
 - 200 мкл проявляющего реагента — 30 минут
 - Ополаскивание*

- Ополаскивание*
- Ополаскивание*
- Переключение
- 200 мкл раствора субстрат-хромогена (DAB) — 10 минут
- Ополаскивание*

- Ополосните микропрепараты деионизированной водой после этапа обработки субстрат-хромогеном.

* Используйте промывочный буфер для соответствующих этапов ополаскивания.

ПРИМЕЧАНИЕ. Если используемый прибор для автоматического окрашивания ополаскивает микропрепараты буфером, то после удаления из прибора для автоматического окрашивания микропрепараты необходимо промывать деионизированной водой.

Этап 4. Контрокрашивание (инструкции для гематоксилина)

- Погрузите микропрепараты в ванну с гематоксилином. Инкубируйте в течение 2–5 минут, в зависимости от концентрации используемого раствора гематоксилина.
- Поместите микропрепараты в ванну с водопроводной водой и осторожно ополосните проточной водопроводной водой. Убедитесь, что остатки гематоксилина полностью удалены.
- Быстро ополосните микропрепараты в ванне с дистиллированной или деионизированной водой.
- Контрокрашивание можно проводить непосредственно в приборе для автоматического окрашивания.

ПРИМЕЧАНИЕ. В зависимости от продолжительности инкубации и концентрации используемого раствора гематоксилина контрокрашивание приведет к окрашиванию клеточных ядер в диапазоне от бледно-голубого до темно-синего цвета. Избыточное или неполное контрокрашивание может отрицательно повлиять на правильность интерпретации результатов.

Этап 5. Заливка

Рекомендуется использовать безводную среду для постоянной фиксации. Однако также допускается заливка и на водной основе. Соблюдайте инструкцию по применению, предоставленную поставщиком заливочной среды.

ПРИМЕЧАНИЕ. Чтобы свести к минимуму выцветание, защищайте микропрепараты от воздействия света и храните их при комнатной температуре (20–25 °C).

3. Процедура ручного окрашивания

ПРИМЕЧАНИЕ. Не допускайте высыхания срезов тканей во время процедуры окрашивания. Высыхание срезов тканей может привести к усилению неспецифического окрашивания. При длительной инкубации держите образцы тканей во влажной среде.

При использовании гистологического набора CINTec® Histology Kit для ручного окрашивания соблюдайте стандартные правила, используемые при ручном

иммуногистохимическом окрашивании.

3.1. Депарафинизация и регидратация

Перед депарафинизацией выдержите микропрепараты в сушильном шкафу при температуре не выше 60 °С не менее 20 минут, но не более одного часа, чтобы количественно удалить воду и тем самым улучшить прилипание ткани к предметному стеклу («запекание»), а также расплавить парафин. Перед выполнением процедуры окрашивания микропрепараты тканей следует депарафинизировать, чтобы удалить заливочную среду, а затем регидратировать. Крайне важно не допускать неполного удаления парафина, поскольку остатки заливочной среды приводят к усилению неспецифического окрашивания. Инкубируйте микропрепараты при комнатной температуре (20–25 °С) в соответствии со следующими этапами:

- 5 (±1) минут в ванне с ксилолом;
- повторите этот этап один раз со свежей ванной;
- удалите лишнюю жидкость;
- 3 (±1) минуты в 95%-м этиловом спирте;
- повторите этот этап один раз со свежей ванной;
- удалите лишнюю жидкость;
- 3 (±1) минуты в 70%-м этиловом спирте;
- повторите этот этап один раз со свежей ванной;
- удалите лишнюю жидкость;
- выдержите не менее 30 секунд в дистиллированной или деионизированной воде.

Начните процедуру окрашивания, как описано в разделе 3.2, этапе 1. Демаскировка антигена.

Одни и те же растворы ксилола и спирта не следует использовать для обработки более 40 микропрепаратов.

3.2. Протокол ручного окрашивания

Этап 1. Демаскировка антигена

- Заполните емкости для окрашивания, например пластиковые емкости Коплина, разведенным раствором для демаскировки антигена (см. «Процедура», раздел 1.1.).
- Поместите емкости для окрашивания с раствором для демаскировки антигена в водяную баню и нагрейте водяную баню и раствор для демаскировки антигена до температуры 95–99 °С. На этом этапе важно скорректировать уровень воды в водяной бане таким образом, чтобы емкости были погружены в воду на 80 %. Чтобы стабилизировать температуру и не допускать испарения, накройте емкости крышками.
- Погрузите депарафинизированные срезы в предварительно нагретый раствор для демаскировки антигена в емкостях для окрашивания; на этом этапе температура в емкостях обычно снижается до менее 90 °С.
- Доведите температуру водяной бани и раствора для демаскировки

антигена в емкостях опять до температуры 95–99 °С; проверьте температуру раствора для демаскировки в емкостях.

- Инкубируйте образцы в течение 10 (±1) минут при температуре 95–99 °С; начинайте обратный отсчет только после того, как будет подтверждено, что температура раствора для демаскировки антигена в емкостях достигла 95–99 °С.
- Достаньте всю емкость с микропрепаратами из водяной бани.
- Остудите микропрепараты в растворе для демаскировки антигена в течение 20 (±1) минут при комнатной температуре.
- Слейте раствор для демаскировки антигена и промойте срезы в разведенном промывочном буфере (см. «Процедура», раздел 1.2).
- Для получения оптимальных результатов вымачивайте срезы в промывочном буфере в течение 5 (±1) минут после демаскировки антигена и перед окрашиванием.

ПРИМЕЧАНИЕ. Раствор для демаскировки антигена предназначен только для одноразового применения. Только для одноразового применения.

Этап 2. Реагент, блокирующий пероксидазу

- Нанесите 200 мкл реагента, блокирующего пероксидазу, покрыв им образец.
- Инкубируйте в течение 5 (±1) минут.
- Слейте лишнюю жидкость и поместите микропрепараты в свежую ванну с промывочным буфером на 5 (±1) минут.

Этап 3. Первичные антитела или отрицательный контроль реагента

- Удалите излишки буфера.
- Нанесите на образец 200 мкл первичных антител (мышинных антител к человеческому р16^{INK4a} или отрицательного контроля реагента).
- Инкубируйте в течение 30 (±1) минут.
- Слейте лишнюю жидкость и поместите микропрепараты в свежую ванну с промывочным буфером на 5 (±1) минут.

Этап 4. Проявляющий реагент

- Удалите излишки буфера.
- Нанесите на образец 200 мкл проявляющего реагента.
- Инкубируйте в течение 30 (±1) минут.
- Слейте лишнюю жидкость и поместите микропрепараты в свежую ванну с буфером на 5 (±1) минут.
- Повторите этот этап дважды со свежей ванной с промывочным буфером.

Этап 5. Раствор субстрат-хромогена (DAB)

- Нанесите на образец 200 мкл раствора субстрат-хромогена (DAB), приготовленного в соответствии с процедурой, описанной выше в разделе 1.3.
- Инкубируйте в течение 10 (\pm 1) минут.
- Слейте лишнюю жидкость и осторожно ополосните образцы дистиллированной или деионизированной водой.

Соберите отработанный раствор субстрат-хромогена (DAB) в контейнер для опасных материалов для надлежащей утилизации.

Этап 6. Контрокрашивание (инструкции для гематоксилина)

- Погрузите микропрепараты в ванну с гематоксилином. Инкубируйте в течение 2–5 минут, в зависимости от концентрации используемого раствора гематоксилина.
- Поместите микропрепараты в ванну с водопроводной водой и осторожно ополосните проточной водопроводной водой. Убедитесь, что остатки гематоксилина полностью удалены.
- Быстро ополосните микропрепараты в ванне с дистиллированной или деионизированной водой.

ПРИМЕЧАНИЕ. В зависимости от продолжительности инкубации и концентрации используемого раствора гематоксилина контрокрашивание приведет к окрашиванию клеточных ядер в диапазоне от бледно-голубого до темно-синего цвета. Избыточное или неполное контрокрашивание может отрицательно повлиять на правильность интерпретации результатов.

Этап 7. Заливка

Рекомендуется использовать безводную среду для постоянной фиксации. При использовании постоянной заливочной среды на основе ксилола необходима процедура обезвоживания, например такая.

- Дистиллированная или деионизированная вода.
- 3 мин в 70%-м этиловом спирте.
- 3 мин в 70%-м этиловом спирте.
- 3 мин в 96%-м этиловом спирте.
- 3 мин в 99%-м этиловом спирте.
- 5 мин в ксилоле.
- 5 мин в ксилоле.

Однако также допускается заливка и на водной основе. Соблюдайте инструкцию по применению, предоставленную поставщиком заливочной среды.

ПРИМЕЧАНИЕ. Чтобы свести к минимуму выцветание, защищайте микропрепараты от воздействия света и храните их при комнатной температуре (20–25 °C).

VII. Контроль качества

Отклонения от рекомендуемых методик фиксации и обработки образцов в лаборатории пользователя могут привести к значительной вариабельности результатов, что приводит к необходимости регулярного внутреннего контроля.

Положительный тканевый контроль

Материалы, используемые в качестве внешних положительных контролей, должны представлять собой свежие образцы, полученные при аутопсии/биопсии/хирургическом вмешательстве, фиксированные, обработанные и залитые в кратчайшие сроки тем же способом, что и образец (образцы) пациента. Положительные тканевые контроли демонстрируют правильную подготовку тканей и надлежащие методики окрашивания. Каждый цикл окрашивания должен включать один внешний положительный тканевый контроль для каждой совокупности условий исследования. Ткани, используемые в качестве материалов, служащих внешними положительными контролями, следует выбирать из образцов пациентов с заведомо положительными результатами окрашивания на p16^{INK4a}. Если положительные контроли не демонстрируют надлежащего положительного окрашивания, то результаты окрашивания данных исследуемых образцов следует считать недействительными.

Отрицательный тканевый контроль

В качестве внутренних отрицательных контрольных сайтов для проверки рабочих характеристик системы ИГХ анализа лаборант может использовать типы клеток, заведомо отрицательных по p16^{INK4a}, которые присутствуют в большинстве срезов тканей. В случае специфического (ложно-положительного) окрашивания отрицательного тканевого контроля результаты, полученные для образцов пациента, следует считать недействительными.

Неспецифический отрицательный контроль реагента

Используйте неспецифический отрицательный контроль реагента вместо первичных антител со срезом образца каждого пациента для оценки неспецифического окрашивания и повышения качества интерпретации специфического окрашивания на антигенном сайте.

В случае специфического (ложно-положительного) окрашивания неспецифического отрицательного контроля реагента результаты, полученные для образцов пациента, следует считать недействительными.

VIII. Интерпретация результатов

Контрольные образцы, окрашенные с использованием отрицательного контроля реагента в качестве первичного реагента, не должны давать специфического окрашивания.

Положительные результаты окрашивания, полученные при использовании моноклональных мышинных антител к человеческому p16^{INK4a}, клон Е6Н4™, следует оценивать в контексте любого неспецифического фонового окрашивания при использовании отрицательного контроля реагента. Как и при любом другом иммуногистохимическом исследовании, отрицательный результат означает, что антиген не обнаружен, а не то, что антиген отсутствует в исследуемых клетках/тканях.

При интерпретации результатов следует учитывать тот факт, что p16^{INK4a} является клеточным белком, который может экспрессироваться на обнаруживаемых уровнях при диспластических поражениях шейки матки высокой степени дедифференцировки и раке шейки матки, а также при некоторых состояниях, не связанных с дисплазией шейки матки, хотя и на разных уровнях и с разной картиной экспрессии.

Окрашенные микропрепараты образцов оцениваются в соответствии с бинарной классификацией, состоящей из оценки «положительный» либо «отрицательный».

Оценка «положительный» присваивается в том случае, если в микропрепарате образца, окрашенном для p16^{INK4a}, наблюдается непрерывное окрашивание клеток базального и парабазального слоев плоского эпителия шейки матки, с окрашиванием или без окрашивания клеток поверхностных слоев («картина диффузного окрашивания»). Пример микропрепарата, оцененного как «положительный» («картина диффузного окрашивания»), представлен в приложении 2, рис. 1.

Оценка «отрицательный» присваивается в том случае, если в микропрепарате образца, окрашенном для p16^{INK4a}, наблюдается либо отрицательная реакция окрашивания в плоском эпителии («картина отрицательного окрашивания»), либо окрашивание отдельных клеток или небольших скоплений клеток, т. е. прерывистое окрашивание, особенно если не окрашиваются клетки базального и парабазального слоев («картина очагового окрашивания»). Пример микропрепарата, оцененного как «отрицательный» («картина очагового окрашивания»), представлен в приложении 2, рис. 2.

Результаты микропрепаратов, окрашенных для анализа на p16^{INK4a} с использованием гистологического набора CINtec[®] Histology Kit, следует интерпретировать вместе с результатами микропрепаратов, окрашенными H&E, приготовленными из того же образца цервикальной ткани. При постановке окончательного диагноза дополнительная информация, полученная с помощью микропрепаратов, окрашенных с использованием гистологического набора CINtec[®], должна рассматриваться в сочетании с основанным на морфологии предварительным диагнозом, поставленным по результатам исследования микропрепаратов, окрашенных H&E.

IX. Ограничения

- Только для профессионального использования. Для проведения иммуногистохимических исследований требуется специальное обучение.
- Клиническая интерпретация любого положительного или отрицательного окрашивания должна оцениваться в контексте клинической картины, морфологии и других гистопатологических критериев. Клиническая интерпретация любого положительного или отрицательного окрашивания должна дополняться морфологическими исследованиями с использованием надлежащих положительных и отрицательных внутренних и внешних контролей, а также другими диагностическими методами. Ответственность за интерпретацию всех этапов, используемых для приготовления и интерпретации готовых ИГХ-препаратов, возлагается на квалифицированного патолога, имеющего достаточные знания о надлежащем использовании ИГХ-

антител, реагентов и методов.

- На результаты окрашивания при иммуногистохимическом исследовании сильно влияет качество окрашиваемой ткани. Соответственно, этапы фиксации, промывки, высушивания, нагревания, приготовления срезов или попадание посторонних тканей значительно влияют на общий результат окрашивания и могут привести к артефактам, захвату антител или ложно-отрицательным результатам. Противоречивые результаты могут быть обусловлены различиями методик фиксации и заливки или же неоднородностью, свойственной самой ткани.
- Избыточное или неполное контрокрашивание может отрицательно повлиять на правильность интерпретации результатов.
- Производитель поставляет данные антитела/реагенты, которые имеют оптимальную концентрацию для использования в соответствии с приведенными здесь инструкциями при проведении ИГХ-исследований на приготовленных тканевых срезах. Любое отклонение от рекомендуемых методик анализа может привести к получению недостоверных результатов, отличных от заявленных ожидаемых результатов; необходимо использовать и документировать соответствующие контрольные образцы. Пользователи, которые не соблюдают рекомендуемые методики анализа, несут ответственность за интерпретацию результатов пациента, полученных в таких обстоятельствах.
- Ложно-положительные результаты могут появляться вследствие неиммунологического связывания белков или продуктов реакции субстрата. Они могут также быть вызваны псевдопероксидазной активностью (эритроциты) и активностью эндогенной пероксидазы (цитохром С).
- Возможны непредвиденные реакции при использовании реагентов с тканями, которые ранее не изучались в анализах такого рода. Нельзя полностью исключить возможность непредвиденных реакций даже в исследованных группах тканей из-за биологической вариабельности экспрессии антигенов в новообразованиях или других патологических тканях. О задокументированной(-ых) непредвиденной(-ых) реакции(-ях) сообщайте в лаборатории Roche mtm laboratories AG. Для получения информации о технической поддержке см. контактную информацию, указанную в разделе XIII.
- Не заменяйте реагенты набора реагентами с другими номерами партии или реагентами других производителей.

X. Рабочие характеристики

Клинические характеристики

Клинические характеристики гистологического набора CINtec® Histology Kit оценивались в контролируемом клиническом исследовании с использованием фиксированных формалином и залитых в парафин образцов тканей шейки матки [21]. Исследование было разработано, чтобы продемонстрировать пригодность гистологического набора CINtec® Histology Kit в качестве средства повышения диагностической точности и согласованности заключений различных исследователей при выявлении цервикальной

интраэпителиальной неоплазии высокой степени дедифференцировки (CIN2+).

Клиническое исследование проводилось с использованием ретроспективно собранных биоптатов из шейки матки, которые были получены методами прицельной биопсии и конизации. Из 500 цервикальных образцов, полученных из двух разных европейских патологических лабораторий и дополнительно оцененных на предмет наличия дисплазии высокой степени дедифференцировки исходя из первоначального диагноза, были приготовлены микропрепараты, окрашенные Н&Е, и микропрепараты последовательных срезов, окрашенные с помощью гистологического набора CINtec® Histology Kit в соответствии с инструкциями производителя.

Три европейских специалиста по гинекологической патологии независимо друг от друга устанавливали диагноз для каждого случая на основе микропрепарата, окрашенного Н&Е. Для случаев с противоречивыми результатами проводилась процедура совместного повторного анализа в рамках экспертизы, а диагнозы, поставленные большинством экспертов (консенсусные диагнозы, поставленные двумя из трех специалистов), служили референсными диагнозами для исследования.

В исследовании в качестве аккредитованных патологов приняло участие двенадцать исследователей (сертифицированных патологов, постоянно изучающих патологию шейки матки) из четырех европейских стран (Франции, Италии, Испании и Германии). На первом этапе интерпретации микропрепаратов все аккредитованные патологи поставили свои диагнозы для каждого случая, основываясь исключительно на микропрепаратах, окрашенных Н&Е. Ни на одном из этапов исследования патологам не предоставлялась информация о первоначальных и референсных диагнозах. После ликвидационного периода продолжительностью более 4 недель тот же набор (повторно маркированных) микропрепаратов, окрашенных Н&Е, повторно оценивался всеми двенадцатью аккредитованными патологами вместе с соответствующими микропрепаратами каждого случая, окрашенными с использованием гистологического набора CINtec® Histology Kit.

Для оценки повышения диагностической точности при анализе микропрепаратов шейки матки, окрашенных с использованием гистологического набора CINtec® Histology, вместе с ретроспективно полученными микропрепаратами, окрашенными Н&Е, по сравнению с анализом только микропрепаратов, окрашенных Н&Е, заключения каждого аккредитованного патолога, сделанные при использовании обоих методов, сравнивались с консенсусными диагнозами, установленными в качестве референсных диагнозов тремя специалистами в области гинекологической патологии.

Результаты

В анализ данных было включено в общей сложности 482 случая с полными наборами заключений, сделанных всеми патологами, принимавшими участие в исследовании. Частоты разных диагностических категорий согласно консенсусным диагнозам, установленными тремя специалистами в области гинекологической патологии, были следующими: отрицательный результат по дисплазии (n = 194), CIN1 (n = 96), CIN2 (n = 69) и CIN3 (n = 123).

Диагностическая точность при выявлении CIN2+

Общая чувствительность для выявления CIN2+ возросла с 1787 (Н&Е) до 2018 (Н&Е плюс гистологический набор CINtec® Histology) истинно

положительных результатов CIN2+ при незначительном снижении общей специфичности с 3088 (H&E) до 3051 (H&E плюс гистологический набор CINtec® Histology) истинно отрицательных результатов ≤CIN1.

Табл. 1

Повышение диагностической точности для CIN высокой степени дедифференцировки (CIN2+) за счет совместной оценки микропрепаратов, окрашенных H&E, вместе с микропрепаратами, окрашенными с использованием гистологического набора CINtec® Histology, по сравнению с оценкой только микропрепаратов, окрашенных H&E; приводятся количества истинно-положительных, ложно-отрицательных, ложно-положительных и истинно-отрицательных результатов анализа в сравнении с консенсусными диагнозами, поставленными экспертами-патологами (примечание: суммарное количество совпадений с консенсусными диагнозами экспертов-патологов составило бы 2304 (192 случая CIN2+, x 12 аккредитованных патологов) истинно-положительных результата)

	Истинно положительные	Ложно отрицательные	Ложно положительные	Истинно отрицательные
H&E	1787	517	392	3088
H&E + гистологический набор CINtec® Histology	2018	286	429	3051

Для проверки влияния гистологической тест-системы CINtec® Histology на точность анализа использовалась модель со смешанными эффектами ANOVA для псевдозначений «складного ножа», более известная как метод Дорфмана–Бербаума–Метца (DBM).

Нулевая гипотеза о том, что диагностическая точность при использовании микропрепаратов, окрашенных H&E, по сравнению с микропрепаратами, окрашенных H&E, в сочетании с микропрепаратами, окрашенными гистологическим набором CINtec® Histology, для CIN2+ является одинаковой, была отклонена при $p = 0,0004$ (площадь под кривой (AUC) для H&E: 0,877; AUC для H&E в сочетании с гистологическим набором CINtec® Histology: 0,925).

Табл. 2

Рабочие характеристики для совместной оценки микропрепаратов, окрашенных H&E, в сочетании с микропрепаратами, окрашенными с использованием гистологического набора CINtec® Histology, в сравнении с оценкой только микропрепаратов, окрашенных H&E, для выявления CIN высокой степени дедифференцировки (CIN2+); в качестве референсных диагнозов использовались консенсусные диагнозы, установленные тремя специалистами в области гинекологической патологии.

	H&E % (95%-й ДИ)	H&E плюс гистологический набор CINtec® Histology % (95%-й ДИ)
Чувствительность	77,6 % (75,8, 79,3)	87,6 % (86,2, 88,9)
Специфичность	88,7 % (87,6, 89,8)	87,7 % (86,5, 88,8)
PPV	82,0 % (80,3, 83,6)	82,5 % (80,9, 84,0)
NPV	85,7 % (84,5, 86,8)	91,4 % (90,4, 92,4)
DLR+	6,885 (6,256, 7,578)	7,105 (6,494, 7,773)
DLR-	0,253 (0,234, 0,273)	0,142 (0,127, 0,158)

95%-й ДИ — 95%-е доверительные интервалы; PPV — прогностическая ценность положительного результата; NPV — прогностическая ценность отрицательного результата; DLR+ — отношение правдоподобия положительного результата диагностики; DLR- — отношение правдоподобия отрицательного результата диагностики

При использовании консенсусных диагнозов, установленных тремя специалистами в области гинекологической патологии, в качестве референсных диагнозов было зафиксировано повышение чувствительности для выявления CIN2+ на 13 % (чувствительность при постановке диагноза по результатам окрашивания микропрепаратов H&E составляла 77,6 % и повысилась до 87,6 % при постановке диагноза по результатам окрашивания микропрепаратов H&E и с использованием гистологического набора CINtec® Histology).

Увеличение диагностической точности при выявлении CIN2+ было доказано независимо со статистической значимостью для подгрупп биоптатов шейки матки, полученных методом прицельной биопсии (n = 249; AUC для H&E: 0,895; AUC для H&E в сочетании с гистологическим набором CINtec® Histology: 0,929; p = 0,0053), а также образцам из шейки матки, полученным методом конизации (n = 233; AUC для H&E: 0,887; AUC для H&E в сочетании с гистологическим набором CINtec® Histology: 0,948; p = 0,009).

Согласованность заключений различных исследователей для выявления CIN2+

Для оценки повышения согласованности заключений различных исследователей для выявления CIN2+ разными аккредитованными патологами использовался вариант каппа-статистики для нескольких экспертов при сравнении диагнозов, поставленных по микропрепаратам шейки матки, окрашенным H&E, и диагнозов, поставленных по микропрепаратам шейки матки, окрашенным H&E, в сочетании с микропрепаратами, окрашенными с использованием гистологического набора CINtec® Histology.

Табл. 3

Повышение согласованности заключений различных исследователей для выявления CIN2+ при последовательном анализе

микропрепаратов, окрашенных Н&Е, и микропрепаратов, окрашенных с использованием гистологического набора CINtec® Histology, в сравнении с анализом только микропрепаратов, окрашенных Н&Е. Приводятся коэффициенты каппа как скорректированный по шансам показатель согласованности.

Диагностическая категория	Каппа для Н&Е	Каппа для Н&Е плюс CINtec®	Статистическая значимость
CIN2+, все случаи	0,580	0,756	$p < 0,0001$
CIN2+, только прицельная биопсия	0,598	0,748	$p < 0,0001$
CIN2+, только конизация	0,548	0,765	$p < 0,0001$

Статистический коэффициент каппа как скорректированный по шансам показатель согласованности заключений аккредитованных патологов при выявлении CIN2+, значительно повысился при анализе микропрепаратов, окрашенных Н&Е, в сочетании с микропрепаратами, окрашенными с использованием гистологического набора CINtec® Histology в сравнении с анализом только микропрепаратов, окрашенных Н&Е (значения каппа для всех случаев возросли с 0,580 до 0,756; $p < 0,0001$).

Воспроизводимость результатов оценки картины окрашивания при анализе на p16^{INK4a}

Оценивалась надежность оценки аккредитованными патоморфологами картины окрашивания образцов тканей шейки матки при анализе на p16^{INK4a} как диффузно-положительной по p16^{INK4a}, очагово-положительной по p16^{INK4a} или отрицательной по p16^{INK4a}.

Наблюдался высокий уровень воспроизводимости результатов от разных патологов при оценке картины окрашивания для p16^{INK4a} как положительной (картина диффузного окрашивания) или отрицательной (картина очагового окрашивания либо отсутствие иммунореактивности). Коэффициент каппа (скорректированный по шансам показатель согласованности) для воспроизводимости результатов, полученных от двенадцати аккредитованных патологов, при оценке картины окрашивания для p16^{INK4a} как положительной (картина диффузного окрашивания) либо отрицательной (картина очагового окрашивания либо отсутствие иммунореактивности) оказался отличным (средняя каппа = 0,899; медианная каппа = 0,903).

Аналитическая эффективность

Аналитическая чувствительность

Исследование чувствительности проводилось с использованием гистологических наборов CINtec® Histology Kit трех партий. В рамках исследования чувствительности проводился анализ тридцати пяти биоптатов из шейки матки с CIN3+, из которых 6 биоптатов с диагнозом CIN3 и 29 биоптатов с диагнозом плоскоклеточная карцинома.

В пяти из 6 (83,3 %) случаев CIN3 наблюдалось сильное диффузное окрашивание для p16. В одном случае CIN3 в биоптате наблюдалась слабая

экспрессия p16, однако отсутствовал четкий p16-положительный сигнал.

В двадцати двух из 29 (75,9 %) случаев, отнесенных к плоскоклеточной карциноме, наблюдалось сильное диффузное окрашивание для p16. В пяти случаях плоскоклеточной карциномы наблюдалась слабая экспрессия p16, однако отсутствовал четкий p16-положительный сигнал. Только в 2 из 29 (6,9 %) случаев образцы были полностью отрицательными по p16. Это можно объяснить тем, что ранее сообщалось, что в 3–8 % случаев плоскоклеточной карциномы результаты анализа на p16 окрашивание были отрицательными [1; 6]. Этот результат может отражать небольшой процент случаев, в которых дисдифференцировка и хромосомные перестройки приводят к инактивации или делеции локуса гена p16.

Для всех трех партий окрашивание на хорошо исследованной панели срезов тканей крысы с использованием отрицательного контроля реагента привело к сильному и специфическому окрашиванию отдельных нейронов головного мозга крысы. К тому же для некоторых клеток почечных канальцев, отдельных макрофагов в селезенке, а также отдельных макрофагов и клеток плазмы в тонкой кишке наблюдалось слабое окрашивание. Другие ткани из тканевой панели крыс дали полностью отрицательные результаты.

Антитело E6H4™ к p16 способно осуществлять непрерывное окрашивание клеток базального и парабазального слоев с окрашиванием или без окрашивания клеток промежуточного или промежуточного и поверхностного слоев плоского эпителия в биоптатах шейки матки с CIN высокой степени дедифференцировки (CIN2, CIN3). Отрицательный контроль реагента (NRC) способен специфически выявлять нейроны крысы.

Аналитическая специфичность

Специфичность мышиных антител к человеческому p16^{INK4a} клона E6H4™ проверялась методом вестерн-блоттинга (положительный результат для лизата клеток линии HeLa, также см. [1]).

Исследование специфичности проводилось с использованием трех партий гистологических наборов CINtec® Histology Kit на хорошо исследованной панели из 90 фиксированных нейтральным забуференным раствором формалина (NBF) образцов нормальных тканей (30 разных типов тканей) и 54 опухолевых тканей, отличных от тканей шейки матки (объединенных в многотканевые панели — MTA).

На предмет окрашивания с использованием p16-специфичных антител (клона E6H4™) исследовалось 16 разных p16-отрицательных тканей [головного мозга, мозжечка, надпочечника, щитовидной железы, костного мозга, сердца, пищевода, желудка, кишечника, толстой кишки, печени, почки, поперечно-полосатой мышцы, кожи, мезотелия, шейки матки] и 14 разных p16-положительных тканей [слабое окрашивание: гипофиз, легкое, вилочковая железа, предстательная железа; положительная картина: нерв, кишечник, миндалина, поджелудочная железа, селезенка; сильно положительная картина: матка, яичник, молочная железа, яичко, паразитовидная железа]. На предмет окрашивания с использованием p16-специфичных антител (клона E6H4™) на опухолевых тканях, отличных от тканей опухолей шейки матки, исследовалось 22 разных случая p16-отрицательного рака и 32 разных случая p16-положительного рака.

Для всех трех партий гистологического набора CINtec® Histology результаты были отрицательными для всех тканей (нормальных тканей и опухолевых тканей), которые исследовались при использовании отрицательного контроля

реагента. Моноклональные мышинные антитела к окситоцин-ассоциированному нейрофизину крысы не вступают в значительную реакцию с образцами нормальных тканей человека и опухолевых тканей человека.

Воспроизводимость

Воспроизводимость между циклами

Воспроизводимость результатов между циклами для гистологического набора CINtec® Histology Kit определялась с использованием протокола ручного анализа путем окрашивания 36 микропрепаратов, приготовленных из блоков тканей с диагнозом CIN2+. Участки дисплазии на всех срезах окрашивались со сравнимой интенсивностью (+/-0,5 по шкале от 0 до 3) в рамках всех циклов. На нормальных участках всех микропрепаратов специфического окрашивания не наблюдалось.

Воспроизводимость внутри цикла

Воспроизводимость результатов внутри цикла для гистологического набора CINtec® Histology Kit определялась с использованием протокола ручного анализа, а также на приборе для автоматического окрашивания в течение трех дней. Всего в анализ было включено три блока тканей с диагнозом CIN2+. В каждый день исследования в анализ включался один последовательный срез из каждого блока. Участки дисплазии на срезах из одного блока окрашивались со сравнимой интенсивностью (+/-0,5 по шкале от 0 до 3) во все дни, а также при ручном и автоматизированном окрашивании. На нормальных участках всех микропрепаратов специфического окрашивания не наблюдалось.

Воспроизводимость для разных партий

Для определения воспроизводимости результатов для разных партий срезы тканей с диагнозом CIN2+ окрашивались с использованием гистологических наборов CINtec® Histology Kit трех разных партий. Выполнялось ручное и автоматизированное окрашивание в соответствии с протоколом, приведенным в инструкции по применению. Участки дисплазии на срезах из одного блока окрашивались со сравнимой интенсивностью (+/-0,5 по шкале от 0 до 3) реагентами всех трех партий при ручном и автоматизированном окрашивании. На нормальных участках всех микропрепаратов специфического окрашивания не наблюдалось.

Обратите внимание, что метод оценки интенсивности окрашивания по шкале от 0 до 3 использовался исключительно для оценки аналитической эффективности и не должен использоваться в клинической практике для интерпретации результатов окрашивания срезов ткани. Вместо этого для стандартной интерпретации следует использовать качественную интерпретацию окрашенных микропрепаратов, как описано в разделе VIII.

XI. Поиск и устранение неисправностей

В случае необходимости технической помощи контактную информацию см. в разделе XIII.

Неисправность	Возможная причина	Предлагаемое решение
1. Отсутствие окрашивания микропрепаратов.	1a. Отклонение от инструкции по применению.	1a. Внимательно прочтите инструкцию по применению и соблюдайте изложенные в ней процедуры.
2. Слабое окрашивание микропрепаратов.	2a. Недостаточная демаскировка антигена.	2a. Используйте свежеприготовленный раствор для демаскировки антигена и (или) убедитесь, что раствор для демаскировки антигена доводится до температуры 95–99 °С в течение полных 10 минут и остужается в течение дополнительных 20 минут.
	2b. Недостаточное время инкубации реагентов.	2b. Обратитесь к пункту 2.2. /3.2. Из рекомендаций протокола окрашивания.
	2c. Ненадлежащий метод фиксации.	2c. Убедитесь, что ткань пациента не зафиксирована чрезмерно, а также что не использовался альтернативный фиксатор.
	2d. Вода, в которой разводился раствор для демаскировки антигена, содержит слишком высокую концентрацию ионов.	2d. Убедитесь, что ионообменная колонка для получения деионизированной воды проверялась во время планового технического обслуживания.

	<p>2е. Ненадлежащая депарафинизация.</p>	<p>2е. Пользователям следует учитывать тот факт, что различия в температуре оборудования или времени воздействия во время преаналитической подготовки образца могут привести к неполному удалению парафина из микропрепаратов тканей. Присутствие остатков парафина может привести к неполному окрашиванию при использовании любого гистологического красителя, в том числе гистологического красителя CIntec® Histology stain.</p> <p>В гистопатологических лабораториях следует проводить регулярный мониторинг оборудования, чтобы уменьшить вариативность условий процедуры приготовления образцов перед окрашиванием. Наблюдение четко определенных границ на иммунореактивных участках ткани и другие неоднородности окрашивания микропрепарата при использовании любого иммуногистохимического красителя могут быть показателями неоптимальной или неполной преаналитической обработки образца. При выявлении неоднородности окрашивания пользователям следует рассмотреть возможность проверки оборудования и методов преаналитической подготовки образцов.</p>
<p>3. Чрезмерное фоновое окрашивание микропрепаратов.</p>	<p>3а. Неполное удаление парафина.</p>	<p>3а. Используйте свежие ванны с ксилолом и соблюдайте инструкции из раздела 2.1./3.1.</p>

	3b. При помещении срезов на предметные стекла использовались добавки на основе крахмала.	3b. Добавки на основе крахмала, используемые для заливки срезов, могут проявлять иммунореактивность, и поэтому их не следует использовать.
	3c. Недостаточная промывка предметных стекол.	3c. Используйте свежий раствор в ваннах для буфера и флаконах для промывания.
	3d. Высыхание срезов тканей во время процедуры окрашивания.	3d. Используйте камеру влажности. Перед нанесением реагента протирайте только три-четыре микропрепарата за один раз.
	3e. Ненадлежащий метод фиксации.	3e. Используйте только фиксатор, рекомендованный в данной инструкции. В неправильно фиксированной ткани возможно чрезмерное фоновое окрашивание.
	3f. Неспецифическое связывание реагентов с тканью.	3f. Проверьте метод фиксации образца, а также ткань на предмет некроза.
4. Ткань отстает от предметных стекол.	4a. Использование неподходящих предметных стекол.	4a. Следуйте рекомендации в данной инструкции и используйте предметные стекла SuperFrost® Plus.
5. Избыточно сильное специфическое окрашивание.	5a. Ненадлежащий метод фиксации.	5a. Обеспечьте правильный фиксатор и метод фиксации.
	5b. Продолжительное время инкубации реагентов.	5b. Повторно просмотрите и придерживайтесь протокола окрашивания, приведенного в разделах 2.2/3.2 выше.
	5c. Неподходящий промывочный раствор.	5c. Используйте промывочный буфер (10 шт.) (номер по каталогу — 8550).

XII. Символы

Символ:	Пояснения:
	Номер по каталогу
	Код серии
	Глобальный номер предмета торговли
	Уникальный идентификатор устройства
	Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Производитель
	Содержит количество, достаточное для <n> тестов
	См. инструкцию по применению
	Срок годности
	Предел допустимых температур
	Дата изготовления
	Только для одноразового применения
	Обращайтесь в техническую поддержку (телефон)
	Содержит материалы животного происхождения
	Содержимое

XIII. Производитель

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

Контактный номер технической поддержки (телефон): +800 5505 6606

Сводную информацию по безопасности и рабочим характеристикам можно найти здесь:

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

XIV. Статус редакции

Текущая инструкция по применению является версией 2.9, которая выпущена в декабре 2022 года.

Изменения, внесенные в предыдущую версию (2.8, выпущенной в мае 2021 года.):

- На титульный лист добавлен символ «Содержит материалы животного происхождения»

- Раздел IV. Необходимое оборудование: добавлен прибор для автоматического окрашивания (в предыдущей версии также упоминаемый в разделе VI. 2. Процедура окрашивания с использованием приборов для автоматического окрашивания)
- Раздел VI. Образцы тканей, залитых в парафин: добавлено уточнение, что окрашивание срезов тканей следует выполнять немедленно.
- Раздел VI. Процедура окрашивания с использованием приборов для автоматического окрашивания: уточнено, что производителем валидированы только приборы LabVision Autostainer и Dako Autostainer PLUS, но аналогичные приборы могут быть валидированы пользователем
- Объяснены дополнительные символы (раздел XII)
- Редакторские изменения

XV. Интеллектуальная собственность

CINtec является торговой маркой Roche.

Все остальные товарные знаки являются собственностью их соответствующих владельцев.

© 2022 Roche

Приложение 1

Источники

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

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

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

Приложение 2

Пример картины диффузного окрашивания

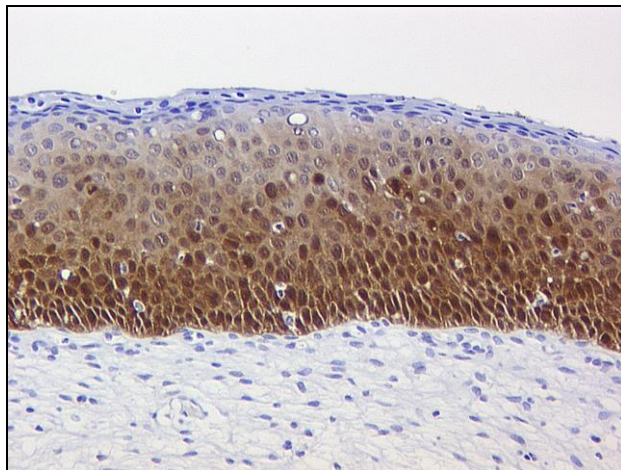


Рис. 1. CIN 3

Пример картины очагового окрашивания

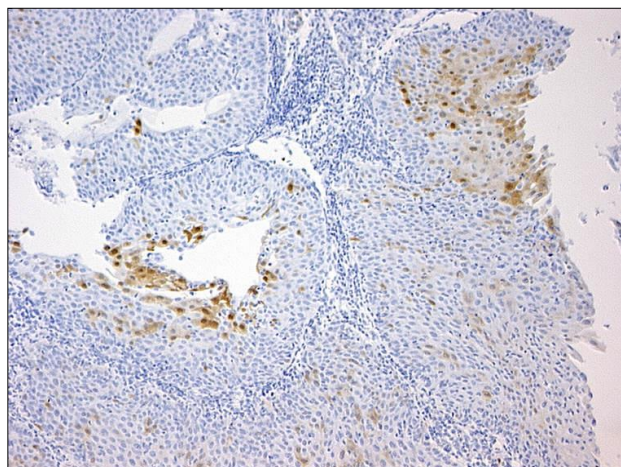


Рис. 2. Плоскоклеточная метаплазия, зрелая