

CINtec® PLUS Cytology Kit

REF

605-100

06889565001

IVD

100

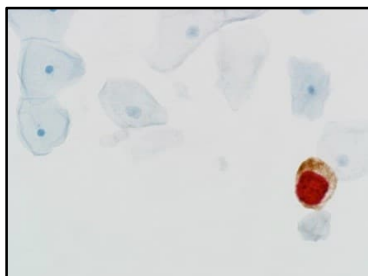


Figura 1. Célula epitelial de colo do útero positiva para p16^{INK4a} (coloração citoplasmática castanha) e para Ki-67 (coloração nuclear vermelha).

UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

CINtec PLUS Cytology Kit é um ensaio de imunocitoquímica que se destina a ser utilizado no laboratório para a detecção qualitativa em simultâneo das proteínas p16^{INK4a} e Ki-67 em preparações de citologia do colo do útero coradas num instrumento BenchMark IHC/ISH. Está indicado para utilização como auxiliar na identificação de mulheres com lesões intraepiteliais de alto grau no colo do útero numa população sujeita a rastreio, bem como nos subgrupos de pacientes cujo teste de Papanicolaou apresenta um resultado de ASC-US (células escamosas

atípicas de significado indeterminado) ou LSIL (lesão intraepitelial escamosa de baixo grau), ou em pacientes com resultados positivos de alto risco no teste de HPV.

A interpretação dos resultados dos testes só pode ser feita por um profissional certificado em conjunto com a história clínica do paciente e com os testes de diagnóstico adicionais que tenham sido efetuados.

O produto destina-se a utilização em diagnóstico in vitro (IVD).

RESUMO E EXPLICAÇÃO

Nas células eucarióticas, o controlo da progressão do ciclo de divisão celular é regulado por um padrão complexo de expressão controlada e por modificações pós-tradução das proteínas que regulam o ciclo celular. A proteína p16^{INK4a} desempenha um papel crucial neste mecanismo de regulação do ciclo das células eucarióticas. Faz parte do controlo da transição da fase G1/S mediado pela proteína do retinoblastoma (pRb), que desencadeia a paragem do ciclo celular no decorrer dos processos de diferenciação celular. Consequentemente, a p16^{INK4a} tem um efeito antiproliferativo durante a progressão do ciclo celular regular.¹ Em células epiteliais diferenciadas a nível terminal, a expressão de p16^{INK4a} é regulada negativamente para níveis normalmente não detetáveis através de imunocitoquímica (ICC).²

Na displasia do colo do útero, a sobre-expressão de p16 é considerada um biomarcador substituído da transformação das infeções por HPV, refletindo a ativação da proliferação celular impulsionada pela oncoproteína E6/E7 do HPV.^{2,3,4,5} A detecção de p16 em preparações de citologia do colo do útero foi proposta como um marcador adjuvante valioso para triagem de mulheres com resultados anómalos no teste de Papanicolaou, bem como com resultados positivos de testes de HPV.^{3,4,5} No entanto, como a coloração específica de p16 pode ser observada em células metaplásicas ou endocervicais individuais nas quais p16 pode ser expressa para exercer a sua função celular fisiológica normal, supressora de crescimento, a interpretação de preparações de citologia do colo do útero com coloração única de p16 requer a identificação de células imunorreativas de p16 e a classificação adicional dessas células em relação a sinais de anormalidades morfológicas.^{2,3,4}

A detecção simultânea combinada de p16 e do marcador de proliferação Ki-67 na mesma célula por ICC demonstrou ser uma ferramenta valiosa para identificar células do colo do útero displásicas em preparações citológicas sem a necessidade de interpretação morfológica.^{3,7,8} A Ki-67 é uma proteína nuclear e nucleolar estritamente associada à proliferação celular e não é detetável por métodos de imunocoloração padrão em células em repouso (G0).⁶ Em condições fisiológicas normais, a expressão da proteína Ki-67 associada à proliferação é mutuamente exclusiva da proteína anti-proliferativa p16. De forma contrastante, as células em que a via mediada pela proteína do retinoblastoma (pRb), que controla a progressão do ciclo celular, é anulada a montante da função de supressor tumoral da p16 (como acontece nas células epiteliais que expressam as

oncoproteínas HPV E6/E7 de alto risco) podem proliferar e, portanto, podem expressar Ki-67 na presença de p16 funcional.^{2,3}

Assim, a detecção de células individuais em preparações de citologia do colo do útero que co-expressam simultaneamente p16 e Ki-67 pode servir como indicador independente da morfologia de células com desregulação do ciclo celular. Esta co-expressão de p16 e Ki-67 pode ser utilizada como indicador da presença de transformação das infeções por HPV e de neoplasia intra-epitelial cervical subjacente.^{2,3} No passado recente, foram realizados e publicados numerosos estudos que avaliaram o valor potencial e a utilidade clínica da citologia de dupla coloração p16/Ki-67 na identificação de mulheres que podem beneficiar de encaminhamento para colposcopia com base em vários resultados de rastreio primário do cancro do colo do útero. Estes resultados incluem a triagem de mulheres com resultados de teste de Papanicolaou com células escamosas atípicas de significado indeterminado (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance, ASC-US) ou lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (Low grade Squamous Intraepithelial Lesion, LSIL), mulheres que são HPV positivas de alto risco no rastreio primário do HPV, ou mulheres que são negativas para lesão intraepitelial ou malignidade (Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy, NILM)/HPV positivas em contextos clínicos em que o teste de Papanicolaou/teste de HPV são utilizados como rastreio primário.⁷⁻²⁵

PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO

CINtec PLUS Cytology Kit contém um conjunto de reagentes para a detecção imunocitoquímica em simultâneo das proteínas p16^{INK4a} e Ki-67 em amostras citológicas obtidas no colo do útero. As proteínas são detetadas utilizando um cocktail pronto a utilizar de anticorpos monoclonais primários que contém um anticorpo monoclonal recombinante de rato direcionado contra a proteína p16^{INK4a} humana (clone E6H4TM) e um anticorpo primário recombinante de coelho direcionado contra a proteína Ki-67 humana (clone 274-11AC3V1). Após o condicionamento celular, a inibição da atividade de peroxidase endógena e a incubação com o cocktail de anticorpos primários, o ensaio utiliza dois sistemas de detecção prontos a utilizar, otimizados para utilização em amostras de citologia do colo do útero:

- Um anticorpo secundário de cabra anti-ratinho fixado covalentemente a haptenos HQ (hapteno proprietário) e um anticorpo terciário anti-hapteno HQ conjugado de peroxidase de rábano (HRP), otimizado para a detecção do clone de anticorpo monoclonal de rato E6H4;
- Um anticorpo secundário de cabra anti-coelho fixado covalentemente a haptenos NP (hapteno proprietário) e um anticorpo terciário anti-hapteno NP conjugado de fosfatase alcalina (AP), otimizado para a detecção do clone de anticorpo recombinante de coelho 274-11AC3V1.

As reações cromogénicas baseiam-se na conversão mediada por HRP de tetra-hidroclorato de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e a conversão mediada por AP de Fast Red com Naphthol Phosphate resulta num precipitado castanho no local do antígeno p16^{INK4a} e num precipitado vermelho no local do antígeno Ki-67, respetivamente.

Após a sujeição a coloração contrastante e bluing automáticos, segue-se um procedimento de montagem em duas fases. Primeiro, a lâmina é montada utilizando um meio de montagem aquoso. Subsequentemente, é aplicada uma coverslip na lâmina utilizando um meio de montagem permanente. Os resultados da coloração são avaliados através de inspeção com microscopia ótica.

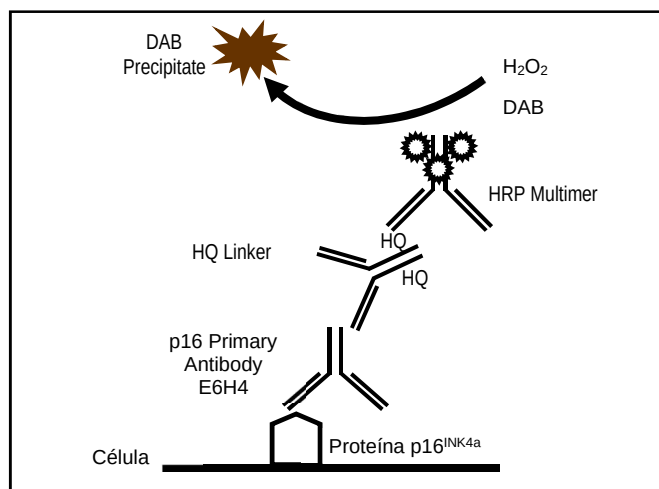


Figura 2. Detecção da proteína p16^{INK4a} humana.

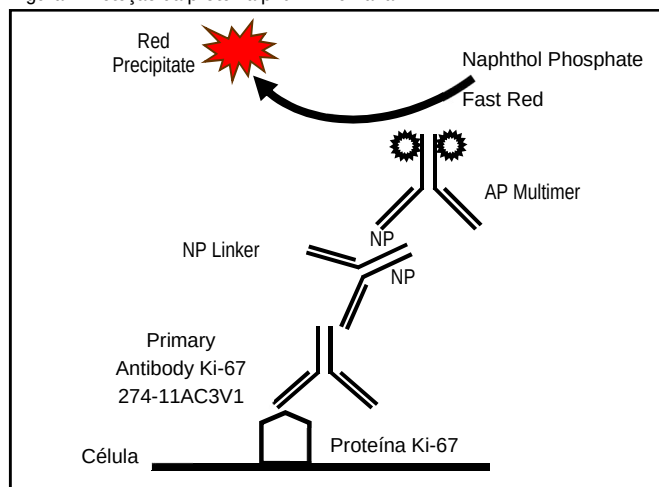


Figura 3. Detecção da proteína Ki-67 humana.

MATERIAIS FORNECIDOS

CINtec PLUS Cytology Kit contém reagente suficiente para 100 testes.

Um dispensador de 10 mL de	CINtec PLUS Cytology Primary Antibody Cocktail (p16/Ki-67) contém um cocktail de clone de anticórprio monoclonal recombinante de rato E6H4 direcionado para a proteína p16 ^{INK4a} humana e de clone de anticórprio primário recombinante de coelho 274-11AC3V1 direcionado contra a proteína Ki-67 humana (<5 µg/mL) num tampão contendo proteína com conservante ProClin 300.
Um dispensador de 10 mL de	CINtec PLUS Cytology Red anti-Rabbit NP Linker contém IgG de cabra anti-coelho marcada com NP (<10 µg/mL; NP é um hapteno proprietário fixado covalentemente ao anticórprio de cabra) num tampão que contém proteína, com o conservante ProClin 300.
Um dispensador de 10 mL de	CINtec PLUS Cytology Red AP Multimer contém um anticórprio terciário anti-NP monoclonal de rato marcado com AP (<20 µg/mL) num tampão que contém proteína, com o conservante ProClin 300.
Um dispensador de 10 mL de	CINtec PLUS Cytology Red Naphthol Phosphate contém Naphthol Phosphate (<1%), com o conservante ProClin 300.
Um dispensador de 10 mL de	CINtec PLUS Cytology Fast Red contém Fast Red (<1%) em tampão acetato, com o conservante ProClin 300.

Um dispensador de 10 mL de	CINtec PLUS Cytology DAB Peroxidase Inhibitor contém solução de peróxido de hidrogênio (<5%).
Um dispensador de 10 mL de	CINtec PLUS Cytology DAB anti-Mouse HQ Linker contém IgG de cabra anti-ratão marcada com HQ (<40 µg/mL; HQ é um hapteno proprietário fixado covalentemente ao anticórprio de cabra) num tampão com proteína, com o conservante ProClin 300.
Um dispensador de 10 mL de	CINtec PLUS Cytology DAB HRP Multimer contém um anticórprio terciário de HRP monoclonal de rato marcado com anti-HQ (<10 µg/mL) num tampão que contém proteína, com o conservante ProClin 300.
Um dispensador de 10 mL de	CINtec PLUS Cytology DAB contém tetra-hidrocloreto de 3,3' diaminobenzidina (<1%) numa solução de estabilizador proprietária com um conservante proprietário.
Um dispensador de 10 mL de	CINtec PLUS Cytology DAB H ₂ O ₂ contém peróxido de hidrogênio (<1%) numa solução de tampão fosfato.

RECONSTITUIÇÃO, HOMOGENEIZAÇÃO, DILUIÇÃO, TITULAÇÃO

CINtec PLUS Cytology Kit foi otimizado para utilização em instrumentos BenchMark IHC/ISH. Não é necessária qualquer reconstituição, homogeneização, diluição ou titulação dos reagentes do kit.

Quaisquer desvios relativamente aos procedimentos de fixação recomendados e ao posterior processamento das amostras citológicas de colo do útero podem produzir uma variabilidade substancial nos resultados, exigindo a realização regular de controlos internamente.

Para mais informações acerca de controlos, consulte a secção Controlo de qualidade.

MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

Os reagentes de coloração, como os dos kits de detecção VENTANA e os componentes auxiliares, incluindo lâminas de controlo tecidual positivo e negativo, não são fornecidos.

Os produtos indicados na folha de métodos podem não estar todos disponíveis em todas as regiões. Consulte o seu representante de assistência local.

São necessários os seguintes reagentes e materiais para a coloração, mas não são fornecidos no kit de detecção:

1. Controlos apropriados (opcional, consulte a secção Controlo de qualidade)
2. Hematoxylin Counterstain (Ref. 760-2021 / 05266726001)
3. Bluing Reagent (Ref. 760-2037 / 05266769001)
4. Reaction Buffer Concentrate (10X) (Ref. 950-300 / 05353955001)
5. Cell Conditioning Solution (CC1) (Ref. 950-124 / 05279801001)
6. Cell Conditioning Solution (CC2) (Ref. 950-123 / 05279798001)
7. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (Ref. 950-224 / 05424569001)
8. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC2) (Ref. 950-223 / 05424542001)
9. LCS (Predilute) (Ref. 650-010 / 05264839001)
10. ULTRA LCS (Predilute) (Ref. 650-210 / 05424534001)
11. Reagent Grade Ethanol desnatado (pureza ≥ 95%)
12. Instrumento BenchMark IHC/ISH
13. São recomendadas lâminas de microscópio Superfrost Plus (Thermo Fisher Scientific) para esfregaços convencionais
14. Lâminas de microscópio ThinPrep Arcless (Hologic REF 70126-002) ou lâminas de microscópio Superfrost Plus (VWR REF 48311-703)
15. Roche Cell Collection Medium (REF 07994753190)
16. PreservCyt® Solution (Hologic REF 234004)
17. Lâminas BD SurePath PreCoat (incluídas no kit SurePath GYN)
18. SurePath™ Preservative Fluid (BD REF 490522)
19. Meio de montagem aquoso CC/Mount (Roche REF 7342098001; Diagnostic BioSystems P/N: K 002; Sigma-Aldrich P/N: C9368)
20. Opcional: Estufa de secagem capaz de manter uma temperatura de 60 °C ± 5 °C
21. Equipamento de laboratório de uso genérico

CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE

Após a receção e quando não estiver a ser utilizado, conservar entre 2-8 °C. Não congelar. O utilizador deverá validar quaisquer outras condições de conservação que não

num banho de fixador contendo uma solução de etanol com grau de reagente $\geq 95\%$. Remova o banho de fixador ou o cesto de lâminas de ThinPrep 5000 Processor e incube as lâminas durante mais 15 minutos, no mínimo, e 60 minutos, no máximo. Substitua a solução de etanol do cesto de lâminas a seguir a cada ensaio. Depois de terminado o tempo de incubação, remova as lâminas da solução de etanol e seque as lâminas na posição horizontal sobre uma superfície plana durante, pelo menos, 60 minutos. As lâminas secas podem ser conservadas à temperatura ambiente protegidas da luz e têm de ser coradas com CINtec PLUS Cytology Kit no prazo de 7 dias após a preparação.

Antes de realizar a coloração imunocitoquímica com CINtec PLUS Cytology Kit, remova a etiqueta de lâmina original utilizada em ThinPrep 5000 Processor.

Preparação das amostras PreservCyt

Uma amostra de citologia em PreservCyt Solution (PC) destinada a coloração imunocitoquímica utilizando CINtec PLUS Cytology Kit pode ser conservada a 15-30 °C durante 6 semanas e depois durante mais 12 semanas refrigerada a 2-8 °C.

As lâminas ThinPrep Arcless Microscope ou as lâminas Superfrost Plus são necessárias para a coloração imunocitoquímica com CINtec PLUS Cytology Kit em instrumentos BenchMark IHC/ISH.

Slide Preparation com amostras colhidas em PreservCyt utilizando ThinPrep 2000 Processor

As lâminas são preparadas com amostras de citologia colhidas por um profissional de cuidados de saúde e ressuspensas em PreservCyt utilizando ThinPrep 2000 Processor. Depois de a sequência de ThinPrep 2000 Processor estar concluída, a lâmina processada é colocada num frasco com fixador contendo uma solução de etanol com grau de reagente $\geq 95\%$. Remova o frasco do suporte de banho de fixador de ThinPrep 2000 Processor e transfira a lâmina processada do frasco para uma caixa de lâminas cheia com uma solução de etanol com grau de reagente $\geq 95\%$. Incube a(s) lâmina(s) em etanol durante 15 minutos, no mínimo, e 60 minutos, no máximo. Substitua a solução de etanol no frasco de fixador e no cesto de lâminas a seguir a cada preparação de 20 lâminas. Depois de terminado o tempo de incubação, remova a(s) lâmina(s) da solução de etanol e seque a(s) lâmina(s) na posição horizontal sobre uma superfície plana durante, pelo menos, 60 minutos. As lâminas secas podem ser conservadas a 15-30 °C protegidas da luz e têm de ser coradas com CINtec PLUS Cytology Kit no prazo de 7 dias após a preparação.

Slide Preparation com amostras colhidas em PreservCyt utilizando ThinPrep 5000 Processor

As lâminas são preparadas com amostras de citologia colhidas por um profissional de cuidados de saúde e ressuspensas em PreservCyt utilizando ThinPrep 5000 Processor. Depois de a sequência de ThinPrep 5000 Processor estar concluída, as lâminas processadas ficam num rack de lâminas que é mergulhado num banho de fixador contendo uma solução de etanol com grau de reagente $\geq 95\%$. Remova o banho de fixador ou o cesto de lâminas de ThinPrep 5000 Processor e incube as lâminas durante mais 15 minutos, no mínimo, e 60 minutos, no máximo. Substitua a solução de etanol do cesto de lâminas a seguir a cada ensaio. Depois de terminado o tempo de incubação, remova as lâminas da solução de etanol e seque as lâminas na posição horizontal sobre uma superfície plana durante, pelo menos, 60 minutos. As lâminas secas podem ser conservadas à temperatura ambiente protegidas da luz e têm de ser coradas com CINtec PLUS Cytology Kit no prazo de 7 dias após a preparação.

Antes de realizar a coloração imunocitoquímica com CINtec PLUS Cytology Kit, remova a etiqueta de lâmina original utilizada em ThinPrep 5000 Processor.

Preparação das amostras BD SurePath

As amostras de citologia colhidas por um profissional de cuidados de saúde e ressuspensas em SurePath Preservative Fluid destinadas a coloração imunocitoquímica utilizando CINtec PLUS Cytology Kit podem ser conservadas durante um máximo de 4 semanas a 15-30 °C, ou durante 6 meses num frigorífico a 2-10 °C.

Slide Preparation de BD SurePath imediatamente a seguir ao processamento de uma lâmina de teste de Papanicolau

Depois de ter sido criado um agregado de células enriquecido para preparação de uma lâmina destinada a coloração de Papanicolau, esse agregado pode ser utilizado imediatamente na preparação de uma segunda lâmina que deverá ser corada com CINtec PLUS Cytology Kit. Siga as recomendações do fabricante para a utilização da "Slide Preparation" [opção 2] para amostras GYN no instrumento PrepStain™. O volume de ressuspensão tem de ser alterado para 0 mL na opção de menu "Change Sample/Stain Parameters".

Slide Preparation de BD SurePath com um agregado de células conservado

Os agregados de células enriquecidos podem ser conservados adicionando aproximadamente 2 mL de SurePath Preservative Fluid e tapando os tubos de amostras para conservação (consulte as instruções do fabricante para obter mais informações). A partir da data de colheita da amostra, os agregados de células que foram ressuspensos em fluido conservante podem ficar conservados durante até 4 semanas a 15-30 °C, ou durante 6 meses num frigorífico mantido a 2-10 °C. Para processar uma lâmina no CINtec PLUS Cytology Kit, deve primeiro deixar-se a amostra atingir a temperatura ambiente durante 60 minutos. Comece com o segundo passo de centrifugação do processo de enriquecimento GYN e prossiga com os restantes passos de pré-processamento, conforme descrito nas instruções do fabricante para o reproprocessamento de agregados de células preservadas. Siga as recomendações do fabricante para a utilização da "Slide Preparation" [opção 2] para amostras GYN no instrumento PrepStain.

Para todas as opções de preparação listadas acima, remova o rack de lâminas do instrumento PrepStain assim que estiver concluída a etapa de transferência de amostras. Inverta o rack para decantar o líquido. Pipete 2 mL de uma solução de etanol com grau de reagente $\geq 95\%$ para cada câmara de decantação e decante imediatamente. Enxágue com 2 mL de uma solução de etanol com grau de reagente $\geq 95\%$ uma segunda vez e incube durante 10 minutos. Decante segunda vez invertendo o rack. Remova as câmaras de decantação das lâminas e deixe as lâminas secar na horizontal sobre uma superfície plana durante, pelo menos, 60 minutos. As lâminas secas podem ser conservadas à temperatura ambiente protegidas da luz e têm de ser coradas com CINtec PLUS Cytology Kit no prazo de 7 dias após a preparação.

Utilização de esfregaços convencionais

Os esfregaços convencionais devem ser fixados com reagente de fixação em aerossol para citologia contendo polietilenoglicol (por exemplo, Safetex Cytology Fixative, Andwin Scientific) imediatamente após a colheita das amostras. As lâminas de esfregaço convencional fixadas com aerossol podem ser conservadas à temperatura ambiente protegidas da luz e têm de ser coradas com CINtec PLUS Cytology Kit no prazo de 7 dias após a preparação.

Não é necessário qualquer outro pré-processamento antes de carregar as lâminas no instrumento BenchMark IHC/ISH.

PROCEDIMENTO DE COLORAÇÃO

CINtec PLUS Cytology Kit foi desenvolvido para utilização em instrumentos BenchMark IHC/ISH em combinação com reagentes auxiliares e acessórios VENTANA.

CINtec PLUS Cytology Kit foi otimizado com os parâmetros indicados nas Tabelas 2, 3 e 4; o utilizador tem de validar os resultados obtidos com este kit.

Os parâmetros relativos aos protocolos automáticos podem ser apresentados, impressos e editados de acordo com as instruções do Manual do utilizador do instrumento.

Tabela 2. Protocolo de coloração recomendado para lâminas ThinPrep, SurePath e de esfregaço convencional preparadas no instrumento BenchMark GX.

Procedimento de coloração	GX CINtec PLUS Cytology		
Opções selecionáveis	Tipo de Slide Preparation		
	RCCM/ThinPrep	SurePath	Convencional
ThinPrep	Selecionado	Não selecionado	Não selecionado
SurePath	Não selecionado	Selecionado	Não selecionado
Outro	Não selecionado	Não selecionado	Selecionado
Opção Cell Conditioning	Não selecionável	Não selecionável	16 min
Tempo de incubação do anticorpo	16 min	20 min	16 min
Tempo de HQ Linker Inc	12 min	16 min	12 min

Procedimento de coloração	GX CINtec PLUS Cytology		
Opções selecionáveis	Tipo de Slide Preparation		
	RCCM/ThinPrep	SurePath	Convencional
Tempo de HRP Multimer Inc	6 min	8 min	8 min
Tempo de NP Linker Inc	8 min	16 min	8 min
Tempo de AP Multimer Inc	8 min	8 min	8 min
Hematoxylin	8 min	8 min	8 min
Bluing	4 min	4 min	4 min

Tabela 3. Protocolo de coloração recomendado para lâminas de esfregaço ThinPrep, SurePath e convencionais no instrumento BenchMark XT.

Procedimento de coloração	XT CINtec PLUS Cytology		
Opções selecionáveis	Tipo de Slide Preparation		
	RCCM/ThinPrep	SurePath	Convencional
ThinPrep	Selecionado	Não selecionado	Não selecionado
SurePath	Não selecionado	Selecionado	Não selecionado
Outro	Não selecionado	Não selecionado	Selecionado
Opção Cell Conditioning	Não selecionável	Não selecionável	16 min
Tempo de incubação do anticorpo	16 min	20 min	16 min
Tempo de HQ Linker Inc	12 min	16 min	12 min
Tempo de HRP Multimer Inc	8 min	8 min	8 min
Tempo de NP Linker Inc	8 min	16 min	8 min
Tempo de AP Multimer Inc	8 min	8 min	8 min
Hematoxylin	8 min	8 min	8 min
Bluing	4 min	4 min	4 min

Tabela 4. Protocolo de coloração recomendado para lâminas ThinPrep, SurePath e de esfregaço convencional preparadas nos instrumentos BenchMark ULTRA ou BenchMark ULTRA PLUS.

Procedimento de coloração	U CINtec PLUS Cytology		
Opções selecionáveis	Tipo de Slide Preparation		
	RCCM/ThinPrep	SurePath	Convencional
ThinPrep	Selecionado	Não selecionado	Não selecionado
SurePath	Não selecionado	Selecionado	Não selecionado
Outro	Não selecionado	Não selecionado	Selecionado

Procedimento de coloração	U CINtec PLUS Cytology		
Opções selecionáveis	Tipo de Slide Preparation		
	RCCM/ThinPrep	SurePath	Convencional
Opção Cell Conditioning	Não selecionável	Não selecionável	16 min
Tempo de incubação do anticorpo	16 min	16 min	16 min
Tempo de HQ Linker Inc	12 min	16 min	12 min
Tempo de HRP Multimer Inc	8 min	8 min	8 min
Tempo de NP Linker Inc	8 min	16 min	8 min
Tempo de AP Multimer Inc	8 min	8 min	8 min
Hematoxylin	8 min	8 min	8 min
Bluing	4 min	4 min	4 min

PROCEDIMENTO DE PÓS-PROCESSAMENTO - MONTAGEM E APLICAÇÃO DA COVERSILIP

Para manter uma sensibilidade ótima e prevenir o esbatimento dos cromogênios, é necessário um procedimento de montagem em duas etapas.

Remova as lâminas do instrumento BenchMark IHC/ISH e, cuidadosamente, agite e enxague as lâminas com água da torneira desionizada ou destilada e detergente de louça suave até LCS ser completamente removido das lâminas.

NOTA: Não deixe a água correr diretamente sobre as lâminas. A água deverá correr com o mínimo de força possível.

As lâminas serão montadas seguindo um protocolo de duas etapas, e as etapas seguintes têm de ser executadas sequencialmente:

Montagem aquosa:

1. Incube as lâminas em água destilada ou desionizada durante pelo menos 1 min;
2. As lâminas nas quais não vai ser aplicada uma coverslip devem ser mantidas em água destilada ou desionizada durante a aplicação do meio de montagem aquoso CC/Mount nas outras lâminas;
3. Remova apenas uma lâmina da água destilada ou desionizada e limpe cuidadosamente a parte de trás da lâmina com uma toalha de papel para remover o excesso de água. Não esconda nem limpe a água na parte da frente da lâmina (lado da amostra);
4. Pegue na lâmina com uma ligeira inclinação e aplique 4-6 gotas de meio de montagem aquoso CC/Mount por lâmina ThinPrep ou SurePath e 8 gotas por lâmina de esfregaço convencional. Evite a formação de bolhas de ar. Para evitar a formação de bolhas, a primeira gota pode ser descartada numa toalha de papel antes da aplicação de CC/Mount na área de preparação das amostras da lâmina;
5. Incline e rode suavemente a lâmina de vidro para criar uma camada fina de meio de montagem que cubra totalmente a área de preparação das amostras (não aplique ainda uma coverslip de película ou vidro); verifique a distribuição do meio de montagem na lâmina efetuando uma inspeção visual;
6. Limpe o excesso de meio de montagem aquoso CC/Mount na parte de trás e nos rebordos da lâmina. Se necessário, utilize uma toalha de papel húmida;
7. Para secar, coloque as lâminas preparadas na posição horizontal
 - Incube as lâminas ThinPrep ou SurePath preparadas a 37-60 °C durante 1 hora, ou então de um dia para o outro, à temperatura ambiente;
 - Incube as lâminas de esfregaço convencionais a 37 °C durante 4 horas, ou a 60 °C durante 1 hora, ou então de uma dia para o outro à temperatura ambiente

Aplicação de coverslip de película ou vidro:

1. Após a secagem completa da montagem aquosa de CC/Mount, deixe as lâminas atingirem um equilíbrio à temperatura ambiente, se necessário. Incube as lâminas em xileno durante 1 minuto no mínimo e 20 minutos no máximo. Em seguida, aplique nas lâminas coverslips de vidro utilizando um meio de montagem à base de xileno ou um método de aplicação de coverslip de película à base de xileno.

NOTA: As lâminas não podem ser desidratadas através de uma série ascendente de álcool antes de lhes ser aplicada uma coverslip de vidro ou película.

2. Deixe o meio de montagem à base de xileno secar à temperatura ambiente.

NOTA: Para minimizar o esbatimento, proteja as lâminas da luz e conserve-as à temperatura ambiente.

CONTROLO DE QUALIDADE

Quaisquer desvios relativamente aos procedimentos de fixação recomendados e ao posterior processamento das amostras citológicas de colo do útero podem produzir uma variabilidade substancial nos resultados. O mau funcionamento do produto devido a problemas de manuseamento ou a instabilidade não tem como resultado sinais óbvios. Por isso, devem ser executados simultaneamente controlos apropriados com amostras de pacientes.

Controlo positivo

Devem ser utilizadas como controlos positivos amostras processadas da mesma maneira que a(s) amostra(s) de pacientes. Os controlos positivos são um indicador de amostras preparadas corretamente e técnicas de coloração corretas. Deve ser incluído um controlo positivo em cada processo de coloração.

Os controlos positivos conhecidos devem ser utilizados apenas para monitorizar o correto desempenho de amostras processadas e de reagentes de teste, e não para auxiliar na formulação de um diagnóstico específico das amostras de pacientes. Se os controlos positivos não permitirem demonstrar coloração positiva apropriada, os resultados obtidos com as amostras de teste devem ser considerados inválidos.

Negative Control

Vários tipos de células diferentes presentes em amostras de citologia do colo do útero representativas, e que se sabe serem negativas em termos de expressão dos antígenos p16^{INK4a} e Ki-67 (tais como as células superficiais) podem servir como controlo negativo interno para avaliar a coloração de fundo.

Verificação do ensaio

O utilizador deve verificar o desempenho de CINtec PLUS Cytology Kit em amostras positivas e negativas com características do desempenho conhecidas antes iniciar o respetivo uso num procedimento de diagnóstico.

INTERPRETAÇÃO DA COLORAÇÃO/RESULTADOS PREVISTOS

A coloração com CINtec PLUS Cytology Kit produz dois produtos de reação de cor distinta: um precipitado castanho nos locais do antígeno p16^{INK4a}, e um precipitado vermelho nos locais do antígeno Ki-67. Uma coloração castanha das células (citoplasma e/ou núcleos) indica sobre-expressão de p16^{INK4a}. A coloração Red de células (núcleos) indica expressão de Ki-67. As células coradas para ambos os antígenos apresentam coloração citoplasmática castanha com núcleos vermelhos pronunciados de forma típica. Um patologista/técnico de citologia qualificado, com experiência em procedimentos de imunocitoquímica e formação na interpretação de lâminas coradas com CINtec PLUS Cytology Kit, tem de avaliar os controlos antes de interpretar os resultados.

A interpretação dos resultados dos testes só pode ser feita por um profissional certificado em conjunto com a história clínica do paciente e com os testes de diagnóstico adicionais que tenham sido efetuados.

Para fazer a interpretação das lâminas de citologia do colo do útero coradas com CINtec PLUS Cytology Kit, as lâminas devem ser avaliadas em termos de presença de células epiteliais de colo do útero que apresentem coloração citoplasmática castanha e nuclear vermelha, um indicador de expressão de p16^{INK4a} e Ki-67 em simultâneo. Além disso, à semelhança da comunicação dos resultados do teste de Papanicolaou, as amostras devem ser avaliadas quanto à adequação da amostra de acordo com as Bethesda Guidelines 2015 (ou TBS)²⁸ ao comunicar o resultado do teste CINtec PLUS Cytology Kit.

Resultado de teste positivo

A presença de uma ou mais células epiteliais de colo do útero com colocação de imunocoloração citoplasmática castanha específica e imunocoloração nuclear vermelha específica dentro da mesma célula é considerada um resultado de teste CINtec PLUS Cytology Kit positivo, independentemente das características citomorfológicas.

Resultado de teste negativo

Se nenhuma célula epitelial de colo do útero apresentar simultaneamente imunocoloração citoplasmática castanha e imunocoloração nuclear vermelha, o resultado do teste CINtec PLUS Cytology Kit é considerado negativo.

A presença de células epiteliais de colo do útero que apresentam imunorreatividade apenas para um marcador, mas não para ambos os marcadores (como a coloração castanha de p16^{INK4a} apenas ou a coloração vermelha de Ki-67 apenas), não é considerada um resultado de teste positivo de CINtec PLUS Cytology Kit.

LIMITAÇÕES ESPECÍFICAS

1. Apenas para utilização profissional. É necessária formação especial para realizar procedimentos imunocitoquímicos.
2. A avaliação de lâminas de microscópio coradas com CINtec PLUS Cytology Kit deve ser realizada apenas por um técnico certificado que tenha recebido formação para interpretar estes resultados do teste.
3. A interpretação clínica de qualquer coloração positiva ou negativa deve ser avaliada dentro do contexto da apresentação clínica e dos critérios citológicos.
4. A interpretação dos resultados de coloração de CINtec PLUS Cytology Kit depende da intensidade e qualidade da sujeição a coloração contrastante com hematoxilina. Qualquer desvio em relação aos reagentes e tempos de incubação recomendados requer a validação por parte do cliente, uma vez que uma sujeição a coloração contrastante excessiva ou incompleta pode interferir com a correta interpretação dos resultados.
5. É frequente as amostras de colo do útero apresentarem níveis visivelmente detetáveis de sangue total. Se a concentração de sangue total ultrapassar 1.0%, a amostra deve ser lisada com ácido acético glacial (GAA), respeitando o protocolo ThinPrep, antes da preparação da lâmina.
6. As lâminas de esfregaço convencionais que se destinam a utilização na coloração com CINtec PLUS Cytology Kit devem ser preparadas utilizando lâminas de vidro para microscópio Superfrost Plus e Safetex Cytology Fixative (Andwin Scientific), um reagente de fixação em aerossol para citologia que contém polietilenoglicol. Qualquer desvio relativamente a esta recomendação requer validação por parte do cliente.
7. Não é recomendada a utilização de ThinPrep 3000 Processor para preparação de amostras ThinPrep, uma vez que o procedimento de fixação com aerossol realizado pelo instrumento pode causar perda substancial de células quando as lâminas preparadas são coradas com CINtec PLUS Cytology Kit.
8. As lâminas ThinPrep Arcless Microscope ou as lâminas de microscópio ThinPrep Microscope Slides para processamento especial ou Superfrost Plus são necessárias para preparação de amostras ThinPrep para coloração imunocitoquímica com CINtec PLUS Cytology Kit em instrumentos BenchMark IHC/ISH. As lâminas de microscópio ThinPrep com uma área de rastreio impressa podem levar a resultados de coloração inconsistentes.
9. O fabricante fornece estes anticorpos/reagentes com a diluição ótima para utilização em conformidade com as instruções aqui fornecidas para realização de testes de imunocitoquímica em lâminas preparadas para citologia em meio líquido (LBC). Qualquer desvio em relação aos procedimentos de teste recomendados pode invalidar os resultados previstos declarados; devem ser utilizados e documentados os controlos apropriados. Os utilizadores que se desviarem dos procedimentos de teste recomendados têm de aceitar a responsabilidade pela interpretação dos resultados dos pacientes nessas circunstâncias.
10. Os ensaios podem não estar todos registados em todos os instrumentos. Contacte o seu representante local da Roche para obter mais informações.

CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

DESEMPENHO ANALÍTICO

O desempenho de CINtec PLUS Cytology Kit foi avaliado através de estudos de reprodutibilidade analítica e de outros estudos relevantes.

Sensibilidade e especificidade analítica

A sensibilidade e a especificidade analítica dos anticorpos primários p16 e Ki-67 foram testadas em ensaios de Western Blot e de inibição peptídica.

Nos ensaios de Western Blot foram utilizados lisados de linhas celulares representativas de uma série de intensidades de coloração. O anticorpo p16^{INK4a} (E6H4) conseguiu detetar uma banda de aproximadamente 15-20 kD na preparação de proteína p16^{INK4a} recombinante purificada. Além disso, o anticorpo ligou-se especificamente à proteína

p16^{INK4a} recombinante purificada e não a uma quantidade equivalente de proteína recombinante não relacionada. Ficou também demonstrado que o anticorpo liga a proteína p16^{INK4a} endógena expressa em lisados derivados de linhas celulares HeLa, SK Mel 28 e DU145, e não na linha celular de negativa de p16^{INK4a}, a MDA MB 231. Os níveis relativos de proteína p16^{INK4a} detetados em lisados das quatro linhas celulares em Western Blot corresponderam aos dados de coloração IHC, o que demonstrou a sensibilidade da detecção de anticorpo anti-p16^{INK4a} (E6H4). A ligação do clone do anticorpo Ki-67 (274-11AC3V1) foi testada num ensaio de Western Blot utilizando lisados de células inteiras preparados a partir de linhas celulares de L428 (um linfoma de Hodgkin positivo para o antígeno Ki-67; DSMZ ATCC 197) e de LNCaP (uma linha celular de carcinoma da próstata com baixa expressão de proteína Ki-67; ATCC CRL-1740). O anticorpo foi capaz de detetar a proteína Ki-67 endógena em lisados de células, mesmo em níveis de expressão baixos, e a intensidade da banda correlacionou-se com a coloração IHC de Ki-67 nestas linhas celulares. O anticorpo primário CIntec PLUS Cytology Kit Ki-67 (274-11AC3V1) ligou-se a um fragmento de proteína Ki-67 recombinante purificada, e não a uma quantidade equivalente da proteína de controlo negativo recombinante não relacionada. A ligação neste ensaio não foi detetada na linha celular LNCaP com baixa expressão de Ki-67. Os níveis relativos de proteína Ki-67 detetados em lisados destas linhas celulares no ensaio de Western Blot estão correlacionados com os dados de coloração IHC e com os dados de expressão de mRNA. Os resultados do Western Blot demonstram que o anticorpo primário Ki-67 utilizado em CIntec PLUS Cytology Kit consegue detetar a proteína Ki-67 endógena em lisados celulares e no fragmento de proteína Ki-67 recombinante na forma purificada.

Os ensaios de inibição peptídica utilizaram soluções contendo péptidos específicos de p16 ou Ki-67. O cocktail de anticorpos primários foi diluído numa razão de 1:1, volume:volume, com soluções peptídicas específicas de p16 ou Ki-67 com diferentes concentrações para abranger um leque de razões molares: aproximadamente 1 vez, 10 vezes, 100 vezes, 1000 vezes e 10000 vezes o excesso molar de péptidos, em comparação com a concentração final de anticorpo na solução. O cocktail de anticorpos primários contendo o péptido específico de p16 serviu como controlo não específico para o anticorpo anti-Ki-67, e um péptido Alk-a não relacionado serviu como controlo não específico para o anticorpo anti-p16. Foi corada uma lâmina de cada amostra (três pools de amostras citológicas de colo do útero e um de células CaSki) com cada solução. Os resultados deste estudo demonstraram que o anticorpo anti-p16 se liga especificamente à proteína p16, e que o anticorpo anti-Ki-67 se liga especificamente à proteína Ki-67. Como era de esperar, as intensidades da coloração de p16 e Ki-67 sofreram uma redução em todas as amostras após a coloração com soluções que continham os respetivos péptidos específicos numa concentração de 1 M, tendo sido atingida a inibição completa com as soluções que continham ≥ 10 M, ao passo que não foi observada nenhuma redução da intensidade da coloração da p16 após coloração com soluções que continham péptidos não específicos ou que não continham péptidos.

Repetibilidade e precisão intermédia

Foram realizados estudos de precisão da coloração com CIntec PLUS Cytology Kit de amostras de colo do útero ThinPrep para demonstrar:

- Precisão global – A percentagem de resultados iguais aos da maioria foi calculada para cada um dos 12 pools de citologia de colo do útero (3 pools HSIL/HPV+, 1 LSIL/HPV+, 1 ASC-US/HPV+, 1 NILM/HPV+, 3 NILM/HPV- LBC e 3 pools negativos da linha celular T24) corados com 3 lotes de CIntec PLUS Cytology Kit, em 5 dias não consecutivos, utilizando 2 lâminas replicadas de cada pool e avaliados por 3 equipas de leitores.
- Precisão entre dias – A percentagem de resultados iguais aos da maioria foi calculada para cada dia (Dia 1-Dia 5), agregando dados de 12 pools de citologia de colo do útero (3 pools HSIL/HPV+, 1 LSIL/HPV+, 1 ASC-US/HPV+, 1 NILM/HPV+, 3 NILM/HPV- LBC e 3 pools negativos da linha celular T24), 3 lotes de CIntec PLUS Cytology Kit, 2 lâminas replicadas de cada pool e 3 equipas de leitores.
- Precisão entre lotes – A percentagem de resultados iguais aos da maioria foi calculada para cada lote de CIntec PLUS Cytology Kit (Lote 1-3) agregando dados de 12 pools de citologia de colo do útero (3 pools HSIL/HPV+, 1 LSIL/HPV+, 1 ASC-US/HPV+, 1 NILM/HPV+, 3 NILM/HPV- LBC e 3 pools negativos da linha celular T24), 5 dias não consecutivos, 2 réplicas e 3 equipas de leitores.

Todas as lâminas foram ocultadas e randomizadas, tendo depois sido avaliadas seguindo a interpretação de coloração de CIntec PLUS Cytology Kit. As lâminas foram avaliadas por três equipas de leitores, cada uma delas constituída por um técnico de citologia e por um patologista. A maioria, ou o resultado no modo de nível de pool (positivo ou negativo), foi utilizada como referência para determinar a percentagem de resultados iguais aos da maioria. A percentagem de resultados iguais aos da maioria é equivalente a PPA quando

a maioria é positiva e a NPA quando a maioria é negativa. Os resultados são apresentados de forma resumida na Tabela 5, na Tabela 6 e na Tabela 7. Todos os intervalos de confiança (CI) foram intervalos de confiança de 95% bilaterais. Os CI foram calculados utilizando o método percentil bootstrap, exceto nos casos em que a estimativa pontual era de 100%. Nestes casos, foi utilizado o método de pontuação de Wilson.

Tabela 5. Estudo de precisão intralaboratorial – Precisão global

Categoria de pool	Número de avaliações	Modo de resultados de CIntec PLUS Cytology Kit (maioria)	Percentagem de resultados iguais aos da maioria	Intervalo de confiança de 95%
Linha celular T24	270	Negativo	100.0%	(98.6, 100.0)
NILM/HPV-	270	Negativo	94.1%	(90.7, 97.0)
NILM/HPV+	90	Positivo	61.1%	(47.2, 74.4)
ASC-US/HPV+	90	Positivo	93.3%	(88.9, 97.8)
LSIL/HPV+	90	Positivo	100.0%	(95.9, 100.0)
HSIL/HPV+	270	Positivo	98.9%	(96.7, 100.0)

Tabela 6. Estudo de precisão intralaboratorial - Precisão entre dias

Categoria de pool	Número de avaliações	Modo de resultados de CIntec PLUS Cytology Kit (maioria)	Percentagem de resultados iguais aos da maioria				
			Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Linha celular T-24	270	Negativo	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
NILM/HPV-	270	Negativo	88.9%	90.7%	98.1%	98.1%	94.4%
NILM/HPV+	90	Positivo	44.4%	50.0%	77.8%	66.7%	66.7%
ASC-US/HPV+	90	Positivo	94.4%	88.9%	88.9%	94.4%	100.0%
LSIL/HPV+	90	Positivo	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
HSIL/HPV+	270	Positivo	100.0%	94.4%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabela 7. Estudo de precisão intralaboratorial - Precisão entre lotes

Categoria de pool	Número de avaliações	Modo de resultados de CIntec PLUS Cytology Kit (maioria)	Percentagem de resultados iguais aos da maioria		
			Lote 1	Lote 2	Lote 3
Linha celular T24	270	Negativo	100.0%	100.0%	100.0%
NILM/HPV-	270	Negativo	92.2%	93.3%	96.7%
NILM/HPV+	90	Positivo	46.7%	70.0%	66.7%
ASC-US/HPV+	90	Positivo	90.0%	96.7%	93.3%
LSIL/HPV+	90	Positivo	100.0%	100.0%	100.0%
HSIL/HPV+	270	Positivo	100.0%	100.0%	96.7%

Precisão do leitor

Para avaliar a precisão do leitor, três equipas de leitores, cada uma constituída por um técnico de citologia e um patologista, avaliaram todas as lâminas coradas para os estudos de precisão, incluindo 2 réplicas de 12 pools de citologia de colo do útero (3 pools HSIL/HPV+, 1 LSIL/HPV+, 1 ASC-US/HPV+, 1 NILM/HPV+, 3 NILM/HPV- LBC e 3 pools

negativos da linha celular T24), 3 lotes CINtec PLUS Cytology Kit, em 5 dias não consecutivos. As percentagens de resultados iguais à maioria foram calculadas a partir dos resultados agregados entre as equipas de leitores e estão resumidas na Tabela 8.

Tabela 8. Estudo de precisão intralaboratorial - Precisão entre leitores

Categoria de pool	Número de avaliações	Modo de resultados de CINtec PLUS Cytology Kit (maioria)	Percentagem de resultados iguais aos da maioria		
			Equipa de leitores 1	Equipa de leitores 2	Equipa de leitores 3
Linha celular T 24	270	Negativo	100.0%	100.0%	100.0%
NILM/HPV-	270	Negativo	95.6%	91.1%	95.6%
NILM/HPV+	90	Positivo	70.0%	63.3%	50.0%
ASC-US/HPV+	90	Positivo	100.0%	90.0%	90.0%
LSIL/HPV+	90	Positivo	100.0%	100.0%	100.0%
HSIL/HPV+	270	Positivo	98.9%	98.9%	98.9%

externa

Os estudos de reprodutibilidade de CINtec PLUS Cytology Kit foram realizados para demonstrar:

- A reprodutibilidade interlotes de CINtec PLUS Cytology Kit (Tabela 9),
- A reprodutibilidade intraensaio (Tabela 10) e interensaios (Tabela 11) nos instrumentos BenchMark GX, XT e ULTRA
- A reprodutibilidade intraplataforma nos instrumentos BenchMark GX, XT e ULTRA (Tabela 12),
- A reprodutibilidade interplataformas entre os instrumentos BenchMark GX, XT e ULTRA (Tabela 13).

Tabela 9. A reprodutibilidade interlotes de CINtec PLUS Cytology Kit.

Tipo de amostra	Percentagem de concordância global
ThinPrep	100.0
SurePath	100.0

Tabela 10. Reprodutibilidade intraensaio de CINtec PLUS Cytology Kit.

Tipo de amostra	Percentagem de concordância global		
	GX	XT	ULTRA
ThinPrep	100.0	100.0	100.0
SurePath	93.8	96.3	92.6

Tabela 11. Reprodutibilidade interensaios de CINtec PLUS Cytology Kit.

Tipo de amostra	Percentagem de concordância global		
	GX	XT	ULTRA
ThinPrep	100.0	96.2	100.0
SurePath	100.0	92.6	100

Tabela 12. Reprodutibilidade intraplataforma de CINtec PLUS Cytology Kit.

Tipo de amostra	Percentagem de concordância global		
	GX	XT	ULTRA
ThinPrep	100.0	100.0	100.0
SurePath	100.0	100.0	96.3

Tabela 13. Reprodutibilidade interplataformas de CINtec PLUS Cytology Kit.

Tipo de amostra	Percentagem de concordância global
ThinPrep	100.0
SurePath	96.3

Estes estudos foram realizados em amostras de colo do útero ThinPrep e SurePath. Todos os estudos cumpriram os respetivos critérios de aceitação predeterminados.

Estudos de concordância

O desempenho de CINtec PLUS Cytology Kit para utilização em instrumentos BenchMark GX, XT e ULTRA foi avaliado por comparação com CINtec PLUS Kit (dispositivo homologado, Roche mtm laboratories AG, Mannheim) que demonstrou anteriormente elevada sensibilidade e especificidade em termos de presença de doença pré-cancerosa e cancerosa em amostras de citologia do colo do útero no que diz respeito à presença de células epiteliais de colo do útero individuais que apresentam um resultado de coloração dupla positivo para p16^{INK4a} e Ki-67.^{7-15,18,20,23,25-28}

Foram realizados estudos de concordância utilizando amostras de pacientes da população de utilização pretendida, com um resultado de teste de Papanicolaou NILM (negativo para lesão intraepitelial ou malignidade), ASC-US, LSIL e HSIL para cada um dos métodos individuais de preparação de citologia do colo do útero: Lâminas ThinPrep, BD SurePath e de esfregaço convencional. Para as amostras LBC, foram preparadas duas lâminas de cada amostra de paciente. No caso dos esfregaços convencionais, foram preparadas duas lâminas da mesma paciente na mesma consulta, sendo o material de amostra colhido dividido por duas lâminas ("técnica de divisão de amostras"). Uma lâmina foi testada com CINtec PLUS Cytology Kit num instrumento BenchMark IHC/ISH e uma lâmina foi corada com o dispositivo homologado.

Algoritmo de leitura das amostras LBC:

Cada lâmina foi lida por dois leitores qualificados. Se estivessem de acordo quanto ao resultado, considerava-se que o resultado era final para essa lâmina. Se não estivessem de acordo quanto ao resultado, era realizada uma leitura de arbitragem por um terceiro leitor e o resultado obtido pela maioria passava a ser o resultado final dessa lâmina.

Algoritmo de leitura das lâminas de esfregaço convencionais:

Cada lâmina foi lida por dois leitores qualificados. Se ambos os leitores classificassem uma lâmina como positiva, o resultado final dessa lâmina era positivo. Se não estivessem de acordo quanto ao resultado, a lâmina era revista por três leitores como painel para uma revisão consensual, e o resultado passava a ser o resultado final dessa lâmina. Se ambos os leitores classificassem uma lâmina como negativa, a lâmina era lida por um terceiro leitor para confirmar o resultado negativo. Se o terceiro leitor confirmasse o resultado negativo, o resultado final dessa lâmina era negativo. Se o terceiro leitor classificasse uma lâmina como positiva, a lâmina era submetida a uma revisão por painel para encontrar um consenso, que passava a ser o resultado final dessa lâmina.

A concordância dos resultados do teste é reportada como percentagem de concordância positiva (PPA) e percentagem de concordância negativa (NPA) $\pm$ o intervalo de confiança (CI) de 95% entre CINtec PLUS Cytology Kit para utilização num instrumento BenchMark IHC/ISH e no dispositivo homologado.

Tabela 14. Concordância dos resultados de teste entre CINtec PLUS Cytology Kit e o dispositivo homologado em preparações de lâminas de citologia do colo do útero ThinPrep.

CINtec PLUS Cytology Kit		Dispositivo homologado	
		+	-
	+	140	25
	-	17	147
	Total	157	172
PPA (n/N) (CI de 95%) = 140/157 x 100% = 89.2% (83.3-93.1%)			
NPA (n/N) (CI de 95%) = 147/172 x 100% = 85.5% (79.4-90.0%)			

Tabela 15. Concordância dos resultados de teste entre CINtec PLUS Cytology Kit e o dispositivo homologado em preparações de lâminas de citologia do colo do útero SurePath.

		Dispositivo homologado	
		+	-
CINtec PLUS Cytology Kit	+	56	3
	-	9	108
Total		65	111
PPA (n/N) (CI de 95%) = 56/65 x 100% = 86.2% (75.7-92.5%)			
NPA (n/N) (CI de 95%) = 108/111 x 100% = 97.3% (92.4-99.1%)			

Tabela 16. Concordância dos resultados do teste entre CINtec PLUS Cytology Kit e o dispositivo homologado em preparações de lâmina de citologia do colo do útero de esfregaços convencionais.

		Dispositivo homologado	
		+	-
CINtec PLUS Cytology Kit	+	98	17
	-	20	72
Total		118	89
PPA (n/N) (CI de 95%) = 98/118 x 100% = 83.1% (75.3-88.8%)			
NPA (n/N) (CI de 95%) = 72/89 x 100% = 80.9% (71.5-87.7%)			

Estudo Roche Cell Collection Medium

O desempenho de Roche Cell Collection Medium em comparação com a solução PreservCyt foi avaliado por coloração de 616 pares de amostras de colo do útero (casos) utilizando CINtec PLUS Cytology Kit. Para cada caso, foi preparada uma lâmina de cada um dos respectivos frascos de PC ou RCCM. Todas as lâminas foram lidas por uma equipa de técnicos de citologia/patologistas, com a identidade das lâminas ocultada. Os resultados de teste de CINtec PLUS Cytology Kit que fazem a comparação entre meios (PC vs. RCCM) encontram-se resumidos na Tabela 17. As taxas de positividade foram calculadas dividindo o número de casos positivos pelo número total de casos adequados para cada meio. Os resultados mostram uma diferença entre as duas taxas de positividade de 2.4% (1.5, 6.3).

Tabela 17. Equivalência em termos de taxas positivas de CINtec PLUS Cytology Kit de Roche Cell Collection Medium (RCCM) e PreservCyt (PC).

Resultado de CINtec PLUS Cytology Kit em termos de RCCM	Resultado de CINtec PLUS Cytology Kit em termos de PC		
	Positivo	Negative	Total
Positivo	170	48	218
Negative	37	204	241
Total	207	252	459
Taxa de positividade de RCCM, n/N (%):	218/459 (47.5%)		
Taxa de positividade de PC, n/N (%):	207/459 (45.1%)		
Diferença de taxas de positividade, n/N (%):	11/459 (2.4%; CI de 95%: -1.5, 6.3)		

Os resultados de CINtec PLUS Cytology Kit de comparação da adequação da celularidade de PreservCyt com Roche Cell Collection Medium encontram-se resumidos na Tabela 18. As taxas de celularidade adequada foram calculadas dividindo o número de casos com celularidade adequada pelo número total de casos de cada meio. Os

resultados mostram a diferença entre as duas taxas de celularidade adequadas como sendo de 3.2% (-0.0, 6.6).

Tabela 18. Comparação da adequação da celularidade de CINtec PLUS Cytology Kit em termos de Roche Cell Collection Medium (RCCM) e PreservCyt (PC).

Adequação da celularidade de CINtec PLUS Cytology Kit em termos de RCCM	Adequação da celularidade de CINtec PLUS Cytology Kit em termos de PC		
	Sim	Não	Total
Sim	468	63	531
Não	43	42	85
Total	511	105	616
Taxa de adequação de RCCM, n/N (%):	531/616 (86.2%)		
Taxa de adequação de PC, n/N (%):	511/616 (83.0%)		
Diferença de taxas de adequação, n/N (%):	20/616 (3.2%; CI de 95%: -0.0, 6.6)		

Estudo de reprodutibilidade interlaboratorial na plataforma de coloração BenchMark ULTRA PLUS

Foi efetuado um estudo de reprodutibilidade para avaliar o teste CINtec PLUS Cytology no instrumento BenchMark ULTRA PLUS para a deteção imunocitoquímica dupla de p16INK4a e Ki-67 em amostras citológicas. O estudo incluiu 2 culturas distintas de células T24 e 10 pools de amostras derivadas de doentes (2 HSIL/HPV+, 2 LSIL/HPV+, 2 ASC-US/HPV+, 2 NILM/HPV+ e 2 NILM/HPV- LBC). As culturas de células T24 foram preparadas a partir de um único banco de células de trabalho. Foram fornecidas a cada um dos 3 centros de estudo alíquotas de cada pool de amostras, cultura de células T24 e um pool de controlo com volume suficiente para a realização dos testes planeados em cada centro. Em cada um dos cinco dias de coloração, os centros prepararam uma lâmina de teste a partir de cada uma das alíquotas fornecidas por RTD utilizando um processador de lâminas ThinPrep 2000 ou ThinPrep 5000. Após a preparação das lâminas, cada centro corou um conjunto de 13 lâminas num instrumento BenchMark ULTRA PLUS. Os 5 dias de coloração foram não consecutivos e abrangeram pelo menos 20 dias. Em cada centro, 2 equipas de leitores, cada uma constituída por um técnico de citologia e um patologista, avaliaram independentemente as lâminas coradas no respetivo centro quanto à presença ou ausência de dupla coloração e atribuíram à lâmina um resultado do teste CINtec PLUS Cytology positivo, negativo ou insatisfatório. Todas as determinações anteriores do estado do HPV, do estado do teste de Papanicolaú, dos resultados do teste CINtec PLUS Cytology, bem como outras informações clínicas, foram ocultadas às equipas de leitores.

Os dados foram introduzidos diretamente numa base de dados clínica e analisados para determinar a reprodutibilidade do ensaio em vários centros, dias e equipas de leitores. As taxas de aceitabilidade da celularidade e da coloração de fundo de todos os casos foram de 100% em todos os instrumentos. Os resultados são apresentados de forma resumida na Tabela 19 e na Tabela 20.

Tabela 19. Estudo de reprodutibilidade interlaboratorial do instrumento BenchMark ULTRA PLUS – Reprodutibilidade entre centros

Categoria de pool	Número de avaliações	Modo de resultados de CINtec PLUS Cytology (maioria)	Percentagem de resultados iguais aos da maioria		
			Centro A	Centro B	Centro C
Linha celular T24	60	Negativo	95.0%	100.0%	100.0%
NILM/HPV-	60	Negativo	100.0%	95.0%	100.0%
NILM/HPV+	60	Positivo	90.0%	80.0%	95.0%
ASC-US/HPV+	60	Positivo	100.0%	95.0%	100.0%

Categoria de pool	Número de avaliações	Modo de resultados de CINTec PLUS Cytology (maioria)	Percentagem de resultados iguais aos da maioria		
			Centro A	Centro B	Centro C
LSIL/HPV+	60	Positivo	100.0%	95.0%	100.0%
HSIL/HPV+	60	Positivo	100.0%	100.0%	100.0%

Tabela 20. Estudo de reprodutibilidade interlaboratorial do instrumento BenchMark ULTRA PLUS – Precisão global

Categoria de pool	Modo de resultados de CINTec PLUS Cytology (maioria)	Percentagem de resultados iguais aos da maioria	n/N	Intervalos de confiança de 95%
Linha celular T24	Negativo	98.3%	59/60	(96.7, 100.0)
NILM/HPV-	Negativo	98.3%	59/60	(96.7, 100.0)
NILM/HPV+	Positivo	88.3%	53/60	(86.7, 90.0)
ASC-US/HPV+	Positivo	98.3%	59/60	(96.7, 100.0)
LSIL/HPV+	Positivo	98.3%	59/60	(96.7, 100.0)
HSIL/HPV+	Positivo	100.0%	60/60	(94.0, 100.0)

Concordância entre os instrumentos BenchMark ULTRA PLUS e BenchMark ULTRA (amostras ThinPrep)

Três laboratórios participaram num estudo de concordância entre o instrumento BenchMark ULTRA PLUS e o instrumento BenchMark ULTRA. Este estudo utilizou 220 pools de amostras de colo do útero de LBC não identificadas ThinPrep preparadas em Roche Tissue Diagnostics (RTD) nas seguintes categorias: 88 pools positivos, 22 pools positivos borderline, 22 pools negativos intermédios e 88 pools de cultura de células T24 negativos. Um conjunto de 4 lâminas de cada amostra foi preparado em RTD utilizando o processador de lâminas ThinPrep 2000 ou ThinPrep 5000. A primeira lâmina preparada de cada conjunto foi corada num instrumento BenchMark ULTRA em RTD. Uma das 3 lâminas restantes foi fornecida a cada centro de estudo para coloração com o teste CINTec PLUS Cytology no instrumento BenchMark ULTRA PLUS. A lâmina BenchMark ULTRA corada em RTD foi avaliada quanto à presença ou ausência de dupla coloração e foi-lhe atribuída um resultado positivo, negativo ou insatisfatório por uma equipa de leitores de RTD, constituída por um técnico de citologia e um patologista, para estabelecer uma pontuação de referência. Em cada centro, uma equipa de leitores do estudo avaliou independentemente as lâminas coradas no instrumento BenchMark ULTRA para obter um resultado do teste CINTec PLUS Cytology. As lâminas coradas no instrumento BenchMark ULTRA PLUS em cada centro foram avaliadas pela equipa de leitores desse centro em termos de resultado do teste CINTec PLUS Cytology. Por conseguinte, cada equipa de leitores do centro avaliou uma lâmina corada BenchMark ULTRA e uma lâmina corada BenchMark ULTRA PLUS de cada amostra. As leituras das lâminas coradas BenchMark ULTRA e BenchMark ULTRA PLUS foram separadas por um período de wash-out de duas semanas. Todas as determinações anteriores do estado do HPV, do estado do teste de Papanicolau, dos resultados do teste CINTec PLUS Cytology, bem como outras informações clínicas, foram ocultadas a todas as equipas de leitores. A equivalência de desempenho do ensaio CINTec PLUS Cytology era considerada aceitável no instrumento BenchMark ULTRA PLUS se as taxas de PPA e NPA tivessem um limite inferior de intervalo de confiança de 95% bilateral de, pelo menos, 85%. Exigia-se que a taxa de aceitabilidade da coloração de fundo e da celularidade das lâminas de teste coradas com CINTec PLUS Cytology no instrumento BenchMark ULTRA PLUS fosse aceitável em ≥90% de todas as lâminas de teste para que o estudo fosse aprovado. As taxas de aceitabilidade da coloração de fundo e da celularidade em todas as lâminas testadas foram de 99.7% e 99.4%, respetivamente. Tabela 21 abaixo apresenta de forma

resumida a taxa de concordância do estado de CINTec PLUS Cytology entre os instrumentos BenchMark ULTRA e BenchMark ULTRA PLUS.

Tabela 21. Estudo de concordância do instrumento BenchMark ULTRA com BenchMark ULTRA PLUS – Concordância em pool do estado de CINTec PLUS Cytology entre plataformas (ThinPrep)

Estado de CINTec PLUS Cytology				Concordância		
BenchMark ULTRA PLUS	BenchMark ULTRA					
	Positivo	Negative	Total	Taxa	% (n/N)	CI de 95%
Positivo	314	13	327	PPA	95.7 (314/328)	(92.8, 98.1)
Negativo	14	317	331	NPA	96.1 (317/330)	(93.5, 98.1)
Total	328	330	658	OPA	95.9 (631/658)	(94.1, 97.4)

Nota: As taxas de concordância em pool reúnem todas as amostras e equipas de leitores de ULTRA PLUS.

Nota: PPA = Percentagem de concordância positiva; NPA = Percentagem de concordância negativa; OPA = Percentagem de concordância global

Estudo de reprodutibilidade intralaboratorial na plataforma de coloração BenchMark ULTRA PLUS

Foi efetuado um estudo de reprodutibilidade intralaboratorial para avaliar a repetibilidade intraensaio, a precisão intermédia entre dias e a precisão intermédia entre instrumentos do teste CINTec PLUS Cytology em amostras SurePath. O estudo incluiu 2 culturas distintas de células T24 e 9 pools de amostras SurePath derivadas de doentes (3 CINTec Positivas/HPV+, 3 borderline e 3 CINTec negativas/HPV-). As lâminas de teste foram preparadas no instrumento de preparação de lâminas BD Totalys em cada um dos cinco dias de coloração, que não foram consecutivos e abrangeram pelo menos 20 dias. Foram utilizados três BenchMark ULTRA PLUS para avaliar a reprodutibilidade entre instrumentos. As lâminas de teste foram avaliadas por uma equipa de leitores constituída por um técnico de citologia e um patologista com formação para avaliar CINTec PLUS Cytology. A concordância das lâminas de teste foi determinada comparando o estado de CINTec PLUS Cytology das lâminas de teste com o modo de nível de pool (Pool-Level Mode, PLM), que é definido como o resultado de estado mais frequente entre todas as avaliações de um pool que agrega dados de todos os instrumentos, de todos os dias e de todas as réplicas desse pool. As taxas de aceitabilidade da coloração de fundo e da celularidade de todas as lâminas de teste foram de 99.4% e 99.7%, respetivamente. Os resultados são apresentados abaixo de forma resumida na Tabela 22, na Tabela 23, na Tabela 24 e na Tabela 25.

Tabela 22. Estudo de precisão intralaboratorial – Precisão global de amostras verdadeiro-positivas e verdadeiro-negativas SurePath

Estado de CINTec PLUS	Estado modal a nível do pool			Concordância		
	Positivo	Negative	Total	Medição	% (n/N)	CI de 95%
Positivo	89	0	89	PPA	100.0 (89/89)	(95.9, 100.0)
Negativo	0	90	90	NPA	100.0 (90/90)	(95.9, 100.0)
Total	89	90	179	OPA	100.0 (179/179)	(97.9, 100.0)

Tabela 23. Estudo de precisão intralaboratorial – Precisão intermédia entre dias

Dia	Mesmo resultado com PLM, n (%)	Resultado diferente de PLM, n (%)	Total, n (%)
Dia 1	36 (100.0)	0 (0.0)	36 (100.0)
Dia 2	35 (100.0)	0 (0.0)	35 (100.0)
Dia 3	36 (100.0)	0 (0.0)	36 (100.0)
Dia 4	36 (100.0)	0 (0.0)	36 (100.0)
Dia 5	36 (100.0)	0 (0.0)	36 (100.0)

Tabela 24. Estudo de precisão intralaboratorial – Repetibilidade intraensaio

Réplica	Mesmo resultado com PLM, n (%)	Resultado diferente de PLM, n (%)	Total, n (%)
Réplica 1	90 (100.0)	0 (0.0)	90 (100.0)
Réplica 2	89 (100.0)	0 (0.0)	89 (100.0)

Tabela 25. Estudo de precisão intralaboratorial – Precisão intermédia entre instrumentos

Instrumento	Mesmo resultado com PLM, n (%)	Resultado diferente de PLM, n (%)	Total, n (%)
Instrumento 1	60 (100.0)	0 (0.0)	60 (100.0)
Instrumento 2	60 (100.0)	0 (0.0)	60 (100.0)
Instrumento 3	59 (100.0)	0 (0.0)	59 (100.0)

Concordância entre as plataformas de coloração BenchMark ULTRA PLUS e BenchMark ULTRA (amostras SurePath)

Foi efetuado um estudo de concordância interna para verificar o desempenho da coloração equivalente do kit CIntec PLUS Cytology entre as plataformas de coloração BenchMark ULTRA e ULTRA PLUS em amostras SurePath. O estudo incluiu 88 culturas de linhas celulares T24 verdadeiro-positivas, 26 positivas borderline, 26 negativas intermédias e 88 verdadeiro-negativas. Foram preparadas duas lâminas de teste de cada amostra no instrumento de preparação de lâminas BD Totalys, que foram depois coradas com CIntec PLUS Cytology em BenchMark ULTRA ou BenchMark ULTRA PLUS. As lâminas de teste foram avaliadas por uma equipa de leitores constituída por um técnico de citologia e um patologista com formação para avaliar CIntec PLUS Cytology. A equivalência de desempenho do ensaio CIntec PLUS Cytology era considerada aceitável no instrumento BenchMark ULTRA PLUS se as taxas de PPA e NPA tivessem um limite inferior de intervalo de confiança de 95% bilateral de, pelo menos, 85%. Exigia-se que a taxa de aceitabilidade da coloração de fundo e da celularidade das lâminas de teste coradas com CIntec PLUS Cytology no instrumento BenchMark ULTRA PLUS fosse aceitável em ≥90% de todas as lâminas de teste para que o estudo fosse aprovado. As taxas de aceitabilidade da coloração de fundo e da celularidade de todas as lâminas de teste foram de 99.6% e 99.1%, respetivamente. Os resultados são apresentados de forma resumida na Tabela 26 abaixo.

Tabela 26. Estudo de concordância do instrumento BenchMark ULTRA com BenchMark ULTRA PLUS (SurePath)

Estado de ULTRA PLUS	Estado de ULTRA			Concordância		
	Positivo	Negative	Total	Medição	% (n/N)	CI de 95%
Positivo	94	2	96	PPA	92.2 (94/102)	(85.3, 96.0)
Negativo	8	119	127	NPA	98.3 (119/121)	(94.2, 99.5)
Total	102	121	223	OPA	95.5 (213/223)	(91.9, 97.5)

DESEMPENHO CLÍNICO

Foi concebido um ensaio prospetivo multicêntrico (IMPACT, IMproved Primary screening And Colposcopy Triage) para avaliar o desempenho clínico de CIntec PLUS Cytology Kit no instrumento BenchMark ULTRA, utilizando amostras de colo do útero colhidas na clínica colocadas em solução PreservCyt®, para identificação de doença do colo do útero de alto grau. O estudo foi concebido para avaliar o desempenho de CIntec PLUS Cytology Kit como teste reflexo em mulheres com idade ≥25 anos que eram HPV positivas no cobas® 4800 HPV Test ou no cobas® 6800/8800 HPV Test. Os dados deste estudo apoiam a utilização de CIntec PLUS Cytology Kit como auxiliar na identificação de mulheres com lesões intraepiteliais do colo do útero de alto grau em pacientes com resultados de teste HR-HPV positivos.

Características do desempenho de CIntec PLUS Cytology Kit vs. teste de Papanicolaou em mulheres de 25-65 anos de idade com cobas® 6800/8800 HPV Test ou cobas® 4800 HPV Test, resultados positivos

O desempenho comparativo de CIntec PLUS Cytology Kit vs. teste de Papanicolaou em mulheres com resultados positivos nos testes cobas® 6800/8800 HPV Test e cobas® 4800 HPV Test é apresentado nas seguintes tabelas em termos de população 12 Outros HR HPV+ (Tabela 27), população HPV16+ (Tabela 28) e população HPV18+ (Tabela 29). Nos três grupos de genótipos, observou-se um aumento da sensibilidade e uma diminuição da especificidade na deteção de doença do colo do útero de alto grau para CIntec PLUS Cytology Kit vs. teste de Papanicolaou (Tabela 27, Tabela 28 e Tabela 29). Tanto entre as mulheres com resultados positivos nos testes cobas® 6800/8800 HPV Test e cobas® 4800 HPV Test, o aumento máximo de sensibilidade (diferença = 23.1% e 24.2%, respetivamente) e a diminuição mínima de especificidade (diferença = 7.9% e 8.7%, respetivamente), no que diz respeito ao teste de Papanicolaou, foram observados nas populações 12 Outros HR HPV+ (Tabela 27).

Em todos os casos, a utilização de CIntec PLUS Cytology Kit teve como resultado uma redução substancial do risco de doença no que diz respeito aos resultados de CIntec PLUS Cytology Kit negativos versus teste de Papanicolaou NILM. Entre cobas® 6800/8800 HPV Test, mulheres positivas, 1-NPV era 3.7%, 6.1% e 1.2% mais baixo para ≥CIN2 e 0.9%, 3.3% e 0.3% mais baixo para ≥CIN3 nas populações 12 Outros HR HPV+, HPV16+ e HPV18+, respetivamente. Entre as mulheres positivas com cobas® 4800 HPV Test, 1-NPV era 3.4%, 9.1% e 3.3% mais baixo para ≥CIN2 e 0.8%, 5.1% e 0.5% mais baixo para ≥CIN3 nas populações 12 Outros HR HPV+, HPV16+ e HPV18+, respetivamente.

Tabela 27. Desempenho de CINTec PLUS Cytology Kit vs. teste de Papanicolau em mulheres 12 Outros HR HPV+ com 25-65 anos de idade.

cobas® 6800/8800 system, 12 Outros HR HPV+			
Desempenho Medição	Diagnóstico CPR ≥CIN2		
	CINtec <i>PLUS</i> Cytology	Teste de Papanicolau	Diferença
Sensibilidade (%)	83.0 (254/306) (78.4, 86.8)	58.8 (180/306) (53.2, 64.2)	24.2 (18.3, 29.9)
Especificidade (%)	56.8 (1373/2416) (54.8, 58.8)	65.5 (1583/2416) (63.6, 67.4)	-8.7 (-10.9, -6.4)
PPV (%)	19.6 (254/1297) (18.5, 20.6)	17.8 (180/1013) (16.2, 19.3)	1.8 (0.0, 3.3)
1-NPV (%)	3.6 (52/1425) (2.9, 4.6)	7.4 (126/1709) (6.5, 8.3)	-3.7 (-4.5, -2.4)
Prevalência (%)	11.2 (306/2722)		
Desempenho Medição	Diagnóstico CPR ≥CIN3		
	CINtec <i>PLUS</i> Cytology	Teste de Papanicolau	Diferença
Sensibilidade (%)	86.0 (80/93) (77.5, 91.6)	66.7 (62/93) (56.6, 75.4)	19.4 (10.0, 28.7)
Especificidade (%)	53.7 (1412/2629) (51.8, 55.6)	63.8 (1678/2629) (62.0, 65.6)	-10.1 (-12.3, -8.0)
PPV (%)	6.2 (80/1297) (5.6, 6.6)	6.1 (62/1013) (5.2, 6.9)	0.0 (-0.8, 0.8)
1-NPV (%)	0.9 (13/1425) (0.5, 1.5)	1.8 (31/1709) (1.3, 2.4)	-0.9 (-1.4, -0.3)
Prevalência (%)	3.4 (93/2722)		
cobas® 4800 system, 12 Outros HR HPV+			
Desempenho Medição	Diagnóstico CPR ≥CIN2		
	CINtec <i>PLUS</i> Cytology	Teste de Papanicolau	Diferença
Sensibilidade (%)	82.1 (256/312) (77.4, 85.9)	59.0 (184/312) (53.4, 64.3)	23.1 (17.3, 28.7)
Especificidade (%)	58.6 (1520/2594) (56.7, 60.5)	66.5 (1726/2594) (64.7, 68.3)	-7.9 (-10.1, -5.8)
PPV (%)	19.2 (256/1330) (18.1, 20.3)	17.5 (184/1052) (15.9, 19.0)	1.8 (0.2, 3.3)
1-NPV (%)	3.6 (56/1576) (2.8, 4.4)	6.9 (128/1854) (6.0, 7.8)	-3.4 (-4.4, -2.3)
Prevalência (%)	10.7 (312/2906)		
Desempenho Medição	Diagnóstico CPR ≥CIN3		
	CINtec <i>PLUS</i> Cytology	Teste de Papanicolau	Diferença
Sensibilidade (%)	86.2 (81/94) (77.8, 91.7)	67.0 (63/94) (57.0, 75.7)	19.1 (9.8, 28.4)
Especificidade (%)	55.6 (1563/2812) (53.7, 57.4)	64.8 (1823/2812) (63.0, 66.6)	-9.2 (-11.3, -7.2)
PPV (%)	6.1 (81/1330) (5.5, 6.5)	6.0 (63/1052) (5.1, 6.8)	0.1 (-0.7, 0.9)
1-NPV (%)	0.8 (13/1576) (0.5, 1.3)	1.7 (31/1854) (1.2, 2.2)	-0.8 (-1.3, -0.3)
Prevalência (%)	3.2 (94/2906)		
Nota: CPR = Revisão central da patologia; PPV = Valor preditivo positivo; NPV = Valor preditivo negativo; números entre parênteses são (n/N) e intervalos de confiança de 95% bilaterais.			

Tabela 28. Desempenho de CINtec PLUS Cytology Kit vs. teste de Papanicolau em mulheres HPV16+ com 25-65 anos de idade.

cobas® 6800/8800 system, HPV16+			
Desempenho Medição	Diagnóstico CPR ≥CIN2		
	CINtec <i>PLUS</i> Cytology	Teste de Papanicolau	Diferença
Sensibilidade (%)	92.6 (176/190) (88.0, 95.6)	75.8 (144/190) (69.2, 81.3)	16.8 (10.7, 23.2)
Especificidade (%)	57.2 (349/610) (53.3, 61.1)	68.5 (418/610) (64.7, 72.1)	-11.3 (-15.4, -7.2)
PPV (%)	40.3 (176/437) (37.9, 42.7)	42.9 (144/336) (39.4, 46.3)	-2.6 (-5.7, 0.8)
1-NPV (%)	3.9 (14/363) (2.3, 6.2)	9.9 (46/464) (7.8, 12.3)	-6.1 (-7.1, -2.6)
Prevalência (%)	23.8 (190/800)		
Desempenho Medição	Diagnóstico CPR ≥CIN3		
	CINtec <i>PLUS</i> Cytology	Teste de Papanicolau	Diferença
Sensibilidade (%)	92.5 (111/120) (86.4, 96.0)	77.5 (93/120) (69.2, 84.1)	15.0 (7.7, 22.8)
Especificidade (%)	52.1 (354/680) (48.3, 55.8)	64.3 (437/680) (60.6, 67.8)	-12.2 (-16.0, -8.3)
PPV (%)	25.4 (111/437) (23.6, 27.2)	27.7 (93/336) (24.8, 30.5)	-2.3 (-4.7, 0.3)
1-NPV (%)	2.5 (9/363) (1.3, 4.4)	5.8 (27/464) (4.2, 7.8)	-3.3 (-4.7, -1.1)
Prevalência (%)	15.0 (120/800)		
cobas® 4800 system, HPV16+			
Desempenho Medição	Diagnóstico CPR ≥CIN2		
	CINtec <i>PLUS</i> Cytology	Teste de Papanicolau	Diferença
Sensibilidade (%)	93.6 (176/188) (89.2, 96.3)	76.6 (144/188) (70.0, 82.1)	17.0 (10.9, 23.5)
Especificidade (%)	44.8 (182/406) (40.1, 49.7)	60.1 (244/406) (55.3, 64.7)	-15.3 (-20.6, -9.8)
PPV (%)	44.0 (176/400) (41.7, 46.4)	47.1 (144/306) (43.5, 50.6)	-3.1 (-6.6, 0.5)
1-NPV (%)	6.2 (12/194) (3.6, 10.2)	15.3 (44/288) (12.0, 19.0)	-9.1 (-13.4, -4.8)
Prevalência (%)	31.6 (188/594)		
Desempenho Medição	Diagnóstico CPR ≥CIN3		
	CINtec <i>PLUS</i> Cytology	Teste de Papanicolau	Diferença
Sensibilidade (%)	94.0 (110/117) (88.2, 97.1)	78.6 (92/117) (70.4, 85.1)	15.4 (7.9, 23.4)
Especificidade (%)	39.2 (187/477) (34.9, 43.7)	55.1 (263/477) (50.6, 59.5)	-15.9 (-20.7, -11.0)
PPV (%)	27.5 (110/400) (25.7, 29.2)	30.1 (92/306) (27.1, 32.9)	-2.6 (-5.4, 0.2)
1-NPV (%)	3.6 (7/194) (1.8, 7.0)	8.7 (25/288) (6.2, 11.8)	-5.1 (-8.3, -1.7)
Prevalência (%)	19.7 (117/594)		
Nota: CPR = Revisão central da patologia; PPV = Valor preditivo positivo; NPV = Valor preditivo negativo; números entre parênteses são (n/N) e intervalos de confiança de 95% bilaterais.			

Tabela 29. Desempenho de CINtec PLUS Cytology Kit vs. teste de Papanicolaou em mulheres HPV18+ com 25-65 anos de idade.

cobas® 6800/8800 system, HPV18+			
Desempenho Medição	Diagnóstico CPR ≥CIN2		
	CINtec <i>PLUS</i> Cytology	Teste de Papanicolaou	Diferença
Sensibilidade (%)	83.8 (31/37) (68.9, 92.3)	73.0 (27/37) (57.0, 84.6)	10.8 (-6.7, 27.8)
Especificidade (%)	62.7 (205/327) (57.3, 67.8)	73.1 (239/327) (68.0, 77.6)	-10.4 (-16.1, -4.6)
PPV (%)	20.3 (31/153) (16.8, 23.4)	23.5 (27/115) (18.6, 28.2)	-3.2 (-8.2, 1.8)
1-NPV (%)	2.8 (6/211) (1.4, 5.4)	4.0 (10/249) (2.3, 6.3)	-1.2 (-3.6, 1.3)
Prevalência (%)	10.2 (37/364)		
Desempenho Medição	Diagnóstico CPR ≥CIN3		
	CINtec <i>PLUS</i> Cytology	Teste de Papanicolaou	Diferença
Sensibilidade (%)	87.5 (14/16) (64.0, 96.5)	81.3 (13/16) (57.0, 93.4)	6.3 (-19.6, 31.6)
Especificidade (%)	60.1 (209/348) (54.8, 65.1)	70.7 (246/348) (65.7, 75.2)	-10.6 (-16.1, -5.0)
PPV (%)	9.2 (14/153) (6.7, 10.8)	11.3 (13/115) (8.0, 13.9)	-2.2 (-5.2, 0.8)
1-NPV (%)	0.9 (2/211) (0.3, 2.7)	1.2 (3/249) (0.4, 2.7)	-0.3 (-1.7, 1.1)
Prevalência (%)	4.4 (16/364)		
cobas® 4800 system, HPV18+			
Desempenho Medição	Diagnóstico CPR ≥CIN2		
	CINtec <i>PLUS</i> Cytology	Teste de Papanicolaou	Diferença
Sensibilidade (%)	87.5 (28/32) (71.9, 95.0)	71.9 (23/32) (54.6, 84.4)	15.6 (-3.6, 33.9)
Especificidade (%)	53.4 (102/191) (46.3, 60.3)	62.3 (119/191) (55.3, 68.9)	-8.9 (-16.6, -1.0)
PPV (%)	23.9 (28/117) (19.9, 27.6)	24.2 (23/95) (18.8, 29.3)	-0.3 (-5.8, 5.3)
1-NPV (%)	3.8 (4/106) (1.5, 8.2)	7.0 (9/128) (4.0, 11.0)	-3.3 (-8.1, 1.3)
Prevalência (%)	14.3 (32/223)		
Desempenho Medição	Diagnóstico CPR ≥CIN3		
	CINtec <i>PLUS</i> Cytology	Teste de Papanicolaou	Diferença
Sensibilidade (%)	86.7 (13/15) (62.1, 96.3)	80.0 (12/15) (54.8, 93.0)	6.7 (-20.5, 33.2)
Especificidade (%)	50.0 (104/208) (43.3, 56.7)	60.1 (125/208) (53.3, 66.5)	-10.1 (-17.5, -2.5)
PPV (%)	11.1 (13/117) (8.1, 13.2)	12.6 (12/95) (8.8, 15.6)	-1.5 (-5.1, 2.0)
1-NPV (%)	1.9 (2/106) (0.5, 5.2)	2.3 (3/128) (0.8, 5.2)	-0.5 (-3.4, 2.3)
Prevalência (%)	6.7 (15/223)		
Nota: CPR = Revisão central da patologia; PPV = Valor preditivo positivo; NPV = Valor preditivo negativo; números entre parênteses são (n/N) e intervalos de confiança de 95% bilaterais.			

Características do desempenho na população de cobas® 6800/8800 HPV Test ou cobas® 4800 HPV Test, resultados positivos, mulheres com 30-65 anos de idade com resultados de teste de Papanicolaou NILM

O desempenho de CINtec PLUS Cytology Kit para detectar ≥CIN2 e ≥CIN3 em mulheres 12 Outros HR HPV+ com teste de Papanicolaou NILM é apresentado na Tabela 30.

Na população de cobas® 6800/8800 system, as mulheres 12 Outros HR HPV+ com teste de Papanicolaou NILM, sensibilidade e especificidade para a detecção de ≥CIN2 foram de 66.7% e 69.7%, respectivamente (62.5% e 67.8%, respectivamente, para ≥CIN3). Os PPV neste grupo foram de 13.0% para ≥CIN2 e 2.6% para ≥CIN3, enquanto o risco de doença em mulheres com resultados negativos de CINtec PLUS Cytology Kit (1-NPV) foi de 3.1% para ≥CIN2 e 0.8% para ≥CIN3.

Na população de cobas® 4800 system, nas mulheres 12 Outros HR HPV+ com teste de Papanicolaou NILM, a sensibilidade e a especificidade para a detecção de ≥CIN2 foram de 64.9% e 71.0%, respectivamente (66.7% e 69.4%, respectivamente, para ≥CIN3). Os PPV neste grupo foram de 12.0% para ≥CIN2 e 2.5% para ≥CIN3, enquanto o risco de doença em mulheres com resultados negativos de CINtec PLUS Cytology Kit (1-NPV) foi de 2.9% para ≥CIN2 e 0.6% para ≥CIN3.

Tabela 30. Desempenho de CINtec PLUS Cytology Kit em mulheres 12 Outros HR HPV+ com 30-65 anos de idade com citologia NILM.

Medida do desempenho	cobas® 6800/8800 system, 12 Outros HR HPV+/NILM		cobas® 4800 system, 12 Outros HR HPV+/NILM	
	Diagnóstico CPR ≥CIN2	Diagnóstico CPR ≥CIN3	Diagnóstico CPR ≥CIN2	Diagnóstico CPR ≥CIN3
Sensibilidade (%)	66.7 (50/75) (55.4, 76.3)	62.5 (10/16) (38.6, 81.5)	64.9 (48/74) (53.5, 74.8)	66.7 (10/15) (41.7, 84.8)
Especificidade (%)	69.7 (772/1108) (66.9, 72.3)	67.8 (791/1167) (65.0, 70.4)	71.0 (864/1217) (68.4, 73.5)	69.4 (885/1276) (66.8, 71.8)
Prevalência (%)	6.3 (75/1183)	1.4 (16/1183)	5.7 (74/1291)	1.2 (15/1291)
PPV (%)	13.0 (50/386) (10.8, 14.9)	2.6 (10/386) (1.6, 3.4)	12.0 (48/401) (9.9, 13.9)	2.5 (10/401) (1.6, 3.2)
NPV (%)	96.9 (772/797) (95.8, 97.8)	99.2 (791/797) (98.8, 99.6)	97.1 (864/890) (96.2, 97.9)	99.4 (885/890) (99.0, 99.7)
1-NPV (%)	3.1 (25/797) (2.2, 4.2)	0.8 (6/797) (0.4, 1.2)	2.9 (26/890) (2.1, 3.8)	0.6 (5/890) (0.3, 1.0)
PLR	2.20 (1.79, 2.59)	1.94 (1.19, 2.58)	2.24 (1.81, 2.65)	2.18 (1.35, 2.82)
NLR	0.48 (0.34, 0.64)	0.55 (0.27, 0.91)	0.49 (0.35, 0.66)	0.48 (0.22, 0.84)
Taxa de positividade (%)	32.6 (386/1183) (30.0, 35.3)		31.1 (401/1291) (28.6, 33.5)	
Nota: CPR = Revisão central da patologia; PPV = Valor preditivo positivo; NPV = Valor preditivo negativo; PLR = Razão de probabilidade positiva; NLR = Razão de probabilidade negativa; números entre parênteses são (n/N) e intervalos de confiança de 95% bilaterais.				

O desempenho de CINtec PLUS Cytology Kit para detectar ≥CIN2 e ≥CIN3 em mulheres HPV16+ com teste de Papanicolaou NILM é apresentado na Tabela 31.

Na população de cobas® 6800/8800 system, nas mulheres HPV16+ com teste de Papanicolaou NILM, a sensibilidade e a especificidade foram de 76.3% e 72.5%, respectivamente, para ≥CIN2, e de 75.0% e 70.5%, respectivamente, para ≥CIN3. Os PPV neste grupo foram de 23.8% para ≥CIN2 e 14.8% para ≥CIN3, enquanto o risco de doença em mulheres com resultados negativos de CINtec PLUS Cytology Kit (1-NPV) foi de 3.5% para ≥CIN2 e 2.4% para ≥CIN3.

Na população de cobas® 4800 system, nas mulheres HPV16+ com teste de Papanicolaou NILM, a sensibilidade e a especificidade foram de 80.6% e 61.7%, respectivamente, para ≥CIN2, e de 81.8% e 59.0%, respectivamente, para ≥CIN3. Os PPV neste grupo foram de 27.9% para ≥CIN2 e 17.3% para ≥CIN3, enquanto o risco de doença em mulheres com resultados negativos de CINtec PLUS Cytology Kit (1-NPV) foi de 5.5% para ≥CIN2 e 3.1% para ≥CIN3.

Tabela 31. Desempenho de CINtec PLUS Cytology Kit em mulheres HPV16+ com 30-65 anos de idade com citologia NILM.

Medida do desempenho	cobas® 6800/8800 system, HPV16+/NILM		cobas® 4800 system, HPV16+/NILM	
	Diagnóstico CPR ≥CIN2	Diagnóstico CPR ≥CIN3	Diagnóstico CPR ≥CIN2	Diagnóstico CPR ≥CIN3
Sensibilidade (%)	76.3 (29/38) (60.8, 87.0)	75.0 (18/24) (55.1, 88.0)	80.6 (29/36) (65.0, 90.2)	81.8 (18/22) (61.5, 92.7)
Especificidade (%)	72.5 (245/338) (67.5, 77.0)	70.5 (248/352) (65.5, 75.0)	61.7 (121/196) (54.8, 68.3)	59.0 (124/210) (52.3, 65.5)
Prevalência (%)	10.1 (38/376)	6.4 (24/376)	15.5 (36/232)	9.5 (22/232)
PPV (%)	23.8 (29/122) (19.1, 28.2)	14.8 (18/122) (11.0, 18.1)	27.9 (29/104) (22.8, 32.7)	17.3 (18/104) (13.2, 20.8)
NPV (%)	96.5 (245/254) (94.2, 98.0)	97.6 (248/254) (95.8, 98.9)	94.5 (121/128) (90.5, 97.2)	96.9 (124/128) (93.5, 98.7)
1-NPV (%)	3.5 (9/254) (2.0, 5.8)	2.4 (6/254) (1.1, 4.2)	5.5 (7/128) (2.8, 9.5)	3.1 (4/128) (1.3, 6.5)
PLR	2.77 (2.10, 3.49)	2.54 (1.81, 3.24)	2.11 (1.61, 2.64)	2.00 (1.45, 2.50)
NLR	0.33 (0.18, 0.54)	0.35 (0.17, 0.64)	0.31 (0.16, 0.57)	0.31 (0.12, 0.66)
Taxa de positividade (%)	32.4 (122/376) (28.0, 36.9)		44.8 (104/232) (38.7, 50.9)	
Nota: CPR = Revisão central da patologia; PPV = Valor preditivo positivo; NPV = Valor preditivo negativo; PLR = Razão de probabilidade positiva; NLR = Razão de probabilidade negativa; números entre parênteses são (n/N) e intervalos de confiança de 95% bilaterais.				

O desempenho de CINtec PLUS Cytology Kit para detetar $\geq$ CIN2 e $\geq$ CIN3 em mulheres HPV18+ com teste de Papanicolaou NILM é apresentado na Tabela 32.

Na população de cobas® 6800/8800 system, nas mulheres HPV18+ com teste de Papanicolaou NILM, a sensibilidade e a especificidade foram de 75.0% e 73.3%, respetivamente, para $\geq$ CIN2, e de 66.7% e 72.1% para $\geq$ CIN3. Os PPV foram de 9.7% e 3.2% para $\geq$ CIN2 e para $\geq$ CIN3, respetivamente, enquanto o risco de doença em mulheres com resultados negativos de CINtec PLUS Cytology Kit (1-NPV) foi de 1.3% e 0.6% para $\geq$ CIN2 e para $\geq$ CIN3, respetivamente.

Na população de cobas® 4800 system, nas mulheres HPV18+ com teste de Papanicolaou NILM, a sensibilidade e a especificidade foram de 85.7% e 68.3%, respetivamente, para $\geq$ CIN2, e de 66.7% e 65.7% para $\geq$ CIN3. Os PPV foram de 15.8% e 5.3% para $\geq$ CIN2 e para $\geq$ CIN3, respetivamente, enquanto o risco de doença em mulheres com resultados negativos de CINtec PLUS Cytology Kit (1-NPV) foi de 1.4% para ambos os cutoffs da doença.

Tabela 32. Desempenho de CINtec PLUS Cytology Kit em mulheres HPV18+ com 30-65 anos de idade com citologia NILM.

Medida do desempenho	cobas® 6800/8800 system, HPV18+/NILM		cobas® 4800 system, HPV18+/NILM	
	Diagnóstico CPR $\geq$ CIN2	Diagnóstico CPR $\geq$ CIN3	Diagnóstico CPR $\geq$ CIN2	Diagnóstico CPR $\geq$ CIN3
Sensibilidade (%)	75.0 (6/8) (40.9, 92.9)	66.7 (2/3) (20.8, 93.9)	85.7 (6/7) (48.7, 97.4)	66.7 (2/3) (20.8, 93.9)
Especificidade (%)	73.3 (154/210) (67.0, 78.9)	72.1 (155/215) (65.7, 77.7)	68.3 (69/101) (58.7, 76.6)	65.7 (69/105) (56.2, 74.1)
Prevalência (%)	3.7 (8/218)	1.4 (3/218)	6.5 (7/108)	2.8 (3/108)
PPV (%)	9.7 (6/62) (5.4, 13.1)	3.2 (2/62) (1.0, 5.0)	15.8 (6/38) (9.2, 21.1)	5.3 (2/38) (1.7, 8.3)
NPV (%)	98.7 (154/156) (97.0, 99.6)	99.4 (155/156) (98.5, 99.9)	98.6 (69/70) (95.0, 99.7)	98.6 (69/70) (96.6, 99.7)
1-NPV (%)	1.3 (2/156) (0.4, 3.0)	0.6 (1/156) (0.1, 1.5)	1.4 (1/70) (0.3, 5.0)	1.4 (1/70) (0.3, 3.4)
PLR	2.81 (1.49, 3.97)	2.39 (0.73, 3.74)	2.71 (1.46, 3.87)	1.94 (0.59, 3.18)
NLR	0.34 (0.10, 0.81)	0.46 (0.09, 1.11)	0.21 (0.04, 0.76)	0.51 (0.09, 1.24)
Taxa de positividade (%)	28.4 (62/218) (22.6, 34.3)		35.2 (38/108) (26.5, 43.8)	

Nota: CPR = Revisão central da patologia; PPV = Valor preditivo positivo; NPV = Valor preditivo negativo; PLR = Razão de probabilidade positiva; NLR = Razão de probabilidade negativa; números entre parênteses são (n/N) e intervalos de confiança de 95% bilaterais.

RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

- Se um dispensador de reagente não dispensar fluido, verifique se existem materiais ou partículas estranhos na câmara de preparação ou no menisco, como, por exemplo, fibras ou precipitados. Se o dispensador estiver bloqueado, não o utilize e contacte o seu representante de assistência local. Ou então prepare novamente o dispensador colocando o dispensador sobre um recipiente de resíduos, removendo a tampa do bico e pressionando a parte de cima do dispensador.
- Pode ser observada ocasionalmente cristalização no dispensador de CINtec PLUS Red Naphthol Phosphate. As investigações realizadas não revelaram qualquer interferência de cristais na interpretação dos resultados. Se forem observados cristais nas lâminas, limpe a ponta do bico e efetue a preparação do dispensador, para garantir a remoção de quaisquer resíduos cristalinos. Se os cristais persistirem, interrompa a utilização e contacte o representante de assistência local para substituir o dispensador.
- Se o controlo positivo apresentar uma coloração mais fraca do que a esperada, verifique se o protocolo selecionado corresponde a esse tipo específico de amostra; por exemplo, as preparações de citologia SurePath requerem um tempo de condicionamento celular mais longo do que as lâminas ThinPrep ou preparações de esfregaço convencionais. Verifique se todos os barris de dispensador estão livres de resíduos.
- Se o controlo positivo for negativo, deve ser verificado para garantir que a lâmina tem a etiqueta de código de barras correta. Se a lâmina estiver etiquetada corretamente, verifique se todos os barris de dispensador estão livres de resíduos.
- Se observar fundo elevado, diminua os tempos de incubação dos protocolos de coloração. Adicionalmente, verifique, para ter a certeza de que a solução volumosa de Reaction Buffer foi formulada corretamente.
- Se observar coloração fraca, aumente os tempos de incubação dos protocolos de coloração. Numa lâmina de esfregaço convencional, o tempo de incubação do condicionamento celular também pode ser ajustado.
- O precipitado vermelho utilizado para indicar a expressão da proteína Ki-67 é solúvel em álcool. Se a coloração de Ki-67 for fraca ou não estiver presente, certifique-se de que não foi utilizada hematoxilina com álcool e de que o procedimento de pós-processamento recomendado foi seguido em conformidade com as instruções de Procedimento de pós-processamento - Montagem e aplicação da coverslip.

- Se a amostra sair da lâmina, as lâminas devem ser verificadas para garantir que a amostra foi preparada corretamente de acordo com a secção Preparação das amostras e que foi utilizado o tipo de lâmina de microscópio recomendado.
- Para qualquer ação corretiva, consulte a secção Procedimento de coloração, o Manual do utilizador do instrumento ou contacte o seu representante de assistência local.
- Se a tampa de uma amostra de RCCM for mal colocada ou se o frasco de amostra tiver uma fuga, podem ser encomendadas tampas de substituição (avulso, 250/saco, REF 08037230190 ou 8 tabuleiros de 48/caixa, REF 06913512001).

REFERÊNCIAS

- Kim WY, Sharpless NE. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. Cell. 2006 Oct 20;127(2):265-75.
- Wentzensen N, von Knebel Doeberitz M. Biomarkers in cervical cancer screening. Dis Markers. 2007;23:315-30.
- Cuschieri K, Wentzensen N. Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2008;17(10):2536-2545.
- Roelens J, Reuschenbach M, von Knebel Doeberitz M, et al. p16^{INK4a} immunocytochemistry versus human papillomavirus testing for triage of women with minor cytologic abnormalities: a systematic review and meta-analysis. Cancer Cytopathol. 2012;120(5):294-307.
- Carozzi F, Gillio-Tos A, Confortini M, et al. Risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia during follow-up in HPV-positive women according to baseline p16-INK4a results: a prospective analysis of a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. Lancet Oncol. 2013;14(2):168-76.
- Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. J Cell Physiol. 2000;182:311-22.
- Schmidt D, Bergeron C, Denton KJ, et al. p16/Ki-67 Dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL Papanicolaou cytology: Results from the European equivocal or mildly abnormal Papanicolaou cytology study. Cancer Cytopathol. 2011;119(3):158-66.
- Petry KU, Schmidt D, Scherbring S, et al. Triage Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. Gynecol Oncol. 2011;121(3):505-9.

9. Ravarino A, Nemolato S, Macciocu E, et al. CINTec PLUS immunocytochemistry as a tool for the cytologic diagnosis of glandular lesions of the cervix uteri. *Am J Clin Pathol.* 2012;138(5):652-6.
10. Singh M, Mockler D, Akalin A, et al. Immunocytochemical colocalization of p16(INK4a) and Ki-67 predicts CIN2/3 and AIS/adenocarcinoma. *Cancer Cytopathol.* 2012;120(1):26-34.
11. Ikenberg H, Bergeron C, Schmidt D, et al. Screening for Cervical Cancer Precursors with p16/Ki-67 Dual-stained Cytology: Results of the PALMS Study. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(20):1550-7.
12. Wentzensen N, Fetterman B, Castle PE, et al. p16/Ki-67 Dual Stain Cytology for Detection of Cervical Precancer in HPV-Positive Women. *J Natl Cancer Inst.* 2015 Sep 15;107(12):djv257.
13. Uijterwaal MH, Polman NJ, Witte BI, et al. Triaging HPV-positive women with normal cytology by p16/Ki-67 dual-stained cytology testing: baseline and longitudinal data. *Int J Cancer.* 2015;136(10):2361-68.
14. Wentzensen N, Schwartz L, Zuna RE, et al. Performance of p16/Ki-67 immunostaining to detect cervical cancer precursors in a colposcopy referral population. *Clin Cancer Res.* 2012;18(15):4154-62.
15. Bergeron C, Ikenberg H, Sideri M, et al. Prospective evaluation of p16/Ki-67 dual-stained cytology for managing women with abnormal Papanicolaou cytology: PALMS study results. *Cancer Cytopathol.* 2015. 123(6):373-81.
16. Dona MG, Vocaturo A, Giuliani M, et al. p16/Ki-67 dual staining in cervico-vaginal cytology: Correlation with histology, Human Papillomavirus detection and genotyping in women undergoing colposcopy. *Gynecol Oncol.* 2012;126(2):198-202.
17. Allia E, Ronco G, Coccia A, et al. Interpretation of p16(INK4a) /Ki-67 dual immunostaining for the triage of human papillomavirus-positive women by experts and nonexperts in cervical cytology. *Cancer Cytopathol.* 2015;123(4):212-218.
18. Gustinucci D, Giorgi Rossi P, Cesarini E, et al. Use of cytology, E6/E7 mRNA, and p16^{INK4a}-Ki-67 to define the management of human papillomavirus (HPV)-positive women in cervical cancer screening. *Am J Clin Pathol.* 2016; 145(1):35-45.
19. Rossi P, Borghi L, Ferro R, Mencarelli R. A population of 1136 HPV DNA-HR positive women: expression of p16(INK4a)/Ki67 Dual-Stain Cytology and cytological diagnosis. Histological correlations and cytological follow up. *Pathologica.* 2015;107(3-4):185-191.
20. Wright TC Jr, Behrens CM, Ranger-Moore J, et al. Triaging HPV-positive women with p16/Ki-67 dual-stained cytology: Results from a sub-study nested into the ATHENA trial. *Gynecol Oncol.* 2017;144:51-56.
21. Clarke MA, Cheung LC, Castle PE, et al. Five-Year Risk of Cervical Precancer Following p16/Ki-67 Dual-Stain Triage of HPV-Positive Women. *JAMA Oncol.* 2019;5(2):181-186.
22. Wentzensen N, Clarke MA, Bremer R, et al. Clinical Evaluation of Human Papillomavirus Screening With p16/Ki-67 Dual Stain Triage in a Large Organized Cervical Cancer Screening Program. *JAMA Intern Med.* 2019;179(7):881-888.
23. Wentzensen N, Fetterman B, Tokugawa D, et al. Interobserver reproducibility and accuracy of p16/Ki-67 dual-stain cytology in cervical cancer screening. *Cancer Cytopathol.* 2014;122(12):914-20.
24. Arian-Cuns C, Mercado-Gutierrez M, Paniello-Alastruey I, et al. Dual staining for p16/Ki67 is a more specific test than cytology for triage of HPV-positive women. *Virchows Arch.* 2018;473(5):599-606.
25. Ebisch RMF, van der Horst J, Hermens M, et al. Evaluation of p16/Ki-67 dual-stained cytology as triage test for high-risk human papillomavirus-positive women. *Mod Pathol.* 2017;30(7): 1021-1031.
26. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
27. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 24 June 2020 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
28. Nayar R and Wilbur DC, eds. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology: Definitions, Criteria, and Explanatory Notes. 3rd ed. 2015, Springer International Publishing: Switzerland.

NOTA: Neste documento, é sempre utilizado o ponto como separador decimal para marcar o limite entre a parte inteira e as partes fracionais de um número decimal. Não são utilizados separadores de milhares.

O resumo sobre segurança e desempenho está disponível aqui:

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

Símbolos

Ventana utiliza os seguintes símbolos e sinais, além dos listados na norma ISO 15223-1 (para os USA: consultar elabdoc.roche.com/symbols para mais informações).



Número Global de Item Comercial

Rx only

Para os USA: Advertência: A Lei Federal dos EUA restringe a venda deste dispositivo a um médico ou mediante receita médica.

HISTÓRICO DE REVISÕES

Rev	Atualizações
J	Atualização do modelo e da rotulagem. Adição de BenchMark ULTRA PLUS.

PROPRIEDADE INTELECTUAL

VENTANA, BENCHMARK, CINTEC e COBAS são marcas comerciais de Roche. Todos os restantes nomes de produtos e marcas comerciais são propriedade dos respetivos titulares.

© 2025 Ventana Medical Systems, Inc.

For USA: Rx only

INFORMAÇÕES DE CONTACTO



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

www.roche.com



0123