Instrucciones de uso

CINtec® Histology Kit

El CINtec® Histology Kit es un ensayo inmunohistoquímico para determinar cualitativamente el antígeno p16^{INK4a} en cortes de tejidos procedentes de biopsias de cuello uterino fijadas con formol e incluidas en parafina. Está indicado para ser utilizado, conjuntamente con portaobjetos teñidos con hematoxilina-eosina preparados a partir de la misma muestra de tejido cervical, como una ayuda para incrementar la exactitud diagnóstica y la concordancia interobservador en el diagnóstico de neoplasias intraepiteliales cervicales de alto grado.

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim
Germany

https://navifyportal.roche.com

REF **10213370001**

GTIN **07613336230350**

Σ **50**

2 – 8 °C

CE 0123

IVD

Índice

ESPAÑOL 2
I. Nombre del producto 2
II. Uso previsto 2
III. Resumen y explicación del dispositivo 2
Resumen y explicación 2
Significado clínico 3
Principios del procedimiento 4
IV. Reactivos 4
Material suministrado 4
Almacenamiento 7
Materiales y reactivos necesarios pero no suministrados 7
Equipo necesario 8
V. Advertencias y precauciones 8
Advertencia 8
Precauciones 9
VI. Procedimiento 9
Preparación de las muestras 9
Muestras de tejido incluido en parafina 10
Tratamiento de recuperación por calor del epítopo 10
Procedimiento de tinción 10
1. Preparación de los reactivos 10
1.1 Solución de recuperación del epítopo 10
1.2 Tampón de lavado 11
1.3 Solución sustrato-cromógeno (DAB) 11
1.4 Contratinción 11
1.5 Medios de montaje 11
2. Procedimiento de tinción para Autostainer Instruments 11
2.1 Eliminación de la parafina y rehidratación 12
2.2 Protocolo de tinción para Autostainer Instruments 13
3. Procedimiento de tinción manual 15
3.1 Eliminación de la parafina y rehidratación 15
3.2 Protocolo del procedimiento de tinción manual 15
VII. Control de calidad 18
VIII. Interpretación de los resultados 18
IX. Limitaciones 19
X. Características de rendimiento 20
XI. Solución de problemas 26
XII. Símbolos 29
XIII. Fabricante 29
XIV. Estado de la revisión 29
XV. Propiedad intelectual 30
Anexo 1 Referencias 31
Anexo 2 34

ESPAÑOL

I. Nombre del producto

CINtec® Histology Kit

II. Uso previsto

Para uso en diagnóstico in vitro.

El CINtec® Histology Kit es un ensayo inmunohistoquímico para determinar cualitativamente el antígeno $p16^{INK4a}$ en cortes de tejidos procedentes de biopsias de cuello uterino fijadas con formol e incluidas en parafina.

Está indicado para ser utilizado, conjuntamente con portaobjetos teñidos con hematoxilina-eosina preparados a partir de la misma muestra de tejido cervical, como una ayuda para incrementar la exactitud diagnóstica y la concordancia interobservador en el diagnóstico de neoplasias intraepiteliales cervicales de alto grado.

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

Solo un patólogo con formación debe interpretar este ensayo junto con el examen histológico, la información clínica importante y los controles adecuados.

III. Resumen y explicación del dispositivo

Resumen y explicación

El CINtec® Histology Kit se basa en el uso de un anticuerpo primario de ratón monoclonal (clon E6H4®) frente a la proteína humana $p16^{INK4a}$.

La proteína $p16^{INK4a}$ es un inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina que tiene una función crucial en la regulación del ciclo celular eucariótico. En ésta interviene la proteína RB (pRB) de la transición de las fases G1-S y provoca la detención del ciclo celular durante el proceso de diferenciación. En células epiteliales terminales diferenciadas, la expresión de la proteína $p16^{INK4a}$ se realiza a niveles que normalmente no se pueden detectar mediante la inmunohistoquímica.

Se ha descubierto que el gen de la $p16^{INK4a}$ está inactivado funcionalmente en muchos tumores, ya sea por una mutación genética o por la hipermetilación del activador. Se ha observado que la inactivación del gen oncosupresor de la proteína $p16^{INK4a}$ contribuye a la desregulación del ciclo celular y a la pérdida de control de la proliferación celular.

No obstante, se ha observado una alta sobreregulación de la expresión de la $p16^{INK4a}$ en las células epiteliales cervicales competentes para la replicación, lugar donde las oncoproteínas del papilomavirus humano de alto riesgo (HR-HPV) comienzan su proceso de transformación celular [1; 2]. La elevada sobreexpresión de la $p16^{INK4a}$ está estrechamente ligada, a nivel molecular, a la actividad de las oncoproteínas E7 del papilomavirus humano de alto riesgo. Se ha observado que

dicha sobreexpresión de la p16^{INK4a} refleja la inactivación mediada por la oncoproteína E7 del complejo funcional entre la proteína RB (pRB) y el factor de trascripción E2F, lo que constituye uno de los elementos clave durante la transformación celular inducida por el papilomavirus humano de alto riesgo [3].

Se han publicado diversos estudios que afirman que se ha observado una sobreexpresión inmunohistoquímica de la proteína p16^{INK4a} en un gran número de casos de displasia cervical precancerosa de alto grado (por ejemplo, 80 – 100% de las lesiones CIN2 y prácticamente todas las lesiones CIN3) y de cánceres invasivos. Se ha demostrado que las lesiones intraepiteliales de bajo grado (CIN1) muestran índices variables de sobreexpresión de la p16^{INK4a}, normalmente entre un 30 – 60% [1; 2; 4-16]

Para la interpretación de los resultados se debe tener en cuenta que la p16^{INK4a} es una proteína celular que se puede expresar en niveles detectables tanto en lesiones displásicas de alto grado del cuello uterino y en cánceres cervicales como en casos no asociados con displasia cervical, aunque a distintos niveles y con diferentes patrones de expresión. Las preparaciones histológicas de tejido mantienen la morfología del tejido intacta, lo que contribuye a la interpretación de la positividad de la proteína p16^{INK4a} de la lesión del cuello uterino. Se ha sugerido que los patrones de tinción difusa (a saber, tinciones continuas de las células de las capas basales y parabasales, con o sin tinción de las células de las capas celulares superficiales) deben considerarse resultados positivos para la sobreexpresión de la p16^{INK4a}. Se ha observado que este patrón de tinción proporciona el nivel más alto de sensibilidad y especificidad para el CIN de alto grado [1; 4; 5]. En cambio, los patrones de tinción focales (tinción de células aisladas o de pequeños grupos de células; es decir, tinción no continua, que no afecta a las células basales y parabasales), así como la falta de inmunoreactividad, se consideran resultados negativos en las pruebas de sobreexpresión de la p16^{INK4a} [1; 4; 5].

La interpretación de los portaobjetos con tinción para la p16^{INK4a} mediante el uso del CINtec® Histology Kit debe realizarse en conjunción con portaobjetos con tinción de hematoxilina-eosina preparados con la misma muestra de tejido de cuello uterino. Para llegar a un diagnóstico definitivo se deben combinar los datos adicionales aportados por los portaobjetos de tinción del CINtec® con el diagnóstico preliminar basado en la morfología a partir de los portaobjetos con tinción de hematoxilina-eosina.

Significado clínico

Se ha demostrado que la lectura conjunta de los portaobjetos con tinción de hematoxilina-eosina de los cortes de biopsias del cuello uterino con los portaobjetos consecutivos de la misma muestra del tejido y la inmunotinción de la p16^{INK4a} mejora la precisión diagnóstica y la concordancia entre observadores de la neoplasia intraepitelial del cuello uterino de alto grado (CIN2+).

El diagnóstico patológico realizado a partir de los cortes del tejido del cuello uterino con tinción de hematoxilina-eosina constituye la base de la decisión de proseguir con un tratamiento. Por lo tanto, las consecuencias de un diagnóstico poco preciso son importantes, ya que podría conducir al tratamiento inapropiado del paciente, es decir, un tratamiento excesivo en el caso de mujeres sanas o un tratamiento insuficiente en el caso de mujeres con lesiones displásicas de alto grado.

La interpretación diagnóstica a partir de cortes histológicos de tejidos cervicales teñidos con hematoxilina-eosina está sujeta a un alto grado de discordancia entre

patólogos. En diversas publicaciones [17-20] se ha constatado el bajo índice de concordancia entre observadores y de concordancia intraobservador en histología del cuello uterino.

Un ambicioso estudio que se llevó a cabo en diversos centros de los Estados Unidos para valorar la interpretación de los estudios realizados por diversos patólogos especialistas sobre muestras histológicas del cuello uterino (2.237 biopsias dirigidas por colposcopia y 535 muestras de biopsias por conización mediante procedimiento de escisión electroquirúrgica) demostró que la concordancia de las interpretaciones histopatológicas era sólo moderada (kappa=0,46 para las biopsias en sacabocados y kappa=0,49 para las muestras de biopsias realizadas mediante procedimiento de escisión electroquirúrgica) [17]. Usando el sistema de clasificación de la OMS y de Bethesda modificado, se ha demostrado que la concordancia entre observadores de seis histopatólogos al valorar 125 muestras de biopsias dirigidas por colposcopia es baja para ambos sistemas de clasificación [18]. Asimismo, en un estudio realizado en el Reino Unido se demostró una baja concordancia entre observadores de ocho expertos histopatólogos tras examinar 100 muestras de biopsias dirigidas por colposcopia (valor kappa no ponderado de 0,358) [19].

Al añadir portaobjetos con tinción del CINtec® Histology Kit a los portaobjetos convencionales con tinción de hematoxilina-eosina utilizados para establecer diagnósticos, se mejora la precisión general de este procedimiento de diagnóstico histomorfológico [21-39].

Principios del procedimiento

CINtec® Histology Kit contiene un grupo de reactivos para la detección inmunohistoquímica del antígeno $p16^{INK4a}$. Este kit está diseñado para realizar el procedimiento de tinción inmunohistoquímico que consta de dos pasos con muestras de tejido fijado con formol e incluido en parafina procedentes de biopsias de cuello uterino. Para la detección del antígeno se emplea un anticuerpo primario de ratón monoclonal, clon E6H4®, frente a la proteína humana $p16^{INK4a}$.

Se utiliza un reactivo de visualización listo para su uso compuesto de un reactivo de polímeros conjugado con peroxidasa de rábano picante y fragmentos de anticuerpos Fab' de cabra anti-ratón. Mediante la absorción de la fase sólida, se ha eliminado la reacción cruzada del reactivo de visualización con las inmunoglobulinas humanas. La reacción del cromógeno se basa en la conversión en la que interviene la peroxidasa de rábano picante de un cromógeno DAB que forma un producto de reacción visible en el lugar del antígeno. Después de la contratinción, se puede cubrir la muestra y proceder a la evaluación de los resultados mediante microscopio.

IV. Reactivos

Material suministrado

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

1 Peroxidase-Blocking Reagent

Reactivo de bloqueo de la peroxidasa
2 x 11,5 mL, listo para su uso
Peróxido de hidrógeno al 3% que contiene 15 mmol/L de azida de sodio (NaN_3).
EUH210 Puede solicitarse la ficha de datos de seguridad.

2 Mouse anti-Human p16^{INK4a} Antibody

Anticuerpo de ratón antihumano p16^{INK4a}
11,5 mL, listo para su uso
Anticuerpo monoclonal de ratón antihumano p16^{INK4a} (~1 µg/mL), clon E6H4™, suministrado en 50 mmol/L de tampón Tris, pH 7,2, que contiene 15 mmol/L de azida de sodio (NaN_3) y proteína estabilizante.

3 Visualization Reagent

Reactivo de visualización
2 x 11,5 mL, listo para su uso

Atención

H317 Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

P261 Evitar respirar el polvo/ el humo/ el gas/ la niebla/ los vapores/el aerosol.
P272 Las prendas de trabajo contaminadas no podrán sacarse del lugar de trabajo.
P280 Llevar guantes de protección.
P333 + P313 En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.
P362 + P364 Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.
P501 Eliminar el contenido/el recipiente en una planta de eliminación de residuos autorizada.

Componentes del peligro:
26172-54-3 2-metil-2H-isotiazol-3-ona, clorhidrato
55965-84-9 Masa de reacción de: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona [n.o CE 247-500-7] y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona [n.o CE 220-239-6] (3:1)

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

4 Negative Reagent Control

Reactivo de control negativo
11,5 mL, listo para su uso

Anticuerpo monoclonal de la neurofisina relacionado con la oxitocina anti-rata de ratón (~1 µg/mL), suministrado en 50 mmol/L de tampón Tris, pH 7,2, que contiene 15 mmol/L de azida de sodio (NaN_3) y proteína estabilizante. Para la verificación de la especificidad de la tinción. La neurofisina relacionada con la

oxitocina de la rata no se encuentra en tejidos humanos.

5 DAB Buffered Substrate

Sustrato tamponado DAB
31 mL

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

6 DAB Chromogen

Cromógeno DAB
0,85 mL, solución de cromógeno 3,3'-diaminobencidina.

Peligro

H314 Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves.
H341 Se sospecha que provoca defectos genéticos.
H350 Puede provocar cáncer.

P201 Solicitar instrucciones especiales antes del uso.
P280 Llevar guantes/ prendas/ gafas/ máscara de protección.
P303 + P361 + P353 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitar inmediatamente toda la ropa contaminada. Enjuagar la piel con agua.
P304 + P340 + P310 EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la persona al aire libre y mantenerla en una posición que le facilite la respiración. Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico.
P305 + P351 + P338 + P310 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado. Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLO-GÍA/médico.
P308 + P313 EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico.

Componentes del peligro:
868272-85-9 3,3′-Diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate

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

7 Epitope Retrieval Solution 10X

Solución de recuperación del epítopo 10X

500 mL, 100 mmol/L de tampón Tris pH 9 que contiene 10 mmol/L de EDTA y 15 mmol/L de azida de sodio (NaN3).

Almacenamiento

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

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

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

Materiales y reactivos necesarios pero no suministrados

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

500 mmol/L Tris Solución de tampón con 1,5 mol/L NaCl, pH 7.6, que contiene detergentes y un agente antimicrobiano.

Atención

H317 Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

P261 Evitar respirar el polvo/ el humo/ el gas/ la niebla/ los vapores/ el aerosol.
P272 Las prendas de trabajo contaminadas no podrán sacarse del lugar de trabajo.
P280 Llevar guantes de protección.
P333 + P313 En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.
P362 + P364 Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.
P501 Eliminar el contenido/ el recipiente en una planta de eliminación de residuos autorizada.

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

Paños absorbentes;

Contratinción con hematoxilina;

Agua destilada o desionizada (agua de lavado);

Etanol, 95% y 70%;

Medio de montaje;

Tejidos positivos y negativos para su uso como controles del procedimiento;

Portaobjetos (SuperFrost® Plus o equivalente);

Xilol;

Cubreobjetos.

Equipo necesario

Opcional: horno de secado, capaz de mantener una temperatura de 60 °C o inferior;

Opcional: instrumento Dako o LabVision Autostainer;

Cámara húmeda (opcional);

Microscopio (aumento de 4 – 40x);

Baños o recipientes de tinción;

Frascos de lavado;

Cronómetro (capaz de medir intervalos de 2 – 60 minutos);

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

V. Advertencias y precauciones

⚠ Advertencia

1. ¡Atención! Algunos de los reactivos de este kit contienen compuestos químicos peligrosos. Los componentes incluidos en este kit deben manipularse de acuerdo con las precauciones de seguridad para reactivos peligrosos de laboratorio.
2. Los componentes 1, 2, 4, y 7 de este producto contienen azida de sodio (NaN_3), un compuesto químico altamente tóxico en su forma pura. Aunque a las concentraciones presentes en el producto no está clasificada como peligrosa, la azida de sodio puede reaccionar con cañerías de plomo y cobre formando acumulaciones de azidas metálicas altamente explosivas. Una vez desechado el producto, deje correr una cantidad abundante de agua para evitar acumulaciones de azidas metálicas en las cañerías.
3. Los componentes 2, 3 y 4 contienen materiales de origen animal. Al igual que con cualquier producto de origen biológico, deberán aplicarse los procedimientos de manipulación adecuados.
4. Para este kit se encuentra disponible una ficha de datos de seguridad bajo petición.
5. Las muestras histológicas, antes y después de la fijación, así como todos los materiales expuestos a ellas, deben manipularse como si fuesen potencialmente infecciosas y deben eliminarse de acuerdo con las precauciones adecuadas.
6. No pipetee nunca los reactivos con la boca y evite el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y las membranas mucosas. En caso de que los reactivos o las muestras entren en contacto con la piel o con las membranas mucosas, deben lavarse con agua abundante.
7. El reactivo de visualización y el cromógeno DAB pueden resultar afectados negativamente si se exponen a luz intensa. No almacene los componentes del kit ni realice el procedimiento de tinción con luz intensa, como la luz solar directa.
8. Cuando manipule los componentes incluidos en el CINtec® Histology Kit o

aquellos componentes que se utilicen conjuntamente, utilice un equipo de protección personal adecuado para evitar el contacto con los ojos y la piel. Le rogamos que consulte la ficha de datos de seguridad (SDS) para obtener una información más detallada.

9. El etiquetado de seguridad del producto sigue principalmente las directrices de la UE sobre el SMA.

⚠ Precauciones

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

VI. Procedimiento

Preparación de las muestras

CINtec® Histology Kit está diseñado para utilizarse con muestras de tejido conservado para el procedimiento inmunohistoquímico. Las muestras deberán preparase de acuerdo con los métodos habituales de procesamiento de tejidos.

Para obtener un rendimiento óptimo, se recomienda utilizar portaobjetos con carga positiva permanente, como SuperFrost® Plus.

Muestras de tejido incluido en parafina

Las muestras apropiadas para este kit son las de tejido fijado con formol tamponado neutro en incluido en parafina que se hayan procesado según los métodos rutinarios estándar. Si las muestras se preparan mediante un método diferente de conservación, el usuario deberá comprobar su idoneidad.

Las muestras procedentes de biopsias deben fijarse durante 18 – 24 horas en formol tamponado neutro (porcentaje recomendado: 10%) y cortarse en bloques de un grosor de 3 ó 4 mm. A continuación, se deshidratan los bloques de tejido en distintas diluciones de alcohol y xilol y, después, se lleva a cabo una infiltración con parafina fundida a una temperatura no superior a 60 °C. En el laboratorio de histopatología, se seccionan en 4 – 5 µm y se montan en el portaobjetos SuperFrost® Plus cada uno de los bloques de tejido. Los portaobjetos deben teñirse de inmediato, ya que la antigenicidad de las secciones de tejido puede disminuir con el tiempo.

Tratamiento de recuperación por calor del epítopo

El método de recuperación por calor del epítopo supone el calentamiento de los cortes de tejidos montados en portaobjetos sumergidos en la solución de recuperación del epítopo en un baño maría calibrado capaz de mantener la solución de recuperación del epítopo a una temperatura de 95 – 99 ºC. Los laboratorios situados a alturas elevadas deberían determinar el método adecuado para mantener la temperatura apropiada del baño maría. El fabricante no recomienda alterar el procedimiento indicado.

Después de la recuperación por calor del epítopo, se deben dejar enfriar los cortes de tejido durante 20 minutos antes de proseguir. A continuación, se debe realizar inmediatamente la tinción de los cortes de tejido.

Procedimiento de tinción

1. Preparación de los reactivos

Antes de su uso en inmunotinción, los reactivos deben estar a temperatura ambiente (20 – 25 °C). Por lo tanto, los siguientes pasos se deben realizar a temperatura ambiente.

Procure evitar el secado de las muestras durante el procedimiento de inmunotinción, ya que en tal caso se pueden producir artefactos de tinción.

Antes de realizar la tinción, se deben preparar los siguientes reactivos:

1.1 Solución de recuperación del epítopo

Prepare la cantidad suficiente de solución de recuperación del epítopo para el procedimiento de tinción previsto mediante la dilución 1:10 de una cantidad del Vial 7 (solución de recuperación del epítopo 10X) con agua destilada o desionizada.

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

NOTA: El uso de agua con un nivel elevado de iones para la disolución de la solución de recuperación del epítopo puede reducir significativamente el procedimiento de tinción de la prueba. Por favor, cerciórese de que el agua

empleada esté debidamente desionizada (es decir, asegúrese de que la columna de intercambio iónico que emplea para la elaboración de agua desionizada haya sido controlada durante el proceso de mantenimiento habitual). ¡No use agua corriente!

1.2 Tampón de lavado

Utilice el tampón de lavado (10X), referencia 10215364001, suministrado por Roche mtm laboratories AG conjuntamente con el CINtec® Histology Kit. Para pedidos por favor visite la web www.roche.com.

Prepare una cantidad suficiente de tampón de lavado para los pasos de lavado del procedimiento de tinción previsto mediante la dilución 1:10 de una cantidad de tampón de lavado (10X), referencia 10215364001, con agua destilada o desionizada.

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

1.3 Solución sustrato-cromógeno (DAB)

Para la preparación de la solución sustrato-cromógeno, se debe añadir una gota de cromógeno DAB a 2 mL de sustrato tamponado DAB. Lleve a cabo los procedimientos siguientes:

i) transfiera 2 mL de sustrato tamponado DAB del Vial 5 al tubo de ensayo;

ii) añada una gota (25 – 30 µL) de cromógeno DAB del Vial 6. Mézclelo y aplíquelo a los cortes de tejido con una pipeta.

2mL de solución sustrato-cromógeno (DAB), preparada de acuerdo con las instrucciones anteriores, es normalmente suficiente para la tinción de cinco cortes de tejido, incluidas las cinco muestras de control correspondientes.

NOTA: utilice la solución de sustrato-cromógeno (DAB) preparada el mismo día.

NOTA: si se añade una cantidad excesiva de cromógeno DAB al sustrato tamponado DAB, se producirá un deterioro de la señal positiva.

1.4 Contratinción

El producto final coloreado de la reacción de tinción de DAB es insoluble en agua. Para la contratinción, puede utilizarse alcohol o hematoxilina basada en agua. En tal caso, realice la contratinción de acuerdo con las instrucciones para la hematoxilina suministradas por el proveedor.

1.5 Medios de montaje

Se recomienda utilizar un medio no acuoso permanente para el montaje de las muestras en los portaobjetos después de la tinción. No obstante, también se puede usar un medio de montaje acuoso.

Se recomienda utilizar Eukitt Mounting Medium para el montaje no acuoso. Se recomienda utilizar Aquatex Merck para el montaje acuoso.

2. Procedimiento de tinción para Autostainer Instruments

Se ha adaptado el CINtec® Histology Kit para su uso con los Autostainer

Instruments (Lab Vision Autostainer 480 o Dako Autostainer Plus) de acuerdo con la plantilla abajo descrita. Es possible utilizar otros instrumentos o sistemas con funciones equivalentes una vez que el usuario los haya validado como corresponda. Antes de la tinción con los Autostainer Instrument, deberán prepararse las muestras y los reactivos de la forma descrita en las secciones1.1 – 1.5 y 2.1

2.1 Eliminación de la parafina y rehidratación

Antes de la eliminación de la parafina, coloque los portaobjetos en un horno de secado durante un período de 20 minutos como mínimo y de una hora como máximo, tanto para eliminar cuantitativamente el agua y aumentar así la adherencia del tejido al cristal del portaobjetos ("horneado"), como para fundir la parafina a una temperatura inferior a 60 ºC. Antes de llevar a cabo el procedimiento de tinción, los portaobjetos de tejido deben desparafinarse para eliminar el medio de inclusión y volverse a hidratar. Es importante evitar que queden restos de parafina, debido a que los residuos del medio de inclusión producirán un aumento de la tinción inespecífica. Incube los portaobjetos a temperatura ambiente (20 – 25 ºC) según los pasos que se describen a continuación.

- 5 (±1) minutos en un baño de xilol;
- repita una vez este proceso en un baño fresco;
- elimine el exceso de líquido;
- 3 (±1) minutos en etanol al 95%;
- repita una vez este proceso en un baño fresco;
- elimine el exceso de líquido;
- 3 (±1) minutos en etanol al 70%;
- repita una vez este proceso en un baño fresco;
- elimine el exceso de líquido;
- mínimo de 30 segundos en agua destilada o desionizada.

Comience el procedimiento de tinción como se indicó en la sección 2.2, Paso 1: Recuperación del epítopo.

Las soluciones de xilol y alcohol deberán cambiarse cada 40 portaobjetos.

NOTA: Los usuarios deberán tener en cuenta que las variaciones en la temperatura del equipo o en los tiempos de exposición, durante la preparación preanalítica de las muestras, pueden producir una eliminación incompleta de la parafina de los portaobjetos de tejido. La parafina residual puede dar lugar a una tinción incompleta con cualquier tinción histológica, incuyendo la tinción con CINtec® Histology. Los laboratorios de patología deberían seguir una monitorización regular del equipo para reducir las variaciones en la preparación de las pruebas antes de la tinción. La presencia de líneas muy marcadas dentro de un área de tejido inmunorreactivo u otras inconsistencias en la tinción de un portaobjetos, con cualquier tinción inmunohistológica, deberán entenderse en cualquier caso como un indicador de una preparación preanalítica inadecuada o incompleta de las muestras. Los usuarios deberán considerar la posibilidad de controlar el equipo y los métodos de preparación preanalítica de las pruebas, si observan inconsistencias en la tinción.

2.2 Protocolo de tinción para Autostainer Instruments

Paso 1: Recuperación del epítopo

- Llene los recipientes de tinción, *p. ej.*, recipientes de plástico Coplin, con la solución de recuperación del epítopo diluida (véase Procedimiento, sección 1.1);
- coloque los recipientes de tinción con la solución de recuperación del epítopo en un baño maría. Caliente el baño maría y la solución de recuperación del epítopo a 95 – 99 °C. Es importante ajustar el nivel de agua en el baño maría para asegurar que los recipientes estén sumergidos en el agua a un nivel del 80%. Tape los recipientes para estabilizar la temperatura y evitar la evaporación;
- sumerja los cortes desparafinados en la solución de recuperación del epítopo precalentada de los recipientes de tinción; este paso normalmente bajará la temperatura en los recipientes por debajo de 90 ºC;
- lleve la temperatura del baño maría **y** la solución de recuperación del epítopo en los recipientes hasta 95 – 99 ºC; compruebe la temperatura de la solución de recuperación del epítopo en los recipientes;
- incube durante 10 (±1) minutos a 95 – 99 °C; empiece la cuenta atrás sólo después de verificar que la temperatura de la solución de recuperación del epítopo en los recipientes ha alcanzado la temperatura de 95 – 99 ºC;
- retire el recipiente con los portaobjetos del baño maría;
- deje que los portaobjetos se enfríen en la solución de recuperación del epítopo durante 20 (±1) minutos a temperatura ambiente;
- trasvase la solución de recuperación del epítopo y enjuague los cortes en el tampón de lavado (véase Procedimiento, sección 1.2);
- para un rendimiento óptimo, sumerja los cortes en tampón de lavado durante 5 minutos después de la recuperación del epítopo y antes de la tinción.

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

Paso 2: Programación del instrumento

Antes de la primera aplicación del CINtec® Histology Kit en el Autostainer Instrument, debe crearse una nueva plantilla. Consulte el Manual del usuario del Autostainer Instrument correspondiente.

Paso 3: Procedimiento del Autostainer

- Transfiera los reactivos de los frascos del kit en los Autostainer Reagent Vials graduados. Utilice el mapa generado por el Autostainer para los tiempos de programación y los volúmenes de reactivo (véase en el punto 4 los tiempos y los volúmenes específicos);
- coloque los Autostainer Reagent Vials en el rack de reactivos del Autostainer de acuerdo con el Reagent Layout Map generado por ordenador;
- cargue los portaobjetos en el Autostainer de acuerdo con el Slide Layout Map generado por ordenador;

- para evitar que se sequen, debe rociar las muestras con tampón de lavado después de cargarlas en el Autostainer;
- A continuación, se describe el funcionamiento del programa:
    - enjuague*;
    - 200 µL de reactivo de bloqueo de la peroxidasa: 5 minutos;
    - enjuague*;
    - 200 µL de proteína $p16^{INK4a}$ de anticuerpo primario o reactivo de control negativo: 30 minutos;
    - enjuague*;
    - 200 µL de reactivo de visualización: 30 minutos;
    - enjuague*;
    - enjuague*;
    - enjuague*;
    - cambio;
    - 200 µL de solución sustrato-cromógeno (DAB): 10 minutos;
    - enjuague*;
    - enjuague los portaobjetos en agua desionizada después del paso con el sustrato de cromógeno.

  *utilice el tampón de lavado para los pasos de enjuague correspondientes.

NOTA: si el Autostainer Instrument utilizado enjuaga los portaobjetos con tampón, los portaobjetos deben enjaguarse con agua desionizada después de retirarlos del Autostainer.

Paso 4: Contratinción (instrucciones para la hemaxotilina)

- Sumerja los portaobjetos en un baño de hematoxilina. Incúbelos durante 2 – 5 minutos dependiendo de la potencia de la hematoxilina empleada;
- Coloque los portaobjetos en un baño de agua y enjuáguelos en un baño de agua corriente. Asegúrese de que se han eliminado todos los restos de hematoxilina;
- Enjuague suavemente los portaobjetos en un baño de agua destilada o desionizada durante un período de tiempo reducido;
- Puede realizar la contratinción directamente sobre el Autostainer Instrument.

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

Paso 5: Montaje

Se recomienda utilizar un medio de montaje no acuoso permanente. No obstante, también puede utilizarse un medio de montaje acuoso. Siga las instrucciones de uso del proveedor del medio de montaje.

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

3. Procedimiento de tinción manual

NOTA: evite que los cortes de tejido se sequen durante el procedimiento de tinción. Los cortes de tejido seco pueden causar un aumento de la tinción inespecífica. Si se utilizan tiempos de incubación prolongados, mantenga los tejidos en un entorno húmedo.

Al emplear el CINtec® Histology Kit para tinción manual, siga los procedimientos estándar utilizados en el manual de tinción inmunohistoquímica.

3.1 Eliminación de la parafina y rehidratación

Antes de la eliminación de la parafina, coloque los portaobjetos en un horno de secado a una temperatura inferior a 60ºC durante un período de 20 minutos como mínimo y de una hora como máximo, tanto para eliminar cuantitativamente el agua y aumentar así la adherencia del tejido al cristal del portaobjetos ("horneado"), como para fundir la parafina.

Antes de llevar a cabo el procedimiento de tinción, los portaobjetos de tejido deben desparafinarse para eliminar el medio de inclusión y volverse a hidratar. Es importante evitar que queden restos de parafina, debido a que los residuos del medio de inclusión producirán un aumento de la tinción inespecífica. Incube los portaobjetos a temperatura ambiente (20 – 25°C), según los pasos que se describen a continuación.

- 5 (±1) minutos en un baño de xilol;
- repita una vez este proceso en un baño fresco;
- elimine el exceso de líquido;
- 3 (±1) minutos en etanol al 95%;
- repita una vez este proceso en un baño fresco;
- elimine el exceso de líquido;
- 3 (±1) minutos en etanol al 70%;
- repita una vez este proceso en un baño fresco;
- elimine el exceso de líquido;
- mínimo de 30 segundos en agua destilada o desionizada.

Comience el procedimiento de tinción como se indicó en la sección 3.2, Paso 1: Recuperación del epítopo.

Las soluciones de xilol y alcohol deberán cambiarse cada 40 portaobjetos.

3.2 Protocolo del procedimiento de tinción manual

Paso 1: Recuperación del epítopo

- Llene los recipientes de tinción, *p. ej.*, recipientes de plástico Coplin, con la solución de recuperación del epítopo diluida (véase Procedimiento, sección 1.1);
- coloque los recipientes de tinción con la solución de recuperación del epítopo en un baño maría. Caliente el baño maría y la solución de

recuperación del epítopo a 95 – 99 °C. En ese paso es importante ajustar el nivel de agua en el baño maría para asegurar que los recipientes estén sumergidos en el agua a un nivel del 80%. Tape los recipientes para estabilizar la temperatura y evitar la evaporación;

- sumerja los cortes desparafinados en la solución de recuperación del epítopo precalentada de los recipientes de tinción; este paso normalmente bajará la temperatura en los recipientes por debajo de 90 ºC;
- lleve la temperatura del baño maría **y** la solución de recuperación del epítopo en los recipientes hasta 95 – 99 °C; compruebe la temperatura de la solución de recuperación del epítopo en los recipientes;
- incube durante 10 (±1) minutos a 95 – 99 °C; empiece la cuenta atrás sólo después de verificar que la temperatura de la solución de recuperación del epítopo en los recipientes ha alcanzado la temperatura de 95 – 99 ºC;
- retire el recipiente con los portaobjetos del baño maría;
- deje que los portaobjetos se enfríen en la solución de recuperación del epítopo durante 20 (±1) minutos a temperatura ambiente;
- trasvase la solución de recuperación del epítopo y enjuague los cortes en el tampón de lavado diluido (véase Procedimiento, sección 1.2);
- para un rendimiento óptimo, sumerja los cortes en tampón de lavado durante 5 (±1) minutos después de la recuperación del epítopo y antes de la tinción.

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

Paso 2: Reactivo de bloqueo de la peroxidasa

- Aplique 200 µL de reactivo de bloqueo de la peroxidasa para cubrir la muestra;
- incúbela durante 5 (±1) minutos;
- elimine el exceso de líquido y coloque los portaobjetos en una baño de tampón fresco durante 5 (±1) minutos.

Paso 3: Anticuerpo primario o reactivo de control negativo

- Elimine el exceso de tampón;
- cubra la muestra con 200 µL de anticuerpo primario (proteína $p16^{INK4a}$ de ratón antihumana o reactivo de control negativo);
- incúbela durante 30 (±1) minutos;
- elimine el exceso de líquido y coloque los portaobjetos en una baño de tampón fresco durante 5 (±1) minutos.

Paso 4: Reactivo de visualización

- Elimine el exceso de tampón;
- cubra la muestra con 200 µL de reactivo de visualización;

- incúbela durante 30 (±1) minutos;
- elimine el exceso de líquido y coloque los portaobjetos en una baño de tampón fresco durante 5 (±1) minutos;
- repita dos veces este proceso en un baño de tampón de lavado fresco.

Paso 5: Solución sustrato-cromógeno (DAB)

- Cubra la muestra con 200 µL de solución de sustrato-cromógeno (DAB) que se ha preparado de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección 1.3;
- incúbela durante 10 (±1) minutos;
- elimine el exceso de líquido y enjuague suavemente con agua destilada o desionizada.

Recoja los residuos de la solución sustrato-cromógeno (DAB) en un recipiente para desechos peligrosos para eliminarlos de forma adecuada.

Paso 6: Contratinción (instrucciones para la hemaxotilina)

- Sumerja los portaobjetos en un baño de hematoxilina. Incúbelos durante 2 – 5 minutos dependiendo de la potencia de la hematoxilina empleada;
- Coloque los portaobjetos en un baño de agua y enjuáguelos en un baño de agua corriente. Asegúrese de que se han eliminado todos los restos de hematoxilina;
- Enjuague suavemente los portaobjetos en un baño de agua destilada o desionizada durante un período de tiempo reducido.

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

Paso 7: Montaje

Se recomienda utilizar un medio de montaje no acuoso permanente. Para usar un medio de montaje permanente basado en xileno es necesario realizar un proceso de deshidratación, p. ej.

- Agua destilada o desionizada
- 3 minutos en etanol al 70%
- 3 minutos en etanol al 70%
- 3 minutos en etanol al 96%
- 3 minutos en etanol al 99%
- 5 minutos en xileno
- 5 minutos en xileno

No obstante, también puede utilizarse un medio de montaje acuoso. Siga las instrucciones de uso del proveedor del medio de montaje.

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

VII. Control de calidad

Las desviaciones en los procedimientos recomendados para la fijación y el procesamiento de las muestras en el laboratorio pueden causar variaciones notables en los resultados, por lo que es necesario que se realicen con regularidad controles internos.

Control de tejido positivo

Los materiales para la realización de un control positivo externo deben ser muestras recientes de autopsias, biopsias o cirugía fijadas, procesadas e incluidas lo antes posible de la misma forma que las muestras del paciente. Los controles de tejido positivos indican si los tejidos se han preparado correctamente y las técnicas de tinción son adecuadas. En cada sesión de tinción deberá incluirse un control de tejido positivo externo para cada grupo de ensayos. Los tejidos utilizados para los materiales de control positivo externo se deben seleccionar de muestras de pacientes con una tinción positiva conocida para la $p16^{INK4a}$. Si los controles positivos no muestran una tinción positiva adecuada, los resultados de las muestras deberán considerarse como no válidos.

Control de tejido negativo

El personal de laboratorio puede utilizar los diferentes tipos de células que han dado negativo para $p16^{INK4a}$ presentes en la mayoría de los cortes de tejidos como puntos internos de control negativo para verificar las especificaciones de rendimiento de la inmunohistoquímica. Si se produce una tinción específica (tinción falsa positiva) en el control de tejido negativo, los resultados de las muestras del paciente deberán considerarse como no válidos.

Control de reactivo negativo inespecífico

Utilice el control de reactivo negativo inespecífico en lugar del anticuerpo primario con un corte de cada muestra del paciente con el fin de evaluar la tinción inespecífica y permitir una mejor interpretación de la tinción específica en el lugar del antígeno.

Si se produce una tinción específica (tinción falsa positiva) en el control de reactivo negativo inespecífico, los resultados de las muestras del paciente deberán considerarse como no válidos.

VIII. Interpretación de los resultados

Las muestras de control con tinción de reactivo de control negativo como reactivo primario no deben mostrar una tinción específica.

La tinción positiva mediante el uso del anticuerpo monoclonal de ratón antihumano $p16^{INK4a}$, Clon E6H4™, se deberá evaluar dentro del contexto de toda tinción de fondo inespecífica del reactivo de control negativo. Como en muchos ensayos inmunohistoquímicos, un resultado negativo significa que no se ha detectado el antígeno, no que el antígeno no estuviera presente en las células/tejido del ensayo.

Para la interpretación de los resultados se debe tener en cuenta que la $p16^{INK4a}$ es una proteína celular que se puede expresar en niveles detectables tanto en lesiones displásicas de alto grado del cuello uterino y en cánceres cervicales, como en casos no asociados con displasia cervical; aunque a distintos niveles y con diferentes patrones de expresión.

Las muestras del portaobjetos con tinción se evalúan de acuerdo con el sistema de clasificación compuesto de un resultado “positivo” y “negativo”.

Un resultado “positivo” se asigna a las muestras de tinción de portaobjetos de p16^{INK4a} que muestran una tinción de células de las capas de las células basales y parabasales del epitelio escamoso del cérvix, con o sin tinción de las células de las capas superficiales de las células (“patrón de tinción difuso”). Un ejemplo de un portaobjeto con resultado “positivo” (“patrón de tinción difuso”) se muestra en el Anexo 2, figura 1.

Un resultado “negativo” se asigna a las muestras de tinción de portaobjetos de p16^{INK4a} que muestran una reacción de tinción negativa en el epitelio escamoso (“patrón de tinción negativo”) o tinción de células aisladas o pequeños grupos de células; p. ej., una tinción no continua, que no afecte específicamente a las células basales y parabasales (“patrón de tinción focal”). Un ejemplo de un portaobjeto con resultado “negativo” (“patrón de tinción focal”) se muestra en el Anexo 2, figura 2.

La interpretación de los portaobjetos con tinción para la p16^{INK4a} mediante el uso de CINtec® Histology Kit debe realizarse en conjunción con portaobjetos con tinción de hematoxilina-eosina preparados con la misma muestra de tejido del cuello uterino. Para llegar a un diagnóstico definitivo se deben combinar los datos adicionales aportados por los portaobjetos de tinción del CINtec® con el diagnóstico preliminar basado en la morfología a partir de los portaobjetos con tinción de hematoxilina-eosina.

IX. Limitaciones

- Sólo para uso profesional. Para llevar a cabo los procedimientos de inmunohistoquímica se requiere contar con una formación especializada.
- La interpretación clínica de una tinción positiva o negativa se debe evaluar dentro del contexto de una presentación clínica, morfología y otros criterios histopatológicos. Toda interpretación clínica de una tinción positiva o negativa se debe complementar con estudios morfológicos mediante el uso de controles externos e internos de positivos y negativos adecuados, así como otras pruebas diagnósticas. Un patólogo calificado con experiencia en el uso adecuado de anticuerpos inmunohistoquímicos, reactivos y métodos debe interpretar todos los pasos utilizados para la preparación y la interpretación de la preparación de un IHC final.
- La calidad de la tinción de los tejidos influye en gran medida en los resultados de tinción de la inmunohistoquímica. De este modo, los pasos de fijación, lavado, secado, calentamiento, corte o contaminación con otros tejidos contribuyen significativamente al resultado global de la tinción obtenido y puede producir artefactos, la captura de anticuerpos o resultados de falsos negativo. Los resultados inconsistentes pueden deberse a variaciones en los métodos de fijación e inclusión o a irregularidades inherentes a los tejidos.
- Una contratinción excesiva o incompleta puede influir negativamente en la interpretación adecuada de los resultados.
- El fabricante suministra estos anticuerpos/reactivos en una disolución óptima para que se utilicen de acuerdo con las instrucciones proporcionadas, para los ensayos inmunohistoquímicos en secciones de tejidos preparados. Las desviaciones de los procedimientos de ensayo recomendados pueden invalidar los resultados esperados que se describen en este documento; se deben utilizar y documentar los controles apropiados. Los usuarios que se desvíen de los procedimientos de ensayo

son responsables de la interpretación de los resultados del paciente de acuerdo con estas circunstancias.

- Los resultados falsos positivos se pueden deber a la unión no inmunitaria de proteínas o los productos de reacción del sustrato. Esto puede derivar también de la actividad pseudoperoxidasa (eritrocitos) y la actividad de la peroxidasa endógena (citrocromo C).
- Los reactivos pueden demostrar reacciones inesperadas en tejidos en los que no se han realizado ensayos anteriormente. La posibilidad de reacciones inesperadas incluso en grupos de tejidos en los que se han realizado ensayos no se puede eliminar completamente debido a la variabilidad biológica de la expresión del antígeno en neoplasmas u otros tejidos patológicos. Póngase en contacto con Roche mtm laboratorios AG con las reacciones inesperadas documentadas. Para información sobre el servicio técnico consulte la información de contacto proporcionada en la sección XIII..
- No sustituya los reactivos del kit por reactivos con números de catálogos diferentes o por reactivos de otros fabricantes.

X. Características de rendimiento

Rendimiento clínico

El rendimiento clínico del CINtec® Histology Kit se ha evaluado en un estudio clínico controlado utilizando para ello muestras de tejido del cuello uterino fijado con formol e incluido en parafina [21]. Este estudio se diseñó para demostrar la idoneidad del CINtec® Histology Kit y aumentar la precisión diagnóstica y la concordancia entre observadores para la detección de la neoplasia intraepitelial del cuello uterino de alto grado (CIN2+).

El estudio se realizó a partir de biopsias con pinza en sacabocados y por conización recopiladas retrospectivamente. Para la preparación de los portaobjetos con tinción de hematoxilina-eosina y de portaobjetos consecutivos con tinción del CINtec® Histology Kit se utilizó, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, un total de 500 muestras cervicales procedentes de dos laboratorios europeos de patología selecionando preferentemente displasias de alto grado a partir de sus diagnósticos originales.

Tres expertos europeos en patología ginecológica establecieron sus diagnósticos individualmente para cada caso basándose en el portaobjetos con tinción de hematoxilina-eosina. En los casos en que surgieron discrepancias en los resultados, se realizó una segunda revisión conjunta durante una reunión de evaluación, y los diagnósticos mayoritarios (diagnóstico de consenso, dos de tres) se utilizaron como diagnóstico de referencia para el estudio.

En el estudio participaron como patólogos del panel un grupo de doce investigadores (patólogos certificados con experiencia en la lectura de patologías cervicales) de cuatro países europeos (Francia, Italia, España y Alemania). En la primera ronda de interpretaciones de los portaobjetos, todos los patólogos del panel establecieron su diagnóstico individualmente para cada caso basándose únicamente en los portaobjetos con tinción de hematoxilina-eosina. Los patólogos desconocían en todo momento los diagnósticos originales y el diagnóstico de referencia. Al cabo de más de cuatro semanas, los doce patólogos volvieron a revisar el mismo grupo de portaobjetos con tinción de hematoxilina-eosina (con distinto etiquetado), conjuntamente con los portaobjetos correspondientes con

tinción del CINtec® Histology Kit.

Para valorar las mejoras en la precisión diagnóstica de los portaobjetos con tinción de CINtec® Histology leídas conjuntamente con los respectivos portaobjetos con tinción de hematoxilina-eosina en comparación con los portaobjetos con sólo la tinción de hematoxilina-eosina, se compararon los resultados de las lecturas de los patólogos de cada grupo para ambos métodos con los diagnósticos de consenso establecidos como diagnósticos de referencia por los tres expertos en patología ginecológica.

Resultados:

En el análisis de los datos se incluyó un total de 482 casos con un diagnóstico completo de todos los patólogos que participaron en el estudio. Las frecuencias de las diversas categorías de diagnósticos basadas en los diagnósticos de consenso de los tres expertos en ginecopatología dieron negativo para displasia (n=194), CIN1 (n=96), CIN2 (69) y CIN3 (n=123).

Precisión diagnóstica para la detección de CIN2+

La sensibilidad general para la identificación del CIN2+ aumentó de 1.787 (Hematoxilina-eosina) a 2.018 (Hematoxilina-eosina y CINtec® Histology) resultados verdaderos positivos de CIN2+, con únicamente una leve reducción en la especificidad general de 3.088 (Hematoxilina-eosina) a 3.051 (Hematoxilina-eosina y CINtec® Histology) resultados verdaderos negativos ≤CIN1.

Tabla 1

Mejora de la precisión diagnóstica del CIN (CIN2+) de alto grado mediante la lectura conjunta de portaobjetos con tinción de hematoxilina-eosina y CINtec® Histology frente a los portaobjetos sólo con tinción de hematoxilina-eosina; número de resultados de verdaderos positivos y verdaderos negativos, y número de resultados de falsos negativos y falsos positivos comparados con los diagnósticos de consenso aportados por los patólogos expertos. (Nota: en el caso de haberse producido un acuerdo total entre los patólogos expertos para el diagnóstico de consenso se habrían obtenido 2.304 (192 casos de CIN2+, x grupo de 12 patólogos) verdaderos positivos).

	Verdaderos positivos	**Falsos negativos**	**Falsos positivos**	**Verdaderos negativos**
H&E	1.787	517	392	3.088
H&E y CINtec® Histology	2.018	286	429	3.051

Para comprobar los efectos del CINtec® Histology test sobre la precisión, se utilizó el modelo de análisis de varianza de efectos mixtos para pseudovalores Jackknife, más conocido como el método de Dorfman-Berbaum-Metz (DBM).

La hipótesis nula de que la precisión diagnóstica basada en los portaobjetos con tinción de hematoxilina-eosina en comparación con la tinción de hematoxilina-eosina y CINtec® Histology para el CIN2+ es igual se rechazó con p=0,0004 (Área bajo la curva para H&E: 0,877; Área bajo la curva para H&E y CINtec® Histology:

0,925).

Tabla 2

Características de rendimiento de la lectura conjunta de portaobjetos teñidos con H&E y CINtec® Histology en comparación con la lectura de portaobjetos teñidos solo con H&E para la identificación de CIN de alto grado (CIN2+); diagnósticos de consenso establecidos por tres ginecopatólogos expertos en la interpretación de portaobjetos teñidos con H&E utilizados como diagnósticos de referencia

	H&E % (95% CI)	**H&E plus CINtec® Histology** % (95% CI)
Sensibilidad	77,6% (75,8, 79,3)	87,6% (86,2, 88,9)
Especificidad	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)

IC del 95 %, intervalos de confianza del 95 %; PPV, valor predictivo positivo; NPV, valor predictivo negativo; DLR+, cociente de verosimilitud diagnóstica positivo; DLR–, cociente de verosimilitud diagnóstica negativo

Tomando el diagnóstico de consenso de los tres expertos en patología ginecológica como referencia, la sensibilidad para la detección del CIN2+ mejoró un 13% relativo (la sensibilidad para los diagnósticos de hematoxilina-eosina fue del 77,6% y aumentó hasta un 87,6% en los diagnósticos establecidos a partir de portaobjetos con tinción de hematoxilina-eosina y CINtec® Histology).

El aumento de la precisión diagnóstica para la detección del CIN2+ se demostró independientemente con significancia estadística en lo que se refiere a los subgrupos de muestras de biopsias con pinza del cuello uterino (n=249; Área bajo la curva para H&E: 0,895; Área bajo la curva para H&E y CINtec® Histology: 0,929; p=0,0053) y por conización (n=233; Área bajo la curva para H&E: 0,887; Área bajo la curva para H&E y CINtec® Histology 0,948; p=0,009).

Concordancia entre observadores para la detección del CIN2+

Para la valoración de la mejora de la concordancia entre observadores de la detección del CIN2+ entre el grupo de patólogos del panel, se utilizó un tipo de indicador múltiple de las estadísticas kappa con los diagnósticos realizados a partir de los portaobjetos con tinción de hematoxilina-eosina y los realizados a partir de los portaobjetos con tinción de hematoxilina-eosina leídos conjuntamente con portaobjetos con tinción CINtec® Histology.

Tabla 3

Mejora de la concordancia entre observadores para la detección del CIN2+

mediante la lectura conjunta de los portaobjetos con tinción de hematoxilina-eosina y CINtec® Histology en comparación con los portaobjetos con tinción sólo de hematoxilina-eosina. Se ofrecen los valores kappa como medida de concordancia en la que los efectos del azar han sido corregidos.

Categoría de diagnóstico	**Kappa H&E**	**Kappa H&E y CINtec®**	**Significancia estadística**
CIN2+, todos los casos	0,580	0,756	p<0,0001
CIN2+, sólo biopsias con pinza	0,598	0,748	p<0,0001
CIN2+, sólo biopsias por conización	0,548	0,765	p<0,0001

La estadística kappa como medida de concordancia en la que los efectos del azar han sido corregidos entre el grupo de patólogos del panel para la detección del CIN2+ aumentó significativamente en las lecturas de portaobjetos con tinción de hematoxilina-eosina y CINtec® Histology en comparación con la lectura del portaobjetos con sólo hematoxilina-eosina (incremento en los valores kappa en todos los casos desde 0,580 hasta 0,756; p<0,0001).

Reproducibilidad al considerar el patrón de tinción de la p16^{INK4a}

Se evaluó la fiabilidad entre el grupo de patólogos del panel para valorar el patrón de tinción de la p16^{INK4a} en muestras de tejido del cuello uterino como positivo poco preciso para p16^{INK4a}, focalmente positivo para p16^{INK4a} o negativo para p16^{INK4a}.

Había un alto nivel de reproducibilidad entre los patólogos para considerar el patrón de tinción de la p16^{INK4a} como positivo (patrón de tinción difuso) o negativo (patrón de tinción focal o ninguna inmunorreactividad). Se demostró que el valor kappa (medida de concordancia en la que los efectos del azar han sido corregidos) de la reproducibilidad entre el grupo de doce patólogos del panel para considerar el patrón de tinción de la p16^{INK4a} como positivo (patrón de tinción difuso) o negativo (patrón de tinción focal y ninguna inmunorreactividad) era excelente (promedio de kappa = 0,899; kappa media = 0,903).

Desempeño analítico

Sensibilidad analítica

El estudio de sensibilidad se realizó con CINtec® Histology Kit de 3 lotes. En el estudio de sensibilidad, se analizaron 35 biopsias cervicales con CIN3+, incluidas 6 biopsias clasificadas como CIN3 y 29 biopsias clasificadas como carcinoma de células escamosas.

Cinco de 6 (83,3 %) de los casos clasificados como CIN3 mostraron una fuerte tinción dispersa de p16. Un caso de biopsia CIN3 mostró una expresión p16 débil pero perdió una señal clara p16 positiva.

Veintidós de 29 (75,9 %) de los casos clasificados como carcinoma de células escamosas mostraron una fuerte tinción dispersa de p16. Cinco casos de carcinoma de células escamosas mostraron una expresión débil de p16 pero se perdió una señal clara de p16 positiva. Solo 2 de 29 (6,9 %) de los casos fueron completamente negativos para p16. Esto puede explicarse ya que se indicó con

anterioridad que entre el 3 y el 8 % de los casos de carcinoma de células escamosas fueron negativos para la tinción de p16 [1; 6]. Esto puede reflejar un pequeño porcentaje de casos en los que la desdiferenciación y las reorganizaciones cromosómicas condujeron a la inactivación o eliminación del locus del gen p16.

Para los 3 lotes, la tinción en un panel bien caracterizado de secciones de tejido de rata usando el control negativo del reactivo dio como resultado una tinción fuerte y específica de neuronas individuales en cerebro de rata. Además, algunas células canaliculares del riñón, los macrófagos únicos en el bazo y los macrófagos individuales y las células plasmáticas en el intestino delgado mostraron una tinción débil. Otros tejidos del conjunto de los tejidos de ratas dieron un resultado completamente negativo.

El anticuerpo anti-p16 E6H4™ es capaz de producir una tinción continua de las células de las capas celulares basales y parabasales, con o sin tinción de células de las capas intermedias o intermedias y superficiales del epitelio escamoso en biopsias cervicales con CIN de alto grado (CIN2, CIN3). El control negativo del reactivo (CNR) es capaz de detectar específicamente neuronas de rata.

Especificidad analítica

Se ha verificado la especificidad del anticuerpo de ratón anti-p16^{INK4a} humano, clon E6H4™ mediante un análisis de inmunotransferencia tipo Western (positivo para lisado de línea celular HeLa, consulte también [1]).

El estudio de especificidad se realizó con CINtec® Histology Kit de 3 lotes en un panel bien caracterizado de 90 muestras de tejido normal fijadas con FTN (formol tamponado neutro) (30 tipos diferentes de tejido) y 54 tejidos tumorales distintos del cuello uterino (dispuestos en matrices de tejido múltiples = MTM).

Para la tinción usando el anticuerpo específico p16 (clon E6H4™) en tejidos normales, 16 tejidos diferentes negativos para p16 (cerebro, cerebelo, glándula suprarrenal, tiroides, médula ósea, corazón, esófago, estómago, intestino, colon, hígado, riñón, músculo estriado, piel, mesotelio, cuello uterino) y 14 tejidos diferentes positivos para p16 (tinción débil: hipófisis, pulmón, glándula timo, próstata; positivo: nervio, intestino, amígdalas, páncreas, bazo; fuertemente positivo: útero, ovario, mama, testículo, paratiroides). Para la tinción usando el anticuerpo específico de p16 (clon E6H4™) en tejidos tumorales distintos del cuello uterino, se observaron 22 casos de tumores diferentes negativos para p16 y 32 casos de tumores diferentes positivos para p16.

Para los 3 lotes de CINtec® Histology, los resultados fueron negativos para todos los tejidos (tejidos normales y tejidos tumorales) analizados cuando se usó el control negativo del reactivo. El anticuerpo monoclonal de ratón antirata relacionado con la oxitocina neurofisina no reacciona significativamente con muestras de tejido humano normal y tejidos tumorales humanos.

Reproducibilidad

Reproducibilidad inter-ensayo

La reproducibilidad entre ensayos se determinó para el CINtec® Histology Kit mediante el protocolo del manual mediante la tinción de 36 portaobjetos preparados a partir de bloques de tejido a los que se les diagnosticó CIN2+. Las zonas displásicas de todos los cortes mostraban en todas los ensayos una tinción de intensidad comparable (+/- 0,5 en una escala de 0 a 3). Mientras, las zonas normales no mostraban ninguna tinción especial.

Reproducibilidad intra-ensayo

La reproducibilidad intra-ensayo se determinó con el CINtec® Histology Kit siguiendo el protocolo manual y mediante el autostainer en tres días distintos. En total, se incluyeron tres bloques de tejido a los que se les diagnosticó CIN2+. De cada bloque se incluyó un corte seriado cada día. La zona displásica de los cortes de un bloque mostraba una tinción con intensidad comparable (+/- 0,5 en una escala de 0 a 3) todos los días y también en tinciones manuales y automatizadas. Mientras, las zonas normales no mostraban ninguna tinción especial.

Reproducibilidad entre lotes

Con la finalidad de determinar la reproducibilidad entre lotes, se utilizaron CINtec® Histology Kit de tres lotes distintos para la tinción de cortes de casos CIN2+. Se realizó la tinción manual y automatizada de acuerdo con el protocolo establecido en las instrucciones de uso. La zona displásica de los cortes de un bloque mostraba una tinción con intensidad comparable (+/- 0,5 en una escala de 0 a 3) en los reactivos procedentes de los tres lotes para la tinción manual y automatizada. Mientras, las zonas normales no mostraban ninguna tinción especial.

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

XI. Solución de problemas

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

Problema	Causa probable	Solución sugerida
1. No se produce la tinción de los portaobjetos	**1a.** No se han seguido los pasos de las instrucciones de uso correctamente;	**1a.** Lea atentamente las instrucciones de uso y siga los procedimientos descritos;
2. Se produce una tinción débil de los portaobjetos	**2a.** La recuperación del epítopo no ha sido adecuada;	**2a.** Utilice la solución de recuperación del epítopo preparada recientemente y/o verifique que alcance una temperatura de 95 – 99 °C durante 10 minutos y que se deja enfriar durante otros 20 minutos;
	2b. Los tiempos de incubación de los reactivos no han sido adecuados;	**2b.** Revise las recomendaciones del protocolo de tinción indicadas en las secciones 2.2./3.2.;
	2c. El método de fijación utilizado no es adecuado;	**2c.** Asegúrese de que el tejido del paciente no se haya fijado en exceso o que no se haya utilizado un agente de fijación alternativo;
	2d. El agua empleada para la disolución de la solución de recuperación del epítopo presenta una concentración de iones demasiado alta;	**2d**. Cerciórese de que su columna de intercambio iónico haya sido controlada durante el proceso de mantenimiento rutinario;

	2e. Eliminación inapropiada de la parafina;	**2e.** Los usuarios deberán tener en cuenta que las variaciones en la temperatura del equipo o en los tiempos de exposición, durante la preparación preanalítica de las muestras, pueden producir una eliminación incompleta de la parafina de los portaobjetos de tejido. La parafina residual puede dar lugar una tinción incompleta con cualquier tinción histológica, incluyendo la tinción con CINtec® Histology. Los laboratorios de patología deberían seguir una monitorización regular del equipo para reducir las variaciones en la preparación de las pruebas antes de la tinción. La presencia de líneas muy marcadas dentro de un área de tejido inmunorreactivo u otras inconsistencias en la tinción de un portaobjetos, con cualquier tinción inmunohistológica, deberán entenderse en cualquier caso como un indicador de una preparación preanalítica inadecuada o incompleta de las muestras. Los usuarios deberán considerar la posibilidad de controlar el equipo y los métodos de preparación preanalítica de las pruebas, si observan inconsistencias en la tinción;

3. La tinción de fondo de los portaobjetos es excesiva	**3a.** No se ha eliminado completamente la parafina;	**3a.** Utilice baños de xilol recientes y siga el procedimiento descrito en la sección 2.1./3.1.;
	3b. Se han utilizado aditivos con almidón durante el montaje de los cortes de los portaobjetos;	**3b.** Evite utilizar aditivos con almidón para el montaje de los cortes, ya que muchos aditivos son inmunorreactivos;
	3c. No se han enjuagado bien los portaobjetos;	**3c.** Utilice una solución reciente en los baños de tampón y los frascos de lavado;
	3d. Se han secado los cortes durante el procedimiento de tinción;	**3d.** Utilice una cámara húmeda. Enjuague sólo entre tres y cuatro portaobjetos simultáneamente antes de añadir los reactivos;
	3e. El método de fijación utilizado no es adecuado;	**3e.** Asegúrese que se ha utilizado un agente de fijación recomendado. Otros agentes de fijación pueden causar una tinción de fondo excesiva;
	3f. Se ha producido una unión inespecífica de los reactivos al tejido;	**3f.** Compruebe el método de fijación de la muestra y la presencia de necrosis;
4. El tejido se separa de los portaobjetos	**4a.** Se han utilizado portaobjetos incorrectos;	**4a.** Siga la recomendación y utilice portaobjetos SuperFrost® Plus;
5. La tinción específica es excesivamente fuerte	**5a.** Se ha utilizado un método de fijación inadecuado;	**5a.** Asegúrese de que se han utilizado los agentes y los métodos de fijación adecuados;
	5b. Los tiempos de incubación de los reactivos son demasiado largos;	**5b.** Revise y siga las recomendaciones de protocolo de tinción indicadas en las secciones 2.2/3.2.;
	5c. Se ha utilizado una solución de lavado inadecuada;	**5c.** Utilice el tampón de lavado (10 x) (referencia 10215364001).

XII. Símbolos

Símbolo:	Explicación:
REF	Referencia
LOT	Código del lote
GTIN	Número mundial de artículo comercial
UDI	Identificación única del producto
IVD	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	Fabricante
Σ	Contenido suficiente para <n> ensayos
	Consultar las instrucciones de uso
	Fecha de caducidad
	Limitación de temperatura
	Fecha de fabricación
	No reutilizar
	Contacto del soporte técnico (teléfono)
BIO	Contiene materiales de origen animal
CONTENT	Contenido

XIII. Fabricante

Fabricado por:

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim
Alemania

Contacto del soporte técnico (Teléfono):

https://navifyportal.roche.com
+800 5505 6606

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

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

XIV. Estado de la revisión

Las instrucciones de uso actuales pertenecen a la Versión 1.0 publicada en junio de 2024.

Cambios a la versión anterior del producto 9511 / 06594441001 (2.9, publicados en diciembre de 2022):

- El fabricante ha cambiado de Roche mtm laboratories AG a Roche Diagnostics GmbH, por lo que se ha emitido un nuevo número de producto, 10213370001.
- Cambios editoriales

XV. Propiedad intelectual

CINtec y E6H4 son marcas registradas de Roche.

Todas las demás marcas comerciales pertenecen a sus respectivos propietarios.

© 2024 Roche

Anexo 1 Referencias

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 immuncytochemical 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} Immunoexpression 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 HumanPapillomavirus (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 intra-epithelial neoplasia (CIN): intra- and interpathologist variation and factors associated with disagreement. Histopathology 1990, 16(4):371-6
20. De Vet HCW, Knipschild PG, Schouten HJ, Koudstaal J, Kwee W-S, Willebrand D, Sturmans F, and Arends JW. Interobserver variation in histopathological grading of cervical dysplasia. J Clin Epidemiol 1990, 43(12):1395-8
21. Bergeron C, Ordi J, Schmidt D, Trunk MJ, Keller T, and Ridder R, for the CINtec Histology Study Group. Conjunctive p16^{INK4a} testing significantly increases accuracy in diagnosing high-grade cervical intraepithelial neoplasia. Am J Clin Pathol 2010, 133(3):395-406
22. Sayed K, Korourian S, Ellison DA, Kozlowski K, Talley L, Horn HV, et al. Diagnosing cervical biopsies in adolescents: the use of p16 immunohistochemistry to improve reliability and reproducibility. J Low Genit Tract Dis 2007, 11(3):141-6
23. Gurrola-Diaz CM, Suarez-Rincon AE, Vazquez-Camacho G, Buonocunto-Vazquez G, RosalesQuintana S, Wentzensen N, et al. p16^{INK4a} immunohistochemistry improves the reproducibility of the histological diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia in cone biopsies. Gynecol Oncol 2008, 111(1):120-4
24. Horn LC, Reichert A, Oster A, Arndal SF, Trunk MJ, Ridder R, et al. Immunostaining for p16^{INK4a} used as a conjunctive tool improves interobserver agreement of the histologic diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. Am J Surg Pathol 2008, 32(4):502-12
25. Haidopoulos D, Partsinevelos GA, Vlachos GD, Rodolakis A, Markaki S, Voulgaris Z, et al. p16^{INK4A} is a strong biomarker for cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical carcinoma: a reappraisal. Reprod Sci 2009, 16(7):685-93
26. Lesnikova I, Lidang M, Hamilton-Dutoit S and Koch J. p16 as a diagnostic marker of cervical neoplasia: a tissue microarray study of 796 archival specimens. Diagn Pathol 2009, 4:22
27. Ordi J, Garcia S, del Pino M, Landolfi S, Alonso I, Quinto L, et al. p16^{INK4a} immunostaining identifies occult CIN lesions in HPV-positive women. Int J Gynecol Pathol 2009, 28(1):90-7

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

Anexo 2

Ejemplo de patrón de tinción difuso

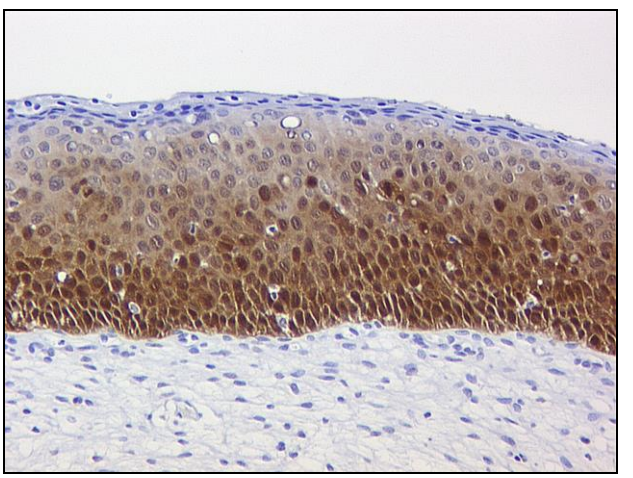

Fig. 1: CIN 3

Ejemplo de patrón de tinción focal

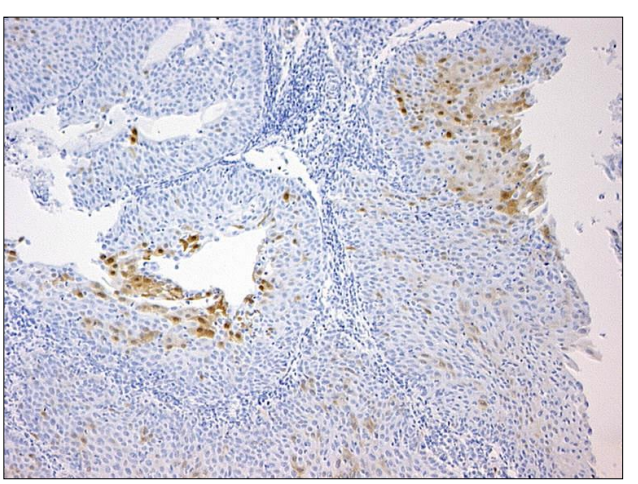

Fig. 2: Metaplasia escamosa madura