

Instrucțiuni de utilizare

CINtec® Histology Kit

CINtec® Histology Kit este o analiză imunohistochimică pentru detectarea calitativă a antigenului p16^{INK4a} pe secțiuni de țesut preparate din biopsii cervicale fixate în formol, incluzionate în parafină. Este recomandată în vederea utilizării în asociere cu lame colorate cu H&E preparate din același specimen de țesut cervical ca suport în creșterea preciziei diagnosticului și în concordanța interobservator în diagnosticul neoplaziei intraepiteliale cervicale de grad înalt.



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim
Germany

<https://navifyportal.roche.com>

REF

10213370001

GTIN

07613336230350



50



2 – 8 °C



CE
0123

IVD



Cuprins

ROMÂNĂ	3
I. Numele produsului.....	3
II. Domeniu de utilizare.....	3
III. Rezumat și explicație.....	3
Importanță clinică.....	4
Principiul procedurii.....	5
IV. Reactivi	5
Materiale furnizate	5
Stocare	7
Materiale și reactivi necesari, dar care nu s-au furnizat.....	7
Echipamente necesare	8
V. Avertismente și precauții.....	8
Avertisment.....	8
Atenție	9
VI. Procedură.....	10
Prepararea specimenelor.....	10
Specimene de țesut incluzionate în parafină	10
Extragerea epitopului prin încălzire	10
Procedura de colorare.....	11
1. Prepararea reactivilor.....	11
1.1 Epitope Retrieval Solution.....	11
1.2 Wash Buffer	11
1.3 Substrate-Chromogen Solution (DAB)	11
1.4 Contra-colorare.....	12
1.5 Mediu de montare.....	12
2. Procedura de colorare pentru instrumentele automate de colorare	12
2.1 Deparafinare și rehidratare	12
2.2 Protocol de colorare pentru instrumentele automate de colorare	13
3. Procedură de colorare pentru utilizare manuală.....	15
3.1 Deparafinare și rehidratare	15
3.2 Protocol de colorare pentru utilizare manuală	16
VII. Controlul calității	18
VIII. Interpretarea rezultatelor	18
IX. Limitări.....	19
X. Caracteristici de performanță.....	20
XI. Depanare.....	25

XII.	Simboluri	28
XIII.	Producător	28
XIV.	Starea revizuirii	28
XV.	Proprietate intelectuală.....	29
	Anexa 1 Referințe	30
	Anexa 2.....	33

ROMÂNĂ

I. Numele produsului

CINtec® Histology Kit

II. Domeniu de utilizare

Pentru utilizare în vederea diagnosticului in vitro.

CINtec® Histology Kit este o analiză imunohistochimică pentru detectarea calitativă a antigenului p16^{INK4a} pe secțiuni de țesut preparate din biopsii cervicale fixate în formol, incluzionate în parafină.

Este recomandată în vederea utilizării în asociere cu lame colorate cu H&E preparate din același specimen de țesut cervical ca suport în creșterea preciziei diagnosticului și în concordanța interobservator în diagnosticul neoplaziei intraepiteliale cervicale de grad înalt.

Testul este destinat pentru utilizarea manuală sau pentru utilizare pe instrumentele automate de colorare.

Acest test trebuie interpretat de un patolog calificat în asociere cu examinarea histologică, informațiile clinice relevante și controalele adecvate. Rezumatul și explicarea dispozitivului.

III. Rezumat și explicație

CINtec® Histology Kit are la bază un anticorp monoclonal de șoarece (clona E6H4®) îndreptat împotriva proteinei umane p16^{INK4a}.

Proteina p16^{INK4a} este un inhibitor al kinazei dependente de ciclină care joacă un rol major în reglarea ciclului celulelor eucariote. Ea constituie o parte a procesului de control, mediat de proteina retinoblastomului (pRB), al tranziției de fază G1-S și declanșează oprirea ciclului celular în cursul proceselor de diferențiere celulară. În celulele epiteliale diferențiate terminal, p16^{INK4a} este exprimată la niveluri de obicei nedetectate de către analizele imunohistochimice.

În diferite entități tumorale, s-a constatat că gena p16^{INK4a} este inactivată funcțional prin mutație genetică sau prin hipermetilarea promotorului. S-a demonstrat că această inactivare a genei supresor tumoral p16^{INK4a} contribuie la dereglarea ciclului celular și la pierderea controlului asupra proliferării celulare.

Însă în celulele epiteliale cervicale competente de replicare, în care oncoproteinele din tipurile cu risc ridicat de virus Human Papillomavirus (HR-HPV) au inițiat procesul de transformare celulară, s-a demonstrat că expresia p16^{INK4a} este semnificativ reglată ascendent [1; 2]. Această supraexpresie puternică a p16^{INK4a} a fost strâns legată la nivel molecular de activitatea oncoproteinelor E7 din HR-HPV. S-a demonstrat că supraexpresia p16^{INK4a} reflectă inactivarea mediată de oncoproteina E7 a complexului funcțional dintre pRB și factorul de transcripție E2F, acesta fiind unul dintre evenimentele cheie din timpul transformării celulare induse de HR-HPV [3].

În literatura publicată există numeroase studii care afirmă că supraexpresia proteinei p16^{INK4a} a fost observată imunohistochimic într-un procent foarte ridicat de cazuri de displazie cervicală precanceroasă de grad înalt (și anume 80 – 100%

dintre leziunile CIN2 și, practic, toate leziunile CIN3) și de cancer invaziv. S-a demonstrat că leziunile intraepiteliale cervicale de grad scăzut (CIN1) prezintă supraexpresia p16^{INK4a} în procente variabile, încadrate în general în intervalul 30 – 60% [1; 2; 4-16].

În interpretarea rezultatelor trebuie să se ia în considerare faptul că p16^{INK4a} este o proteină celulară ce poate fi exprimată la niveluri detectabile atât în leziunile cervicale displazice de grad înalt și în cancerul de col uterin, cât și în unele afecțiuni care nu sunt asociate cu displazia cervicală, chiar dacă la niveluri diferite și cu tipare de expresie diferite. Preparatele histologice de țesut prezintă o morfologie tisulară intactă pentru a sprijini interpretarea rezultatului pozitiv al leziunii cervicale la p16^{INK4a}. S-a sugerat că un tipar de colorație difuz, și anume colorația continuă a celulelor din straturile celulare bazale și parabazale, cu sau fără colorația celulelor din straturile celulare superficiale, este clasificat ca un rezultat pozitiv la testul de supraexpresie p16^{INK4a}. S-a demonstrat că acest tipar de colorație oferă cel mai înalt nivel de sensibilitate și totodată de specificitate pentru CIN de grad înalt [1; 4; 5]. În opoziție, un tipar focal de colorație (colorația celulelor izolate sau a aglomerărilor de celule mici, și anume colorație fără continuitate, în special nu cea a celulelor bazale și parabazale), cât și absența imunoreactivității sunt considerate un rezultat negativ la testul supraexpresiei p16^{INK4a} [1; 4; 5].

Interpretarea lamelor colorate pentru p16^{INK4a} folosind CINtec® Histology Kit trebuie să se realizeze în asociere cu lame colorate cu H&E preparate din același specimen de țesut cervical. Informațiile suplimentare oferite de lamele colorate cu CINtec® trebuie îmbinate cu diagnosticul preliminar bazat pe morfologie stabilit pe lamele colorate cu H&E în vederea stabilirii unui diagnostic final.

Importanță clinică

S-a demonstrat că interpretarea corelată a lamelor colorate cu H&E ce cuprind secțiuni de biopsie cervicală alături de lame consecutive din același specimen de țesut și imunocolorate pentru p16^{INK4a} îmbunătățește precizia diagnosticului și concordanța interobservator în diagnosticul neoplaziei intraepiteliale cervicale de grad înalt (CIN2+).

Diagnosticul patologic stabilit pe secțiunile de țesut cervical colorate cu H&E constituie baza deciziei de inițiere a tratamentului. În consecință, impactul unui diagnostic greșit este semnificativ. Diagnosticul greșit poate conduce la managementul inadecvat al pacientului, și anume tratamentul excesiv al femeilor sănătoase sau tratamentul insuficient al femeilor cu leziuni displazice de grad înalt.

Interpretarea secțiunilor histologice de țesut colorate cu H&E în vederea diagnosticării provoacă neînțelegeri semnificative în rândul patoloșilor. Diferite publicații au indicat rate scăzute ale concordanței intraobservator și interobservator în histologia de col uterin [17-20].

Un studiu clinic multicentric amplu desfășurat în Statele Unite ale Americii a evaluat interpretarea analizelor histologice ale specimenelor cervicale (2237 de biopsii prin colposcopie și 535 de specimene prelevate prin conizație realizată prin metoda LEEP), prin participarea mai multor patologi calificați; posibilitatea de redare a interpretărilor histopatologice a fost doar moderată (kappa=0,46 pentru biopsiile prin trepanație și kappa=0,49 pentru specimenele obținute prin biopsie LEEP) [17]. Folosind sistemul de clasificare WHO (Organizația Mondială a Sănătății) și un sistem de clasificare modificat, Bethesda, s-a demonstrat că respectiva concordanță interobservator a unui număr de șase histopatologi care au evaluat 125 de specimene obținute prin colposcopie este slabă în cazul ambelor sisteme de clasificare [18]. În mod similar, un studiu desfășurat în Marea Britanie a demonstrat

o concordanță interobservator redusă între opt specialiști histopatologi care au examinat 100 de specimene obținute prin colposcopie (valoare kappa neponderată egală cu 0,358) [19].

Precizia globală a procedurii de diagnosticare histomorfologică este îmbunătățită prin adăugarea de lame colorate cu CINtec® Histology Kit la lamele convenționale colorate cu H&E folosite în stabilirea diagnosticelor [21-39].

Principiul procedurii

CINtec® Histology Kit conține un set de reactivi pentru detectarea imunohistochimică a antigenului p16^{INK4a}. Kit-ul este conceput pentru realizarea unei proceduri de colorație imunohistochimică în două etape pentru speci­menele de țesut fixate în formol, incluzionate în parafină, obținute prin biopsii cervicale. Pentru detectarea antigenului, se utilizează un anticorp monoclonal primar de șoarece, clona E6H4®, îndreptat împotriva proteinei umane p16^{INK4a}.

Se utilizează un reactiv de vizualizare gata de întrebuințat ce cuprinde un reactiv polimeric conjugat cu peroxidază din hrean și fragmente de anticorp de capră anti-șoarece Fab. Visualization Reagent a fost supus absorbției în fază solidă pentru a elimina reactivitatea încrucișată cu imunoglobulinele umane. Reacția cromogenului se bazează pe conversia mediată de peroxidaza din hrean a cromogenului DAB într-un produs de reacție vizibil în poziția antigenului. După contra-colorare, specimenul poate fi acoperit cu lamele, iar rezultatele pot fi evaluate prin inspecție la microscopul cu iluminare.

IV. Reactivi

Materiale furnizate

Materialele enumerate mai jos sunt incluse în fiecare kit și sunt suficiente pentru efectuarea a 50 de teste și 50 de reacții de control negativ. Numărul testelor este calculat pentru utilizarea unei cantități de 200 µl din reactivi per lamă.

1 Peroxidase Blocking Reagent

Peroxidase Blocking Reagent

2 x 11,5 ml, gata de întrebuințat

3% apă oxigenată, conținând 15 mmol/l azidă de sodiu (NaN₃).

EUH210: Fișa cu date de securitate disponibilă la cerere.

2 Mouse anti-Human p16^{INK4a} Antibody

Mouse anti-Human p16^{INK4a} Antibody

11,5 ml, gata de întrebuințat

Anticorpul monoclonal de șoarece anti-uman p16^{INK4a} (~1 µg/ml), clona E6H4™, furnizat în soluție tampon Tris 50 mmol/l cu pH 7,2, conținând 15 mmol/l azidă de sodiu (NaN₃) și proteină de stabilizare.

3 Visualization Reagent

Visualization Reagent

2 x 11,5 ml, gata de întrebuințat



Avertisment

H317 Poate provoca o reacție alergică a pielii.

P261 Evitați să respirați praf/fum/gaz/ceață/vapori/aerosoli.

P272 Îmbrăcămintea de lucru contaminată nu trebuie lăsată la locul de muncă.

P280 Purtați mănuși de protecție.

P333 + P313 Dacă apar iritații ale pielii sau erupții cutanate: consultați medicul.

P362 + P364 Scoateți îmbrăcămintea contaminată și spălați-o înainte de reutilizare.

P501 Aruncați conținutul/recipientul într-o instalație aprobată de eliminare a deșeurilor.

Conține:

26172-54-3 clorhidrat 2-metil- 2H-izotiazol-3-onă

55965-84-9 masă de reacție pentru: 5-cloro-2-metil-4-izotiazolin-3-onă [EC nr. 247-500-7] și 2-metil- 2H-izotiazol-3-onă [EC nr. 220-239-6] (3:1)

Reactiv polimeric conjugat cu peroxidază din hrean și fragmente de anticorp de capră anti-șoarece Fab, purificate pentru afinitate, furnizat în soluție stabilizatoare care conține conservanți și proteină stabilizatoare.

4 Negative Reagent Control

Negative Reagent Control

11,5 ml, gata de întrebuințat

Anticorp monoclonal de șoarece anti-neurofizină de șobolan cuplată la oxitocină (~1 µg/ml), furnizat în soluție tampon Tris 50 mmol/l cu pH 7,2, conținând 15 mmol/l azidă de sodiu (NaN₃) și proteină de stabilizare. Pentru a verifica specificitatea colorației. Neurofizina de șobolan cuplată la oxitocină nu este prezentă în țesuturile umane.

5 DAB Buffered Substrate

DAB Buffered Substrate

31 ml

Soluție tampon substrat, pH 7,5, ce conține < 0,1% apă oxigenată, stabilizatori și potențatori.

6 DAB Chromogen

DAB Chromogen

0,85 ml, soluție cromogen 3,3'-diaminobenzidină.



Pericol

H314 Provoacă arsuri grave ale pielii și lezarea ochilor.

H341 Susceptibil de a provoca anomalii genetice.

H350 Poate provoca cancer.

P201 Procurați instrucțiuni speciale înainte de utilizare.

P280 Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/echipament de protecție a ochilor/echipament de protecție a feței.

P303 + P361 + P353 ÎN CAZ DE CONTACT CU PIELEA (sau părul): scoateți imediat toată îmbrăcăminte contaminată. Clătiți pielea cu apă.

P304 + P340 + P310 ÎN CAZ DE INHALARE: Transportați persoana la aer liber și mențineți-o într-o poziție confortabilă pentru respirație. Sunați imediat la un CENTRU DE INFORMARE TOXICOLOGICĂ sau un medic.

P305 + P351 + P338 + P310 ÎN CAZ DE CONTACT CU OCHII: Clătiți cu atenție cu apă, timp de mai multe minute. Scoateți lentilele de contact, dacă este cazul și dacă acest lucru se poate face cu ușurință. Continuați să clătiți. Sunați imediat la un CENTRU DE INFORMARE TOXICOLOGICĂ sau un medic.

P308 + P313 ÎN CAZ DE expunere sau de posibilă expunere: consultați medicul.

Conține 868272-85-9 3,3'-diaminobenzidină tetraclorhidrat hidrat

NOTĂ: consultați reglementările federale, de stat sau locale pentru eliminare.

7 Epitope Retrieval Solution 10X

Epitope Retrieval Solution 10X

500 ml, soluție tampon Tris 100 mmol/l cu pH 9 conținând 10 mmol/l EDTA și 15 mmol/l azidă de sodiu (NaN_3).

Stocare

Stocați la 2 – 8 °C. Nu utilizați după data de expirare. Nu s-au obținut date cu privire la stocarea reactivilor în orice alte condiții în afara celor enunțate mai sus.

După deschidere, componentele kit-ului sunt stabile timp de 6 luni dacă sunt depozitate la 2 – 8 °C. Soluțiile trebuie eliminate dacă au aspect tulbure.

Wash Buffer diluat și Epitope Retrieval Solution diluat sunt stabile pentru o perioadă de până la o lună dacă sunt păstrate la 2 – 8 °C. Soluțiile nu trebuie utilizate dacă au aspect tulbure.

Materiale și reactivi necesari, dar care nu s-au furnizat

CINtec® Wash Buffer 10X utilizat cu CINtec® Histology Kit este disponibil cu numărul de catalog 10215364001 de la Roche, însă nu este inclus în kit. Pentru detalii privind comenzile, accesați site-ul web www.roche.com.

Soluția tampon Tris 500 mmol/l cu 1,5 mol/l NaCl, pH 7,6, conținând detergent și un agent antimicrobian.



Avertisment

H317 Poate provoca o reacție alergică a pielii.

P261 Evitați să respirați praf/fum/gaz/ceată/vapori/aerosoli.

P272 Îmbrăcămintea de lucru contaminată nu trebuie lăsată la locul de muncă.

P280 Purtați mănuși de protecție.

P333 + P313 Dacă apar iritații ale pielii sau erupții cutanate: consultați medicul.

P362 + P364 Scoateți îmbrăcămintea contaminată și spălați-o înainte de reutilizare.

P501 Aruncați conținutul/recipientul într-o instalație aprobată de eliminare a deșeurilor.

Conține 55965-84-9 masă de reacție pentru: 5-cloro-2-metil-4-izotiazolin-3-onă [EC nr. 247-500-7] și 2-metil- 2H-izotiazol-3-onă [EC nr. 220-239-6] (3:1)

Lavete absorbante;

Contra-colorație cu Hematoxylin;

Apă distilată sau deionizată (Apă pentru spălare);

Etanol, 95% și 70%;

Mediu de montare;

Țesuturi pozitive și negative care să fie utilizate ca lame de control al procesului;

Lame (SuperFrost® Plus sau echivalent);

Xilen;

Lamele.

Echipamente necesare

Opțional: Cuptor de uscare, capabil să mențină o temperatură de 60 °C sau inferioară;

Opțional: instrument Dako sau LabVision Autostainer;

Cameră umedă (opțional);

Microscop cu iluminare (putere de mărire a obiectivului 4 - 40x);

Vase sau băi de colorație;

Flacoane cu soluție de spălare;

Cronometru (reglabil pentru intervale cuprinse între 2 și 60 de minute);

Bain-marie cu capac (care să poată menține Epitope Retrieval Solution la 95 – 99 °C);

V. Avertismente și precauții

⚠ Avertisment

1. Atenție! Unii dintre reactivii incluși în acest kit conțin substanțe chimice periculoase. Când manevrați componentele acestui kit, respectați precauțiile de siguranță pentru manipularea reactivilor de laborator periculoși.

2. Componentele 1, 2, 4 și 7 ale acestui produs conțin azidă de sodiu (NaN_3), care este extrem de toxică în stare pură. Deși nu este clasificată ca periculoasă, azida de sodiu la concentrațiile din acest produs ar putea reacționa cu tubulatura din plumb și cupru formând acumulări extrem de explozive de azide metalice. La eliminare, spălați cu cantități mari de apă pentru a evita acumularea de azidă metalică în tubulatură.
3. Componentele 2, 3 și 4 conțin material de origine animală. Respectați procedurile de manipulare adecvate, așa cum se recomandă în cazul oricărui produs derivat din surse biologice.
4. Fișa tehnică de securitate a kit-ului este disponibilă la cerere.
5. La manipularea și eliminarea specimenelor histologice, inclusiv a tuturor specimenelor înainte și după fixare, precum și a tuturor materialelor expuse la acestea, respectați precauțiile de siguranță privind manipularea materialelor cu potențial infecțios, precum și cerințele aplicabile privind eliminarea deșeurilor.
6. Nu folosiți niciodată pipeta pentru reactivi cu ajutorul gurii. Evitați contactul pielii și al mucoaselor cu reactivi și specimene biologice. În eventualitatea în care reactivii sau speciamele intră în contact cu pielea sau mucoasele, clătiți cu apă din abundență.
7. Visualization Reagent și DAB Chromogen ar putea fi afectate negativ dacă sunt expuse la lumină excesivă. Nu depozitați componentele kit-ului și nu efectuați operațiuni de colorare în lumină puternică, precum lumina solară directă.
8. Purtați echipament de protecție individuală adecvat pentru a evita contactul cu ochii și pielea la manipularea oricăruia dintre componentele incluse sau care urmează a fi utilizate împreună cu CIntec® Histology Kit. Consultați Fișa tehnică de securitate (FTS) pentru informații suplimentare.
9. Etichetarea de siguranță a produselor respectă recomandările GHS al UE.

Atenție

1. Pentru utilizare în vederea diagnosticului in vitro.
2. Destinat exclusiv utilizării în scop profesional.
3. Minimizați contaminarea microbiană a reactivilor pentru a evita colorația nespecifică.
4. Orice durată, temperatură sau metodă de incubare în afara celor specificate poate genera rezultate eronate.
5. Nu utilizați acest kit dacă ambalajul sau oricare dintre componentele acestuia au fost deteriorate. În eventualitatea în care ambalajul ar fi compromis sau componentele ar fi deteriorate, vă rugăm să anunțați fără întârziere producătorul.
6. Eliminarea tuturor deșeurilor trebuie făcută în conformitate cu directivele și reglementările locale.
7. Toți reactivii sunt formulați în mod specific în vederea utilizării pentru acest test. Pentru ca testul să funcționeze conform specificațiilor, nu trebuie efectuată nicio înlocuire a acestora.
8. Dacă se observă o colorație neașteptată, care nu poate fi explicată prin variații ale procedurilor de laborator și se bănuiește existența unei probleme legate de CIntec® Histology Kit consultați imediat informațiile de contact furnizate în

secțiunea XIII. pentru informații suplimentare privind asistența tehnică.

9. Funcționarea defectuoasă a produsului datorată problemelor de manipulare sau instabilității nu produce niciun semn evident. De aceea, ca o măsură de control al calității, trebuie operate lame de control pozitiv și negativ simultan cu speciamele de la pacient.
10. Pentru a raporta incidente suspectate grave în legătură cu acest dispozitiv, contactați reprezentantul local Roche și autoritatea competentă a statului membru sau a țării în care locuiește utilizatorul.

VI. Procedură

Prepararea speciameleor

CINtec® Histology Kit este conceput pentru a fi utilizat împreună cu speciame de țesut conservate în vederea procedurilor imunohistochimice. Prepararea speciameleor trebuie să se realizeze conform metodelor standard de procesare a țesutului.

Pentru o performanță optimă, se recomandă lamele încărcate pozitiv, precum lamele SuperFrost® Plus.

Speciame de țesut incluzionate în parafină

Speciamele de țesut neutre, fixate în formol, incluzionate în parafină, care conțin soluție tampon, prelucrate utilizând metodele de rutină standard, sunt adecvate pentru a fi utilizate alături de acest kit. În cazul în care speciamele sunt preparate folosind o altă metodă de conservare, utilizatorul trebuie să verifice natura adecvată a acestei metode.

Speciamele obținute prin biopsie trebuie fixate timp de 18 – 24 de ore în formol neutru cu soluție tampon (se recomandă cea de 10%) și transformate în blocuri cu o grosime de 3 sau 4 mm. Blocurile de țesut sunt apoi deshidratate printr-o serie de substanțe alcoolice și xilen, urmată de infiltrarea de parafină topită menținută la cel mult 60 °C. Fiecare bloc de țesut va fi secționat la 4 – 5 μm și montat pe lame de microscop SuperFrost® Plus în cadrul unui laborator de histopatologie. Lamele trebuie colorate imediat, deoarece antigenicitatea secțiunilor de țesut tăiate se poate reduce în timp.

Extragerea epitopului prin încălzire

Pentru extragerea epitopului prin încălzire, secțiunile de țesut montate pe lame trebuie încălzite prin scufundare în Epitope Retrieval Solution într-un bain-marie calibrat care poate menține Epitope Retrieval Solution la o temperatură între 95 și 99 °C. Laboratoarele situate la altitudini ridicate trebuie să determine metoda optimă de menținere a temperaturii necesare a apei în bain-marie. Producătorul nu recomandă nicio deviere de la procedura descrisă aici.

După extragerea epitopului prin încălzire, secțiunile de țesut trebuie răcite la temperatura camerei timp de 20 de minute înainte de continuarea procesării. Colorarea secțiunilor de țesut trebuie efectuată apoi fără întârziere.

Procedura de colorare

1. Prepararea reactivilor

Toți reactivii trebuie aduși la temperatura ambiantă (20 – 25 °C) înainte de a fi utilizați în procedura de imuno-colorație. Prin urmare, toate etapele ulterioare se vor efectua la temperatura ambiantă.

Se recomandă precauție pentru a se evita uscarea specimenelor pe parcursul procedurii de imuno-colorație deoarece uscarea poate conduce la artefacte de colorație.

Următorii reactivi trebuie pregătiți înainte de a iniția procedura de colorare:

1.1 Epitope Retrieval Solution

Preparați o cantitate de Epitope Retrieval Solution suficientă pentru procedura de colorare planificată, diluând o cantitate din Fiola 7 (Epitope Retrieval Solution 10X) în proporție de 1:10 cu apa distilată sau deionizată.

După diluare, Epitope Retrieval Solution poate fi depozitată la 2 – 8 °C timp de până la o lună. Soluția diluată trebuie eliminată dacă are aspect tulbure.

NOTĂ: Utilizarea apei cu niveluri crescute de ioni pentru diluarea soluției de extragere a epitopului ar putea reduce semnificativ performanțele de colorație ale testului. Vă rugăm asigurați-vă că apa utilizată este deionizată corespunzător (adică asigurați-vă că s-a verificat prin operațiuni de întreținere de rutină coloana de schimb de ioni pentru producerea apei deionizate). Nu utilizați apă de la robinet!

1.2 Wash Buffer

Utilizați CINTec® Wash Buffer 10X, număr de catalog 10215364001, furnizat de Roche în combinație cu CINTec® Histology Kit. Pentru detalii privind comenzile, accesați site-ul web www.roche.com.

Preparați o cantitate de Wash Buffer suficientă pentru etapele de clătire ale procedurii de colorare planificate, diluând o cantitate din Wash Buffer 10X, număr de catalog 10215364001, în proporție de 1:10 cu apă distilată sau deionizată.

După diluare, Wash Buffer poate fi depozitată la 2 – 8 °C timp de până la o lună. Soluția diluată trebuie eliminată dacă are aspect tulbure.

1.3 Substrate-Chromogen Solution (DAB)

Pentru prepararea Substrate-Chromogen Solution, trebuie adăugată o picătură de DAB Chromogen la 2 ml de DAB Buffered Substrate. Procedați după cum urmează:

- i) transferați 2 ml de DAB Buffered Substrate din Fiola 5 într-o eprubetă de testare;
- ii) adăugați o picătură (25 – 30 µl) de DAB Chromogen din Fiola 6.
Amestecați și aplicați pe secțiunile de țesut folosind o pipetă;

Cantitatea de 2 ml din Substrate-Chromogen Solution (DAB) preparată conform indicației de mai sus este de obicei suficientă pentru colorarea a cinci secțiuni de țesut, incluzând cele cinci specimene de control corespunzătoare.

NOTĂ: Folosiți Substrate-Chromogen Solution (DAB) preparată în aceeași zi.

NOTĂ: Adăugarea de DAB Chromogen în exces la DAB Buffered Substrate va conduce la deteriorarea semnalului pozitiv.

1.4 Contra-colorare

Reacția de colorare DAB conduce la obținerea unui produs final colorat, insolubil în apă. Pentru contra-colorare se poate utiliza Hematoxylin pe bază de alcool sau apă. În cazul utilizării, respectați instrucțiunile oferite de furnizorul de Hematoxylin referitor la efectuarea contra-colorării.

1.5 Mediu de montare

Pentru montarea specimenelor de pe lamă după colorare, se recomandă un mediu de montare permanent, neapos. Însă montarea apoasă este de asemenea acceptată.

Eukitt Mounting Medium este recomandat pentru montarea neapoasă. Aquatex Merck este recomandat pentru montarea apoasă.

2. Procedura de colorare pentru instrumentele automate de colorare

CINtec® Histology Kit a fost adaptat în vederea utilizării cu instrumentele automate de colorare (Lab Vision Autostainer 480 sau Dako Autostainer Plus) conform șablonului prezentat în continuare. Este posibilă utilizarea altor instrumente sau sisteme cu un mod de funcționare similar, în urma validării corespunzătoare de către utilizator. Înainte de colorarea pe instrumentul automat de colorare, speciunile și reactivii trebuie preparați conform indicațiilor din secțiunile 1.1 – 1.5 și 2.1.

2.1 Deparafinare și rehidratare

Înainte de deparafinării, introduceți lamele într-un cuptor de uscare la o temperatură de cel mult 60 °C, timp de cel puțin 20 de minute, însă nu mai mult de o oră pentru a îndepărta cantitativ apa, îmbunătățind astfel adeziunea țesutului la lama din sticlă („coacere”) și pentru a topi parafina. Lamele cu țesut trebuie deparafinate pentru a îndepărta mediul de includere, după care trebuie rehidratate înainte de a putea efectua procedura de colorare. Este crucial să se evite îndepărtarea incompletă a parafinei deoarece mediul de includere rezidual va conduce la obținerea unei colorații nespecifice sporite. Incubați lamele la temperatura ambiantă (20 – 25 °C), conform etapelor următoare.

- 5 (±1) minute într-o baie de xilen;
- repetați această etapă o dată, într-o baie proaspătă;
- îndepărtați lichidul în exces;
- 3 (±1) minute în 95% etanol;
- repetați această etapă o dată, într-o baie proaspătă;
- îndepărtați lichidul în exces;
- 3 (±1) minute în 70% etanol;
- repetați această etapă o dată, într-o baie proaspătă;
- îndepărtați lichidul în exces;
- minimum 30 de secunde în apă distilată sau deionizată.

Inițiați procedura de colorare conform indicațiilor din Secțiunea 2.2, Etapa 1: Extragerea epitopului.

Soluțiile cu xilen și alcool nu trebuie folosite pentru un număr mai mare de 40 de lame.

NOTĂ: Utilizatorii trebuie să rețină faptul că variațiile de temperatură ale echipamentului sau de durată a expunerii de pe parcursul preparării preanalitice a probei pot conduce la îndepărtarea incompletă a parafinei de pe lamele cu țesut. Parafina reziduală poate conduce la colorarea incompletă cu orice colorant histologic, incluzând colorația CINtec® Histology. Laboratoarele de histopatologie ar trebui să includă monitorizarea periodică a echipamentului pentru a reduce variația din prepararea probelor dinainte de colorare. În cazul oricărei colorații imuno-histochimice, observarea marginilor bine conturate din zonele de țesut imuno-reactiv sau a altor inconsecvențe de colorație de pe o lamă poate constitui un indicator al procesării preanalitice incomplete sau necorespunzătoare a specimenului. Dacă se observă o colorație neconsecventă, utilizatorii ar trebui să ia în considerare verificarea echipamentului și a metodelor de preparare preanalitică a probei.

2.2 Protocol de colorare pentru instrumentele automate de colorare

Etapă 1: Extragerea epitopului

- umpleți vasele de colorație, *de ex.*, vase Coplin din plastic, cu Epitope Retrieval Solution diluată (a se vedea Procedura, Secțiunea 1.1);
- introduceți vasele de colorație care conțin Epitope Retrieval Solution în bain-marie și încălziți apa în bain-marie Epitope Retrieval Solution până la 95 – 99 °C. Este important să se ajusteze nivelul de apă din bain-marie pentru a vă asigura că vasele sunt scufundate în apă la un nivel de 80%. Pentru a stabiliza temperatura și pentru a evita evaporarea, acoperiți vasele cu capace;
- scufundați secțiunile deparafinate în Epitope Retrieval Solution preîncălzită din vasele de colorație; această etapă reduce de obicei temperatura din vase până sub 90 °C;
- aduceți temperatura apei din bain-marie **și** a Epitope Retrieval Solution din vase înapoi la 95 – 99 °C; verificați temperatura Epitope Retrieval Solution din vase;
- incubați timp de 10 (±1) minute la 95 – 99 °C; începeți numărătoarea inversă doar după ce s-a verificat că temperatura Epitope Retrieval Solution din vase a atins o temperatură de 95 – 99 °C;
- scoateți tot vasul cu lame din baia de apă;
- lăsați lamele să se răcească în Epitope Retrieval Solution timp de 20 (±1) de minute la temperatura camerei;
- decantați Epitope Retrieval Solution și clătiți secțiunile în Wash Buffer (a se vedea Procedura, Secțiunea 1.2);
- pentru o performanță optimă, îmbibați secțiunile în Wash Buffer timp de 5 minute după extragerea epitopului și înaintea colorației.

NOTĂ: Epitope Retrieval Solution este concepută exclusiv în vederea unei singure întrebuințări. Nu reutilizați.

Etapă 2: Programarea instrumentului

Înainte de prima aplicări a CINtec® Histology Kit pe un instrument automat de colorare, trebuie instalat un șablon nou. Vă rugăm să consultați Manualul

operatorului pentru instrumentul automat de colorare respectiv.

Etapă 3: Procedura instrumentului automat de colorare

- transferați reactivii din flacoanele kit-ului în fiolele gradate cu reactivi ale instrumentului automat de colorare. Folosiți harta generată de instrumentul automat de colorare pentru timpii programelor și volumele de reactivi (a se vedea punctul 4 pentru timpii și volumele specifice);
 - poziționați fiolele cu reactivi ale instrumentului automat de colorare în suportul pentru reactivi al instrumentului automat de colorare conform Hărții de dispunere a reactivilor generate de computer;
 - încărcați lamele în instrumentul automat de colorare pe baza Hărții de dispunere a lamelor generate de computer;
 - pentru a preveni uscarea, speciemenle trebuie pulverizate cu soluție tampon de spălare după încărcarea în instrumentul automat de colorare;
 - în continuare, este prezentat un rezumat al ciclului de operare al programului:
 - o clătire*;
 - o 200 µl Peroxidase-Blocking Reagent - 5 minute;
 - o clătire*;
 - o 200 µl Primary p16^{INK4a} antibody sau Negative Reagent Control - 30 minute;
 - o clătire*;
 - o 200 µl Visualization Reagent - 30 de minute;
 - o clătire*;
 - o clătire*;
 - o clătire*;
 - o comutare;
 - o 200 µl Substrate-Chromogen Solution (DAB) - 10 minute;
 - o clătire*;
 - o clătiți lamele în apă deionizată după etapa substrat-cromogen.
- *se va folosi Wash Buffer pentru etapele de clătire respective.

NOTĂ: În cazul în care instrumentul automat de colorare folosit clătește lamele în soluție tampon, lamele trebuie clătite cu apă deionizată după ce sunt îndepărtate din instrumentul automat de colorare.

Etapă 4: Contra-colorare (Instrucțiunile fac referire la Hematoxylin)

- scufundați lamele într-o baie de Hematoxylin. Incubați timp de 2 – 5 minute, în funcție de puterea soluției de Hematoxylin folosite;
- introduceți lamele într-o baie de apă de la robinet și clătiți delicat sub jet de apă de la robinet. Asigurați-vă că a fost îndepărtată toată soluția de Hematoxylin reziduală;
- clătiți scurt lamele delicat într-un bain-marie cu apă distilată sau deionizată;
- contra-colorarea poate fi efectuată direct pe instrumentul automat de colorare.

NOTĂ: În funcție de durata incubăției și de puterea tipului de Hematoxylin utilizat, contra-colorarea va conduce la o colorație albastru pal spre închis a nucleelor

celulelor. Contra-colorarea excesivă sau incompletă poate afecta interpretarea corectă a rezultatelor.

Etapă 5: Montarea

Este recomandat un mediu de montare permanent, neapos. Totuși, se acceptă și un mediu de montare apos. Respectați instrucțiunile de utilizare oferite de către furnizor referitor la mediul de montare.

NOTĂ: Pentru a minimiza decolorarea, protejați lamele împotriva luminii și păstrați-le la temperatura ambiantă (20 – 25 °C).

3. Procedură de colorare pentru utilizare manuală

NOTĂ: Preveniți uscarea secțiunilor de țesut pe parcursul procedurii de colorare. Secțiunile de țesut uscate pot conduce la obținerea unei colorații nespecifice sporite. Pentru proceduri de incubare prelungită, păstrați țesuturile într-un mediu umed.

Respectați procedurile standard folosite în colorarea imunohistochimică manuală atunci când folosiți CINtec® Histology Kit pentru colorare manuală.

3.1 Deparafinare și rehidratare

Înainte de deparafinării, introduceți lamele într-un cuptor de uscare la o temperatură de cel mult 60 °C, timp de cel puțin 20 de minute, însă nu mai mult de o oră pentru a îndepărta cantitativ apa, îmbunătățind astfel adeziunea țesutului la lama din sticlă („coacere”) și pentru a topi parafina. Lamele cu țesut trebuie deparafinate pentru a îndepărta mediul de includere, după care trebuie rehidratate înainte de a putea efectua procedura de colorare. Este crucial să se evite îndepărtarea incompletă a parafinei deoarece mediul de includere rezidual va conduce la obținerea unei colorații nespecifice sporite. Incubați lamele la temperatura ambiantă (20 – 25 °C), conform etapelor următoare.

- 5 (±1) minute într-o baie de xilen;
- repetați această etapă o dată, într-o baie proaspătă;
- îndepărtați lichidul în exces;
- 3 (±1) minute în 95% etanol;
- repetați această etapă o dată, într-o baie proaspătă;
- îndepărtați lichidul în exces;
- 3 (±1) minute în 70% etanol;
- repetați această etapă o dată, într-o baie proaspătă;
- îndepărtați lichidul în exces;
- minimum 30 de secunde în apă distilată sau deionizată.

Inițiați procedura de colorare conform indicațiilor din Secțiunea 3.2, Etapa 1: Extragerea epitopului.

Soluțiile cu xilen și alcool nu trebuie folosite pentru un număr mai mare de 40 de lame.

3.2 Protocol de colorare pentru utilizare manuală

Etapa 1: Extragerea epitopului

- umpleți vasele de colorație, *de ex.*, vase Coplin din plastic, cu Epitope Retrieval Solution diluată (a se vedea Procedura, Secțiunea 1.1);
- introduceți vasele de colorație care conțin Epitope Retrieval Solution în bain-marie și încălziți apa în bain-marie Epitope Retrieval Solution până la 95 – 99 °C. În această etapă, este important să se ajusteze nivelul de apă din bain-marie pentru a vă asigura că vasele sunt scufundate în apă la un nivel de 80%. Pentru a stabili temperatura și pentru a evita evaporarea, acoperiți vasele cu capace;
- scufundați secțiunile deparafinate în Epitope Retrieval Solution preîncălzită din vasele de colorație; această etapă reduce de obicei temperatura din vase până sub 90 °C;
- aduceți temperatura apei din bain-marie **și** a Epitope Retrieval Solution din vase înapoi la 95 – 99 °C; verificați temperatura Epitope Retrieval Solution din vase;
- incubați timp de 10 (± 1) minute la 95 – 99 °C; începeți numărătoarea inversă doar după ce s-a verificat că temperatura Epitope Retrieval Solution din vase a atins o temperatură de 95 – 99 °C;
- scoateți tot vasul cu lame din baia de apă;
- lăsați lamele să se răcească în Epitope Retrieval Solution timp de 20 (± 1) de minute la temperatura camerei;
- decantați Epitope Retrieval Solution și clătiți secțiunile în soluție tampon de spălare diluată (a se vedea Procedura, Secțiunea 1.2);
- pentru o performanță optimă, îmbibați secțiunile în Wash Buffer timp de 5 (± 1) minute după extragerea epitopului și înaintea colorației.

NOTĂ: Epitope Retrieval Solution este concepută exclusiv în vederea unei singure întrebuințări. Nu reutilizați.

Etapa 2: Peroxidase-Blocking Reagent

- aplicați 200 μ l Peroxidase-Blocking Reagent pentru a acoperi specimenul;
- incubați timp de 5 (± 1) minute;
- îndepărtați lichidul în exces și introduceți lamele într-o baie Wash Buffer proaspătă timp de 5 (± 1) minute.

Etapa 3: Primary Antibody sau Negative Reagent Control

- îndepărtați soluția tampon în exces;
- acoperiți specimenul cu 200 μ l de anticorp primar (Mouse Anti-Human p16^{INK4a} sau Negative Reagent Control);
- incubați timp de 30 (± 1) minute;
- îndepărtați lichidul în exces și introduceți lamele într-o baie Wash Buffer proaspătă timp de 5 (± 1) minute.

Etapă 4: Visualization Reagent

- îndepărtați soluția tampon în exces;
- acoperiți specimenul cu 200 µl de Visualization Reagent;
- incubați timp de 30 (±1) minute;
- îndepărtați lichidul în exces și introduceți lamele într-o baie proaspătă de soluție tampon timp de 5 (±1) minute;
- repetați această etapă de două ori cu o baie Wash Buffer proaspătă.

Etapă 5: Substrate-Chromogen Solution (DAB)

- acoperiți specimenul cu 200 µl de Substrate-Chromogen Solution (DAB) preparată conform procedurii descrise la punctul 1.3 de mai sus;
- incubați timp de 10 (±1) minute;
- îndepărtați lichidul în exces și clătiți delicat cu apă distilată sau deionizată.

Colectați deșeurile de Substrate-Chromogen Solution (DAB) într-un recipient pentru materiale periculoase în vederea eliminării adecvate.

Etapă 6: Contra-colorare (Instrucțiunile fac referire la Hematoxylin)

- scufundați lamele într-o baie de Hematoxylin. Incubați timp de 2 – 5 minute, în funcție de puterea soluției de Hematoxylin folosite;
- introduceți lamele într-o baie de apă de la robinet și clătiți delicat sub jet de apă de la robinet. Asigurați-vă că a fost îndepărtată toată soluția de Hematoxylin reziduală;
- clătiți scurt lamele delicat într-un bain-marie cu apă distilată sau deionizată.

NOTĂ: În funcție de durata incubăției și de puterea tipului de Hematoxylin utilizat, contra-colorarea va conduce la o colorație albastru pal spre închis a nucleelor celulelor. Contra-colorarea excesivă sau incompletă poate afecta interpretarea corectă a rezultatelor.

Etapă 7: Montarea

Este recomandat un mediu de montare permanent, neapos. Pentru mediile de montare permanente pe bază de xilen, este necesară o procedură de deshidratare, de ex.

- apă distilată sau deionizată
- 3 min 70% etanol
- 3 min 70% etanol
- 3 min 96% etanol
- 3 min 99% etanol
- 5 min xilen
- 5 min xilen

Totuși, se acceptă și un mediu de montare apos. Respectați instrucțiunile de utilizare oferite de către furnizor referitor la mediul de montare.

NOTĂ: Pentru a minimiza decolorarea, protejați lamele împotriva luminii și păstrați-le la temperatura ambiantă (20 – 25 °C).

VII. Controlul calității

Abaterile de la procedurile recomandate privind fixarea și procesarea specimenelor în laboratorul utilizatorului pot genera o diversitate semnificativă a rezultatelor, necesitând efectuarea periodică a controalelor interne.

Control de țesut pozitiv

Materialele externe de control pozitiv trebuie să fie specimene de autopsie/biopsie/chirurgicale proaspete, procesate și incluzionate cât mai curând posibil, în același mod precum proba (probele) pacientului. Controalele pozitive de țesut indică țesuturile preparate corect și tehnicile de colorare adecvate. În fiecare ciclu de colorare trebuie inclus un control pozitiv extern de țesut pentru fiecare set de condiții de testare. Țesuturile folosite pentru materialele externe de control pozitiv trebuie selectate din speciunile pacientului cu o colorație pozitivă cunoscută pentru p16^{INK4a}. În cazul în care controalele pozitive nu demonstrează colorarea pozitivă adecvată, rezultatele asociate specimenelor de testare vor fi considerate fără valoare.

Control de țesut negativ

Tipurile de celule cunoscute ca fiind negative la p16^{INK4a}, prezente în majoritatea secțiunilor de țesut, pot fi utilizate de către laborant ca poziții de control intern negativ pentru a verifica specificațiile de performanță IHC. În cazul în care colorația specifică (colorație fals pozitivă) se produce în controlul de țesut negativ, rezultatele asociate specimenelor pacienților trebuie considerate fără valoare.

Controlul de reactiv negativ nespecific

Folosiți Negative Reagent Control nespecific în locul anticorpului primar, cu o secțiune din specimenul fiecărui pacient pentru a evalua colorația nespecifică și pentru a face posibilă o mai bună interpretare a colorației specifice a poziției antigenului.

În cazul în care colorația specifică (colorație fals pozitivă) se produce în Negative Reagent Control, nespecific, rezultatele asociate specimenelor pacienților trebuie considerate nule.

VIII. Interpretarea rezultatelor

Specimenele de control colorate cu Negative Reagent Control ca reactiv primar nu trebuie să prezinte colorație specifică.

Colorația pozitivă folosind anticorpul monoclonal de șoarece anti-uman p16^{INK4a}, clona E6H4™, trebuie evaluată în contextul colorației de fond nespecifice a Negative Reagent Control. La fel ca în cazul oricărui test imunohistochimic, un rezultat negativ indică faptul că nu s-a detectat antigenul și nu că antigenul a fost absent în celulele/țesutul testat.

În interpretarea rezultatelor trebuie să se ia în considerare faptul că p16^{INK4a} este o proteină celulară ce poate fi exprimată la niveluri detectabile atât în leziunile cervicale displazice de grad înalt și în cancerul de col uterin, cât și în unele afecțiuni care nu sunt asociate cu displazia cervicală, chiar dacă la niveluri diferite și cu tipare de expresie diferite.

Specimenele de pe lamele colorate sunt evaluate conform unui sistem binar de

evaluare compus din evaluările „pozitiv” și „negativ”.

Evaluarea „pozitiv” este atribuită dacă specimenul de pe lamă colorat cu p16^{INK4a} prezintă o colorație continuă a celulelor din straturile celulare bazale și parabazale ale epitelului cervical scuamos, cu sau fără colorarea celulelor din straturile celulare superficiale („tipar de colorație difuz”). Un exemplu de lamă evaluată „pozitiv” („tipar de colorație difuz”) este prezentat în Anexa 2, Figura 1.

Evaluarea „negativ” este atribuită dacă specimenul de pe lamă colorat cu p16^{INK4a} prezintă fie o reacție de colorație negativă în epitelul scuamos („tipar negativ de colorație”), fie o colorație a celulelor izolate sau a aglomerărilor de celule mici; și anume, o colorație fără continuitate, în special nu cea a celulelor bazale și parabazale („tipar focal de colorație”). Un exemplu de lamă evaluată „negativ” („tipar focal de colorație”) este prezentat în Anexa 2, Figura 2.

Interpretarea lamelor colorate pentru p16^{INK4a} folosind CINTec® Histology Kit trebuie să se realizeze în asociere cu lame colorate cu H&E preparate din același specimen de țesut cervical. Informațiile suplimentare oferite de lamele colorate cu CINTec® trebuie îmbinate cu diagnosticul preliminar bazat pe morfologie stabilit pe lamele colorate cu H&E în vederea stabilirii unui diagnostic final.

IX. Limitări

- Destinat exclusiv utilizării în scop profesional. Pentru efectuarea procedurilor imunohistochimice este necesară o pregătire specială.
- Interpretarea clinică a colorației pozitive sau negative trebuie evaluată în contextul prezentării clinice, al morfologiei și al altor criterii histopatologice. Interpretarea clinică a colorației pozitive sau negative trebuie completată de studii morfologice folosind controale pozitive și negative, interne și externe, adecvate, dar și alte teste de diagnosticare. Responsabilitatea de a interpreta toate etapele folosite pentru prepararea și interpretarea preparatului de IHC final revine unui patolog calificat, familiarizat cu folosirea corectă a anticorpilor IHC, a reactivilor și a metodelor.
- Rezultatele colorării în imunohistochimie sunt influențate puternic de calitatea țesutului colorat. Prin urmare, etapele de fixare, spălare, uscare, încălzire, secționare sau contaminare cu alte țesuturi contribuie semnificativ la rezultatul global al colorării și poate conduce la artefacte, imobilizarea anticorpilor sau rezultate fals negative. Rezultatele inconsecvente se pot datora variațiilor de fixare și din metodele de incluziune sau neregularităților inerente din țesut.
- Contra-colorarea excesivă sau incompletă poate afecta interpretarea corectă a rezultatelor.
- Producătorul furnizează acești anticorpi/reactivi într-o diluție optimă în vederea utilizării conform instrucțiunilor furnizate în prezentul document, pentru testarea IHC pe secțiuni de țesut preparate. Abaterile de la procedurile de testare recomandate pot anula rezultatele așteptate declarate; trebuie să se utilizeze și să se consemneze controale adecvate. Utilizatorii care se abat de la procedurile de testare recomandate trebuie să își asume responsabilitatea cu privire la interpretarea rezultatelor pacientului în aceste circumstanțe.
- Rezultatele fals-pozitive se pot înregistra ca urmare a fixării non-imunologice a proteinelor sau a produselor de reacție a substratului.

Acestea pot fi cauzate de asemenea de activitatea pseudoperoxidazei (eritrocite) și de activitatea endogenă a peroxidazei (citocrom C).

- Reactivii pot genera reacții neașteptate pe țesuturile netestate anterior. Posibilitatea producerii de reacții neașteptate chiar și în grupurile de țesut testat nu poate fi eliminată complet ca urmare a diversității biologice a expresiei antigenului în neoplasme sau alte țesuturi patologice. Contactați Roche mtm laboratories AG referitor la reacția (reacțiile) neașteptată (neașteptate) consemnată (consemnate). Pentru informații privind asistența tehnică, consultați informațiile de contact furnizate în secțiunea XIII.
- Nu înlocuiți reactivii din kit cu reactivi cu alte numere de lot sau cu reactivi furnizați de alți producători.

X. Caracteristici de performanță

Performanță clinică

Performanța clinică a CINtec® Histology Kit a fost evaluată într-un studiu clinic controlat folosind specimene de țesut cervical fixate în formol, incluzionate în parafină [21]. Studiul a fost conceput pentru a demonstra natura adecvată a CINtec® Histology Kit ca suport în creșterea preciziei diagnosticului și a concordanței interobservator pentru detectarea neoplaziei intraepiteliale cervicale de grad înalt (CIN2+).

Studiul clinic s-a desfășurat pe biopsii cervicale prin trepanație și conizație, colectate retrospectiv. Un total de 500 de specimene cervicale obținute de la două laboratoare de patologie europene și îmbogățite pentru displazie de grad înalt pe baza diagnosticelor originale au fost utilizate pentru prepararea lamelor colorate cu H&E și a lamelor consecutive colorate cu CINtec® Histology Kit în conformitate cu instrucțiunile producătorului.

Trei specialiști europeni în patologie ginecologică au stabilit un diagnostic independent pentru fiecare caz pe baza lamei colorate cu H&E. Cazurile care au prezentat rezultate discrepante au fost supuse unui al doilea proces de analiză în cadrul unei ședințe de judecare, iar diagnosticele majoritare (diagnostice în consens, două din trei) au servit drept diagnostice de referință pentru studiu.

Doisprezece investigatori (specialiști în patologie cervicală care citec periodic patologie cervicală) din 4 țări europene (Franța, Italia, Spania și Germania) au participat la studiu în calitate de patologi experți. Într-o primă serie de interpretări ale lamelor, toți patologii experți au stabilit diagnostice individuale pentru fiecare caz exclusiv pe baza lamelor colorate cu H&E. Patologii nu au cunoscut diagnosticele inițiale și nici diagnosticele care constituiau standardul de aur. După o pauză de peste 4 săptămâni, același set de lame colorate cu H&E (re-etichetate) a fost analizat din nou de toți cei doisprezece patologi, alături de lamele corespunzătoare pentru fiecare caz, colorate cu CINtec® Histology Kit.

Pentru a evalua creșterea preciziei diagnosticului pentru lamele cervicale colorate cu CINtec® Histology citite alături de lamele respective colorate cu H&E în comparație cu lamele cervicale colorate cu H&E exclusiv, rezultatele interpretărilor fiecărui patolog pentru ambele metode au fost comparate cu diagnosticele în consens stabilite ca fiind diagnostice de referință de cei trei specialiști în patologie ginecologică.

Rezultate:

În analiza datelor au fost incluse în total 482 de cazuri cu diagnostice complete

stabilite de toți patologii participanți la studiu. Frecvența diferitelor categorii de diagnostic bazate pe diagnosticele în consens stabilite de către cei trei specialiști în patologie ginecologică a fost negativă pentru displazie (n=194), CIN1 (n=96), CIN2 (69) și CIN3 (n=123).

Precizia diagnosticului în detectarea CIN2+

Sensibilitatea globală în identificarea CIN2+ a crescut de la 1787 (H&E) la 2018 (H&E plus CINtec® Histology) rezultate CIN2+ adevărat pozitive, cu doar o ușoară reducere în specificitatea globală, de la 3088 (H&E) la 3051 (H&E plus CINtec® Histology) rezultate ≤ CIN1 adevărat negative.

Tab. 1

Creșterea preciziei diagnosticului pentru CIN (CIN2+) de grad înalt prin interpretarea corelată a lamelor colorate cu H&E plus CINtec® Histology comparativ cu lamele colorate exclusiv cu H&E; se indică numărul rezultatelor de interpretare adevărat pozitive, fals negative, fals pozitive și adevărat negative comparativ cu diagnosticele de consens stabilite de către patologii specialiști (Notă: concordanța totală cu diagnosticele de consens stabilite de specialiștii patologii ar fi de 2304 (192 cazuri CIN2+, x 12 patologii) rezultate adevărat pozitive).

	Adevărat pozitive	Fals negative	Fals pozitive	Adevărat negative
H&E	1787	517	392	3088
H&E+CINtec® Histology	2018	286	429	3051

Modelul ANOVA de efecte mixte pentru pseudovalorile Jackknife, cunoscut sub numele de metoda Dorfman-Berbaum-Metz (DBM), a fost utilizat pentru testarea efectelor testului CINtec® Histology asupra preciziei.

Ipoteza nulă conform căreia precizia diagnosticului stabilit pe baza lamelor colorate cu H&E comparativ cu cel stabilit pe baza lamelor colorate cu H&E plus CINtec® Histology pentru CIN2+ este egală a fost respinsă cu $p=0,0004$ (aria de sub curbă (AUC) pentru H&E: 0,877; AUC pentru H&E plus CINtec® Histology: 0,925).

Tab. 2

Caracteristicile de performanță pentru interpretarea corelată a lamelor colorate cu H&E plus CINtec® Histology comparativ cu lamele colorate doar cu H&E pentru identificarea CIN (CIN2+) de grad înalt; diagnosticele în consens stabilite de trei specialiști în patologie ginecologică pe baza lamelor colorate cu H&E folosite ca diagnostice de referință

	H&E % (95% CI)	H&E plus CINtec® Histology % (95% CI)
Sensibilitate	77,6% (75,8, 79,3)	87,6% (86,2, 88,9)
Specificitate	88,7% (87,6, 89,8)	87,7% (86,5, 88,8)
PPV	82,0% (80,3, 83,6)	82,5% (80,9, 84,0)
NPV	85,7% (84,5, 86,8)	91,4% (90,4, 92,4)

DLR+	6,885 (6,256, 7,578)	7,105 (6,494, 7,773)
DLR-	0,253 (0,234, 0,273)	0,142 (0,127, 0,158)

95% CI, interval de încredere de 95%; PPV, valoare predictivă pozitivă; NPV, valoare predictivă negativă; DLR+, raport de probabilitate de diagnostic pozitiv; DLR-, raport de probabilitate de diagnostic negativ

Folosind diagnosticele în consens stabilite de către cei trei specialiști în patologie ginecologică drept referință, sensibilitatea în detectarea CIN2+ s-a îmbunătățit cu relativ 13% (sensibilitatea diagnosticelor H&E de 77,6%, crescând la 87,6% pentru diagnosticele stabilite pe baza lamelor colorate cu H&E plus CINtec® Histology).

Creșterea preciziei diagnosticului în CIN2+ a fost demonstrată independent cu o semnificație statistică pentru subgrupurile de biopsii cervicale prin trepanație (n=249; AUC pentru H&E: 0,895; AUC pentru H&E plus CINtec® Histology: 0,929; p=0,0053) și specimene de conizație cervicală (n=233; AUC pentru H&E: 0,887; AUC pentru H&E plus CINtec® Histology: 0,948; p=0,009).

Concordanță interobservator pentru detectarea CIN2+

Pentru evaluarea concordanței interobservator în CIN2+ între patologi, s-a utilizat o formă de evaluare multiplă a statisticii Kappa între diagnosticele stabilite pe baza lamelor cervicale colorate cu H&E și diagnosticele stabilite pe baza lamelor colorate cu H&E interpretate în corelație cu lamele cervicale colorate cu CINtec® Histology.

Tab. 3

Îmbunătățirea concordanței interobservator în CIN2+ prin interpretarea corelată a lamelor colorate cu H&E plus CINtec® Histology comparativ cu lamele colorate doar cu H&E. Sunt indicate valorile Kappa ca măsură corectată întâmplător a concordanței

Categorie de diagnostic	Kappa H&E	Sensibilitate H&E plus CINtec®	Semnificație statistică
CIN2+, toate cazurile	0,580	0,756	p<0,0001
CIN2+, exclusiv biopsii prin trepanație	0,598	0,748	p<0,0001
CIN2+, exclusiv biopsii prin conizație	0,548	0,765	p<0,0001

Statistica kappa ca măsură corectată pe baza probabilității a concordanței dintre patologi pentru CIN2+ s-a îmbunătățit semnificativ pentru interpretările lamelor colorate cu H&E plus CINtec® Histology, comparativ cu lamele colorate exclusiv cu H&E (creștere a valorilor kappa pentru toate cazurile de la 0,580 la 0,756; p<0,0001).

Posibilitatea de redare în evaluarea tiparului de colorație cu p16^{INK4a}

S-a evaluat fiabilitatea în rândul patologiilor din punct de vedere al evaluării tiparului de colorație cu p16^{INK4a} pe specimene de țesut cervical ca p16^{INK4a} pozitiv difuz, p16^{INK4a} pozitiv focal sau negativ pentru p16^{INK4a}.

S-a înregistrat un nivel înalt al posibilității de redare între patologi privind evaluarea tiparului de colorație cu p16^{INK4a} ca fiind pozitiv (tipar de colorație difuz) sau negativ (tipar focal de colorație, sau absența imunoreactivității). S-a demonstrat că valoarea Kappa (măsură corectată pe baza probabilității a concordanței) pentru posibilitatea de redare dintre doisprezece patologi în evaluarea tiparului de colorație cu p16^{INK4a} ca fiind pozitiv (tipar de colorație difuz) sau negativ (tipar focal de colorație și absența imunoreactivității) este excelentă (valoare kappa medie = 0,899; valoare kappa mediană = 0,903).

Performanță analitică

Sensibilitate analitică

Studiul de sensibilitate a fost efectuat cu kit-uri CINtec® Histology din 3 loturi. În cadrul studiului de sensibilitate au fost analizate 35 de biopsii cervicale cu CIN3+, inclusiv 6 biopsii clasificate drept CIN3 și 29 biopsii clasificate drept carcinom scuamocelular.

5 din 6 (83,3%) cazuri clasificate drept CIN3 au demonstrat colorație difuză cu p16. Un caz de biopsie CIN3 a demonstrat o expresie p16 slabă, dar nu a recepționat un semnal p16 pozitiv clar.

22 dintre cele 29 (75,9%) de cazuri clasificate drept carcinom scuamocelular au demonstrat colorație difuză p16. 5 cazuri de carcinom scuamocelular au demonstrat o expresie p16 slabă, dar nu au recepționat un semnal p16 pozitiv clar. Doar 2 dintre cele 29 (6,9%) de cazuri au fost complet negative p16. Acest lucru poate fi explicat prin faptul că, anterior, 3 – 8% dintre cazurile de carcinom scuamocelular au fost negative pentru colorația p16 [1; 6]. Acest lucru poate reflecta un procentaj mic de cazuri în care dediferențierea și rearanjamentele cromozomiale au condus la inactivarea sau ștergerea locusului genei p16.

Pentru toate cele 3 loturi, colorația unui grup bine caracterizat de secțiuni de țesut de șobolan utilizând Negative Reagent Control a condus la o colorație puternică și specifică a neuronilor individuali ai creierului de șobolan. În plus, anumite celule canaliculare ale rinichiului, macrofagele individuale ale splinei, precum și macrofagele individuale și celulele plasmatică ale intestinului subțire au demonstrat colorație slabă. Alte țesuturi din matricea de țesuturi de șobolan au fost complet negative.

Anticorpul anti-p16 E6H4™ poate reda colorația continuă a celulelor straturilor de celule bazale și parabazale, cu sau fără colorația celulelor straturilor intermediare sau a celor intermediare și superficiale ale epiteliului scuamos în cazul biopsiilor cervicale cu CIN de grad înalt (CIN2 CIN3). Negative Reagent Control (NRC) are capacitatea de a detecta în mod specific neuronii șobolanului.

Specificitate analitică

Specificitatea anticorpului de șoarece anti-uman p16^{INK4a}, clona E6H4™, a fost verificată prin analiza Western blot (pozitiv pentru lizatul liniei celulare HeLa; consultați și [1]).

Studiul de specificitate a fost efectuat cu kit-uri CINtec® Histology din 3 loturi, pe un grup bine caracterizat de 90 de probe de țesut normal fixat în NBF (formol neutru cu soluție tampon) (30 de tipuri diferite de țesut) și 54 de țesuturi tumorale, altele decât cele de col uterin (aranjate în matrice multitisulare = MTA).

Pentru colorația folosind anticorpul specific p16 (clona E6H4™) pe țesuturi normale, au fost observate 16 țesuturi diferite negative pentru p16 (creier mare, cerebel, glandă suprarenală, glandă tiroidă, măduvă osoasă, inimă, esofag, stomac, intestin,

colon, ficat, rinichi, mușchi striat, piele, mezoteliu, col uterin) și 14 țesuturi diferite pozitive pentru p16 (colorație slabă: hipofiză, plămân, timus, prostată; pozitive: nervi, intestin, amigdale, pancreas, splină; puternic pozitive: uter, ovare, sâni, testicule, paratiroidă). Pentru colorație folosind un anticorp specific p16 (clona E6H4™) pe alte țesuturi tumorale decât colul uterin, au fost observate 22 de cazuri diferite de tumoră negative pentru p16 și 32 de cazuri diferite de tumoră pozitive pentru p16.

Pentru toate cele 3 loturi de CINtec® Histology, rezultatele au fost negative pentru toate țesuturile (cele normale și cele tumorale) testate la folosirea Negative Reagent Control. Anticorpul monoclonal de șoarece anti-neurofizină de șobolan cuplată la oxitocină nu reacționează în mod semnificativ cu probele de țesut uman normal și cele de țesut uman tumoral.

Posibilitate de redare

Posibilitate de redare inter-ciclu

Posibilitatea de redare inter-ciclu a fost determinată pentru CINtec® Histology Kit cu ajutorul protocolului manual, prin colorarea a 36 de lame preparate din blocuri de țesut diagnosticate cu CIN2+. Zonele displazice din toate secțiunile au fost colorate la o intensitate similară (+/- 0,5 pe o scară de la 0 la 3) în toate ciclurile. Zonele normale de pe toate lamele nu au prezentat o colorație specifică.

Posibilitate de redare intra-ciclu

Posibilitatea de redare intra-ciclu a fost determinată cu ajutorul CINtec® Histology Kit, cu protocol manual și pe instrumentul automat de colorare, în trei zile diferite. În total, au fost incluse trei blocuri de țesut diagnosticate cu CIN2+. În fiecare zi, din fiecare bloc a fost inclusă o secțiune în serie. Zona displazică din cadrul secțiunilor unui bloc a fost colorată la o intensitate similară (+/- 0,5 pe o scară de la 0 la 3) în fiecare zi și, de asemenea, în colorarea manuală și automată. Zonele normale de pe toate lamele nu au prezentat o colorație specifică.

Posibilitate de redare inter-lot

Pentru a determina posibilitatea de redare inter-lot, s-au utilizat CINtec® Histology Kits din 3 loturi diferite pentru colorarea secțiunilor din cazurile CIN2+. Colorarea manuală și automată s-a realizat în conformitate cu protocolul indicat în instrucțiunile de utilizare. Zona displazică din cadrul secțiunilor unui bloc a fost colorată la o intensitate similară (+/- 0,5 pe o scară de la 0 la 3) cu reactivii din toate cele trei loturi, în colorare manuală și automată. Zonele normale de pe toate lamele nu au prezentat o colorație specifică.

Rețineți că metoda de evaluare a intensității colorației cu o scară de la 0 la 3 a fost utilizată exclusiv pentru evaluarea performanței analitice și nu va fi utilizată pentru interpretarea colorației secțiunilor de țesut în practica clinică. În schimb, pentru interpretarea de rutină va fi utilizată interpretarea calitativă a lamelor colorate conform descrierii din Secțiunea VIII.

XI. Depanare

Consultați secțiunea XIII. pentru detalii de contact în cazul în care este necesară asistență tehnică.

Problemă	Cauză probabilă	Măsură recomandată
1. Absența colorației lamelor	<u>1a.</u> Abatere de la Instrucțiunile de utilizare;	<u>1a.</u> Citiți cu atenție instrucțiunile de utilizare și respectați procedurile specificate în acestea;
2. Colorație slabă a lamelor	<u>2a.</u> Extragere inadecvată a epitopului;	<u>2a.</u> Folosiți Epitope Retrieval Solution proaspăt pregătită și/sau asigurați-vă că Epitope Retrieval Solution atinge 95 – 99 °C timp de 10 minute și că este lăsată să se răcească timp de încă 20 de minute;
	<u>2b.</u> Durate inadecvate de incubare a reactivilor;	<u>2b.</u> Revedeți 2.2. / 3.2. Recomandări ale protocolului de colorare;
	<u>2c.</u> Metodă de fixare inadecvată;	<u>2c.</u> Asigurați-vă că țesutul pacientului nu este fixat excesiv și că nu s-a utilizat o soluție de fixare alternativă;
	<u>2d.</u> Apa utilizată pentru diluarea soluției de extragere a epitopului conține o concentrație de ioni prea ridicată;	<u>2d.</u> Asigurați-vă că respectiva coloană de schimb de ioni pentru producerea apei deionizate a fost verificată în cadrul procedurii de întreținere de rutină;

	<u>2e.</u> Deparafinare necorespunzătoare;	<u>2e.</u> Utilizatorii trebuie să rețină faptul că variațiile de temperatură ale echipamentului sau de durată a expunerii de pe parcursul preparării preanalitice a probei pot conduce la îndepărtarea incompletă a parafinei de pe lamele cu țesut. Parafina reziduală poate conduce la colorarea incompletă cu orice colorant histologic, incluzând colorația CINTec® Histology. Laboratoarele de histopatologie ar trebui să includă monitorizarea periodică a echipamentului pentru a reduce variația din prepararea probelor dinainte de colorare. În cazul oricărei colorații imuno-histochimice, observarea marginilor bine conturate din zonele de țesut imuno-reactiv sau a altor inconsecvențe de colorație de pe o lamă poate constitui un indicator al procesării preanalitice incomplete sau necorespunzătoare a specimenului. Dacă se observă o colorație neconsecventă, utilizatorii ar trebui să ia în considerare verificarea echipamentului și a metodelor de preparare preanalitică a probei;
3. Colorație de fond excesivă a lamelor	<u>3a.</u> Îndepărtare incompletă a parafinei;	<u>3a.</u> Folosiți băi proaspete cu xilen și urmați procedura detaliată în Secțiunea 2.1. / 3.1.;
	<u>3b.</u> Montarea secțiunilor pe lame realizată cu ajutorul aditivilor din amidon;	<u>3b.</u> Aditivii din amidon folosiți în montarea secțiunilor pot prezenta imunoreactivitate și de aceea se recomandă evitarea acestora;
	<u>3c.</u> Clătire insuficientă a lamelor;	<u>3c.</u> Folosiți soluție proaspătă în băi cu soluție tampon și spălați flacoanele;
	<u>3d.</u> Uscarea secțiunilor în timpul procedurii de colorare;	<u>3d.</u> Folosiți camera umedă. Ștergeți doar trei sau patru lame odată înainte de aplicarea reactivului;
	<u>3e.</u> Metodă de fixare inadecvată;	<u>3e.</u> Folosiți exclusiv soluția de fixare recomandată. Țesutul fixat incorrect poate prezenta o colorație de fond excesivă;

	3f. Fixarea nespecifică a reactivilor la țesut;	3f. Verificați metoda de fixare a specimenului, respectiv dacă este prezentă necroza;
4. Țesutul se desprinde de pe lame	4a. Folosirea necorespunzătoare; lamelor	4a. Urmăriți recomandarea descrisă aici și folosiți lame SuperFrost® Plus;
5. Colorație specifică excesiv de puternică	5a. Metodă de fixare inadecvată;	5a. Asigurați-vă că se folosește substanța de fixare și metoda de fixare adecvată;
	5b. Durate prelungite de incubare a reactivilor;	5b. Consultați și respectați protocolul de colorație prezentat în secțiunile 2.2/3.2 de mai sus;
	5c. Soluție de spălare inadecvată;	5c. Folosiți Wash Buffer (10 x) (număr de catalog 10215364001).

XII. Simboluri

Simbol:



Explicație:

Număr de catalog
Cod lot
Număr global al articolului comercial (GTIN)
Identificator unic al dispozitivului
Dispozitiv medical de diagnosticare in vitro
Producător
Conținut suficient pentru <n> teste
Consultați instrucțiunile de utilizare
A se folosi înainte de
Limitare de temperatură
Data fabricației
Nu reutilizați
Informații de contact pentru asistență tehnică (telefon)
Conține materiale de origine animală
Conținut

XIII. Producător

Produs de:

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim
Germany

<https://navifyportal.roche.com>

**Informații de contact
pentru asistență
tehnică (telefon):** +800 5505 6606

Rezumatul privind siguranța și performanța poate fi găsit la următoarea adresă:

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

XIV. Starea revizuirii

Instrucțiunile de utilizare curente reprezintă versiunea 1.0 lansată în iunie 2024.

Modificări față de versiunea anterioară pentru produsul 9511 / 06594441001 (2.9, lansată în decembrie 2022):

- Producătorul și-a schimbat numele din Roche mtm laboratories AG în Roche Diagnostics GmbH și, astfel, a fost emis noul număr de produs, 10213370001
- Modificări editoriale

XV. Proprietate intelectuală

CINtec este marcă comercială a Roche.

Toate celelalte mărci comerciale sunt proprietatea deținătorilor respectivi.

© **2024 Roche**

Anexa 1

Referințe

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

14. Kalof AN, Evans MF, Simmons-Arnold L, Beatty BG, and Cooper K. p16^{INK4a} Immunoeexpression and HPV In Situ Hybridization Signal Patterns Potential Markers of High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2005, 29(5):674-9
15. Ansari-Lari MA, Staebler A, Zaino RJ, Shah KV, and Ronnett BM. Distinction of Endocervical and Endometrial Adenocarcinomas: Immunohistochemical p16 Expression Correlated With Human Papillomavirus (HPV) DNA Detection. *Am J Surg Pathol* 2004, 28(2):160-7
16. Regauer S, and Reich O. CK17 and p16 expression patterns distinguish (atypical) immature squamous metaplasia from high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). *Histopathology* 2007, 50(5):629-35
17. Stoler MH, and Schiffman M. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations. *JAMA* 2001, 285(11):1500-5
18. McCluggage WG, Walsh MY, Thornton CM, Hamilton PW, Date A, Caughley LM, and Bharucha H. Inter- and intra-observer variation in the histopathological reporting of intraepithelial lesions using a modified Bethesda grading system. *Br J Obstet Gynaecol* 1998, 105(2):206-10
19. Ismail SM, Colclough AB, Dinnen JS, Eakins D, Evans DMD, Gradwell E, O'Sullivan JPO, Summerell JM, and Newcombe R. Reporting cervical intraepithelial neoplasia (CIN): intra- and interpathologist variation and factors associated with disagreement. *Histopathology* 1990, 16(4):371-6
20. De Vet HCW, Knipschild PG, Schouten HJ, Koudstaal J, Kwee W-S, Willebrand D, Sturmans F, and Arends JW. Interobserver variation in histopathological grading of cervical dysplasia. *J Clin Epidemiol* 1990, 43(12):1395-8
21. Bergeron C, Ordi J, Schmidt D, Trunk MJ, Keller T, and Ridder R, for the CINtec Histology Study Group. Conjunctive p16^{INK4a} testing significantly increases accuracy in diagnosing high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol* 2010, 133(3):395-406
22. Sayed K, Korourian S, Ellison DA, Kozlowski K, Talley L, Horn HV, et al. Diagnosing cervical biopsies in adolescents: the use of p16 immunohistochemistry to improve reliability and reproducibility. *J Low Genit Tract Dis* 2007, 11(3):141-6
23. Gurrola-Diaz CM, Suarez-Rincon AE, Vazquez-Camacho G, Buonocunto-Vazquez G, RosalesQuintana S, Wentzensen N, et al. p16^{INK4a} immunohistochemistry improves the reproducibility of the histological diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia in cone biopsies. *Gynecol Oncol* 2008, 111(1):120-4
24. Horn LC, Reichert A, Oster A, Arndal SF, Trunk MJ, Ridder R, et al. Immunostaining for p16^{INK4a} used as a conjunctive tool improves interobserver agreement of the histologic diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2008, 32(4):502-12
25. Haidopoulos D, Partsinevelos GA, Vlachos GD, Rodolakis A, Markaki S, Voulgaris Z, et al. p16^{INK4A} is a strong biomarker for cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical carcinoma: a reappraisal. *Reprod Sci* 2009, 16(7):685-93
26. Lesnikova I, Lidang M, Hamilton-Dutoit S and Koch J. p16 as a diagnostic marker of cervical neoplasia: a tissue microarray study of 796 archival specimens. *Diagn Pathol* 2009, 4:22
27. Ordi J, Garcia S, del Pino M, Landolfi S, Alonso I, Quinto L, et al. p16^{INK4a} immunostaining identifies occult CIN lesions in HPV-positive women. *Int J Gynecol Pathol* 2009, 28(1):90-7

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

Anexa 2

Exemplu de tipar de colorație difuz

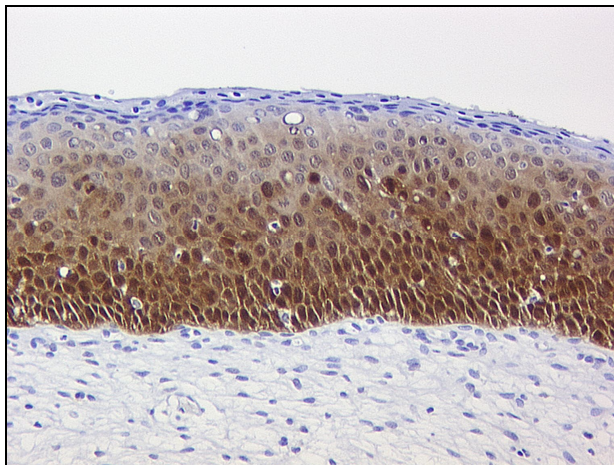


Fig. 1: CIN 3

Exemplu de tipar focal de colorație

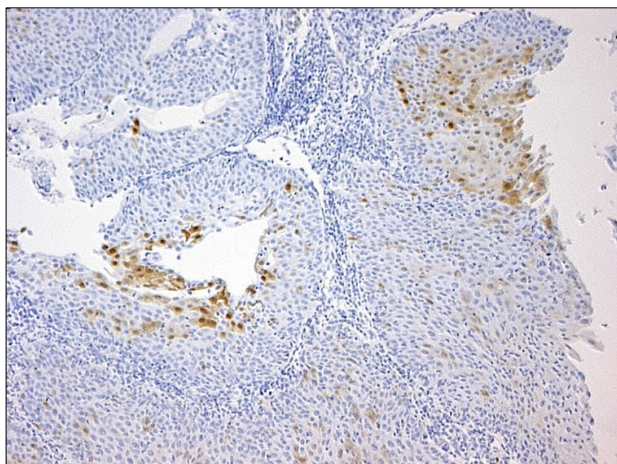


Fig. 2: Metaplazie scuamoasă, matură