Instruções de Utilização

CINtec® Histology Kit

O CINtec® Histology Kit é um ensaio imuno-histoquímico para a deteção qualitativa do antigénio $p16^{INK4a}$ em secções de tecido preparadas a partir de biópsias do colo do útero fixadas em formol e impregnadas em parafina. Destina-se a ser utilizado em conjunto com lâminas coradas por H&E preparadas a partir da mesma amostra de tecido do colo do útero como forma de ajudar a aumentar a precisão de diagnóstico e a concordância interobservador no diagnóstico de neoplasia intra-epitelial do colo do útero de alto grau.

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim
Germany

https://navifyportal.roche.com

REF **10213370001**

GTIN **07613336230350**

Σ **50**

2 – 8 °C

CE 0123

IVD

Índice

PORTUGUÊS 3
I. Nome do produto 3
II. Utilização prevista 3
III. Resumo e explicação do dispositivo 3
Resumo e explicação 3
Significado clínico 4
Princípios do procedimento 5
IV. Reagentes 5
Materiais fornecidos 5
Armazenamento 7
Materiais e reagentes necessários mas não fornecidos 8
Equipamento necessário 8
V. Avisos e precauções 9
Aviso 9
Atenção 9
VI. Procedimento 10
Preparação das amostras 10
Amostras de tecido impregnadas em parafina 10
Recuperação do epítopo induzida por calor 10
Procedimento de coloração 11
1. Preparação de reagentes 11
1.1 Epitope Retrieval Solution 11
1.2 Wash Buffer 11
1.3 Substrate-Chromogen Solution (DAB) 11
1.4 Corante de contraste 12
1.5 Meio de montagem 12
2. Procedimento de coloração para Instrumentos Autostainer 12
2.1 Desparafinização e rehidratação 12
2.2 Protocolo de coloração para Instrumentos Autostainer 13
3. Procedimento de coloração para utilização manual 15
3.1 Desparafinização e rehidratação 15
3.2 Protocolo de coloração para utilização manual 15
VII. Controlo de qualidade 18
VIII. Interpretação dos resultados 18
IX. Limitações 19

X. Características do desempenho 20
XI. Resolução de problemas 26
XII. Símbolos 29
XIII. Fabricante 29
XIV. Estado da revisão 29
XV. Propriedade intelectual 30
Anexo 1 Referências 31
Anexo 2 34

PORTUGUÊS

I. Nome do produto

CINtec® Histology Kit

II. Utilização prevista

Para utilizar em diagnóstico in vitro.

O CINtec® Histology Kit é um ensaio imuno-histoquímico para a deteção qualitativa do antigénio $p16^{INK4a}$ em secções de tecido preparadas a partir de biópsias do colo do útero fixadas em formol e impregnadas em parafina.

Destina-se a ser utilizado em conjunto com lâminas coradas por H&E preparadas a partir da mesma amostra de tecido do colo do útero como forma de ajudar a aumentar a precisão de diagnóstico e a concordância interobservador no diagnóstico de neoplasia intra-epitelial do colo do útero de alto grau.

Este teste destina-se a utilização manual ou em Instrumentos Autostainer.

Este ensaio deverá ser interpretado por um patologista qualificado em conjunto com exames histológicos, informações clínicas relevantes e controlos adequados.

III. Resumo e explicação do dispositivo

Resumo e explicação

O CINtec® Histology Kit baseia-se num anticorpo monoclonal de ratinho (clone E6H4®) dirigido contra a proteína humana $p16^{INK4a}$.

A proteína $p16^{INK4a}$ é um inibidor de cinases dependentes da ciclina que desempenha um papel principal na regulação do ciclo celular eucariótico. Faz parte do controlo mediado pela proteína retinoblastoma (pRB) da transição da fase G1-S e ativa o travamento do ciclo celular no decorrer de processos de diferenciação celular. Em células epiteliais diferenciadas no final, a $p16^{INK4a}$ é expressa em níveis tipicamente não detetáveis por imuno-histoquímica.

Em várias entidades tumorais, o gene $p16^{INK4a}$ foi considerado funcionalmente inativo por mutação do gene ou hipermetilação da região promotora. Esta inativação do gene supressor de tumores $p16^{INK4a}$ mostrou contribuir para a desregulação do ciclo celular e para a perda de controlo da proliferação celular.

Contudo, na replicação de células epiteliais do colo do útero competentes, em que oncoproteínas do tipo Papilomavírus humano de alto risco (HR-HPV) iniciaram o processo de transformação celular, a expressão de $p16^{INK4a}$ foi considerada altamente regulada para cima [1; 2]. Esta forte sobre-expressão de $p16^{INK4a}$ foi estritamente ligada ao nível molecular à atividade das oncoproteínas E7 de HR-HPV. A sobre-expressão de $p16^{INK4a}$ demonstrou refletir a inativação mediada pela oncoproteína E7 do complexo funcional entre pRB e o fator de transcrição E2F, que é um dos eventos chave durante a transformação celular induzida por HR-HPV [3].

Existem inúmeros estudos na literatura publicada que relatam que a sobre-expressão da proteína $p16^{INK4a}$ foi observada por processos imuno-histoquímicos numa proporção muito elevada de casos de displasia pré-cancerosa do colo do útero de alto grau (isto é, entre 80 e 100% das lesões de

CIN2 e virtualmente todas as lesões de CIN3) e cancros invasivos. Lesões intra-epiteliais do colo do útero de baixo grau (CIN1) demonstraram a apresentação de sobre-expressão de p16^{INK4a} em proporções variáveis, tipicamente no intervalo entre 30 e 60% [1; 2; 4-16].

A interpretação dos resultados deve ter em consideração o facto de a p16^{INK4a} ser uma proteína celular que pode ser expressa em níveis detetáveis em lesões displásicas de alto grau do colo do útero e cancros do colo do útero, bem como em algumas condições não associadas a displasia do colo do útero, embora com níveis e com padrões de expressão diferentes. As preparações de tecido histológico têm a morfologia do tecido intacta para auxiliar na interpretação da positividade da p16^{INK4a} da lesão no colo do útero. Um padrão de coloração difusa, isto é, uma coloração contínua de células das camadas celulares basais e parabasais, com ou sem coloração de células de camadas celulares superficiais, foi sugerido como classificação para um resultado de teste positivo para sobre-expressão de p16^{INK4a}. Este padrão de coloração demonstrou fornecer o nível mais elevado de sensibilidade e de especificidade para CIN de alto grau [1; 4; 5]. Por outro lado, um padrão de coloração focal (coloração de células isoladas ou pequenos agrupamentos de células, isto é, coloração não contínua, particularmente não proveniente das células basais e parabasais), bem como a falta de qualquer imunorreatividade, é visto como um resultado de teste negativo para sobre-expressão de p16^{INK4a} [1; 4; 5].

A interpretação de lâminas coradas para p16^{INK4a} utilizando o CINtec® Histology Kit deve ser efetuada em conjunto com lâminas coradas por H&E preparadas a partir da mesma amostra de tecido do colo do útero. As informações adicionais fornecidas pelas lâminas coradas por CINtec® devem ser combinadas com o diagnóstico preliminar baseado na morfologia estabelecido nas lâminas coradas por H&E para criar um diagnóstico final.

Significado clínico

A leitura conjunta de lâminas coradas por H&E que compreendem secções de biópsia do colo do útero juntamente com lâminas consecutivas a partir da mesma amostra de tecido e imuno-coradas para p16^{INK4a} demonstrou melhorar a precisão de diagnóstico e a concordância interobservador no diagnóstico de neoplasia intra-epitelial do colo do útero de alto grau (CIN2+).

O diagnóstico patológico efetuado nas secções de tecido do colo do útero coradas por H&E estabelece a base para a decisão de procurar mais tratamento. Consequentemente, o impacto de um diagnóstico impreciso é significativo. Um diagnóstico impreciso pode levar a uma gestão inadequada da doente, isto é, tratamento exagerado de mulheres essencialmente saudáveis, ou tratamento insuficiente de mulheres com lesões displásicas de alto grau estabelecidas.

A interpretação de diagnóstico de secções histológicas de tecido corado por H&E está sujeita a taxas elevadas de discordância entre patologistas. Foram referidas taxas baixas de concordância inter e intra-observador em histologia do colo do útero em várias publicações [17-20].

Um extenso ensaio multicêntrico nos Estados Unidos avaliou a interpretação de exames histológicos do colo do útero (2237 biópsias colposcópicas e 535 amostras de biópsia por conização com ansa diatérmica) por vários patologistas com formação adequada; a reprodutibilidade das interpretações histo-patológicas foi apenas moderada (kappa = 0,46 para biópsias por punção e kappa = 0,49 para amostras de biópsia com ansa diatérmica) [17]. Utilizando o sistema de classificação da OMS e um sistema de classificação Bethesda modificado, a concordância interobservador de seis histopatologistas que avaliaram 125 amostras de biópsias colposcópicas

demonstrou ser insuficiente para ambos os sistemas de classificação [18]. Da mesma forma, um estudo conduzido no Reino Unido demonstrou uma concordância interobservador insuficiente entre oito histopatologistas especialistas que examinaram 100 amostras de biópsias colposcópicas (valor kappa não ponderado de 0,358) [19].

Adicionando lâminas coradas com CINtec® Histology Kit às lâminas coradas por H&E convencionais utilizadas para estabelecer o diagnóstico, a precisão geral deste procedimento de diagnóstico histomorfológico é melhorada [21-39].

Princípios do procedimento

CINtec® Histology Kit contém um conjunto de reagentes para a deteção imuno-histoquímica do antigénio $p16^{INK4a}$. O Kit destina-se a efetuar um procedimento de coloração imuno-histoquímico de dois passos para amostras de tecido fixadas em formol e impregnadas em parafina obtidas de biópsias do colo do útero. Para a deteção do antigénio, é utilizado um clone de anticorpo monoclonal primário de ratinho E6H4® direcionado à proteína $p16^{INK4a}$ humana.

É utilizado um reagente de visualização pronto a usar incluindo um conjugado de reagente de polímero com peroxidase de rábano e fragmentos de anticorpo Fab anti-ratinho de caprino. O Visualization Reagent foi sujeito a absorção de fase sólida para eliminar a reatividade cruzada com imuno-globulinas humanas. A reação de cromogénio baseia-se na conversão mediada por peroxidase de rábano de um cromogénio de DAB num produto de reação visível no local do antigénio. Depois da aplicação do corante de contraste, a amostra pode ser coberta por uma lamela e os resultados podem ser avaliados por inspecção de microscopia óptica.

IV. Reagentes

Materiais fornecidos

Os materiais indicados em baixo estão incluídos em cada kit e são suficientes para efetuar 50 testes e 50 reações de controlo negativo. O número de testes baseia-se na utilização de 200 µl dos reagentes por lâmina.

1 Peroxidase Blocking Reagent

Peroxidase Blocking Reagent
2 x 11,5 ml, pronto a utilizar
3% de peróxido de hidrogénio, contendo 15 mmol/l de azida de sódio (NaN_3).

EUH210: Ficha de segurança fornecida a pedido.

2 Mouse anti-Human $p16^{INK4a}$ Antibody

Mouse anti-Human $p16^{INK4a}$ Antibody
11,5 ml, pronto a utilizar
Mouse anti-Human $p16^{INK4a}$ Antibody monoclonal (~1 µg/ml), Clone E6H4™, fornecido em 50 mmol/l de tampão Tris pH 7,2, contendo 15 mmol/l de azida de sódio (NaN_3) e proteína estabilizadora.

3 Visualization Reagent

Visualization Reagent
2 x 11,5 ml, pronto a utilizar

Aviso

H317 Pode provocar uma reação alérgica cutânea.

P261 Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.
P272 A roupa de trabalho contaminada não pode sair do local de trabalho.
P280 Usar luvas de proteção.
P333 + P313 Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico.
P362 + P364 Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar.
P501 Eliminar o conteúdo/recipiente num centro de tratamento de resíduos apropriado.

Contém:
26172-54-3 cloridrato de 2-metil-2H-isotiazol-3-ona
55965-84-9 massa reacional de: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolina-3-ona [CE n.º 247-500-7] e 2-metil-2H-isotiazol-3-ona [CE n.º 220-239-6] (3:1).

Conjugado de reagente de polímero com peroxidase de rábano e fragmentos de anticorpo Fab anti-ratinho de caprino purificado por afinidade, fornecido em solução estabilizante com conservantes e proteína estabilizadora.

4 Negative Reagent Control

Negative Reagent Control
11,5 ml, pronto a utilizar

Anticorpo de neurofisina relacionado com oxitocina anti-rato monoclonal de ratinho (~1 μg/ml), fornecido em 50 mmol/l de tampão Tris pH 7,2, contendo 15 mmol/l de azida de sódio (NaN_3) e proteína estabilizadora. Para verificação da especificidade da coloração. A neurofisina relacionada com oxitocina de rato não está presente em tecidos humanos.

5 DAB Buffered Substrate

DAB Buffered Substrate
31 ml

Solução tampão de substrato, pH 7,5, contendo <0,1% de peróxido de hidrogénio, estabilizadores e intensificadores.

6 DAB Chromogen

DAB Chromogen
0,85 ml, solução de cromogéneo 3,3'-diaminobenzidina.

Perigo

H314 Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves.
H341 Suspeito de provocar anomalias genéticas.
H350 Pode provocar cancro.

P201 Pedir instruções específicas antes da utilização.
P280 Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.
P303 + P361 + P353 SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): despir/retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água.
P304 + P340 + P310 EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a vítima para uma zona ao ar livre e mantê-la em repouso numa posição que não dificulte a respiração. Contactar imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.
P305 + P351 + P338 + P310 SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar. Contactar imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.
P308 + P313 EM CASO de exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico.

Contém 868272-85-9 3,3′-diaminobenzidina tetrahidrocloreto hidratado

NOTA: Consulte os regulamentos locais, federais ou estaduais quanto à eliminação.

7 Epitope Retrieval Solution 10X

Epitope Retrieval Solution 10X
500 ml, 100 mmol/l de tampão Tris, pH 9 contendo 10 mmol/l de EDTA e 15 mmol/l de azida de sódio (NaN_3).

Armazenamento

Conservar entre 2 – 8 °C. Não utilizar depois do prazo de validade. Não foram gerados dados relativos ao armazenamento dos reagentes em condições diferentes das indicadas acima.

Depois de aberto, os componentes do kit permanecem estáveis durante 6 meses, se armazenados entre 2 – 8 °C. As soluções devem ser eliminadas se apresentarem um aspeto turvo.

A Epitope Retrieval Solution diluída e o Wash Buffer diluído permanecem estáveis pelo período de um mês, se armazenados entre 2 e 8 °C. As soluções não devem ser utilizadas se estiverem turvas.

Materiais e reagentes necessários mas não fornecidos

CINtec® Wash Buffer 10X a ser utilizado com o CINtec® Histology Kit está disponível através do número de catálogo 10215364001 de Roche, mas não está incluído no kit. Para obter informações de pedido, consulte o site www.roche.com.

Solução de tampão Tris de 500 mmol/l com 1,5 mol/l NaCl, pH 7,6, contendo detergente e um agente antimicrobiano.

Aviso

H317 Pode provocar uma reação alérgica cutânea.

P261 Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.
P272 A roupa de trabalho contaminada não pode sair do local de trabalho.
P280 Usar luvas de proteção.
P333 + P313 Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico.
P362 + P364 Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar.
P501 Eliminar o conteúdo/recipiente num centro de tratamento de resíduos apropriado.

Contém 55965-84-9 massa reacional de: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolina-3-ona [CE n.º 247-500-7] e 2-metil-2H-isotiazol-3-ona [CE n.º 220-239-6] (3:1).

Toalhetes absorventes;

Corante de contraste de hematoxilina;

Água desionizada ou destilada (água de lavagem);

Etanol, 95% e 70%;

Meio de montagem;

Tecidos positivos e negativos a utilizar como controlos de processo;

Lâminas (SuperFrost® Plus ou equivalente);

Xilol;

Proteções.

Equipamento necessário

Opcional: Estufa de secagem capaz de manter uma temperatura de 60 °C ou inferior;

Opcional: instrumento Dako ou LabVision Autostainer;

Câmara húmida (opcional);

Microscópio ótico (4 – 40x a ampliação objetiva);

Tinas ou bacias de coloração;

Frascos de lavagem;

Cronómetro (capaz de intervalos de 2 a 60 minutos);

Banho-maria com tampa (capaz de manter uma Epitope Retrieval Solution a uma temperatura entre 95 – 99 °C).

V. Avisos e precauções

⚠ Aviso

1. Atenção! Alguns dos reagentes incluídos neste kit contêm químicos perigosos. Ao manusear os componentes deste kit, seguir as precauções de segurança para o manuseamento de reagentes laboratoriais perigosos.
2. Os componentes 1, 2, 4 e 7 deste produto contêm azida de sódio (NaN_3), que é altamente tóxico na sua forma pura. Nas concentrações do produto, apesar de não serem classificadas como perigosas, a azida de sódio pode reagir com a canalização de chumbo e cobre e formar acumulações altamente explosivas de azidas metálicas. Durante a eliminação, enxaguar com grande volume de água para evitar a acumulação de azidas metálicas na canalização.
3. Os componentes 2, 3 e 4 contêm material de origem animal. Cumprir os procedimentos de manuseamento adequado conforme aplicado a qualquer produto derivado de origens biológicas.
4. Ficha de Dados de Segurança para o kit disponível sob pedido.
5. Ao manusear e eliminar amostras de histologia, incluindo todas as amostras antes e depois da fixação, bem como todos os materiais expostos a eles, cumprir as precauções de segurança para manusear material potencialmente infeccioso bem como requisitos aplicáveis de eliminação de resíduos.
6. Nunca pipetar reagentes com a boca. Evitar o contacto da pele e das membranas mucosas com reagentes e amostras. No caso de os reagentes ou amostras entrarem em contacto com a pele ou membranas mucosas, lavar abundantemente com água.
7. O Visualization Reagent e o DAB Chromogen podem ser afetados de forma adversa se expostos a níveis de luz excessivos. Não armazenar os componentes do kit ou realizar a coloração com luz forte, como luz solar direta.
8. Utilizar equipamento de proteção pessoal adequado para evitar contacto com os olhos e a pele ao manusear qualquer um dos componentes incluídos ou a utilizar em conjunto com o CINtec® Histology Kit. Consulte a Ficha de Dados de Segurança para obter informações adicionais.
9. A etiquetagem de segurança do produto segue principalmente as diretrizes do GHS da UE.

⚠ Atenção

1. Para utilizar em diagnóstico in vitro.
2. Apenas para utilização profissional.
3. Minimizar a contaminação microbiana de reagentes para evitar coloração não específica.
4. A utilização de tempos de incubação, temperaturas ou métodos que não os especificados pode dar origem a resultados erróneos.
5. Não utilizar o kit se a embalagem de qualquer um dos componentes estiver danificada. Se a embalagem estiver comprometida ou os componentes danificados, notificar o fabricante sem demora.
6. A eliminação de todos os resíduos deve ser efetuada em conformidade com diretrizes e regulamentos locais.

7. Todos os reagentes são formulados especificamente para utilização com este teste. Para o teste ser efetuado conforme especificado, não devem ser efetuada substituições.
8. Se se observar uma coloração inesperada, que não possa ser justificada pelas variações nos procedimentos laboratoriais e se suspeitar de um problema com o CINtec® Histology Kit, consulte a informação de contacto disponibilizada na Secção XIII para obter informações adicionais sobre a assistência técnica.
9. O mau funcionamento do produto devido a problemas de manuseamento ou instabilidade não resulta em sinais óbvios. Por isso, como medida de controlo de qualidade, devem realizar-se controlos positivos e negativos simultaneamente com as amostras de doentes.
10. Para reportar incidentes graves suspeitos relacionados com este dispositivo, contacte o representante local da Roche e a autoridade competente do estado-membro ou do país onde o utilizador está estabelecido.

VI. Procedimento

Preparação das amostras

O CINtec® Histology Kit destina-se a ser utilizado com amostras de tecido preservadas para procedimentos de imuno-histoquímica. As amostras devem ser preparadas de acordo com métodos padrão de processamento de tecidos.

São recomendadas lâminas carregadas positivamente como lâminas SuperFrost® Plus para um desempenho ótimo.

Amostras de tecido impregnadas em parafina

As amostras de tecido fixado em formol neutro tamponado e impregnado em parafina processadas utilizando métodos padrão de rotina são adequadas para utilização com este kit. Se as amostras forem preparadas utilizando um método de conservação diferente, o utilizador deve verificar a adequação do método.

As amostras da biópsia devem ser fixadas durante 18 – 24 horas em formol neutro tamponado (a recomendação é 10%) e dispostas em blocos com uma espessura de 3 ou 4 mm. Os blocos de tecido são então desidratados em vários álcoois e xilol, a que se segue uma infiltração com parafina derretida mantida a uma temperatura não superior a 60 °C. Cada bloco de tecido será cortado a 4 – 5 µm e montado em lâminas de microscópio SuperFrost® Plus por um laboratório de histopatologia. As lâminas devem ser coradas imediatamente, porque a antigenicidade das secções de tecido cortado pode diminuir com o tempo.

Recuperação do epítopo induzida por calor

Para a recuperação do epítopo induzida por calor, as secções de tecido colocadas em lâminas devem ser aquecidas por imersão na Epitope Retrieval Solution num banho-maria calibrado capaz de manter a Epitope Retrieval Solution a uma temperatura entre 95 – 99 °C. Laboratórios situados em locais mais elevados devem determinar o melhor método de manter a temperatura necessária do banho-maria. O fabricante não recomenda nenhum desvio ao procedimento aqui descrito.

Depois da recuperação do epítopo induzida por calor, as secções de tecido devem ser arrefecidas à temperatura ambiente durante 20 minutos antes de qualquer processamento adicional. Em seguida, a coloração das secções de tecido deve ser

efetuada sem demora.

Procedimento de coloração

1. Preparação de reagentes

Todos os reagentes devem ser equilibrados à temperatura ambiente (20 – 25 °C) antes de serem utilizados em imuno-coloração. Desta forma, todos os passos subsequentes devem ser efetuados à temperatura ambiente.

Deve ter-se cuidado para evitar a secagem das amostras durante o procedimento de imuno-coloração pois a secagem pode levar a artefactos na coloração.

Os reagentes seguintes devem ser preparados antes de se iniciar o procedimento de coloração:

1.1 Epitope Retrieval Solution

Preparar a quantidade de Epitope Retrieval Solution suficiente para o procedimento de coloração que é planeado por diluição de uma quantidade de Frasco 7 (Epitope Retrieval Solution 10X) 1:10 utilizando água destilada ou desionizada.

Após diluição, a Epitope Retrieval Solution pode ser armazenada entre 2 – 8 °C durante até um mês. A solução diluída deve ser eliminada se apresentar um aspeto turvo.

NOTA: A utilização de água com níveis elevados de iões para diluição da Epitope Retrieval Solution pode reduzir de forma significativa o desempenho de coloração do teste. Assegurar que a água utilizada é devidamente desionizada (isto é, assegurar que a coluna de troca de iões para produzir água desionizada foi verificada pela manutenção de rotina). Não utilizar água da torneira!

1.2 Wash Buffer

Utilizar CINtec® Wash Buffer 10X, número de catálogo 10215364001, fornecido pela Roche em conjunto com CINtec® Histology Kit. Para obter informações de pedido, consulte o site www.roche.com.

Preparar uma quantidade de Wash Buffer suficiente para os passos de lavagem do procedimento de coloração que é planeado por diluição de uma quantidade do Wash Buffer 10X, referência 10215364001, 1:10 utilizando água destilada ou desionizada.

Depois da diluição, o Wash Buffer pode ser armazenado a 2 – 8 °C durante até um mês. A solução diluída deve ser eliminada se apresentar um aspeto turvo.

1.3 Substrate-Chromogen Solution (DAB)

Para preparação da Substrate-Chromogen Solution, deve ser adicionada uma gota de DAB Chromogen a 2 ml de DAB Buffered Substrate. Proceder da seguinte forma:

i) transferir 2 ml de DAB Buffered Substrate do Frasco 5 para um tubo de ensaio;

ii) adicionar uma gota (entre 25 e 30 µl) de DAB Chromogen do Frasco 6. Misturar e aplicar nas secções de tecido com uma pipeta.

2 ml de Substrate-Chromogen Solution (DAB) preparada de acordo com as instruções acima é normalmente suficiente para corar cinco secções de tecido incluindo as cinco amostras de controlo correspondentes.

NOTA: Utilizar a Substrate-Chromogen Solution (DAB) preparada no mesmo dia.

NOTA: Adicionar DAB Chromogen em excesso ao DAB Buffered Substrate resultará em deterioração do sinal positivo.

1.4 Corante de contraste

A reação de coloração de DAB resulta num produto final colorido insolúvel em água. Pode ser utilizado álcool ou hematoxilina à base de água para a aplicação do corante de contraste. Se utilizado, cumprir as instruções fornecidas pelo fornecedor da hematoxilina para aplicar o corante de contraste.

1.5 Meio de montagem

Para a montagem de amostras em lâminas depois da coloração, recomenda-se um meio de montagem permanente não aquoso. Contudo, também é aceitável um meio de montagem aquoso.

Recomenda-se Eukitt Mounting Medium para montagem não aquosa. Recomenda-se Aquatex Merck para montagem aquosa.

2. Procedimento de coloração para Instrumentos Autostainer

O CINtec® Histology Kit foi adaptado para utilização nos Instrumentos Autostainer (o LabVision Autostainer 480 ou o Dako Autostainer Plus) de acordo com o modelo descrito abaixo. Poderão ser utilizados outros instrumentos ou sistemas que tenham função equivalente depois de devidamente validados pelo utilizador. Antes da coloração no Instrumento Autostainer, as amostras e reagentes devem ser preparados conforme indicado nas Secções 1.1 – 1.5 e 2.1

2.1 Desparafinização e rehidratação

Antes da desparafinização, colocar lâminas numa estufa de secagem a uma temperatura inferior a 60 °C durante pelo menos 20 minutos mas não mais de uma hora para remover água de forma quantitativa melhorando assim a aderência do tecido à lâmina de vidro (“aquecimento”) e derreter a parafina. As lâminas de tecido devem ser desparafinizadas para remover o meio de impregnação e em seguida rehidratadas antes de ser possível efetuar o procedimento de coloração. É crucial evitar a remoção incompleta de parafina pois o meio de impregnação residual resultará em aumento de coloração não específica. Incubar as lâminas à temperatura ambiente (entre 20 – 25 °C) de acordo com os seguintes passos.

- 5 (±1) minutos num banho de xilol;
- repetir este passo uma vez com um banho novo;
- remover líquido em excesso;
- 3 (±1) minutos em etanol a 95%;
- repetir este passo uma vez com um banho novo;
- remover líquido em excesso;
- 3 (±1) minutos em etanol a 70%;
- repetir este passo uma vez com um banho novo;
- remover líquido em excesso;
- mínimo de 30 segundos em água destilada ou desionizada.

Iniciar o procedimento de coloração conforme descrito na Secção 2.2, Passo 1:

Recuperação do epítopo.

As soluções de xilol e álcool não devem ser utilizadas para mais de 40 lâminas.

NOTA: Os utilizadores devem ter em atenção que as variações de temperatura do equipamento ou os tempos de exposição durante a preparação pré-analítica da amostra podem levar à remoção incompleta de parafina de lâminas de tecido. A parafina residual pode levar à coloração incompleta com qualquer corante de histologia, incluindo o corante de Histologia CINtec®. Os laboratórios de histopatologia devem incluir monitorização regular do equipamento para reduzir a variação na preparação de amostras antes da coloração. A observação de limites bem definidos nas áreas de tecido imunorreativo ou outras inconsistências de coloração numa lâmina podem, com qualquer corante imuno-histoquímico, ser um indicador de processamento pré-analítico não ideal ou incompleto da amostra. Os utilizadores devem considerar verificar o equipamento e os métodos de preparação pré-analítica de amostras se se observar coloração inconsistente;

2.2 Protocolo de coloração para Instrumentos Autostainer

Passo 1: Recuperação do epítopo

- encher tinas de coloração, *por ex.*, tinas Coplin em plástico, com a Epitope Retrieval Solution diluída (ver Procedimento, Secção 1.1);
- colocar tinas de coloração contendo Epitope Retrieval Solution em banho-maria e aquecer o banho-maria e a Epitope Retrieval Solution entre 95 – 99 °C. É importante ajustar o nível de água no banho-maria para garantir que as tinas ficam mergulhadas na água a 80%. Para estabilizar a temperatura e evitar evaporação, cobrir as tinas com tampas;
- mergulhar secções desparafinizadas em Epitope Retrieval Solution pré-aquecida nas tinas de coloração; este passo irá normalmente baixar a temperatura nas tinas para uma temperatura inferior a 90 °C;
- equilibrar a temperatura do banho-maria **e** a Epitope Retrieval Solution nas tinas novamente para uma temperatura entre 95 – 99 °C; verificar a temperatura da Epitope Retrieval Solution nas tinas;
- incubar durante 10 (±1) minutos a 95 – 99 °C; iniciar a contagem decrescente apenas depois de se verificar se a temperatura da Epitope Retrieval Solution nas tinas atingiu uma temperatura de 95 – 99 °C;
- remover a tina completa com lâminas do banho-maria;
- deixar que as lâminas arrefeçam na Epitope Retrieval Solution durante 20 (±1) minutos à temperatura ambiente;
- decantar a Epitope Retrieval Solution e enxaguar as secções com Wash Buffer (ver Procedimento, Secção 1.2);
- para um desempenho ideal, embeber as secções em Wash Buffer durante 5 minutos depois da recuperação do epítopo e antes da coloração.

NOTA: A Epitope Retrieval Solution foi concebida apenas para uma única aplicação. Não reutilizar.

Passo 2: Programação do instrumento

Antes da primeira aplicação do CINtec® Histology Kit num Instrumento Autostainer, é necessário configurar um novo modelo. Consultar o Manual do operador do

Instrumento Autostainer dedicado.

Passo 3: Procedimento do Autostainer

- transferir os reagentes das garrafas do kit para os frascos de reagente Autostainer graduados. Utilizar o mapa gerado pelo Autostainer para programar tempos e volumes de reagente (ver ponto 4 para obter tempos e volumes específicos);
- colocar os frascos de reagente do Autostainer no suporte de reagentes Autostainer de acordo com o mapa de disposição de reagentes gerado por computador;
- carregar as lâminas no Autostainer de acordo com o mapa de disposição de lâminas gerado por computador;
- para impedir que as amostras sequem, estas devem ser pulverizadas com Wash Buffer no Autostainer;
- o seguinte é um resumo do programa:
    - lavar*;
    - 200 µl de Reagente de bloqueio da peroxidase - 5 minutos;
    - lavar*;
    - 200 µl de Anticorpo primário $p16^{INK4a}$ ou Negative Reagent Control - 30 minutos;
    - lavar*;
    - 200 µl de Visualization Reagent - 30 minutos;
    - lavar*;
    - lavar*;
    - lavar*;
    - trocar;
    - 200 µl de Substrate-Chromogen Solution (DAB) - 10 minutos;
    - lavar*;
    - lavar lâminas em água desionizada depois do passo de substrato-cromogénio.

    *utilizar Wash Buffer para os respetivos passos de lavagem.

NOTA: Se o instrumento Autostainer utilizado lavar lâminas em tampão, as lâminas devem ser lavadas com água desionizada depois de serem retiradas do Autostainer.

Passo 4: Corante de contraste (as instruções referem-se a hematoxilina)

- mergulhar lâminas num banho de hematoxilina. Incubar entre 2 e 5 minutos, dependendo da concentração de hematoxilina utilizada;
- colocar lâminas num banho de água da torneira e lavar cuidadosamente com água da torneira corrente. Assegurar que toda a hematoxilina foi eliminada;
- lavar brevemente as lâminas com cuidado num banho de água destilada ou desionizada;
- pode aplicar o corante de contraste diretamente no instrumento Autostainer.

NOTA: Dependendo da duração da incubação e do potencial da hematoxilina utilizada, a aplicação de um corante de contraste resultará numa coloração azul clara a escura dos núcleos das células. A adição excessiva ou insuficiente de corante de contraste pode interferir com a interpretação correta dos resultados.

Passo 5: Montagem

Recomenda-se que o meio de montagem seja não aquoso e permanente. Doutro modo, também é aceitável um meio de montagem aquoso. Seguir as instruções de utilização do fornecedor do meio de montagem.

NOTA: Para minimizar o esbatimento, proteger as lâminas da luz e armazenar à temperatura ambiente (entre 20 – 25 °C).

3. Procedimento de coloração para utilização manual

NOTA: Prevenir a secagem de secções de tecido durante o procedimento de coloração. Secções de tecido secas pode resultar no aumento de coloração não específica. Para incubações prolongadas, manter os tecidos num ambiente húmido.

Seguir os procedimentos padrão utilizados em coloração imuno-histoquímica manual quando utilizar o CINtec® Histology Kit para coloração manual.

3.1 Desparafinização e rehidratação

Antes da desparafinização, colocar lâminas numa estufa de secagem a uma temperatura inferior a 60 °C durante pelo menos 20 minutos mas não mais de uma hora para remover água de forma quantitativa melhorando assim a aderência do tecido à lâmina de vidro ("aquecimento") e derreter a parafina. As lâminas de tecido devem ser desparafinizadas para remover o meio de impregnação e em seguida rehidratadas antes de ser possível efetuar o procedimento de coloração. É crucial evitar a remoção incompleta de parafina pois o meio de impregnação residual resultará em aumento de coloração não específica. Incubar as lâminas à temperatura ambiente (entre 20 – 25 °C) de acordo com os seguintes passos.

- 5 (±1) minutos num banho de xilol;
- repetir este passo uma vez com um banho novo;
- remover líquido em excesso;
- 3 (±1) minutos em etanol a 95%;
- repetir este passo uma vez com um banho novo;
- remover líquido em excesso;
- 3 (±1) minutos em etanol a 70%;
- repetir este passo uma vez com um banho novo;
- remover líquido em excesso;
- mínimo de 30 segundos em água destilada ou desionizada.

Iniciar o procedimento de coloração conforme descrito na Secção 3.2, Passo 1: Recuperação do epítopo.

As soluções de xilol e álcool não devem ser utilizadas para mais de 40 lâminas.

3.2 Protocolo de coloração para utilização manual

Passo 1: Recuperação do epítopo

- encher tinas de coloração, *por ex.*, tinas Coplin em plástico, com a Epitope Retrieval Solution diluída (ver Procedimento, Secção 1.1);
- colocar tinas de coloração contendo Epitope Retrieval Solution em banho-

maria e aquecer o banho-maria e a Epitope Retrieval Solution entre 95 – 99 °C. Neste passo, é importante ajustar o nível de água no banho-maria para garantir que as tinas ficam mergulhadas na água a 80%. Para estabilizar a temperatura e evitar evaporação, cobrir as tinas com tampas;

- mergulhar secções desparafinizadas em Epitope Retrieval Solution pré-aquecida nas tinas de coloração; este passo irá normalmente baixar a temperatura nas tinas para uma temperatura inferior a 90 °C;
- equilibrar a temperatura do banho-maria **e** a Epitope Retrieval Solution nas tinas novamente para uma temperatura entre 95 – 99 °C; verificar a temperatura da Epitope Retrieval Solution nas tinas;
- incubar durante 10 (±1) minutos a 95 – 99 °C; iniciar a contagem decrescente apenas depois de se verificar se a temperatura da Epitope Retrieval Solution nas tinas atingiu uma temperatura de 95 – 99 °C;
- remover a tina completa com lâminas do banho-maria;
- deixar que as lâminas arrefeçam na Epitope Retrieval Solution durante 20 (±1) minutos à temperatura ambiente;
- decantar a Epitope Retrieval Solution e enxaguar as secções com o Wash Buffer diluído (ver Procedimento, Secção 1.2);
- para um desempenho ideal, embeber as secções em Wash Buffer durante 5 (±1) minutos depois da recuperação do epítopo e antes da coloração.

NOTA: A Epitope Retrieval Solution foi concebida apenas para uma única aplicação. Não reutilizar.

Passo 2: Reagente de bloqueio da peroxidase

- aplicar 200 µl de Reagente de bloqueio da peroxidase para cobrir a amostra;
- incubar durante 5 (±1) minutos;
- sacudir o líquido em excesso e colocar as lâminas num banho de Wash Buffer durante 5 (±1) minutos.

Passo 3: Primary Antibody ou Negative Reagent Control

- remover tampão em excesso;
- cobrir a amostra com 200 µl de anticorpo primário (Mouse Anti-Human $p16^{INK4a}$ ou Negative Reagent Control);
- incubar durante 30 (±1) minutos;
- sacudir o líquido em excesso e colocar as lâminas num banho de Wash Buffer durante 5 (±1) minutos.

Passo 4: Visualization Reagent

- remover tampão em excesso;
- cobrir a amostra com 200 µl de Visualization Reagent;
- incubar durante 30 (±1) minutos;

- sacudir o líquido em excesso e colocar as lâminas num banho de Wash Buffer durante 5 (±1) minutos;
- repetir este passo duas vezes com um Wash Buffer novo.

Passo 5: Substrate-Chromogen Solution (DAB)

- cobrir a amostra com 200 µl de Substrate-Chromogen Solution (DAB) que tenha sido preparada de acordo com o procedimento descrito em 1.3 acima;
- incubar durante 10 (±1) minutos;
- sacudir o excesso de líquido e lavar cuidadosamente com água destilada ou desionizada.

Recolher os resíduos da Substrate-Chromogen Solution (DAB) num recipiente de materiais perigosos para uma eliminação adequada.

Passo 6: Corante de contraste (as instruções referem-se a hematoxilina)

- mergulhar lâminas num banho de hematoxilina. Incubar entre 2 e 5 minutos, dependendo da concentração de hematoxilina utilizada;
- colocar lâminas num banho de água da torneira e lavar cuidadosamente com água da torneira corrente. Assegurar que toda a hematoxilina foi eliminada;
- lavar brevemente as lâminas com cuidado num banho de água destilada ou desionizada.

NOTA: Dependendo da duração da incubação e do potencial da hematoxilina utilizada, a aplicação de um corante de contraste resultará numa coloração azul clara a escura dos núcleos das células. A adição excessiva ou insuficiente de corante de contraste pode interferir com a interpretação correta dos resultados.

Passo 7: Montagem

Recomenda-se que o meio de montagem seja não aquoso e permanente. Para meio de montagem permanente à base de xilol é necessário um procedimento de desidratação, por ex.

- água destilada ou desionizada
- 3 min de etanol a 70%
- 3 min de etanol a 70%
- 3 min de etanol a 96%
- 3 min de etanol a 99%
- 5 min de xilol
- 5 min de xilol

Doutro modo, também é aceitável um meio de montagem aquoso. Seguir as instruções de utilização do fornecedor do meio de montagem.

NOTA: Para minimizar o esbatimento, proteger as lâminas da luz e armazenar à temperatura ambiente (entre 20 – 25 °C).

VII. Controlo de qualidade

Desvios aos procedimentos recomendados para fixação e processamento de amostras no laboratório do utilizador podem produzir uma variabilidade significativa de resultados, sendo necessário o processamento regular de controlos internos.

Controlo tecidular positivo

Os materiais de controlo positivo externo devem ser amostras de autópsia/biópsia/cirúrgicas recentes fixadas, processadas e impregnadas o mais rápido possível da mesma forma que a(s) amostra(s) de doente. Os controlos de tecido positivos são indicativos de tecidos corretamente preparados e técnicas de coloração adequadas. Um controlo de tecido externo positivo para cada conjunto de condições de teste deve ser incluído em cada processamento de coloração. Os tecidos utilizados para os materiais de controlo positivo externo devem ser selecionados em amostras da doente com coloração positiva conhecida para $p16^{INK4a}$. Se os controlos positivos não demonstrarem uma coloração positiva adequada, os resultados das amostras de teste deverão ser considerados inválidos.

Controlo tecidular negativo

Os tipos celulares conhecidos por serem negativos para $p16^{INK4a}$ presente na maioria das secções de tecido podem ser utilizados pelo técnico laboratorial como locais de controlo negativo interno para verificar as especificações de desempenho de IHC. Se ocorrer uma coloração específica (falsa coloração positiva) no controlo tecidular negativo, os resultados com a amostra da doente deverão ser considerados inválidos.

Negative Reagent Control não específico

Utilizar o Negative Reagent Control em vez do anticorpo primário com uma secção de cada amostra de doente para avaliar a coloração não específica e permitir uma melhor interpretação da coloração específica no local do antigénio.

Se ocorrer uma coloração específica (falsa coloração positiva) com o Negative Reagent Control não específico, os resultados com a amostra de doente deverão ser considerados inválidos.

VIII. Interpretação dos resultados

As amostras de controlo coradas com o Negative Reagent Control como reagente primário não devem apresentar coloração específica.

A coloração positiva utilizando o Mouse anti-Human $p16^{INK4a}$ Antibody monoclonal, Clone E6H4™, deve ser avaliada dentro do contexto de qualquer coloração de fundo não específica do controlo de reagente negativo. Tal como acontece com qualquer teste imuno-histoquímico, um resultado negativo significa que o antigénio não foi detetado, e não que o antigénio não existia nas células/tecidos analisados.

A interpretação dos resultados deve ter em consideração o facto de a $p16^{INK4a}$ ser uma proteína celular que pode ser expressa em níveis detetáveis em lesões displásicas de alto grau do colo do útero e cancros do colo do útero, bem como em algumas condições não associadas a displasia do colo do útero, embora com níveis e com padrões de expressão diferentes.

As amostras de lâminas coradas são avaliadas de acordo com um sistema de classificação binário composto pelas classificações "positivo" e "negativo".

A classificação "positivo" é atribuída se a amostra de lâmina corada com $p16^{INK4a}$ apresentar uma coloração contínua de células das camadas celulares basal e

parabasal do epitélio cervical escamoso, com ou sem coloração de células de camadas celulares superficiais ("padrão de coloração difusa"). É apresentado um exemplo de uma lâmina classificada como "positivo" ("padrão de coloração difusa") no Anexo 2, Figura 1.

A classificação "negativo" é atribuída se a amostra de lâmina corada com p16^{INK4a} apresentar uma reação de coloração negativa no epitélio escamoso ("padrão de coloração negativo") ou uma coloração de células isoladas ou pequenos agrupamentos; isto é, uma coloração não contínua, particularmente não das células basais e parabasais ("padrão de coloração focal"). É apresentado um exemplo de uma lâmina classificada como "negativo" ("padrão de coloração focal") no Anexo 2, Figura 2.

A interpretação de lâminas coradas para p16^{INK4a} utilizando o CINtec® Histology Kit deve ser efetuada em conjunto com lâminas coradas por H&E preparadas a partir da mesma amostra de tecido do colo do útero. As informações adicionais fornecidas pelas lâminas coradas por CINtec® devem ser combinadas com o diagnóstico preliminar baseado na morfologia estabelecido nas lâminas coradas por H&E para criar um diagnóstico final.

IX. Limitações

- Apenas para utilização profissional. É necessária formação especial para o desempenho de procedimentos imuno-histoquímicos.
- A interpretação clínica de qualquer coloração positiva ou negativa, deve ser avaliada dentro do contexto do historial clínico, morfologia e outros critérios histopatológicos. A interpretação clínica de qualquer coloração positiva ou negativa, deve ser complementada por meio de estudos morfológicos que utilizem controlos positivos e negativos, internos e externos adequados, bem como por meio de outros testes de diagnóstico. É da responsabilidade de um patologista qualificado que esteja familiarizado com a utilização correta dos anticorpos para IHC, reagentes e métodos, interpretar todos os passos realizados para preparar e interpretar a preparação IHC final.
- Os resultados de coloração em procedimentos de imuno-histoquímica são fortemente influenciados pela qualidade do tecido corado. Desta forma, os passos de fixação, lavagem, secagem, aquecimento, seccionamento ou contaminação com outros tecidos contribuem significativamente para o resultado geral da coloração e podem levar a artefactos, aprisionamento de anticorpos ou resultados falsos negativos. Os resultados inconsistentes podem ser resultantes de variações nos métodos de fixação e impregnação ou de irregularidades inerentes ao tecido.
- A adição excessiva ou insuficiente de corante de contraste pode interferir com a interpretação correta dos resultados.
- O fabricante fornece estes anticorpos/reagentes com a diluição ideal para utilização de acordo com as instruções aqui fornecidas, para testes de IHC em secções de tecido preparadas. Qualquer desvio aos procedimentos de teste recomendados pode invalidar resultados esperados declarados; devem ser empregues e documentados controlos adequados. Os utilizadores que se desviem dos procedimentos de teste recomendados terão de aceitar a responsabilidade da interpretação dos resultados das doentes nestas circunstâncias.

- Poderão observar-se resultados falsos positivos devido a ligação não imunológica de proteínas ou produtos de reação dos substratos. Tais resultados poderão igualmente ser provocados por atividade de pseudo-peroxidase (eritrócitos) e atividade de peroxidase endógena (citocromo C).
- Os reagentes podem demonstrar reações inesperadas em tecidos não testados anteriormente. A possibilidade de surgirem reações inesperadas, mesmo nos grupos de tecidos testados, não pode ser totalmente eliminada devido à variabilidade biológica da expressão de antigénios em neoplasias ou outros tecidos patológicos. Contactar a Roche mtm laboratories AG com reação(ões) inesperada(s) documentada(s). Consulte a informação de contacto disponibilizada na Secção XIII para obter informações sobre a assistência técnica.
- Não substituir reagentes do kit por reagentes com outros números de lote ou com reagentes de outros fabricantes.

X. Características do desempenho

Desempenho clínico

O desempenho clínico do CINtec® Histology Kit foi avaliado num estudo clínico controlado utilizando amostras de tecido do colo do útero fixado em formol e impregnado em parafina [21]. O estudo foi concebido para demonstrar a adequação do CINtec® Histology Kit como ajuda para aumentar a precisão de diagnóstico e a concordância interobservador para a deteção de neoplasia intraepitelial cervical de alto grau (CIN2+).

O estudo clínico foi efetuado em biópsias por punção e conização do colo do útero obtidas retrospetivamente. Foi utilizado um total de 500 amostras do colo do útero de dois laboratórios de patologia europeus diferentes e enriquecidas para displasia de alto grau com base nos seus diagnósticos originais na preparação de lâminas coradas por H&E e lâminas consecutivas coradas com o CINtec® Histology Kit de acordo com as instruções do fabricante.

Três especialistas em patologia ginecológica estabeleceram os seus diagnósticos independentes em cada caso com base na lâmina corada por H&E. Os casos com resultados discrepantes foram sujeitos a um segundo processo de análise conjunta durante um encontro de adjudicação e a maioria dos diagnósticos (diagnósticos de consenso, dois em três) serviu de diagnóstico de referência para o estudo.

Doze investigadores (patologistas certificados com experiência de leitura de patologia do colo do útero de forma regular) de 4 países europeus (França, Itália, Espanha e Alemanha) fizeram parte do painel de patologistas no estudo. Numa primeira fase de interpretações de lâminas, todos os patologistas do painel estabeleceram os seus diagnósticos individuais para cada caso apenas com base em lâminas coradas por H&E. Os patologistas não tiveram acesso em momento algum aos diagnósticos originais e aos diagnósticos de referência. Depois de um período de "wash-out" de mais de 4 semanas, o mesmo conjunto de lâminas coradas por H&E (reetiquetadas) foi novamente analisado por doze patologistas do painel, em conjunto com as lâminas correspondentes de cada caso coradas com o CINtec® Histology Kit.

Para a avaliação de melhorias na precisão de diagnóstico para as lâminas de amostras do colo do útero coradas com CINtec® Histology lidas em conjunto com as lâminas coradas por H&E respetivas em comparação com as lâminas de amostras do colo do útero coradas apenas por H&E, foram comparados os resultados de

leituras de cada patologista do painel para ambos os métodos com os diagnósticos de consenso estabelecidos como diagnósticos de referência pelos três especialistas em patologia ginecológica.

Resultados:

A análise de dados incluiu um total de 482 casos com diagnósticos completos realizados por todos os patologistas do estudo. As frequências das várias categorias de diagnóstico com base nos diagnósticos de consenso pelos três especialistas em patologia ginecológica foram Negativo para displasia (n=194), CIN1 (n=96), CIN2 (69) e CIN3 (n=123).

Precisão de diagnóstico para a deteção de CIN2+

A sensibilidade geral para a identificação de CIN2+ foi aumentada de 1787 (H&E) para 2018 (H&E e CINtec®) de resultados CIN2+ positivos verdadeiros, com apenas uma redução ligeira em termos de especificidade geral de 3088 (H&E) para 3051 (H&E e CINtec® Histology) de resultados ≤CIN1 negativos verdadeiros.

Tabela 1

Melhoria de precisão de diagnóstico para CIN de elevado grau (CIN2+) pela leitura conjunta de lâminas coradas por H&E e CINtec® Histology versus lâminas apenas coradas por H&E; são apresentados os números de resultados de leitura verdadeiros positivos, falsos negativos, falsos positivos e verdadeiros negativos comparativamente com os diagnósticos de consenso pelos patologistas especialistas [Nota: a concordância total com os diagnósticos de consenso dos patologistas especialistas teriam resultado em 2304 (192 casos de CIN2+, x 12 patologistas do painel) resultados verdadeiros positivos]

	Verdadeiros positivos	**Falsos negativos**	**Falsos positivos**	**Verdadeiros negativos**
H&E	1787	517	392	3088
H&E+CINtec® Histology	2018	286	429	3051

O modelo de efeitos mistos ANOVA para Pseudo-valores de Jackknife, vulgarmente conhecido por método Dorfman-Berbaum-Metz (DBM), foi utilizado para testar os efeitos do teste CINtec® Histology em termos de precisão.

A hipótese nula de que a precisão de diagnóstico com base em lâminas coradas por H&E versus H&E e CINtec® Histology para CIN2+ era igual foi rejeitada com p=0,0004 (área sob a curva (AUC) para H&E: 0,877; AUC para H&E e CINtec® Histology: 0,925).

Tabela 2

Características do desempenho para a leitura conjuntiva de lâminas coradas por H&E e CINtec® Histology versus lâminas apenas coradas por H&E para a identificação de CIN de elevado grau (CIN2+); diagnósticos de consenso estabelecidos por três especialistas em patologia ginecológica relativamente a lâminas coradas por H&E utilizados como diagnósticos de referência

	H&E % (CI de 95%)	**H&E e CINtec® Histology** % (CI de 95%)
Sensibilidade	77,6% (75,8, 79,3)	87,6% (86,2, 88,9)
Especificidade	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)

CI de 95% CI, intervalos de confiança a 95%; PPV, valor preditivo positivo; NPV, valor preditivo negativo; DLR+, razão de verosimilhança diagnóstica positiva; DLR–, razão de verosimilhança diagnóstica negativa

Utilizando os diagnósticos de consenso dos três especialistas em patologia ginecológica como padrão de referência, a sensibilidade para a deteção de CIN2+ foi melhorada em relativamente 13% (a sensibilidade para diagnósticos de H&E de 77,6% aumentou para 87,6% para diagnósticos estabelecidos em lâminas coradas por H&E e CINtec® Histology).

O aumento de precisão de diagnóstico para a deteção de CIN2+ foi comprovado de forma independente com significado estatístico para os subgrupos de biópsias do colo do útero obtidas por punção (n=249; AUC para H&E: 0,895; AUC para H&E e CINtec® Histology: 0,929; p=0,0053) e amostras do colo do útero por conização (n=233; AUC para H&E: 0,887; AUC para H&E e CINtec® Histology: 0,948; p=0,009).

Concordância interobservador para a deteção de CIN2+

Para a avaliação da melhoria da concordância interobservador para a deteção de CIN2+ entre patologistas do painel, foi utilizada uma forma de múltiplos avaliadores das estatísticas Kappa entre diagnósticos em lâminas do colo do útero coradas por H&E lidas em conjunto com lâminas de amostra do colo do útero coradas por CINtec® Histology.

Tabela 3

Melhoria da concordância interobservador para a deteção de CIN2+ pela leitura conjunta de lâminas coradas por H&E e CINtec® Histology versus lâminas apenas coradas por H&E. São fornecidos valores Kappa como uma medida da concordância corrigida para a hipótese

Categoria diagnóstica	**Kappa de H&E**	**Kappa de H&E e CINtec®**	**Significado estatístico**
CIN2+, todos os casos	0,580	0,756	p<0,0001
CIN2+, apenas biópsias por punção	0,598	0,748	p<0,0001
CIN2+, apenas biópsias por conização	0,548	0,765	p<0,0001

A estatística kappa como medida da concordância corrigida para a hipótese entre os patologistas do painel para a deteção de CIN2+ foi melhorada de forma significativa para as leituras de lâminas coradas por H&E e CINtec® Histology versus a leitura apenas de lâminas H&E (aumento de valores kappa para todos os casos entre 0,580 e 0,756; p<0,0001).

Reprodutibilidade na classificação do padrão de coloração p16^{INK4a}

A fiabilidade entre patologistas do painel para avaliar o padrão de coloração de p16^{INK4a} em amostras de tecido do colo do útero como positivo para p16^{INK4a} de forma difusa, positivo para p16^{INK4a} de forma focal ou negativo para p16^{INK4a} foi avaliada.

Houve um elevado nível de reprodutibilidade entre patologistas para classificar o padrão de coloração por p16^{INK4a} como positivo (padrão de coloração difusa) ou negativo (padrão de coloração focal ou sem imunorreatividade). O valor Kappa (medida da concordância corrigida para a hipótese) para reprodutibilidade entre os doze patologistas do painel para classificar o padrão de coloração de p16^{INK4a} como positivo (padrão de coloração difusa) ou negativo (padrão de coloração focal e sem imunorreatividade) foi determinado como excelente (valor kappa médio = 0,899; valor kappa mediano = 0,903).

Desempenho analítico

Sensibilidade analítica

O estudo de sensibilidade foi realizado com Kits para histologia CINtec® de 3 lotes. Foram analisadas trinca e cinco biópsias do colo do útero com CIN3+ no estudo de sensibilidade, incluindo 6 biópsias classificadas como CIN3 e 29 biópsias classificadas como carcinoma de células escamosas.

Cinco dos 6 (83,3%) casos classificados como CIN3 apresentaram forte coloração difusa de p16. Um caso de biópsia CIN3 apresentou uma fraca expressão de p16, mas não tinha um sinal positivo de p16 claro.

Vinte e dois dos 29 (75,9%) casos classificados como carcinoma de células escamosas apresentaram forte coloração difusa p16. Cinco casos de carcinoma de células escamosas apresentaram uma fraca expressão de p16, mas não tinham um sinal positivo de p16 claro. Apenas 2 dos 29 (6,9%) casos eram completamente negativos p16. Isto pode ser explicado visto que foi previamente relatado que 3-8% dos casos de carcinoma de células escamosas eram negativos para coloração de p16 [1; 6]. Isto pode refletir uma pequena percentagem de casos nos quais a desdiferenciação e o rearranjo cromossómico originaram a desativação ou deleção do lócus génico p16.

Para os 3 lotes, a coloração num painel bem caracterizado de secções de tecidos de rato utilizando o Negative Reagent Control resultou numa coloração forte e específica de neurónios únicos no cérebro de rato. Além disso, algumas células do tipo canalicular do rim, macrófagos únicos no baço, e macrófagos únicos e células do plasma no intestino delgado apresentaram fraca coloração. Outros tecidos da matriz dos tecidos do rato eram completamente negativos.

O anticorpo anti-p16 E6H4™ é capaz de processar a coloração contínua de células das camadas celulares basal e parabasal, com ou sem coloração das células das camadas intermédia ou intermédia e superficial do epitélio escamoso em biópsias do colo do útero CIN (CIN2 CIN3) de elevado grau. O Negative Reagent Control (NRC) é capaz de detetar especificamente neurónios de rato.

Especificidade analítica

A especificidade do Mouse anti-Human p16^{INK4a} Antibody, Clone E6H4™, foi verificada pela análise por Western blot (positivo para o lisado da linha celular HeLa; consultar também [1]).

O estudo de especificidade foi realizado com Kits para histologia CINtec® de 3 lotes num painel devidamente caracterizado de 90 amostras de tecido normal fixas em NBF (formol neutro tamponado) (30 tipos diferentes de tecidos) e 54 tecidos tumorais diferentes dos do colo do útero (organizadas em Matrizes de múltiplos tecidos = MTA).

Para coloração utilizando o anticorpo p16 específico (Clone E6H4™) em tecidos normais, foram observados 16 tecidos p16 negativos diferentes [cérebro hemisférico, cerebelo, glândula suprarrenal, tiroide, medula óssea, coração, esófago, estômago, intestinos, cólon, fígado, rim, músculo estriado, pele, mesotélio, colo do útero] e 14 tecidos p16 positivos diferentes [Fraca coloração: hipófise, pulmão, glândula do timo, próstata; positivo: nervo, intestino, amígdala, pâncreas, baço; fortemente positivo: útero, ovário, mama, testículos, paratiroide]. Para coloração utilizando o anticorpo p16 específico (Clone E6H4 ™) em tecidos tumorais diferentes dos do colo do útero, foram observados 22 casos de tumor p16 negativo diferentes e 32 casos de tumor p16 positivo diferentes.

No caso dos 3 lotes de CINtec® Histology, os resultados foram negativos para todos os tecidos (tecidos normais e tecidos tumorais) testados quando foi utilizado o Negative Reagent Control. O anticorpo de neurofisina relacionado com oxitocina anti-rato monoclonal de ratinho não reage significativamente com amostras de tecidos normais humanos e tecidos tumorais humanos.

Reprodutibilidade

Reprodutibilidade inter-ensaio

A reprodutibilidade inter-ensaio foi determinada com o CINtec® Histology Kit utilizando o protocolo manual corando 36 lâminas preparadas a partir de blocos de tecido diagnosticado como CIN2+. As áreas com displasia em todas as secções foram coradas com intensidade comparável (+/- 0,5 numa escala de 0 a 3) em todos os ensaios. Áreas normais em todas as lâminas não demonstraram coloração específica.

Reprodutibilidade intra-ensaio

A reprodutibilidade intra-ensaio foi determinada com o CINtec® Histology Kit com o protocolo manual e no instrumento Autostainer em três dias diferentes. No total, foram incluídos três blocos de tecido diagnosticado como CIN2+. De cada bloco foi incluída uma secção em série em cada dia. A área com displasia nas secções de um bloco foi corada com intensidade comparável (+/- 0,5 numa escala de 0 a 3) em todos os dias e também em coloração manual e automática. Áreas normais em todas as lâminas não demonstraram coloração específica.

Reprodutibilidade inter-lote

Para determinar a reprodutibilidade interlote, foram utilizados 3 lotes diferentes de CINtec® Histology Kit para coloração de secções de casos CIN2+. Foi efetuada coloração manual e automática de acordo com o protocolo indicado nas instruções de utilização. A área com displasia nas secções de um bloco foi corada com intensidade comparável (+/- 0,5 numa escala de 0 a 3) com os reagentes de todos os três lotes em coloração manual e automática. Áreas normais em todas as lâminas não demonstraram coloração específica.

De notar que o método de pontuação da intensidade da coloração com uma escala de 0 a 3 por exclusivamente utilizado para fins de avaliação do desempenho analítico e não deve ser utilizado na interpretação da coloração das secções de tecido na prática clínica. Em vez disso, será utilizada na interpretação de rotina a interpretação qualitativa das lâminas coradas tal como é descrita na Secção VIII.

XI. Resolução de problemas

Consultar a Secção XIII para obter as informações de contacto se for necessária assistência técnica.

Problema	Causa provável	Ação sugerida
1. Sem coloração de lâminas	**1a.** Desvio das Instruções de utilização;	**1a.** Ler cuidadosamente as Instruções de utilização e cumprir os procedimentos aqui resumidos;
2. Coloração de lâminas fraca	**2a.** Recuperação do epítopo inapropriada;	**2a.** Utilizar Epitope Retrieval Solution recentemente preparada e/ou garantir que a Epitope Retrieval Solution atinge entre 95 – 99 °C para um total de 10 minutos e arrefece mais 20 minutos;
	2b. Tempos de incubação do reagente inapropriados;	**2b.** Rever 2.2. / 3.2. Recomendações do protocolo de coloração;
	2c. Método de fixação inapropriado;	**2c.** Garantir que o tecido da doente não está excessivamente fixado ou que não foi utilizado fixador alternativo;
	2d. A água que foi utilizada para diluir a Epitope Retrieval Solution inclui uma concentração de iões que é demasiado elevada;	**2d.** Garantir que a coluna de troca de iões para produzir água desionizada foi verificada pela manutenção de rotina;

	2e. Desparafinização inapropriada;	**2e.** Os utilizadores devem ter em atenção que as variações de temperatura do equipamento ou os tempos de exposição durante a preparação pré-analítica da amostra podem levar à remoção incompleta de parafina de lâminas de tecido. A parafina residual pode levar à coloração incompleta com qualquer corante de histologia, incluindo o corante de Histologia CINtec®. Os laboratórios de histopatologia devem incluir monitorização regular do equipamento para reduzir a variação na preparação de amostras antes da coloração. A observação de limites bem definidos nas áreas de tecido imunorreativo ou outras inconsistências de coloração numa lâmina podem, com qualquer corante imuno-histoquímico, ser um indicador de processamento pré-analítico não ideal ou incompleto da amostra. Os utilizadores devem considerar verificar o equipamento e os métodos de preparação pré-analítica de amostras se se observar coloração inconsistente.
3. Coloração de fundo excessiva das lâminas	**3a.** Remoção de parafina incompleta;	**3a.** Utilizar banhos de xilol recentes e seguir o procedimento conforme resumido na Secção 2.1. / 3.1.;
	3b. Montagem de secções em lâminas efetuada com aditivos de amido;	**3b.** Aditivos de amido utilizados em montagem de secções podem exibir imunorreatividade e devem, por isso, ser evitados;
	3c. Lavagem de lâminas insuficiente;	**3c.** Utilizar solução recente em banhos de tampão e garrafas de lavagem;
	3d. Secagem de secções durante o procedimento de coloração;	**3d.** Utilizar câmara húmida. Limpe apenas três a quatro lâminas de cada vez antes de aplicar o reagente;
	3e. Método de fixação inapropriado;	**3e.** Utilizar apenas fixador da forma aqui recomendada. Tecido fixado de forma aberrante pode demonstrar coloração de fundo excessiva;

	3f. Ligação não específica de reagentes com o tecido;	**3f.** Verificar método de fixação da amostra e presença de necrose;
4. O tecido destaca-se das lâminas	**4a.** Utilização de lâminas inadequadas;	**4a.** Cumprir a recomendação presente e utilizar lâminas SuperFrost® Plus;
5. Coloração específica excessivamente forte	**5a.** Método de fixação inapropriado;	**5a.** Garantir fixador e método de fixação adequado;
	5b. Tempos de incubação de reagente prolongados;	**5b.** Rever e cumprir o protocolo de coloração indicado nas Secções 2.2 / 3.2 acima;
	5c. Solução de lavagem inapropriada;	**5c.** Utilizar o Wash Buffer (10 x) (referência 10215364001).

XII. Símbolos

Símbolo:	Explicação:
REF	Referência
LOT	Código de lote
GTIN	Número global de item comercial
UDI	Identificador único do dispositivo
IVD	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Fabricante
Σ	Contém o suficiente para <n> testes
	Consultar instruções de utilização
	Utilizar até
	Limite de temperatura
	Data de fabrico
	Não reutilizar
	Contacto da assistência técnica (telefone)
BIO	Contém materiais de origem animal
CONTENT	Conteúdo

XIII. Fabricante

Fabricado por:

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim
Germany

https://navifyportal.roche.com

Contacto da assistência técnica (Telefone): +800 5505 6606

O resumo da segurança e do desempenho pode ser encontrado aqui:

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

XIV. Estado da revisão

As atuais instruções de utilização representam a versão 1.0, publicada em junho de 2024.

Alterações à versão anterior relativas ao produto 9511 / 06594441001 (2.9, publicada em dezembro de 2022):

- Alteração do fabricante de Roche mtm laboratories AG para Roche Diagnostics GmbH, tendo por isso sido emitido um novo número de produto, 10213370001
- Alterações a nível da redação

XV. Propriedade intelectual

CINtec é uma marca comercial de Roche.

Todas as restantes marcas comerciais são propriedade dos respetivos titulares.
© 2024 Roche

Anexo 1
Referências

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

14. Kalof AN, Evans MF, Simmons-Arnold L, Beatty BG, and Cooper K. p16^{INK4a} Immunoexpression and HPV In Situ Hybridization Signal Patterns Potential Markers of High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia. Am J Surg Pathol 2005, 29(5):674-9
15. Ansari-Lari MA, Staebler A, Zaino RJ, Shah KV, and Ronnett BM. Distinction of Endocervical and Endometrial Adenocarcinomas: Immunohistochemical p16 Expression Correlated With HumanPapillomavirus (HPV) DNA Detection. Am J Surg Pathol 2004, 28(2):160-7
16. Regauer S, and Reich O. CK17 and p16 expression patterns distinguish (atypical) immature squamous metaplasia from high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). Histopathology 2007, 50(5):629-35
17. Stoler MH, and Schiffman M. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations. JAMA 2001, 285(11):1500-5
18. McCluggage WG, Walsh MY, Thornton CM, Hamilton PW, Date A, Caughley LM, and Bharucha H. Inter- and intra-observer variation in the histopathological reporting of intraepithelial lesions using a modified Bethesda grading system. Br J Obstet Gynaecol 1998, 105(2):206-10
19. Ismail SM, Colclough AB, Dinnen JS, Eakins D, Evans DMD, Gradwell E, O´Sullivan JPO, Summerell JM, and Newcombe R. Reporting cervical intra-epithelial neoplasia (CIN): intra- and interpathologist variation and factors associated with disagreement. Histopathology 1990, 16(4):371-6
20. De Vet HCW, Knipschild PG, Schouten HJ, Koudstaal J, Kwee W-S, Willebrand D, Sturmans F, and Arends JW. Interobserver variation in histopathological grading of cervical dysplasia. J Clin Epidemiol 1990, 43(12):1395-8
21. Bergeron C, Ordi J, Schmidt D, Trunk MJ, Keller T, and Ridder R, for the CINtec Histology Study Group. Conjunctive p16^{INK4a} testing significantly increases accuracy in diagnosing high-grade cervical intraepithelial neoplasia. Am J Clin Pathol 2010, 133(3):395-406
22. Sayed K, Korourian S, Ellison DA, Kozlowski K, Talley L, Horn HV, et al. Diagnosing cervical biopsies in adolescents: the use of p16 immunohistochemistry to improve reliability and reproducibility. J Low Genit Tract Dis 2007, 11(3):141-6
23. Gurrola-Diaz CM, Suarez-Rincon AE, Vazquez-Camacho G, Buonocunto-Vazquez G, RosalesQuintana S, Wentzensen N, et al. p16^{INK4a} immunohistochemistry improves the reproducibility of the histological diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia in cone biopsies. Gynecol Oncol 2008, 111(1):120-4
24. Horn LC, Reichert A, Oster A, Arndal SF, Trunk MJ, Ridder R, et al. Immunostaining for p16^{INK4a} used as a conjunctive tool improves interobserver agreement of the histologic diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. Am J Surg Pathol 2008, 32(4):502-12
25. Haidopoulos D, Partsinevelos GA, Vlachos GD, Rodolakis A, Markaki S, Voulgaris Z, et al. p16^{INK4A} is a strong biomarker for cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical carcinoma: a reappraisal. Reprod Sci 2009, 16(7):685-93
26. Lesnikova I, Lidang M, Hamilton-Dutoit S and Koch J. p16 as a diagnostic marker of cervical neoplasia: a tissue microarray study of 796 archival specimens. Diagn Pathol 2009, 4:22
27. Ordi J, Garcia S, del Pino M, Landolfi S, Alonso I, Quinto L, et al. p16^{INK4a} immunostaining identifies occult CIN lesions in HPV-positive women. Int J Gynecol Pathol 2009, 28(1):90-7

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

Anexo 2

Exemplo de padrão de coloração difuso

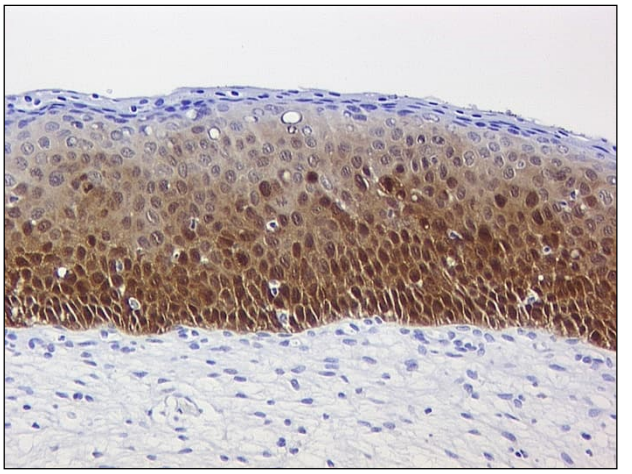

Fig. 1: CIN 3

Exemplo de padrão de coloração focal

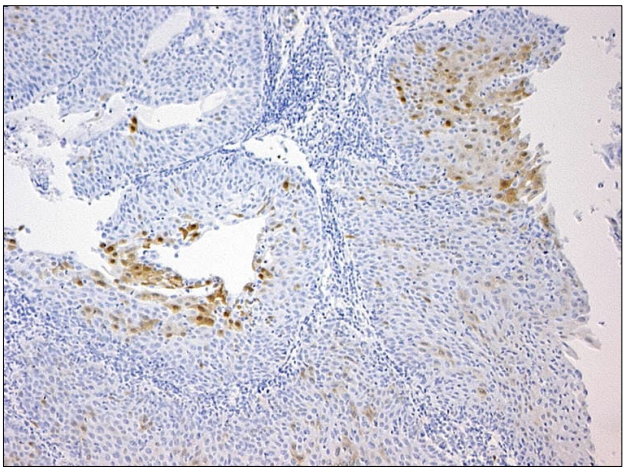

Fig. 2: Metaplasia escamosa, madura