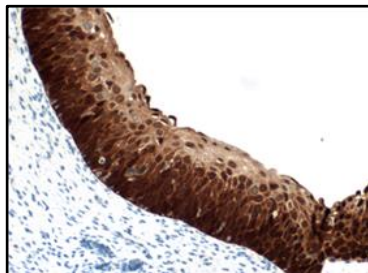


CINtec® p16 Histology

REF	805-4713	Σ	50
	06695248001		
REF	825-4713	Σ	250
	06695256001		
IVD			



Obr. 1. Barvení cervikálních skvamózních epitelových buněk s protilátkou CINtec p16 Histology.

URČENÉ POUŽITÍ

CINtec p16 Histology je imunohistochemický test pro kvalitativní detekci proteinu p16^{INK4a} na řezech tkáně fixované formalínem, zalité parafinem, které byly připraveny z biopsií děložního hrdla. Je indikován k použití ve spojení se skličky obarvenými H&E, připravenými ze stejného vzorku cervikální tkáně jako pomůcka ke zvýšení přesnosti diagnostiky a shody mezi pozorovateli při diagnostice cervikální intraepiteliální neoplazie vysokého stupně.

Tento produkt musí být interpretován kvalifikovaným patologem v kombinaci s histologickým vyšetřením, relevantními klinickými informacemi a správnými kontrolami. Tato protilátka je určena pro diagnostické použití in vitro (IVD).

SOUHRN A VYSVĚTLENÍ

CINtec p16 Histology sestává z jediné složky: anti-p16^{INK4a} (E6H4), myši monoklonální primární protilátka.

Jako inhibitor cyklin-dependentní kinázy hraje p16^{INK4a} (p16) klíčovou roli v progresi buněčného cyklu a buněčné diferenciaci.¹⁻⁴ Protein p16^{INK4a} řídí přechod fází G1-S zprostředkovaný retinoblastomovým proteinem (pRB) a spouští zastavení buněčného cyklu v průběhu procesu buněčné diferenciace.^{1,5} V normálních, terminálně diferencovaných buňkách je p16^{INK4a} exprimován na nízkých úrovních, obvykle jej nelze imunohistochemicky detekovat.^{1,5} Výzkumné studie zjistily, že silná nadměrná exprese p16^{INK4a} v předrakovinných a rakovinných tkáních je úzce spojena s expresí onkoproteinu lidského papilomaviru (HPV) E7.^{1,3,6,7,8}

Detekce nadměrné exprese p16 pomocí IHC může pomoci při interpretaci histologických vzorků děložního hrdla. Bylo prokázáno, že protein p16 je nadměrně exprimován v neoplastických skvamózních epitelových buňkách děložního hrdla, přičemž bylo zjištěno, že v normálním epitelu a v neoplastických lézích většinou chybí.^{1,2,5,6,7} Četné studie zkoumaly korelaci mezi nadměrnou expresí p16 a přítomností cervikální intraepiteliální neoplazie (CIN).^{8,9} Nadměrná exprese p16 byla pozorována prakticky ve všech lézích CIN3, převážně většině lézí CIN2 a obvykle u 40 % až 60 % skvamózních cervikálních lézí klasifikovaných jako CIN1 v tkáňových řezech obarvených H&E.⁸⁻¹³

KLINICKÝ VÝZNAM

Diagnostická interpretace vzorků z biopsie děložního hrdla vytváří základ pro rozhodnutí o léčbě pacientky. CIN1 je histologický projev infekce HPV. Obecně se doporučuje, aby se pacientky s diagnostikovanou lézí CIN1 vrátily k následnému vyhodnocení do jednoho roku.¹⁴ U cervikálního onemocnění je CIN2 nejčastěji používanou klinickou prahovou hodnotou pro léčbu.¹⁴ U pacientek s diagnostikovanou CIN2 nebo CIN3 se doporučuje excizivní nebo ablativní léčba. Riziko excizivní léčby pacientky v plodném věku zahrnuje nežádoucí účinky na budoucí těhotenství.^{15,16,17} Proto je při rozhodování o léčbě pacientky důležitá přesná diagnóza CIN, zejména CIN2 a CIN3.¹⁸ Morfologická interpretace vzorků z biopsie děložního hrdla pouze pomocí H&E podléhá variabilitě mezi pozorovateli.¹⁸⁻²⁵ Několik studií hodnotilo doplňkové použití skliček obarvených s p16 a vliv na spolehlivost mezi pozorovateli při diagnostické interpretaci histologických vzorků děložního hrdla pathology. Ve všech těchto studiích se diagnostická

shoda mezi pathology významně zlepšila, když byla sklička, obarvená s p16, interpretována společně se skličky obarvenými H&E ve srovnání s interpretací samotného sklička obarveného H&E.^{10, 11, 13, 21, 22, 26, 27, 28}

Několik studií dále hodnotilo účinek na diagnostickou přesnost interpretace histologie děložního hrdla, když byla použita sklička obarvená s p16 spolu se skličky obarvenými H&E. Dijkstra a kolegové (2010) prokázali téměř dokonalou shodu mezi diagnózami stanovenými s podporou skliček obarvených s p16 interpretovaných jediným patologem ve srovnání s posuzovanými diagnózami stanovenými panelem odborných patologů pouze na základě barvení H&E.¹⁰ Bergeron a kolegové uvádějí významné zvýšení diagnostické přesnosti, když interpretace zahrnovala jak sklička obarvená s p16, tak sklička obarvená H&E ve srovnání se samotnou interpretací skliček obarvených H&E (p = 0.0004), přičemž senzitivita pro ≥ CIN2 se zvýšila ze 77 % na 87 %.¹¹ V nedávné prospektivní populační studii, ve které akademické klinické centrum v USA analyzovalo více než 1450 po sobě jdoucích případů z biopsie děložního hrdla, bylo zjištěno, že barvení na p16 „je užitečným a spolehlivým diagnostickým doplňkem pro rozlišení biopsií s nebo bez CIN2+“.¹² Proto má doplňková interpretace skliček obarvených H&E, zahrnujících řezy z biopsie děložního hrdla, spolu s následnými skličky ze stejného vzorku tkáně imunologicky obarvené na p16, potenciál významně zlepšit diagnostickou shodu při interpretaci biopsií děložního hrdla.

PRINCIP POSTUPU

CINtec p16 Histology je myši monoklonální primární protilátka produkovaná proti proteinu p16^{INK4a}. Protilátka CINtec p16 Histology se váže na protein p16^{INK4a} v tkáňových řezech fixovaných formalínem, zalitých parafinem (FFPE) a vykazuje jaderný a/nebo cytoplazmatický vzor barvení. Tuto protilátku je možné zobrazit pomocí detekční soupravy OptiView DAB IHC Detection Kit (kat. č. 760-700 / 06396500001) nebo *ultraView* Universal DAB Detection Kit (kat. č. 760-500 / 05269806001). Další údaje naleznete v příslušném metodickém listu.

DODÁVANÝ MATERIÁL

CINtec p16 Histology (kat. č. 805-4713 / 06695248001) obsahuje dostatek reagentů pro 50 testů.

Jeden 5mL dávkovač protilátky CINtec p16 Histology obsahuje přibližně 5.0 µg myši monoklonální protilátky.

CINtec p16 Histology (kat. č. 825-4713 / 06695256001) obsahuje dostatek reagentů pro 250 testů.

Jeden 25mL dávkovač protilátky CINtec p16 Histology obsahuje přibližně 25.0 µg myši monoklonální protilátky.

Tato protilátka je naředěna v Tris-HCl s obsahem nosičového proteinu a 0.10 % konzervačního prostředku ProClin 300.

Koncentrace specifické protilátky je přibližně 1.0 µg/mL. Pro tento produkt není známa žádná nespecifická reaktivita protilátky.

Protilátka CINtec p16 Histology je rekombinantní myši monoklonální protilátka purifikovaná ze supernatantu buněčné kultury.

Podrobné popisy následujících položek naleznete v příslušném metodickém listu v detekční soupravě VENTANA: Princip postupu, Materiál a metody, Odběr vzorků a příprava pro analýzu, Postupy kontroly kvality, Řešení problémů, Interpretace výsledků a Omezení.

POTŘEBNÉ MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY

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

Ne všechny výrobky uvedené v příbalové informaci musejí být dostupné ve všech zeměpisných oblastech. obraťte se na místní servisní zastoupení.

Následující reagentie a materiály mohou být při barvení potřebné, nejsou však součástí dodávky:

1. Doporučená kontrolní tkáň
2. Mikroskopická sklička, kladně nabitá
3. Negative Control (Monoclonal) (kat. č. 760-2014 / 05266670001)
4. OptiView DAB IHC Detection Kit (kat. č. 760-700 / 06396500001)
5. *ultraView* Universal DAB Detection Kit (kat. č. 760-500 / 05269806001)
6. Antibody Diluent (kat. č. 251-018 / 05261899001)
7. EZ Prep Concentrate (10X) (kat. č. 950-102 / 05279771001)
8. Reaction Buffer Concentrate (10X) (kat. č. 950-300 / 05353955001)

9. LCS (Predilute) (kat. č. 650-010 / 05264839001)
10. ULTRA LCS (Predilute) (kat. č. 650-210 / 05424534001)
11. Cell Conditioning Solution (CC1) (kat. č. 950-124 / 05279801001)
12. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (kat. č. 950-224 / 05424569001)
13. Hematoxylin II (kat. č. 790-2208 / 05277965001)
14. Bluing Reagent (kat. č. 760-2037 / 05266769001)
15. Trvalé fixační médium
16. Krycí sklo
17. Automatizovaný podavač krycích skliček
18. Obecné laboratorní vybavení
19. Přístroj BenchMark IHC/ISH

SKLADOVÁNÍ A STABILITA

Po přijetí a mezi použitími uchovávejte při teplotě 2–8 °C. Nezmrazujte.

Aby byla zajištěna správná funkčnost reagentie a stabilita protilátky, musí se dávkovač po každém použití uzavřít víčkem a okamžitě umístit ve svislé poloze do chladničky.

Každý dávkovač protilátky má stanovenou dobu expirace. Při řádném skladování zůstane reagentie stabilní do data uvedeného na štítku. Po uplynutí data expirace reagentii nepoužívejte.

PŘÍPRAVA VZORKŮ

Pro použití této primární protilátky s detekčními soupravami VENTANA a přístroji BenchMark IHC/ISH jsou vhodné tkáně FFPE zpracované běžným způsobem. Doporučeným vhodným fixativem na tkáň je 10% neutrální pufovaný formalin.²⁹ Je třeba pořídit řezy o tloušťce přibližně 4 µm a fixovat je na kladně nabitá podložní sklička. Sklička je třeba obarvit neprodleně, neboť antigenost připravených tkáňových řezů se může postupem času snižovat. Pro více informací požádejte místního zástupce společnosti Roche o kopii dokumentu „Recommended Slide Storage and Handling“ (Doporučené postupy pro skladování skliček a manipulace s nimi).

Vyšetření neznámých vzorků doporučujeme provádět souběžně s pozitivními a negativními kontrolními vzorky.

VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

1. Určeno k diagnostickému použití in vitro (IVD).
2. Pouze k odbornému použití.
3. Nepoužívejte nad rámec specifikovaného počtu testů.
4. Roztok ProClin 300 se používá v této reagentii jako konzervační prostředek. Je klasifikován jako dráždivý a při styku s kůží může způsobit senzibilizaci. Při manipulaci dodržujte příslušná bezpečnostní opatření. Zamezte kontaktu reagentii s očima, kůží a sliznicemi. Používejte ochranný oděv a rukavice.
5. Kladně nabitá sklička mohou být citlivá na zátěž prostředí, což má za následek nevhodné zbarvení. Požádejte zástupce společnosti Roche o další informace o tom, jak používat tyto typy skliček.
6. S materiálem lidského nebo živočišného původu je třeba nakládat jako s biologicky nebezpečným materiálem a likvidovat jej v souladu s platnými bezpečnostními opatřeními. V případě expozice je potřeba se řídit zdravotnickými směnicemi odpovědných orgánů.^{30,31}
7. Zabraňte kontaktu reagentii s očima a sliznicemi. Jestliže se reagentie dostanou do kontaktu s citlivými oblastmi, omyjte zasažené oblasti vydatným množstvím vody.
8. Zabraňte mikrobiální kontaminaci reagentii, mohla by způsobit nepřesnost výsledků.
9. Další informace o používání tohoto prostředku obsahuje uživatelská příručka přístroje BenchMark IHC/ISH a návody k použití všech nezbytných součástí, které naleznete na internetových stránkách navifyportal.roche.com.
10. Doporučené metody likvidace jsou uvedeny v celostátních a/nebo místních předpisech.
11. Označení produktu bezpečnostními štítky se řídí hlavně pokyny GHS EU. Pro profesionální uživatele je na vyžádání k dispozici bezpečnostní list.
12. Pro nahlášení podezřelých závažných incidentů týkajících se tohoto prostředku se obraťte na místního zástupce společnosti Roche a kompetentní orgány členského státu nebo země, ve které uživatel provozuje činnost.

Tento produkt obsahuje součásti klasifikované následovně podle směrnice (ES) č. 1272/2008:

Tab. 1. Informace o rizicích.

Riziko	Kód	Věta
	H317	Může vyvolat alergickou kožní reakci.
	H412	Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky.
	P261	Zamezte vdechování mlhy a par.
	P273	Zabraňte uvolnění do životního prostředí.
	P280	Používejte ochranné rukavice.
	P333 + P313	Při podráždění kůže nebo výrazce: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.
	P362 + P364	Kontaminovaný oděv svlékněte a před opětovným použitím vyperte.
	P501	Odstraňte obsah/obal předáním do schváleného zařízení k likvidaci odpadu.

Tento produkt obsahuje látku s č. CAS 55965-84-9, reakční směs: 5-chlor-2-methyl-2H-isothiazolin-3-onu a 2-methyl-2H-isothiazol-3-onu (3 : 1).

POSTUP BARVENÍ

Primární protilátky VENTANA byly vyvinuty pro použití v přístrojích BenchMark IHC/ISH společně s detekčními soupravami a příslušenstvím VENTANA. Doporučené barvicí protokoly naleznete v Tab. 2 a Tab. 3.

Tato protilátka byla optimalizována pro specifické inkubační doby, uživatel však musí výsledky získané pomocí této reagentie validovat.

Parametry automatických procesů lze zobrazit, vytisknout a upravovat podle postupů uvedených v uživatelské příručce přístroje. Další podrobné informace o postupech imunohistochemického barvení naleznete v metodickém listu k příslušné detekční soupravě VENTANA.

Další podrobnosti o správném používání tohoto prostředku najdete v metodickém listu ke vkládacímu dávkovači (P/N 805-4713 nebo P/N 825-4713).

Tab. 2. Doporučený barvicí protokol pro protilátku C1Ntec p16 Histology se soupravou ultraView Universal DAB Detection Kit na přístrojích BenchMark IHC/ISH.

Typ postupu	Metoda		
	GX	XT	ULTRA nebo ULTRA PLUS
Odparafinování	Zvoleno	Zvoleno	Zvoleno
Cell Conditioning (Odmaskování antigenu)	CC1, standardní	CC1, standardní	ULTRA CC1, 64 minut 95 °C
Protilátka (primární)	24 minut, 37 °C	16 minut, 37 °C	20 minut, 36 °C
ultraBlock*	8 minut	n/a	n/a
Kontrastní barvivo	Hematoxylin II, 4 minuty		
Po kontrastním barvení	Bluing, 4 minuty		

* V kroku ultraBlock použijte ředidlo protilátky Antibody Diluent.

Tab. 3. Doporučený barvicí protokol pro protilátku CINtec p16 Histology se soupravou OptiView DAB IHC Detection Kit na přístrojích BenchMark IHC/ISH.

Typ postupu	Metoda		
	GX	XT	ULTRA nebo ULTRA PLUS
Odparafinování	Zvoleno	Zvoleno	Zvoleno
Cell Conditioning (Odmaskování antigenu)	CC1, 32 minut	CC1, 48 minut	ULTRA CC1, 48 minut 100 °C
Preprimární inhibitor peroxidázy	Zvoleno	Zvoleno	Zvoleno
Protílátka (primární)	8 minut, 37 °C	8 minut, 37 °C	12 minut, 36 °C
Postfixativ*	8 minut	n/a	n/a
Kontrastní barvivo	Hematoxylin II, 4 minuty		
Po kontrastním barvení	Bliuing, 4 minuty		

* V kroku následné fixace použijte ředidlo protilátky Antibody Diluent.

Vzhledem k různým způsobům fixace a zpracování tkání, jakož i obecnému stavu přístroje a podmínkám laboratorního prostředí může být potřeba prodloužit nebo zkrátit dobu inkubace s primární protilátkou, dobu úpravy buněk nebo dobu předběžného zpracování proteázou v závislosti na jednotlivých vzorcích, použité metodě detekce a vlastní preferenci hodnotitele. Další informace o různých fixacích naleznete v příručce „Immunohistochemistry Principles and Advances“ (Zásady a postupy imunohistochemie).³²

NEGATIVNÍ REAGENČNÍ KONTROLA

Kromě obarvení protilátkou CINtec p16 Histology by mělo být provedeno obarvení druhého sklíčka s odpovídající reagecemi negativní kontroly.

POZITIVNÍ KONTROLNÍ TKÁŇ

Nejvhodnějším laboratorním postupem je uložit řez pro pozitivní kontrolu na stejné sklíčko jako testovanou tkáň. Při nanášení reagentie na sklíčko pak lze snáze zjistit případné závady. Pro kontrolu kvality je nejvhodnější tkáň se slabým pozitivním zbarvením. Kontrolní tkáň může obsahovat pozitivně i negativně zabarvené prvky a sloužit pro pozitivní i negativní kontrolu. Kontrolní tkáň by měl být čerstvý vzorek z pitvy, biopsie nebo operace, připravený a fixovaný co nejdříve stejným způsobem jako testované řezy. Známé pozitivní kontroly tkání je nutno používat pouze ke sledování správné funkce reagentií a přístrojů, nikoli jako pomůcku ke stanovení konkrétní diagnózy testovaných vzorků. Pokud pozitivní kontroly tkání pozitivní zbarvení nevykazují, je třeba považovat výsledky testovaných vzorků za neplatné.

Příklady tkání pro pozitivní kontrolu této protilátky jsou normální slinivka, normální mandle a karcinom děložního hrdla.

V normální tonzilární tkáni dochází k nukleárnímu a/nebo cytoplazmatickému barvení rozptýlených skvamózních epitelových buněk primárně v epitelu krypt a rozptýlených folikulárních dendritických buněk v zárodečných centrech a je zde absence barvení u většiny lymfocytů (lze pozorovat barvení vzácných lymfocytů).

INTERPRETACE BARVENÍ / OČEKÁVANÉ VÝSLEDKY

Vzor barvení buněk pro protilátku CINtec p16 Histology je jaderný a/nebo cytoplazmatický.

Nadměrná exprese biomarkeru p16^{INK4a} ve vzorcích z biopsie děložního hrdla je reprezentována jako difúzní kontinuální barvení buněk bazálních a parabazálních buněčných vrstev cervikálního skvamózního epitelu, s barvením nebo bez barvení mezilehlých nebo mezilehlých až povrchových buněčných vrstev. Tento kontinuální, difúzní vzor barvení představuje pozitivní stav CINtec p16 Histology. Fokální barvení je reprezentováno nekontinuálním barvením izolovaných buněk nebo malých buněčných shluků, zejména ne bazálních a parabazálních buněk. Fokální barvení a žádné barvení p16 představují negativní histologický stav CINtec p16 Histology. Vzor barvení p16 a kritéria stavu CINtec p16 Histology jsou uvedené v Tab. 4.

Tab. 4. Stav CINtec p16 Histology a vzory barvení p16.

Stav CINtec p16 Histology	Vzor barvení p16	Popis zbarvení
Pozitivní	Difúzní	Kontinuální barvení buněk bazálních a parabazálních buněčných vrstev cervikálního skvamózního epitelu, s barvením nebo bez barvení mezilehlých nebo mezilehlých až povrchových buněčných vrstev
Negativní	Fokální	Barvení izolovaných buněk nebo malých buněčných shluků; tj. nekontinuální barvení, zejména ne bazálních a parabazálních buněk
	Žádné barvení p16	Reakce s negativním barvením ve skvamózním epitelu

SPECIFICKÁ OMEZENÍ

CINtec p16 Histology může prokázat barvení fibroblastů a sloupcového epitelu v cervikálních tkáních, což neinterferuje s interpretací.

Systém detekce OptiView Detection je obecně citlivější než systém detekce *ultraView* Detection. Uživatel však musí výsledky získané pomocí této reagentie a detekčních systémů validovat.

Pacientská tkáň by měla být obarvena do 24 týdnů od nařezání z tkáňového bloku. Výkon barvení s protilátkou CINtec p16 Histology na řezech, které byly skladovány při teplotě místnosti déle než 24 týdnů, nebyl ověřen.

Vzorky by měly být fixovány alespoň 1 hodinu v 10% NBF, zinkovém formalinu nebo Z-fixu anebo alespoň 3 hodiny ve fixačním prostředku AFA. Použití dob fixace anebo typů fixativů jiných než doporučených může vést k falešně negativním výsledkům. Alkoholové fixativy, formalin a PREFER nejsou pro tento test doporučovány.

Všechny testy nemusejí být registrovány na každém přístroji. Pro více informací kontaktujte místního zástupce společnosti Roche.

FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY

ANALYTICKÁ VÝKONNOST

Níže jsou uvedeny výsledky provedených testů barvení týkajících se senzitivity, specifity, preciznosti a správnosti.

Senzitivita a specifita

Analytická senzitivita a specifita byly stanoveny barvením několika případů běžných a neoplastických lidských tkání protilátkou CINtec p16 Histology. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 5 a Tab. 6. Mnoho běžných tkání prokázalo barvení několika buněk nebo specifických typů buněk, jak je uvedeno. To se očekává vzhledem k roli proteinu p16^{INK4a} v regulaci buněčného cyklu.

Tab. 5. Senzitivita/specifita protilátky CINtec p16 Histology byla stanovena testováním běžných tkání FFPE.

Tkáň	Počet pozitivních případů / celkový počet případů	Pozitivní buňky v běžné tkáni
Velký mozek	4/4	Gloivé buňky
Mozeček	3/3	Purkyňovy buňky
Nadledvinka	3/3	Adrenokortikální epitelové buňky
Vaječník	3/3	Stromální buňky

Tkáň	Počet pozitivních případů / celkový počet případů	Pozitivní buňky v běžné tkáni
Slinivka	3/3	Langerhansovy ostrůvky, acinární buňky
Lymfatická uzlina	3/3	Lymfocyty, folikulární dendritické buňky
Příštitné tělísko	2/3	Hlavní buňky
Hypofýza	3/3	Přední hypofýzové epitelové buňky
Varle	3/3	Spermatogenní buňky, Leydigovy buňky
Štítná žláza	3/3	Folikulární buňky
Prs	3/3	Myoepiteliální buňky, lumenální epitelální buňky, stromální buňky
Slezina	3/3	Lymfocyty, folikulární dendritické buňky
Mandle	6/6	Skvamózní epitelové buňky, lymfocyty, folikulární dendritické buňky
Brzlík	3/3	Epitelové retikulární buňky, lymfocyty, Hassalova tělíska
Kostní dřeň	2/3	Myeloidní buňky
Plíce	3/3	Pneumocyty, bronchiální epitelové buňky
Srdce	0/3	Žádné pozitivní buňky
Jícen	3/3	Skvamózní epitelové buňky
Žaludek	3/3	Epitelové buňky, fundické žlázy
Tenké střevo	3/3	Epitelové buňky
Tlusté střevo	3/3	Epitelové buňky
Appendix	0/3	Žádné pozitivní buňky
Játra	0/3	Žádné pozitivní buňky
Slinná žláza	3/3	Buňky pruhovaného epitelu, serózní acinární buňky
Hltan / ústní dutina	2/3	Respirační epitelové buňky, epitelové buňky pruhovaného kanálu, slizniční acinární buňky, serózní acinární buňky
Ledvina	3/3	Tubulární epitelové buňky, mezangiální buňky glomerulů
Prostata	3/3	Acinární buňky, bazální buňky
Močový měchýř	3/3	Uroteliální buňky
Endometrium	3/3	Žlázové buňky endometria, stromální buňky
Děložní hrdlo ^a	1/120	Skvamózní epitelové buňky
Kosterní sval	0/3	Žádné pozitivní buňky
Kůže	0/3	Žádné pozitivní buňky
Nerv	4/4	Schwannovy buňky
Mezotel	0/3	Žádné pozitivní buňky

Tkáň	Počet pozitivních případů / celkový počet případů	Pozitivní buňky v běžné tkáni
Měkká tkáň	3/3	Endoteliální buňky, fibroblasty, duktální buňky

^a Byly vyhodnocovány běžné tkáně děložního hrdla i tkáně s chronickou cervicitidou. Případy děložního hrdla byly interpretovány na základě hodnotícího algoritmu CINtec Histology, který počítá barvení běžných skvamózních (fokální barvení), endocervikálních nebo stromálních buněk jako negativní.

Tab. 6. Senzitivita/specificita protilátky CINtec p16 Histology byla stanovena testováním řady neoplastických tkání FFPE.

Patologie	Počet pozitivních případů / celkový počet případů
Glioblastom (mozek)	1/1
Meningiom (mozek)	1/1
Ependymom (mozeček)	1/1
Oligodendrogliom (mozeček)	1/1
Adenokarcinom (hlava a krk)	1/1
Karcinom ze skvamózních buněk (hlava a krk)	0/1
Serózní karcinom (vaječník)	1/1
Nádor z granulózních buněk (vaječník)	1/1
Teratom (vaječník)	1/1
Pankreatický neuroendokrinní novotvar (slinivka)	1/1
Duktální adenokarcinom (slinivka)	1/1
Seminom (varle)	1/1
Embryonální karcinom (varle)	1/1
Folikulární karcinom (štítná žláza)	1/1
Papilární karcinom (štítná žláza)	0/1
Duktální karcinom in situ (prs)	1/1
Invazivní duktální karcinom (prs)	1/1
Invazivní lobulární karcinom (prs)	1/1
Adenom (nadledvinka)	1/1
Fenochromcytom (nadledvinka)	1/1
Difúzní lymfom z velkých B-buněk (slezina)	0/1
Pleomorfní adenom (slinná žláza)	1/1
Warthinův nádor (slinná žláza)	1/1
Malobuněčný karcinom (plíce)	1/1
Karcinom ze skvamózních buněk (plíce)	0/1
Adenokarcinom (plíce)	1/1
Karcinom ze skvamózních buněk (jícen)	0/1
Adenokarcinom (jícen)	1/1
Adenokarcinom (žaludek)	1/1
Gastrointestinální stromální tumor (žaludek)	1/1

Patologie	Počet pozitivních případů / celkový počet případů
Adenokarcinom (tenké střevo)	0/1
Gastrointestinální stromální tumor (tenké střevo)	1/1
Adenokarcinom (tlusté střevo)	1/1
Adenoskvamózní karcinom (tlusté střevo)	1/1
Karcinoidní nádor (apendix)	1/1
Hepatocelulární karcinom (játra)	1/1
Cholangiokarcinom (játra)	0/1
Karcinom ledvin (ledvina)	1/2
Papilární renální adenom (ledvina)	1/1
Adenokarcinom (prostata)	2/2
Karcinom z jasných buněk (děloha)	1/1
Endometroidní karcinom (děloha)	1/1
Leiomyom (děloha)	0/1
Leiomyosarkom (děloha)	1/1
Cervikální intraepiteliální neoplazie I (CIN I) (děložní hrdlo)	12/37
CIN I–II, hraniční nízký vs. vysoký stupeň (děložní hrdlo)	2/8
CIN II (děložní hrdlo)	52/60
CIN II–III, vysoký stupeň (děložní hrdlo)	1/3
CIN III (děložní hrdlo)	65/67
Karcinom ze skvamózních buněk (čípek)	73/76
Adenoskvamózní karcinom (děložní hrdlo)	2/2
Adenokarcinom (děložní hrdlo)	1/1
Neuroendokrinní karcinom (děložní hrdlo)	1/1
Alveolární rabdomyosarkom (sval)	0/1
Myxom (sval)	1/1
Karcinom z bazálních buněk (kůže)	1/1
Invazivní melanom (kůže)	1/1
Karcinom ze skvamózních buněk (kůže)	0/1
Schwannom (periferní nerv)	1/1
Neurofibrosarkom (nerv)	1/1
Anaplastický velkobuněčný lymfom (lymfatická uzlina)	1/1
Folikulární lymfom (lymfatická uzlina)	1/1
Hodgkinův lymfom (lymfatická uzlina)	1/1
Karcinom z uroteliálních buněk (močový měchýř)	1/1
Karcinom ze skvamózních buněk (močový měchýř)	0/1
Plazmocytom (extramedulární)	1/1
Mezoteliom (mezotel)	1/1
Pleuropulmonální solitární fibrózní nádor (mezoteliom)	1/1
Angiosarkom (měkká tkáň)	1/1
Liposarkom (měkká tkáň)	1/1

Preciznost mezi přístroji

Preciznost mezi přístroji hodnotily dvě provedené studie. Jedna studie byla provedena na přístroji BenchMark XT a na přístroji BenchMark ULTRA s použitím detekční soupravy *ultraView* Universal DAB Detection Kit a druhá studie byla provedena na přístroji BenchMark ULTRA s detekční soupravou *OptiView* DAB IHC Detection Kit.

V první studii byly řezy ze dvou multitkáňových bloků obsahujících cervikální karcinom ze skvamózních buněk, mandle a slinivku obarveny na třech přístrojích BenchMark XT a třech přístrojích BenchMark ULTRA pomocí detekční soupravy *ultraView* Universal DAB Detection Kit (5 řezů z každého multitkáňového bloku na každý přístroj). Intenzity barvení p16 byly v rozmezí 0.5 bodu od středního skóre (mediánu) ve 100 % všech tkání po obarvení na třech přístrojích BenchMark XT. Intenzity barvení p16 byly v rozmezí 0.5 bodu od středního skóre (mediánu) ve 100 % cervikálního karcinomu ze skvamózních buněk (15/15), 93 % mandlí (14/15) a 93 % slinivky (14/15) po obarvení na třech přístrojích BenchMark ULTRA. Všechny tkáně obarvené protilátkou CINtec p16 Histology měly přijatelné zbarvení pozadí.

Ve druhé studii byla preciznost testu s protilátkou CINtec p16 Histology stanovena na třech přístrojích BenchMark ULTRA obarvením replikátů sklíček 28 případů děložního hrdla (osm běžných děložních hrdel, šest CIN1, šest CIN2, čtyři CIN3 a čtyři případy cervikálního karcinomu) pomocí detekční soupravy *OptiView* DAB IHC. Každý případ byl obarven na každém ze tří přístrojů BenchMark ULTRA každou ze tří šarží protilátky CINtec p16 Histology. Celkově bylo do studie zařazeno devět sklíček obarvených protilátkou CINtec p16 Histology z každého případu (tři šarže protilátky CINtec p16 Histology, tři přístroje BenchMark ULTRA). Každé sklíčko obarvené protilátkou CINtec p16 Histology bylo poté spárováno se sklíčkem obarveným H&E ze stejného případu. Všechna sklíčka byla randomizována a poté hodnocena jedním patologem, který nebyl obeznámen s diagnózou případu. Tento patolog hodnotil intenzity barvení p16, pozitivní nebo negativní stav CINtec p16 Histology a pozadí. Data ukázala, že 97.6 % tkání mělo skóre intenzity barvení v rozmezí 0.5 bodu u všech přístrojů. Navíc 100 % řezů obarvených protilátkou CINtec p16 Histology na třech přístrojích BenchMark ULTRA prokázalo stejný stav CINtec p16 Histology. Všechny tkáně obarvené protilátkou CINtec p16 Histology měly přijatelné zbarvení pozadí.

Mezilehlá preciznost mezi přístroji byla navíc stanovena u tří přístrojů BenchMark ULTRA PLUS barvením duplicitních sklíček 24 případů tkáně děložního hrdla (jedenáct běžných tkání děložního hrdla, jeden CIN1, dva CIN2, sedm CIN3 a tři karcinomy ze skvamózních buněk). Testovací sklíčka byla randomizována a následně vyhodnocena jedním patologem, který nebyl obeznámen s diagnózou případu, a to z hlediska pozitivního nebo negativního stavu protilátky CINtec p16 Histology, morfologie a nespecifického zbarvení (pozadí). Celková procentuální shoda byla 99.3 %. Všechny tkáně obarvené protilátkou CINtec p16 Histology měly 100% přijatelnou morfologii i přijatelné zbarvení pozadí.

Preciznost mezi šaržemi

Preciznost mezi šaržemi protilátky CINtec p16 Histology byla hodnocena testováním tří šarží protilátky CINtec p16 Histology na přístroji BenchMark ULTRA pomocí detekční soupravy *OptiView* DAB IHC Detection Kit. Řezy z každého z 26 vzorků tkáně z biopsie děložního hrdla (šest případů běžného děložního hrdla, šest CIN1, šest CIN2, šest CIN3 a dva případy cervikálního karcinomu) byly obarveny duplicitně s použitím jednotlivých šarží protilátky CINtec p16 Histology. Jednotlivá sklíčka s tkání, obarvená protilátkou CINtec p16 Histology, byla spárována se sousedním sklíčkem H&E a sklíčkem s negativní reagenční kontrolou ze stejného případu. Sady sklíček byly randomizovány a hodnoceny jedním patologem, který nebyl obeznámen s diagnózou případu a číslem šarže. Stav CINtec p16 Histology (pozitivní = difúzní barvení p16; negativní = fokální nebo žádné barvení p16) byl stanoven na základě sklíčka s protilátkou CINtec p16 Histology. Kategorie CIN [CIN2+ (CIN2, CIN3, adenokarcinom in situ nebo invazivní karcinom spojené do jedné kategorie) / CIN1- (žádný CIN nebo CIN1 spojené do jedné kategorie)] byly stanoveny na základě doplňkové interpretace sklíček obarvených H&E a protilátkou CINtec p16 Histology. Výsledky prokazují reprodukovatelnost testu s CINtec p16 Histology ve třech výrobních šaržích protilátky. Všechny případy vykazovaly 100 % pozitivní i negativní shodu pro stav CINtec p16 Histology a 98.7 % shodu pro kategorii CIN ve třech výrobních šaržích protilátky. Data jsou shrnuta v Tab. 7. Barvení pozadí bylo přijatelné ve 100 % obarvených tkání.

Tab. 7. Reprodukovatelnost primární protilátky mezi šaržemi protilátky CINtec p16 Histology u vzorků děložního hrdla měřená podle stavu CINtec p16 Histology (pozitivní/negativní) a kategorie CIN (CIN2+/CIN1-).

Reprodukovatelnost	Hodnocení	Průměrná pozitivní shoda (n/N)	Průměrná negativní shoda (n/N)	Celková procentuální shoda (n/N)
Mezi šaržemi	Stav CINtec Histology	100.0 % (352/352)	100.0 % (264/264)	100.0 % (308/308)
	Kategorie CIN	98.1 % (314/320)	98.0 % (290/296)	98.1 % (302/308)

Opakovatelnost v rámci jednoho dne a preciznost mezi dny

Celkově byly provedeny tři studie s cílem posoudit opakovatelnost v rámci jednoho dne a preciznost mezi dny. V prvních dvou studiích patolog hodnotil tkáň na základě intenzit barvení p16 (0–4), zatímco ve třetí studii byl hodnocen stav CINtec p16 Histology (pozitivní/negativní) ve vzorcích z biopsie děložního hrdla.

V první studii byly řezy ze dvou multikárňových bloků obsahujících tři tkáň (cervikální karcinom ze skvamózních buněk, mandle, slinivka) obarveny na přístroji BenchMark XT pomocí detekční soupravy *ultraView Universal DAB Detection Kit*. Ve druhé studii byly dva multikárňové bloky obsahující mandle, slinivku a tři případy děložního hrdla (invasivní karcinom ze skvamózních buněk, CIN1-, CIN2+) obarveny na přístroji BenchMark ULTRA pomocí detekční soupravy *OptiView DAB IHC Detection Kit*. Opakovatelnost v rámci dne pro protilátku CINtec p16 Histology byla testována obarvením 14 replikátů řezů z každého multikárňového bloku protilátkou CINtec p16 Histology. Protilátka CINtec p16 Histology splnila kritéria přijatelnosti u 100 % barvení tkání v rozmezí 0.5 bodu od středního skóre (mediánu) intenzity barvení v obou studiích. Preciznost mezi dny byla testována v 5 na sebe nenavazujících dnech v minimálně 20denním období. V obou těchto studiích protilátka CINtec p16 Histology splnila kritéria přijatelnosti u 100 % barvení tkání v rozmezí 0.5 bodu od středního skóre (mediánu) intenzity barvení pro opakovatelnost v rámci dne i preciznost mezi dny. Všechny tkáň obarvené protilátkou CINtec p16 Histology měly přijatelné pozadí.

Třetí studie hodnotila 24 vzorků tkáně děložního hrdla (tři cervikální karcinomy ze skvamózních buněk, šest CIN3, šest CIN2, šest CIN1, tři normální případy děložního hrdla) podle stavu CINtec p16 Histology (pozitivní/negativní) na jednom přístroji BenchMark ULTRA s detekční soupravou *OptiView DAB IHC Detection Kit*. Testování bylo prováděno v 5 na sebe nenavazujících dnech v minimálně 20denním období. Každý den testování byla dvě sklička z každého případu obarvena protilátkou CINtec p16 Histology (celkem 150 skliček) a jedno skličko z každého případu bylo obarveno negativní reagenční kontrolou (celkem 75 skliček). U analýz opakovatelnosti v rámci dne byl stav CINtec p16 Histology (pozitivní/negativní) srovnáván mezi dvěma hodnotitelnými skličky ze stejného případu, obarvenými ve stejný den. Vzhledem k tomu, že tato studie brala v úvahu 5 dní, celkový počet srovnání pro každý případ pro opakovatelnost v rámci dne byl 5. Celkový počet srovnání pro preciznost mezi dny byl 120 = 24 případů × 5 srovnání na jeden případ.

Výsledky ukázaly 100% opakovatelnost v rámci dne a 100% preciznost mezi dny, když byly tkáň hodnoceny na základě stavu protilátky CINtec p16 Histology. Všechny řezy obarvené protilátkou CINtec p16 Histology měly přijatelné zbarvení pozadí.

Opakovatelnost v rámci cyklu byla navíc stanovena barvením vždy 5 skliček z 24 případů tkáně děložního čípku (jedenáct běžných tkání děložního hrdla, jeden CIN1, dva CIN2, sedm CIN3 a tři karcinomy ze skvamózních buněk) na přístroji BenchMark ULTRA PLUS. Testovací sklička byla randomizována a následně vyhodnocena jedním patologem, který nebyl obeznámen s diagnózou případu, a to z hlediska pozitivního nebo negativního stavu protilátky CINtec p16 Histology, morfologie a nespecifického zbarvení (pozadí). Celková procentuální shoda byla 97.5 %. Všechny tkáň obarvené protilátkou CINtec p16 Histology měly 100% přijatelnou morfologii i přijatelné zbarvení pozadí.

Mezilehlá preciznost mezi dny byla navíc stanovena barvením duplicitních skliček z 24 případů tkáně děložního čípku (jedenáct běžných tkání děložního hrdla, jeden CIN1, dva CIN2, sedm CIN3 a tři karcinomy ze skvamózních buněk) na přístroji BenchMark ULTRA PLUS v 5 na sebe nenavazujících dnech v minimálně 20denním období. Mezilehlá preciznost mezi dny byla 98.8 %. Všechny tkáň obarvené protilátkou CINtec p16 Histology měly 100% přijatelnou morfologii i přijatelné zbarvení pozadí.

Přesnost mezi platformami a detekčními soupravami

Přesnost testu byla prokázána napříč platformami BenchMark ULTRA, BenchMark XT a BenchMark GX pomocí detekční soupravy *OptiView DAB IHC Detection Kit* a *ultraView Universal DAB Detection Kit*. Celkově bylo 186 případů děložního hrdla obarveno protilátkou CINtec p16 Histology a hodnoceno z hlediska stavu CINtec p16 Histology (pozitivní/negativní) a pozadí (přijatelné/nepřijatelné). OPA byla 98.3–100 % pro každou párovou kombinaci platform v rámci jedné detekční soupravy i každou párovou kombinaci detekčních souprav v rámci jedné platformy. Všechny hodnotitelné případy obarvené protilátkou CINtec p16 Histology měly přijatelné zbarvení pozadí.

Kromě toho byla provedena studie, která srovnávala účinnost barvení protilátky CINtec p16 Histology pomocí detekční soupravy *OptiView DAB IHC Detection Kit* na přístroji BenchMark ULTRA PLUS oproti přístroji BenchMark ULTRA. Sto dvacet (120) případů tkáně děložního hrdla (60 pozitivních na CINtec p16 Histology a 60 negativních na CINtec p16 Histology) bylo obarveno a obarvená sklička byla hodnocena patologem, který určil stav CINtec p16 Histology. Celková procentuální shoda byla 99.1 %. Všechny tkáň obarvené protilátkou CINtec p16 Histology měly 100% přijatelnou morfologii i přijatelné zbarvení pozadí.

Preciznost u jednoho hodnotitele a preciznost mezi jednotlivými hodnotiteli

Preciznost u jednoho hodnotitele a preciznost mezi jednotlivými hodnotiteli byla hodnocena u 50 případů děložního hrdla (16 případů normálního děložního hrdla, 12 případů CIN1, 12 CIN2, 6 CIN3 a 4 případy karcinomu děložního hrdla) obarvených protilátkou CINtec p16 Histology na přístroji BenchMark ULTRA pomocí detekční soupravy *OptiView DAB IHC Detection Kit*.

Všechna sklička byla randomizována a následně hodnocena třemi patologi v pozitivní/negativní stav CINtec p16 Histology. Patologové nebyli obeznámeni s diagnózou případu. Sklička obarvená protilátkou CINtec p16 Histology byla po čtyřdenním eliminačním období znovu randomizována pro druhé vyhodnocení stavu CINtec p16 Histology každým ze tří patologů. Celková procentuální shoda pro preciznost u jednoho hodnotitele i preciznost mezi jednotlivými hodnotiteli pro stav CINtec p16 Histology byla 98.7 %, jak ukazuje Tab. 8.

Ve studii preciznosti u jednoho hodnotitele a preciznosti mezi hodnotiteli pro kategorii CIN bylo každé skličko s protilátkou CINtec p16 Histology spárováno se skličkem obarveným H&E ze stejného případu a spárované sady skliček byly randomizovány. Kategorie CIN (CIN2+/CIN1-) byla hodnocena třemi patologi na základě doplňkové interpretace skliček obarvených H&E a skliček obarvených protilátkou CINtec p16 Histology. Po eliminačním období trvajícím alespoň 4 týdny byly páry skliček znovu randomizovány a každý ze tří patologů provedl druhé vyhodnocení kategorie CIN. Data uvedená v Tab. 8 ukazují, že celková procentuální shoda pro preciznost u jednoho hodnotitele a preciznost mezi jednotlivými hodnotiteli pro kategorii CIN byla 98.0 %, respektive 90 %.

Tab. 8. Preciznost u jednoho hodnotitele a preciznost mezi hodnotiteli testu s protilátkou CINtec p16 Histology u vzorků děložního hrdla, měřená podle stavu CINtec p16 Histology (pozitivní/negativní) a kategorie CIN (CIN2+/CIN1-).

Preciznost hodnotitel e	Hodnocení	Průměrná pozitivní shoda (95% CI)	Průměrná negativní shoda (95% CI)	Celková procentuální shoda (95% CI)
U jednoho hodnotitele	Stav CINtec p16 Histology	98.7 % (93.9–100.0 %)	98.6 % (93.0–100.0 %)	98.7 % (94.0–100.0 %)
	Kategorie CIN	97.4 % (89.1–100.0 %)	98.4 % (92.6–100.0 %)	98.0 % (92.0–100.0 %)
Mezi hodnotiteli	Stav CINtec p16 Histology	98.7 % (93.1–100.0 %)	98.6 % (92.3–100.0 %)	98.7 % (93.9–100.0 %)
	Kategorie CIN	87.0 % (71.8–97.6 %)	91.9 % (83.0–98.5 %)	90.0 % (80.0–98.0 %)

Studie reprodukovatelnosti (studie preciznosti mezi laboratořemi)

Pro test s protilátkou CINtec p16 Histology byla provedena studie reprodukovatelnosti mezi laboratořemi, která měla za cíl prokázat reprodukovatelnost testu při určování stavu

CINtec p16 Histology a kategorie CIN. Ve studii bylo použito 27 případů děložního hrdla (10 bez CIN, 5 CIN1, 5 CIN2, 5 CIN3 a 2 případy karcinomu děložního hrdla) a byla provedena na třech přístrojích BenchMark ULTRA, ve třech na sebe nenavazujících dnech, ve třech externích laboratořích. Vzorky byly randomizovány a hodnoceny celkem šesti patologi (dva patologové na jednom pracovišti) jak z hlediska stavu CINtec p16 Histology (pozitivní/negativní), tak z hlediska kategorie CIN (CIN2+/CIN1-), a to na základě doplňkové interpretace sklíček obarvených H&E a sklíček obarvených protilátkou CINtec p16 Histology. Patologové nebyli obeznámeni s diagnózou případů. Výsledky stavu CINtec p16 Histology jsou uvedeny v Tab. 9, výsledky kategorie CIN jsou uvedeny v Tab. 10. Míra přijatelnosti morfologie u všech šesti patologi na všech pracovištích byla 96,3 %, míra přijatelnosti zbarvení pozadí pak byla 97,1 %. Data naznačují vynikající shodu v reprodukovatelnosti testu napříč pracovišti, dny i patologi.

Tab. 9. Reprodukovatelnost mezi laboratořemi: shoda pro stav CINtec p16 Histology (pozitivní/negativní) u vzorků děložního hrdla.

Míry shody pro Reprodukovatelnost mezi laboratořemi (stav CINtec p16 Histology)	Průměrná pozitivní shoda	Průměrná negativní shoda	Celková procentuální shoda
Mezi pracovišti (3 pracoviště)	96,2 % (91,2–99,3 %)	93,9 % (86,3–99,0 %)	95,3 % (90,6–99,2 %)
Mezi dny (3 na sebe nenavazující dny)	98,2 % (95,9–99,7 %)	97,1 % (93,3–99,5 %)	97,8 % (95,5–99,5 %)
Mezi hodnotiteli (2 patologové na pracovišti)	95,5 % (87,8–100,0 %)	92,9 % (82,6–100,0 %)	94,4 % (87,1–100,0 %)

Tab. 10. Reprodukovatelnost mezi laboratořemi: shoda pro kategorii CIN (CIN2+/CIN1-) u vzorků děložního hrdla na základě doplňkové interpretace sklíček obarvených H&E a sklíček obarvených protilátkou CINtec p16 Histology.

Míry shody pro Reprodukovatelnost mezi laboratořemi (kategorie CIN)	Průměrná pozitivní shoda	Průměrná negativní shoda	Celková procentuální shoda
Mezi pracovišti (3 pracoviště)	94,4 % (86,8–98,8 %)	94,1 % (86,7–98,6 %)	94,3 % (88,5–98,6 %)
Mezi dny (3 na sebe nenavazující dny)	96,9 % (93,1–99,2 %)	96,6 % (93,0–99,1 %)	96,8 % (94,0–99,1 %)
Mezi hodnotiteli (2 patologové na pracovišti)	95,0 % (87,4–98,9 %)	94,8 % (88,6–98,9 %)	94,9 % (89,3–98,7 %)

KLINICKÁ VÝKONNOST

Diagnostická shoda

Byla provedena studie CERvical Tissue Adjunctive aNalysis (CERTAIN), která prokázala, že doplňkové hodnocení výsledků pro protilátku CINtec p16 Histology vede ke zvýšení konzistence diagnózy cervikální intraepiteliální neoplazie (CIN) a úrovně shody mezi hodnoceními všeobecných patologi Community Pathologists (CP) a odborných patologi Expert Pathologists (XP) pro tkáň z punch biopsie děložního hrdla.

Klinická studie CERTAIN byla provedena na 1100 retrospektivně odebraných vzorcích FFPE z punch biopsie děložního hrdla, které představují populaci odeslanou ke kolposkopii. Referenční diagnóza stanovená XP byla stanovena pro každý případ studie pouze pomocí sklíček obarvených H&E a pomocí sklíček obarvených H&E i protilátkou CINtec p16 Histology. Dva patologové XP stanovili své nezávislé diagnózy (bez CIN, CIN1, CIN2, CIN3, adenokarcinom in situ nebo invazivní karcinom) na základě sklíček obarvených H&E pro každý z 1100 případů. Patologům byly také poskytnuty následující

klinické informace: věk pacientky, výsledek cytologického stěru Pap a výsledek testu HPV (pokud byly k dispozici). Nesouhlasné případy byly hodnoceny třetím patologi XP. Případy, u nichž nebylo dosaženo dvou ze tří většinových diagnóz, byly přezkoumány během hodnotící schůzky, již se zúčastnili všichni tři XP. Většinové (nebo shodné) výsledky určily odborně stanovenou referenční diagnózu pro každý případ hodnocený ve studii (nazývanou XP1 nebo H&E referenční diagnóza). Po minimálně čtyřtýdenním eliminačním období stejné XP vyhodnotili sklíčka obarvená jak H&E, tak protilátkou CINtec p16 Histology za účelem stanovení jejich diagnózy: bez CIN; histologie LSIL / CIN1; histologie HSIL / CIN2; histologie HSIL / CIN3; adenokarcinom in situ nebo invazivní karcinom (nazývané XP2 nebo referenční diagnóza H&E + CINtec p16 Histology). Proces stanovení většinové diagnózy byl stejný jako proces použitý pro stanovení referenční diagnózy u sklíček obarvených pouze H&E. Studie se zúčastnilo sedmdesát (70) certifikovaných CP z celých Spojených států amerických. V prvním kole (1. kolo, CP1) bylo 1100 případů obarvených H&E rozděleno do čtyř hodnotících sad po 275 případech se srovnatelným rozdělením jednotlivých diagnostických kategorií na referenční diagnózu. 70 CP bylo rozděleno do čtyř skupin sestávajících buď ze 17, nebo 18 patologi na skupinu. Pro každý případ v rámci přiřazené hodnotící sady byly patologům poskytnuty následující klinické údaje: věk pacientky, výsledek cytologického stěru Pap a výsledek testu HPV (pokud byly k dispozici). CP nezávisle stanovili své diagnózy na sklíčku obarveném H&E pro každý z jejich přiřazených případů: bez CIN; CIN1; CIN2; CIN3; adenokarcinom in situ nebo invazivní karcinom. Každý studijní případ byl individuálně vyhodnocen buď 17, nebo 18 všeobecnými patologi.

Ve druhém kole (2. kolo, CP2) CP hodnotili sklíčka obarvená H&E spolu se spárováními odpovídajícími sklíčky obarvenými protilátkou CINtec p16 Histology pro stejnou sadu případů v rámci jejich přiřazené hodnotící sady. Po nejméně 4týdenním eliminačním období mezi 1. a 2. kolem každý patolog nezávisle stanovil své diagnózy: bez CIN; histologie LSIL / CIN1; histologie HSIL / CIN2; histologie HSIL / CIN3; adenokarcinom in situ nebo invazivní karcinom. CP zaznamenali stav CINtec p16 Histology (CINtec p16 Histology pozitivní = difúzní barvení p16; CINtec p16 Histology negativní = fokální nebo žádné barvení p16) spolu s histologickou diagnózou s použitím jak sklíčka obarveného H&E, tak sklíčka obarveného protilátkou CINtec p16 Histology. Primárním cílem této studie bylo prokázat zvýšení diagnostické shody, aniž by byla ohrožena pozitivní procentuální shoda, tj. pravděpodobnost pozitivního výsledku testu v souladu s diagnózou $\geq$ CIN2 (CIN2, CIN3, adenokarcinom in situ nebo invazivní karcinom spojené do jedné kategorie) nebo $\leq$ CIN1 (bez CIN nebo CIN1 spojené do jedné kategorie) na základě sklíček obarvených H&E (1. kolo) ve srovnání s interpretací sklíček obarvených H&E spolu se sklíčky obarvenými protilátkou CINtec p16 Histology (2. kolo).

Zlepšení diagnostické přesnosti u odborných patologi

Zlepšení diagnostické přesnosti u odborných patologi bylo stanoveno srovnáním H&E referenční diagnózy odborného patologa (XP1) s H&E a CINtec p16 Histology referenční diagnózou odborného patologa (XP2). Analýza byla provedena u interpretace všech 1100 biopsií děložního hrdla. Zlepšení diagnostické přesnosti mezi H&E referenční diagnózou stanovenou odbornými patologi a referenční diagnózou H&E a CINtec p16 Histology stanovenou odbornými patologi je uvedeno v Tab. 11. Při použití H&E a protilátky CINtec p16 Histology při diagnostické interpretaci biopsií děložního hrdla identifikovali XP o 23,7 % více případů $\geq$ CIN2 ve srovnání s diagnostickou interpretací pomocí samotného H&E.

Tab. 11. Shoda mezi referenční diagnózou H&E a referenční diagnózou H&E a CINtec p16 Histology pro všechny případy.

		Referenční diagnóza H&E					Celkem
		Bez CIN	CIN1	CIN2	CIN3	ACIS* nebo karcinom	
Referenční diagnóza H&E + CINtec p16 Histology	Bez CIN	693	13	4	0	0	710
	Histologie LSIL	46	120	4	1	0	171
	Histologie HSIL	30	31	83	69	1	214
	ACIS* nebo karcinom	0	0	0	0	5	5

	Referenční diagnóza H&E					Celkem
	Bez CIN	CIN1	CIN2	CIN3	ACIS* nebo karcinom	
Celkem	769	164	91	70	6	1100

* ACIS: adenokarcinom in situ

Interpretace všeobecného patologa pomocí H&E versus H&E a CINtec p16 Histology ve srovnání s referenční diagnózou H&E stanovenou odborníky

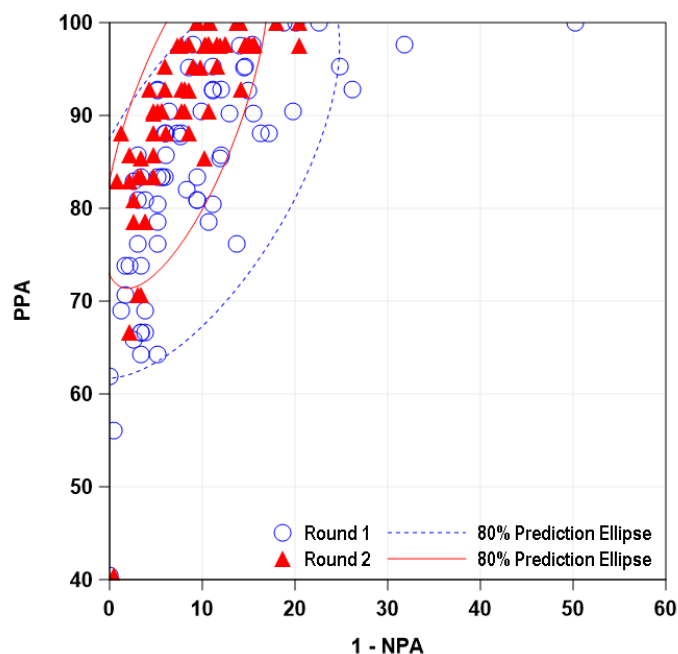
Diagnostická shoda mezi všeobecnými patologi byla stanovena srovnáním výsledků H&E diagnóz stanovených všeobecnými patologi v 1. kole (CP1) s H&E referenční diagnózou stanovenou odborným patologi (XP1) a H&E + CINtec p16 Histology diagnóz stanovených všeobecným patologi v 2. kole (CP2) s H&E referenční diagnózou stanovenou odborným patologi (XP1). Míry shody a intervaly spolehlivosti (CI) zprůměrované mezi případy a hodnotitelé jsou uvedeny v Tab. 12. Bylo zjištěno statisticky významné zvýšení PPA, míra pro detekci lézí $\geq$ CIN2 (+6.8 % s 95 % CI: 4.7 % až 9.0 %). Navíc negativní procentuální shoda (NPA) pro detekci $\leq$ CIN1 vzrostla o 1.3 % s 95 % CI: 0.5 % až 2.3 %.

Tab. 12. Míra pozitivní a negativní shody hodnocení všeobecných patologi pro sklička obarvená H&E versus sklička obarvená H&E a sklička obarvená protilátkou CINtec p16 Histology s H&E referenční diagnózou stanovenou odborníkem (XP1).

Cílový parametr	H&E	H&E + CINtec p16 Histology	Rozdíl	Hodnota p
PPA % (95 % CI)	83.5 % (79.9, 86.8)	90.3 % (87.5, 92.7)	6.8 % (4.7, 9.0)	< .0001
NPA % (95 % CI)	90.4 % (89.4, 91.4)	91.8 % (90.6, 92.9)	1.3 % (0.5, 2.3)	0.0032

Poznámka: Rozdíl se nerovná 1.4 % kvůli chybě zaokrouhlování: H&E = 90.44 %, H&E + CINtec Histology = 91.76 %, rozdíl = 1.32 %.

Souhrnný přehled diagnostické přesnosti jednotlivých hodnotitelů z řad všeobecných patologi pro diagnostiku $\geq$ CIN2 versus $\leq$ CIN1 s použitím skliček obarvených pouze H&E ve srovnání s použitím skliček obarvených H&E spolu se skličky obarvenými protilátkou CINtec p16 Histology oproti referenční diagnóze H&E stanovené odborníkem je zobrazen na Obr. 2. Jsou znázorněny PPA a NPA (negativní procentuální shoda, tj. shoda negativního výsledku testu s $\leq$ CIN1 dle XP1) interpretace každého patologa pro 1. kolo (pouze sklička obarvená H&E – modré kroužky) versus 2. kolo (sklička obarvená H&E spolu se skličky obarvenými protilátkou CINtec p16 Histology – červené trojúhelníky). Predikční elipsy označují rozsah výkonnosti PPA a NPA, který se očekává u většiny patologi: 80 % by mělo spadat mezi elipsy a 20 % by mělo spadat mimo elipsy. Tato data ukazují, že interpretace biopsi děložního hrdla pomocí H&E spolu se skličky obarvenými protilátkou CINtec p16 Histology zlepšuje diagnostickou shodu a snižuje variabilitu mezi hodnotiteli.



Obr. 2. Souhrnný přehled pro diagnostickou shodu (PPA versus 1-NPA) u všeobecných patologi pro diagnostiku $\geq$ CIN2 versus $\leq$ CIN1 pomocí pouze H&E (1. kolo) a H&E + CINtec p16 Histology (2. kolo) ve srovnání s referenční diagnózou H&E stanovenou odborníkem (XP1) (80 % prediktivních elips generovaných za předpokladu dvojrozměrné normality).

Interpretace všeobecného patologa pomocí H&E versus H&E a CINtec p16 Histology ve srovnání s H&E + CINtec p16 Histology referenční diagnózou stanovenou odborníky

Dále byly výsledky hodnocení všeobecných patologi využívajících obě metody (H&E + CINtec p16 Histology versus pouze H&E) porovnány s referenční diagnózou (XP2) stanovenou odborníky gynekopatologi pomocí skliček obarvených H&E a protilátkou CINtec p16 Histology. Odborní patologové neznali výsledky prvního kola jednotlivých hodnocení ani konsenzuální H&E referenční diagnózy. Proces stanovení konsenzuálních diagnóz byl stejným procesem pro stanovení H&E referenční diagnózy popsán výše.

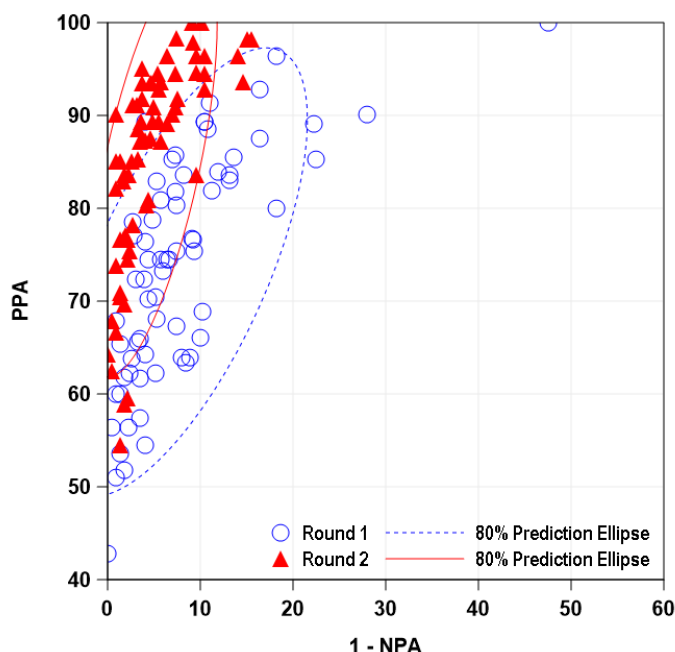
Byly analyzovány výsledky hodnocení všeobecných patologi s použitím skliček obarvených H&E versus sklička obarvená H&E spolu se skličky obarvenými protilátkou CINtec p16 Histology a porovnány s H&E a CINtec p16 Histology referenční diagnózou stanovenou odborníkem (Tab. 13). Tato data vykazují statisticky významný nárůst PPA (+11.5 % s 95 % CI: 9.3 % až 13.5 %) a NPA (+3.0 % s 95 % CI: 2.2 % až 3.7 %).

Tab. 13. Míra pozitivní (PPA) a negativní (NPA) shody hodnocení všeobecných patologi pro sklička obarvená H&E versus sklička obarvená H&E a sklička obarvená protilátkou CINtec p16 Histology s H&E a CINtec p16 Histology referenční diagnózou stanovenou odborníkem (XP2).

Cílový parametr	H&E	H&E + CINtec p16 Histology	Rozdíl	Hodnota p
PPA % (95 % CI)	73.3 % (69.6, 76.9)	84.8 % (82.1, 87.1)	11.5 % (9.3, 13.5)	< .0001
NPA % (95 % CI)	92.2 % (91.3, 93.1)	95.2 % (94.4, 96.0)	3.0 % (2.2, 3.7)	< .0001

Souhrnný přehled diagnostické přesnosti jednotlivých hodnotitelů všeobecných patologi pro diagnostiku $\geq$ CIN2 versus $\leq$ CIN1 s použitím skliček obarvených pouze H&E ve srovnání s použitím skliček obarvených H&E spolu se skličky obarvenými protilátkou CINtec p16 Histology oproti referenční diagnóze H&E + CINtec p16 Histology stanovené

odborníkem je zobrazen na Obr. 3. Zobrazeny jsou PPA a NPA interpretace každého patologa pro 1. kolo (pouze H&E – modré kroužky) versus 2. kolo (H&E a CINtec p16 Histology – červené trojúhelníky). Predikční elipsy označují rozsah výkonnosti PPA a NPA, který se očekává u většiny patologů: 80 % by mělo spadat mezi elipsy a 20 % by mělo spadat mimo elipsy. Tato data ukazují, že interpretace biopsií děložního hrdla pomocí H&E spolu se sklíčky obarvenými protilátkou CINtec p16 Histology zlepšuje diagnostickou konzistentnost a snižuje variabilitu mezi hodnotiteli.



Obr. 3. Souhrnný přehled pro diagnostickou shodu (PPA versus 1-NPA) u všeobecných patologů pro diagnostiku $\geq$ CIN2 versus $\leq$ CIN1 pomocí pouze H&E (1. kolo) a H&E a CINtec p16 Histology (2. kolo) ve srovnání s referenční diagnózou H&E a CINtec p16 Histology stanovenou odborníkem (XP2) (80 % prediktivních elips generovaných za předpokladu dvojrozměrné normality).

Účinnost barvení s protilátkou CINtec p16 Histology

Sekundárním cílem této studie bylo hodnocení účinnosti barvení u testu CINtec p16 Histology, jak jej stanovili všeobecní patologové během kontroly studijních sklíček. Během studie 70 všeobecných patologů poskytlo celkem 19250 interpretací stavu CINtec p16 Histology. Posuzovaná kritéria účinnosti barvení byla: celková přijatelnost barvení, přijatelnost barvení pozadí a přijatelnost morfologie. Výsledky ukazují > 99% míru přijatelnosti pro všechna kritéria barvení (Tab. 14).

Tab. 14. Účinnost barvení s protilátkou CINtec p16 Histology.

Cílový parametr	Počet interpretací n/N	Míra
Přijatelnost barvení	19074/19250	99.09 %
Přijatelnost morfologie	19249/19250	99.99 %
Přijatelnost pozadí	19249/19250	99.99 %

Závěry

Použití sklíček obarvených protilátkou CINtec p16 Histology jako doplněk k interpretaci sklíček obarvených H&E zvyšuje diagnostickou shodu při detekci lézí CIN ($\geq$ CIN2) vysokého stupně u punch biopsií děložního hrdla. Tato vylepšená shoda je dána jak zvýšením PPA (shoda pozitivního výsledku testu s diagnózou $\geq$ CIN2), tak NPA (shoda negativních výsledků testu s CIN1 nebo diagnóza bez CIN). Dále se zvyšuje konzistentnost diagnóz mezi všeobecnými patologi navzájem i s panelem odborníků.

LITERATURA

- Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, et al. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol.* 1998;153:1741-1748.
- Negri G, Egarter-Vigl E, Kasal A, et al. p16INK4a 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;27:187-193.
- von Knebel Doeberitz M, Vinokurova S. Host factors in HPV-related carcinogenesis: cellular mechanisms controlling HPV infections. *Arch Med Res.* 2009;40(6):435-442.
- Voorhoeve PM, Agami R. The tumor-suppressive functions of the human INK4A locus. *Cancer Cell.* 2003;4:311-319.
- Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, et al. Overexpression of p16(INK4a) as a specific marker for dysplasia and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer.* 2001;92:276-284.
- Negri G, Vittadello F, Romano F, et al. p16INK4a expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Virchows Arch.* 2004;445:616-620.
- Wentzensen N, von Knebel Doeberitz M. Biomarkers in cervical cancer screening. *Dis Markers.* 2007;23(4):315-330.
- Cuschieri K, Wentzensen N. Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17:2536-2545.
- Tsompou I, Arbyn M, Kyrgiou M, et al. p16INK4a immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and metaanalysis. *Cancer Treat Rev.* 2009;35:210-220.
- Dijkstra MG, Heideman DA, de Roy SC, et al. p16(INK4a) immunostaining as an alternative to histology review for reliable grading of cervical intraepithelial lesions. *J Clin Pathol.* 2010;63(11):972-977.
- Bergeron C, Ordi J, Schmidt D, et al. European CINtec Histology Study Group. Conjunctive p16INK4a testing significantly increases accuracy in diagnosing highgrade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol.* 2010;133:395-406.
- Galgano MT, Castle PE, Atkins KA, et al. Using biomarkers as objective standards in the diagnosis of cervical biopsies. *Am J Surg Pathol.* 2010;34:1077-1087.
- Stoler MH, Wright TC, Ferenczy A, et al. Routine Use of Adjunctive p16 Immunohistochemistry Improves Diagnostic Agreement of Cervical Biopsy Interpretation. *Am J Surg Pathol.* 2018;42(8):1001-1009.
- Massad LS, Einstein M, Huh W, et al. 2012 Updated Consensus Guidelines for the management of abnormal cervical cancer screening tests and cancer precursors. *J Low Genit Tract Dis.* 2013;17:S1-S27.
- Arbyn M, Kyrgiou M, Simoons C, et al. Perinatal mortality and other severe adverse pregnancy outcomes associated with treatment of cervical intraepithelial neoplasia: metaanalysis. *BMJ.* 2008;337:a1284.
- Albrechtsen S, Rasmussen S, Thoresen S, et al. Pregnancy outcome in women before and after cervical conisation: population based cohort study. *BMJ.* 2008;337:a1343.
- Sadler L, Saftlas A, Wang W, et al. Treatment for cervical intraepithelial neoplasia and risk of preterm delivery. *JAMA.* 2004;291:2100-2106.
- Park KJ, Soslow RA. Current concepts in cervical pathology. *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133(5):729-738.
- Stoler MH, Schiffman M. Atypical squamous cells of undetermined significance-lowgrade squamous intraepithelial lesion triage study (ALTS) group. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL triage study. *JAMA.* 2001;285:1500-1505.
- Stoler MH, Ronnett BM, Joste NE, et al. New Mexico HPV Pap registry steering committee. The interpretive variability of cervical biopsies and its relationship to HPV status. *Am J Surg Pathol.* 2015;39(6):729-736.
- Klaes R, Benner A, Friedrich T, et al. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2002;26:1389-1399.
- Reuschenbach M, Wentzensen N, Dijkstra MG, et al. p16INK4a immunohistochemistry in cervical biopsy specimens: A systematic review and metaanalysis of the interobserver agreement. *Am J Clin Pathol.* 2014;142(6):767-772.

23. De Vet HCW, Knipschild PG, Schouten HJA, et al. Interobserver variation in histopathological grading of cervical dysplasia. J Clin Epidemiol. 1990;43:1395-1398.
24. Creagh T, Bridger JE, Kupek E, et al., Pathologist variation in reporting cervical borderline epithelial abnormalities and cervical intraepithelial neoplasia. J Clin Pathol, 1995. 48(1): p. 59-60.
25. Ceballos KM, Chapman W, Daya D, et al., Reproducibility of the histological diagnosis of cervical dysplasia among pathologists from 4 continents. Int J Gynecol Pathol, 2008. 27(1): p. 101-107.
26. Gurrola-Díaz CM, Suárez-Rincón AE, Vázquez-Camacho G, et al. p16INK4a immunohistochemistry improves the reproducibility of the histological diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia in cone biopsies. Gynecol Oncol. 2008;111:120-124.
27. Hom LC, Reichert A, Oster A, Amdal SF, et al. Immunostaining for p16INK4a used as a conjunctive tool improves interobserver agreement of the histologic diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. Am J Surg Pathol. 2008;32:502-512.
28. Sayed K, Korourian S, Ellison DA, et al. Diagnosing cervical biopsies in adolescents: the use of p16 immunohistochemistry to improve reliability and reproducibility. J Low Genit Tract Dis. 2007;11:141-146.
29. Carson FL, Cappellano C. Histotechnology; A Self-Instructional Text, 5th edition. American Society for Clinical Pathology Press; 2020, 2022.
30. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
31. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 24 June 2020 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
32. Roche PC, Hsi ED. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. In: NR Rose, ed. ASM Press; 2002.

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

Souhm bezpečnosti a funkčnosti naleznete zde:

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

Symbyly

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



Globální číslo obchodní položky

Rx Only

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

HISTORIE REVIZÍ

Rev.	Aktualizace
H	Aktualizován oddíl Upozornění a bezpečnostní opatření, přidáno prohlášení Rx only a aktualizována současná šablona.

DUŠEVNÍ VLASTNICTVÍ

VENTANA, BENCHMARK, CINTEC, OPTIVIEW a ULTRAVIEW jsou ochranné známky společnosti Roche. Všechny ostatní ochranné známky jsou majetkem příslušných vlastníků.

© 2024 Ventana Medical Systems, Inc.

For USA: Rx only

KONTAKTNÍ ÚDAJE



Ventana Medical Systems, Inc.
1910 E. Innovation Park Drive
Tucson, AZ 85755
USA
+1 520 887 2155
+1 800 227 2155 (USA)

www.roche.com



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

