

Instrukcja stosowania

CINtec® Histology Kit

Zestaw CINtec® Histology Kit jest testem immunohistochemicznym przeznaczonym do jakościowego wykrywania antygenu p16^{INK4a} w preparatach skrawków tkanek utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie pozyskanych z biopsji szyjki macicy. Zestaw jest przeznaczony do stosowania w połączeniu z preparatami barwionymi hematoksyliną i eozyną (H&E), pochodzącymi z tych samych próbek tkanki szyjki macicy, w celu zwiększenia dokładności diagnostycznej i zgodności obserwacji pomiędzy osobami badającymi preparaty pod kątem śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy dużego stopnia.



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim
Germany

<https://navifyportal.roche.com>

REF

10213370001

GTIN

07613336230350



50



2–8°C



CE
0123

IVD



Spis treści

POLSKI.....	3
I. Nazwa produktu.....	3
II. Przeznaczenie.....	3
III. Podsumowanie i wyjaśnienie działania zestawu	3
Podsumowanie i objaśnienia.....	3
Znaczenie kliniczne.....	4
Zasada procedury	5
IV. Odczynniki.....	5
Dostarczane materiały	5
Przechowywanie.....	7
Materiały i odczynniki wymagane, ale niedostarczane	8
Wymagany sprzęt.....	8
V. Ostrzeżenia i środki ostrożności	9
Ostrzeżenie.....	9
Uwaga	10
VI. Procedura.....	10
Przygotowanie próbki.....	10
Skrawki tkankowe zatopione w parafinie.....	10
Termiczne odmaskowanie antygenu	11
Procedura barwienia	11
1. Przygotowanie odczynników.....	11
1.1 Epitope Retrieval Solution.....	11
1.2 Wash Buffer.....	11
1.3 Odczynnik Substrate-Chromogen Solution (DAB).....	12
1.4 Barwienie kontrastowe.....	12
1.5 Środek do zatapiania.....	12
2. Procedura barwienia w aparatach Autostainer	12
2.1 Odparafinowanie i ponowne uwodnienie.....	13
2.2. Protokół barwienia w aparatach Autostainer	13
3. Procedura barwienia ręcznego	15
3.1 Odparafinowanie i ponowne uwodnienie.....	15
3.2. Protokół barwienia ręcznego.....	16
VII. Kontrola jakości	18
VIII. Interpretacja wyników.....	19
IX. Ograniczenia	20
X. Charakterystyka wyników	21

XI.	Rozwiązywanie problemów	27
XII.	Symbole	30
XIII.	Producent	30
XIV.	Informacje o wersji	30
XV.	Własność intelektualna	31
	Załącznik 1 Bibliografia.....	32
	Załącznik 2	35

POLSKI

I. Nazwa produktu

CINtec® Histology Kit

II. Przeznaczenie

Do badań diagnostycznych in vitro.

Zestaw CINtec® Histology Kit jest testem immunohistochemicznym przeznaczonym do jakościowego wykrywania antygenu p16^{INK4a} w preparatach skrawków tkanek utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie pozyskanych z biopsji szyjki macicy.

Zestaw jest przeznaczony do stosowania w połączeniu z preparatami barwionymi hematoksyliną i eozyną (H&E), pochodzącymi z tych samych próbek tkanki szyjki macicy, w celu zwiększenia dokładności diagnostycznej i zgodności obserwacji pomiędzy osobami badającymi preparaty pod kątem śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy dużego stopnia.

Test ten można wykonywać ręcznie lub przy użyciu aparatów Autostainer.

Wynik testu powinien zostać zinterpretowany przez wykwalifikowanego patologa na podstawie badań histopatologicznych, odpowiednich danych klinicznych i badań kontrolnych.

III. Podsumowanie i wyjaśnienie działania zestawu

Podsumowanie i objaśnienia

Zestaw CINtec® Histology Kit zawiera mysie przeciwciało monoklonalne (klon E6H4®) skierowane przeciwko ludzkiemu białku p16^{INK4a}.

Białko p16^{INK4a} jest inhibitorem kinazy zależnej od cyklin i pełni kluczową rolę w mechanizmie regulacji cyklu komórkowego u eukariontów. Stanowi element kontroli przejścia komórki z fazy G1 do fazy S, regulowanego za pośrednictwem białka Rb i blokuje postęp cyklu komórkowego w procesach różnicowania się komórek. W ostatecznie zróżnicowanych komórkach nabłonka ekspresja białka p16^{INK4a} jest obniżona do poziomu zwykle niewykrywalnego metodami immunohistochemicznymi.

Stwierdzono, że w wielu typach nowotworów gen białka p16^{INK4a} ulegał inaktywacji poprzez mutację lub hipermetylację promotora. Wykazano, że taka inaktywacja genu p16^{INK4a}, będącego supresorem nowotworowym, przyczyniała się do rozregulowania cyklu komórkowego i utraty kontroli nad proliferacją komórek.

Natomiast w zdolnych do namnażania się komórkach nabłonka szyjki macicy, gdzie onkoproteiny wirusa brodawczaka ludzkiego wysokiego ryzyka (HR-HPV) zainicjowały proces transformacji komórkowej, wykrywano znaczącą nadekspresję białka p16^{INK4a} [1, 2]. Ta silna nadekspresja białka p16^{INK4a} była ściśle związana na poziomie molekularnym z aktywnością onkoproteiny E7 wirusa HR-HPV. Wykazano, że nadekspresja białka p16^{INK4a} odzwierciedla regulowaną przez onkoproteinę E7 inaktywację funkcjonalnego kompleksu białka Rb i czynnika transkrypcyjnego E2F, co stanowi jedno z kluczowych zdarzeń podczas indukowanej przez wirusa HR-HPV

transformacji komórkowej [3].

W licznych badaniach dostępnych w artykułach naukowych wykazywano, że nadekspresja białka p16^{INK4a} (stwierdzona metodami immunohistochemicznymi) jest obecna w znacznym odsetku przypadków dysplazji przednowotworowej szyjki macicy dużego stopnia (tj. 80–100% zmian CIN2 i praktycznie wszystkie zmiany CIN3) i raków inwazyjnych. Zmiany śródnabłonkowe szyjki macicy małego stopnia (CIN1) wykazywały nadekspresję białka p16^{INK4a} w zmiennym zakresie, zwykle od 30 do 60% [1, 2, 4–16].

Podczas interpretacji wyników należy uwzględniać fakt, że białko p16^{INK4a} jest białkiem komórkowym, które może ulegać ekspresji na wykrywalnym poziomie w zmianach dysplastycznych szyjki macicy dużego stopnia i rakach szyjki macicy, jak również w niektórych stanach niezwiązanych z dysplazją szyjki macicy, lecz z różnym nasileniem i wykazując różne wzorce ekspresji. W histologicznych preparatach tkankowych morfologia tkanek jest nienaruszona, co pomaga w interpretacji wyników dodatnich względem białka p16^{INK4a} w skrawkach ze zmianami pobranymi z szyjki macicy. Sugeruje się, aby rozproszony wzorec barwienia, tj. barwienie ciągłe komórek warstwy podstawnej i przypodstawnej, któremu towarzyszyć może barwienie komórek warstw powierzchniowych, interpretować jako dodatni wynik testu na nadekspresję białka p16^{INK4a}. Udowodniono, że przy takim wzorcu barwienia można wykrywać zmiany CIN dużego stopnia z najwyższą czułością i swoistością [1, 4, 5]. Z kolei ogniskowy wzorec barwienia (zabarwienie pojedynczych komórek lub niewielkich zbitek komórek, czyli barwienie nieciągłe, szczególnie poza obrębem komórek warstwy podstawnej i przypodstawnej) oraz brak jakiejkolwiek immunoreaktywności należy interpretować jako ujemny wynik testu na nadekspresję białka p16^{INK4a} [1, 4, 5].

Wyniki uzyskane dla preparatów barwionych po kątem obecności białka p16^{INK4a} przy użyciu zestawu CINtec® Histology Kit należy interpretować w połączeniu z wynikami preparatów wybarwionych H&E, przygotowanych z tej samej próbki tkanki szyjki macicy. Dodatkowe informacje uzyskane dzięki analizie preparatów barwionych przy użyciu zestawu CINtec® należy wykorzystać wraz ze wstępnym rozpoznaniem bazującym na cechach morfologicznych, postawionym w oparciu o analizę preparatów wybarwionych H&E, do postawienia ostatecznego rozpoznania.

Znaczenie kliniczne

Wykazano, że połączenie odczytów preparatów z biopsji szyjki macicy wybarwionych H&E oraz preparatów z kolejnych wycinków tej samej tkanki wybarwionych immunochemicznie pod kątem obecności białka p16^{INK4a} zwiększa spójność oceny prowadzonej przez różnych badaczy i dokładność diagnostyczną rozpoznawania śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy dużego stopnia (CIN2+).

Rozpoznanie patologiczne postawione na podstawie badania skrawków tkankowych szyjki macicy wybarwionych H&E stanowi podstawę do dalszego leczenia. Konsekwencje mylnego rozpoznania mogą więc być poważne. Mylne rozpoznanie może być przyczyną niewłaściwego postępowania z pacjentką, np. podjęcia intensywnego leczenia zasadniczo zdrowej osoby lub niedostatecznego leczenia osoby ze zmianami dysplastycznymi dużego stopnia.

Interpretacja diagnostyczna histologicznych skrawków tkankowych wybarwionych H&E jest obarczona wysokim odsetkiem niezgodności co do interpretacji wyników pomiędzy patologami. Problem rozbieżności wyników powtórzonego badania tej samej tkanki badanej przez tego samego specjalistę oraz wyników badań prowadzonych przez różnych specjalistów omawiano w licznych publikacjach

dotyczących histologii szyjki macicy [17–20].

W szeroko zakrojonym, wieloośrodkowym badaniu w USA porównywano interpretacje preparatów histologicznych szyjki macicy (2237 próbek z biopsji kolposkopowej i 535 próbek z konizacji szyjki macicy pętlą elektrochirurgiczną LEEP) przeprowadzone przez wielu, odpowiednio przeszkolonych patologów. Odtwarzalność interpretacji wyników histopatologicznych była raczej umiarkowana ($\kappa=0,46$ dla próbek z biopsji sztanckowej i $\kappa=0,49$ dla próbek z biopsji metodą LEEP) [17]. Zarówno przy stosowaniu systemu oceniania WHO, jak i zmodyfikowanej klasyfikacji Bethesda, zgodność pomiędzy wynikami uzyskanymi przez sześciu histopatologów badających 125 próbek z biopsji kolposkopowej była niska [18]. Również badanie prowadzone w Wielkiej Brytanii wykazało niską zgodność interpretacji wyników pomiędzy ośmioma specjalistami histopatologami, badającymi 100 próbek z biopsji kolposkopowej (nieważona wartość κ wyniosła 0,358) [19].

Uzupełniając badanie konwencjonalnych próbek wybarwionych H&E o wyniki badania wykonanego przy użyciu zestawu CINtec® Histology Kit można poprawić ogólną dokładność tej histomorfologicznej procedury diagnostycznej [21–39].

Zasada procedury

Zestaw CINtec® Histology Kit zawiera zestaw odczynników przeznaczonych do immunohistochemicznego wykrywania antygenu p16^{INK4a}. Zestaw został opracowany na potrzeby dwuetapowej procedury barwienia immunohistochemicznego utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie próbek tkankowych uzyskanych z biopsji szyjki macicy. Do wykrywania antygenu stosuje się pierwszorzędowe mysie przeciwciała monoklonalne (klon E6H4®) skierowane przeciwko ludzkiemu białku p16^{INK4a}.

Stosowany jest gotowy do użycia odczynnik do wizualizacji, będący polimerowym odczynnikiem sprzężonym z peroksydazą chrzanową i fragmentami Fab' kozich przeciwciał anti-mysich. Odczynnik Visualization Reagent poddano absorpcji w fazie stałej w celu wykluczenia reakcji krzyżowych z ludzkimi immunoglobulinami. Reakcja barwna polega na konwersji chromogenu DAB z użyciem peroksydazy chrzanowej do barwnego produktu reakcji w miejscach występowania antygenu. Po barwieniu kontrastowym można nałożyć na preparat szkiełko nakrywkowe i ocenić wyniki pod mikroskopem świetlnym.

IV. Odczynniki

Dostarczane materiały

Wymienione poniżej materiały są dostarczane w każdym zestawie i wystarczają do wykonania 50 testów i 50 reakcji kontroli ujemnych. Liczba testów została wyliczona przy założeniu zużycia 200 µl odczynników na preparat.

1 Peroxidase Blocking Reagent

Peroxidase Blocking Reagent

2 x 11,5 ml, gotowy do użycia

3% roztwór nadtlenu wodoru, zawierający 15 mmol/l azydki sodu (NaN₃).

EUH210: Karta charakterystyki substancji niebezpiecznej dostępna na życzenie.

2 Mouse anti-Human p16^{INK4a} Antibody

Mouse anti-Human p16^{INK4a} Antibody

11,5 ml, gotowy do użycia

Mysie przeciwciało monoklonalne skierowane przeciwko ludzkiemu białku p16^{INK4a} (~1 µg/ml), klon E6H4™, dostarczane w buforze Tris 50 mmol/l, pH 7,2, zawierającym 15 mmol/l azydki sodu (NaN₃) i białko stabilizujące.

3 Visualization Reagent

Visualization Reagent

2 x 11,5 ml, gotowy do użycia



Ostrzeżenie

H317 Może powodować reakcję alergiczną skóry.

P261 Unikać wdychania pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy.

P272 Zanieczyszczonej odzieży ochronnej nie wynosić poza miejsce pracy.

P280 Stosować rękawice ochronne.

P333 + P313 W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.

P362 + P364 Zdjąć zanieczyszczoną odzież i wyprać przed ponownym użyciem.

P501 Zawartość/pojemnik usuwać, przekazując je do zatwierdzonej placówki utylizacji odpadów.

Zawiera:

26172-54-3 chlorowodorek 2-metylo-2H-izotiazol-3-onu

55965-84-9 masę reakcyjną: 5-chloro-2-metylo-4-izotiazolin-3-onu [nr WE 247-500-7] i 2-metylo-2H-izotiazol-3-onu [nr WE 220-239-6] (3:1)

Polimerowy odczynnik sprzężony z peroksydazą chrzanową i fragmentami Fab' kozich przeciwciał anty-mysich, wyselekcjonowanymi pod względem powinowactwa, dostarczany w stabilizującym roztworze zawierającym konserwanty i białko stabilizujące.

4 Negative Reagent Control

Negative Reagent Control

11,5 ml, gotowy do użycia

Mysie przeciwciało monoklonalne skierowane przeciwko szczurzej neurofizynie związanej z oksytocyną (~1 µg/ml), dostarczane w buforze Tris 50 mmol/l, pH 7,2, zawierającym 15 mmol/l azydki sodu (NaN₃) i białko stabilizujące. W celu weryfikacji swoistości barwienia. Szczurza neurofizyna związana z oksytocyną nie jest obecna w tkankach ludzkich.

5 DAB Buffered Substrate

DAB Buffered Substrate

31 ml

Roztwór buforowy dla substratu, pH 7,5, zawierający <0,1% nadtlenu wodoru, stabilizatory i wzmacniacze.

6 DAB Chromogen

DAB Chromogen

0,85 ml, roztwór chromogenu 3,3'-diaminobenzzydyny.



Niebezpieczeństwo

H314 Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu.

H341 Podejrzewa się, że powoduje wady genetyczne.

H350 Może powodować raka.

P201 Przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi środkami ostrożności.

P280 Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.

P303 + P361 + P353 W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ (lub z włosami): Natychmiast zdjąć całą zanieczyszczoną odzież. Spłukać skórę pod strumieniem wody.

P304 + P340 + P310 W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO DRÓG ODDECHOWYCH: Wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania. Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ/lekarzem.

P305 + P351 + P338 + P310 W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać. Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ/lekarzem.

P308 + P313 W PRZYPADKU narażenia lub styczności: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.

Zawiera 868272-85-9, uwodniony tetrachlorowodorek 3,3'-diaminobenzzydyny

UWAGA: Należy utylizować produkt zgodnie z unijnymi, państwowymi i lokalnymi przepisami.

7 Epitope Retrieval Solution 10X

Epitope Retrieval Solution 10X

500 ml, bufor Tris 100 mmol/l, pH 9, zawierający 10 mmol/l EDTA i 15 mmol/l azydku sodu (NaN₃).

Przechowywanie

Przechowywać temperaturze w 2–8°C. Nie należy stosować po upływie daty

ważności. Nie uzyskano danych dotyczących przechowywania odczynników w warunkach innych niż wymienione powyżej.

Po otwarciu elementów zestawu są one stabilne przez 6 miesięcy, jeśli są przechowywane w temperaturze 2–8°C. Należy usunąć roztwory, jeśli zmętnieją.

Rozcieńczony Wash Buffer (bufor płuczący) i rozcieńczony Epitope Retrieval Solution (roztwór do odmaskowania epitopu antygenu) są stabilne przez maksymalnie jeden miesiąc przy przechowywaniu w temperaturze 2–8°C. Roztworów nie wolno używać w razie zmętnienia.

Materiały i odczynniki wymagane, ale niedostarczane

Bufor **CINtec® Wash Buffer 10X** do stosowania z zestawem CINtec® Histology Kit jest dostępny w firmie Roche pod numerem katalogowym 10215364001, ale nie stanowi elementu zestawu. Szczegółowe informacje na temat składania zamówień można uzyskać na stronie www.roche.com.

Bufor Tris 500 mmol/l z 1,5 mol/l NaCl, pH 7,6, zawierający detergent i środek przeciwdrobnoustrojowy.



Ostrzeżenie

H317 Może powodować reakcję alergiczną skóry.

P261 Unikać wdychania pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy.

P272 Zanieczyszczonej odzieży ochronnej nie wносить poza miejsce pracy.

P280 Stosować rękawice ochronne.

P333 + P313 W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.

P362 + P364 Zdjąć zanieczyszczoną odzież i wyprać przed ponownym użyciem.

P501 Zawartość/pojemnik usuwać, przekazując je do zatwierdzonej placówki utylizacji odpadów.

Zawiera 55965-84-9 masę reakcyjną: 5-chloro-2-metylo-4-izotiazolin-3-onu [nr WE 247-500-7] i 2-metylo- 2H-izotiazol-3-onu [nr WE 220-239-6] (3:1)

Ściereczki chłonne;

Hematoksylina do barwienia kontrastowego;

Woda destylowana lub dejonizowana (woda do mycia);

Etanol, 95% i 70%;

Środek do zatapiania preparatu;

Preparaty tkankowe do stosowania jako kontrole dodatnie i ujemne;

Szkiełka (SuperFrost® Plus lub odpowiednik);

Ksylen;

Szkiełka nakrywkowe.

Wymagany sprzęt

Opcjonalnie: Suszarka umożliwiająca utrzymanie temperatury 60°C lub niższej;

Opcjonalnie: Aparat Dako lub LabVision Autostainer;
Komora wilgotna (opcjonalnie);
Mikroskop świetlny (z obiektywem o powiększeniu 4–40x);
Naczynia lub łaźnia do barwienia;
Tryskawki;
Minutnik (pomiar w odstępach 2–60 minut);
Łaźnia wodna z pokrywą (do utrzymywania roztworu Epitope Retrieval Solution w temperaturze 95–99°C).

V. Ostrzeżenia i środki ostrożności

Ostrzeżenie

1. Uwaga! Niektóre odczynniki z zestawu zawierają niebezpieczne substancje chemiczne. Podczas posługiwania się elementami zestawu należy ściśle przestrzegać zasad bezpieczeństwa pracy z niebezpiecznymi odczynnikami laboratoryjnymi.
2. Elementy 1, 2, 4 i 7 tego produktu zawierają azyd sodu (NaN_3), silnie toksyczny w czystej postaci. W stężeniach użytych w produkcie, pomimo tego, że nie jest on sklasyfikowany jako niebezpieczny, nagromadzony azyd sodu może jednak reagować z ołowiem i miedzią w instalacji kanalizacyjnej, tworząc silnie wybuchowe azydki metali. Przy usuwaniu resztek odczynnika spłukiwać go dużą ilością wody, aby uniknąć gromadzenia się azydów metali w instalacji kanalizacyjnej.
3. Elementy 2, 3 i 4 zestawu zawierają materiał pochodzenia zwierzęcego. Należy ściśle przestrzegać procedur właściwego postępowania z produktami pochodzenia biologicznego.
4. Karty charakterystyki substancji niebezpiecznych zawartych w zestawie są dostępne na życzenie.
5. Podczas posługiwania się utrwalonymi lub jeszcze nieutrwalonymi próbkami histologicznymi i usuwania ich, jak również posługiwania się wszelkimi materiałami mającymi z nimi kontakt i usuwania ich, należy ściśle przestrzegać zasad bezpieczeństwa pracy z potencjalnie zakaźnym materiałem i odnośnych przepisów dotyczących utylizacji takich materiałów.
6. Nigdy nie pipetować odczynników ustami. Unikać kontaktu odczynników i próbek ze skórą i błonami śluzowymi. W przypadku kontaktu odczynnika lub próbki ze skórą lub błonami śluzowymi obficie spłukiwać wodą.
7. Wysokie natężenie światła może negatywnie oddziaływać na odczynniki Visualization Reagent i DAB Chromogen. Nie należy przechowywać elementów zestawu ani wykonywać barwienia w silnym świetle, np. w bezpośrednich promieniach słonecznych.
8. Należy stosować odpowiedni sprzęt ochrony osobistej, aby uniknąć kontaktu z oczami lub skórą podczas pracy z elementami należącymi do zestawu lub stosowanymi wraz z zestawem CIntec® Histology Kit. Dalsze informacje znaleźć można w kartach charakterystyki substancji niebezpiecznych (SDS).
9. Oznakowanie dotyczące bezpieczeństwa produktu jest przede wszystkim

zgodne z wytycznymi GHS UE.

Uwaga

1. Do badań diagnostycznych in vitro.
2. Wyłącznie do użytku profesjonalnego.
3. Należy minimalizować skażenie mikrobiologiczne odczynników dla uniknięcia niespecyficznych wyników barwienia.
4. Czasy i temperatury inkubacji, jak również metody postępowania inne od podanych, mogą być powodem uzyskania błędnych wyników.
5. Nie stosować zestawu, jeśli opakowanie któregoś z elementów jest uszkodzone. Jeśli opakowanie lub elementy mają ślady uszkodzeń, prosimy niezwłocznie powiadomić producenta.
6. Należy utylizować wszelkie zużyte materiały zgodnie z miejscowymi wskazaniami i przepisami.
7. Wszystkie odczynniki zostały specjalnie opracowane do użytku w tym teście. Jeśli ma on działać zgodnie ze specyfikacją, nie należy stosować zamienników dla tych odczynników.
8. W przypadku uzyskania nieoczekiwanego wyniku barwienia, którego nie można wyjaśnić różnicami w procedurach laboratoryjnych oraz, gdy podejrzewa się problem z zestawem CINtec® Histology Kit, należy niezwłocznie skontaktować się z działem pomocy technicznej, korzystając z danych kontaktowych zamieszczonych w części XIII., aby uzyskać dalsze informacje.
9. Nieprawidłowe działanie produktu wynikające z niewłaściwego posługiwania się nim lub niestabilności odczynników nie wykazuje jednoznacznych oznak. Dlatego, w ramach kontroli jakości, należy wykonywać dodatnie i ujemne próby kontrolne równoległe z odczynami na próbkach od pacjentów.
10. Aby zgłosić podejrzenie wystąpienia poważnych incydentów związanych z tym wyrobem, należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem firmy Roche oraz powiadomić właściwy organ państwa członkowskiego lub państwa, w którym znajduje się użytkownik.

VI. Procedura

Przygotowanie próbki

Zestaw CINtec® Histology Kit jest przeznaczony do stosowania z próbkami tkankowymi utwalonymi na potrzeby procedur immunohistochemicznych. Próbki należy przygotowywać z zastosowaniem standardowych metod obróbki tkanek.

Szkiełka o dodatnim ładunku, takie jak szkiełka SuperFrost® Plus, są zalecane do uzyskania optymalnego działania testu.

Skrawki tkankowe zatopione w parafinie

Zestaw można stosować z próbkami tkanek utwalonych w obojętnej zbuforowanej formalinie i zatopionych w parafinie, przygotowanych w rutynowy sposób, przy użyciu standardowych metod. Jeśli do przygotowania próbek zastosowano inną metodę konserwacji, musi ona zostać zweryfikowana przez użytkownika.

Próbki biopsyjne należy utrzymywać przez 18–24 godz. w obojętnej zbuforowanej formalinie (zalecane stężenie to 10%) i zatapiać w bloku o grubości 3 lub 4 mm. Bloki tkankowe następnie odwadnia się w serii roztworów alkoholu i ksyleny oraz nasącza parafiną, roztopioną i utrzymywaną w temperaturze nie wyższej niż 60°C. W laboratorium histopatologicznym każdy blok tkankowy zostanie pocięty na skrawki o grubości 4–5 µm, które zostaną umieszczone na szkiełkach mikroskopowych SuperFrost® Plus. Preparaty należy natychmiast wybarwić, ponieważ antygenowość ciętych skrawków tkankowych może z czasem ulegać osłabieniu.

Termiczne odmaskowanie antygenu

Podczas termicznego odmaskowania antygenu skrawki tkankowe umieszczone na szkiełku należy ogrzać poprzez zanurzenie w odczynniku Epitope Retrieval Solution w kalibrowanej łaźni wodnej umożliwiającej utrzymanie roztworu Epitope Retrieval Solution w temperaturze 95–99°C. Laboratoria znajdujące się na dużych wysokościach powinny ustalać optymalne metody utrzymywania wymaganej temperatury w łaźni wodnej. Producent nie zaleca żadnych odstępstw od opisanej tutaj procedury.

Po termicznym odmaskowaniu antygenu skrawki tkankowe należy schładzać przez 20 minut w temperaturze pokojowej przed dalszym przetwarzaniem. Należy następnie niezwłocznie przeprowadzić procedurę barwienia skrawków tkankowych.

Procedura barwienia

1. Przygotowanie odczynników

Przed barwieniem immunochemicznym wszystkie odczynniki należy doprowadzić do temperatury pokojowej (20–25°C). Podobnie, wszystkie kolejne etapy barwienia należy przeprowadzić w temperaturze pokojowej.

Dłóżć starań, aby nie doszło do wysychania próbek podczas procedur immunochemicznych, jako że wysychanie może prowadzić do powstawania artefaktów podczas barwienia.

Przed rozpoczęciem procedury barwienia należy przygotować poniższe odczynniki:

1.1 Epitope Retrieval Solution

Przygotować ilość odczynnika Epitope Retrieval Solution wystarczającą do planowanej procedury barwienia, rozcieńczając zawartość fiolki 7 (Epitope Retrieval Solution 10X) w stosunku 1:10 wodą destylowaną lub dejonizowaną.

Rozcieńczony odczynnik Epitope Retrieval Solution można przechowywać w temperaturze 2–8°C przez maksymalnie jeden miesiąc. Należy usunąć rozcieńczony roztwór, jeśli zmętnieje.

UWAGA: Stosowanie wody o wysokiej zawartości jonów do rozcieńczania roztworu do odmaskowania antygenu może znacznie ograniczyć natężenie sygnału barwienia. Należy upewnić się, że używana woda jest właściwie dejonizowana (w tym prowadząc rutynowe zabiegi konserwacyjne stosowanej do dejonizacji wody kolumny jonowymiennej). Nie używać wody kranowej!

1.2 Wash Buffer

Z zestawem CINtec® Histology Kit stosować dostarczany przez firmę Roche bufor

CINtec® Wash Buffer 10X, numer katalogowy 10215364001. Szczegółowe informacje na temat składania zamówień można uzyskać na stronie www.roche.com.

Przygotować ilość odczynnika Wash Buffer wystarczającą do przeprowadzenia etapów płukania planowanej procedury barwienia, rozcieńczając odczynnik Wash Buffer 10X, numer katalogowy 10215364001, w stosunku 1:10 wodą destylowaną lub dejonizowaną.

Rozcieńczony odczynnik Wash Buffer można przechowywać w temperaturze 2–8°C przez maksymalnie jeden miesiąc. Należy usunąć rozcieńczony roztwór, jeśli zmętnieje.

1.3 Odczynnik Substrate-Chromogen Solution (DAB)

Podczas przygotowywania odczynnika Substrate-Chromogen Solution należy dodać jedną kroplę odczynnika DAB Chromogen do 2 ml odczynnika DAB Buffered Substrate. Należy wykonać następujące czynności:

- i) przenieść do probówki testowej 2 ml odczynnika DAB Buffered Substrate z fiolki 5;
- ii) dodać jedną kroplę (25–30 µl) odczynnika DAB Chromogen z fiolki 6. Wymieszać i nanieść na skrawek tkankowy pipetą.

2 ml odczynnika Substrate-Chromogen Solution (DAB) przygotowanego zgodnie z powyższą instrukcją zwykle wystarczają do wybarwienia pięciu skrawków tkankowych wraz z pięcioma próbkami kontrolnymi.

UWAGA: Przygotowany odczynnik Substrate-Chromogen Solution (DAB) należy zużyć tego samego dnia.

UWAGA: Dodanie nadmiernej ilości DAB Chromogen do DAB Buffered Substrate spowoduje zmniejszenie natężenia sygnału dodatniego.

1.4 Barwienie kontrastowe

W wyniku reakcji barwnej odczynnika DAB uzyskuje się nierozpuszczalny w wodzie, barwny produkt końcowy. Do barwienia kontrastowego można zastosować alkoholowy lub wodny roztwór hematoksyliny. Podczas stosowania hematoksyliny przy wykonywaniu barwienia kontrastowego należy przestrzegać instrukcji jej dostawcy.

1.5 Środek do zatapiania

Zaleca się, aby przeprowadzać zatapianie próbek po barwieniu z zastosowaniem środka do trwałego zatapiania innego niż wodny. Dopuszcza się jednak również użycie wodnego środka do zatapiania.

Do zatapiania w środku innym niż wodny zaleca się Eukitt Mounting Medium. Do zatapiania w środku wodnym zaleca się Aquatex Merck.

2. Procedura barwienia w aparatach Autostainer

Zestaw CINtec® Histology Kit został dostosowany do używania z aparatami Autostainer (Lab Vision Autostainer 480 lub Dako Autostainer Plus) zgodnie z podanym poniżej szablonem. Korzystanie z innych aparatów lub systemów oferujących porównywalne funkcje jest możliwe pod warunkiem przeprowadzenia przez użytkownika odpowiedniej walidacji. Przed wykonaniem barwienia na aparacie Autostainer próbki i odczynniki należy przygotować zgodnie z wytycznymi w punktach 1.1–1.5 i 2.1

2.1 Odparafinowanie i ponowne uwodnienie

Przed odparafinowaniem należy umieścić preparaty w suszarce w temperaturze nie wyższej niż 60°C na przynajmniej 20 minut, lecz nie więcej niż jedną godzinę, w celu ilościowego usunięcia wody, poprawy przylegania tkanki do szkiełka („zapiękanie”) i roztopienia parafiny. Preparaty tkankowe trzeba odparafinować, aby usunąć środek do zatapiania. Następnie należy je ponownie nawodnić przed przystąpieniem do barwienia. Należy koniecznie usunąć całą parafinę, gdyż pozostałości środka do zatapiania mogą powodować nasilenie barwienia nieswoistego. Inkubować preparaty w temperaturze pokojowej (20–25°C) zgodnie z poniższą procedurą.

- umieścić na 5 ($\pm$ 1) minut w kąpeli ksylenowej;
- powtórzyć ten etap jeden raz, używając świeżej kąpeli;
- usunąć nadmiar płynu;
- umieścić na 3 ($\pm$ 1) minuty w 95% etanolu;
- powtórzyć ten etap jeden raz, używając świeżej kąpeli;
- usunąć nadmiar płynu;
- umieścić na 3 ($\pm$ 1) minuty w 70% etanolu;
- powtórzyć ten etap jeden raz, używając świeżej kąpeli;
- usunąć nadmiar płynu;
- umieścić na przynajmniej 30 sekund w wodzie destylowanej lub dejonizowanej.

Rozpocząć procedurę barwienia zgodnie z opisem w punkcie 2.2, Etap 1: Odmaskowanie antygenu.

Roztwory ksylenu i alkoholu należy wymieniać przynajmniej co 40 preparatów.

UWAGA: Należy pamiętać, że zmienianie temperatury urządzeń lub czasu poszczególnych etapów przetwarzania próbki przed analizą może prowadzić do niepełnego usunięcia parafiny z preparatów tkankowych. Resztki parafiny mogą powodować nieprawidłowości w barwieniu histologicznym, w tym barwieniu przy użyciu testu CIntec® Histology. Laboratoria histopatologiczne powinny regularnie monitorować sprzęt dla ograniczenia zmienności warunków podczas przygotowywania preparatów do barwienia. Zaobserwowanie wyrazistych granic w obrębie tkanek poddanych barwieniu immunochemicznemu lub innych niezgodności wyników dowolnego barwienia immunohistochemicznego może wskazywać na nieoptymalne lub niepełne przygotowanie próbki do barwienia przed analizą. Należy w takiej sytuacji sprawdzić, czy sprzęt działa prawidłowo i czy zastosowano właściwe metody przygotowania próbki do analizy.

2.2. Protokół barwienia w aparatach Autostainer

Etap 1: Odmaskowanie antygenu

- napełnić naczynia do barwienia, np. plastikowe naczynia Coplin, rozcieńczonym roztworem Epitope Retrieval Solution (patrz część Procedura, punkt 1.1);
- umieścić naczynia do barwienia zawierające odczynnik Epitope Retrieval Solution w łaźni wodnej i ogrzać wodę wraz z odczynnikiem Epitope Retrieval Solution do 95–99°C. Należy koniecznie dostosować poziom wody w łaźni,

aby zapewnić zanurzenie naczyń w wodzie do 80% wysokości. Naczynia nakryć pokrywami, aby ustabilizować temperaturę i zapobiec parowaniu;

- zanurzyć odparafinowane preparaty tkankowe w ogrzonym wcześniej odczynniku Epitope Retrieval Solution w naczyniach do barwienia; podczas tej czynności temperatura w naczyniach spada zwykle poniżej 90°C;
- doprowadzić łaźnię wodną i odczynnik Epitope Retrieval Solution w naczyniach z powrotem do temperatury 95–99°C; sprawdzić temperaturę odczynnika Epitope Retrieval Solution w naczyniach;
- inkubować przez 10 (± 1) minut w temperaturze 95–99°C; rozpocząć odliczanie czasu dopiero po upewnieniu się, że temperatura odczynnika Epitope Retrieval Solution w naczyniach osiągnęła 95–99°C;
- wyjąć całe naczynie z preparatami z łaźni wodnej;
- pozwolić, aby preparaty w odczynniku Epitope Retrieval Solution stygły przez 20 (± 1) minut w temperaturze pokojowej;
- zlać roztwór Epitope Retrieval Solution i przepłukać preparaty odczynnikiem Wash Buffer (patrz część Procedura, punkt 1.2);
- dla uzyskania optymalnego działania testu zanurzyć preparaty w odczynniku Wash Buffer na 5 minut po odmaskowaniu antygenu i przed barwieniem;

UWAGA: Odczynnik Epitope Retrieval Solution jest przeznaczony wyłącznie do jednokrotnego użytku. Nie należy używać go ponownie.

Etap 2: Programowanie aparatu

Przed pierwszym użyciem zestawu CINtec® Histology Kit w aparacie Autostainer należy skonfigurować nowy szablon. Szczegółowe informacje zawiera instrukcja obsługi aparatu Autostainer.

Etap 3: Barwienie na automacie Autostainer

- przenieść odczynniki z butelek zestawu do miarowych fiolek na odczynniki aparatu Autostainer. Użyć wygenerowanej przez Autostainer mapy czasów programów i objętości odczynników (te dane znajdują się w punkcie 4);
- umieścić fiołki z odczynnikiem aparatu Autostainer w statywie na odczynniki aparatu Autostainer zgodnie z komputerowo wygenerowaną mapą rozmieszczenia odczynników;
- umieścić preparaty w aparacie Autostainer zgodnie z komputerowo wygenerowaną mapą rozmieszczenia preparatów;
- w celu zapobieżenia wysychaniu preparatów należy spryskać je buforem płuczącym po umieszczeniu w aparacie Autostainer;
- poniżej przedstawiono schemat przebiegu programu:
 - o płukanie*;
 - o 200 μ l Peroxidase-Blocking Reagent — 5 minut;
 - o płukanie*;
 - o 200 μ l Primary p16^{INK4a} antibody lub Negative Reagent Control — 30 minut;
 - o płukanie*;

- o 200 µl Visualization Reagent — 30 minut;
- o płukanie*;
- o płukanie*;
- o płukanie*;
- o zamiana;
- o 200 µl Substrate-Chromogen Solution (DAB) — 10 minut;
- o płukanie*;
- o przepłukać preparaty wodą dejonizowaną po etapie „substrat-chromogen.

*do odpowiednich etapów płukania stosować odczynnik Wash Buffer.

UWAGA: Jeśli stosowany aparat Autostainer płucze preparaty buforem, muszą one być przemyte wodą dejonizowaną po wyjęciu z aparatu Autostainer.

Etap 4: Barwienie kontrastowe (instrukcje mają zastosowanie do hematoksyliny)

- zanurzyć preparaty w kąpeli z hematoksyliny. Inkubować przez czas od 2 do 5 minut, w zależności od stężenia stosowanego roztworu hematoksyliny;
- umieścić preparaty w kąpeli z wody kranowej i delikatnie przepłukać pod bieżącą wodą kranową. Upewnić się, że usunięto resztki hematoksyliny;
- krótko, delikatnie przepłukać preparaty w kąpeli z wodą destylowaną lub dejonizowaną;
- barwienie kontrastowe można wykonać bezpośrednio w aparacie Autostainer.

UWAGA: W zależności od czasu inkubacji i siły działania używanej hematoksyliny jądra komórkowe po barwieniu kontrastowym będą miały kolor bładoniebieski do granatowego. Nadmierne lub niecałkowite barwienie kontrastowe może utrudniać prawidłową interpretację wyników.

Etap 5: Zatapianie

Zalecany jest niewodny środek do trwałego zatapiania. W innych przypadkach dopuszcza się również użycie wodnego środka do zatapiania. Należy przestrzegać instrukcji producenta danego środka do zatapiania.

UWAGA: Aby ograniczyć zanikanie sygnału, należy przechowywać preparaty w temperaturze pokojowej (20–25°C) i chronić przed światłem.

3. Procedura barwienia ręcznego

UWAGA: Należy zapobiegać wysychaniu skrawków tkankowych podczas wykonywania barwienia. Wysuszenie skrawków tkankowych może powodować nasilenie odczynu nieswoistego. Jeżeli stosuje się długie czasy inkubacji, tkanki powinny się znajdować w środowisku o odpowiedniej wilgotności.

Podczas ręcznego barwienia immunohistochemicznego przy użyciu zestawu CINtec® Histology Kit należy postępować zgodnie ze standardowymi procedurami.

3.1 Odparafinowanie i ponowne uwodnienie

Przed odparafinowaniem należy umieścić preparaty w suszarce w temperaturze nie

wyższej niż 60°C na przynajmniej 20 minut, lecz nie więcej niż jedną godzinę, w celu ilościowego usunięcia wody, poprawy przylegania tkanki do szkiełka („zapiękanie”) i roztopienia parafiny. Preparaty tkankowe trzeba odparafinować, aby usunąć środek do zatapiania. Następnie należy je ponownie nawodnić przed przystąpieniem do barwienia. Należy koniecznie usunąć całą parafinę, gdyż pozostałości środka do zatapiania mogą powodować nasilenie barwienia nieswoistego. Inkubować preparaty w temperaturze pokojowej (20–25°C) zgodnie z poniższą procedurą.

- umieścić na 5 (± 1) minut w kąpeli ksilenowej;
- powtórzyć ten etap jeden raz, używając świeżej kąpeli;
- usunąć nadmiar płynu;
- umieścić na 3 (± 1) minuty w 95% etanolu;
- powtórzyć ten etap jeden raz, używając świeżej kąpeli;
- usunąć nadmiar płynu;
- umieścić na 3 (± 1) minuty w 70% etanolu;
- powtórzyć ten etap jeden raz, używając świeżej kąpeli;
- usunąć nadmiar płynu;
- umieścić na przynajmniej 30 sekund w wodzie destylowanej lub dejonizowanej.

Rozpocząć procedurę barwienia zgodnie z opisem w punkcie 3.2, Etap 1: Odmaskowanie antygenu.

Roztwory ksylenu i alkoholu należy wymieniać przynajmniej co 40 preparatów.

3.2. Protokół barwienia ręcznego

Etap 1: Odmaskowanie antygenu

- napełnić naczynia do barwienia, *np.* plastikowe naczynia Coplin, rozcieńczonym roztworem Epitope Retrieval Solution (patrz część Procedura, punkt 1.1);
- umieścić naczynia do barwienia zawierające odczynnik Epitope Retrieval Solution w łaźni wodnej i ogrzać wodę wraz z odczynnikiem Epitope Retrieval Solution do 95–99°C. Na tym etapie należy koniecznie dostosować poziom wody w łaźni, aby zapewnić zanurzenie naczyń w wodzie do 80% wysokości. Naczynia nakryć pokrywami, aby ustabilizować temperaturę i zapobiec parowaniu;
- zanurzyć odparafinowane preparaty tkankowe w ogrzanej wcześniej odczynnikiem Epitope Retrieval Solution w naczyniach do barwienia; podczas tej czynności temperatura w naczyniach spada zwykle poniżej 90°C;
- doprowadzić łaźnię wodną i odczynnik Epitope Retrieval Solution w naczyniach z powrotem do temperatury 95–99°C; sprawdzić temperaturę odczynnika Epitope Retrieval Solution w naczyniach;
- inkubować przez 10 (± 1) minut w temperaturze 95–99°C; rozpocząć odliczanie czasu dopiero po upewnieniu się, że temperatura odczynnika Epitope Retrieval Solution w naczyniach osiągnęła 95–99°C;
- wyjąć całe naczynie z preparatami z łaźni wodnej;

- pozwolić, aby preparaty w odczynniku Epitope Retrieval Solution stygły przez 20 (± 1) minut w temperaturze pokojowej;
- zlać roztwór Epitope Retrieval Solution i przepłukać preparaty rozcieńczonym odczynnikiem Wash Buffer (patrz część Procedura, punkt 1.2);
- dla uzyskania optymalnego działania testu zanurzyć preparaty w odczynniku Wash Buffer na 5 (± 1) minut po odmaskowaniu antygenu i przed barwieniem.

UWAGA: Odczynnik Epitope Retrieval Solution jest przeznaczony wyłącznie do jednokrotnego użytku. Nie należy używać go ponownie.

Etap 2: Peroxidase-Blocking Reagent

- zastosować 200 μ l odczynnika Peroxidase-Blocking Reagent do przykrycia preparatu;
- inkubować przez 5 (± 1) minut;
- strząsnąć nadmiar płynu i umieścić preparaty w świeżej kąpeli z odczynnika Wash Buffer na 5 (± 1) minut.

Etap 3: Primary Antibody lub Negative Reagent Control

- usunąć nadmiar buforu;
- przykryć próbkę, używając 200 μ l roztworu przeciwciała pierwszorzędowego (Mouse Anti-Human p16^{INK4a} lub Negative Reagent Control);
- inkubować przez 30 (± 1) minut;
- strząsnąć nadmiar płynu i umieścić preparaty w świeżej kąpeli z odczynnika Wash Buffer na 5 (± 1) minut.

Etap 4: Visualization Reagent

- usunąć nadmiar buforu;
- przykryć próbkę, używając 200 μ l odczynnika Visualization Reagent;
- inkubować przez 30 (± 1) minut;
- strząsnąć nadmiar płynu i umieścić preparaty w świeżej kąpeli z buforu na 5 (± 1) minut;
- powtórzyć ten etap dwukrotnie, używając świeżej kąpeli z odczynnika Wash Buffer.

Etap 5: Substrate-Chromogen Solution (DAB)

- przykryć próbkę, używając 200 μ l odczynnika Substrate-Chromogen Solution (DAB) przygotowanego zgodnie z procedurą opisaną powyżej w punkcie 1.3;
- inkubować przez 10 (± 1) minut;
- strząsnąć nadmiar płynu i przemyć delikatnie wodą destylowaną lub dejonizowaną.

Zebrać zużyty odczynnik Substrate-Chromogen Solution (DAB) do pojemnika na

niebezpieczne odpady do właściwej utylizacji.

Etap 6: Barwienie kontrastowe (instrukcje mają zastosowanie do hematoksyliny)

- zanurzyć preparaty w kąpeli z hematoksyliny. Inkubować przez czas od 2 do 5 minut, w zależności od stężenia stosowanego roztworu hematoksyliny;
- umieścić preparaty w kąpeli z wody kranowej i delikatnie przepłukać pod bieżącą wodą kranową. Upewnić się, że usunięto resztki hematoksyliny;
- krótko, delikatnie przepłukać preparaty w kąpeli z wodą destylowaną lub dejonizowaną.

UWAGA: W zależności od czasu inkubacji i siły działania używanej hematoksyliny jądra komórkowe po barwieniu kontrastowym będą miały kolor bładoniebieski do granatowego. Nadmierne lub niecałkowite barwienie kontrastowe może utrudniać prawidłową interpretację wyników.

Etap 7: Zatapanie

Zalecany jest niewodny środek do trwałego zatapania. W przypadku środków do trwałego zatapania na bazie ksylenu konieczna jest procedura odwadniania, np.

- woda destylowana lub dejonizowana
- 3 min w 70% etanolu
- 3 min w 70% etanolu
- 3 min w 96% etanolu
- 3 min w 99% etanolu
- 5 min w ksylenie
- 5 min w ksylenie

W innych przypadkach dopuszcza się również użycie wodnego środka do zatapania. Należy przestrzegać instrukcji producenta danego środka do zatapania.

UWAGA: Aby ograniczyć zanikanie sygnału, należy przechowywać preparaty w temperaturze pokojowej (20–25°C) i chronić przed światłem.

VII. Kontrola jakości

Stosowanie innych niż zalecane metod utrwalania i dalszego przetwarzania próbek w laboratorium użytkownika może powodować znaczną zmienność wyników, przez co konieczne jest regularne przeprowadzanie wewnętrznych kontroli jakości.

Dodatnia kontrola tkankowa

Zewnętrzne materiały do kontroli dodatkowo powinny być świeżymi próbkami z autopsji/biopsji/pobranymi chirurgicznie i jak najszybciej utrwalonymi, poddanymi obróbce i zatopieniu w ten sam sposób jak próbki pobrane od pacjenta. Wyniki dodatknych kontroli tkankowych potwierdzają właściwe przygotowanie tkanek i prawidłową technikę barwienia. Podczas każdej serii barwienia, dla każdej konfiguracji testowej należy wykonać jedną zewnętrzną dodatnią kontrolę tkankową. Tkanki użyte jako zewnętrzna kontrola dodatnia powinny być dobierane spośród

preparatów pacjentów o znanym dodatnim barwieniu białka p16^{INK4a}. Jeżeli w kontrolach dodatnich nie uzyska się dodatniego odczynu, należy uznać, że wyniki próbek badanych są nieważne.

Ujemna kontrola tkankowa

Typy komórek o znanym ujemnym wyniku barwienia białka p16^{INK4a} są obecne w większości skrawków tkankowych i można je wykorzystać jako obszary wewnętrznej kontroli ujemnej w celu weryfikacji działania testu IHC. Jeżeli w obrębie ujemnej kontroli tkankowej występuje swoiste barwienie (wynik fałszywie dodatni), należy uznać, że wyniki próbek pacjenta są nieważne.

Nieswoisty odczynnik Negative Reagent Control

Użyć nieswoistego odczynnika Negative Reagent Control do kontroli ujemnej zamiast przeciwciała pierwszorzędowego na skrawku tkankowym z próbki od każdego pacjenta w celu oceny barwienia nieswoistego i umożliwienia lepszej interpretacji swoistego barwienia w miejscach, gdzie jest obecny antygen.

Jeżeli przy zastosowaniu nieswoistego odczynnika Negative Reagent Control występuje swoiste barwienie (wynik fałszywie dodatni), należy uznać, że wyniki próbek od pacjenta są nieważne.

VIII. Interpretacja wyników

Preparaty kontrolne barwione odczynnikiem Negative Reagent Control, stosowanym w charakterze pierwszorzędowego odczynnika, nie mogą wykazywać swoistego barwienia.

Dodatni wynik barwienia uzyskany przy użyciu mysiego przeciwciała monoklonalnego skierowanego przeciwko ludzkiemu białku p16^{INK4a} (klon E6H4[™]), należy oceniać w kontekście wszelkiego nieswoistego barwienia tła uzyskanego przy użyciu odczynnika Negative Reagent Control. Podobnie jak we wszystkich testach immunohistochemicznych, wynik ujemny oznacza, że antygen nie został wykryty, nie oznacza natomiast, że antygen ten nie występuje w badanych komórkach lub tkankach.

Podczas interpretacji wyników należy uwzględniać fakt, że białko p16^{INK4a} jest białkiem komórkowym, które może ulegać ekspresji na wykrywalnym poziomie w zmianach dysplastycznych szyjki macicy dużego stopnia i rakach szyjki macicy, jak również w niektórych stanach niezwiązanych z dysplazją szyjki macicy, lecz z różnym nasileniem i wykazując różne wzorce ekspresji.

Wybarwione preparaty należy oceniać w systemie zero-jedynkowym, tj. jako „dodatnie” lub „ujemne”.

Ocenę „dodatnią” przyznaje się, gdy preparat wybarwiony pod kątem obecności białka p16^{INK4a} wykazuje barwienie ciągłe komórek w obrębie warstwy podstawnej i przypodstawnej nabłonka płaskiego szyjki macicy, któremu towarzyszyć może barwienie komórek warstw powierzchniowych („rozproszony wzorec barwienia”). Przykład preparatu ocenionego jako „dodatni” („rozproszony wzorec barwienia”) można znaleźć w załączniku 2, na rysunku 1.

Ocenę „ujemną” przyznaje się, gdy preparat wybarwiony pod kątem obecności białka p16^{INK4a} wykazuje ujemne barwienie komórek nabłonka płaskiego („ujemny wzorec barwienia”) lub barwienie pojedynczych komórek lub niewielkich zbitek komórek, tj., barwienie nieciągłe, zwłaszcza poza obrębem warstwy podstawnej i przypodstawnej („ogniskowy wzorec barwienia”). Przykład preparatu ocenionego jako „ujemny”

(„ogniskowy wzorec barwienia”) można znaleźć w załączniku 2, na rysunku 2.

Wyniki uzyskane dla preparatów barwionych po kątem obecności białka p16^{INK4a} przy użyciu zestawu CINtec® Histology Kit należy interpretować w połączeniu z wynikami preparatów wybarwionych H&E, przygotowanych z tej samej próbki tkanki szyjki macicy. Dodatkowe informacje uzyskane dzięki analizie preparatów barwionych przy użyciu zestawu CINtec® należy wykorzystać wraz ze wstępnym rozpoznaniem bazującym na cechach morfologicznych, postawionym w oparciu o analizę preparatów wybarwionych H&E, do postawienia ostatecznego rozpoznania.

IX. Ograniczenia

- Wyłącznie do użytku profesjonalnego. Do przeprowadzania procedur immunohistochemicznych wymagane są specjalne szkolenia.
- Interpretacja kliniczna dodatniego lub ujemnego odczynu musi być prowadzona w kontekście obrazu klinicznego, morfologii i innych kryteriów histopatologicznych. Interpretacja kliniczna jakiegokolwiek dodatniego lub ujemnego odczynu powinna zostać uzupełniona przez badania morfologiczne, wykonanie odpowiednich prób kontrolnych dodatnich i ujemnych zewnętrznych oraz wewnętrznych, jak również innych badań diagnostycznych. Odpowiedzialność związana z interpretacją końcowego wybarwionego preparatu immunohistochemicznego spoczywa na wykwalifikowanym patologu, dysponującym doświadczeniem obejmującym stosowanie przeciwciał w procedurach immunohistochemicznych, odczynników i metod interpretacji preparatu immunohistochemicznego na każdym etapie jego przygotowania.
- Wyniki barwienia immunohistochemicznego zależą w dużym stopniu od jakości barwionych tkanek. Tak więc nieprawidłowe utrwalanie, przemywanie, suszenie, ogrzewanie, wycinanie skrawków lub ich zanieczyszczenie domieszką innych tkanek istotnie wpływa na całościowy wynik barwienia i może powodować artefakty, pułapki przeciwciał lub wyniki fałszywie ujemne. Niespójne wyniki mogą być konsekwencją zmienności metod utrwalania i zatapiania albo wynikać z nieprawidłowości samej tkanki.
- Nadmierne lub niecałkowite barwienie kontrastowe może utrudniać prawidłową interpretację wyników.
- Producent dostarcza przeciwciała/odczynniki, przeznaczone do stosowania zgodnie z niniejszymi instrukcjami, w rozcieńczeniu optymalnym do badań immunohistochemicznych na przygotowanych preparatach skrawków tkankowych. Jakakolwiek niezgodność z zalecanymi procedurami testu może spowodować, że podane oczekiwane wartości wyników utracą ważność. Należy stosować właściwe próby kontrolne i notować ich wyniki w dokumentacji. Użytkownicy, którzy nie postępują zgodnie z zalecanymi procedurami testowymi, muszą przyjąć odpowiedzialność za interpretację wyników pacjentek w zmienionych warunkach.
- Wiązanie białek lub produktów reakcji na drodze mechanizmów innych niż immunologiczne może być przyczyną wyników fałszywie dodatnich. Wyniki fałszywie dodatnie mogą również wystąpić na skutek aktywności podobnej do peroksydazy (erytrocyty) lub aktywności peroksydazy endogennej (cytochrom C).

- W tkankach, które nie zostały uprzednio przetestowane, odczynniki mogą wykazywać nieoczekiwane reakcje. Nie można całkowicie wykluczyć wystąpienia nieoczekiwanych reakcji nawet w przetestowanych tkankach, z uwagi na zmienność biologiczną ekspresji antygenów w nowotworach lub innych tkankach patologicznych. Udokumentowane przykłady nieoczekiwanych reakcji należy zgłaszać Roche mtm laboratories AG. Informacje na temat wsparcia technicznego podano w części poświęconej danym kontaktowym w sekcji XIII.
- Nie wolno zastępować odczynników znajdujących się w zestawie odczynnikami mającymi inne numery partii lub odczynnikami innych producentów.

X. Charakterystyka wyników

Skuteczność kliniczna

Skuteczność kliniczną zestawu CINtec® Histology Kit oceniano w kontrolowanym badaniu klinicznym przy użyciu utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie próbek tkankowych z szyjki macicy [21]. Badanie zostało zaprojektowane w celu wykazania adekwatności stosowania zestawu CINtec® Histology Kit w celu podwyższenia zgodności oceny wyników przez różnych badaczy i dokładności rozpoznania śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy dużego stopnia (CIN2+).

Badanie kliniczne przeprowadzono przy użyciu zebranych retrospektywnie preparatów wycinków z biopsji szlancowych i konizacji szyjki macicy. Ogółem uzyskano 500 próbek z szyjki macicy z dwóch różnych europejskich laboratoriów patologicznych i wzbogacono o dysplazję dużego stopnia w oparciu o oryginalne rozpoznanie. Zostały one wykorzystane do przygotowania preparatów wybarwionych H&E, oraz odpowiadających im preparatów, wybarwionych przy użyciu zestawu CINtec® Histology Kit, zgodnie z instrukcjami producenta.

Trzech europejskich ekspertów histopatologii ginekologicznej postawiło swoje niezależne diagnozy dla każdego z przypadków w oparciu o preparat barwiony hematoksyliną i eozyną. Przypadki, w których wystąpiły rozbieżności, poddano kolejnemu, wspólnemu procesowi oceny podczas spotkania ekspertów. Rozpoznanie większościowe (przy zgodności dwóch z trzech ekspertów) posłużyło jako złoty standard rozpoznania (standard odniesienia) w tym badaniu.

Panel współpracujących patologów składał się z dwunastu badaczy (certyfikowanych patologów, regularnie badających preparaty patologiczne szyjki macicy) z 4 krajów europejskich (Francja, Włochy, Hiszpania i Niemcy). Podczas pierwszego etapu interpretacji wyników każdy patolog z panelu stawiał indywidualnie rozpoznanie dla każdego przypadku wyłącznie na podstawie preparatów barwionych H&E. Patologom nigdy nie ujawniano pierwotnego rozpoznania, ani rozpoznania postawionego w złotym standardzie. Po odczekaniu ponad 4 tygodni ten sam zestaw preparatów wybarwionych H&E (z nowymi etykietami) był badany ponownie przez dwunastu patologów z panelu, w połączeniu z preparatami barwionymi przy użyciu zestawu CINtec® Histology Kit dla każdego przypadku.

W celu oceny poprawy dokładności diagnostycznej łącznego badania preparatów szyjki macicy wybarwionych przy użyciu zestawu CINtec® Histology i preparatów tej samej tkanki wybarwionych H&E, w porównaniu z badaniem preparatów wybarwionych wyłącznie H&E, wyniki uzyskane każdorazowo przez panel patologów były porównywane z diagnozą większościową, postawioną przez trzech ekspertów

patologii ginekologicznej.

Wyniki:

Analiza objęła łącznie 482 przypadki z pełnym rozpoznaniem, postawionym przez wszystkich patologów, biorących udział w badaniu. Częstość występowania poszczególnych kategorii diagnostycznych w oparciu o rozpoznanie większościowe postawione na podstawie obserwacji trzech ekspertów w dziedzinie patologii ginekologicznej była następująca: wynik ujemny badania pod kątem obecności dysplazji (n=194), CIN1 (n=96), CIN2 (n=69) i CIN3 (n=123).

Dokładność diagnostyczna wykrywania zmian CIN2+

Ogólna czułość wykrywania zmian CIN2+ wzrosła z 1787 (H&E) do 2018 (H&E wraz z zestawem CINtec® Histology) wyników prawdziwie dodatnich względem zmian CIN2+, przy nieznacznym zmniejszeniu ogólnej swoistości z 3088 (H&E) do 3051 (H&E wraz z zestawem CINtec® Histology) wyników prawdziwie ujemnych względem zmian CIN1.

Tab. 1

Poprawa dokładności diagnostycznej względem zmian CIN dużego stopnia (CIN2+) poprzez zastosowanie połączanego odczytu wyników uzyskanych dla preparatów wybarwionych H&E oraz przy użyciu zestawu CINtec® Histology, w porównaniu z odczytem wyników uzyskanych dla preparatów wybarwionych wyłącznie H&E. Podano liczbę wyników prawdziwie dodatnich i prawdziwie ujemnych oraz fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych w porównaniu z rozpoznaniem większościowym ekspertów w dziedzinie patologii (Uwaga: Całkowita zgodność z rozpoznaniem większościowym postawionym przez ekspertów w dziedzinie patologii oznaczałaby 2304 wyniki prawdziwie dodatnie: 192 przypadki zmian CIN2+ x 12 patologów z panelu).

	Wyniki prawdziwie dodatnie	Wyniki fałszywie ujemne	Wyniki fałszywie dodatnie	Wyniki prawdziwie ujemne
H&E	1787	517	392	3088
H&E+CINtec® Histology	2018	286	429	3051

ANOVA w modelu mieszanym dla pseudowartości w metodzie scyzorykowej, znana też jako metoda Dorfman-Berbaum-Metz (DBM), została zastosowana do sprawdzenia dokładności testu CINtec® Histology.

Hipoteza zerowa zakładająca, że dokładność diagnostyczna rozpoznania zmian CIN2+ opartego na preparatach wybarwionych H&E oraz przy użyciu zestawu CINtec® Histology jest taka sama jak rozpoznania opartego wyłącznie na preparatach wybarwionych H&E została odrzucona przy wartości $p=0,0004$ (pole pod krzywą (AUC) dla preparatów wybarwionych H&E: 0,877; AUC dla preparatów wybarwionych H&E wraz z zestawem CINtec® Histology: 0,925).

Tab. 2

Charakterystyka wyników przy połączonym odczycie wyników uzyskanych dla preparatów wybarwionych H&E oraz przy użyciu zestawu CINtec®

Histology w porównaniu z odczytem wyników uzyskanych dla preparatów wybarwionych wyłącznie H&E w celu identyfikacji zmian CIN dużego stopnia (CIN2+); rozpoznanie większościowe postawione przez trzech ekspertów w dziedzinie patologii ginekologicznej, oparte na analizie preparatów wybarwionych H&E, stanowiło rozpoznanie referencyjne

	H&E % (95-procentowy CI)	H&E wraz z zestawem CINtec® Histology % (95-procentowy CI)
Czułość	77,6% (75,8; 79,3)	87,6% (86,2; 88,9)
Swoistość	88,7% (87,6; 89,8)	87,7% (86,5; 88,8)
PPV	82,0% (80,3; 83,6)	82,5% (80,9; 84,0)
NPV	85,7% (84,5; 86,8)	91,4% (90,4; 92,4)
DLR+	6,885 (6,256; 7,578)	7,105 (6,494; 7,773)
DLR-	0,253 (0,234; 0,273)	0,142 (0,127; 0,158)

95-procentowy CI, 95-procentowy przedział ufności; PPV, dodatnia wartość predykcyjna; NPV, ujemna wartość predykcyjna; DLR+, wskaźnik wiarygodności dodatniego wyniku; DLR-, wskaźnik wiarygodności ujemnego wyniku

Posługując się rozpoznaniem większościowym postawionym przez trzech ekspertów patologii ginekologicznej jako standardem odniesienia przy zmianach CIN2+, stwierdzono poprawę czułości wykrywania o 13% (czułość barwienia H&E wyniosła 77,6% i została zwiększona do 87,6% przy dołączeniu do rozpoznania preparatów wybarwionych przy użyciu zestawu CINtec® Histology).

Zwiększenie dokładności diagnostycznej wykrywania zmian CIN2+ zostało niezależnie dowiedzione z istotnością statystyczną w podgrupie wycinków z biopsji szlankowej szyjki macicy (n=249; AUC dla barwienia H&E: 0,895; AUC dla preparatów wybarwionych H&E wraz z zestawem CINtec® Histology: 0,929; p=0,0053) i w podgrupie próbek z konizacji szyjki macicy (n=233; AUC dla barwienia H&E: 0,887; AUC dla preparatów wybarwionych H&E wraz z zestawem CINtec® Histology: 0,948; p=0,009).

Zgodność oceny wyników przez różnych badaczy podczas wykrywania zmian CIN2+

Podczas oceny poprawy zgodności oceny wyników przez różnych badaczy z panelu patologów przy wykrywaniu zmian CIN2+ zastosowano statystykę Kappa dla wielu badaczy przy ocenie rozpoznań postawionych na podstawie barwienia preparatów pobranych z szyjki macicy przy użyciu H&E oraz barwienia H&E połączonego z barwieniem przy użyciu zestawu CINtec® Histology.

Tab. 3

Poprawa zgodności oceny wyników przez różnych badaczy przy wykrywaniu zmian CIN2+ na podstawie połączonego odczytu wyników preparatów wybarwionych H&E oraz przy użyciu zestawu CINtec® Histology w porównaniu z odczytem wyników uzyskanych dla preparatów wybarwionych wyłącznie H&E. Wartości kappa zostały podane jako miara zgodności skorygowana losowo.

Kategoria diagnostyczna	Wyniki barwienia H&E — Kappa	Wyniki barwienia H&E wraz z zestawem CINtec® — Kappa	Istotność statystyczna
CIN2+, wszystkie przypadki	0,580	0,756	p<0,0001
CIN2+, tylko wycinki z biopsji sztanconych	0,598	0,748	p<0,0001
CIN2+, tylko wycinki z konizacji szyjki macicy	0,548	0,765	p<0,0001

Wartości statystyczne kappa, jako skorygowana losowo miara zgodności pomiędzy patologami z panelu przy wykrywaniu zmian CIN2+, wykazały znaczącą poprawę przy analizie preparatów wybarwionych równocześnie H&E oraz przy użyciu zestawu CINtec® Histology w porównaniu z analizą preparatów wybarwionych wyłącznie H&E (zwiększenie wartości kappa dla wszystkich przypadków z 0,580 do 0,756; p<0,0001).

Odtwarzalność oceny wzorca barwienia białka p16^{INK4a}

Oceniono wiarygodność oceny wzorca barwienia białka p16^{INK4a} w próbkach tkankowych szyjki macicy jako rozproszonego barwienia p16^{INK4a}-dodatniego, ogniskowego barwienia p16^{INK4a}-dodatniego lub ujemnego barwienia względem białka p16^{INK4a}.

Stwierdzono wysoką odtwarzalność wyników między patologami przy ocenie wzorca barwienia białka p16^{INK4a} jako wyniku dodatniego (rozproszony wzorec barwienia) lub ujemnego (ogniskowy wzorec barwienia lub brak reakcji immunochemicznej). Wartość kappa (skorygowana losowo miara zgodności) dla odtwarzalności wyników między dwunastoma patologami z panelu podczas oceny wzorca barwienia białka p16^{INK4a} jako wyniku dodatniego (rozproszony wzorec barwienia) lub ujemnego (ogniskowy wzorec barwienia lub brak reakcji immunochemicznej) była bardzo wysoka (średnia wartość kappa = 0,899; mediana wartości kappa = 0,903).

Skuteczność analityczna

Czułość analityczna

Badanie czułości przeprowadzono przy użyciu 3 partii zestawów CINtec® Histology Kit. Podczas badania czułości przeanalizowano trzydzieści pięć próbek ze zmianami CIN3+ pozyskanych z biopsji szyjki macicy, w tym 6 próbek pozyskanych z biopsji szyjki macicy sklasyfikowanych jako zmiany CIN3 i 29 próbek pozyskanych z biopsji szyjki macicy sklasyfikowanych jako rak płaskonabłonkowy.

W pięciu spośród 6 (83,3%) przypadków sklasyfikowanych jako zmiany CIN3 zaobserwowano silne rozproszone barwienie białka p16. W jednej próbce ze zmianami CIN3 pozyskanej z biopsji stwierdzono słabą ekspresję białka p16; nie uzyskano jednak jednoznacznego dodatniego sygnału swoistego dla białka p16.

W dwudziestu dwóch spośród 29 (75,9%) przypadków sklasyfikowanych jako rak płaskonabłonkowy zaobserwowano silne rozproszone barwienie swoiste dla białka p16. W pięciu przypadkach raka płaskonabłonkowego stwierdzono słabą ekspresję

białka p16; nie uzyskano jednak jednoznacznego dodatniego sygnału względem białka p16. Tylko dla 2 spośród 29 (6,9%) przypadków uzyskano całkowicie ujemny wynik względem białka p16. Jest to uzasadniony wynik, gdyż już wcześniej odnotowywano, że w 3–8% przypadków raka płaskonabłonkowego barwienie swoiste względem białka p16 daje wynik ujemny [1, 6]. Wynik ten może odzwierciedlać niewielki odsetek przypadków, w których dedyferencjacja i rearanżacje chromosomowe doprowadziły do inaktywacji lub usunięcia locus genu p16.

W przypadku wszystkich 3 partii barwienie wykonywane przy użyciu dobrze scharakteryzowanego panelu zawierającego skrawki tkanek szczurzych z wykorzystaniem odczynnika Negative Reagent Control dało silne i swoiste wybarwienie pojedynczych neuronów w tkankach mózgów szczurzych. Słabe wybarwienie zaobserwowano również w niektórych komórkach kanalikowych nerek, pojedynczych makrofagach w śledzionie oraz pojedynczych makrofagach i komórkach osocza w jelicie cienkim. Dla pozostałych tkanek z panelu tkanek szczurzych uzyskano całkowicie ujemny wynik.

Przeciwciało E6H4™ skierowane przeciwko białku p16 jest zdolne do ciągłego barwienia komórek warstwy podstawnej i przypodstawnej, któremu towarzyszyć może barwienie komórek warstwy pośredniej lub pośredniej i powierzchniowej nabłonka płaskiego w próbkach ze zmianami dużego stopnia CIN (CIN2, CIN3) uzyskanych z biopsji szyjki macicy. Odczynnik Negative Reagent Control (NRC) umożliwia swoiste wykrywanie neuronów szczurzych.

Swoistość analityczna

Swoistość™ mysiego przeciwciała klonu E6H4 skierowanego przeciwko ludzkiemu białku p16^{INK4a} zweryfikowano, przeprowadzając analizę Western blot (wynik dodatni dla lizatu z linii komórkowej HeLa; patrz również [1]).

Badanie swoistości przeprowadzono przy użyciu 3 partii zestawów CINtec® Histology Kit za pomocą dobrze scharakteryzowanego panelu składającego się z 90 utrwalonych przy użyciu obojętnej zbuforowanej formaliny (NBF) próbek tkanek prawidłowych (30 różnych typów tkanek) i 54 tkanek nowotworowych innych niż tkanki szyjki macicy (zebranych w panel wielu tkanek = MTA).

W celu oceny barwienia przy użyciu przeciwciała swoistego względem białka p16 (klon E6H4™) wykonywanego na tkankach prawidłowych przeprowadzono obserwację 16 różnych tkanek ujemnych względem białka p16 [mózg, mózdzek, nadnercze, tarczyca, szpik kostny, serce, przelyk, żołądek, jelito, okrężnica, wątroba, nerki, mięsień prądkowany, skóra, mezotelium, szyjka macicy] oraz 14 różnych tkanek dodatnich względem białka p16 [słabe barwienie: przysadka, płuco, grasicą, gruczoł krokowy; barwienie dodatnie: nerw, jelito, migdałek, trzustka, śledziona; barwienie silnie dodatnie: macica, jajnik, sutek, jądro, przytarczyca]. W celu oceny barwienia przy użyciu przeciwciała swoistego względem białka p16 (klon E6H4™) wykonywanego na tkankach nowotworowych innych niż tkanki szyjki macicy przeprowadzono obserwację 22 różnych tkanek nowotworowych ujemnych względem białka p16 oraz 32 różnych tkanek nowotworowych dodatnich względem białka p16.

W przypadku wszystkich 3 partii zestawu CINtec® Histology uzyskano wyniki ujemne dla wszystkich tkanek (prawidłowych i nowotworowych) testowanych przy użyciu odczynnika Negative Reagent Control. Mysie przeciwciało monoklonalne przeciwko szczurzej neurofizynie związanej z oksytocyną nie wykazuje istotnej reakcji z próbkami ludzkich tkanek prawidłowych i nowotworowych.

Odtwarzalność

Odtwarzalność między cyklami:

Odtwarzalność między cyklami barwienia przy użyciu zestawu CINtec® Histology Kit w protokole barwienia ręcznego określono na podstawie 36 preparatów przygotowanych z bloków tkanek zdiagnozowanych jako zmiany CIN2+. Obszary dysplastyczne na wszystkich skrawkach wybarwiono z porównywalną intensywnością (+/- 0,5 w skali od 0 do 3) we wszystkich cyklach barwienia. Prawidłowe obszary na wszystkich preparatach nie wykazywały swoistego barwienia.

Odtwarzalność w obrębie cyklu

Odtwarzalność w obrębie cyklu określono na preparatach wybarwionych przy użyciu zestawu CINtec® Histology Kit w protokole barwienia ręcznego i na aparacie Autostainer w trzech różnych dniach. Ogółem włączono do tego badania trzy bloki tkankowe zdiagnozowane jako zmiany CIN2+. Każdego dnia pracowano z jedną serią preparatów z każdego bloku. Obszary dysplastyczne na skrawkach z danego bloku wybarwiono z porównywalną intensywnością (+/- 0,5 w skali od 0 do 3) każdego dnia badania, stosując barwienie ręczne oraz aparat do barwienia zautomatyzowanego. Prawidłowe obszary na wszystkich preparatach nie wykazywały swoistego barwienia.

Odtwarzalność między różnymi partiami

Odtwarzalność wyników barwienia między partiami zestawów CINtec® Histology Kit określono poprzez barwienie skrawków tkanek przypadków CIN2+ przy użyciu 3 różnych partii zestawów. Zarówno ręczne, jak i zautomatyzowane barwienie wykonywano zgodnie z protokołami w instrukcji stosowania. Obszary dysplastyczne na skrawkach z danego bloku wybarwiono z porównywalną intensywnością (+/- 0,5 w skali od 0 do 3) przy użyciu odczynników z wszystkich trzech badanych partii, stosując barwienie ręczne oraz aparat do barwienia zautomatyzowanego. Prawidłowe obszary na wszystkich preparatach nie wykazywały swoistego barwienia.

Należy pamiętać, że metoda oceny intensywności barwienia przy użyciu skali od 0 do 3 była używana wyłącznie na potrzeby oceny skuteczności analitycznej zestawu i nie powinna być używana w praktyce klinicznej podczas interpretacji wyników barwienia skrawków tkanek. Podczas rutynowej interpretacji wyników barwienia preparatów, w zamian za to należy interpretować wyniki jakościowo zgodnie z opisem w części VIII.

XI. Rozwiązywanie problemów

W celu uzyskania pomocy technicznej należy zapoznać się z sekcją XIII., w której przedstawiono dane kontaktowe.

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Zalecane postępowanie
1. Brak barwienia preparatów	<u>1a.</u> Nieprzestrzeganie instrukcji stosowania;	<u>1a.</u> Należy uważnie przeczytać instrukcję stosowania i przestrzegać opisanych w niej procedur;
2. Słabe barwienie preparatów	<u>2a.</u> Niedostateczne odmaskowanie antygenu;	<u>2a.</u> Użyć świeżo przygotowanego roztworu Epitope Retrieval Solution i/lub sprawdzić, czy odczynnik Epitope Retrieval Solution osiąga temperaturę 95–99°C na pełne 10 minut oraz czy jest pozostawiony do ostygnięcia na dalsze 20 minut;
	<u>2b.</u> Nieodpowiednie czasy inkubacji odczynników;	<u>2b.</u> Zapoznać się z przedstawionymi w punktach 2.2. / 3.2. zaleceniami dotyczącymi protokołu barwienia;
	<u>2c.</u> Niewłaściwa metoda utrwalania;	<u>2c.</u> Upewnić się, że tkanki od pacjenta nie zostały nadmiernie utrwalone i że nie stosowano utrwalaczy innych niż zalecane;
	<u>2d.</u> Stężenie jonów w wodzie użytej do rozcieńczenia roztworu do odmaskowania antygenu jest zbyt wysokie;	<u>2d.</u> Należy upewnić się, że kolumna jonowymienna stosowana do dejonizacji wody podlega rutynowym zabiegom konserwacyjnym;

	<u>2e.</u> Niewłaściwa metoda odparafinowania;	<u>2e.</u> Należy pamiętać, że zmienianie temperatury urządzeń lub czasu poszczególnych etapów przetwarzania próbki przed analizą może prowadzić do niepełnego usunięcia parafiny z preparatów tkankowych. Resztki parafiny mogą powodować nieprawidłowości w barwieniu histologicznym, w tym barwieniu przy użyciu testu CINTec® Histology. Laboratoria histopatologiczne powinny regularnie monitorować sprzęt dla ograniczenia zmienności warunków podczas przygotowywania preparatów do barwienia. Zaobserwowanie wyrazistych granic w obrębie tkanek poddanych barwieniu immunochemicznemu lub innych niezgodności wyników dowolnego barwienia immunohistochemicznego może wskazywać na nieoptymalne lub niepełne przygotowanie próbki do barwienia przed analizą. Należy w takiej sytuacji sprawdzić, czy sprzęt działa prawidłowo i czy zastosowano właściwe metody przygotowania próbki do analizy;
3. Nadmierne barwienie tła preparatów	<u>3a.</u> Niecałkowite usunięcie parafiny;	<u>3a.</u> Zastosować świeżą kąpiel ksilenową i przeprowadzać procedurę barwienia zgodnie z opisem przedstawionym w punktach 2.1. / 3.1.;
	<u>3b.</u> Zatapianie skrawków z zastosowaniem dodatków zawierających skrobię;	<u>3b.</u> Dodatki zawierające skrobię, stosowane podczas zatapiania skrawków tkankowych, mogą wykazywać reaktywność immunochemiczną, powinno się więc ich unikać;
	<u>3c.</u> Niewystarczające przepłukanie szkiełek;	<u>3c.</u> Zastosować świeży roztwór do kąpeli z buforem i w tryskawkach;
	<u>3d.</u> Wysychanie preparatów podczas barwienia;	<u>3d.</u> Zastosować komorę wilgotną. Przecierać tylko trzy do czterech preparatów naraz przed zastosowaniem odczynników;

	<u>3e.</u> Niewłaściwa metoda utrwalania;	<u>3e.</u> Należy stosować wyłącznie zalecany odczynnik do utrwalania. Nieprawidłowo utrwalone tkanki mogą wykazywać nadmierne barwienie tła;
	<u>3f.</u> Nieswoiste wiązanie odczynników do tkanek;	<u>3f.</u> Sprawdzić, jaką zastosowano metodę utrwalania próbek i czy nie występuje w nich martwica;
4. Tkanka odkleja się od szkiełka	<u>4a.</u> Użycie niewłaściwych szkiełek;	<u>4a.</u> Należy stosować szkiełka SuperFrost® Plus, zgodnie z zaleceniami w niniejszej instrukcji;
5. Nadmiernie silne swoiste barwienie	<u>5a.</u> Niewłaściwa metoda utrwalania;	<u>5a.</u> Należy stosować wyłącznie właściwe substancje utrwalające i metody utrwalania;
	<u>5b.</u> Zbyt długie czasy inkubacji odczynników;	<u>5b.</u> Należy przeczytać zalecenia przedstawione w punktach 2.2 / 3.2 powyżej i stosować się do opisanego w nich protokołu barwienia;
	<u>5c.</u> Nieprawidłowy roztwór płuczący;	<u>5c.</u> Należy stosować odczynnik Wash Buffer (10 x) (numer katalogowy 10215364001).

XII. Symbole

Symbol:

Wyjaśnienie:

	Numer katalogowy
	Numer serii
	Globalny Numer Jednostki Handlowej
	Unikalny identyfikator wyrobu
	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro
	Producent
	Zawiera odczynnik w ilości wystarczającej na <n> testów
	Sprawdzić w instrukcji stosowania
	Data ważności
	Temperatura przechowywania
	Data produkcji
	Nie należy używać ponownie
	Dane do kontaktu z działem pomocy technicznej (nr telefonu)
	Zawiera materiały pochodzenia zwierzęcego
	Zawartość

XIII. Producent

Producent:

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim
Germany

<https://navifyportal.roche.com>

**Dane kontaktowe
działu pomocy
technicznej
(nr telefonu):**

+800 5505 6606

Podsumowanie dotyczące bezpieczeństwa i skuteczności działania można znaleźć na stronie:

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

XIV. Informacje o wersji

Bieżąca instrukcja stosowania stanowi wersję 1.0 wydaną w czerwcu 2024 r.

Zmiany względem poprzedniej wersji dla produktu 9511 / 06594441001 (2.9, wydanej w grudniu 2022 r.):

- Zmieniono producenta z Roche mtm laboratories AG na Roche Diagnostics GmbH, a tym samym nadano nowy numer produktu, 10213370001
- Wprowadzono zmiany edytorskie

XV. Własność intelektualna

CINtec jest znakiem towarowym firmy Roche.

Wszystkie pozostałe znaki towarowe stanowią własność odpowiednich właścicieli.

© **2024 Roche**

Załącznik 1

Bibliografia

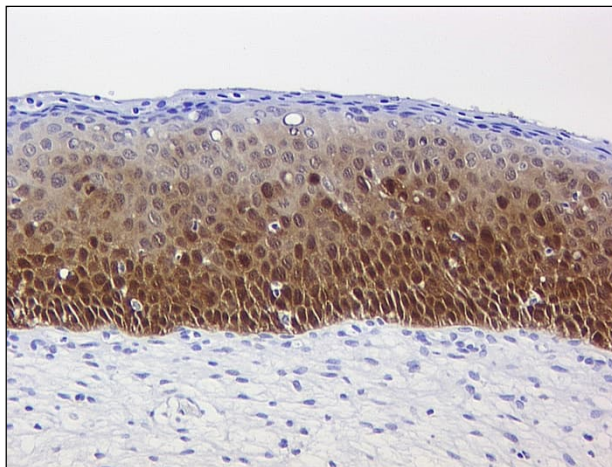
1. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, and von Knebel Doeberitz M. Overexpression of p 16^{INK4a} as a specific marker for dysplasia and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001, 92(2):276-84
2. Sano T, Oyama T, Kashiwabara 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) immunochemistry in cervical histopathology and cytology: an update of recent developments. *Int J Cancer* 2015, 136(12):2741-51
35. Clinton LK, Miyazaki K, Ayabe A, Davis J, Tauchi-Nishi P and Shimizu D. The LAST guidelines in clinical practice: implementing recommendations for p16 use. *Am J Clin Pathol* 2015, 144(6):844-9
36. Zhang G, Yang B and Abdul-Karim FW. p16 Immunohistochemistry is useful in confirming highgrade squamous intraepithelial lesions (HSIL) in women with negative HPV testing. *Int J Gynecol Pathol* 2015, 34(2):180-6
37. Darragh TM. The LAST Project and the diagnostic bottom line. *Cytopathology* 2015, 26(6):343-5
38. de Sam Lazaro S, Newbill CP, Berlin M and Morgan TK. p16 Staining of Cervical Biopsies May Decrease the Frequency of Unnecessary Loop Electrosurgical Excision Procedures. *J Low Genit Tract Dis* 2016, 20(3):201-6
39. Stoler MH, Wright TC Jr, Ferenczy A, Ranger-Moore J, Fang Q, Kapadia M, Ridder R. Routine Use of Adjunctive p16 Immunohistochemistry Improves Diagnostic Agreement of Cervical Biopsy Interpretation: Results From the CERTAIN Study. *Am J Surg Pathol*. 2018, 42(8):1001-9

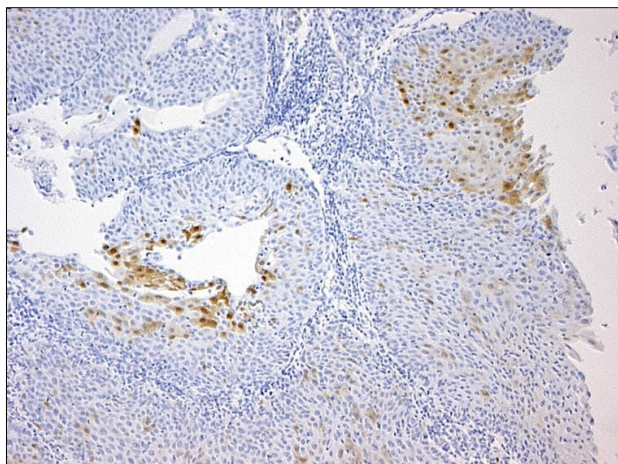
Załącznik 2

Przykład rozlanego wzorca barwienia



Rys.1: CIN 3

Przykład ogniskowego wzorca barwienia



Rys.2: Metaplazja płaskonabłonkowa, zaawansowana