

Istruzioni per l'uso

CINtec[®] Histology Kit

CINtec[®] Histology Kit è un test immunoistochimico per l'identificazione qualitativa dell'antigene p16^{INK4a} su sezioni di tessuto preparate da biopsie cervicali fissate in formalina e incluse in paraffina. L'uso è inteso in associazione con vetrini colorati con H&E preparati dallo stesso campione di tessuto cervicale come un ausilio per incrementare l'accuratezza diagnostica e la concordanza inter-osservatore per la diagnosi delle neoplasie intra-epiteliali cervicali di alto grado.



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim
Germany

<https://navifyportal.roche.com>

REF

10213370001

GTIN

07613336230350



50



2 – 8 °C



0123

IVD



Indice

ITALIANO.....	2
I. Nome del prodotto	2
II. Uso previsto	2
III. Sintesi e descrizione del dispositivo.....	2
Sintesi e descrizione	2
Significatività clinica	3
Principio della procedura.....	4
IV. Reagenti.....	4
Materiali forniti.....	4
Conservazione	6
Materiali e reagenti necessari ma non forniti	7
Apparecchiatura necessaria.....	7
V. Avvertenze e precauzioni	8
Avvertenza.....	8
Attenzione.....	8
VI. Procedura.....	9
Preparazione dei campioni.....	9
Campioni di tessuto inclusi in paraffina	9
Trattamento per lo smascheramento dell'epitopo indotto da calore	10
Procedura di colorazione	10
1. Preparazione dei reagenti	10
1.1 Soluzione per lo smascheramento dell'epitopo	10
1.2 Tampone di lavaggio	10
1.3 Substrate-Chromogen Solution (DAB)	11
1.4 Colorante di contrasto.....	11
1.5 Mezzo di montaggio.....	11
2. Procedura di colorazione per strumenti Autostainer	11
2.1 Rimozione della paraffina e reidratazione	11
2.2 Protocollo di colorazione per strumenti Autostainer	12
3. Procedura di colorazione per uso manuale	14
3.1 Rimozione della paraffina e reidratazione	15
3.2 Protocollo di colorazione per uso manuale	15
VII. Controllo qualità.....	17
VIII. Interpretazione dei risultati	18
IX. Limitazioni	19
X. Caratteristiche di performance.....	20
XI. Risoluzione dei problemi.....	25
XII. Simboli	28
XIII. Fabbricante	28
XIV. Stato di revisione	28
XV. Proprietà intellettuale	29
Annex 1 Bibliografia.....	30
Annex 2	33

ITALIANO

I. Nome del prodotto

CINtec® Histology Kit

II. Uso previsto

Per uso diagnostico in vitro.

CINtec® Histology Kit è un test immunoistochimico per l'identificazione qualitativa dell'antigene p16^{INK4a} su sezioni di tessuto preparate da biopsie cervicali fissate in formalina e incluse in paraffina.

L'uso è inteso in associazione con vetrini colorati con H&E preparati dallo stesso campione di tessuto cervicale come un ausilio per incrementare l'accuratezza diagnostica e la concordanza inter-osservatore per la diagnosi delle neoplasie intra-epiteliali cervicali di alto grado.

Il test è destinato all'uso manuale o all'uso sugli strumenti Autostainer.

Questo test deve essere interpretato da un patologo qualificato unitamente all'esame istologico, alle informazioni cliniche pertinenti e agli adeguati controlli.

III. Sintesi e descrizione del dispositivo

Sintesi e descrizione

CINtec® Histology Kit si basa su un anticorpo monoclonale murino (clone E6H4®) diretto contro la proteina p16^{INK4a} umana.

La proteina p16^{INK4a} è un inibitore della chinasi ciclina-dipendente che svolge un ruolo importante nella regolazione del ciclo cellulare delle cellule eucariote. Esso partecipa al controllo mediato dalla proteina retinoblastoma (pRB) della transizione di fase G1-S e attiva l'arresto del ciclo cellulare nel corso di processi di differenziazione cellulare. Nelle cellule epiteliali differenziate in fase finale, la p16^{INK4a} è espressa a livelli tipicamente non determinabili dall'immunoistochimica.

In molte entità tumorali, è stato osservato che il gene p16^{INK4a} viene reso inattivo dal punto di vista funzionale da mutazione genica o ipermetilazione del promotore. È stato dimostrato che tale inattivazione del gene p16^{INK4a}, un soppressore tumorale, contribuisce alla disregolazione del ciclo cellulare e alla perdita di controllo della proliferazione cellulare.

Tuttavia, nelle cellule epiteliali cervicali replicazione-competenti, in cui le proteine tumorali ad alto rischio di papillomavirus umano (HR-HPV) hanno dato inizio al processo di trasformazione cellulare, l'espressione della p16^{INK4a} ha dimostrato un'elevata up-regulation [1; 2]. Questa forte iper-espressione di p16^{INK4a} è stata fortemente associata, a livello molecolare, all'attività delle proteine tumorali E7 del HR-HPV. È stato dimostrato che l'iper-espressione di p16^{INK4a} riflette l'inattivazione mediata dalla proteina tumorale E7 del complesso funzionale fra pRB e il fattore di trascrizione E2F che è una delle tappe fondamentali nel corso della trasformazione

cellulare indotta da HR-HPV [3].

Numerosi studi in letteratura hanno rivelato che l'iper-espressione della proteina p16^{INK4a} è stata osservata a livello immunoistochimico in una proporzione molto elevata di casi di displasia cervicale precancerosa di alto grado (ad es. nell'80 – 100% delle lesioni CIN2 e praticamente in tutte le lesioni CIN3) e di carcinomi invasivi. È stato evidenziato che le lesioni intraepiteliali cervicali di basso grado (CIN1) mostrano l'iper-espressione di p16^{INK4a} a livelli variabili, generalmente entro un range di 30 – 60% [1; 2; 4-16].

L'interpretazione dei risultati deve prendere in considerazione il fatto che la p16^{INK4a} è una proteina cellulare che può essere espressa a livelli individuabili nelle lesioni displastiche e nei carcinomi cervicali nonché in alcune condizioni non associate a displasia cervicale sebbene a diversi livelli e con diversi modi di espressione. I preparati di tessuto istologico hanno una morfologia del tessuto intatta per favorire l'interpretazione della positività alla p16^{INK4a} della lesione cervicale. È stato osservato che uno schema di colorazione diffuso, ovvero una colorazione continua delle cellule degli strati cellulari basali e parabasali, con o senza colorazione delle cellule degli strati cellulari superficiali, è indice di un risultato positivo del test per l'iper-espressione di p16^{INK4a}. È stato dimostrato che questo schema di colorazione fornisce il maggior livello sia di sensibilità che di specificità per una CIN di grado elevato [1; 4; 5]. Invece, uno schema di colorazione focale (colorazione di cellule isolate o piccoli ammassi di cellule, ad es. colorazione non continua, in particolare non delle cellule basali e parabasali) nonché la mancanza di qualsiasi immuno-reattività è considerata un risultato del test negativo per l'iper-espressione di p16^{INK4a} [1; 4; 5].

L'interpretazione dei vetrini colorati per p16^{INK4a} utilizzando CINtec® Histology Kit deve essere effettuata in combinazione con vetrini colorati con EE preparati dallo stesso campione di tessuto cervicale. Le informazioni aggiuntive fornite dai vetrini colorati CINtec® devono essere combinate con la diagnosi preliminare basata sulla morfologia ottenuta dai vetrini colorati con EE in modo da stabilire una diagnosi finale.

Significatività clinica

È stato evidenziato che la lettura combinata di vetrini colorati con EE costituiti da sezioni di biopsie cervicali e consecutivamente di vetrini dello stesso campione di tessuto e immunocolorati per p16^{INK4a} migliora l'accuratezza diagnostica e l'accordo inter-osservatore nella diagnosi di neoplasia intraepiteliale cervicale di grado elevato (CIN2+).

La diagnosi patologica posta sulle sezioni di tessuto cervicale colorate con EE rappresenta la base per decidere di effettuare ulteriori terapie. Di conseguenza l'impatto di una diagnosi imprecisa è significativo. Una diagnosi imprecisa può determinare una gestione inadeguata della paziente, per esempio attraverso la prestazione di cure eccessive a donne essenzialmente sane o di cure insufficienti a donne con lesioni displastiche accertate di grado elevato.

L'interpretazione diagnostica di sezioni di tessuto istologico colorate con EE è soggetta ad un elevato tasso di disaccordo fra i patologi. In numerose pubblicazioni sono stati riferiti livelli bassi di accordo inter- e intra-osservatore nell'istologia della cervice [17-20].

Un vasto studio multicentrico condotto negli Stati Uniti ha valutato l'interpretazione di analisi di campioni cervicali istologici (2.237 biopsie colposcopiche e 535

campioni bioptici di conizzazione LEEP) da parte di numerosi patologi ben preparati; la riproducibilità delle interpretazioni istopatologiche è stata solo moderata ($\kappa = 0,46$ per biopsia punch e $\kappa = 0,49$ per campioni bioptici LEEP) [17]. Mediante il sistema di classificazione dell'OMS e uno di Bethesda modificato, l'accordo interosservatore di sei istopatologi che hanno valutato 125 campioni di biopsia colposcopica si è rivelato scarso per entrambi i sistemi di classificazione [18]. Analogamente, uno studio condotto nel Regno Unito ha evidenziato lo scarso accordo inter-osservatore fra otto istopatologi esperti che hanno esaminato 100 campioni bioptici colposcopici (coefficiente kappa non pesato di 0,358) [19].

Aggiungendo vetrini colorati con il CINtec® Histology Kit ai vetrini convenzionali colorati con EE utilizzati per accertare le diagnosi, la precisione generale di questa procedura diagnostica istomorfologica migliora [21-39].

Principio della procedura

CINtec® Histology Kit contiene una serie di reagenti per l'identificazione immunoistochimica dell'antigene p16^{INK4a}. Il Kit è progettato per eseguire una procedura di colorazione immunoistochimica in due fasi per campioni di tessuto fissati in formalina e inclusi in paraffina ottenuti da biopsie cervicali. Per l'identificazione dell'antigene si utilizza un clone dell'anticorpo monoclonale murino primario E6H4® diretto alla proteina umana p16^{INK4a}.

Il kit utilizza un reagente di visualizzazione pronto all'uso contenente un polimero, reagente coniugato con perossidasi di rafano e frammenti di anticorpo Fab' anti-topo di capra. Il reagente di visualizzazione è stato sottoposto all'assorbimento della fase solida per eliminare la reattività incrociata con le immunoglobuline umane. La reazione del cromogeno si basa sulla conversione mediata da perossidasi di rafano di un cromogeno DAB in un prodotto di reazione visibile in corrispondenza del sito dell'antigene. Dopo averlo controcolorato, il campione può essere coperto da un vetrino coprioggetto e i risultati possono essere valutati per mezzo di esame al microscopio ottico.

IV. Reagenti

Materiali forniti

I materiali elencati di seguito sono inclusi in ogni kit e sono sufficienti per eseguire 50 test e 50 reazioni di controllo negativo. Il numero di test si basa sull'uso di 200 µL di reagenti per vetrino.

1 Peroxidase Blocking Reagent

Reagente di blocco della perossidasi

2 x 11,5 mL, pronto all'uso

3% di perossido di idrogeno contenente 15 mmol/L di sodio azide (NaN₃).

EUH210 Scheda dati di sicurezza disponibile su richiesta.

2 Mouse anti-Human p16^{INK4a} Antibody

Anticorpo murino antiumano p16^{INK4a}

11,5 mL, pronto all'uso

Anticorpo monoclonale murino anti-umano p16^{INK4a} (~1 µg/mL), Clone E6H4TM, fornito in 50 mmol/L di tampone Tris pH 7.2 contenente 15 mmol/L di sodio azide (NaN₃) e proteina stabilizzante.

3 Visualization Reagent

Reagente di visualizzazione

2 x 11,5 mL, pronto all'uso



Attenzione

H317 Può provocare una reazione allergica cutanea.

P261 Evitare di respirare la polvere/ i fumi/ i gas/ la nebbia/ i vapori/ gli aerosol.

P272 Gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro.

P280 Indossare guanti.

P333 + P313 In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.

P362 + P364 Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

P501 Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto d'eliminazione di rifiuti autorizzato.

Componenti pericolosi:

26172-54-3 2-metil-2H-isotiazol-3-one, cloridrato

55965-84-9 Miscela di: 5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3-one [n. CE 247-500-7]; 2-metil-2H-isotiazol-3-one [n. CE 220-239-6] (3:1)

Polimero reagente coniugato con perossidasi di rafano e frammenti di anticorpo Fab' anti-topo di capra purificati per affinità, forniti in soluzione stabilizzante contenente agenti antimicrobici e proteina stabilizzante.

4 Negative Reagent Control

Reagente di controllo negativo

11,5 mL, pronto all'uso

Anticorpo monoclonale murino anti-ratto della neurofisina ossitocina-correlata (~1 µg/mL) fornito in 50 mmol/L di tampone Tris a pH 7.2 contenente 15 mmol/L di sodio azide (NaN₃) e proteina stabilizzante. Da utilizzare per la verifica della specificità della colorazione. La neurofisina ossitocina-correlata di ratto non è presente in tessuti umani.

5 DAB Buffered Substrate

Substrato tamponato DAB

31 mL

Soluzione tampone del substrato pH 7.5 contenente <0,1% di perossido di

idrogeno, stabilizzatori e agenti di potenziamento.

6 DAB Chromogen

Cromogeno DAB

0,85 mL, soluzione cromogena 3,3'-diaminobenzidina.



Pericolo

H314 Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.

H341 Sospettato di provocare alterazioni genetiche.

H350 Può provocare il cancro.

P201 Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso.

P280 Indossare guanti/ indumenti protettivi/ Proteggere gli occhi/ il viso.

P303 + P361 + P353 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle.

P304 + P340 + P310 IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico.

P305 + P351 + P338 + P310 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico.

P308 + P313 IN CASO di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico.

Componenti pericolosi:

868272-85-9 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate

NOTA: Per lo smaltimento consultare le direttive federali, statali o locali.

7 Epitope Retrieval Solution 10 X

Soluzione per lo smascheramento dell'epitopo 10 X

500 mL, 100 mmol/L di tampone Tris pH 9 contenente 10 mmol/L di EDTA e 15 mmol/L di sodio azide (NaN₃).

Conservazione

Conservare a 2–8 °C. Non usare dopo la data di scadenza. Non sono stati prodotti dati in merito alla conservazione dei reagenti in condizioni diverse da quelle specificate in precedenza.

Dopo l'apertura, i componenti del kit sono stabili per 6 mesi, se conservati a 2–8 °C. Le soluzioni devono essere smaltite se appaiono torbide.

Il tampone di lavaggio diluito e la soluzione per lo smascheramento dell'epitopo diluita sono stabili per 1 mese se conservati a 2-8°C. Le soluzioni non devono essere utilizzate se appaiono torbide.

Materiali e reagenti necessari ma non forniti

Nel kit non è incluso, ma è fornito, un tampone di lavaggio (**CINtec Wash Buffer 10X**) da utilizzare insieme a CINtec® Histology Kit, numero di catalogo 10215364001, Roche. Pour vos commandes, consulter notre site www.roche.com.

500 mmol/L di tampone Tris con 1.5 mol/L NaCl, pH 7.6, contenente detergent e agenti antimicrobici.



Attenzione

H317 Può provocare una reazione allergica cutanea.

P261 Evitare di respirare la polvere/ i fumi/ i gas/ la nebbia/ i vapori/ gli aerosol.

P272 Gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro.

P280 Indossare guanti.

P333 + P313 In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.

P362 + P364 Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

P501 Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto d'eliminazione di rifiuti autorizzato.

Componenti pericolosi:

55965-84-9 Miscela di: 5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3-one [n. CE 247-500-7]; 2-metil-2H-isotiazol-3-one [n. CE 220-239-6] (3:1)

Panni assorbenti;

Colorante di contrasto: ematossilina;

Acqua distillata o deionizzata (acqua per lavaggio);

Etanolo, 95% e 70%;

Mezzo di montaggio;

Tessuti negativi e positivi da usare come controlli di processo;

Vetrini (SuperFrost® Plus o equivalenti);

Xilene;

Vetrini copri oggetto.

Apparecchiatura necessaria

Opzionale: stufa di asciugatura in grado di mantenere una temperatura di 60°C o inferiore;

Opzionale: strumento Dako o LabVision Autostainer;

Camera umida (opzionale);

Microscopio ottico (ingrandimento obiettivo 4 – 40x);

Vaschette o bagni per la colorazione;

Flaconi di lavaggio;

Contaminuti (per intervalli di 2 – 60 minuti);

Bagnomaria con coperchio (capace di mantenere la soluzione per lo smascheramento dell'epitopo a 95-99°C).

V. Avvertenze e precauzioni

Avvertenza

1. Attenzione: alcuni dei reagenti inclusi in questo kit contengono agenti chimici pericolosi. Durante la manipolazione dei componenti di questo kit, adottare le precauzioni di sicurezza per il trattamento di reagenti di laboratorio pericolosi.
2. I componenti 1, 2, 4 e 7 di questo prodotto contengono sodio azide (NaN_3), una sostanza fortemente tossica in forma pura. Sebbene non sia classificata come pericolosa, la sodio azide, alle concentrazioni del prodotto, può reagire con il piombo e il rame delle tubature formando accumuli di azidi metalliche fortemente esplosivi. Durante lo smaltimento, sciacquare le tubature con abbondante acqua per impedire l'accumulo di azidi metalliche.
3. I componenti 2, 3 e 4 contengono una sostanza di origine animale. Adottare le appropriate procedure previste per il trattamento dei prodotti di origine biologica.
4. La scheda di dati di sicurezza del kit è disponibile su richiesta.
5. I campioni istologici, prima e dopo la fissazione, e tutti i materiali ad essi esposti, devono essere trattati e smaltiti rispettando le precauzioni di sicurezza per la manipolazione di sostanze potenzialmente infettive e gli obblighi per un appropriato smaltimento dei rifiuti.
6. Non pipettare mai i reagenti con la bocca. Evitare che la cute e le mucose vengano a contatto con reagenti e campioni. Nell'eventualità che reagenti o campioni entrino in contatto con la cute o le mucose, lavare con abbondante acqua.
7. Il Reagente di visualizzazione e il cromogeno DAB possono essere danneggiati se esposti a livelli di luce eccessivi. Non conservare i componenti del kit o eseguire colorazione in condizioni di luce intensa, come nel caso di luce solare diretta.
8. Indossare adeguati dispositivi di protezione personale per evitare il contatto con occhi e cute durante la manipolazione dei componenti inclusi o da utilizzare insieme a CINtec® Histology Kit. Per ulteriori informazioni, fare riferimento alla scheda di dati di sicurezza (Safety Data Sheet, SDS).
9. L'etichettatura di sicurezza dei prodotti segue essenzialmente le linee guida EU GHS.

Attenzione

1. Per uso diagnostico in vitro.
2. Solo per uso professionale.

3. Ridurre al minimo la contaminazione microbica di reagenti per evitare una colorazione aspecifica.
4. L'impiego di tempi, temperature o metodi di incubazione diversi da quelli specificati può determinare risultati errati.
5. Non utilizzare il kit se la confezione di alcuni suoi componenti è danneggiata. Qualora la confezione o i componenti dovessero risultare danneggiati, informare immediatamente l'azienda produttrice.
6. Lo smaltimento di tutti i materiali di scarto deve essere eseguito nel rispetto delle linee guida e delle normative locali.
7. Tutti i reagenti sono formulati specificatamente per l'uso con questo test. Per eseguire il test secondo quanto specificato, non effettuare alcuna sostituzione.
8. Qualora si osservi una colorazione imprevista che non sia spiegabile da una variazione nelle procedure di laboratorio, ma si sospetti un problema con CINtec® Histology Kit, fare immediatamente riferimento alle informazioni di contatto disponibili nella Sezione XIII per ulteriori dettagli sull'assistenza tecnica.
9. Il malfunzionamento del prodotto a causa di problemi di manipolazione o di instabilità non mostra segni evidenti. Pertanto, come misura di controllo della qualità, è opportuno eseguire controlli positivi e negativi contemporaneamente con campioni del paziente.
10. Per segnalare sospetti incidenti gravi correlati a questo dispositivo, contattare il rappresentante locale Roche e l'autorità competente dello Stato membro o del paese in cui risiede l'utilizzatore.

VI. Procedura

Preparazione dei campioni

CINtec® Histology Kit è ideato per essere utilizzato con campioni di tessuto conservati per procedure immunoistochimiche. I campioni devono essere preparati in conformità con i metodi standard di preparazione del tessuto.

Per prestazioni ottimali si consigliano vetrini a carica positiva come SuperFrost® Plus.

Campioni di tessuto inclusi in paraffina

Sono idonei all'uso con questo kit campioni di tessuto inclusi in paraffina e fissati in formalina tamponata neutra preparati con i metodi standard ordinari. Qualora i campioni vengano preparati utilizzando un diverso metodo di conservazione, l'operatore deve verificarne l'idoneità.

I campioni biotici devono essere fissati per 18-24 ore in formalina tamponata neutra (si raccomanda al 10%) e bloccati in uno spessore di 3 o 4 mm. In seguito, i blocchi di tessuto vengono disidratati applicando una serie di alcol e xilene, quindi infiltrati con paraffina fusa mantenuta a non più di 60°C. Ciascun blocco di tessuto sarà diviso in sezioni di 4 – 5 µm e montato su vetrini SuperFrost® Plus per microscopio da un laboratorio di istopatologia. I vetrini devono essere colorati immediatamente, poiché l'antigenicità delle sezioni di tessuto tagliate può diminuire nel tempo.

Trattamento per lo smascheramento dell'epitopo indotto da calore

Per lo smascheramento dell'epitopo indotto da calore, è necessario riscaldare le sezioni di tessuto montate su vetrini mediante immersione nella soluzione per lo smascheramento dell'epitopo in un bagnomaria calibrato in grado di mantenere la soluzione per lo smascheramento dell'epitopo a una temperatura di 95 – 99°C. I laboratori situati ad altitudini più elevate devono definire il metodo migliore per mantenere la temperatura del bagnomaria richiesta. L'azienda produttrice raccomanda di non eseguire alcuna variazione dalla procedura descritta nel presente documento.

Dopo lo smascheramento dell'epitopo indotto da calore, le sezioni di tessuto devono essere raffreddate a temperatura ambiente per 20 minuti prima del successivo trattamento. Quindi, eseguire la colorazione delle sezioni di tessuto senza ritardi.

Procedura di colorazione

1. Preparazione dei reagenti

Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (20-25°C) prima di essere utilizzati per l'immunocolorazione. Di conseguenza tutte le fasi successive devono essere svolte a temperatura ambiente.

Aver cura di non far essiccare i campioni durante la procedura di immunocolorazione in quanto l'essiccazione può determinare artefatti di colorazione.

Prima dell'inizio della procedura di colorazione è opportuno preparare i seguenti reagenti:

1.1 Soluzione per lo smascheramento dell'epitopo

Preparare la quantità sufficiente della soluzione per lo smascheramento dell'epitopo programmata per la procedura di colorazione diluendo una quantità sufficiente di fiala 7 (Soluzione per lo smascheramento dell'epitopo 10 X) 1:10 utilizzando acqua distillata o deionizzata.

Dopo la diluizione, la soluzione per lo smascheramento dell'epitopo può essere conservata a 2 – 8°C per un mese. Eliminare la soluzione diluita se appare torbida.

NOTA: L'uso di acqua con elevati livelli di ioni per la diluizione della soluzione di smascheramento dell'epitopo può ridurre l'efficacia del test di colorazione in modo significativo. Accertarsi che l'acqua utilizzata sia adeguatamente deionizzata (ovvero assicurarsi che la colonna a scambio ionico per la produzione di acqua deionizzata sia stata sottoposta ai regolari controlli di manutenzione). Non usare acqua del rubinetto!

1.2 Tampone di lavaggio

Utilizzare tampone di lavaggio 10 X numero di catalogo 10215364001, fornito da Roche mtm laboratories AG in combinazione con CINTec® Histology Kit. Pour vos commandes, consultez notre site www.roche.com.

Preparare una quantità sufficiente di tampone di lavaggio per le fasi di lavaggio della procedura di colorazione programmata diluendo la quantità di tampone di

lavaggio 10 X, numero di catalogo 10215364001, 1:10 mediante acqua distillata o deionizzata.

Dopo la diluizione, il tampone di lavaggio può essere conservato a 2 – 8°C per un mese. Eliminare la soluzione diluita se appare torbida.

1.3 Substrate-Chromogen Solution (DAB)

Per la preparazione della soluzione cromogeno-substrato è necessario aggiungere una goccia di cromogeno DAB a 2 mL di tampone substrato DAB. Procedere come segue:

- i) Trasferire 2 mL di tampone substrato DAB dalla fiala 5 a una provetta.
- ii) Aggiungere una goccia (25 – 30 µL) di cromogeno DAB dalla fiala 6. Miscelare e applicare alle sezioni di tessuto con una pipetta.

Per la colorazione di cinque sezioni di tessuto, inclusi i relativi cinque campioni di controllo, di solito sono sufficienti 2 mL di soluzione cromogeno-substrato (DAB) preparati secondo le istruzioni precedenti.

NOTA: usare la substrate-chromogen solution (DAB) preparata nello stesso giorno.

NOTA: un'aggiunta eccessiva di cromogeno DAB al tampone substrato DAB causerà un deterioramento del segnale positivo.

1.4 Colorante di contrasto

La reazione di colorazione DAB determina un prodotto finale colorato insolubile in acqua. Per la colorazione di contrasto è possibile utilizzare ematossilina a base di acqua o alcol. In caso di utilizzo, rispettare le istruzioni fornite dal fornitore dell'ematossilina per l'esecuzione della colorazione di contrasto.

1.5 Mezzo di montaggio

Per il montaggio di campioni su vetrino dopo la colorazione si raccomanda un mezzo di montaggio permanente e non acquoso. Tuttavia, è accettabile anche un montaggio acquoso.

Per un montaggio non acquoso si consiglia di usare Eukitt Mounting Medium. Per un montaggio acquoso si consiglia Aquatex Merck.

2. Procedura di colorazione per strumenti Autostainer

CINtec® Histology Kit è stato adattato per l'uso su strumenti Autostainer (Lab Vision Autostainer 480 o Dako Autostainer Plus) in base al modello descritto di seguito. È possibile usare altri strumenti o sistemi con funzione simile dopo un'appropriata validazione da parte dell'utente. Prima della colorazione sullo strumento Autostainer, i campioni e i reagenti devono essere preparati come indicato nelle sezioni 1.1 – 1.5 e 2.1.

2.1 Rimozione della paraffina e reidratazione

Porre i vetrini in una stufa di asciugatura a una temperatura non superiore a 60°C per almeno 20 minuti, ma non oltre un'ora al fine di rimuovere quantitativamente l'acqua, migliorando così l'aderenza del tessuto al vetrino ("essiccazione ad alte temperature") e fondere la paraffina. Rimuovere la paraffina dai vetrini di tessuto, per rimuovere il mezzo di inclusione, quindi reidratare prima di eseguire la

procedura di colorazione. È fondamentale evitare la rimozione incompleta della paraffina, poiché il mezzo di inclusione residuo determinerà un aumento della colorazione aspecifica. Incubare i vetrini a temperatura ambiente (20–25°C) rispettando i seguenti passaggi:

- 5 ($\pm$ 1) minuti in un bagno di xilene;
- Ripetere questo passaggio una volta con un bagno fresco;
- Rimuovere il liquido in eccesso;
- 3 ($\pm$ 1) minuti in etanolo al 95%;
- Ripetere questo passaggio una volta con un bagno fresco;
- Rimuovere il liquido in eccesso;
- 3 ($\pm$ 1) minuti in etanolo al 70%;
- Ripetere questo passaggio una volta con un bagno fresco;
- Rimuovere il liquido in eccesso;
- Almeno 30 secondi in acqua distillata o deionizzata.

Iniziare la procedura di colorazione come descritto nella Sezione 2.2, Passaggio 1: smascheramento dell'epitopo.

Le soluzioni di xilene e alcol non devono essere utilizzate per più di 40 vetrini.

NOTA: Gli utenti devono tenere presente che eventuali variazioni della temperatura dell'impianto o dei tempi di esposizione durante la preparazione del campione nella fase preanalitica possono determinare una rimozione incompleta della paraffina dai vetrini con il tessuto. Eventuale paraffina residua può determinare una colorazione incompleta con qualsiasi colorante istologico, incluso il colorante istologico CINtec®. I laboratori di istopatologia devono monitorare regolarmente l'attrezzatura al fine di ridurre eventuali variazioni nella preparazione del campione prima della colorazione. L'osservazione di margini nettamente definiti all'interno di aree di tessuto immunoreattive o di altre incongruenze della colorazione all'interno di un vetrino possono, con un colorante immunoistochimico qualsiasi, essere indice di preparazione preanalitica non ottimale o incompleta del campione. Gli utenti devono controllare le attrezzature e i metodi di preparazione preanalitici del campione, qualora osservassero incongruenze nella colorazione.

2.2 Protocollo di colorazione per strumenti Autostainer

Passaggio 1: smascheramento dell'epitopo

- Riempire le vaschette per la colorazione, ad es. vaschette in plastica Coplin, con la soluzione per lo smascheramento dell'epitopo diluita (fare riferimento alla Sezione 1.1 della Procedura);
- Immergere le vaschette per la colorazione contenenti la soluzione per lo smascheramento dell'epitopo in un bagnomaria. Riscaldare il bagnomaria e la soluzione per lo smascheramento dell'epitopo a 95 – 99°C. E' molto importante controllare il livello dell'acqua nel bagnomaria per assicurarsi che le vaschette siano immerse almeno all'80%. Coprire le vaschette con coperchi al fine di stabilizzare la temperatura ed evitare l'evaporazione;
- Immergere le sezioni deparaffinizzate nella soluzione per lo smascheramento dell'epitopo preriscaldata nelle vaschette per la colorazione; questo passaggio solitamente abbassa il livello della

temperatura nelle vaschette a meno di 90°C;

- Riportare la temperatura del bagnomaria e della soluzione per lo smascheramento dell'epitopo nelle vaschette a 95 – 99°C; controllare la temperatura della soluzione per lo smascheramento dell'epitopo nelle vaschette;
- Incubare per 10 ($\pm$ 1) minuti a 95 – 99°C; cominciare a contare i minuti solo dopo aver verificato che la soluzione per lo smascheramento dell'epitopo nelle vaschette abbia raggiunto la temperatura di 95 – 99°C;
- Rimuovere l'intera vaschetta con i vetrini dal bagnomaria;
- Lasciare raffreddare i vetrini nella soluzione per lo smascheramento dell'epitopo per 20 ($\pm$ 1) minuti a temperatura ambiente;
- Decantare la soluzione per lo smascheramento dell'epitopo e risciacquare le sezioni nel tampone di lavaggio (fare riferimento alla Sezione 1.2 della Procedura);
- Per prestazioni ottimali, immergere le sezioni nel tampone di lavaggio per 5 minuti dopo lo smascheramento dell'epitopo e prima della colorazione.

NOTA: la soluzione per lo smascheramento dell'epitopo è un prodotto monouso. Non riutilizzare.

Passaggio 2: programmazione dello strumento

Prima di eseguire la prima applicazione di CINtec® Histology Kit su uno strumento Autostainer, è necessario configurare un nuovo modello. Fare riferimento al manuale d'uso dello strumento Autostainer dedicato.

Passaggio 3: procedura Autostainer

- Trasferire i reagenti dai flaconi del kit nelle fiale graduate per reagenti dell'Autostainer. Per i tempi di programma e i volumi dei reagenti utilizzare la mappa generata dall'Autostainer (fare riferimento al punto 4 per tempi e volumi specifici);
- Posizionare le fiale dei reagenti dell'Autostainer nel relativo cestello dei reagenti in base alla mappa per la disposizione dei reagenti generata dal computer;
- Caricare i vetrini nell'Autostainer in base alla mappa per la disposizione dei vetrini generata dal computer;
- per evitare l'essiccazione, spruzzare sui campioni del tampone di lavaggio prima di caricarli nell'Autostainer;
- Di seguito sono riportate le linee generali per l'esecuzione del programma:
 - Lavaggio*
 - 200 μ L di Peroxidase-Blocking Reagent - 5 minuti
 - Lavaggio*
 - 200 μ L di Primary p16^{INK4a} Antibody o Reagente di controllo negativo – 30 minuti
 - Lavaggio*
 - 200 μ L di reagente di visualizzazione - 30 minuti

- Lavaggio*
- Lavaggio*
- Lavaggio*
- Cambio
- 200 µL di substrate chromogen solution (DAB) - 10 minuti
- Lavaggio*
- Lavare i vetrini in acqua deionizzata dopo il passaggio con substrate chromogen.

*Usare il tampone di lavaggio per i rispettivi passaggi di risciacquo.

NOTA: se lo strumento Autostainer utilizzato lava i vetrini nel tampone, i vetrini devono essere risciacquati con acqua deionizzata dopo esser stati rimossi dall'Autostainer.

Passaggio 4: colorante di contrasto (le istruzioni si riferiscono all'ematossilina)

- Immergere i vetrini in un bagno di ematossilina. Incubare per 2 – 5 minuti a seconda dell'intensità di ematossilina utilizzata;
- Porre i vetrini in un bagnomaria con acqua del rubinetto e risciacquare delicatamente con acqua corrente. Assicurarsi che tutta l'ematossilina residua sia stata eliminata;
- Risciacquare rapidamente i vetrini con delicatezza in un bagno di acqua distillata o deionizzata;
- La colorazione di contrasto può essere eseguita direttamente sullo strumento Autostainer.

NOTA: a seconda della durata dell'incubazione e dell'intensità dell'ematossilina utilizzata, la colorazione di contrasto determinerà una colorazione variabile dei nuclei cellulari dal blu pallido al blu scuro. Una colorazione di contrasto eccessiva o incompleta può interferire con una corretta interpretazione dei risultati.

Passaggio 5: montaggio

Si consiglia un mezzo di montaggio permanente e non acquoso. Tuttavia, è accettabile anche un mezzo di montaggio acquoso. Osservare le istruzioni per l'uso del fornitore del mezzo di montaggio.

NOTA: per ridurre al minimo lo scolorimento, proteggere i vetrini dalla luce e conservare a temperatura ambiente (20–25°C).

3. Procedura di colorazione per uso manuale

NOTA: evitare che le sezioni di tessuto si secchino durante la procedura di colorazione. Le sezioni di tessuto secche possono provocare un aumento della colorazione aspecifica. In caso di incubazioni prolungate conservare i tessuti in un ambiente umido.

Nell'uso del CINTec® Histology Kit per colorazione manuale, osservare le procedure standard utilizzate nella colorazione manuale di immunohistochimica.

3.1 Rimozione della paraffina e reidratazione

Prima di rimuovere la paraffina porre i vetrini in una stufa di asciugatura a una temperatura non superiore a 60°C per almeno 20 minuti, ma non oltre un'ora, al fine di rimuovere quantitativamente l'acqua, migliorando così l'aderenza del tessuto al vetrino ("essiccamento ad alta temperatura") e fondere la paraffina.

I vetrini di tessuto devono essere deparaffinizzati per rimuovere il mezzo di inclusione ed essere quindi reidratati prima che possa essere eseguita la procedura di colorazione. È fondamentale evitare la rimozione incompleta della paraffina, poiché il mezzo di inclusione residuo determinerà un aumento della colorazione aspecifica. Incubare i vetrini a temperatura ambiente (20–25°C) rispettando i seguenti passaggi:

- 5 (± 1) minuti in un bagno di xilene;
- Ripetere questo passaggio una volta con un bagno fresco;
- Rimuovere il liquido in eccesso;
- 3 (± 1) minuti in etanolo al 95%;
- Ripetere questo passaggio una volta con un bagno fresco;
- Rimuovere il liquido in eccesso;
- 3 (± 1) minuti in etanolo al 70%;
- Ripetere questo passaggio una volta con un bagno fresco;
- Rimuovere il liquido in eccesso;
- Almeno 30 secondi in acqua distillata o deionizzata.

Iniziare la procedura di colorazione come descritto nella Sezione 3.2, Passaggio 1: smascheramento dell'epitopo.

Le soluzioni di xilene e alcol non devono essere utilizzate per più di 40 vetrini.

3.2 Protocollo di colorazione per uso manuale

Passaggio 1: smascheramento dell'epitopo

- Riempire le vaschette per la colorazione, ad es. vaschette in plastica Coplin, con la soluzione per lo smascheramento dell'epitopo diluita (fare riferimento alla Sezione 1.1 della Procedura).
- Immergere le vaschette per la colorazione contenenti la soluzione per lo smascheramento dell'epitopo in un bagnomaria. Riscaldare il bagnomaria e la soluzione per lo smascheramento dell'epitopo a 95 – 99°C. È molto importante controllare il livello dell'acqua nel bagnomaria per assicurarsi che le vaschette siano immerse almeno all'80%. Coprire le vaschette con coperchi al fine di stabilizzare la temperatura ed evitare l'evaporazione;
- Immergere le sezioni deparaffinizzate nella soluzione per lo smascheramento dell'epitopo preriscaldata nelle vaschette per la colorazione; questo passaggio solitamente abbassa il livello della temperatura nelle vaschette a meno di 90°C;
- Riportare la temperatura del bagnomaria e della soluzione per lo smascheramento dell'epitopo nelle vaschette a 95 – 99°C; controllare la temperatura della soluzione per lo smascheramento dell'epitopo nelle

vaschette;

- Incubare per 10 (± 1) minuti a 95 – 99°C; cominciare a contare I minuti solo dopo aver verificato che la soluzione per lo smascheramento dell'epitopo nelle vaschette abbia raggiunto la temperatura di 95 – 99°C;
- Rimuovere l'intera vaschetta con i vetrini dal bagnomaria;
- Lasciare raffreddare i vetrini nella soluzione per lo smascheramento dell'epitopo per 20 (± 1) minuti a temperatura ambiente;
- Decantare la soluzione per lo smascheramento dell'epitopo e risciacquare le sezioni nel tampone di lavaggio diluito (fare riferimento alla Sezione 1.2 della Procedura);
- Per prestazioni ottimali, immergere le sezioni nel tampone di lavaggio per 5 (± 1) minuti dopo lo smascheramento dell'epitopo e prima della colorazione.

NOTA: la soluzione per lo smascheramento dell'epitopo è un prodotto monouso. Non riutilizzare.

Passaggio 2: Peroxidase-Blocking Reagent

- Applicare 200 μ L di Peroxidase-Blocking Reagent per coprire il campione;
- Incubare per 5 (± 1) minuti;
- Picchiettare per eliminare il liquido in eccesso e mettere i vetrini in un bagno di tampone di lavaggio fresco per 5 (± 1) minuti.

Passaggio 3: anticorpo primario o reagente di controllo negativo

- Rimuovere il tampone in eccesso;
- Coprire il campione con 200 μ L di anticorpo primario (p16^{INK4a} murino antiumano o reagente di controllo negativo);
- Incubare per 30 (± 1) minuti;
- Picchiettare per eliminare il liquido in eccesso e mettere i vetrini in un bagno di tampone di lavaggio fresco per 5 (± 1) minuti.

Passaggio 4: reagente di visualizzazione

- Rimuovere il tampone in eccesso;
- Coprire il campione con 200 μ L di reagente di visualizzazione;
- Incubare per 30 (± 1) minuti;
- Picchiettare per eliminare il liquido in eccesso e mettere i vetrini in un bagno di tampone di lavaggio fresco per 5 (± 1) minuti;
- Ripetere questo passaggio due volte con un bagno di tampone di lavaggio fresco.

Passaggio 5: Substrate-Chromogen Solution (DAB)

- Coprire il campione con 200 μ L di Substrate-Chromogen Solution (DAB) preparati secondo la procedura descritta in precedenza nella sezione 1.3;
- Incubare per 10 (± 1) minuti;

- Picchiettare per eliminare il liquido in eccesso e risciacquare delicatamente con acqua distillata o deionizzata.

Raccogliere i residui della Substrate-Chromogen Solution (DAB) in un contenitore per sostanze pericolose per uno smaltimento adeguato.

Passaggio 6: colorante di contrasto (le istruzioni si riferiscono all'ematossilina)

- Immergere i vetrini in un bagno di ematossilina. Incubare per 2 – 5 minuti a seconda della potenza di ematossilina utilizzata;
- Porre i vetrini in un bagnomaria in acqua di rubinetto e risciacquare delicatamente con acqua corrente. Assicurarsi che tutta l'ematossilina residua sia stata eliminata;
- Risciacquare rapidamente i vetrini con delicatezza in un bagno di acqua distillata o deionizzata.

NOTA: a seconda della durata dell'incubazione e della potenza dell'ematossilina utilizzata, la colorazione di contrasto determinerà una colorazione variabile dei nuclei cellulari, dal blu pallido al blu scuro. Una colorazione di contrasto eccessiva o incompleta può interferire con una corretta interpretazione dei risultati.

Passaggio 7: montaggio

Si consiglia un mezzo di montaggio permanente e non acquoso. Per i mezzi di montaggio a base di xylene é necessaria una procedura di desidratazione, p.e

- Acqua distillata o demonizzata
- 3 min alcool etilico a 70%
- 3 min alcool etilico a 70%
- 3 min alcool etilico a 96%
- 3 min alcool etilico a 99%
- 5 min Xylene
- 5 min Xylene

Tuttavia, è accettabile anche un mezzo di montaggio acquoso. Osservare le istruzioni per l'uso del fornitore del mezzo di montaggio.

NOTA: per ridurre al minimo lo scolorimento, proteggere i vetrini dalla luce e conservare a temperatura ambiente (20–25°C).

VII. Controllo qualità

Eventuali deviazioni dalle procedure raccomandate per la fissazione dei campioni e la lavorazione nel laboratorio dell'utilizzatore potrebbero determinare una significativa variabilità dei risultati che necessita di effettuare regolarmente dei controlli interni.

Controllo di tessuto positivo

I materiali di controllo positivo esterni devono essere campioni chirurgici/bioptici/autoptici freschi, fissati, trattati e inclusi il più presto possibile nello

stesso modo dei campioni dei pazienti. I controlli di tessuto positivi sono indicativi di tessuti preparati correttamente e di tecniche di colorazione adeguate. Ogni fase di colorazione dovrebbe includere un controllo di tessuto esterno positivo per ogni serie di condizioni in cui viene svolto il test. I tessuti utilizzati per i materiali di controllo positivo esterno devono essere selezionati da campioni del paziente con colorazione per p16^{INK4a} accertata come positiva. Se i controlli positivi non sono in grado di provare una colorazione positiva adeguata, i risultati con i campioni del test devono essere considerati nulli.

Controllo di tessuto negativo

Il tecnico di laboratorio può utilizzare i tipi di cellule notoriamente negativi alla p16^{INK4a} presenti nella maggior parte delle sezioni di tessuto come siti di controllo negativi interni al fine di controllare le specifiche di esecuzione dell'IHC. Se nel controllo del tessuto negativo si ottiene una colorazione specifica (colorazione falsa positiva), i risultati con i campioni del paziente devono essere considerati nulli.

Reagente di controllo negativo aspecifico

Utilizzare il reagente di controllo negativo aspecifico al posto dell'anticorpo principale con una sezione di ogni campione del paziente per valutare la colorazione aspecifica e ottenere una migliore interpretazione della colorazione specifica nel sito dell'antigene.

Se con il reagente di controllo negativo si ottiene una colorazione specifica (colorazione falsa positiva), i risultati con i campioni del paziente devono essere considerati nulli.

VIII. Interpretazione dei risultati

I campioni di controllo colorati con reagente di controllo negativo come reagente primario non devono mostrare una colorazione specifica.

La colorazione positiva che impiega l'anticorpo monoclonale murino anti-umano p16^{INK4a}, clone E6H4™, deve essere valutata nel contesto di qualsiasi colorazione aspecifica di fondo del reagente di controllo negativo. Come in qualsiasi test immunoistochimico, un risultato negativo indica che non è stato identificato l'antigene, non che l'antigene fosse assente nelle cellule/tessuto sottoposti alla reazione.

L'interpretazione dei risultati deve prendere in considerazione il fatto che la p16^{INK4a} è una proteina cellulare che può essere espressa a livelli individuabili nelle lesioni displastiche e nei carcinomi cervicali nonché in alcune condizioni non associate a displasia cervicale sebbene a diversi livelli e con diversi schemi di espressione.

I campioni su vetrino colorato si giudicano in base a un sistema di valutazione binario composto da valutazioni "positive" e "negative".

Si assegna una valutazione "positiva" se il campione su vetrino colorato con p16^{INK4a} mostra una colorazione continua di cellule di strati cellulari basali e parabasali dell'epitelio cervicale squamoso con o senza colorazione di cellule degli strati cellulari superficiali ("metodo di colorazione diffusa"). Un esempio di vetrino considerato come "positivo" ("metodo di colorazione diffusa") è illustrato nell'Annex 2, Figura 1.

Si assegna una valutazione "negativa" se il campione su vetrino colorato con p16^{INK4a} mostra una reazione di colorazione negativa nell'epitelio squamoso ("metodo di colorazione negativa") o una colorazione di cellule isolate o piccoli ammassi cellulari; ovvero, una colorazione non continua, specialmente non di cellule basali e parabasali ("metodo di colorazione focale"). Un esempio di vetrino

considerato come “negativo”(“metodo di colorazione focale”) è illustrato nell’Annex 2, Figura 2.

L’interpretazione dei vetrini colorati per p16^{INK4a} con CINtec® Histology Kit deve essere effettuata congiuntamente con vetrini colorati con EE ottenuti dallo stesso campione di tessuto cervicale. Le informazioni aggiuntive fornite dai vetrini colorati con CINtec® devono essere combinate alla diagnosi preliminare sulla base della morfologia posta sui vetrini colorati con EE in modo da pervenire ad una diagnosi finale.

IX. Limitazioni

- Solo per uso professionale. Per l'esecuzione delle procedure immunoistochimiche si richiede una formazione specialistica.
- L’interpretazione clinica di qualsiasi colorazione positiva o negativa deve essere valutata nel contesto della presentazione clinica, della morfologia e di altri criteri istopatologici. L’interpretazione clinica di qualsiasi colorazione positiva o negativa deve essere coadiuvata da studi morfologici che impieghino adeguati controlli interni ed esterni, positivi e negativi, nonché da altri test diagnostici. È responsabilità di un patologo qualificato dotato di familiarità con l’uso corretto di anticorpi, reagenti e metodi IHC, interpretare tutti i passaggi utilizzati per preparare e interpretare la preparazione finale di IHC.
- I risultati della colorazione in immunoistochimica sono fortemente influenzati dalla qualità del tessuto colorato. Di conseguenza, i passaggi di fissazione, lavaggio, asciugatura, riscaldamento, sezionamento o contaminazione con altri tessuti contribuiscono in modo significativo al risultato globale della colorazione e possono determinare artefatti, intrappolamento dell’anticorpo o risultati falsi-negativi. Risultati incongruenti possono essere dovuti a variazioni nei metodi di fissazione e di inclusione o a irregolarità intrinseche nel tessuto.
- Una colorazione di contrasto eccessiva o incompleta può interferire con una corretta interpretazione dei risultati.
- L'azienda produttrice fornisce questi anticorpi/reagenti a una diluizione ottimale per l’uso coerente con le istruzioni riportate nel presente documento, per test IHC su sezioni di tessuto preparate. Qualsiasi variazione dalle procedure di analisi consigliate può invalidare i risultati previsti dichiarati; è necessario impiegare e documentare controlli appropriati. Gli operatori che si scostano dalle procedure del test consigliate devono assumersi la responsabilità di interpretare i risultati del paziente in tali circostanze.
- È possibile osservare risultati falsi-positivi a causa del legame non immunologico di proteine o di prodotti di reazione del substrato. Essi possono essere causati anche dall’attività della pseudoperossidasi (eritrociti) e dall’attività della perossidasi endogena (citocromo C).
- I reagenti possono manifestare reazioni impreviste in tessuti precedentemente non testati. La possibilità di reazioni impreviste anche in gruppi di tessuto non sottoposti a test non può essere completamente eliminata a causa della variabilità biologica dell’espressione dell’antigene nei tessuti neoplastici o in altri tessuti patologici. Contattare Roche mtm

laboratories AG in caso di reazioni impreviste documentate. Per informazioni sull'assistenza tecnica, fare riferimento alle informazioni di contatto disponibili nella Sezione XIII.

- Non sostituire i reagenti del kit con reagenti di codice diverso o con reagenti di altri produttori.

X. Caratteristiche di performance

Performance clinica

La performance clinica di CINtec® Histology Kit è stata valutata in uno studio clinico controllato utilizzando campioni di tessuto cervicale inclusi in paraffina e fissati in formalina [21]. Lo studio è stato concepito per dimostrare l'adeguatezza di CINtec® Histology Kit come ausilio per incrementare la precisione diagnostica e l'accordo inter-osservatore per l'individuazione di neoplasie intraepiteliali cervicali di grado elevato (CIN2+).

Lo studio clinico è stato condotto su punch biopsie e per conizzazione cervicali raccolte a posteriori. Per la preparazione dei vetrini colorati con EE e dei vetrini usati in seguito colorati con CINtec® Histology Kit secondo le istruzioni del produttore sono stati utilizzati complessivamente 500 campioni cervicali raccolti da due diversi laboratori di patologia europei e arricchiti per displasia di grado elevato sulla base delle rispettive diagnosi iniziali.

Tre ginecopatologi europei esperti hanno posto la loro diagnosi in modo indipendente su ogni caso sulla base dei vetrini colorati con EE. I casi con discrepanze di risultato sono stati sottoposti a un secondo processo di revisione congiunto nel corso di una riunione decisionale e le diagnosi maggioritarie (diagnosi di consenso, due su tre) sono state prese come diagnosi di riferimento per lo studio.

Dodici ricercatori (patologi certificati che trattano regolarmente patologie cervicali) di 4 Paesi europei (Francia, Italia, Spagna e Germania) hanno partecipato allo studio in qualità di esperti. Nella prima tornata di interpretazione dei vetrini, tutti i patologi del gruppo di esperti hanno posto le loro diagnosi per ogni caso esclusivamente sulla base dei vetrini colorati con EE. I patologi hanno sempre letto i campioni in cieco rispetto alle diagnosi originali e alle diagnosi di riferimento. Dopo un periodo di interruzione di oltre 4 settimane, la stessa serie di vetrini colorati con EE (ri-etichettati) è stata riesaminata da tutti i dodici patologi del gruppo di esperti insieme ai vetrini abbinati di ogni caso colorati rispettivamente con CINtec® Histology Kit.

Per la valutazione dei miglioramenti nell'accuratezza diagnostica per i vetrini cervicali colorati con CINtec® Histology letti congiuntamente ai rispettivi vetrini colorati con EE rispetto ai vetrini cervicali colorati solo con EE, i risultati delle letture di ciascun patologo del gruppo di esperti per entrambi i metodi sono stati confrontati con le diagnosi di consenso poste come diagnosi di riferimento dai tre ginecopatologi esperti.

Risultati:

Nell'analisi dei dati è stato incluso un totale di 482 casi con diagnosi complete poste da tutti i patologi coinvolti nello studio. Le frequenze delle varie categorie diagnostiche basate sulle diagnosi di consenso effettuate dai tre ginecopatologi esperti sono state negative per displasia (n=194), CIN1 (n=96), CIN2 (69) e CIN3 (n=123).

Accuratezza diagnostica per l'individuazione di CIN2+

La sensibilità generale per l'identificazione di CIN2+ è stata aumentata da 1787 (EE) a 2018 (EE più CINtec® Histology) risultati CIN2+ veri positivi, con solo una leggera riduzione nella specificità totale da 3088 (EE) a 3051 (EE più CINtec® Histology) di risultati ≤CIN1 veri negativi.

Tabella 1

Miglioramento dell'accuratezza diagnostica per CIN (CIN2+) di grado elevato attraverso la lettura congiunta di vetrini colorati con EE più CINtec® Histology rispetto a vetrini colorati solo con EE; vengono forniti i numeri di risultati veri positivi e veri negativi e numeri di risultati falsi negativi e falsi positivi rispetto alle diagnosi di consenso dei patologi esperti. (Nota bene: l'accordo totale con le diagnosi di consenso dei patologi esperti sarebbe risultato di 2304 (192 casi di CIN2+, x 12 patologi del gruppo di esperti) risultati veri positivi).

	Veri Positivi	Falsi Negativi	Falsi Positivi	Veri Negativi
EE	1787	517	392	3088
EE+CINtec® Histology	2018	286	429	3051

Per verificare gli effetti di efficacia del test CINtec® Histology è stato utilizzato il modello ANOVA ad effetti misti per pseudovalori jackknife, comunemente conosciuto con il nome di metodo di Dorfman-Berbaum-Metz (DBM).

L'ipotesi nulla che l'accuratezza diagnostica per CIN2+ basata su vetrini colorati con EE rispetto a vetrini colorati con EE più CINtec® Histology sia equivalente è stata rifiutata con $p = 0,0004$ (AUC per EE: 0,877; AUC per EE più CINtec® Histology 0,925).

Tabella 2

Caratteristiche di performance per l'osservazione congiunta di vetrini colorati con EE più CINtec® Histology contro vetrini colorati solo con EE per l'identificazione di CIN di grado elevato (CIN2+); diagnosi di consenso poste da tre ginecopatologi esperti su vetrini colorati con EE come diagnosi di riferimento.

	EE % (95% CI)	EE plus CINtec® Histology % (95% CI)
Sensibilità	77,6% (75,8, 79,3)	87,6% (86,2, 88,9)
Specificità	88,7% (87,6, 89,8)	87,7% (86,5, 88,8)
VVP [PPV]	82,0% (80,3, 83,6)	82,5% (80,9, 84,0)
VPN [NPV]	85,7% (84,5, 86,8)	91,4% (90,4, 92,4)
RVD+ [DLR+]	6,885 (6,256, 7,578)	7,105 (6,494, 7,773)
RVD- [DLR-]	0,253 (0,234, 0,273)	0,142 (0,127, 0,158)

IC al 95%, intervalli di confidenza al 95%; VPP, valore predittivo positivo; VPN, valore predittivo negativo; RVD+, rapporto di verosimiglianza diagnostica positivo; RVD-, rapporto di verosimiglianza

diagnostica negativo

Utilizzando le diagnosi di consenso dei tre ginecopatologi esperti come riferimento, la sensibilità per l'individuazione di CIN2+ è migliorata del 13% relativo (la sensibilità per le diagnosi con EE del 77,6%, salita all'87,6% per diagnosi poste su vetrini colorati con EE più CINtec® Histology).

L'aumento dell'accuratezza diagnostica per l'individuazione di CIN2+ è stato provato in maniera indipendente con significatività statistica per i sottogruppi dei campioni di punch biopsie cervicali (n=249; AUC per EE: 0,895; AUC per EE più CINtec® Histology: 0,929; p=0,0053) e di conizzazioni cervicali (n=233; AUC per EE: 0,887; AUC per EE più CINtec® Histology: 0,948; p=0,0009).

Accordo interosservatore per l'individuazione di CIN2+

Per la valutazione del miglioramento dell'accordo interosservatore per l'individuazione di CIN2+ fra i patologi del gruppo di esperti, è stato usato un modulo a stimatori multipli della statistica Kappa per le diagnosi poste sulla base dei vetrini cervicali colorati con EE e quelle poste sulla base dei vetrini colorati con EE osservati unitamente ai vetrini cervicali colorati con CINtec® Histology.

Tabella 3

Miglioramento dell'accordo interosservatore per l'individuazione di CIN2+ per mezzo dell'osservazione congiunta di vetrini colorati con EE più CINtec® Histology rispetto a vetrini colorati solo con EE. Vengono indicati i valori kappa come misura di accordo a probabilità corretta.

Categoria diagnostica	Kappa EE	Kappa EE più CINtec®	Significatività statistica
CIN2+, tutti i casi	0,580	0,756	p<0,0001
CIN2+, solo biopsie punch	0,598	0,748	p<0,0001
CIN2+, solo biopsie per conizzazione	0,548	0,765	p<0,0001

La statistica kappa come misura di accordo a probabilità corretta fra i patologi del gruppo di esperti per l'individuazione di CIN2+ è migliorata in modo significativo per le osservazioni dei vetrini colorati con EE più CINtec® Histology, rispetto all'osservazione dei vetrini con EE (aumento dei valori kappa per tutti i casi da 0,580 a 0,756; p<0,0001).

Riproducibilità nella stima dello schema di colorazione p16^{INK4a}

È stata valutata l'affidabilità fra i patologi del gruppo di esperti di valutare lo schema di colorazione p16^{INK4a} in campioni di tessuto cervicale come diffusamente p16^{INK4a} –positivi, focalmente p16^{INK4a} –positivi o negativi per p16^{INK4a}.

Si è osservato un elevato livello di riproducibilità fra i patologi nella valutazione dello schema di colorazione con p16^{INK4a} come positivo (schema di colorazione diffuso) o negativo (schema di colorazione focale o nessuna immunoreattività). Il valore kappa (misura di accordo a probabilità corretta) per la riproducibilità fra i dodici patologi del gruppo di esperti per la valutazione dello schema di colorazione p16^{INK4a} come positivo (schema di colorazione diffuso) o negativo (schema di colorazione focale e nessuna immunoreattività) è stato considerato eccellente (kappa medio = 0,899; kappa mediano = 0,903).

Performance analitica

Sensibilità analitica

Lo studio di sensibilità è stato condotto con CINtec® Histology Kit da 3 lotti. Nello studio di sensibilità sono state analizzate 35 biopsie cervicali con CIN3+, tra cui 6 biopsie classificate come CIN3 e 29 biopsie classificate come carcinoma a cellule squamose.

Cinque su 6 (83,3%) casi classificati come CIN3 presentavano un'intensa colorazione diffusa per p16. Un caso di biopsia CIN3 presentava una debole espressione di p16 ma era privo di un chiaro segnale p16 positivo.

Ventidue su 29 (75,9%) casi classificati come carcinoma a cellule squamose presentavano un'intensa colorazione diffusa per p16. Cinque casi di carcinoma a cellule squamose presentavano una debole espressione di p16 ma erano privi di un chiaro segnale p16 positivo. Solo 2 casi su 29 (6,9%) erano completamente negativi a p16. Ciò può essere spiegato sulla base della precedente segnalazione secondo cui una percentuale compresa nell'intervallo 3-8% dei casi di carcinoma a cellule squamose era negativa alla colorazione per p16 [1; 6]. Ciò può riflettere una ridotta percentuale di casi in cui il dedifferenziamento e i riarrangiamenti cromosomici hanno determinato l'inattivazione o la delezione del locus del gene p16.

Per tutti e 3 i lotti, la colorazione su un pannello ben caratterizzato di sezioni di tessuti di ratto con reagente di controllo negativo ha avuto come risultato una colorazione intensa e specifica di singoli neuroni nel cervello di ratto. Inoltre, alcune cellule canalicolari del rene, singoli macrofagi nella milza, singoli macrofagi e singole plasmacellule nell'intestino tenue presentavano una debole colorazione. Altri tessuti dell'array di tessuti di ratto erano completamente negativi.

L'anticorpo anti-p16 E6H4™ è in grado di rendere continua la colorazione delle cellule degli strati cellulari basali e parabasali, con o senza colorazione delle cellule degli strati intermedi o intermedi e superficiali dell'epitelio squamoso nelle biopsie cervicali con CIN di alto grado (CIN2, CIN3). Il reagente di controllo negativo (NRC) è in grado di rilevare in maniera specifica i neuroni di ratto.

Specificità analitica

La specificità dell'anticorpo murino anti-umano p16^{INK4a}, clone E6H4™, è stata verificata tramite analisi Western blot (positivo per il lisato della linea cellulare HeLa; fare riferimento anche a [1]).

Lo studio di specificità è stato condotto con CINtec® Histology Kit da 3 lotti su un pannello ben caratterizzato di 90 campioni di tessuto normale (30 diversi tipi di tessuto) fissati in NBF (formalina tamponata neutra) e 54 tessuti tumorali diversi dal collo dell'utero (arrangiati in array multi-tessuto = MTA).

Per la colorazione con l'anticorpo p16 specifico (clone E6H4™) su tessuti normali sono stati osservati 16 diversi tessuti p16 negativi [cervello, cervelletto, ghiandola surrenale, tiroide, midollo osseo, cuore, esofago, stomaco, intestino, colon, fegato, rene, muscolo striato, cute, mesotelio, collo dell'utero] e 14 diversi tessuti p16 positivi [colorazione debole: ipofisi, polmone, timo, prostata; positivo: nervo, intestino, tonsilla, pancreas, milza; fortemente positivo: utero, ovaio, mammella, testicolo, paratiroide]. Per la colorazione con l'anticorpo p16 specifico (clone E6H4™) su tessuti tumorali diversi dal collo dell'utero sono stati osservati 22 diversi casi di tumori p16 negativi e 32 diversi casi di tumori p16 positivi.

Per tutti e 3 i lotti di CINtec® Histology Kit i risultati sono stati negativi per tutti i

tessuti (normali e tumorali) testati con il reagente di controllo negativo. L'anticorpo monoclonale murino anti-ratto della neurofisina ossitocina-correlata non reagisce in misura significativa con campioni normali e tumorali di tessuti umani.

Riproducibilità

Riproducibilità inter-run

La riproducibilità inter-run è stata determinata per CINtec® Histology Kit con il protocollo manuale colorando 36 vetrini preparati da blocchi di tessuto su cui era stata posta la diagnosi di CIN2+. Le aree displastiche su tutte le sezioni sono state colorate con intensità analoga (+/- 0,5 su una scala da 0 a 3) in tutte le fasi. Aree normali su tutti i vetrini non hanno evidenziato alcuna colorazione specifica.

Riproducibilità intra-run

La riproducibilità intra-run è stata determinata con CINtec® Histology Kit con il protocollo manuale e sullo strumento autostainer in tre giorni diversi. Sono stati inclusi complessivamente tre blocchi di tessuti diagnosticati come CIN2+. Ogni giorno è stata inclusa una sezione seriale da ogni blocco. L'area displastica sulle sezioni di un blocco è stata colorata con analoga intensità (+/- 0,5 su una scala da 0 a 3) tutti i giorni e anche con colorazione manuale e automatizzata. Aree normali su tutti i vetrini non hanno evidenziato alcuna colorazione specifica.

Riproducibilità interlotto

Per determinare la riproducibilità interlotto sono stati utilizzati CINtec® Histology Kit da 3 diversi lotti per colorare le sezioni dei casi CIN2+. È stata effettuata una colorazione manuale e automatizzata conformemente al protocollo delineato nelle istruzioni per l'uso. L'area displastica sulle sezioni di un blocco è stata colorata con analoga intensità (+/- 0,5 su una scala da 0 a 3) con i reagenti di tutti e tre i lotti nella modalità manuale e automatizzata. Aree normali su tutti i vetrini non hanno evidenziato alcuna colorazione specifica.

Si noti che il metodo di punteggio dell'intensità della colorazione su una scala da 0 a 3 è stato utilizzato esclusivamente ai fini della valutazione della performance analitica e non deve essere utilizzato per l'interpretazione della colorazione delle sezioni di tessuto nella pratica clinica. Per l'interpretazione di routine, fare riferimento all'interpretazione qualitativa dei vetrini colorati descritta nella Sezione VIII.

XI. Risoluzione dei problemi

Fare riferimento alla Sezione XIII per informazioni di contatto qualora sia necessaria assistenza tecnica.

Problema	Causa probabile	Intervento consigliato
1. Nessuna colorazione dei vetrini	<u>1a.</u> Mancato rispetto delle istruzioni per l'uso;	<u>1a.</u> Leggere attentamente le istruzioni per l'uso e adottare le procedure ivi riportate;
2. Colorazione debole dei vetrini	<u>2a.</u> Smascheramento inadeguato dell'epitopo;	<u>2a.</u> Utilizzare una soluzione per lo smascheramento dell'epitopo preparata di recente e/o accertarsi che tale soluzione raggiunga 95 – 99°C per 10 minuti pieni e che venga lasciata raffreddare per altri 20 minuti;
	<u>2b.</u> Tempi d'incubazione inadeguati del reagente;	<u>2b.</u> Rivedere le raccomandazioni delle sezioni 2.2./3.2. sul protocollo di colorazione;
	<u>2c.</u> Metodo di fissazione inadeguato;	<u>2c.</u> Accertarsi che il tessuto del paziente non sia fissato eccessivamente o che non siano stati utilizzati fissativi alternativi;
	<u>2d.</u> L'acqua utilizzata per diluire la soluzione di smascheramento dell'epitopo contiene una concentrazione di ioni troppo elevata;	<u>2d.</u> Accertarsi che la colonna a scambio ionico per la produzione di acqua deionizzata sia stata controllata durante i regolari controlli di manutenzione;

	<u>2e.</u> Deparaffinizzazione inadeguata;	<u>2e.</u> Gli utenti devono tenere presente che le variazioni della temperatura dell'attrezzatura o dei tempi di esposizione durante la preparazione preanalitica del campione possono determinare una rimozione incompleta della paraffina dai vetrini con il tessuto. Eventuale paraffina residua può determinare colorazione incompleta con qualsiasi colorante istologico, incluso il colorante istologico CINtec®. I laboratori di istopatologia devono monitorare regolarmente l'attrezzatura, al fine di ridurre le variazioni nella preparazione del campione prima della colorazione. L'osservazione di margini nettamente definiti all'interno di aree di tessuto immunoreattive o altre incongruenze della colorazione all'interno di un vetrino possono, con un qualsiasi colorante immunoistochimico, essere indice di preparazione preanalitica non ottimale o incompleta del campione. Gli utenti devono controllare le attrezzature e i metodi di preparazione preanalitica del campione se si osservano incongruenze nella colorazione;
3. Eccessiva colorazione di fondo dei vetrini	<u>3a.</u> Rimozione incompleta della paraffina;	<u>3a.</u> Utilizzare bagni freschi di xilene e rispettare la procedura riportata nella Sezione 2.1/3.1.;
	<u>3b.</u> Utilizzo di additivi troppo adesivi nel montaggio delle sezioni su vetrini;	<u>3b.</u> Additivi troppo adesivi nelle sezioni di montaggio possono mostrare immunoreattività. Evitarne l'uso;
	<u>3c.</u> Risciacquo inadeguato dei vetrini;	<u>3c.</u> Utilizzare una soluzione fresca nei bagni di tampone e nei flaconi;
	<u>3d.</u> Asciugatura delle sezioni durante la procedura di colorazione;	<u>3d.</u> Usare la camera umida. Pulire solo tre o quattro vetrini per volta prima di applicare il reagente;
	<u>3e.</u> Metodo di fissazione inadeguato;	<u>3e.</u> Utilizzare solo i fissativi consigliati nel presente documento. Il tessuto fissato in modo anomalo può manifestare una colorazione di fondo eccessiva;
	<u>3f.</u> Legame aspecifico di reagenti al tessuto;	<u>3f.</u> Verificare il metodo di fissazione del campione e la presenza di necrosi;
4. Il tessuto si stacca dai vetrini	<u>4a.</u> Uso di vetrini inadeguati;	<u>4a.</u> Osservare i consigli riportati nel presente documento e utilizzare vetrini SuperFrost® Plus;

5. Colorazione specifica eccessivamente forte	<u>5a.</u> Metodo di fissazione inadeguato;	<u>5a.</u> Accertarsi di aver impiegato fissativi e metodi di fissazione adeguati;
	<u>5b.</u> Tempi di incubazione del reagente troppo lunghi;	<u>5b.</u> Rivedere e osservare il protocollo di colorazione riportato in precedenza nelle sezioni 2.2/3.2.;
	<u>5c.</u> Soluzione di lavaggio inadeguata;	<u>5c.</u> Usare il tampone di lavaggio (10 x) (numero di catalogo 10215364001).

XII. Simboli

Simbolo:	Spiegazione:
	Numero di catalogo
	Codice del lotto
	Global Trade Item Number
	Identificativo unico del dispositivo
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Fabbricante
	Contenuto sufficiente per <n> test
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Utilizzare entro
	Limiti di temperatura
	Data di fabbricazione
	Non riutilizzare
	Contatto per l'assistenza tecnica (telefonica)
	Contiene materiali di origine animale
	Contenuto

XIII. Fabbricante

Prodotto da: Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim
Germania

<https://navifyportal.roche.com>

Contatto per l'assistenza tecnica (telefonica): +800 5505 6606

Il riepilogo dei dati relativi alla sicurezza e alle prestazioni è disponibile qui:

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

XIV. Stato di revisione

Le attuali istruzioni per l'uso costituiscono product 9511 / 06594441001 la versione 1.0 rilasciata a giugno 2024.

Modifiche alla versione precedente per il prodotto 9511 / 06594441001 (2.9, pubblicata a dicembre 2022):

- Il fabbricante è cambiato da Roche mtm laboratories AG a Roche Diagnostics GmbH e pertanto è stato emesso il nuovo numero di prodotto 10213370001
- Modifiche editoriali

XV. Proprietà intellettuale

CINtec ed E6H4 sono marchi commerciali di Roche.

Tutti gli altri marchi sono di proprietà dei rispettivi titolari.

© 2024 Roche

Annex 1 Bibliografia

1. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, and von Knebel Doeberitz M. Overexpression of 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

Annex 2

Esempio di colorazione diffusa

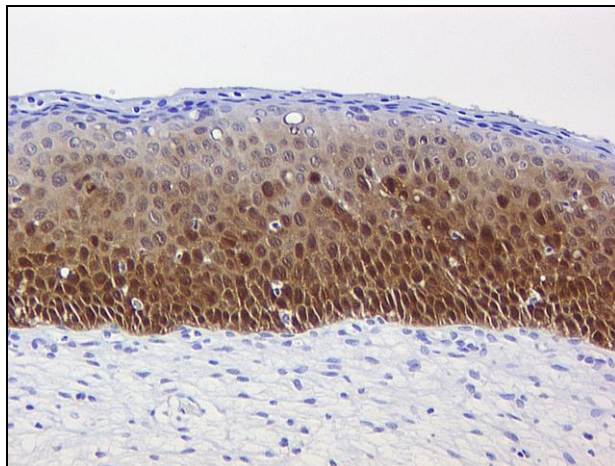


Fig. 1: CIN 3

Esempio di colorazione focale

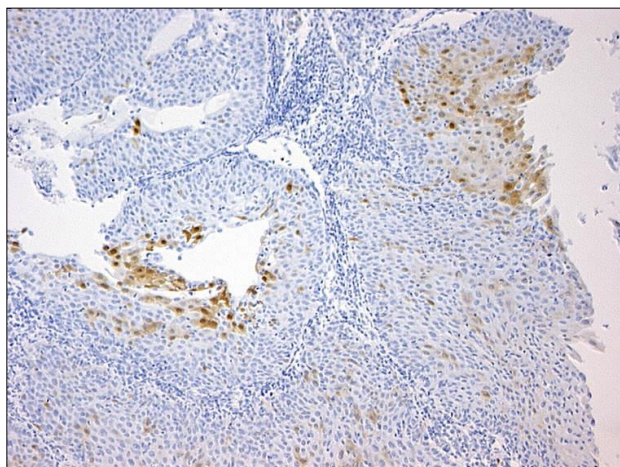


Fig. 2: Metaplasia squamosa matura