

Instructions d'utilisation

CINtec[®] Histology Kit

Le CINtec[®] Histology Kit est un test d'immunohistochimie permettant la détection qualitative de l'antigène p16^{INK4a} dans des coupes de tissus préparées à partir de biopsies cervicales fixées au formol et incluses en paraffine. Il est destiné à être utilisé en conjonction avec des lames colorées en H&E, issues des mêmes échantillons de tissus cervicaux. Il est une aide pour améliorer la précision diagnostique et la concordance inter-observateurs dans les néoplasies intraépithéliales cervicales de haut grade.



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim
Germany

<https://navifyportal.roche.com>

REF 10213370001

GTIN 07613336230350

 50

 2 – 8 °C



CE
0123

IVD



Table des matières

FRANÇAIS	2
I. Nom du produit	2
II. Utilisation prévue	2
III. Résumé et explication du dispositif	2
Résumé et explication	2
Signification clinique	3
Principe de la procédure	4
IV. Réactifs	4
Matériels fournis	4
Conservation	6
Matériels et réactifs requis mais non fournis	7
Équipement requis	7
V. Mises en garde et précautions	8
Mise en garde	8
Attention	9
VI. Procédure	9
Préparation de l'échantillon	9
Échantillons de tissus inclus en paraffine	9
Démasquage thermique de l'épitope	10
Procédure d'immunomarquage	10
1. Préparation des réactifs	10
1.1 Tampon de démasquage	10
1.2 Tampon de lavage	10
1.3 Préparation de la solution substrat-chromogène (DAB)	11
1.4 Contre-coloration	11
1.5 Milieu de montage	11
2. Procédure d'immunomarquage pour automates Autostainer	11
2.1 Déparaffinage et réhydratation	12
2.2 Protocole d'immunomarquage pour les automates Autostainer	12
3. Procédure de marquage pour utilisation manuelle	14
3.1 Déparaffinage et réhydratation	14
3.2 Protocole de marquage pour utilisation manuelle	15
VII. Contrôle de qualité	17
VIII. Interprétation des résultats	18
IX. Limites	19
X. Performances	20
XI. Dépannage	25
XII. Symboles	28
XIII. Fabricant	28
XIV. État de la révision	28
XV. Propriété intellectuelle	29
Annexe 1 Références	30
Annexe 2	33

FRANÇAIS

I. Nom du produit

CINtec® Histology Kit

II. Utilisation prévue

Pour utilisation en diagnostic in vitro.

Le CINtec® Histology Kit est un test d'immunohistochimie permettant la détection qualitative de l'antigène p16^{INK4a} dans des coupes de tissus préparées à partir de biopsies cervicales fixées au formol et incluses en paraffine.

Il est destiné à être utilisé en conjonction avec des lames colorées en H&E, issues des mêmes échantillons de tissus cervicaux. Il est une aide pour améliorer la précision diagnostique et la concordance inter-observateurs dans les néoplasies intraépithéliales cervicales de haut grade.

Ce test est destiné à une utilisation manuelle ou à une utilisation sur les instruments Autostainer.

Ce test doit être interprété par un anatomopathologiste qualifié à la lumière des examens histologiques, des informations cliniques pertinentes et des contrôles appropriés.

III. Résumé et explication du dispositif

Résumé et explication

Le CINtec® Histology Kit est à base d'anticorps monoclonal de souris (clone E6H4®) visant la protéine humaine p16^{INK4a}.

La protéine p16^{INK4a} est un inhibiteur de la kinase cycline-dépendante, qui joue un rôle essentiel dans la régulation du cycle cellulaire eucaryote. Elle fait partie du contrôle, médié par la protéine du rétinoblastome (pRB), de la transition des phases G1-S et elle déclenche l'interruption du cycle cellulaire au cours des processus de différenciation cellulaire. Dans le cas des cellules épithéliales définitivement différenciées, l'expression de la p16^{INK4a} est régulée à la baisse à des niveaux qui ne sont généralement pas détectables par immunohistochimie.

Dans de nombreuses entités tumorales, le gène p16^{INK4a} suppresseur de tumeur s'est avéré être fonctionnellement inactif par mutation génétique ou par hyperméthylation de son promoteur. Il est apparu que l'inactivation de ce gène contribuait à la dérégulation du cycle cellulaire et à la perte de contrôle de la prolifération cellulaire.

Il a cependant été démontré que, dans les cellules épithéliales cervicales capables de se diviser, quand les oncoprotéines du Papilloma virus à haut risque (HR-HPV) ont initié le processus de transformation cellulaire, l'expression de p16^{INK4a} était fortement régulée à la hausse [1; 2]. Cette forte surexpression de p16^{INK4a} s'avère étroitement associée au niveau moléculaire d'activité des oncoprotéines E7 du HR-

HPV. Il a été démontré que la surexpression de p16^{INK4a} reflétait l'inactivation médiée par les oncoprotéines E7 du complexe fonctionnel entre pRB et le facteur de transcription E2F, qui constitue l'un des événements essentiels au cours de la transformation cellulaire induite par le HR-HPV [3].

De nombreuses études publiées rapportent que la surexpression de la protéine p16^{INK4a} a été observée en immunohistochimie dans une très forte proportion de cas de dysplasie cervicale précancéreuse de haut grade (80 à 100 % des CIN2 et quasiment toutes les CIN3) et de cancer invasif. La surexpression de p16^{INK4a} a également été mise en évidence dans une proportion variable de lésions intraépithéliales cervicales de bas grade (CIN1), de l'ordre de 30 à 60% en général [1; 2; 4-16].

L'interprétation des résultats doit tenir compte du fait que p16^{INK4a} est une protéine cellulaire, qui peut être exprimée à un taux détectable dans certaines dysplasies cervicales de haut grade et cancers cervicaux, mais aussi dans certaines situations non associées aux dysplasies cervicales, quoique en quantité différente et avec un mode d'expression différent. Les préparations histologiques de tissus ont une morphologie tissulaire intacte afin d'aider à l'interprétation d'un résultat positif pour p16^{INK4a} dans la lésion cervicale. On a suggéré qu'un marquage diffus, c'est-à-dire une coloration continue des cellules des couches basale et parabasale, avec ou sans coloration des couches cellulaires superficielles, pourrait indiquer un résultat positif pour la surexpression de p16^{INK4a}. Ce mode de marquage s'est avéré le plus sensible et le plus spécifique des CIN de haut grade [1; 4; 5]. En revanche, un marquage focal (coloration de cellules isolées ou de petits groupes de cellules, non continue ou absente en particulier dans les couches basale et parabasale) et l'absence d'immunoréactivité sont considérés comme un résultat négatif de surexpression de p16^{INK4a} [1; 4; 5].

Les lames marquées pour la recherche de p16^{INK4a} avec le CINtec® Histology Kit doivent être interprétées en relation avec des lames de coloration H&E préparées dans la même pièce de biopsie. Les informations complémentaires fournies par les lames de marquage CINtec® doivent être associées au diagnostic morphologique préliminaire, posé sur la base des lames de coloration H&E, pour obtenir le diagnostic final.

Signification clinique

La lecture conjointe des lames H&E composées de coupes de la pièce de biopsie cervicale et de lames consécutives de la même pièce colorées immunomarquées pour la recherche de p16^{INK4a} apporte une amélioration démontrée de la précision de diagnostic et de la concordance entre observateurs dans le diagnostic des néoplasmes intraépithéliaux cervicaux de haut grade (CIN2+).

Le diagnostic pathologique basé sur les coupes de tissu cervical en coloration H&E constitue la base de la décision de traitement. L'imprécision du diagnostic a donc des implications considérables. Un diagnostic imprécis peut entraîner une prise en charge inadéquate de la patiente, c'est-à-dire un traitement excessif de femmes globalement en bonne santé ou un traitement insuffisant de femmes porteuses de dysplasies de haut grade établies.

L'interprétation diagnostique des coupes histologiques de coloration H&E fait apparaître d'importantes discordances entre les pathologistes. Diverses publications font état d'un faible taux de concordance inter- et intra-observateurs dans l'histologie du col de l'utérus [17-20].

Dans le cadre d'une grande étude multicentrique réalisée aux États-Unis, l'interprétation d'échantillons d'histologie cervico-utérine (2237 biopsies colposcopiques et 535 pièces de biopsie prélevées lors d'une conisation) par plusieurs pathologistes bien entraînés a été évaluée : la reproductibilité des interprétations histopathologiques était médiocre ($\kappa = 0,46$ pour les biopsies à l'emporte-pièce et $\kappa = 0,49$ pour les biopsies LEEP) [17]. La concordance entre observateurs de six histopathologistes évaluant 125 pièces de biopsie colposcopique, selon le système de notation de l'OMS et le système Bethesda modifié, s'est avérée mauvaise avec les deux systèmes de notation [18]. De même, une étude britannique a fait apparaître une mauvaise concordance entre huit histopathologistes experts pour l'examen de 100 pièces de biopsie colposcopique (valeur non pondérée de $\kappa = 0,358$) [19].

L'association de lames marquées avec le CINtec® Histology Kit aux lames de coloration H&E habituellement utilisées pour poser le diagnostic permet d'améliorer la précision globale de cette procédure de diagnostic histomorphologique [21-39].

Principe de la procédure

Le CINtec® Histology Kit contient une série de réactifs requis pour la détection immunohistochimique de l'antigène p16^{INK4a}. Le Kit est conçu pour effectuer un marquage immunohistochimique en deux étapes pour des échantillons de tissus fixés au formol et inclus en paraffine, issus de biopsies cervicales. Pour la détection de l'antigène, on utilise un anticorps monoclonal primaire de souris (clone E6H4®) dirigé contre la protéine humaine p16^{INK4a}.

Un réactif de visualisation prêt à l'emploi composé d'un polymère associé à la peroxydase de raifort et à des fragments Fab' d'anticorps de chèvre anti-souris est utilisé. Le réactif de visualisation a été purifié par absorption sur phase solide afin d'éliminer la réaction croisée avec les immunoglobulines humaines. La réaction chromogénique se base sur une conversion, grâce à la peroxydase de raifort, d'un chromogène DAB en un produit de réaction visible sur le site de l'antigène. A l'issue de la contre-coloration, l'échantillon peut être recouvert d'une lamelle et les résultats peuvent être évalués au moyen d'un microscope optique.

IV. Réactifs

Matériels fournis

Les matériels répertoriés ci-dessous sont inclus dans chaque kit et suffisent pour réaliser 50 tests et 50 réactions de contrôle négatif. Le nombre de tests suppose l'utilisation de 200 µl de réactif par lame.

1 Peroxidase Blocking Reagent

Réactif de blocage de la peroxydase

2 x 11,5 mL, prêt à l'emploi

Peroxyde d'hydrogène à 3%, contenant 15 mmol/L d'azide de sodium (NaN₃).

EUH210: Fiche de données de sécurité disponible sur demande.

2 Mouse anti-Human p16^{INK4a} Antibody

Anticorps de souris anti-p16^{INK4a} humain

11,5 mL, prêt à l'emploi

Anticorps monoclonal de souris anti p16^{INK4a} humaine (~1 µg/mL), Clone E6H4™, dans un tampon 50 mmol/L Tris pH 7.2, contenant 15 mmol/L d'azide de sodium (NaN₃) et une protéine stabilisante.

3 Visualization Reagent

Réactif de visualisation

2 x 11,5 mL, prêt à l'emploi



Attention

H317 Peut provoquer une allergie cutanée.

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

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

P280 Porter des gants de protection.

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

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

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

Composants dangereux:

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

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

Polymère conjugué à la peroxydase de raifort et des fragments Fab' d'anticorps de chèvre anti-souris isolés par affinité, dans une solution stabilisante contenant des préservateurs et une protéine stabilisante.

4 Negative Reagent Control

Réactif de contrôle négatif

11,5 mL, prêt à l'emploi

Anticorps monoclonal de souris (~1 µg/mL) anti neurophysine de rat liée à l'ocytocine, dans un tampon de 50 mmol/L Tris pH 7.2, contenant 15 mmol/L d'azide de sodium (NaN₃) et une protéine stabilisante. Pour vérification de la spécificité du marquage. Les neurophysines de rat liées à l'ocytocine ne sont pas présentes dans les tissus humains.

5 DAB Buffered Substrate

Tampon de substrat de la DAB

31 mL

Solution tampon de substrat, pH 7.5, contenant moins de 0.1 % de peroxyde d'hydrogène, des stabilisants et des amplificateurs.

6 DAB Chromogen

Chromogène DAB

0,85 mL, solution chromogénique de 3,3'-diaminobenzidine.



Danger

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

H341 Susceptible d'induire des anomalies génétiques.

H350 Peut provoquer le cancer.

P201 Se procurer les instructions spéciales avant utilisation.

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

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

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

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

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

Composant dangereux:

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

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

7 Epitope Retrieval Solution 10-X

Tampon de démasquage 10-X concentré

500 mL, Tampon Tris 100 mmol/L pH 9, contenant 10 mmol/L d'EDTA et 15 mmol/L d'azide de sodium (NaN₃).

Conservation

Conserver entre 2 et 8°C. Ne pas utiliser après la date de péremption. Aucune donnée n'est indiquée sur la conservation des réactifs dans des conditions autres

que celles susmentionnées.

Après ouverture, les composants du kit restent stables pendant 6 mois, s'ils sont conservés entre 2 et 8 °C. Les solutions doivent être jetées si leur aspect semble trouble.

Le tampon de lavage et le tampon de démasquage restent stables pendant 1 mois maximum après dilution s'ils sont conservés entre 2 et 8 °C. Les solutions ne doivent pas être utilisées si leur aspect semble trouble.

Matériels et réactifs requis mais non fournis

CINtec® Wash Buffer 10X (le tampon de lavage) à utiliser avec le CINtec® Histology Kit est disponible dans le Catalogue, numéro de code 10215364001 auprès de Roche, mais n'est pas inclus dans ce kit. Pour vos commandes, consulter notre site www.roche.com.

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



Attention

H317 Peut provoquer une allergie cutanée.

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

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

P280 Porter des gants de protection.

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

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

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

Composants dangereux:

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

Lingettes absorbantes ;

Contre-colorant à l'hématoxyline ;

Eau distillée ou désionisée (eau de rinçage) ;

Ethanol à 95% et 70% ;

Milieu de montage ;

Tissus de contrôle positifs et négatifs à utiliser comme contrôles de la procédure ;

Lames (SuperFrost® Plus ou équivalent) ;

Xylène ;

Lamelles de protection .

Équipement requis

Facultatif : étuve de séchage, capable de conserver 60 °C maximum ;

Facultatif : automate Dako Autostainer ou LabVision Autostainer ;

Chambre humide (en option) ;

Microscope optique (grossissement de 4 à 40 x) ;

Cuves ou bains de coloration ;

Flacons de lavage ;

Chronomètre (pouvant accepter des intervalles de 2 à 60 minutes) ;

Bain-marie avec couvercle (pouvant maintenir le tampon de démasquage à une température comprise entre 95 et 99 °C) .

V. Mises en garde et précautions

Mise en garde

1. Attention! Certains réactifs compris dans ce kit sont composés de produits chimiques dangereux. En cas de manipulation des composants de ce kit, il convient de respecter les consignes de sécurité applicables à la manipulation des réactifs dangereux de laboratoire.
2. Les composants 1, 2, 4 et 7 de ce produit contiennent de l'azide de sodium (NaN_3) qui est hautement toxique dans sa forme pure. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le plomb et le cuivre des canalisations pour former des accumulations d'azides métalliques hautement explosifs. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.
3. Les composants 2, 3 et 4 contiennent des produits d'origine animale. Comme avec tout produit d'origine biologique, des procédures de manipulation appropriées doivent être respectées.
4. La fiche de sécurité du kit est disponible sur demande.
5. En cas de manipulation et d'élimination des échantillons histologiques, ce qui inclut tous les échantillons avant et après fixation, ainsi que tous les matériels en contact avec ceux-ci, il convient de respecter les consignes de sécurité applicables à la manipulation de produits susceptibles de transmettre une infection ainsi que les conditions réglementaires d'élimination des déchets.
6. Ne jamais pipeter les réactifs à la bouche. Eviter tout contact de la peau ou des membranes muqueuses avec les réactifs et les échantillons. Si les réactifs ou les échantillons entrent en contact avec la peau ou des membranes muqueuses, rincer abondamment à l'eau.
7. Le réactif de visualisation et le chromogène DAB peuvent se détériorer en cas d'exposition à une luminosité élevée. Ne pas stocker les composants du kit ni effectuer de marquage sous une lumière vive, telle que la lumière directe du soleil.
8. Porter un vêtement de protection approprié pour éviter tout contact avec les yeux et la peau, lors de la manipulation de l'un des composants inclus ou devant être utilisés avec le CINtec[®] Histology Kit. Consulter la Fiche de sécurité (SDS) pour d'autres renseignements.
9. Les étiquettes de sécurité suivent principalement les directives du SGH de

l'UE.

Attention

1. Pour utilisation en diagnostic in vitro.
2. A usage professionnel uniquement.
3. Réduire au minimum la contamination microbienne des réactifs afin d'éviter tout marquage non spécifique.
4. Toute durée, température ou méthode d'incubation autre que celle indiquée peut entraîner des résultats erronés.
5. Ne pas utiliser le kit si l'emballage de l'un de ses composants est endommagé. Si l'emballage ou les composants sont endommagés, il convient d'informer le fabricant dans les meilleurs délais.
6. L'élimination de tous les déchets doit être conforme aux directives et réglementations locales.
7. Tous les réactifs sont formulés spécifiquement pour être utilisés avec ce test. Pour que le test fonctionne comme indiqué, aucune substitution ne doit être effectuée.
8. Si un marquage inattendu est observé, ne pouvant être expliqué par un changement des procédures du laboratoire et en cas de suspicion d'un problème avec le CINtec® Histology Kit, se reporter immédiatement aux coordonnées fournies dans la section XIII pour plus d'informations sur l'assistance technique.
9. Un dysfonctionnement du produit dû à des problèmes de manipulation ou à une instabilité ne provoque aucun signe évident. Par conséquent, par mesure de contrôle de la qualité, les contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que des échantillons du patient.
10. Pour signaler tout soupçon d'incident grave en lien avec l'utilisation de ce dispositif, contacter un représentant Roche local et l'autorité compétente de l'État membre ou du pays de l'utilisateur.

VI. Procédure

Préparation de l'échantillon

Le CINtec® Histology Kit est conçu pour être utilisé avec des échantillons de tissus préservés pour les procédures d'immunohistochimie. Les échantillons doivent être préparés conformément aux méthodes standards de traitement des tissus.

Des lames à charge positive, telles que les lames SuperFrost® Plus, sont recommandées pour une performance optimale.

Echantillons de tissus inclus en paraffine

Les échantillons de tissus conservés dans du formol neutre tamponné et inclus en paraffine traités suivant des méthodes standards peuvent être utilisés avec ce kit. Si les échantillons sont préparés en ayant recours à d'autres méthodes de préservation, l'utilisateur doit vérifier la compatibilité de la méthode.

Les échantillons de biopsie doivent être fixés pendant 18 à 24 heures dans du

formol neutre tamponné (taux de 10 % recommandé) et recoupés en morceaux de 3 à 4 mm d'épaisseur. Ils sont ensuite déshydratés dans une série de bains d'alcools et de xylène, puis imprégnés en paraffine à une température inférieure à 60 °C. Coupés à 4 ou 5 µm puis montés sur des lames de microscopie SuperFrost® Plus dans un laboratoire d'histopathologie. Le marquage des lames doit être effectué immédiatement, car l'antigénicité des coupes de tissu peut diminuer dans le temps.

Démasquage thermique de l'épitope

Pour le démasquage thermique de l'épitope, les coupes de tissus montées sur des lames doivent être chauffées par immersion dans le tampon de démasquage dans un bain-marie étalonné capable de conserver le tampon à une température comprise entre 95 et 99 °C. Les laboratoires situés en altitude doivent déterminer la méthode la plus adaptée pour conserver la température requise du bain-marie. Le fabricant conseille de ne pas dévier de la procédure décrite.

A l'issue du démasquage thermique, les coupes de tissu doivent revenir progressivement à température ambiante, pendant 20 minutes avant un autre traitement. Ensuite, le marquage des coupes doit être effectué dans les meilleurs délais.

Procédure d'immunomarquage

1. Préparation des réactifs

Tous les réactifs doivent être amenés à la température ambiante (20-25°C) avant leur utilisation pour l'immunomarquage. Toutes les étapes qui suivent sont donc exécutées à température ambiante.

On veillera à éviter le dessèchement des échantillons pendant la procédure d'immunomarquage, qui peut entraîner des artefacts de coloration.

Il est recommandé de préparer les réactifs suivants avant la technique :

1.1 Tampon de démasquage

Préparer une quantité suffisante du tampon de démasquage pour la procédure de marquage prévue, en diluant une quantité du Flacon 7 (tampon de démasquage 10-X concentré) au 1:10 dans l'eau distillée ou désionisée.

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

REMARQUE : L'utilisation d'eau contenant un taux élevé d'ions pour la dilution de la solution de démarquage de l'épitope peut réduire significativement les performances de coloration du test. Vérifiez que l'eau utilisée est correctement désionisée (contrôle de la colonne échangeuse d'ions pour la production d'eau désionisée lors de l'entretien de routine). N'utilisez pas d'eau du robinet.

1.2 Tampon de lavage

Utiliser le tampon de lavage 10-X, numéro de code 10215364001, fourni par Roche mtm laboratories AG, en association avec le CINtec® Histology Kit. Pour vos commandes, consulter notre site www.roche.com.

Préparer une quantité suffisante de tampon de lavage en diluant du tampon de lavage 10-X, numéro de code 10215364001, selon un rapport de 1:10 avec de l'eau distillée ou désionisée.

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

1.3 Préparation de la solution substrat-chromogène (DAB)

Pour préparer la solution substrat-chromogène (DAB), une goutte de chromogène DAB doit être ajoutée à 2 mL de tampon de substrat de la DAB. Procéder comme suit :

- i) Transférer 2 mL de tampon de substrat de la DAB provenant du Flacon 5.
- ii) Ajouter une goutte (25 – 30 µl) de chromogène DAB provenant du Flacon 6. Mélanger et appliquer sur les coupes de tissu avec une pipette.

2 mL de la solution substrat-chromogène (DAB) ainsi préparée suffisent généralement pour colorer dix coupes de tissu, y compris les cinq échantillons de contrôle correspondants.

REMARQUES :

- Utiliser la solution substrat-chromogène (DAB) diluée dans la journée.
- L'ajout d'une trop grande quantité de chromogène DAB dans le tampon de substrat de la DAB entraîne une détérioration du signal positif.

1.4 Contre-coloration

La réaction à la DAB donne un produit final coloré qui n'est pas soluble dans l'eau. Pour la contre-coloration, il est possible d'utiliser de l'hématoxyline à base d'alcool ou aqueuse. Dans ce cas, respecter les instructions communiquées par le fournisseur d'hématoxyline pour procéder à la contre-coloration.

1.5 Milieu de montage

Pour le montage des échantillons sur lames après le marquage, un milieu de montage permanent non aqueux est recommandé. Cependant, un milieu de montage aqueux peut également être utilisé.

L'utilisation de l'Eukitt Mounting Medium est recommandée pour le montage non aqueux. L'utilisation de l'Aquatex Merck est recommandée pour le montage aqueux.

2. Procédure d'immunomarquage pour automates Autostainer

Le CINtec® Histology Kit a été optimisé pour être utilisé sur les automates Autostainer (le LabVision Autostainer 480 ou le Dako Autostainer Plus) conformément à la procédure indiquée ci-dessous. Il peut être possible d'utiliser d'autres automates ou systèmes aux fonctions comparables après une validation appropriée par l'utilisateur. Avant la technique sur les automates Autostainer, les échantillons et les réactifs doivent être préparés comme indiqué aux sections 1.1 – 1.5 et 2.1.

2.1 Déparaffinage et réhydratation

Avant le déparaffinage, placer les lames dans une étuve de séchage à une température maximale de 60 °C pendant au moins 20 minutes, sans pour autant dépasser une heure, afin d'éliminer l'eau quantitativement pour améliorer ainsi l'adhérence du tissu à la lame de verre (« plaquage ») et faire fondre la paraffine. Les lames de tissu doivent être déparaffinées afin d'éliminer le milieu d'inclusion puis réhydratées avant la procédure d'immunomarquage. Il est important de bien éliminer la paraffine, car tout résidu du milieu d'inclusion entraînerait un marquage non spécifique. L'incubation des lames doit être réalisée à température ambiante (20 – 25 °C) conformément aux étapes suivantes.

- 5 (\pm 1) minutes dans un bain de xylène ;
- Recommencer cette opération une fois avec un bain frais ;
- Éliminer l'excès de liquide ;
- 3 (\pm 1) minutes dans de l'éthanol à 95% ;
- Recommencer cette opération une fois avec un bain frais ;
- Éliminer l'excès de liquide ;
- 3 (\pm 1) minutes de l'éthanol à 70% ;
- Recommencer cette opération une fois avec un bain frais ;
- Éliminer l'excès de liquide ;
- Au moins 30 secondes dans de l'eau distillée ou désionisée .

Lancer la procédure de marquage comme indiqué à la Section 2.2, Etape 1 : Démasquage.

Les solutions de xylène et d'alcool ne doivent pas être utilisées pour plus de 40 lames.

REMARQUE : Les utilisateurs doivent savoir que les variations de la température de l'équipement ou de la durée d'exposition pendant la préparation des échantillons avant l'analyse peuvent entraîner un déparaffinage incomplet des lames de tissus. Dans toutes les méthodes de coloration histologique, y compris la coloration CINtec® Histology, la présence de résidus de paraffine peut entraîner une coloration incomplète. Les laboratoires d'histopathologie doivent prévoir un contrôle régulier de l'équipement visant à réduire les variations des conditions de préparation des échantillons avant la coloration. L'apparition de zones nettement délimitées dans les zones de tissus immunoréactives ou d'autres hétérogénéités de la coloration d'une lame peuvent indiquer, quelle que soit la méthode de coloration immunohistochimique, un traitement inadéquat ou incomplet de l'échantillon avant l'analyse. En cas de telles anomalies de coloration, l'équipement et les méthodes de préparation des échantillons avant analyse doivent être contrôlés.

2.2 Protocole d'immunomarquage pour les automates Autostainer

Etape 1 : Démasquage

- Remplir les cuves à coloration, ex : Coplin jars en plastiques, avec le tampon de démasquage dilué (voir la Procédure à la section 1.1) ;
- Placer les cuves à coloration contenant le tampon de démasquage dans un bain-marie et faire chauffer l'eau et le tampon à 95 – 99 °C. Il est important d'ajuster le niveau d'eau du bain-marie de manière à ce que les cuves soient immergées à 80% de leur hauteur. Couvrir les cuves avec leurs

couvercles de façon à stabiliser la température et éviter l'évaporation ;

- Immerger les coupes déparaffinées dans le tampon de démasquage préchauffé dans les cuves à coloration. Cette étape entraîne en général une chute de la température dans les cuves sous 90°C ;
- Ramener la température du bain-marie **et** du tampon de démasquage dans les cuves à 95 – 99 °C. Contrôler la température du tampon de démasquage dans les cuves de coloration ;
- Incuber pendant 10 (±1) minutes à 95 – 99 °C. Ne décompter le temps qu'à partir du moment où la température du tampon de démasquage atteint 95 – 99 °C dans les cuves ;
- Retirer la cuve contenant les lames du bain-marie ;
- Laisser les lames revenir progressivement à température ambiante dans le tampon de démasquage pendant 20 (±1) minutes ;
- Laisser décanter le tampon de démasquage et rincer les coupes dans du tampon de lavage (voir la Procédure à la section 1.2) ;
- Pour des performances optimales, laisser tremper les coupes dans le tampon de lavage pendant 5 minutes après le démasquage et avant de passer au marquage .

REMARQUE : Le tampon de démasquage est conçu pour une utilisation unique. Ne pas réutiliser.

Etape 2 : Programmation de l'automate

Avant la première utilisation du CINtec® Histology Kit sur un automate Autostainer, une nouvelle procédure doit être définie. Veuillez vous référer au manuel de l'utilisateur de l'Autostainer correspondant.

Etape 3 : Procédure sur l'Autostainer

- Transférer les réactifs des flacons du kit dans des flacons à réactifs gradués Autostainer. Utiliser la carte générée par l'Autostainer comportant les durées des étapes du programme et les volumes de réactifs (voir le point 4 pour connaître les durées et volumes spécifiques) ;
- Placer les flacons de réactifs Autostainer dans le portoir des réactifs Autostainer, conformément à la carte de disposition des réactifs générée par l'ordinateur ;
- Charger les lames sur l'Autostainer, conformément à la carte de disposition des lames générée par l'ordinateur ;
- Afin d'éviter leur dessèchement, les échantillons doivent être légèrement arrosés de tampon de lavage après leur mise en place dans l'Autostainer ;
- Ci-après figurent les grandes lignes du fonctionnement du programme :
 - Rincer* ;
 - 200 µl de réactif de blocage de la peroxydase - 5 minutes ;
 - Rincer * ;
 - 200 µl de l'anticorps primaire p16^{INK4a} ou de contrôle négatif - 30 minutes ;
 - Rincer * ;

- 200 µl de réactif de visualisation - 30 minutes ;
- Rincer *;
- Rincer*;
- Rincer *;
- Switch ;
- 200 µl de solution substrat-chromogène (DAB) - 10 minutes ;
- Rincer *;
- Rincer les lames dans de l'eau désionisée après l'étape du substrat chromogène .

*Utiliser un tampon de lavage pour les étapes de rinçage respectives.

REMARQUE : Si l'Autostainer rince les lames avec un tampon, les lames doivent être rincées avec de l'eau désionisée après leur sortie de l'Autostainer.

Etape 4 : Contre-coloration (instructions pour l'hématoxyline)

- Immerger les lames dans un bain d'hématoxyline. Incuber pendant 2 à 5 minutes, en fonction de la puissance de l'hématoxyline utilisée ;
- Placer les lames dans un bain d'eau du robinet et rincer doucement sous l'eau courante. Vérifier que tous les résidus d'hématoxyline ont été éliminés ;
- Rincer doucement les lames dans un bain d'eau distillée ou désionisée ;
- La contre-coloration peut être effectuée directement dans l'Autostainer .

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

Etape 5 : Montage

Un milieu de montage permanent non aqueux est recommandé. Cependant, un milieu de montage aqueux peut également être utilisé. Respecter les conseils d'utilisation du milieu de montage, donnés par le fournisseur.

REMARQUE : Pour limiter l'atténuation du signal, conserver les lames dans l'obscurité et à température ambiante (20 – 25 °C).

3. Procédure de marquage pour utilisation manuelle

REMARQUE : Eviter que les coupes de tissus ne sèchent pendant la procédure d'immunomarquage. Les coupes de tissus séchées peuvent présenter un marquage non spécifique élevé. Si la durée d'incubation est longue, placer les tissus dans un environnement humide.

Respecter les procédures standards d'immunomarquage manuel en cas d'utilisation du CINtec® Histology Kit en manuel.

3.1 Déparaffinage et réhydratation

Avant le déparaffinage, placer les lames dans une étuve de séchage à une température maximale de 60 °C pendant au moins 20 minutes, sans pour autant dépasser une heure, afin d'éliminer l'eau quantitativement pour améliorer ainsi

l'adhérence du tissu à la lame de verre (« plaquage ») et faire fondre la paraffine. Les lames de tissu doivent être déparaffinées afin d'éliminer le milieu d'inclusion puis être réhydratées avant la procédure d'immunomarquage. Il est important d'éliminer complètement la paraffine, car tout résidu du milieu d'inclusion entraînerait un marquage non spécifique. L'incubation des lames doit être réalisée à température ambiante (20 – 25 °C) conformément aux étapes suivantes.

- 5 (\pm 1) minutes dans un bain de xylène ;
- Recommencer cette opération une fois avec un bain frais ;
- Eliminer l'excès de liquide ;
- 3 (\pm 1) minutes dans de l'éthanol à 95% ;
- Recommencer cette opération une fois avec un bain frais ;
- Eliminer l'excès de liquide ;
- 3 (\pm 1) minutes dans de l'éthanol à 70% ;
- Recommencer cette opération une fois avec un bain frais ;
- Eliminer l'excès de liquide ;
- Au moins 30 secondes dans de l'eau distillée ou désionisée .

Lancer la procédure d'immunomarquage comme indiqué à la Section 3.2, Etape 1 : Démasquage.

Les solutions de xylène et d'alcool ne doivent pas être utilisées pour plus de 40 lames.

3.2 Protocole de marquage pour utilisation manuelle

Etape 1 : Démasquage

- Remplir les cuves à marquage, ex. Coplin jars en plastique, avec le tampon de démasquage dilué (voir la Procédure à la section 1.1) ;
- Placer les cuves à coloration contenant le tampon de démasquage dans un bain-marie et faire chauffer l'eau et le tampon à 95 – 99 °C. Il est important d'ajuster le niveau d'eau du bain-marie de manière à ce que les cuves soient immergées à 80% de leur hauteur. Couvrir les cuves avec leurs couvercles de façon à stabiliser la température et éviter l'évaporation ;
- Immerger les coupes déparaffinées dans le tampon de démasquage préchauffé dans les cuves à coloration. Cette étape entraîne en général une chute de la température dans les cuves sous 90°C ;
- Ramener la température du bain-marie **et** du tampon de démasquage dans les cuves à 95 – 99 °C. Contrôler la température du tampon de démasquage dans les cuves de coloration ;
- Incuber pendant 10 (\pm 1) minutes à 95 – 99 °C. Ne décompter le temps qu'à partir du moment où la température du tampon de démasquage atteint 95 – 99 °C dans les cuves ;
- Retirer la cuve contenant les lames du bain-marie ;
- Laisser les lames revenir progressivement à température ambiante dans le tampon de démasquage pendant 20 (\pm 1) minutes ;

- Laisser décanter le tampon de démasquage et rincer les coupes dans du tampon de lavage (voir la Procédure à la section 1.2) ;
- Pour des performances optimales, laisser tremper les coupes dans le tampon de lavage pendant 5 (± 1) minutes après le démasquage de l'épitope et avant de passer au marquage .

REMARQUE : Le tampon de démasquage est conçu pour une utilisation unique. Ne pas réutiliser.

Etape 2 : Réactif de blocage de la peroxydase

- Appliquer 200 μ l de réactif de blocage de la peroxydase pour recouvrir l'échantillon ;
- Incuber pendant 5 (± 1) minutes ;
- Tapoter pour enlever l'excès de liquide et placer les lames dans un bain de tampon renouvelé pendant 5 (± 1) minutes .

Etape 3 : Anticorps primaire ou réactif de contrôle négatif

- Enlever l'excès de tampon ;
- Recouvrir l'échantillon avec 200 μ l d'anticorps primaire (Mouse Anti-Human p16^{INK4a} ou réactif de contrôle négatif) ;
- Incuber pendant 30 (± 1) minutes ;
- Tapoter pour enlever l'excès de liquide et placer les lames dans un bain de tampon renouvelé pendant 5 (± 1) minutes .

Etape 4 : Réactif de visualisation

- Enlever l'excès de tampon ;
- Recouvrir l'échantillon avec 200 μ l de réactif de visualisation ;
- Incuber pendant 30 (± 1) minutes ;
- Tapoter pour enlever l'excès de liquide et placer les lames dans un bain de tampon renouvelé pendant 5 (± 1) minutes ;
- Répéter deux fois cette étape avec un bain de tampon renouvelé .

Etape 5 : Solution substrat-chromogène (DAB)

- Recouvrir l'échantillon avec 200 μ l de solution substrat-chromogène (DAB) préparée selon la procédure décrite au point 1.3 ci-dessus ;
- Incuber pendant 10 (± 1) minutes ;
- Tapoter pour enlever l'excès de liquide et rincer doucement à l'eau distillée ou désionisée .

Recueillir les déchets de la solution substrat-chromogène (DAB) dans un conteneur pour déchets biologiques de sorte à les éliminer de manière appropriée.

Etape 6 : Contre-coloration (instructions pour l'hématoxyline)

- Immerger les lames dans un bain d'hématoxyline. Incuber pendant 2 – 5 minutes, en fonction de la puissance de l'hématoxyline utilisée ;
- Placer les lames dans un bain d'eau du robinet et rincer doucement à l'eau courante du robinet. Vérifier que tous les résidus d'hématoxyline ont été éliminés ;
- Rincer brièvement et doucement les lames dans un bain d'eau distillée ou désionisée ;

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

Etape 7 : Montage

Un milieu de montage permanent non aqueux est recommandé. Un montage permanent en xylène nécessite une déshydratation comme suit :

- eau distillée ou déionisée
- 3 min 70% éthanol
- 3 min 70% éthanol
- 3 min 96% éthanol
- 3 min 99% éthanol
- 5 min xylène
- 5 min xylène

Cependant, un milieu de montage aqueux peut également être utilisé. Respecter les conseils d'utilisation du milieu de montage, donnés par le fournisseur.

REMARQUE : Pour limiter l'atténuation, conserver les lames dans l'obscurité et à température ambiante (20 – 25 °C).

VII. Contrôle de qualité

Les écarts par rapport aux procédures préconisées pour la fixation des échantillons et leur traitement dans le laboratoire de l'utilisateur peuvent entraîner une variabilité significative des résultats, qui nécessite des contrôles réguliers.

Contrôle tissulaire positif

Les matériaux de contrôle positif externes sont des pièces d'autopsie, de biopsie ou de chirurgie récentes, fixées, traitées et paraffinées dès que possible, de la même manière que les échantillons des patientes. Les contrôles tissulaires positifs indiquent la bonne préparation des tissus et l'adéquation des techniques de marquage. On prévoira un contrôle tissulaire positif externe pour chaque ensemble de conditions de test, dans chaque série de marquage. Les tissus d'origine extérieure employés pour les contrôles positifs doivent être sélectionnés dans des pièces de patientes démontrées positives à la coloration pour p16^{INK4a}. Si les contrôles positifs ne présentent pas le marquage positif adéquat, les résultats des échantillons testés doivent être considérés comme inexploitable.

Contrôle tissulaire négatif

Des types cellulaires connus comme étant négatifs à p16^{INK4a} et présents dans la plupart des coupes tissulaires peuvent être utilisés comme sites de contrôle négatifs internes pour vérifier les spécifications de performances de l'IHC. Si un marquage spécifique (faux positif) se produit dans le contrôle tissulaire négatif, les résultats des échantillons des patientes doivent être considérés comme inexploitable.

Réactif de contrôle négatif non spécifique

Utiliser le réactif de contrôle négatif non spécifique à la place de l'anticorps primaire dans une coupe de chaque pièce de patiente pour évaluer le marquage non spécifique et permettre une meilleure interprétation du marquage spécifique au niveau du site de l'antigène.

Si un marquage spécifique (faux positif) se produit avec le réactif de contrôle négatif non spécifique, les résultats des échantillons des patientes doivent être considérés comme inexploitable.

VIII. Interprétation des résultats

Les échantillons de contrôle marqués avec le réactif de contrôle négatif à l'étape de réactif primaire ne doivent pas présenter de marquage spécifique.

Un marquage positif en utilisant l'anticorps monoclonal anti-humain de souris p16^{INK4a}, clone E6H4™, doit être évalué par rapport à un marquage non spécifique réalisé avec le réactif de contrôle négatif. Comme avec tout test immunohistochimique, un résultat négatif signifie que l'antigène n'a pas été détecté, et non pas que l'antigène n'était pas présent dans les cellules ou tissus testés.

L'interprétation des résultats doit tenir compte du fait que p16^{INK4a} est une protéine cellulaire qui peut être exprimée à un taux détectable dans certaines dysplasies cervicales de haut grade et cancers cervicaux, mais aussi dans certaines situations non associées aux dysplasies cervicales, quoique en quantité différente et avec un mode d'expression différent.

Les échantillons marqués sont évalués selon un système de classement binaire, composé des caractéristiques « positif » et « négatif ».

La caractéristique « positif » est attribuée si l'échantillon de lame marquée p16^{INK4a} présente un marquage continu des cellules des couches cellulaires basales et parabasales de l'épithélium malpighien, avec ou sans marquage des cellules des couches cellulaires superficielles (« modèle de marquage diffus »). Un exemple d'une lame diagnostiquée comme « positive » (« marquage diffus ») est présenté dans l'Annexe 2, figure 1.

La caractéristique « négatif » est attribuée si l'échantillon de lame marquée p16^{INK4a} présente une réaction négative au marquage dans l'épithélium malpighien (« modèle de marquage négatif ») ou un marquage de cellules isolées ou de petits agrégats cellulaires ; à savoir un marquage non continu, particulièrement pour les cellules basales et parabasales (« modèle de marquage focal »). Un exemple d'une lame diagnostiquée comme « négative » (« marquage focal ») est présenté dans l'Annexe 2, figure 2.

Les lames marquées pour la recherche de p16^{INK4a} avec le CINtec® Histology Kit doivent être interprétées en relation avec des lames de coloration H&E préparées dans la même pièce de tissu cervical. Les informations complémentaires fournies par les lames de marquage CINtec® doivent être associées au diagnostic morphologique préliminaire, posé sur la base des lames de coloration H&E, pour

obtenir le diagnostic final.

IX. Limites

- A usage professionnel uniquement. Une formation spéciale est requise pour l'exécution des procédures d'immunohistochimie.
- L'interprétation clinique d'un marquage positif ou négatif doit être évaluée dans le contexte d'une présentation clinique, de la morphologie et d'autres critères histopathologiques. L'interprétation clinique d'un marquage positif ou négatif doit être complétée par des études morphologiques utilisant des contrôles internes et externes, positifs et négatifs appropriés ainsi que d'autres tests diagnostiques. Un pathologiste qualifié, sachant correctement utiliser les anticorps IHC, les réactifs et les méthodes a la responsabilité d'interpréter toutes les étapes utilisées pour préparer et interpréter la préparation finale d'IHC.
- Les résultats du marquage en immunohistochimie sont dépendants de la qualité des tissus colorés. En conséquence, les étapes de fixation, le lavage, le séchage, le chauffage, la coupe ou la contamination par d'autres tissus contribuent considérablement au résultat global du marquage et peuvent générer des artéfacts, un piégeage des anticorps ou des faux-négatifs. Des résultats incohérents peuvent être dus à des variations dans les méthodes de fixation et d'inclusion ou à des irrégularités inhérentes aux tissus.
- Une contre-coloration excessive ou incomplète peut conduire à une interprétation erronée des résultats.
- Le fabricant fournit les anticorps et les réactifs à une dilution optimale afin qu'ils soient utilisés conformément aux instructions fournies dans le présent manuel, dans le cadre de tests IHC sur des coupes de tissus. Toute déviation par rapport aux procédures de test recommandées peut invalider les résultats obtenus ; des contrôles appropriés doivent être utilisés et documentés. Les utilisateurs qui s'écartent des procédures de test recommandées doivent assumer la responsabilité de l'interprétation des résultats dans ces circonstances.
- Des faux-positifs peuvent être dus à une liaison non immunologique des protéines ou des produits de réaction du substrat. Ils peuvent aussi être causés par une activité pseudoperoxydasique (érythrocytes) et par une activité peroxydasique endogène (cytochrome C).
- Les réactifs peuvent présenter des réactions imprévues sur des tissus qui n'ont pas été testés au préalable. La possibilité de réactions imprévues, même sur des groupes de tissus testés, ne peut pas être complètement éliminée du fait de la variabilité biologique de l'expression antigénique dans les néoplasmes ou d'autres tissus pathologiques. Contacter Roche mtm laboratories AG avec la (les) réaction(s) imprévue(s) documentée(s). Pour des informations sur l'assistance technique, merci de vous reporter aux coordonnées fournies dans la section XIII..
- Ne pas remplacer les réactifs du kit par des réactifs portant d'autres numéros de lot ou par des réactifs provenant d'autres fabricants.

X. Performances

Performances cliniques

Les performances cliniques du CINtec® Histology Kit ont été évaluées dans le cadre d'une étude clinique contrôlée, sur des échantillons de tissus fixés au formol et paraffinés [21]. L'étude avait pour but de démontrer l'adéquation du CINtec® Histology Kit comme moyen d'améliorer la précision du diagnostic et la concordance entre observateurs pour la détection de néoplasmes intraépithéliaux cervicaux de haut grade (CIN2+).

L'étude clinique a été exécutée sur des biopsies cervicales prélevées à l'emporte-pièce ou lors de conisations et recueillies *a posteriori*. Au total, 500 pièces cervicales obtenues de deux laboratoires de pathologie européens et enrichies en dysplasies de haut grade selon leur diagnostic d'origine ont été utilisées pour préparer des lames de coloration H&E et des lames consécutives marquées avec le CINtec® Histology Kit, selon les instructions du fabricant.

Trois experts en gynécologie pathologique européens ont porté un diagnostic indépendant de chaque cas à partir de la lame de coloration H&E. Les cas dont les résultats différaient ont été revus pendant une réunion d'adjudication, et les diagnostics majoritaires (consensus, deux avis sur trois) ont été employés comme diagnostic de référence pour l'étude.

Douze investigateurs (des pathologistes certifiés, pratiquant régulièrement des examens de pathologie cervicale) dans quatre pays d'Europe (France, Italie, Espagne et Allemagne) constituaient le panel d'histologistes de l'étude. Au cours d'une première série d'interprétations, tous les membres du panel ont formulé leur propre diagnostic de chaque cas, sur la seule base des lames de coloration H&E. Les pathologistes n'avaient pas connaissance du diagnostic d'origine ni du diagnostic de référence. Après une période « d'oubli » d'au moins quatre semaines, le même jeu de lames de coloration H&E (avec de nouvelles étiquettes) a été présenté à nouveau aux douze pathologistes du panel, en même temps que les lames correspondantes de chaque cas marquées avec le CINtec® Histology Kit.

Pour évaluer les améliorations de la précision du diagnostic avec les lames cervicales de marquage CINtec® Histology lues en même temps que les lames de coloration H&E, par rapport à la seule coloration H&E, les résultats de chaque pathologiste du panel avec les deux méthodes ont été comparés aux diagnostics de consensus établi comme diagnostic de référence par les trois experts de gynécologie pathologique.

Résultats :

Au total, 482 cas diagnostiqués par tous les pathologistes de l'étude ont été inclus dans l'analyse des données. La fréquence des différentes catégories de diagnostic, selon les diagnostics de consensus établis par les trois experts de gynécologie pathologique, était Dysplasie négative (n=194), CIN1 (n=96), CIN2 (69), et CIN3 (n=123).

Précision du diagnostic pour la détection des CIN2+

La sensibilité globale pour l'identification des CIN2+ est passée de 1787 (H&E) à 2018 (H&E plus CINtec® Histology) vrais positifs pour CIN2+, avec seulement une très légère baisse de la spécificité globale, de 3088 (H&E) à 3051 (H&E plus CINtec® Histology) vrais négatifs pour \leq CIN1.

Tableau 1

Amélioration de la précision de diagnostic pour les CIN (CIN2+) de haut grade par la lecture conjointe des lames H&E et CINtec® Histology par rapport aux lames H&E seules ; le nombre des vrais positifs et vrais négatifs et celui des faux négatifs et faux positifs, par rapport aux consensus de diagnostic des pathologistes expert, sont indiqués. (Remarque : une concordance totale avec les consensus de diagnostic des experts aurait donné 2304 vrais positifs (192 CIN2+, x 12 pathologistes dans le panel).)

	Vrais positifs	Faux négatifs	Faux positifs	Vrais négatifs
H&E	1787	517	392	3088
H&E+CINtec®	2018	286	429	3051

Un modèle ANOVA à effets mixtes pour les pseudo-valeurs selon la méthode Jackknife (méthode Dorfman-Berbaum-Metz ou DBM) a été utilisé pour évaluer les effets du test CINtec® Histology sur la précision.

L'hypothèse nulle selon laquelle la précision des diagnostics basés sur les lames H&E et sur les lames H&E plus CINtec® Histology serait égale pour les CIN2+ a été rejetée avec $p=0,0004$ (aire sous la courbe [AUC, area under the curve] pour H&E : 0,877 ; AUC pour H&E plus CINtec® Histology : 0,925).

Tableau 2

Caractéristiques de performances pour la lecture conjointe de lames colorées par H&E et marquées avec CINtec® Histology par rapport aux lames uniquement colorées par H&E pour l'identification des CIN de haut grade (CIN2+) ; les diagnostics consensuels établis par trois experts en gynécologie pathologique à partir de lames colorées par H&E ont été utilisés comme diagnostics de référence.

	H&E % (95% CI)	H&E plus CINtec® Histology % (95% CI)
Sensibilité	77,6% (75,8, 79,3)	87,6% (86,2, 88,9)
Spécificité	88,7% (87,6, 89,8)	87,7% (86,5, 88,8)
VPP [PPV]	82,0% (80,3, 83,6)	82,5% (80,9, 84,0)
VPN [NPV]	85,7% (84,5, 86,8)	91,4% (90,4, 92,4)
RV+ [DLR+]	6,885 (6,256, 7,578)	7,105 (6,494, 7,773)
RV- [DLR-]	0,253 (0,234, 0,273)	0,142 (0,127, 0,158)

IC à 95%, intervalles de confiance à 95% ; VPP, valeur prédictive positive ; VPN, valeur prédictive négative ; RV+, rapport de vraisemblance positif ; RV-, rapport de vraisemblance négatif

En utilisant les diagnostics consensuels des trois experts en gynécologie pathologique comme référence, on observe une amélioration relative de 13 % de la sensibilité de détection des CIN2+ (la sensibilité des diagnostics par H&E étant de 77,6 %, portée à 87,6 % pour les diagnostics établis sur la base des lames H&E plus CINtec® Histology).

L'augmentation de la précision de diagnostic pour la détection des CIN2+ a été prouvée de manière indépendante et statistiquement significative pour les sous-groupes des biopsies cervicales à l'emporte-pièce (n=249 ; AUC pour H&E : 0,895 ; AUC pour H&E plus CINtec® Histology : 0,929 ; p=0,0053) et les pièces de conisation cervicale (n=233 ; AUC pour H&E : 0,887 ; AUC pour H&E plus CINtec® Histology : 0,948 ; p=0,009).

Concordance entre observateurs pour la détection des CIN2+

L'amélioration de la concordance entre observateurs entre les pathologistes du panel pour la détection des CIN2+ a été réalisée à l'aide d'une forme à notation multiple de statistiques Kappa entre les diagnostics réalisés sur les coupes cervicales en coloration H&E et les diagnostics posés avec les lames de coloration H&E associées aux lames cervicales de marquage CINtec® Histology.

Tableau 3

Amélioration de la concordance entre observateurs pour la détection des CIN2+ par la lecture conjointe de lames de coloration H&E plus CINtec® Histology par rapport aux lames H&E seules. Les valeurs de Kappa sont indiquées comme une mesure de concordance dans laquelle les effets du hasard sont corrigés.

Catégorie de diagnostic	Kappa H&E	Kappa H&E plus CINtec®	Signification statistique
CIN2+, tous échantillons	0,580	0,756	p<0,0001
CIN2+, biopsies à l'emporte-pièce uniquement	0,598	0,748	p<0,0001
CIN2+, biopsies de conisation uniquement	0,548	0,765	p<0,0001

La statistique kappa est une mesure de la concordance entre les pathologistes du panel pour la détection des CIN2+, dans laquelle les effets du hasard sont corrigés; elle est significativement meilleure dans les lectures de lames de coloration H&E plus CINtec® Histology par rapport à la lecture des lames H&E seules (augmentation des valeurs de kappa pour tous les cas de 0,580 à 0,756 ; p<0,0001).

Reproductibilité de la lecture du mode de marquage de p16^{INK4a}

La fiabilité de l'évaluation du mode de marquage de p16^{INK4a} dans les pièces de tissu cervical parmi les pathologistes du panel (positif diffus à p16^{INK4a}, positif focal à p16^{INK4a} ou négatif pour p16^{INK4a}) a été évaluée.

On constate une grande reproductibilité entre les pathologistes pour noter le mode de marquage de p16^{INK4a} comme positif (marquage diffus) ou négatif (marquage focal ou pas d'immunoréactivité). La valeur de kappa (mesure de concordance sans effet de hasard) de reproductibilité entre les douze pathologistes du panel pour la notation du mode de marquage de p16^{INK4a} comme positif (marquage diffus) ou négatif (marquage focal ou pas d'immunoréactivité) a été jugée excellente (kappa moyen = 0,899 ; kappa médian = 0,903).

Performances analytiques

Sensibilité analytique

L'étude de sensibilité a été menée avec des CINtec® Histology Kits provenant de trois lots différents. Trente-cinq biopsies cervicales de lésions avec CIN3+ ont été analysées dans l'étude de sensibilité, dont six biopsies classées en tant que CIN3 et 29 biopsies classées en tant que carcinome épidermoïde.

Parmi les cas classés comme CIN3, cinq sur six (83,3%) présentaient un fort marquage diffus de p16. Un cas de biopsie CIN3 présentait une faible expression de p16 avec absence d'un signal positif clair pour p16.

Parmi les cas classés comme carcinome épidermoïde, 22 sur 29 (75,9%) présentaient un fort marquage diffus de p16. Cinq cas de carcinome épidermoïde présentaient une faible expression de p16 avec absence d'un signal positif clair pour p16. Seuls deux cas sur 29 (6,9%) étaient complètement négatifs pour p16. Cela peut s'expliquer, car il a été rapporté que 3 à 8% des cas de carcinome épidermoïde sont négatifs pour le marquage de p16 [1; 6]. Cela peut refléter un faible pourcentage de cas où la différenciation et les réarrangements chromosomiques entraînent l'inactivation ou la délétion du locus du gène de p16.

Pour les trois lots, le marquage sur un panel bien caractérisé de coupes de tissus de rat à l'aide du réactif de contrôle négatif s'est traduit par un marquage fort et spécifique de neurones individuels dans le cerveau de rat. De plus, certaines cellules canaliculaires du rein, des macrophages isolés dans la rate ainsi que des macrophages isolés et des cellules plasmatiques dans l'intestin grêle présentaient un faible marquage. Les autres tissus du panel de tissus de rat étaient complètement négatifs.

L'anticorps E6H4™ anti-p16 est capable de donner un marquage continu des cellules des couches basales et parabasales, avec ou sans marquage des cellules des couches intermédiaires ou superficielles de l'épithélium malpighien dans les biopsies cervicales avec CIN de haut grade (CIN2, CIN3). Le réactif de contrôle négatif (NRC) est capable de détecter spécifiquement les neurones du rat.

Spécificité analytique

La spécificité du clone E6H4™ de l'anticorps de souris anti-p16^{INK4a} humaine a été vérifiée par western blot (résultat positif pour le lysat de cellules HeLa ; voir aussi [1]).

L'étude de spécificité a été menée avec des CINtec® Histology Kits provenant de trois lots différents sur un panel bien caractérisé de 90 échantillons de tissus normaux (de 30 types de tissus différents) fixés au FNT (formol neutre tamponné) et de 54 tissus tumoraux autres que le col de l'utérus (arrangés en matrices multitissus [MTA, Multi Tissue Arrays]).

Pour le marquage des tissus normaux à l'aide de l'anticorps spécifique de p16 (clone E6H4™), 16 tissus différents négatifs pour p16 (cerveau, cervelet, glande surrénale, thyroïde, moelle osseuse, cœur, œsophage, estomac, intestin, côlon, foie, rein, muscle strié, peau, mésothélium, col de l'utérus) et 14 tissus différents positifs pour p16 (faible marquage : hypophyse, poumon, thymus, prostate ; positifs : nerfs, intestin, amygdale, pancréas, rate ; fortement positifs : utérus, ovaire, sein, testicule, parathyroïde) ont été observés. Pour la coloration des tissus tumoraux autres que le col de l'utérus avec l'anticorps spécifique de p16 (clone E6H4™), 22 cas différents de tumeurs négatives pour p16 et 32 cas

différents de tumeurs positives pour p16 ont été observés.

Pour les trois lots de CINtec® Histology, les résultats étaient négatifs pour tous les tissus testés (tissus normaux et tissus tumoraux) lors de l'utilisation du réactif de contrôle négatif. L'anticorps monoclonal de souris antineurophysine associée à l'ocytocine du rat ne réagit pas de manière notable avec les tissus normaux humains et les tissus tumoraux humains.

Reproductibilité

Reproductibilité inter-séries

La reproductibilité inter-séries du CINtec® Histology Kit a été déterminée au moyen du protocole manuel en marquant 36 lames préparées à partir de blocs de tissus diagnostiqués comme CIN2+. Les zones dysplasiques de toutes les coupes ont été marquées avec une intensité comparable (+/- 0,5 sur une échelle de 0 à 3) dans toutes les séries. Les zones normales de toutes les coupes ne présentaient aucun marquage spécifique.

Reproductibilité intra-série

La reproductibilité intra-série a été déterminée à l'aide du CINtec® Histology Kit selon le protocole manuel et à l'aide de l'automate Autostainer sur trois jours différents. Au total, trois blocs de tissus diagnostiqués comme CIN2+ ont été utilisés. Une coupe successive de chaque bloc était employée chaque jour. La zone dysplasique des coupes d'un bloc était marquée avec une intensité comparable (+/- 0,5 sur une échelle de 0 à 3) tous les jours, en mode de marquage manuel aussi bien qu'automatique. Les zones normales de toutes les coupes ne présentaient aucun marquage spécifique.

Reproductibilité entre lots

Pour déterminer la reproductibilité entre lots, des CINtec® Histology Kits de 3 lots différents ont été utilisés pour marquer des coupes de tissus de CIN2+. Un marquage manuel et automatique a été effectué selon le protocole donné dans le mode d'emploi. La zone dysplasique des coupes d'un bloc était marquée avec une intensité comparable (+/-0,5 sur une échelle de 0 à 3) pour les trois lots, en mode manuel et automatique. Les zones normales de toutes les coupes ne présentaient aucun marquage spécifique.

Il convient de noter que la méthode d'attribution du score sur une échelle de 0 à 3 pour l'intensité du marquage n'a été utilisée que pour l'évaluation des performances analytiques et ne doit pas être utilisée pour l'interprétation du marquage des coupes de tissus dans la pratique clinique. Au lieu de cela, l'interprétation qualitative des lames marquées doit être utilisée comme indiqué dans la section VIII pour l'interprétation de routine.

XI. Dépannage

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

Problème	Cause probable	Action recommandée
1. Aucun marquage des lames	1a. Les conseils d'utilisation n'ont pas été respectés ;	1a. Lire attentivement les instructions d'utilisation et respecter les procédures qui y sont décrites ;
2. Marquage faible des lames	2a. Mauvais démasquage de l'épitope ;	2a. Utiliser un tampon de démasquage préparé récemment et/ ou vérifier que le tampon de démasquage atteint 95 – 99 °C pendant 10 bonnes minutes. La laisser refroidir pendant 20 autres minutes ;
	2b. Durées d'incubation des réactifs inadéquates ;	2b. Revoir les recommandations 2.2. / 3.2. du protocole de marquage ;
	2c. Méthode de fixation inappropriée ;	2c. S'assurer que le tissu du patient n'est pas fixé de manière excessive et qu'aucun autre fixateur n'a été utilisé ;
	2d. L'eau utilisée pour diluer la solution de démasquage de l'épitope contient une concentration d'ions trop élevée ;	2d. Vérifiez que la colonne échangeuse d'ions utilisée pour produire l'eau désionisée a été contrôlée au cours de l'entretien de routine ;

	2e. Déparaffinage incomplet ;	2e. Les utilisateurs doivent savoir que les variations de la température de l'équipement ou de la durée d'exposition pendant la préparation des échantillons avant l'analyse peuvent entraîner un déparaffinage incomplet des lames de tissus. Dans toutes les méthodes de coloration histologique, y compris la coloration CINtec® Histology, la présence de résidus de paraffine peut entraîner une coloration incomplète. Les laboratoires d'histopathologie doivent prévoir un contrôle régulier de l'équipement visant à réduire les variations des conditions de préparation des échantillons avant la coloration. L'apparition de zones nettement délimitées dans les zones de tissus immunoréactives ou d'autres hétérogénéités de la coloration d'une lame peuvent indiquer, quelle que soit la méthode de coloration immunohistochimique, un traitement inadéquat ou incomplet de l'échantillon avant l'analyse. En cas de telles anomalies de coloration, l'équipement et les méthodes de préparation des échantillons avant analyse doivent être contrôlés ;
3. Marquage de fond excessif des lames	3a. La paraffine n'a pas été complètement enlevée ;	3a. Utiliser de nouveaux bains de xylène et suivre la procédure décrite à la Section 2.1. / 3.1 ;
	3b. De l'amidon a été utilisé comme additif lors du montage des coupes sur les lames ;	3b. L'utilisation d'amidon comme additif pour monter les coupes peut provoquer de l'immunoréactivité et doit de ce fait être évitée ;
	3c. Les lames ne sont pas bien rincées ;	3c. Utiliser une nouvelle solution dans les bains de tampon et laver les flacons ;
	3d. Les coupes ont séché au cours de la procédure de marquage ;	3d. Utiliser une chambre humide. Essuyer seulement trois à quatre lames en même temps avant d'appliquer le réactif ;
	3e. Méthode de fixation inappropriée ;	3e. Utiliser seulement le fixateur recommandé. Un tissu fixé de manière anormale peut provoquer un marquage de fond excessif ;
	3f. Liaison non spécifique des réactifs aux tissus ;	3f. Vérifier la méthode de fixation de l'échantillon et la présence de nécrose ;
4. Le tissu se détache des lames	4a. Utilisation de lames inadéquates ;	4a. Respecter les recommandations et utiliser des lames SuperFrost® Plus ;

5. Marquage spécifique trop fort	5a. Méthode de fixation inappropriée ;	5a. S'assurer que des fixateurs et des méthodes de fixation appropriés ont été utilisés ;
	5b. Durées d'incubation des réactifs trop longues ;	5b. Réviser et respecter le protocole de marquage décrit aux sections 2.2 / 3.2 ci-dessus ;
	5c. Une solution de lavage inappropriée a été utilisée ;	5c. Utiliser le tampon de lavage (10 x) (numéro de code 10215364001).

XII. Symboles

Symbole :



Explication :

Numéro de code

Code du lot

Code article international

Identifiant unique des dispositifs

Dispositif médical de diagnostic in vitro

Fabricant

Quantité suffisante pour <n> tests

Consulter les instructions d'utilisation

Utiliser avant

Limites de température

Date de fabrication

Ne pas réutiliser

Coordonnées de l'assistance technique
(téléphone)

Contient des matières d'origine animale

Contenu

XIII. Fabricant

Fabriqué par :

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim
Allemagne

<https://navifyportal.roche.com>

Coordonnées de l'assistance technique (téléphone) : +800 5505 6606

Le résumé des caractéristiques de sécurité et de performances peut être consulté ici : <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>

XIV. Etat de la révision

Ces instructions d'utilisation représentent la Version 1.0, parue en juin 2024.

Modifications par rapport à la version précédente pour le produit réf. 9511 / 06594441001 (2.9, sortie en décembre 2022) :

- Le fabricant a été remplacé par Roche Diagnostics GmbH au lieu de Roche mtm laboratories AG, ce qui a entraîné l'attribution d'un nouveau numéro de produit, 10213370001.
- Modifications apportées à la rédaction du texte

XV. Propriété intellectuelle

CINtec et E6H4 sont des marques commerciales de Roche.

Toutes les autres marques commerciales appartiennent à leurs propriétaires respectifs.

© 2024 Roche

Annexe 1 Références

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

Annexe 2

Exemple de marquage diffus

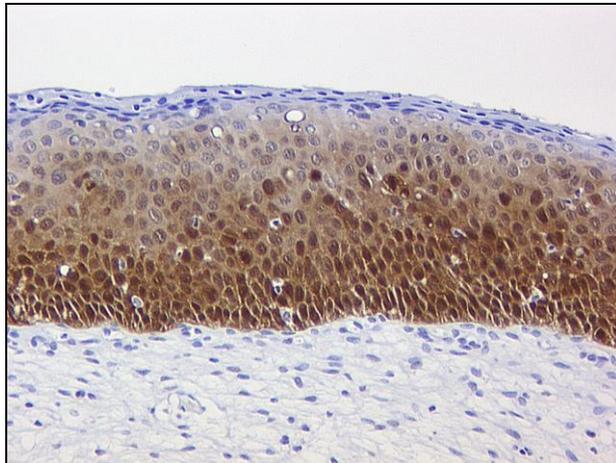


Fig. 1: CIN 3

Exemple de marquage focal

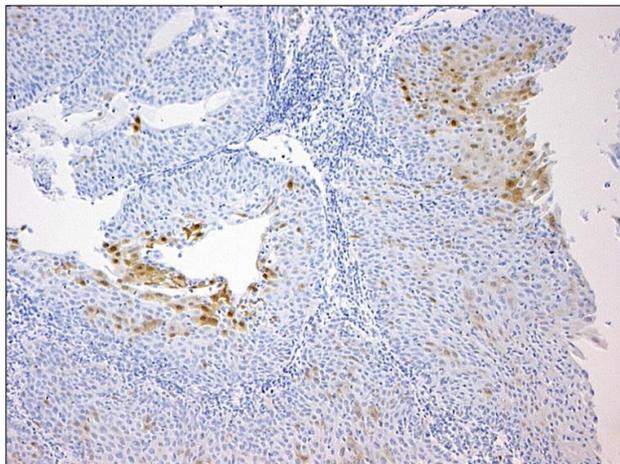


Fig. 2: Métaplasie malpighienne mature