

CINtec® p16 Histology

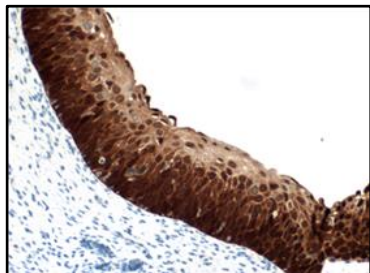
REF 805-4713 Σ 50

06695248001

REF 825-4713 Σ 250

06695256001

IVD



Obrázok 1. Farbenie skvamózných epitelálnych buniek krčka maternice pomocou CINtec p16 Histology.

URČENÉ POUŽITIE

Súprava CINtec p16 Histology je imunohistochemická analýza na kvalitatívnu detekciu proteínu p16^{INK4a} v tkanivových rezoch fixovaných formalínom, zaliatých v parafíne získaných z cervikálnych biopsií. Je určená na použitie v spojení so skličkami farbenými H&E pripravenými z tej istej vzorky cervikálneho tkaniva ako pomôcka na zvýšenie diagnostickej presnosti a zhody medzi pozorovateľmi pri diagnostike cervikálnej intraepiteliálnej neoplázie vysokého

stuňa.

Tento produkt by mal interpretovať kvalifikovaný patológ v spojení s histologickým vyšetrením, relevantnými klinickými informáciami a správnymi kontrolami.

Táto protilátka je určená na diagnostické použitie in vitro (IVD).

SÚHRN A VYSVETLENIE

CINtec p16 Histology sa skladá z jednej zložky: anti-p16^{INK4a} (E6H4), myšej monoklonálnej primárnej protilátky.

Ako inhibitor od cyklínu závislej kinázy zohráva p16^{INK4a} (p16) kľúčovú úlohu v progresii bunkového cyklu a bunkovej diferenciácii.¹⁻⁴ Proteín p16^{INK4a} riadi prechod fázou G1-S sprostredkovaný retinoblastómovým proteínom (pRB) a spúšťa zastavenie bunkového cyklu v priebehu procesu bunkovej diferenciácie.^{1,5} V normálnych, terminálne diferencovaných bunkách, je p16^{INK4a} exprimovaný v nízkych hladinách, ktoré zvyčajne nie sú detegovateľné imunohistochemiou.^{1,5} Výskumné štúdie identifikovali silnú nadmernú expresiu p16^{INK4a} v predrakovinových a rakovinových tkanivách, ktorá úzko súvisí s expresiou onkoproteínu ľudského papilomavírusu (HPV) E7.^{1,3,6,7,8} IHC detekcia nadmernej expzie p16 môže pomôcť pri interpretácii cervikálnych histologických vzoriek. Uvádza sa, že proteín p16 je nadmeme exprimovaný v neoplastických skvamózných epitelálnych bunkách krčka maternice, zatiaľ čo sa zistilo, že väčšinou chýba v normálnom epiteli a v neoplastických léziách.^{1,2,5,6,7} Početné štúdie skúmali koreláciu medzi nadmemou expresiou p16 a prítomnosťou cervikálnej intraepiteliálnej neoplázie (CIN).^{8,9} Nadmerná expresia p16 bola pozorovaná prakticky vo všetkých léziách CIN3 prevažná väčšina lézií CIN2, a typicky u 40 % až 60 % skvamózných cervikálnych lézií klasifikovaných ako CIN1 v tkanivových rezoch farbených H&E.⁸⁻¹³

KLINICKÝ VÝZNAM

Diagnostická interpretácia vzoriek cervikálnej biopsie predstavuje základ pre rozhodnutie o liečbe pacienta. CIN1 je histologickým prejavom infekcie HPV. Vo všeobecnosti sa odporúča, aby sa pacienti s diagnostikovanými léziami CIN1 vrátili na následné hodnotenie do jedného roka.¹⁴ U cervikálneho ochorenia je CIN2 najbežnejšie používaným klinickým prahom pre liečbu.¹⁴ U pacientov s diagnostikovaným CIN2 alebo CIN3 sa odporúča excízia alebo ablatívna liečba. Riziko excíznej liečby pre pacientku v plodnom veku zahŕňa nepriaznivé účinky na budúce tehotenstvo.^{15,16,17} Preto je presná diagnostika CIN a najmä CIN2 a CIN3 dôležitá pri rozhodovaní o liečbe pacientky.¹⁸ Morfológická interpretácia vzoriek cervikálnej biopsie len pomocou H&E podlieha variabilite medzi pozorovateľmi.¹⁸⁻²⁵ Viacero štúdií hodnotilo doplnkové použitie skličiek

farbených p16 a vplyv na spoľahlivosť medzi pozorovateľmi pri diagnostickej interpretácii vzoriek cervikálnej histológie patológmi. Vo všetkých týchto štúdiách sa diagnostická zhoda medzi patológmi výrazne zlepšila, keď sa sklička farbená p16 interpretovali spolu so skličkami farbenými H&E v porovnaní s interpretáciou samotného sklička farbeného H&E.^{10,11,13,21,22,26,27,28}

Okrem toho sa vo viacerých štúdiách hodnotil vplyv na diagnostickú presnosť interpretácie cervikálnej histológie, keď sa spolu so skličkami farbenými H&E použili aj sklička farbená p16. Dijkstra a kol. (2010) preukázali takmer dokonalú zhodu medzi diagnózami stanovenými na základe podložných skličiek farbených p16 interpretovaných jedným patológom v porovnaní s diagnostikovanými diagnózami stanovenými panelom odborných patológov iba na základe farbenia H&E.¹⁰ Bergeron a kol. hlásili významné zvýšenie diagnostickej presnosti, keď interpretácia zahŕňala ako podložné sklička farbené p16, tak aj sklička farbená H&E v porovnaní so samotnou interpretáciou skličiek farbených H&E (p = 0.0004), pričom citlivosť na ≥ CIN2 sa zvýšila zo 77 % na 87 %.¹¹ V nedávnej prospektívnej populačnej štúdiu, v ktorej akademické klinické centrum v USA analyzovalo viac ako 1450 po sebe idúcich prípadov cervikálnej biopsie, sa zistilo, že farbenie na p16 „je užitočné a spoľahlivý diagnostický doplnok na rozlíšenie biopsií s CIN2+ alebo bez neho“. ¹² Preto má adjuvantná interpretácia skličiek farbených H&E obsahujúcich rezy cervikálnej biopsie spolu s nasledujúcimi preparátmi z rovnakého vzorkovaného tkaniva imunofarbeného pre p16 potenciál významne zlepšiť diagnostickú zhodu pri interpretácii cervikálnych biopsií.

PRINCÍP POSTUPU

CINtec p16 Histology je myšia monoklonálna primárna protilátka produkovaná proti proteínu p16^{INK4a}. Protilátka CINtec p16 Histology sa viaže na proteín p16^{INK4a} v tkanivových rezoch fixovaných formalínom, zaliatých v parafíne (FFPE) a vykazuje nukleárny a/alebo cytoplazmatický vzor farbenia. Túto protilátku je možné vizualizovať pomocou detekčnej súpravy OptiView DAB IHC Detection Kit (kat. č. 760-700; 06396500001) alebo detekčnej súpravy ultraView Universal DAB Detection Kit (kat. č. 760-500; 05269806001). Ďalšie informácie nájdete v príslušnom metodickom liste.

DODÁVANÝ MATERIÁL

CINtec p16 Histology (kat. č. 805-4713 / 06695248001) obsahuje dostatok reagentie na 50 testov.

Jeden 5 mL dávkovač protilátky CINtec p16 Histology obsahuje približne 5.0 µg myšej monoklonálnej protilátky.

CINtec p16 Histology (kat. č. 825-4713 / 06695256001) obsahuje dostatok reagentie na 250 testov.

Jeden 25 mL dávkovač protilátky CINtec p16 Histology obsahuje približne 25.0 µg myšej monoklonálnej protilátky.

Táto protilátka sa riedi v Tris-HCl s proteínovým nosičom a s 0.10 % konzervačnou látkou ProClin 300.

Koncentrácia špecifickej protilátky je približne 1.0 µg/mL. V tomto produkte sa nespovorovala žiadna reaktivita na nešpecifické protilátky.

Protilátka CINtec p16 Histology je rekombinantná myšia monoklonálna protilátka purifikovaná zo supernatantu bunkovej kultúry.

V príslušnom metodickom liste k detekčnej súprave VENTANA nájdete podrobný opis nasledujúcich bodov: Princíp postupu, Materiál a metódy, Získavanie a príprava vzoriek na analýzu, Postupy kontroly kvality, Riešenie problémov, Interpretácia výsledkov a Obmedzenia.

POTREBNÉ MATERIÁLY, KTORÉ NIE SÚ SÚČASŤOU DODÁVKY

Farbiace reagentie, napr. detekčné súpravy VENTANA, a pomocné komponenty vrátane skličiek na negatívnu a pozitívnu kontrolu tkaniva nie sú súčasťou dodávky.

Nie všetky produkty uvedené v príbalovom letáku musia byť dostupné vo všetkých regiónoch. Obráťte sa na miestneho zástupcu podpory.

Nasledujúce reagentie a materiály môžu byť potrebné na farbenie, nie sú však súčasťou dodávky:

1. Odporúčané kontrolné tkanivo
2. Kladne nabité mikroskopické sklička
3. Negative Control (Monoclonal) (kat. č. 760-2014 / 05266670001)
4. OptiView DAB IHC Detection Kit (kat. č. 760-700 / 06396500001)
5. ultraView Universal DAB Detection Kit (kat. č. 760-500 / 05269806001)
6. Antibody Diluent (kat. č. 251-018 / 05261899001)

7. EZ Prep Concentrate (10X) (kat. č. 950-102 / 05279771001)
8. Reaction Buffer Concentrate (10X) (kat. č. 950-300 / 05353955001)
9. LCS (Predilute) (kat. č. 650-010 / 05264839001)
10. ULTRA LCS (Predilute) (kat. č. 650-210 / 05424534001)
11. Cell Conditioning Solution (CC1) (kat. č. 950-124 / 05279801001)
12. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (kat. č. 950-224 / 05424569001)
13. Hematoxylin II (kat. č. 790-2208 / 05277965001)
14. Bluing Reagent (kat. č. 760-2037 / 05266769001)
15. Permanentné montážne médium
16. Krycie sklíčko
17. Automat na krycie sklíčka
18. Univerzálne laboratórne vybavenie
19. Prístroj BenchMark IHC/ISH

SKLADOVANIE A STABILITA

Po prijatí a vtedy, keď sa nepoužíva, skladujte pri teplote 2 – 8 °C. Nezmrazujte.

Po každom použití je nutné opätovne nasadiť uzáver dávkovača a dávkovač hneď vložiť do chladničky vo zvislej polohe, aby ste zaistili správnu dodávku reagentie a stabilitu protilátky.

Každý dávkovač protilátky má dátum expirácie. Ak sa reagentia správne skladuje, zachováva si svoje vlastnosti až do dátumu uvedeného na štítku. Nepoužívajte reagentiu po dátume expirácie.

PRÍPRAVA VZORIEK

Bežne spracované FFPE tkanivá sú vhodné na použitie s touto primárnou protilátkou, ak sa použijú spolu s detekčnými súpravami VENTANA a prístrojmi BenchMark IHC/ISH.

Odporúčané činidlo na fixáciu tkaniva je 10 % neutrálny pufrovaný formalín.²⁹ Rezy majú byť približne 4 µm hrubé a položené na kladne nabitú sklíčku. Sklíčka sa majú farbiť okamžite, pretože antigénnosť narezaných tkanivových rezov sa môže časom znížiť. Požiadajte zástupcu spoločnosti Roche o kópiu dokumentu „Recommended Slide Storage and Handling“, v ktorom nájdete ďalšie informácie.

Odporúčame spracovať pozitívnu a negatívnu kontrolu súčasne s neznámymi vzorkami.

VAROVANIA A BEZPEČNOSTNÉ OPATRENIA

1. Určené na diagnostické použitie *in vitro* (IVD).
2. Určené len pre odborníkov.
3. Nepoužívajte po vykonaní stanoveného počtu testov.
4. Roztok ProClin 300 sa používa ako konzervačná látka v tejto reagentii. Táto látka je zaradená ako dráždivá látka a pri kontakte s kožou môže spôsobiť senzibilizáciu. Pri manipulácii dodržiavajte primerané bezpečnostné opatrenia. Zabráňte kontaktu reagentii s očami, kožou a so sliznicami. Používajte ochranný odev a rukavice.
5. Kladne nabitú sklíčku môžu byť citlivé na vplyvy okolitého prostredia, čo vedie k nevhodnému farbeniu. O ďalšie informácie o tom, ako používať tieto typy sklíčok, požiadajte zástupcu spoločnosti Roche.
6. S materiálmi ľudského alebo živočíšneho pôvodu je potrebné zaobchádzať ako s biologicky nebezpečným materiálom a ich likvidácia musí zahŕňať náležité bezpečnostné opatrenia. V prípade expozície je potrebné dodržiavať zdravotné pokyny zodpovedných orgánov.^{30,31}
7. Zabráňte kontaktu činidiel s očami a sliznicami. Ak sa činidlá dostanú do kontaktu s citlivými oblasťami, zmyte ich veľkým množstvom vody.
8. Zabráňte mikrobiálnej kontaminácii činidiel, pretože to môže spôsobiť nesprávne výsledky.
9. Ďalšie informácie o používaní tejto pomôcky nájdete v používateľskej príručke k prístroju BenchMark IHC/ISH a v návodoch na použitie všetkých potrebných komponentov na stránke navifyportal.roche.com.
10. Informácie o odporúčanom spôsobe likvidácie získate od miestnych a/alebo štátnych orgánov.
11. Označenie bezpečnosti produktov v prvom rade zodpovedá usmerneniu GHS EÚ. Na požiadanie možno profesionálnemu používateľovi poskytnúť kartu bezpečnostných údajov.
12. Pri hlásení podozrenia na závažné incidenty spojené s touto pomôckou kontaktujte miestneho zástupcu spoločnosti Roche a kompetentný orgán členského štátu alebo krajiny, v ktorej má používateľ sídlo.

Tento produkt obsahuje komponenty klasifikované v súlade s nariadením (ES) č. 1272/2008 takto:

Tabuľka 1. Informácie o nebezpečnosti.

Nebezpečnosť	Kód	Upozornenie
	H317	Môže vyvolať alergickú kožnú reakciu.
	H412	Škodlivé pre vodné organizmy s dlhodobými účinkami.
	P261	Zabráňte vdychovaniu hmyľ alebo pár.
	P273	Nevypúšťajte do prostredia.
	P280	Noste ochranné rukavice.
	P333 + P313	Ak sa prejaví podráždenie kože alebo sa vytvoria vyrážky: Vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť.
	P362 + P364	Kontaminovaný odev vyzlečte a pred ďalším použitím vyperte.
	P501	Zneškodnite obsah/nádobu v schválenom zariadení na likvidáciu odpadu.

Tento produkt obsahuje CAS č. 55965-84-9, reakčnú zmes: 5-chloro-2-metyl-2H-izotiazol-3-ónu a 2-metyl-2H-izotiazol-3-ónu (3:1).

POSTUP FARBENIA

Primárne protilátky VENTANA boli vyvinuté na použitie v prístrojoch BenchMark IHC/ISH v kombinácii s detekčnými súpravami VENTANA a príslušenstvom. Odporúčané protokoly farbenia uvádza Tabuľka 2 a Tabuľka 3 nižšie.

Táto protilátka je optimalizovaná na uvedené časy inkubácie, ale používateľ musí výsledky získané pomocou tejto reagentie overiť.

Parametre automatizovaných postupov sa môžu zobrazovať, tlačiť a editovať podľa postupu uvedeného v používateľskej príručke k prístroju. Podrobné informácie o postupoch farbenia v imunohistochemii nájdete v príslušnom metodickom liste k detekčnej súprave VENTANA.

Ďalšie podrobnosti o správnom použití tejto pomôcky nájdete v metodickom liste inline dávkovača spojenom s P/N 805-4713 alebo P/N 825-4713.

Tabuľka 2. Odporúčaný protokol farbenia pre protilátku CINtec p16 Histology s detekčnou súpravou *ultraView* Universal DAB Detection Kit v prístrojoch BenchMark IHC/ISH.

Typ postupu	Metóda		
	GX	XT	ULTRA alebo ULTRA PLUS
Odstránenie parafínu	Zvolené	Zvolené	Zvolené
Cell Conditioning (Odmaskovanie antigénu)	CC1, Štandard	CC1, Štandard	ULTRA CC1, 64 minút 95 °C
Protilátka (primárna)	24 minút, 37 °C	16 minút, 37 °C	20 minút, 36 °C
ultraBlock*	8 minút	Neuvádza sa	Neuvádza sa
Kontrastné farbivo	Hematoxylin II, 4 minúty		
Následné kontrastné farbivo	Bluing, 4 minúty		

* Použitie Antibody Diluent v kroku ultraBlock.

Tabuľka 3. Odporúčaný protokol farbenia pre protilátku CINtec p16 Histology s detekčnou súpravou OptiView DAB IHC Detection Kit v prístrojoch BenchMark IHC/ISH.

Typ postupu	Metóda		
	GX	XT	ULTRA alebo ULTRA PLUS
Odstránenie parafínu	Zvolené	Zvolené	Zvolené
Cell Conditioning (Odmaskovanie antigénu)	CC1, 32 minút	CC1, 48 minút	ULTRA CC1, 48 minút 100 °C
Inhibitor preprimárnej peroxidázy	Zvolené	Zvolené	Zvolené
Protilátka (primárna)	8 minút, 37 °C	8 minút, 37 °C	12 minút, 36 °C
Po fixácii*	8 minút	Neuvádza sa	Neuvádza sa
Kontrastné farbivo	Hematoxylin II, 4 minúty		
Následné kontrastné farbivo	Bluing, 4 minúty		

* Použitie Antibody Diluent v kroku po fixácii Post-Fixative.

Vzhľadom na variáciu vo fixácii a spracovaní tkaniva a všeobecné laboratórne prístroje a podmienky prostredia môže byť nutné zvýšiť alebo znížiť inkubáciu primárnych protilátok, úpravu buniek alebo predúpravu proteáz na základe individuálnych vzoriek, použitej detekcie a preferencii čitateľa. Ďalšie informácie o premenných fixácie uvádza „Immunohistochemistry Principles and Advances.“³²

NEGATÍVNA KONTROLNÁ REAGENCIA

Okrem farbenia pomocou protilátky CINtec p16 Histology je nutné farbiť druhé sklíčko príslušnou negatívnou kontrolou.

POZITÍVNA KONTROLA TKANIVA

Optimálna laboratórna prax má zahŕňať pozitívny kontrolný rez na tom istom sklíčku, ako je testované tkanivo. Táto prax pomáha identifikovať pochybenie pri nanášaní reagensii na sklíčko. Na kontrolu kvality je najvhodnejšie tkanivo so slabým pozitívnym farbením. Kontrolné tkanivo môže obsahovať pozitívne alebo negatívne sa farbiace prvky a môže slúžiť ako tkanivo na pozitívnu aj negatívnu kontrolu. Kontrolné tkanivo musí byť nová autopsia, biopsia alebo chirurgická vzorka pripravená či fixovaná čo najskôr rovnakým spôsobom ako testované rezy.

Známe pozitívne kontroly tkaniva sa majú používať len na sledovanie funkcie reagensii a prístrojov, nie ako pomôcka pri stanovení konkrétnej diagnózy testovacích vzoriek. Ak pozitívne kontrolné tkanivo nepreukáže pozitívne zafarbenie, výsledky testovacej vzorky treba považovať za neplatné.

Príklady pozitívnych kontrolných tkanív pre túto protilátku sú normálny pankreas, normálna mandľa a karcinóm krčka maternice.

V normálnom tkanive mandlí je nukleárne a/alebo cytoplazmatické farbenie rozptýlených skvamózných epitelálnych buniek primárne v kryptovom epiteli a rozptýlených folikulárných dendritických buniek v zárodočných centrách a absencia zafarbenia u väčšiny lymfocytov (možno pozorovať zafarbenie vzácnych lymfocytov).

INTERPRETÁCIA FARBenIA/OČAKÁVANÉ VÝSLEDKY

Vzor bunkového farbenia pre CINtec p16 Histology je nukleárny a/alebo cytoplazmatický.

Nadmerná expresia biomarkera p16^{INK4a} vo vzorkách na cervikálnu biopsiu je predstavovaná ako difúzne kontinuálne farbenie buniek bazálnych a parabazálnych bunkových vrstiev cervikálneho skvamózneho epitelu, s farbením alebo bez farbenia stredných alebo stredných až povrchových bunkových vrstiev. Tento súvislý, difúzny vzor farbenia predstavuje pozitívny stav CINtec p16 Histology. Fokálne farbenie predstavuje nespojité farbenie izolovaných buniek alebo zhlukov malých buniek, najmä nie bazálnych a parabazálnych buniek. Fokálne zafarbenie a žiadne zafarbenie p16 predstavujú negatívny stav CINtec p16 Histology. Vzor farbenia p16 a kritéria stavu CINtec p16 Histology sú uvedené v Tabuľka 4.

Tabuľka 4. Stav CINtec p16 Histology a vzory farbenia p16.

Stav CINtec p16 Histology	Vzor farbenia p16	Popis farbenia
Pozitívne	Difúzne	Kontinuálne farbenie buniek bazálnych a parabazálnych bunkových vrstiev skvamózneho cervikálneho epitelu, tiež so zafarbením stredných alebo stredných až povrchových bunkových vrstiev.
Negatívne	Ohniskové	Farbenie izolovaných buniek alebo zhlukov malých buniek; t. j. nepretržité farbenie, najmä nie bazálnych a parabazálnych buniek
	Č. p16 farbenie	Negatívna farbiaca reakcia v plochom epiteli

ŠPECIFICKÉ OBMEDZENIA

CINtec p16 Histology môže demonštrovať farbenie fibroblastov a stĺpcového epitelu v cervikálnych tkanivách, čo neinterferuje s interpretáciou.

Systém detekcie OptiView je všeobecne citlivejší než systém detekcie *ultra*View.

Používateľ musí validovať výsledky získané pomocou tejto reagensie a detekčných systémov.

Tkanivo pacienta by malo byť zafarbené do 24 týždňov od rezu z bloku tkaniva. Účinnosť farbenia pomocou CINtec p16 Histology na rezoch, ktoré boli skladované pri izbovej teplote dlhšie ako 24 týždňov, nebola overená.

Vzorky by mali byť fixované najmenej 1 hodinu v 10 % NBF, zinočnatom formalíne alebo Z-fixe, alebo najmenej 3 hodiny v AFA. Použitie iných časov fixácie alebo typov fixatívov, ako sú odporúčané, môže viesť k falošne negatívnym výsledkom. Pri tejto analýze sa neodporúča používať alkoholový formalín a fixatívy PREFER.

Všetky analýzy sa nemusia zaregistrovať na každom prístroji. Ak chcete získať ďalšie informácie, obráťte sa na miestneho zástupcu spoločnosti Roche.

CHARAKTERISTIKA VÝKONU

ANALYTICKÁ ÚČINNOSŤ

Vykonal sa testy zafarbenia na zistenie citlivosti, špecifickosti, presnosti a správnosti a výsledky sú uvedené nižšie.

Citlivosť a špecifickosť

Analytická citlivosť a špecifickosť sa stanovila zafarbením viacerých prípadov normálnych a neoplastických ľudských tkanív pomocou CINtec p16 Histology. Výsledky sú uvedené v Tabuľka 5 a Tabuľka 6. Mnoho normálnych tkanív preukázalo farbenie niekoľkých buniek alebo špecifických typov buniek, ako je uvedené. Očakáva sa to kvôli úlohe proteínu p16^{INK4a} v regulácii bunkového cyklu.

Tabuľka 5. Citlivosť/špecifickosť CINtec p16 Histology bola stanovená testovaním normálnych tkanív FFPE.

Tkanivo	Počet pozitívnych/všetkých prípadov	Pozitívne bunky v normálnom tkanive
Mozog	4/4	Bazálne bunky
Mozoček	3/3	Purkyňove bunky
Nadoblička	3/3	Adrenokortikálne epitelálne bunky
Vaječník	3/3	Stromálne bunky
Pankreas	3/3	Langerhansove ostrovcy, acinárne bunky

Tkanivo	Počet pozitívnych/všetkých prípadov	Pozitívne bunky v normálnom tkanive
Lymfatická uzlina	3/3	Lymfocyty, folikulárne dendritické bunky
Príštítne telesko	2/3	Hlavné bunky
Podmозgová žľaza	3/3	Epiteliálne bunky predného laloku hypofýzy
Semenník	3/3	Spermatogénne bunky, Leydigove bunky
Štítna žľaza	3/3	Folikulárne bunky
Prsník	3/3	Myoepiteliálne bunky, luminálne epiteliálne bunky, stromálne bunky
Slezina	3/3	Lymfocyty, folikulárne dendritické bunky
Mandľa	6/6	Skvamózne epiteliálne bunky, lymfocyty, folikulárne dendritické bunky
Týmus	3/3	Epitelové retikulárne bunky, lymfocyty, Hassalove teleska
Kostná dreň	2/3	Myeloidné bunky
Plúca	3/3	Pneumocyty, epiteliálne bunky bronchiálneho epitelu
Srdce	0/3	Žiadne pozitívne bunky
Pažerák	3/3	Skvamózne epiteliálne bunky
Žalúdok	3/3	Epiteliálne bunky, fundické žľazy
Tenké črevo	3/3	Epiteliálne bunky
Hrubé črevo	3/3	Epiteliálne bunky
Appendix	0/3	Žiadne pozitívne bunky
Pečeň	0/3	Žiadne pozitívne bunky
Slinná žľaza	3/3	Pruhované epitelové bunky, serózne acinárne bunky
Hltan, ústna dutina	2/3	Respiračné epiteliálne bunky, pruhované epitelové bunky, slizničné acinárne bunky, serózne acinárne bunky
Oblička	3/3	Tubulárne epiteliálne bunky, mezangiálne bunky glomeruli
Prostata	3/3	Acinárne bunky, bazálne bunky
Močový mechúr	3/3	Urotelové bunky
Endometrium	3/3	Endometriálne žľazové bunky, stromálne bunky
Krčok maternice ^a	1/120	Skvamózne epiteliálne bunky
Kostrový sval	0/3	Žiadne pozitívne bunky
Koža	0/3	Žiadne pozitívne bunky
Nerv	4/4	Schwannove bunky
Mezotel	0/3	Žiadne pozitívne bunky
Mäkké tkanivo	3/3	Endoteliálne bunky, fibroblasty, duktálne bunky

^a Medzi hodnotené tkanivá patrí normálny krčok maternice a chronická cervicitída. Prípady krčka maternice boli interpretované na základe algoritmu hodnotenia CINtec

Tkanivo	Počet pozitívnych/všetkých prípadov	Pozitívne bunky v normálnom tkanive
---------	-------------------------------------	-------------------------------------

Histology, ktorý počíta normálne skvamózne (fokálne zafarbenie), endocervikálne alebo stromálne zafarbenie buniek ako negatívne.

Tabuľka 6. Citlivosť/specificita CINtec p16 Histology bola stanovená pomocou testovania rôznych FFPE neoplastických tkanív.

Patológia	Počet pozitívnych/všetkých prípadov
Glioblastóm (mozog)	1/1
Meningeóm (mozog)	1/1
Ependymóm (mozoček)	1/1
Oligodendroglióm (mozoček)	1/1
Adenokarcinóm (hlava a krk)	1/1
Karcinóm skvamóznych buniek (hlava a krk)	0/1
Serózný karcinóm (vaječník)	1/1
Nádor granulóznych buniek (vaječník)	1/1
Teratóm (vaječník)	1/1
Pankreatická neuroendokrinná neoplázia (pankreas)	1/1
Duktálny adenokarcinóm (pankreas)	1/1
Seminóm (semenník)	1/1
Embryonálny karcinóm (semenník)	1/1
Folikulárny karcinóm (štítna žľaza)	1/1
Papilárny karcinóm (štítna žľaza)	0/1
Duktálny karcinóm in situ (prsník)	1/1
Invazívny duktálny karcinóm (prsník)	1/1
Invazívny lobulárny karcinóm (prsník)	1/1
Adenóm (nadoblička)	1/1
Feochromocytóm (nadoblička)	1/1
Difúzný veľkobunkový B-lymfóm (slezina)	0/1
Pleomorfný adenóm (slinná žľaza)	1/1
Warthinov tumor (slinná žľaza)	1/1
Malobunkový karcinóm (plúca)	1/1
Karcinóm skvamóznych buniek (plúca)	0/1
Adenokarcinóm (plúca)	1/1
Karcinóm skvamóznych buniek (pažerák)	0/1
Adenokarcinóm (pažerák)	1/1
Adenokarcinóm (žalúdok)	1/1
Gastrointestinálny stromálny tumor (žalúdok)	1/1
Adenokarcinóm (tenké črevo)	0/1
Gastrointestinálny stromálny tumor (tenké črevo)	1/1
Adenokarcinóm (hrubé črevo)	1/1
Adenoskvamózny karcinóm (hrubé črevo)	1/1
Karcinoidný nádor (appendix)	1/1

Patológia	Počet pozitívnych/všetkých prípadov
Hepatocelulárny karcinóm (pečeň)	1/1
Cholangiokarcinóm (pečeň)	0/1
Karcinóm renálnych buniek (oblička)	1/2
Papilárny renálny adenóm (oblička)	1/1
Adenokarcinóm (prostata)	2/2
Jasnobunkový karcinóm (maternica)	1/1
Endometrioidný karcinóm (maternica)	1/1
Leiomyóm (maternica)	0/1
Leiomyosarkóm (maternica)	1/1
Cervikálna intraepiteliálna neoplázia I (CIN I) (krčok maternice)	12/37
CIN I-II, hraničný nízky vs. vysoký stupeň (krčok maternice)	2/8
CIN II (krčok maternice)	52/60
CIN II-III, vysoký stupeň (krčok maternice)	1/3
CIN III (krčok maternice)	65/67
Karcinóm skvamózných buniek (krčok maternice)	73/76
Adenoskvamózny karcinóm (krčok maternice)	2/2
Adenokarcinóm (krčok maternice)	1/1
Neuroendokrinný karcinóm (krčok maternice)	1/1
Alveolárny rabdomyosarkóm (sval)	0/1
Myxóm (sval)	1/1
Karcinóm z bazálnych buniek (koža)	1/1
Invazívny melanóm (koža)	1/1
Karcinóm skvamózných buniek (koža)	0/1
Schwannóm (periférny nerv)	1/1
Neurofibrosarkóm (nerv)	1/1
Anaplastický veľkobunkový lymfóm (lymfatická uzlina)	1/1
Folikulárny lymfóm (lymfatická uzlina)	1/1
Hodgkinov lymfóm (lymfatická uzlina)	1/1
Urotelový karcinóm (močový mechúr)	1/1
Karcinóm skvamózných buniek (močový mechúr)	0/1
Plazmocytóm (extramedulárny)	1/1
Mezotelióm (mezotel)	1/1
Pleurálny solitárny vláknitý nádor (Mezotel)	1/1
Angiosarkóm (mäkké tkanivo)	1/1
Liposarkóm (mäkké tkanivo)	1/1

Presnosť medzi prístrojmi

Boli vykonané dve štúdie na posúdenie presnosti prístroja. Jedna štúdia bola uskutočnená na prístroji BenchMark XT a prístroji BenchMark ULTRA za použitia detekčnej súpravy *ultraView* Universal DAB Detection Kit, a druhá štúdia bola uskutočnená na prístroji BenchMark ULTRA s detekčnou súpravou *OptiView* DAB IHC Detection Kit.

V prvej štúdii sa rezy z dvoch viackanivových blokov obsahujúcich karcinóm skvamózných buniek krčka maternice, mandlu a pankreasu farbili na troch prístrojoch BenchMark XT a troch prístrojoch BenchMark ULTRA s detekčnou súpravou *ultraView* Universal DAB Detection Kit (5 rezov z každého viackanivového bloku na každý prístroj). Intenzita farbenia p16 bola v rozmedzí 0.5 bodu od stredného skóre u 100 % všetkých tkanív pri farbení v troch prístrojoch BenchMark XT. Intenzita farbenia p16 bola v rozmedzí 0.5 bodu od stredného skóre u 100 % karcinómu skvamózných buniek krčka maternice (15/15), 93 % mandlí (14/15) a 93 % pankreasu (14/15) pri farbení v troch prístrojoch BenchMark ULTRA. Všetky tkanivá farbené pomocou CINtec p16 Histology mali prijateľné farbenie pozadia.

V druhej štúdii sa presnosť testu CINtec p16 Histology stanovila na troch prístrojoch BenchMark ULTRA pomocou farbenia replík skličiek v 28 prípadoch krčka maternice (osem u normálneho krčka maternice, šesť CIN1, šesť CIN2, štyri CIN3 a štyri prípady karcinómu krčka maternice) pomocou detekčnej súpravy *OptiView* DAB IHC Detection Kit. Každý prípad bol farbený na každom z troch prístrojov BenchMark ULTRA s každou z troch šarží CINtec p16 Histology. Celkovo bolo do štúdie zahrnutých deväť skličiek zafarbených pomocou CINtec p16 Histology (tri šarže CINtec p16 Histology, tri prístroje BenchMark ULTRA). Každé skličko zafarbené pomocou CINtec p16 Histology potom spárovalo so skličkom zafarbeným H&E z rovnakého prípadu. Všetky podložné sklička boli randomizované a potom vyhodnotené jedným patológom zaslepeným voči diagnóze prípadu na intenzitu zafarbenia p16, pozitívny alebo negatívny stav CINtec p16 Histology a pozadie. Údaje ukázali, že 97.6 % tkanív malo skóre intenzity farbenia v rozmedzí 0.5 bodu pri všetkých nástrojoch. Okrem toho 100 % rezov farbených pomocou CINtec p16 Histology v troch prístrojoch BenchMark ULTRA preukázalo rovnaký stav CINtec p16 Histology. Všetky tkanivá farbené pomocou CINtec p16 Histology mali prijateľné farbenie pozadia.

Okrem toho, stredná presnosť medzi prístrojmi bola určená v troch prístrojoch BenchMark ULTRA PLUS farbením dvoch kópií skličiek 24 prípadov tkaniva krčka maternice (jedenásť prípadov normálneho krčka maternice, jeden CIN1, dva prípady CIN2, sedem CIN3 a tri prípady karcinómu skvamózných buniek). Testovacie sklička boli randomizované a následne vyhodnotené jedným patológom zaslepeným voči diagnóze prípadu z hľadiska pozitívneho alebo negatívneho stavu CINtec p16 Histology, morfológie a nešpecifického farbenia (pozadia). Percento celkovej zhody bolo 99.3 %. Všetky tkanivá farbené pomocou CINtec p16 Histology mali 100 % prijateľnú morfológiu a farbenie pozadia.

Presnosť medzi šaržami

Presnosť medzi šaržami CINtec p16 Histology sa hodnotila testovaním troch šarží CINtec p16 Histology na prístroji BenchMark ULTRA pomocou detekčnej súpravy *OptiView* DAB IHC Detection Kit. Rezy z každej z 26 vzoriek tkaniva z cervikálnej biopsie (šesť normálnych krčkov maternice, šesť CIN1, šesť CIN2, šesť CIN3 a dva prípady karcinómu krčka maternice) boli farbené duplicitne s použitím každej šarže CINtec p16 Histology. Každé tkanivové skličko farbené pomocou CINtec p16 Histology sa spárovalo so susedným skličkom H&E a negatívnym kontrolným skličkom s reagensiou z toho istého prípadu. Súbor skličiek boli randomizované a vyhodnotil ich jeden patológ, ktorý nepoznal diagnózu prípadov a číslo šarže protilátky. Stav CINtec p16 Histology (pozitívne = difúzne farbenie p16, negatívne = fokálne alebo žiadne farbenie p16) bol stanovený na základe sklička CINtec p16 Histology. Kategórie CIN [CIN2+ (CIN2, CIN3, adenokarcinóm in situ alebo invazívny karcinóm kombinovaný do jednej kategórie)/CIN1- (žiadne CIN alebo CIN1 kombinované do jednej kategórie)] boli stanovené na základe doplnkovej interpretácie H&E a skličiek CINtec p16 Histology. Výsledky dokazujú reprodukovateľnosť CINtec p16 Histology v troch výrobných šaržiach protilátky. Všetky prípady vykazovali 100 % pozitívnu a negatívnu zhodu pre stav CINtec p16 Histology a 98.7 % zhodu pre kategóriu CIN v rámci troch výrobných šarží. Súhrn údajov je uvedený v Tabuľka 7. Farbenie pozadia bolo prijateľné v 100 % farbených tkanív.

Tabuľka 7. Reprodukovateľnosť medzi šaržami primárnych protilátok CINtec p16 Histology na vzorkách krčka maternice, meraná pomocou stavu CINtec p16 Histology (pozitívny/negatívny) a kategórie CIN (CIN2+/CIN1-).

Reprodukovateľnosť	Vyhodnotenie	Priemerná pozitívna zhoda (n/N)	Priemerná negatívna zhoda (n/N)	Percento celkovej zhody (n/N)
Medzi šaržami	Histológia CINtec Stav	100.0 % (352/352)	100.0 % (264/264)	100.0 % (308/308)
	Kategória CIN	98.1 % (314/320)	98.0 % (290/296)	98.1 % (302/308)

V rámci dennej opakovateľnosti a každodennej presnosti

Celkovo sa uskutočnili tri štúdie, ktoré hodnotili opakovateľnosť a presnosť na dennej báze. V prvých dvoch štúdiách patológ hodnotil tkanivá na základe intenzity farbenia p16 (0 – 4) zatiaľ čo v tretej štúdii sa hodnotil stav CINtec p16 Histology (pozitívny/negatívny) v cervikálnych biopsiách.

V prvej štúdii sa rezy z dvoch viackanivových blokov obsahujúcich tri tkanivá (karcinóm skvamóznych buniek krčka maternice, mandla, pankreas) farbili na prístroji BenchMark XT pomocou súpravy *ultraView* Universal DAB Detection Kit. V druhej štúdii sa dva viackanivové bloky obsahujúce mandlu, pankreas a tri prípady krčka maternice (invazívny karcinóm skvamóznych buniek, CIN1-, CIN2+) farbili na prístroji BenchMark ULTRA pomocou súpravy OptiView DAB IHC Detection Kit. Opakovateľnosť CINtec p16 Histology v rámci dňa sa testovala farbením 14 opakovaných rezov z každého viackanivového bloku pomocou CINtec p16 Histology. CINtec p16 Histology prešiel kritériami prijateľnosti so 100 % farbením tkanív v rozmedzí 0.5 bodu od priemerného skóre intenzity farbenia v oboch štúdiách. Presnosť medzi dňami bola testovaná počas 5 po sebe nenasledujúcich dní v trvaní minimálne 20 dní. V oboch štúdiách CINtec p16 Histology prešlo kritériami prijateľnosti so 100 % farbením tkanív v rozmedzí 0.5 bodu od stredného skóre intenzity farbenia pre opakovateľnosť v rámci dňa a presnosť medzi dňami. Všetky tkanivá farbené pomocou CINtec p16 Histology mali prijateľné pozadia.

Tretia štúdia hodnotila 24 vzoriek cervikálneho tkaniva (tri cervikálne karcinómy skvamóznych buniek, šesť CIN3, šesť CIN2, šesť CIN1, tri normálne prípady krčka maternice) podľa stavu CINtec p16 Histology (pozitívny/negatívny) na jednom prístroji BenchMark ULTRA s detekčnou súpravou OptiView DAB IHC Detection Kit. Testovanie prebiehalo počas 5 po sebe nenasledujúcich dní v trvaní minimálne 20 dní. V každý testovací deň boli dve sklička z každého prípadu zafarbené pomocou CINtec p16 Histology (celkom 150 sklíčok) a jedno skličko z každého prípadu bolo zafarbené negatívnou kontrolou reagenta (celkom 75 sklíčok). Pre analýzu opakovateľnosti v priebehu dňa bol porovnaný stav CINtec p16 Histology (pozitívny / negatívny) medzi dvoma hodnotiteľmi podložnými skličkami z rovnakého prípadu zafarbenými v ten istý deň. Pretože v tejto štúdii sa uvažovalo o 5 dňoch, celkový počet porovnaní pre každý prípad s opakovateľnosťou v priebehu dňa bol 5. Celkový počet porovnaní pre každodennú štúdiu presnosti bol 120 = 24 prípadov x 5 porovnaní na prípad.

Výsledky naznačili 100 % opakovateľnosť v rámci dňa a 100 % presnosť medzi dňami, keď sa tkanivá hodnotili na základe stavu CINtec p16 Histology. Všetky rezy farbené pomocou CINtec p16 Histology mali prijateľné farbenie pozadia.

Navyše, opakovateľnosť v rámci cyklu bola určená farbením 5 sklíčok, z ktorých každé bolo z 24 prípadov tkaniva krčka maternice (jedenásť prípadov normálneho krčka maternice, jeden CIN1, dva prípady CIN2, sedem CIN3 a tri prípady karcinómu skvamóznych buniek) v prístroji BenchMark ULTRA PLUS. Testovacie sklička boli randomizované a následne vyhodnotené jedným patológom zaslepeným voči diagnóze prípadu z hľadiska pozitívneho alebo negatívneho stavu CINtec p16 Histology, morfológie a nešpecifického farbenia (pozadia). Percento celkovej zhody bolo 97.5 %. Všetky tkanivá farbené pomocou CINtec p16 Histology mali 100 % prijateľnú morfológiu a farbenie pozadia.

Navyše, stredná presnosť medzi dňami bola určená farbením duplikátov sklíčok 24 prípadov tkaniva krčka maternice (jedenásť prípadov normálneho krčka maternice, jeden CIN1, dva prípady CIN2, sedem CIN3 a tri prípady karcinómu skvamóznych buniek) v prístroji BenchMark ULTRA PLUS v 5 po sebe nenasledujúcich dňoch v priebehu najmenej 20-dňového obdobia. Stredná presnosť medzi dňami bola 98.8 %. Všetky

tkanivá farbené pomocou CINtec p16 Histology mali 100 % prijateľnú morfológiu a farbenie pozadia.

Presnosť medzi platformami a detekčnej súpravy

Presnosť analýzy bola demonštrovaná na platformách BenchMark ULTRA, BenchMark XT a BenchMark GX, pomocou detekčnej súpravy OptiView DAB IHC Detection Kit a detekčnej súpravy *ultraView* Universal DAB Detection Kit. Celkovo sa pomocou CINtec p16 Histology farbilo 186 prípadov krčka maternice a hodnotil sa stav CINtec p16 Histology (pozitívny/negatívny) a pozadie (prijateľné/neprijateľné). OPA bol 98.3 – 100 % pre každú párovú kombináciu platformiem v detekčnej súprave a každú párovú kombináciu detekčných súprav v rámci platformy. Všetky hodnotiteľné prípady farbené CINtec p16 Histology mali prijateľné farbenie pozadia.

Navyše, vykonala sa štúdia porovnania výkonu farbenia CINtec p16 Histology pomocou detekčnej súpravy OptiView DAB IHC Detection Kitv prístroji BenchMark ULTRA PLUS v porovnaní s prístrojom BenchMark ULTRA. Farbilo sa stodvadsať (120) prípadov cervikálneho tkaniva (60 pozitívnych pre CINtec p16 Histology a 60 negatívnych pre CINtec p16 Histology) a farbené sklička zhodnotil patológ, ktorý určil stav CINtec p16 Histology. Percento celkovej zhody bolo 99.1 %. Všetky tkanivá farbené pomocou CINtec p16 Histology mali 100 % prijateľnú morfológiu a farbenie pozadia.

Presnosť v rámci čitateľa a medzi čitateľmi

Presnosť v rámci čitateľa a medzi čitateľmi sa hodnotila na 50 prípadoch krčka maternice (16 prípadov normálneho krčka maternice, 12 CIN1, 12 CIN2, 6 CIN3, a 4 prípady rakoviny krčka maternice) zafarbených pomocou CINtec p16 Histology na prístroji BenchMark ULTRA s detekčnou súpravou OptiView DAB IHC Detection Kit.

Všetky sklička boli randomizované a následne vyhodnotené tromi patológmi z hľadiska pozitívneho/negatívneho stavu CINtec p16 Histology. Patológovia boli zaslepení voči diagnóze prípadu. Sklička zafarbené pomocou CINtec p16 Histology boli znovu randomizované na druhé vyhodnotenie stavu CINtec p16 Histology každým z troch patológov po štvrtýždňovom vymývacom období. Percento celkovej zhody pre presnosť v rámci čitateľa aj medzi čitateľmi pre stav CINtec p16 Histology bola 98.7 %, ako je uvedené v Tabuľka 8.

V štúdiu presnosti v rámci čitateľa a medzi čitateľmi pre kategóriu CIN bolo každé skličko CINtec p16 Histology spárované so sklíčkom farbeným H&E z rovnakého prípadu a spárované súpravy sklíčok boli randomizované. Kategóriu CIN (CIN2+/CIN1-) hodnotili traja patológovia na základe doplnkovej interpretácie sklíčok farbených pomocou H&E a CINtec p16 Histology. Po minimálne 4-týždňovom vymývacom období sa dvojice sklíčok opätovne randomizovali a každý z troch patológov vykonal druhé hodnotenie kategórie CIN. Údaje uvedené v Tabuľka 8 ukazujú, že percento celkovej zhody pre presnosť v rámci čitateľa a medzi čitateľmi pre kategóriu CIN bola 98.0 %, respektive 90 %.

Tabuľka 8. Presnosť analýzy CINtec p16 Histology na vzorkách krčka maternice v rámci čitateľa a medzi čitateľmi meraná podľa stavu CINtec p16 Histology (pozitívny/negatívny) a kategórie CIN (CIN2+/CIN1-).

Presnosť čitateľa	Vyhodnotenie	Priemerná pozitívna zhoda (95 % CI)	Priemerná negatívna zhoda (95 % CI)	Percento celkovej zhody (95 % CI)
Jeden čitateľ	Stav CINtec p16 Histology	98.7 % (93.9 – 100.0 %)	98.6 % (93.0 – 100.0 %)	98.7 % (94.0 – 100.0 %)
	Kategória CIN	97.4 % (89.1 – 100.0 %)	98.4 % (92.6 – 100.0 %)	98.0 % (92.0 – 100.0 %)
Medzi čitateľmi	Stav CINtec p16 Histology	98.7 % (93.1 – 100.0 %)	98.6 % (92.3 – 100.0 %)	98.7 % (93.9 – 100.0 %)
	Kategória CIN	87.0 % (71.8 – 97.6 %)	91.9 % (83.0 – 98.5 %)	90.0 % (80.0 – 98.0 %)

Štúdia reprodukovateľnosti (štúdia presnosti medzi laboratóriami)

Bola dokončená medzilaboratórna štúdia reprodukovateľnosti pre CINtec p16 Histology, aby sa preukázala reprodukovateľnosť analýzy pri určovaní stavu CINtec p16 Histology a

kategórie CIN pomocou 27 prípadov krčka maternice (10 bez CIN, 5 CIN1, 5 CIN2, 5 CIN3, a 2 prípady karcinómu krčka maternice) prebiehajúce cez tri prístroje BenchMark ULTRA iv každý z troch po sebe nenasledujúcich dní v troch externých laboratóriách. Vzorky boli randomizované a hodnotené celkovo šiestimi patológmi (dva patológovia/pracovisko) na základe statusu CINtec p16 Histology (pozitívny/negatívny) a kategórie CIN (CIN2+/CIN1-) na základe prídavnej interpretácie sklíčok farbených H&E a sklíčok farbených CINtec p16 Histology. Patológovia boli zaslepení voči diagnóze prípadu. Výsledky stavu CINtec p16 Histology a kategórie CIN sú uvedené v Tabuľka 9 a Tabuľka 10. Okrem toho bola miera prijateľnosti morfológie a farbenia pozadia pre všetkých šiestich patológov na všetkých pracoviskách 96.3 %, respektíve 97.1 %. Údaje naznačujú vynikajúcu zhodu v reprodukovateľnosti analýzy na rôznych pracoviskách, v rôzne dni a u rôznych patológov.

Tabuľka 9. Reprodukovateľnosť medzi laboratóriami: zhoda na stave CINtec p16 Histology (pozitívny/negatívny) vzoriek krčka maternice.

Miery zhody pre Reprodukovateľnosť medzi laboratóriami (Stav CINtec p16 Histology)	Priemerná pozitívna zhoda	Priemerná negatívna zhoda	Percento celkovej zhody
Medzi pracoviskami (3 pracoviská)	96.2 % (91.2 – 99.3 %)	93.9 % (86.3 – 99.0 %)	95.3 % (90.6 – 99.2 %)
Medzi dňami (3 po sebe nenasledujúce dni)	98.2 % (95.9 – 99.7 %)	97.1 % (93.3 – 99.5 %)	97.8 % (95.5 – 99.5 %)
Medzi čitateľmi (2 patológovia/pracovisko)	95.5 % (87.8 – 100.0 %)	92.9 % (82.6 – 100.0 %)	94.4 % (87.1 – 100.0 %)

Tabuľka 10. Reprodukovateľnosť medzi laboratóriami: zhoda pre kategóriu CIN (CIN2+/CIN1-) vzoriek krčka maternice na základe doplnkovej interpretácie sklíčok farbených H&E a CINtec p16 Histology.

Miery zhody pre Reprodukovateľnosť medzi laboratóriami (Kategória CIN)	Priemerná pozitívna zhoda	Priemerná negatívna zhoda	Percento celkovej zhody
Medzi pracoviskami (3 pracoviská)	94.4 % (86.8 – 98.8 %)	94.1 % (86.7 – 98.6 %)	94.3 % (88.5 – 98.6 %)
Medzi dňami (3 po sebe nenasledujúce dni)	96.9 % (93.1 – 99.2 %)	96.6 % (93.0 – 99.1 %)	96.8 % (94.0 – 99.1 %)
Medzi čitateľmi (2 patológovia/pracovisko)	95.0 % (87.4 – 98.9 %)	94.8 % (88.6 – 98.9 %)	94.9 % (89.3 – 98.7 %)

KLINICKÁ ÚČINNOSŤ

Diagnostická zhoda

Štúdia CERvical Tissue Adjunctive aNalysis (CERTAIN) bola vykonaná s cieľom preukázať, že doplnkové čítanie výsledkov CINtec p16 Histology vedie k zlepšeniu konzistencie diagnostiky cervikálnej intraepiteliálnej neoplázie (CIN), úrovne zhody medzi odčítaniami Community Pathologists (CP) a Expert Pathologists (XP) tkaniva z punkčnej biopsie krčka maternice.

Klinická štúdia CERTAIN sa vykonala na 1100 retrospektívne odobratých vzorkách FFPE cervikálnej punkčnej biopsie, ktoré predstavujú populáciu odporúčanú na kolposkopiu. Referenčná diagnóza odvodená od XP bola stanovená pre každý prípad štúdie len s použitím sklíčok farbených H&E a za použitia sklíčok farbených H&E a CINtec p16 Histology. Dva XP stanovili svoje nezávislé diagnózy (žiadny CIN, CIN1, CIN2, CIN3, adenokarcinóm in situ alebo invazívny karcinóm) na základe sklíčok sfarbených H&E pre

každý z 1100 prípadov. Patológom boli tiež poskytnuté nasledujúce klinické informácie: vek pacienta, výsledok cytologického vyšetrenia a výsledok testu HPV (ak boli k dispozícii). Diskordantné prípady boli vyhodnotené o tretinu XP. Prípady, pre ktoré sa nedosiahla diagnóza dvoch z troch väčšiny, boli preskúmané počas hodnotiaceho stretnutia, ktoré obsahovalo všetky tri XP. Väčšina (alebo konsenzus) výsledkov stanovila referenčnú diagnostiku odvodenú od odborníkov pre každý prípad hodnotený v štúdiu (nazývaný XP1 alebo referenčná diagnóza H&E). Po minimálne štvrtýždňovom vymývanom období vyhodnotili rovnaké XP sklíčka farbené H&E aj CINtec p16 Histology na stanovenie diagnózy: žiadny CIN, LSIL-histológia/CIN1, HSIL-histológia/CIN2, HSIL-histológia/CIN3, adenokarcinóm in situ alebo invazívny karcinóm, (nazývané XP2 alebo H&E + referenčná diagnóza CINtec p16 Histology). Postup stanovenia väčšinových diagnóz bol rovnaký ako pri stanovení referenčnej diagnózy len na sklíčkach farbených H&E. Na štúdiu sa zúčastnilo sedemdesiat (70) radou certifikovaných patológov z celých Spojených štátov. V prvom kole (1. kolo, CP1) bolo 1100 prípadov sfarbených H&E rozdelených do štyroch čítacích súborov s 275 prípadmi s porovnateľným rozdelením jednotlivých diagnostických kategórií na referenčnú diagnózu. 70 certifikovaných patológov bolo rozdelených do štyroch skupín pozostávajúcich buď zo 17 alebo 18 patológov na skupinu. Pre každý prípad v rámci im pridelenej súpravy na odčítanie boli patológom poskytnuté nasledujúce klinické informácie: vek pacienta, výsledok cytologického vyšetrenia a výsledok testu HPV (ak boli k dispozícii). Dva patológovia stanovili svoje nezávislé diagnózy na sklíčku farbenom H&E pre každý z pridelených prípadov: žiadny CIN; CIN1; CIN2; CIN3; adenokarcinóm in situ alebo invazívny karcinóm. Každý prípad štúdie individuálne čítalo 17 alebo 18 všeobecných patológov.

V druhom kole (2. kolo, CP2) patológovia odčítali sklíčka farbené H&E spolu so spárovanými zodpovedajúcimi sklíčkami farbenými CINtec p16 Histology pre rovnaký súbor prípadov v rámci ich priradenej čítacej sady. Po najmenej 4-týždňovom období vymývania medzi 1. a 2. kolom každý patológ nezávisle stanovil svoje diagnózy: žiadny CIN, LSIL-histológia/CIN1, HSIL-histológia/CIN2, HSIL-histológia/CIN3, adenokarcinóm in situ alebo invazívny karcinóm. CP zaznamenali stav CINtec p16 Histology (CINtec p16 Histology pozitívne = difúzne farbenie p16; CINtec p16 Histology negatívne = fokálne alebo žiadne farbenie p16) spolu s ich histologickou diagnózou s použitím sklíčka farbeného H&E aj sklíčka farbeného CINtec p16 Histology. Primárnym cieľom tejto štúdie bolo preukázať zlepšenie diagnostickej zhody bez toho, aby bolo ohrozené percento pozitívnej zhody, t. j. pravdepodobnosti, že pozitívny výsledok testu bude súhlasiť s diagnózou $\geq$ CIN2 (CIN2, CIN3, adenokarcinóm in situ, alebo invazívny karcinóm skombinované do jednej kategórie) alebo $\leq$ CIN1 (žiadny CIN alebo CIN1 skombinované do jednej kategórie) na základe sklíčok farbených H&E (1. kolo) v porovnaní s interpretáciou sklíčok farbených H&E spolu so sklíčkami farbenými CINtec p16 Histology (2. kolo).

Zlepšenie diagnostickej presnosti odborných patológov

Zlepšenie diagnostickej presnosti odborných patológov sa určilo porovnaním referenčnej diagnózy odborného patológa H&E (XP1) s odborným patológom H&E a referenčnou diagnózou CINtec p16 Histology (XP2). Analýza sa vykonala na základe interpretácie všetkých 1100 cervikálnych biopsií. Zlepšenie diagnostickej presnosti medzi referenčnou diagnózou H&E odbornými patológmi a referenčnou diagnózou H&E a referenčnou diagnózou CINtec p16 Histology odbornými patológmi je uvedené v Tabuľka 11. Pri použití H&E a CINtec p16 Histology v diagnostickej interpretácii cervikálnych biopsií identifikovali XP o 23.7 % viac prípadov $\geq$ CIN2 v porovnaní s diagnostickou interpretáciou pomocou samotného H&E.

Tabuľka 11. Zhoda medzi referenčnou diagnózou H&E a referenčnou diagnózou H&E a CINtec p16 Histology pre všetky prípady.

		Referenčná diagnóza H&E					Spolu
		Žiadne CIN	CIN1	CIN2	CIN3	ACIS* alebo rakovina	
Referenčná diagnóza H&E + CINtec p16 Histology	Žiadne CIN	693	13	4	0	0	710
	LSIL-histológia	46	120	4	1	0	171
	HSIL-histológia	30	31	83	69	1	214

	ACIS* alebo rakovina	0	0	0	0	5	5
Spolu		769	164	91	70	6	1100

* ACIS: adenokarcinóm in situ

Interpretácia všeobecného patológa pomocou H&E verzus H&E a CINtec p16 Histology v porovnaní s referenčnou diagnózou H&E odvodenou od odborníkov

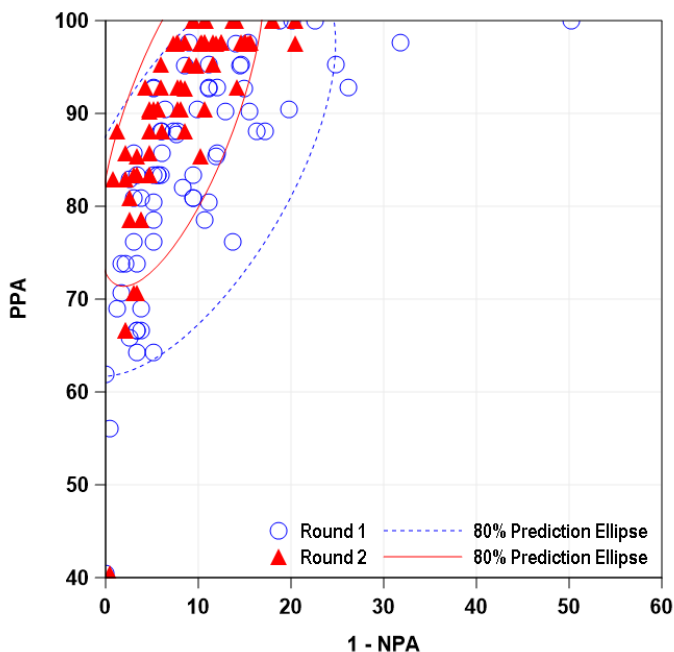
Diagnostická zhoda medzi všeobecnými patológmi bola stanovená porovnaním výsledkov všeobecných patológov 1. kola diagnóz H&E (CP1) s referenčnou diagnózou H&E odborného patológa (XP1), a porovnaním všeobecného patológa v 2. kole diagnóz H&E + CINtec p16 Histology (CP2) s referenčnou diagnózou H&E odborného patológa (XP1). Miery zhody a intervaly spoľahlivosti (CI) spriemerované pre prípad a čitateľa sú uvedené v Tabuľka 12. Bolo pozorované štatisticky významné zvýšenie PPA, miera detekcie lézií $\geq$ CIN2 (+6.8 % s 95 % CI: 4.7 % to 9.0 %). Navyše percento negatívnej zhody (NPA) pre detekciu $\leq$ CIN1 sa zvýšilo o 1.3 % pri 95 % CI: 0.5 % to 2.3 %.

Tabuľka 12. Miera pozitívnej a negatívnej zhody všeobecných patológov sa odčítala zo sklíčok farbených H&E oproti sklíčkam farbeným H&E a sklíčkam farbeným CINtec p16 Histology s referenčnou diagnózou H&E odvodenou od odborníkov (XP1).

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

Poznámka: Rozdiel sa nerovná 1.4 % z dôvodu chyby zaokrúhľovania: H&E = 90.44 %, H&E + CINtec Histology = 91.76 %, Rozdiel = 1.32 %.

Súhrnný diagram diagnostickej presnosti jednotlivých čitateľov – všeobecných patológov na diagnostiku $\geq$ CIN2 verzus $\leq$ CIN1 pomocou sklíčok farbených len H&E verzus sklíčok farbených H&E spolu s CINtec p16 Histology v porovnaní s referenčnou diagnózou H&E odvodenou od odborníkov je zobrazený na Obrázok 2. Je zobrazené PPA a NPA (percento negatívnej zhody, t. j. zhoda negatívneho výsledku testu s $\leq$ CIN1 prostredníctvom XP1) interpretácie každým patológom pre 1. kolo (len preparáty farbené H&E – modré kruhy) v porovnaní s 2. kolom (sklíčka farbené H&E spolu so sklíčkami farbenými CINtec p16 Histology – červené trojuholníky). Elipsy predikcie signalizujú rozsah výkonu PPA a NPA očakávaný u väčšiny patológov: 80 % by malo spadať medzi elipsy a 20 % by malo spadať mimo elipsy. Tieto dáta ukazujú, že interpretácia cervikálnych biopsií pomocou H&E spolu so sklíčkami farbenými CINtec p16 Histology zlepšuje diagnostickú zhodu a znižuje variabilitu medzi čitateľmi.



Obrázok 2. Súhrnný diagram diagnostickej zhody (PPA verzus 1-NPA) všeobecných patológov na diagnostikovanie $\geq$ CIN2 verzus $\leq$ CIN1 za použitia iba H&E (1. kolo) a použitia H&E + CINtec p16 Histology (2. kolo) v porovnaní s referenčnou diagnózou H&E odvodenou od odborníkov (XP1) (80 % elipsy predikcie generované za predpokladu dvojrozmernej normality).

Interpretácia všeobecného patológa pomocou H&E verzus H&E a CINtec p16 Histology v porovnaní s referenčnou diagnózou H&E + CINtec p16 Histology odvodenou od odborníkov

Ďalej boli výsledky čítania všeobecných patológov používajúcich obidve metódy (H&E + CINtec p16 Histology verzus iba H&E) porovnané s referenčnou diagnózou (XP2) stanovenou odbornými gynekopatológmi pomocou sklíčok zafarbených H&E a CINtec p16 Histology. Odborní patológovia boli zaslepení voči výsledkom ich prvého individuálneho čítania a konsenzuálnej referenčnej diagnózy H&E. Proces stanovenia konsenzuálnych diagnóz bol rovnaký proces stanovenia referenčnej diagnózy H&E, ako je popísané vyššie.

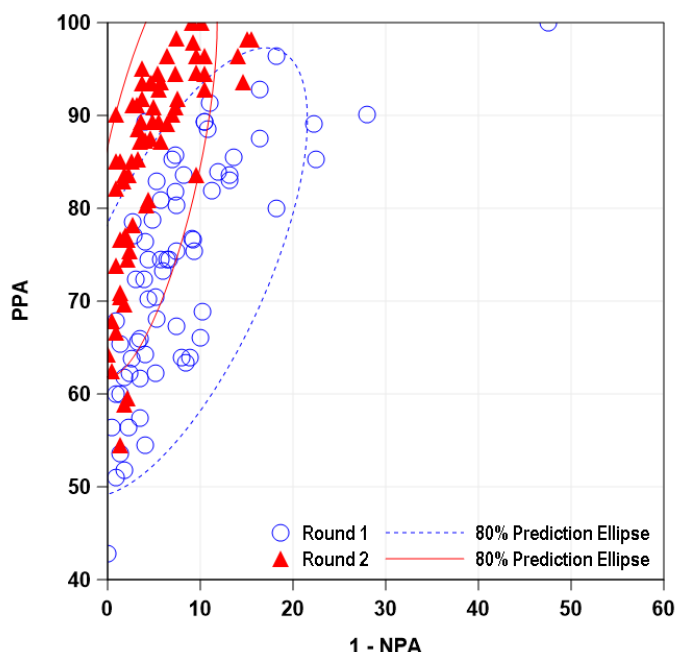
Výsledky čítania všeobecného patológa s použitím iba sklíčok farbených H&E oproti sklíčkam farbeným H&E a CINtec p16 Histology sa analyzovali a porovnali s referenčnou diagnózou H&E a CINtec p16 Histology odvodenou od odborníkov (Tabuľka 13). Tieto údaje preukazujú štatisticky významné zvýšenie PPA (+11.5 % s 95 % CI: od 9.3 % do 13.5 %) a NPA (+3.0 % s 95 % CI: od 2.2 % do 3.7 %).

Tabuľka 13. Pozitívna (PPA) a negatívna (NPA) miera zhody všeobecného patológa sa odčítala zo sklíčok farbených len H&E verzus sklíčok farbených H&E a CINtec p16 Histology s referenčnou diagnózou H&E a CINtec p16 Histology odvodenou od odborníkov (XP2).

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

Súhrnný diagram diagnostickej presnosti jednotlivých čitateľov – všeobecných patológov na diagnostiku $\geq$ CIN2 verzus $\leq$ CIN1 pomocou sklíčok farbených iba H&E verzus sklíčok farbených H&E spolu s CINtec p16 Histology v porovnaní s referenčnou diagnózou H&E +

CINtec p16 Histology odvodenou od odborníkov je zobrazený na Obrázok 3. Sú zobrazené PPA a NPA interpretácie každého patológa pre 1. kolo (len H&E – modré kruhy) v porovnaní s 2. kolom (H&E a CINtec p16 Histology – červené trojuholníky). Elipsy predikcie signalizujú rozsah výkonu PPA a NPA očakávaný u väčšiny patológov: 80 % by malo spadať medzi elipsy a 20 % by malo spadať mimo elipsy. Tieto dáta ukazujú, že interpretácia cervikálnych biopsii pomocou H&E spolu so sklíčkami farbenými CINtec p16 Histology zlepšuje diagnostickú konzistenciu a znižuje variabilitu medzi čitateľmi.



Obrázok 3. Súhrnný diagram diagnostickej zhody (PPA verus 1-NPA) všeobecných patológov na diagnostikovanie $\geq$ CIN2 verus $\leq$ CIN1 za použitia iba H&E (1. kolo) a použitia H&E a CINtec p16 Histology (2. kolo) v porovnaní s referenčnou diagnózou H&E + CINtec p16 Histology odvodenou od odborníkov (XP2) (80 % elipsy predikcie generované za predpokladu dvojzmernej normality).

Účinnosť farbenia CINtec p16 Histology

Sekundárnym cieľom tejto štúdie bola hodnotená účinnosť zafarbenia analýzy CINtec p16 Histology, ako ju určili všeobecní patológovia počas skúmania sklíčok. Počas štúdie bolo získaných 19250 CINtec p16 Histology stavových interpretácií od 70 všeobecných patológov. Hodnotené kritériá účinnosti farbenia boli: celková prijateľnosť farbenia, prijateľnosť farbenia pozadia a morfológická prijateľnosť. Výsledky vykazujú > 99 % mieru prijateľnosti pre všetky kritériá farbenia (Tabuľka 14).

Tabuľka 14. Účinnosť farbenia CINtec p16 Histology.

Cieľový ukazovateľ	Počet interpretácií n/N	Miera
Prijateľnosť farbenia	19074/19250	99.09 %
Morfológická prijateľnosť	19249/19250	99.99 %
Prijateľnosť pozadia	19249/19250	99.99 %

Závery

Použitie zafarbených pomocou CINtec p16 Histology ako doplnku k interpretácii sklíčok zafarbených H&E zvyšuje diagnostickú zhodu pri detekcii lézií CIN ($\geq$ CIN2) vysokej kvality na biopsiách krčka maternice. Táto lepšia zhoda je spôsobená zvýšením PPA (zhoda pozitívneho výsledku testu s diagnózou $\geq$ CIN2) a NPA (zhoda negatívneho výsledku testu s diagnózou CIN1 alebo žiadne CIN). Okrem toho sa zlepšuje zhoda diagnóz medzi všeobecnými patológmi navzájom a s panelom odborníkov.

LITERATÚRA

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

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

POZNÁMKA: Na označenie hranice medzi celým číslom a zlomkovými časťami desatinnej číslice sa v celom tomto dokumente namiesto desatinnej čiarky používa bodka. Na oddelenie tisícok sa nepoužívajú žiadne znaky.

Súhrn informácií o bezpečnosti a výkone nájdete tu:

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

Symbody

Spoločnosť Ventana používa okrem symbolov a značiek uvedených v norme ISO 15223-1 aj nasledujúce symboly a značky (ďalšie informácie pre USA: pozri elabdoc.roche.com/symbols).

GTIN

Globálne číslo obchodnej jednotky

Rx only

Pre USA: Upozornenie: Federálny zákon obmedzuje predaj tejto pomôcky iba prostredníctvom alebo na objednávku lekára.

HISTÓRIA REVÍZIÍ

Rev.	Aktualizácie
H	Aktualizácie časti Varovania a bezpečnostné opatrenia, pridané vyhlásenie Rx only, aktualizované podľa aktuálnej šablóny.

DUŠEVNÉ VLASTNÍCTVO

VENTANA, BENCHMARK, CINTEC, OPTIVIEW a ULTRAVIEW sú ochranné známky spoločnosti Roche. Všetky ostatné ochranné známky sú majetkom ich príslušných vlastníkov.

© 2024 Ventana Medical Systems, Inc.

For USA: Rx only

KONTAKTNÉ ÚDAJE



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

www.roche.com



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

