

CINtec PLUS citologinis rinkinys

REF

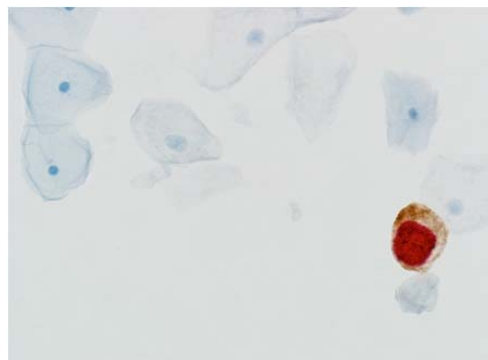
605-100

06889565001

IVD



100



1 paveikslas. Gimdos kaklelio epitelinės ląstelės, turinčios p16^{INK4a} (rudas citoplazminis dažymas) ir Ki-67 (raudonas branduolinis dažymas) baltymų.

NAUDOJIMO PASKIRTIS

CINtec[®] PLUS citologinis rinkinys yra imunohistocheminis testas, skirtas kartu kiekybiškai nustatyti p16^{INK4a} ir Ki-67 baltymus gimdos kaklelio citologiniuose bandiniuose. Jis skirtas naudoti kaip pagalbinė priemonė, nustatant moteris su aukšto laipsnio gimdos kaklelio intraepitelinėmis pažeidimais iš periodinės patikros populiacijos bei pacientų pogrupyje, kai Pap citologijos rezultatas yra ASC-US (nenustatytos reikšmės atipinės plokščiojo epitelio ląstelės) ir LSIL (nežymūs plokščialąsteliniai intraepiteliniai pokyčiai), arba pacientėms, kurioms nustatyti didelės rizikos ŽPV tipai.

Tyrimo rezultatus vertinti turėtų tik sertifikuotas specialistas, atsižvelgdamas į pacientės klinikinę istoriją ir atliktus papildomus diagnostinius tyrimus.

Produktas skirtas *in vitro* diagnostikai (IVD).

SANTRAUKA IR PAAIŠKINIMAS

Eukariotinių ląstelių dalijimosi ciklo eigą reguliuoja sudėtingas ląstelės ciklą reguliuojančių baltymų atliekamas kontroliuojamas raiškos ir potransliacinių modifikacijų derinys. p16^{INK4a} baltymas atlieka esminį vaidmenį šiame eukariotinių ląstelių ciklo reguliavimo mechanizme. Jis dalyvauja retinoblastomos baltymo (pRb) atliekamoje G1/S fazių virsmo kontrolėje ir sustabdo ląstelės ciklą vykstant ląstelių diferenciacijai. Taigi, p16^{INK4a} baltymas normalaus ląstelės ciklo metu riboja ląstelių dauginimąsi. Galutinai diferencijuotose epitelio ląstelėse p16^{INK4a} raiška sumažėja iki tokio lygio, kuris paprastai nebeaptinkamas imunohistocheminiais metodais [1].

Ki-67 yra su ląstelių dauginimusi susijęs baltymas, kurį galima išskirti aptikti tik besidauginančių ląstelių branduoliuose. Detalus ląstelių ciklo tyrimai parodė, kad Ki-67 antigeną galima aptikti visose ląstelės dalijimosi stadijose, taip pat ir mitozės metu, o ramybės stadijos ar nesidalinančiose G0 fazės ląstelėse antigeno raiška nevyksta [2].

Kadangi ląstelės, kuriose p16^{INK4a} raiška padidėjusi, gali aktyviai daugintis tik tada, kai ląstelės ciklo kontrolės mechanizmas yra sutrikęs, normaliomis fiziologinėmis sąlygomis p16^{INK4a} ir dauginimosi žymens Ki-67 raiška toje pačioje ląstelėje turėtų viena kitą slopinti. Taigi, vienu metu vykstanti p16^{INK4a} ir Ki-67 raiška tam tikrose ląstelėse gali būti naudojama kaip ląstelės ciklo kontrolės išsiregulavimo tose ląstelėse rodiklis.

Buvo parodyta, kad esant gimdos kaklelio neoplazijai, p16^{INK4a} baltymo raiška žymiai padidėja dėl pRb funkcinio inaktivavimo, kurį sukelia E7 onkobaltymas iš didelės rizikos

žmogaus papilomos viruso (DR-ŽPV) tipų [3,4]. Kadangi E7 yra būtinas susidaryti ir palaikyti piktybiniam fenotipui su ŽPV susijusiose priešvėžinėse ir vėžinėse pažeidose, padidėjusi p16^{INK4a} raiška yra tiesiogiai siejama su įvairių DR-ŽPV tipų onkogeniniu aktyvumu ir todėl ji buvo pasiūlyta kaip pakaitinis žymuo vertinant transformuojančias ŽPV infekcijas [1;5].

Daugelyje tyrimų buvo vertinta ir parodyta p16^{INK4a} imunodazymo klinikinė nauda gimdos kaklelio histologiniuose [1;3;5;7;8;9;10] ir citologiniuose [5;11;12] mėginiuose.

Įvairiuose tyrimuose parodyta, kad vertinant pūvius su p16^{INK4a} dažymu reikšmingai padidėja patikimumas tarp skirtingų stebėtojų, o taip pat diagnostinis tikslumas nustatant CIN2 ir didesnio laipsnio pažeidas gimdos kaklelio histologinių audinių mėginiuose [6;10;12]. Buvo parodyta, kad gimdos kaklelio citologinių mėginių p16^{INK4a} imunodazymas yra vertingas įrankis efektyviai klasifikuojant Pap citologinius atvejus, priklausančius ASC-US ar LSIL kategorijai. Testo jautrumas, aptinkant CIN2 ar rimtesnes pažeidas, buvo panašus į ŽPV testo, o specifiskumas buvo reikšmingai geresnis [12]. Be to, p16^{INK4a} buvo pasiūlytas kaip vertingas papildomas citologinių mėginių žymuo vertinant moteris, kurioms gimdos kaklelio vėžio patikros metu buvo nustatytas DR-ŽPV [11;13].

Beveik visose didelio laipsnio gimdos kaklelio intraepitelinėse pažeidose (t. y. CIN2, CIN3, ar rimtesnėse), buvo nustatyta padidėjusi p16^{INK4a} raiška [3;6;8]. Kadangi didelis kiekis epitelinių ląstelių, esančių CIN pažeidose, taip pat aktyviai dauginasi, tose pačiose gimdos kaklelio epitelio ląstelėse nustatyta ir p16^{INK4a}, ir Ki-67 raiška gali būti naudojama kaip transformuotų ląstelių rodiklis. Taigi, metodas, pagrįstas gimdos kaklelio citologinių mėginių vertinimu, tiriant atskiras gimdos kaklelio epitelio ląsteles su dvigubu p16^{INK4a} ir Ki-67 dažymu, pasižymi dideliu jautrumu ir specifiskumu, nustatant priešvėžinius ir vėžinius pokyčius [14;15;16;17;18;19;20;21].

PROCEDŪROS PRINCIPAS

Tech. spec. 1.12

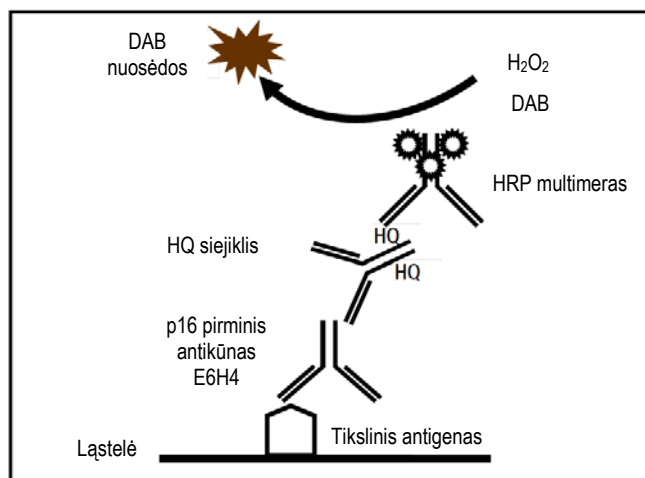
CINtec PLUS citologiniame rinkinyje pateikiami reagentai, skirti vienu metu imunocitochemiškai aptikti p16^{INK4a} ir Ki-67 baltymus citologiniuose mėginiuose, paimtuose iš gimdos kaklelio. Baltymai aptinkami su paruoštu naudoti pirminių monokloninių antikūnų mišiniu, kurį sudaro monokloninis pelės antikūnas prieš žmogaus p16^{INK4a} baltymą (E6H4[™] klonas) ir pirminis rekombinantinis triušio antikūnas prieš žmogaus Ki-67 baltymą (274-11 AC3 klonas). Po ląstelių kondicionavimo, endogeninės peroksidazės aktyvumo slopinimo ir inkubavimo su pirminių antikūnų mišiniu, naudojamos dvi paruoštos naudoti detektavimo sistemos, optimizuotos gimdos kaklelio citologiniams mėginiams:

- Ožkos anti-pelės antrinis antikūnas, kovalentiškai sujungtas su HQ haptenuis (patentuotas haptenas), ir tretinis anti-HQ hapteno antikūnas, sujungtas su krienų peroksidaze (HRP), kurie yra optimizuoti monokloniniams E6H4 klonu pelės antikūnams aptikti;
- Ožkos anti-triušio antrinis antikūnas, kovalentiškai sujungtas su NP haptenuis (patentuotas haptenas), ir tretinis anti-NP hapteno antikūnas, sujungtas su šarmine fosfataze (AP), kurie yra optimizuoti rekombinantiniams 274-11 AC3 klonu triušio antikūnams aptikti.

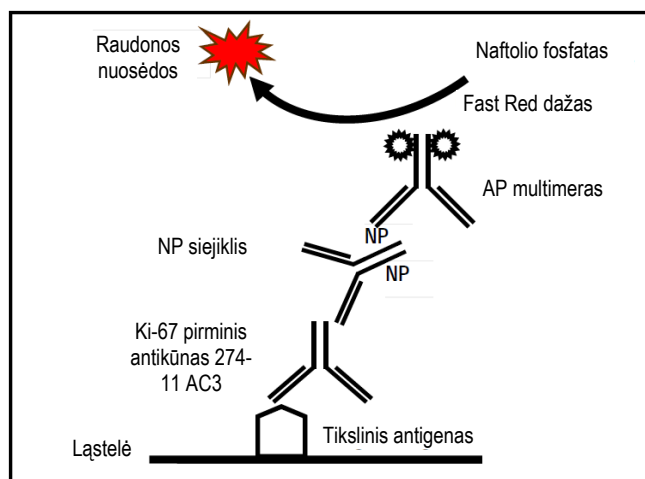
Tech. spec. 1.12

Chromogeninės reakcijos yra pagrįstos HRP atliekama 3,3'-diaminobenzidino tetrahydrochlorido (DAB) konversija ir AP atliekama Fast Red konversija su naftolio fosfatu, kurių metu atitinkamai susidaro rudos nuosėdos p16^{INK4a} antigeno srityje ir raudonos nuosėdos Ki-67 antigeno srityje.

Po automatizuoto kontrastinio dažymo ir melsvinimo, seka dviejų žingsnių įtvirtinimo procedūra. Pirma, pūvis įtvirtinamas naudojant vandeninę terpę. Po to stikelis padengiamas naudojant nuolatinę įtvirtinimo terpę. Dažymo rezultatai vertinami naudojant šviesinį mikroskopą.



2 paveikslas. Žmogaus p16^{INKa} baltymo nustatymas



3 paveikslas. Žmogaus Ki-67 baltymo nustatymas.

PATEIKIAMIE REAGENTAI

CINtec PLUS citologiniame rinkinyje pateikiami reagentai, kurių kiekio pakanka atlikti 100 testų.

- Vienas 10 ml dozatorius *CINtec PLUS Primary Antibody Cocktail (p16/Ki-67)*, kuriame yra pirminių antikūnų kokteilis iš monokloninių E6H4 klonų pelės antikūnų, atpažįstančių žmogaus p16^{INKa} baltymą, ir pirminių rekombinantinių 274-11 AC3 klonų triušio antikūnų, atpažįstančių žmogaus Ki-67 baltymą (bendra antikūnų koncentracija <5 µg/ml), buferiniame tirpale, kuriame yra baltymų su ProClin® 300 konservantu.
- Vienas 10 ml dozatorius *CINtec PLUS Red anti-Rabbit NP Linker*, kuriame yra su NP žymėtų ožkos anti-triušio IgG (<10 µg/ml; NP yra patentuotas haptenas, kovalentiškai prijungtas prie ožkos antikūno) buferiniame tirpale, kuriame yra baltymų su ProClin® 300 konservantu.
- Vienas 10 ml dozatorius *CINtec PLUS Red AP Multimer*, kuriame yra šarminės fosfatazės multimeras – pelės monokloninių anti-NP tretinių antikūnų, žymėtų šarminės fosfataze (<20 µg/ml), buferiniame tirpale, kuriame yra baltymų su ProClin® 300 konservantu.
- Vienas 10 ml dozatorius *CINtec PLUS Red Naphthol Phosphate*, kuriame yra naftolio fosfato (<1 %) su ProClin® 300 konservantu.

- Vienas 10 ml dozatorius *CINtec PLUS Fast Red*, kuriame yra Fast Red (<1 %) acetatiname buferiniame tirpale su ProClin® 300 konservantu.
- Vienas 10 ml dozatorius *CINtec PLUS DAB Peroxidase Inhibitor*, kuriame yra peroksidazės slopiklio vandenilio peroksido tirpalas (<5 %).
- Vienas 10 ml dozatorius *CINtec PLUS DAB anti-Mouse HQ Linker*, kuriame yra su HQ žymėtų ožkos anti-pelės IgG (<40 µg/ml; HQ yra patentuotas haptenas, kovalentiškai prijungtas prie ožkos antikūno) buferiniame tirpale, kuriame yra baltymų su ProClin® 300 konservantu.
- Vienas 10 ml dozatorius *CINtec PLUS DAB HRP Multimer*, kuriame yra krienų peroksidazės multimeras – pelės monokloninių anti-HQ tretinių antikūnų, žymėtų krienų peroksidade (<10 µg/ml), buferiniame tirpale, kuriame yra baltymų su ProClin® 300 konservantu.
- Vienas 10 ml dozatorius *CINtec PLUS DAB*, kuriame yra 3,3'-diaminobenzidino tetrahydrochlorido (<1%) patentuotame stabilizuojančiame tirpale su patentuotu konservantu.
- Vienas 10 ml dozatorius *CINtec PLUS DAB H₂O₂*, kuriame yra vandenilio peroksido (<1 %) fosfatiniame buferiniame tirpale.

ATKŪRIMAS, MAIŠYMAS, SKIEDIMAS, TITRAVIMAS

CINtec PLUS citologinis rinkinys yra optimizuotas naudoti VENTANA BenchMark GX, XT ir ULTRA automatinuose mikroskopinių stiklelių dažytuvuose. Nereikalingas joks atkūrimas, maišymas, skiedimas ar titravimas.

Nukrypęs nuo rekomenduojamų gimdos kaklelio citologinių bandinių fiksavimo ir tolesnio apdorojimo procedūrų, gali atsirasti reikšmingas rezultatų kintamumas, dėl kurio laboratorijoje būtina atlikti kontrolinius dažymus.

Daugiau informacijos apie kontrolinius bandinius pateikiama skyrelyje „Kokybės kontrolė“.

REIKALINGOS, BET NEPATEIKIAMOS PRIEMONĖS

Toliau išvardinti reagentai ir priemonės yra reikalingi dažymui, tačiau nepateikiami su CINtec PLUS citologiniu rinkiniu.

Ne visi produktai, išvardinti pakuotės informaciniame lapelyje, gali būti gaunami visose vietovėse. Pasitarkite su savo vietiniu aptarnavimo atstovu.

1. Tinkami kontroliniai bandiniai (pasirinktinai, prašome remtis skyreliu „Kokybės kontrolė“).
2. Hematokslinino kontrastinis dažas.
3. Melsvinimo reagentas.
4. Reakcijos buferio koncentratas (10X).
5. Ląstelių kondicionavimo tirpalas (CC1/ULTRA CC1)
6. Ląstelių kondicionavimo tirpalas (CC2/ULTRA CC2), reikalingas prietaisui, tačiau nenaudojamas.
7. EZ Prep koncentratas (10X), reikalingas prietaisui, tačiau nenaudojamas.
8. SSC koncentratas (10X), reikalingas prietaisui, tačiau nenaudojamas.
9. Dengiamasis skystis (LCS/ULTRA LCS).
10. Reagentinės kokybės etanolis, denatūruotas (≥ 95 % grynumo).
11. VENTANA BenchMark GX, XT arba ULTRA automatinis objektinių stiklelių dažytuvas.
12. Rekomenduojami SuperFrost® PLUS mikroskopiniai stikleliai (Thermo Fisher Scientific) įprastiniams tepinėliams.
13. ThinPrep® Arcless mikroskopiniai stikleliai arba ThinPrep® mikroskopiniai stikleliai SPECIALIAM APDOROJIMUI (FOR SPECIAL PROCESSING, Hologic, užsakymo numeris 70126-002).
14. BD SurePath™ PreCoat mikroskopiniai stikleliai (pateikiami SurePath GYN rinkinyje).
15. CC/Mount™ vandeninė įtvirtinimo terpė (Diagnostic BioSystems P/N: K 002; Sigma-Aldrich P/N: C9368).
16. Pasirinktinai: džiovinimo krosnis, palaikanti 60 °C ± 5 °C temperatūrą.
17. Ksilenas (histologinės kokybės).
18. Dejonizuotas ar distiliuotas vanduo.
19. Stikliniai dengiamieji stikleliai ir ksileno pagrindo įtvirtinimo terpė arba plastikinės plėvelės dengiamieji stikleliai, tinkami padengti citologiniams bandiniams.
20. Šviesinis mikroskopas.
21. Švelnus indų ploviklis.

SAUGOJIMAS

Saugoti 2-8 °C. Neužšaldyti. Šis reagentų rinkinys gali būti naudojamas iškart išėmus iš šaldytuvo.

Kad užtikrintumėte tinkamą reagento pateikimą ir reagentų stabilumą, po kiekvieno naudojimo ant dozatoriaus uždėkite dangtelį ir iškart padėkite statmeną dozatorių į šaldytuvą.

CINtec PLUS citologinis rinkinys turi galiojimo laiko pabaigos datą. Kai laikomas tinkamai, produktas yra stabilus iki datos, nurodytos etiketėje. Nenaudokite reagento, pasibaigus jo galiojimo laikui nurodytam laikymo metodui. Nėra jokių aiškių požymių, rodančių, kad šis produktas nestabilus, todėl kartu su nežinomais bandiniais turėtų būti dažomos teigiamos ir neigiamos kontrolės. Pasirodžius galimo reagento nestabilumo požymiams iškart kreipkitės į vietinį aptarnavimo atstovą.

PERSPĖJIMAI IR ATSARGUMO PRIEMONĖS

1. Skirta *in vitro* diagnostikai (IVD).
2. Skirta tik profesionaliam naudojimui.
3. Nenaudokite produkto, jei kurio nors iš komponentų pakuotė yra pažeista. Jei pakuotė ar komponentai būtų pažeisti, nedelsdami kreipkitės į vietinį aptarnavimo atstovą.
4. Reagentai yra optimaliai praskiesti, papildomai skiedžiant gali pranykti antigeno dažymas. Vartotojas turi validuoti bet kokius tokius pakeitimus.
5. Kaip konservantas naudojamas ProClin 300. Jis yra klasifikuojamas kaip dirginanti medžiaga ir gali sukelti alergiją susilietęs su oda. Naudodami reagentus, imkitės tinkamų atsargumo priemonių. Venkite akių, odos ir gleivinių kontakto su reagentais. Naudokite apsauginius drabužius ir pirštines. Dozatorių, turinčių šį konservantą, sąrašas pateikiamas skyrelyje „Pateikiami reagentai“.
6. Visos žmogaus ar gyvūnų kilmės medžiagos turėtų būti laikomos biologinio pavojaus medžiagomis ir turėtų būti išmetamos taikant atitinkamas atsargumo priemones.
7. Naudodamiesi reagentais imkitės tinkamų atsargumo priemonių. Venkite akių, odos ir gleivinių kontakto su reagentais. Venkite reagentų patekimo į kvėpavimo takus. Naudokite vienkartinės pirštines ir dėvėkite tinkamus apsauginius drabužius, kai dirbate su potencialiais karcinogenais ar toksiškomis medžiagomis. Jeigu reagentai patenka ant jautrių sričių, gausiai nuplaukite vandeniu.
8. Venkite reagentų mikrobiologinio užkrėtimo, kadangi dėl to gali būti gaunami klaidingi rezultatai.
9. Pasikonsultuokite su vietinėmis ar valstybinėmis tarnybomis dėl rekomenduojamo produkto išmetimo metodo.
10. Detalesnę produkto saugos informaciją galite rasti produkto saugos duomenų lapuose bei Simbolių ir rizikos frazių žinyne www.ventana.com.
11. Apdorodami ir išmesdami citologinius bandinius, įskaitant visus bandinius prieš ir po fiksavimo bei visas su jais sąveikavusias medžiagas, laikykitės saugos nurodymų, skirtų darbu su potencialiai užkrečiama medžiaga, ir tinkamų atliekų tvarkymo reikalavimų.

BANDINIO PARUOŠIMAS

Siekiant išsaugoti tinkamus citologinius bandinius imunohistocheminėms procedūroms, jie turi būti deramai tvarkomi. Visi bandiniai turi būti ruošiami laikantis standartinių ląstelių apdorojimo metodų.

Siekiant išvengti vertinimui trukdančių elementų, tokių kaip kraujas ar gleivės, ir užtikrinti, kad bandinys atitinka Bethesda gaires, gydytojai turėtų laikytis rekomenduojamos bandinių ėmimo metodikos [22, 23].

Su CINtec PLUS citologiniu rinkiniu gali būti naudojami bandiniai ant objektyvinių stiklėlių, paruošti tokiais metodais:

- ThinPrep® (Hologic Inc.) objektyviniai stiklėliai, paruošti ThinPrep® 2000 ar 5000 procesoriais (Hologic Inc.), naudojant ThinPrep® Arcless mikroskopinius stiklėlius arba ThinPrep® mikroskopinius stiklėlius SPECIALIAM APDOROJIMUI (FOR SPECIAL PROCESSING, Hologic, užsakymo numeris 70126-002), laikantis gamintojo nurodymų.
- BD SurePath™ (BD Diagnostics Tripath) objektyviniai stiklėliai, paruošti pagal gamintojo nurodymus.
- Rankiniu būdu paruošti objektyviniai stiklėliai (stiklėliai su įprastiniais tepinėliais).

Kartu su pacienčių bandiniais rekomenduojama dažyti ir tinkamus kontrolinius bandinius (detali informacija pateikiama skyrelyje „Kokybės kontrolė“).

ThinPrep® bandinio paruošimas

Citologiniai bandiniai, skirti imunocitocheminiam dažymui naudojant CINtec PLUS citologinį rinkinį, gali būti laikomi PreservCyte® tirpale nuo 4 °C iki 30 °C temperatūroje iki 6 savaičių po bandinio paėmimo.

Atliekant imunohistocheminį dažymą su CINtec PLUS citologiniu rinkiniu, naudojant VENTANA Benchmark GX, XT ir ULTRA automatinius objektyvinių stiklėlių dažytuvus, būtina naudoti ThinPrep® Arcless mikroskopinius stiklėlius arba ThinPrep® mikroskopinius stiklėlius SPECIALIAM APDOROJIMUI (FOR SPECIAL PROCESSING, Hologic, užsakymo numeris 70126-002).

ThinPrep® bandinio paruošimas naudojant ThinPrep® 2000 procesorių

ThinPrep® (Hologic Inc.) objektyviniai stiklėliai ruošiami naudojant ThinPrep® 2000 procesorių (Hologic Inc.) pagal gamintojo nurodymus. Kai baigiama ThinPrep® 2000 procesoriaus seka, apdorotas objektyvinis stiklėlis yra fiksavimo mėgintuvėlyje su $\geq 95\%$ reagentinio etanolio tirpalu. Atsargiai išimkite mėgintuvėlį iš ThinPrep® 2000 procesoriaus fiksavimo vonelės laikiklio ir perkeltite paruoštą stiklėlį iš mėgintuvėlio į stiklėlių kibirėlį su $\geq 95\%$ reagentinio etanolio tirpalu. Palaikykite stiklėlį etanolyje ne trumpiau kaip 15 ir ne ilgiau kaip 60 minučių. Pakeiskite etanolio tirpalą fiksavimo mėgintuvėlyje ir stiklėlių kibirėlyje kas 20 paruoštų objektyvinių stiklėlių. Pasibaigus inkubavimo laikui, išimkite stiklėlį iš etanolio kibirėlio ir, padėję horizontaliai ant plokščio paviršiaus, džiovinkite jį mažiausiai 60 minučių. Išdžiovintus stiklėlius galima laikyti kambario temperatūroje tamsoje; juos būtina nudažyti su CINtec PLUS citologiniu rinkiniu per 3 dienas po paruošimo.

ThinPrep® bandinio paruošimas naudojant ThinPrep® 5000 procesorių

ThinPrep® (Hologic Inc.) objektyviniai stiklėliai ruošiami naudojant ThinPrep® 5000 procesorių (Hologic Inc.) pagal gamintojo nurodymus. Kai baigiama ThinPrep® 5000 procesoriaus seka, apdoroti objektyviniai stiklėliai yra stiklėlių laikiklyje, įmerktame į $\geq 95\%$ reagentinio etanolio tirpalą fiksavimo vonelėje. Atsargiai išimkite fiksavimo vonelę iš ThinPrep® 5000 procesoriaus ir papildomai palaikykite stiklėlius etanolyje ne trumpiau kaip 15 ir ne ilgiau kaip 60 minučių. Po kiekvieno ciklo pakeiskite etanolio tirpalą fiksavimo mėgintuvėlyje ir stiklėlių kibirėlyje. Pasibaigus inkubavimo laikui, išimkite stiklėlius iš etanolio kibirėlio ir, padėję horizontaliai ant plokščio paviršiaus, džiovinkite juos mažiausiai 60 minučių. Išdžiovintus stiklėlius galima laikyti kambario temperatūroje tamsoje; juos būtina nudažyti su CINtec PLUS citologiniu rinkiniu per 3 dienas po paruošimo.

Prieš imunohistocheminį dažymą su CINtec PLUS citologiniu rinkiniu nuimkite pirmąją objektyvinio stiklėlio etiketę, naudotą ThinPrep® 5000 procesoriaus, ir užklijuokite atitinkamą etiketę, sukurta VENTANA BenchMark GX, XT arba BenchMark ULTRA automatinio objektyvinių stiklėlių dažytuvo.

BD SurePath™ bandinio paruošimas

Citologiniai bandiniai, skirti imunocitocheminiam dažymui naudojant CINtec PLUS citologinį rinkinį, gali būti laikomi SurePath™ konservuojamame tirpale iki 4 savaičių kambario temperatūroje (nuo 15 °C iki 30 °C) arba iki 6 mėnesių šaldytuve nuo 2 °C iki 10 °C.

BD SurePath™ bandinio paruošimas iš karto po Pap stiklėlio apdorojimo

Paruošus koncentruotas ląsteles objektyviam stiklėliui, skirtam Pap dažymui, jas galima iš karto naudoti paruošti antram stiklėliui, kuris bus dažomas su CINtec PLUS citologiniu rinkiniu. Bandinį ruoškite pagal gamintojo rekomendacijas PrepStain™ prietaiso „Slide Preparation“ („Stiklėlio paruošimas“) [2 parinktis] protokolui, skirtam GYN bandiniams. Meniu parinktyje „Change Sample/Stain Parameters“ („Keisti bandinio/dažymo parametrus“) suspendavimo tūrį reikia pakeisti į 0 ml.

BD SurePath™ bandinio paruošimas iš išsaugotų ląstelių

Koncentruotas ląsteles galima išsaugoti pridėjus maždaug 2 ml SurePath™ konservuojamo tirpalo ir uždengus bandinio mėgintuvėlį (detalios informacijos ieškokite gamintojo instrukcijoje). Skaiciuojant nuo bandinio paėmimo datos, koncentruotos ląstelės, kurios buvo suspenduotos konservuojamame tirpale, gali būti laikomos iki 4 savaičių kambario temperatūroje (nuo 15 °C iki 30 °C) arba iki 6 mėnesių šaldytuve nuo 2 °C iki 10 °C. Kad paruošumėte stiklėlį CINtec PLUS citologiniu rinkiniu, pirmiausia atšildykite bandinį iki kambario temperatūros per mažiausiai 60 minučių. Pradėkite nuo GYN koncentravimo proceso antrojo centrifugavimo žingsnio ir atlikite visus likusius išankstinio apdorojimo žingsnius, kaip nurodyta gamintojo instrukcijoje išsaugotų ląstelių apdorojimui. Laikykitės gamintojo rekomendacijų PrepStain™ prietaiso „Slide Preparation“ („Stiklėlio paruošimas“) [2 parinktis] protokolui, skirtam GYN bandiniams.

Abiems šiems bandinio paruošimo variantams po bandinio perkėlimo žingsnio išimkite stiklelių laikiklį iš PrepStain™ prietaiso. Apverskite laikiklį, kad nupiltumėte skystį. Pipete įlašinkite 2 ml $\geq 95\%$ reagentinio etanolio tirpalo į kiekvieną nusodinimo kamerą ir iš karto nupilkite. Užpilkite 2 ml reagentinio etanolio tirpalo antrą kartą ir palaikykite 10 minučių. Nupilkite antrą kartą apversdami laikiklį. Nuimkite nusodinimo kameras nuo stiklelių ir, padėję horizontaliai ant plokščio paviršiaus, džiovinkite stiklelius mažiausiai 60 minučių. Išdžiovintus stiklelius galima laikyti kambario temperatūroje tamsoje; juos būtina nudažyti su CINtec PLUS citologiniu rinkiniu per 3 dienas po paruošimo.

Įprastinio tepinėlio paruošimas

Įprastiniai tepinėliai turėtų būti fiksuojami purškiamu citologiniu fiksavimo reagentu, turinčiu polietilenglikolio (pvz., Safetex™ citologinis fiksatyvas, Andwin Scientific), iš karto paėmus bandinį. Objektiniai stikleliai su purškikliu užfiksuotais įprastiniais tepinėliais gali būti laikomi kambario temperatūroje tamsoje; juos būtina nudažyti su CINtec PLUS citologiniu rinkiniu per 7 dienas po paruošimo.

Prieš sudedant stiklelius į VENTANA BenchMark GX, XT ir ULTRA automatinius objektinių stiklelių dažytuvus, bandinių papildomai apdoroti nereikia.

DAŽYMO PROCEDŪRA

CINtec PLUS citologinis rinkinys buvo sukurtas naudoti su VENTANA BenchMark GX, XT ir ULTRA automatiniiais objektinių stiklelių dažytuvais kartu su VENTANA papildomais reagentais ir priedais. Rekomenduojami dažymo protokolai pateikiami 1, 2 ir 3 lentelėse.

CINtec PLUS citologinis rinkinys buvo optimizuotas taikant parametrus, nurodytus 1, 2 ir 3 lentelėse; nepaisant to, vartotojas turi patvirtinti rezultatus, gautus naudojant šį rinkinį.

Automatinių procedūrų parametrai gali būti peržiūrimi, spausdinami ir redaguojami pagal kiekvieno prietaiso vartotojo vadove pateiktus nurodymus.

1 lentelė. Rekomenduojamas dažymo protokolai ThinPrep®, SurePath™ ir įprastinių tepinėlių stikliams, naudojant VENTANA BenchMark GX automatinį objektinių stiklelių dažytuvą kartu su hematoksilinu (P/N 760-2021) ir melsvinimo reagentu (P/N 760-2037).

Dažymo procedūra	GX CINtec PLUS citologija		
Pasirenkamos parinktys	Mėginio paruošimo tipas		
	ThinPrep	SurePath	Įprastinis
ThinPrep	Pasirinkta	Nepasirinkta	Nepasirinkta
SurePath	Nepasirinkta	Pasirinkta	Nepasirinkta
Kitas	Nepasirinkta	Nepasirinkta	Pasirinkta
Laštelių kondicionavimo parinktis	Nepasirinkta	Nepasirinkta	16 min
Inkubavimo su antikūnu trukmė	16 min	20 min	16 min
Inkubavimo su HQ siejklų trukmė	12 min	16 min	12 min
Inkubavimo su HRP multimerų trukmė	8 min	8 min	8 min
Inkubavimo su NP siejklų trukmė	8 min	16 min	8 min
Inkubavimo su AP multimerų trukmė	8 min	8 min	8 min
Kontrastinis dažymas	Hematoksilinas 4 min.	Hematoksilinas 4 min.	Hematoksilinas 4 min.
Kontrastinis dažymas	Melsvinimas 4 min.	Melsvinimas 4 min.	Melsvinimas 4 min.

2 lentelė. Rekomenduojamas dažymo protokolai ThinPrep®, SurePath™ ir įprastinių tepinėlių stikliams, naudojant VENTANA BenchMark XT automatinį objektinių stiklelių dažytuvą kartu su hematoksilinu (P/N 760-2021) ir melsvinimo reagentu (P/N 760-2037).

Dažymo procedūra	XT CINtec PLUS citologija		
Pasirenkamos parinktys	Mėginio paruošimo tipas		
	ThinPrep	SurePath	Įprastinis
ThinPrep	Pasirinkta	Nepasirinkta	Nepasirinkta
SurePath	Nepasirinkta	Pasirinkta	Nepasirinkta
Kitas	Nepasirinkta	Nepasirinkta	Pasirinkta
Laštelių kondicionavimo parinktis	Nepasirinkta	Nepasirinkta	16 min
Inkubavimo su antikūnu trukmė	16 min	20 min	16 min
Inkubavimo su HQ siejklų trukmė	12 min	16 min	12 min
Inkubavimo su HRP multimerų trukmė	8 min	8 min	8 min
Inkubavimo su NP siejklų trukmė	8 min	16 min	8 min
Inkubavimo su AP multimerų trukmė	8 min	8 min	8 min
Kontrastinis dažymas	Hematoksilinas 4 min.	Hematoksilinas 4 min.	Hematoksilinas 4 min.
Kontrastinis dažymas	Melsvinimas 4 min.	Melsvinimas 4 min.	Melsvinimas 4 min.

3 lentelė. Rekomenduojamas dažymo protokolai ThinPrep®, SurePath™ ir įprastinių tepinėlių stikliams, naudojant VENTANA BenchMark ULTRA automatinį objektinių stiklelių dažytuvą kartu su hematoksilinu (P/N 760-2021) ir melsvinimo reagentu (P/N 760-2037).

Dažymo procedūra	ULTRA CINtec PLUS citologija		
Pasirenkamos parinktys	Mėginio paruošimo tipas		
	ThinPrep	SurePath	Įprastinis
ThinPrep	Pasirinkta	Nepasirinkta	Nepasirinkta
SurePath	Nepasirinkta	Pasirinkta	Nepasirinkta
Kitas	Nepasirinkta	Nepasirinkta	Pasirinkta
Laštelių kondicionavimo parinktis	Nepasirinkta	Nepasirinkta	16 min
Inkubavimo su antikūnu trukmė	16 min	16 min	16 min
Inkubavimo su HQ siejklų trukmė	12 min	16 min	12 min
Inkubavimo su HRP multimerų trukmė	8 min	8 min	8 min
Inkubavimo su NP siejklų trukmė	8 min	16 min	8 min
Inkubavimo su AP multimerų trukmė	8 min	8 min	8 min
Kontrastinis dažymas	Hematoksilinas 4 min.	Hematoksilinas 4 min.	Hematoksilinas 4 min.
Kontrastinis dažymas	Melsvinimas 4 min.	Melsvinimas 4 min.	Melsvinimas 4 min.

BenchMark GX, XT ir ULTRA automatinųjų objektinių stiklėlių dažytuvų naudojimas

1. Ant objekcinio stiklėlio užklijuokite etiketę su juostiniu kodu, atitinkančią atliekamą protokolą.
2. Sudėkite CINtec PLUS citologinio rinkinio dozatorius bei reikalingus papildomus reagentus ant reagentų padėklo ir padėkite juos ant automatinio objektinių stiklėlių dažytuvo.
3. Patikrinkite tūrinius reagentus ir ištuštinkite atliekų talpas.
4. Sudėkite objektinius stiklėlius į automatinį objektinių stiklėlių dažytuvą.
5. Paleiskite dažymo procedūrą.
6. Pasibaigus dažymo procesui, išimkite objektinius stiklėlius iš automatinio objektinių stiklėlių dažytuvo.

PROCEDŪRA PO DAŽYMO – ĮTVIRTINIMAS IR PADENGIMAS

Kad būtų išsaugotas optimalus jautrumas ir neišblukyt chromogenai, reikalinga dviejų žingsnių įtvirtinimo procedūra.

Išimkite stiklėlius iš VENTANA BenchMark GX, XT ir ULTRA automatinio objektinių stiklėlių dažytuvo ir švelniai judindami plaukite stiklėlius čiaupo, dejonizuotu ar distiliuotu vandeniu ir švelniu indų plovikliu, kol nuo stiklėlių visiškai pašalinamas dengiamasis skystis.

PASTABA: Būkite atsargūs, kad vanduo nekristų tiesiai ant objekcinio stiklėlio. Vandeniį leiskite silpniausia srove.

Objektiniai stiklėliai įtvirtinami pagal toliau pateiktą dviejų žingsnių protokolą; būtina šiuos žingsnius atlikti nurodyta tvarka:

1. Vandeninis įtvirtinimas
 - Palaikykite stiklėlius distiliuotame arba dejonizuotame vandenyje mažiausiai 1 min.
 - Stiklėliai, kurie nėra dengiami, turėtų būti palikti distiliuotame arba dejonizuotame vandenyje, kol kiti stiklėliai padengiami CC/Mount™ vandenine įtvirtinimo terpe.
 - Išimkite vieną stiklėlį iš distiliuoto ar dejonizuoto vandens ir atsargiai nuvalykite nugarinę stiklėlio pusę popieriniu rankšluosčiu, kad pašalintumėte vandens perteklių. Nesauskinkite ir nešluostykite vandens nuo priekinės stiklėlio pusės (pusės su bandiniu).
 - Laikydami stiklėlį šiek tiek kampu, užlašinkite 4-6 lašus CC/Mount™ vandeninės įtvirtinimo terpės (Diagnostic BioSystems P/N: K 002; Sigma-Aldrich P/N: C9368) ant ThinPrep® ar SurePath™ stiklėlio arba 8 lašus ant įprastinio tepinėlio stiklėlio. Stenkitės nesudaryti oro burbulų. Kad išvengtumėte oro burbulų, prieš lašinant CC/Mount™ ant stiklėlio su bandinio preparatu, pirmąjį terpės lašą galite nuvalyti į popierinį rankšluostį.
 - Lengvai paverskite ir pasukokite objekcinį stiklėlį, kad plonu įtvirtinimo terpės sluoksniu padengtumėte visą bandinio preparato plotą (dar neuždėkite stiklinio ar plėvelės dengiamojo stiklėlio). Vizualiai patikrinkite, ar terpė tinkamai paskleista ant objekcinio stiklėlio.
 - Nuvalykite CC/Mount™ vandeninės įtvirtinimo terpės perteklių nuo stiklėlio nugarėlės ir briaunų. Jei reikia, naudokite sudrėkintą popierinį rankšluostį.
 - Stiklėlius džiovinkite padėjus ant horizontalaus paviršiaus:
 - a. Palaikykite ThinPrep® arba SurePath™ stiklėlius 37-60 °C temperatūroje 1 valandą arba, alternatyviai, kambario temperatūroje per naktį.
 - b. Palaikykite stiklėlius su įprastiniais tepinėliais 37 °C temperatūroje 4 valandas arba 60 °C temperatūroje 1 valandą arba, alternatyviai, kambario temperatūroje per naktį.
2. Dengimas stikliniu ar plėvelės dengiamuoju stiklėliu:
 - Visiškai išdžiūvus CC/Mount™ vandeniniam įtvirtinimui, jei reikia, atvėsinkite objektinius stiklėlius iki kambario temperatūros. Pamerkite stiklėlius į ksileną ne trumpiau nei 1 minutei ir ne ilgiau nei 20 minučių. Tuomet uždenkite objektinius stiklėlius stikliniu dengiamuoju stiklėliu, naudodami ksileno pagrindo įtvirtinimo terpę, arba taikydami padengimo ksileno pagrindo plėvelę metodu.

PASTABA: Prieš padengiant stikliniu ar plėvelės dengiamuoju stiklėliu, objektinių stiklėlių negalima palaipsniui dehidratuoti alkoholyje.

- Leiskite ksileno pagrindo įtvirtinimo terpei išdžiūti kambario temperatūroje.

PASTABA: Kad kiek galima sumažintumėte blukimą, saugokite stiklėlius nuo šviesos ir laikykite juos kambario temperatūroje.

KOKYBĖS KONTROLĖ

Nukrypęs nuo rekomenduojamų gimdos kaklelio citologinių bandinių fiksavimo ir tolesnio apdorojimo procedūrų, rezultatai gali reikšmingai varijuoti. Prastas produkto veikimas dėl netinkamo produkto naudojimo arba dėl jo nestabilumo neturi jokių akivaizdžių ženklų. Todėl kartu su pacienčių bandiniais turi būti dažomi ir atitinkami kontroliniai bandiniai.

Teigiama kontrolė

Kaip teigiama kontrolė gali būti naudojami bandiniai, apdoroti tokiau pat būdu kaip ir pacienčių bandinys(-iai). Teigiamos kontrolės bandiniai parodo, ar bandiniai buvo deramai paruošti ir ar tinkama dažymo technologija. Vienas teigiamos kontrolės bandinys turėtų būti įtraukiamas atliekant kiekvieną dažymo ciklą.

Žinomi teigiamos kontrolės bandiniai turėtų būti naudojami vien tik stebėti, ar apdoroti bandiniai ir tyrimo reagentai veikė tinkamai, o ne kaip pagalbinė medžiaga nustatant specifinę pacienčių bandinių diagnozę. Jeigu teigiamos kontrolės bandiniai neturi tinkamo teigiamo dažymo, tiriamųjų bandinių rezultatai turėtų būti laikomi negaliojančiais.

Neigiama kontrolė

Siekiant įvertinti foninį dažymą, kaip vidinė neigiama kontrolė gali būti naudojamos įvairios skirtingų tipų ląstelės, randamos tipiškuose gimdos kaklelio citologiniuose bandiniuose, kuriose nėra p16^{INK4a} ir Ki-67 antigenų raiškos (pavyzdžiui, paviršinės ląstelės).

Tyrimo patikra

Prieš pradėdamas naudoti CINtec PLUS citologinį rinkinį diagnostinėms procedūroms, vartotojas turi patvirtinti tinkamą jo veikimą, naudodamas teigiamus ir neigiamus bandinius su žinomomis dažymosi savybėmis.

DAŽYMO VERTINIMAS / LAUKIAMIEI REZULTATAI

Dažant CINtec PLUS citologinio rinkiniu, gaunami du skirtingų spalvų reakcijos produktai: rudas nuosėdos p16^{INK4a} antigeno srityje ir raudonos nuosėdos Ki-67 antigeno srityje. Rudas ląstelių dažymas (citoplazmos ir/arba branduolių) rodo padidėjusią p16^{INK4a} raišką. Raudonas ląstelių dažymas (branduolių) rodo Ki-67 raišką. Ląstelėse, kuriose nudažyti abu antigenai, matomas rudas citoplazminis dažymas su paprastai ryškiais raudonais branduoliais. Kvalifikuotas patologas/citotechnologas, turintis imunocitocheminių procedūrų patirties ir mokantis vertinti CINtec PLUS citologinio rinkiniu nudažytus stiklėlius, prieš vertindamas rezultatus turi įvertinti kontrolinius bandinius (jei jie naudojami).

Tyrimo rezultatus vertinti turėtų tik sertifikuotas specialistas, atsižvelgdamas į pacienčių klinikinę istoriją ir atliktus papildomus diagnostinius tyrimus.

Vertinant citologinius gimdos kaklelio bandinius, nudažytus CINtec PLUS citologiniu rinkiniu, stiklėliai turėtų būti vertinami tiriant atskiras gimdos kaklelio epitelio ląsteles, turinčias ir rudą citoplazminį, ir raudoną branduolinį dažymą, rodantį kartu vykstančią p16^{INK4a} ir Ki-67 raišką. Be to, panašiai kaip aprašant Pap citologijos rezultatus, aprašant CINtec PLUS citologinio tyrimo rezultatus turėtų būti vertinamas bandinių tinkamumas pagal Bethesda 2001 gaires (arba TBS) [23].

Teigiamas tyrimo rezultatas

Nustčius vieną ar daugiau gimdos kaklelio epitelinių ląstelių, kuriose toje pačioje ląstelėje matomas ir specifinis rudas citoplazminis imunodažymas, ir specifinis raudonas branduolinis imunodažymas, laikoma, kad CINtec PLUS citologinio tyrimo rezultatas yra teigiamas.

Neigiamas tyrimo rezultatas

Jeigu nenustatoma jokių gimdos kaklelio epitelinių ląstelių, kuriose matomas dvigubas rudas citoplazminis imunodažymas ir raudonas branduolinis imunodažymas, laikoma, kad CINtec PLUS citologinio tyrimo rezultatas yra neigiamas.

Nustčius gimdos kaklelio epitelinių ląstelių, kuriose matomas tik vieno iš žymenų imunoreaktyvumas (pavyzdžiui, tik rudas p16^{INK4a} dažymas arba tik raudonas Ki-67 dažymas), CINtec PLUS citologinio rinkinio dažymo rezultatas nėra laikomas teigiamu.

APRIBOJIMAI

1. Tik profesionaliam naudojimui. Atlikti imunocitocheminėms procedūroms reikalingas specialus personalo paruošimas.
2. Mikroskopinius objektinius stiklelius, nudažytus su CINtec PLUS citologiniu rinkiniu, vertinti turėtų tik sertifikuotas specialistas, kuris buvo išmokytas aiškinti šio tyrimo rezultatus.
3. Bet kokia teigiama dažymo ar jo nebuvimo klinikinė interpretacija turi būti vertinama klinikinės istorijos ir citologinių kriterijų kontekste.
4. Dažymo su CINtec PLUS citologiniu rinkiniu rezultatų vertinimas priklauso nuo hematoksilino kontrastinio dažymo intensyvumo ir kokybės. Nukrypęs nuo rekomenduojamų reagentų ir inkubavimo trukmės, vartotojas turi atlikti procedūros patikrą, kadangi perteklinis ar nepakankamas kontrastinis dažymas gali trukdyti tinkamai įvertinti rezultatus.
5. Stikleliai su įprastiniais tepinėliais, skirtais dažyti su CINtec PLUS citologiniu rinkiniu, turėtų būti ruošiami naudojant SuperFrost® PLUS (Thermo Fisher Scientific) mikroskopinius stiklinius objektinius stiklelius ir Safetex™ citologinį fiksantą (Andwin Scientific) – purškiamą citologinį fiksavimo reagentą su polietilenglikoliu. Nukrypęs nuo šių rekomendacijų, vartotojas turi atlikti procedūros patikrą.
6. Ruošiant ThinPrep® bandinius, nerekomenduojama naudoti ThinPrep® 3000 procesoriaus, kadangi po prietaiso atliekamos purškiamo fiksavimo procedūros paruoštus stiklelius dažant su CINtec PLUS citologiniu rinkiniu, gali būti prarandama daug ląstelių.
7. ThinPrep® Arcless mikroskopiniai stikleliai arba ThinPrep® mikroskopiniai stikleliai SPECIALIAM APDOROJIMUI (FOR SPECIAL PROCESSING, Hologic, užsakymo numeris 70126-002) yra būtini ruošiant ThinPrep® bandinius imunocitocheminiam dažymui su CINtec PLUS citologiniu rinkiniu, naudojant VENTANA BenchMark GX, XT ir ULTRA automatinius objektinių stiklelių dažytuvus. Naudojant ThinPrep® mikroskopinius stiklelius su įspausta vertinimo sritimi, gali būti gaunami netolygūs dažymo rezultatai.
8. Gamintojas pateikia šiuos antikūnus/reagentus tokios koncentracijos, kuri yra optimali, kai laikomasi pateiktų nurodymų, juos taikant imunocitochemiškai tirti paruoštus skystos terpės citologijos (LBC) stiklelius arba įprastinių tepinėlių stiklelius. Bet koks nukrypimas nuo rekomenduojamų tyrimo procedūrų gali anuliuoti nurodytus laukiamus rezultatus. Tinkamos kontrolės turi būti naudojamos ir dokumentuojamos. Vartotojai, kurie nukrypsta nuo rekomenduojamų tyrimo procedūrų, turi prisiimti atsakomybę už pacientės rezultatų vertinimą tokiais aplinkybėmis.

TRIKČIŲ ŠALINIMAS

1. Jei reagentų dozatorius nepateikia skysčio, patikrinkite, ar užtaisymo kameroje arba meniske nėra pašalinių medžiagų ar dalelių, tokių kaip plaušeliai ar nuosėdos. Jei dozatorius yra užsikimšęs, jo nenaudokite ir susisiekite su vietiniu aptarnavimo atstovu. Kitu atveju iš naujo užtaisykite dozatorių laikydami jį virš atliekų talpos, nuimdami dangtelį nuo snapelio ir paspausdami žemyn dozatoriaus viršų.
2. Jeigu teigiamai kontrolei gautas silpnas dažymas nei tikėtasi, patikrinkite, ar pasirinktas protokolas atitinka konkretų bandinio tipą; pavyzdžiui, SurePath™ citologiniams preparatams reikalingas ilgesnis inkubavimas su antikūnu nei ThinPrep® stikleliams ar stikleliams su įprastiniais tepinėliais. Be to, įsitikinkite, kad visų dozatorių talpose nėra pašalinių dalelių.
3. Jeigu teigiama kontrolė nenusidazė, reikėtų patikrinti, ar ant jos objekcinio stiklelio užklijuota tinkama etiketė su juostiniu kodu. Jeigu objekcinis stiklis pažymėtas tinkamai, įsitikinkite, kad visų dozatorių talpose nėra pašalinių dalelių.
4. Jeigu gaunamas intensyvus foninis dažymas, sutrumpinkite inkubavimo trukmės dažymo protokoluose. Be to, įsitikinkite, kad Reakcijos buferio tūrinis tirpalas buvo paruoštas tinkamai.
5. Jeigu dažymas yra silpnas, pailginkite inkubavimo trukmės dažymo protokoluose. Stikleliams su įprastiniais tepinėliais taip pat gali būti koreguojama ląstelių kondicionavimo trukmė.
6. Raudonos nuosėdos, naudojamos nustatyti Ki-67 baltymo raiškai, tirpsta alkoholyje. Jeigu Ki-67 dažymas yra silpnas arba jo nėra, įsitikinkite, kad nebuvo naudojamas alkoholinis hematoksilino reagentas ir kad buvo laikomasi

rekomenduojamos procedūros po dažymo, kaip nurodyta skyrelyje „Procedūra po dažymo – įtvirtinimas ir padengimas“.

7. Jeigu bandinys nusiplauna nuo stiklelio, patikrinkite objektinius stiklelius, kad įsitikintumėte, jog bandiniai buvo tinkamai paruošti pagal nuodymus skyrelyje „Bandinio paruošimas“ ir buvo naudojamas tinkamo tipo objekcinis stiklis.
8. Koreguodami procesą, remkitės skyreliu „Dažymo procedūra“, prietaiso naudojimosi instrukcija arba susisiekite su savo vietiniu aptarnavimo atstovu.

VEIKIMO CHARAKTERISTIKOS

CINtec PLUS citologinio rinkinio veikimas buvo vertinamas analitinio specifiskumo, atkuriamumo ir atitikties tyrimuose, kaip aprašyta toliau pateikiamuose skyreliuose.

Analitinis specifiskumas

CINtec PLUS citologinio rinkinio analitinis specifiskumas buvo vertinamas slopinant pirminių antikūnų klonus E6H4 ir 274-11 AC3 su atitinkamais peptidais, specifiskais jų epitopams. Skystos terpės citologiniai (LBC) stikleliai, paruošti iš ląstelių linijos, pasižymi padidėjusia abiejų antigenų raiška, buvo naudojami siekiant įvertinti slopinimo specifiniais peptidais poveikį dažymo abiem antikūnais rezultatams. Antikūnų prisijungimas prie jų epitopams specifinių peptidų lėmė antikūnų aktyvumo slopinimą, kuris buvo nustatytas pagal susilpnėjusį dažymą, palyginus su kontroliniu bandiniu be peptidų. Be to, nei vienas iš antikūnų nebuvo slopinamas peptido, specifisko kito antikūno epitopui; tai rodo, kad nespecifiniai peptidai neslopina šių antikūnų.

Atkuriamumas

CINtec PLUS citologinio rinkinio atkuriamumo tyrimai buvo atlikti siekiant nustatyti:

- CINtec PLUS citologinio rinkinio atkuriamumą tarp skirtingų partijų.
- Atkuriamumą tame pačiame dažymo cikle ir tarp skirtingų dažymo ciklų, atliekamų VENTANA BenchMark GX, XT ir ULTRA automatiniais objektinių stiklelių dažytuvais.
- Atkuriamumą tarp tokių pačių VENTANA BenchMark GX, XT ir ULTRA automatinį objektinių stiklelių dažytuvų platformų.
- Atkuriamumą tarp skirtingų VENTANA BenchMark GX, XT ir ULTRA automatinį objektinių stiklelių dažytuvų platformų.

Visi tyrimai atitiko jiems iš anksto nustatytus priimtino kriterijus.

Atitikties tyrimai

CINtec PLUS citologinio rinkinio veikimas, jį naudojant su VENTANA BenchMark GX, XT ir ULTRA automatiniais objektinių stiklelių dažytuvais, buvo vertinamas lyginant su Roche mtm CINtec PLUS rinkiniu (pirminė priemonė, Roche mtm laboratorijos AG, Mannheim), kuris ankstesniuose tyrimuose pasižymėjo dideliu jautriu ir specifiskumu, nustatant priešvėžinę ir vėžinę ligą gimdos kaklelio citologiniuose bandiniuose, vertinant atskiras gimdos kaklelio epitelines ląsteles su dvigubu teigiamu p16^{INKA} ir Ki-67 dažymu [14;15;16;17;18;19;20;21].

Atitikties tyrimai buvo atliekami naudojant pacientų bandinius iš populiacijos, kuriai skiriamas šis produktas, su Pap citologijos rezultatais NILM (intraepitelinių pokyčių, piktybinio naviko nėra), ASC-US, LSIL ir HSIL kiekvienam atskiram gimdos kaklelio citologinių preparatų paruošimo metodui: ThinPrep® (Hologic Inc.), BD SurePath™ (BD Diagnostics Tripath) ir stikleliams su įprastiniais tepinėliais. Skystos terpės bandiniams iš kiekvieno pacientės bandinio buvo paruošti du stikleliai. Įprastiniams tepinėliams du stikleliai buvo paruošti iš tos pačios pacientės to paties vizito metu, padalinant paimto bandinio medžiagą tarp dviejų stiklelių („bandinio dalijimo metodika“). Vienas stiklis buvo tiriamas su CINtec PLUS citologiniu rinkiniu, naudojant VENTANA BenchMark automatinį objektinių stiklelių dažytuvą, o kitas stiklis buvo dažomas su pirmine priemone.

Skystos terpės bandinių vertinimo algoritmas:

Kiekvienas stiklis buvo vertinamas dviejų kvalifikuotų vertintojų. Jeigu jų nustatyti rezultatai sutapdavo, šis rezultatas buvo laikomas galutiniu rezultatu tam stikliui. Jeigu jų nustatyti rezultatai skirdavosi, buvo atliekamas papildomas trečio vertintojo vertinimas, ir daugumos rezultatas buvo laikomas galutiniu rezultatu tam stikliui.

Stiklelių su įprastiniais tepinėliais vertinimo algoritmas:

Kiekvienas stiklis buvo vertinamas dviejų kvalifikuotų vertintojų. Jeigu abu vertintojai laikydavo stiklį teigiamu, galutinis rezultatas tam stikliui buvo laikomas teigiamu. Jeigu jų vertinimas nesutapdavo, stiklis buvo peržiūrimas trijų vertintojų kolegialiai, siekiant sutarimo, kuris buvo laikomas galutiniu rezultatu tam stikliui. Jeigu abu

vertintojai laikydavo stiklėlių neigiamu, stiklėlis buvo vertinamas trečio vertintojo, kad būtų patvirtintas neigiamas rezultatas. Jeigu trečias vertintojas laikydavo stiklėlių teigiamu, stiklėlis buvo peržiūrimas kolegialiai, siekiant sutarimo, kuris buvo laikomas galutiniu rezultatu tam stiklėliui.

Tyrimo rezultatų sutapimas yra pateikiamas kaip teigiamas procentinis sutapimas (TPS) ir neigiamas procentinis sutapimas (NPS) tarp CINtec PLUS citologinio rinkinio, naudojamo su VENTANA BenchMark automatiniai objektinių stiklėlių dažytuvais, ir pirminės priemonės.

4 lentelė. ThinPrep® gimdos kaklelio citologinių stiklėlių preparatų tyrimo rezultatų sutapimas tarp CINtec PLUS citologinio rinkinio ir pirminės priemonės.

		Pirminė priemonė (N)	
		+	-
CINtec® PLUS citologinis rinkinys (n)	+	140	25
	-	17	147
Iš viso		157	172

TPS (n/N) (95 % patikimumo intervalas) = $140/157 \times 100\% = 89.2\%$ (83.3-93.1%)

NPS (n/N) (95 % patikimumo intervalas) = $17/172 \times 100\% = 9.9\%$ (7.4-12.9%)

5 lentelė. SurePath™ gimdos kaklelio citologinių stiklėlių preparatų tyrimo rezultatų sutapimas tarp CINtec PLUS citologinio rinkinio ir pirminės priemonės.

		Pirminė priemonė (N)	
		+	-
CINtec® PLUS citologinis rinkinys (n)	+	56	3
	-	9	108
Iš viso		65	111

TPS (n/N) (95 % patikimumo intervalas) = $56/65 \times 100\% = 86.2\%$ (75.7-92.5%)

NPS (n/N) (95 % patikimumo intervalas) = $9/111 \times 100\% = 8.1\%$ (4.4-13.8%)

6 lentelė. Įprastinių gimdos kaklelio citologinių tepinėlių stiklėlių preparatų tyrimo rezultatų sutapimas tarp CINtec PLUS citologinio rinkinio ir pirminės priemonės.

		Pirminė priemonė (N)	
		+	-
CINtec® PLUS citologinis rinkinys (n)	+	98	17
	-	20	72
Iš viso		118	89

TPS (n/N) (95 % patikimumo intervalas) = $98/118 \times 100\% = 83.1\%$ (75.3-88.8%)

NPS (n/N) (95 % patikimumo intervalas) = $20/89 \times 100\% = 22.5\%$ (15.5-30.0%)

LITERATŪROS NUORODOS

- Wentzensen N, von Knebel Doeberitz M. Biomarkers in cervical cancer screening. Dis Markers. 2007;23:315-30.
- Scholz T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. J Cell Physiol. 2000;182:311-22.
- Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, et al. Overexpression of p16INK4a as a specific marker for dysplasia and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. Int J Cancer. 2001;92:276-84.
- Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, et al. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. Am J Pathol. 1998;153:1741-8.
- Cuschieri K, Wentzensen N. Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2008;17:2536-45.
- Bergeron C, Ordi J, Schmidt D, et al. Conjunctive p16INK4a testing significantly increases accuracy in diagnosing high-grade cervical intraepithelial neoplasia. Am J Clin Pathol. 2010;133:395-406.
- Del Pino M, Garcia S, Fusté V, et al. Value of p16INK4a as a marker of progression/ regression in cervical intraepithelial neoplasia grade 1. Am J Obstet Gynecol. 2009;201(5):488.

- Ordi J, Garcia S, del Pino M, et al. p16INK4a immunostaining identifies occult CIN lesions in HPV-positive women. Int J Gynecol Pathol. 2008;28:90-7.
- Wang SS, Trunk M, Schiffman M, et al. Validation of p16INK4a as a marker of oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2004;13:1355-60.
- Galgano MT, Castle PE, Atkins KA, et al. Using biomarkers as objective standards in the diagnosis of cervical biopsies. Am J Surg Pathol. 2010;8:1077-87.
- Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, et al. Use of p16INK4a over-expression to increase the specificity of human papillomavirus testing: a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. Lancet Oncol. 2008;9:937-45.
- Denton K, Bergeron C, Klement P, et al. The sensitivity and specificity of p16INK4a Cytology versus HPV Testing for Detecting High-Grade Cervical Disease in the Triage of ASC-US and LSIL P
- 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.
- Ikenberg H, Bergeron C, Schmidt D, et al., PALMS study group (2013). 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.
- 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 Pap Cytology Study (EEMAPS). 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):505-09.
- Ravarino A, Nemolato S, Macciocci 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):652-56.
- 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.
- Waldström M, Christensen RK, Omskov D. Evaluation of p16INK4a/Ki-67 dual stain in comparison with an mRNA human papillomavirus test on liquid-based cytology samples with low-grade squamous intraepithelial lesion. Cancer Cytopathol. 2013;121(3):136-45.
- 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.
- Killeen JL, Dye T, Grace C, et al. Improved Abnormal Pap Smear Triage Using Cervical Cancer Biomarkers. J Low Genit Tract Dis. 2013 Jun 11. [Epub ahead of print]
- Birdsong G., Husain M., Faison T, et al. Cervicovaginal Cytology Based on the Papanicolaou Technique: Approved Guideline- Third Edition. CLSI document GP15-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
- Solomon D, Davey D, Kurman R, et al. The 2001 Bethesda system. Terminology for reporting results of cervical cytology. JAMA. 2002;287:2114-9. ap Cytology Results. Am J Clin Pathol. 2010;134:12-21.

INTELEKTINĖ NUOSAVYBĖ

BENCHMARK, CINtec, VENTANA ir VENTANA logotipas yra Roche prekių ženklai.

Visi kiti prekiniai ženklai yra atitinkamų jų savininkų nuosavybė.

© 2013 Ventana Medical Systems Inc.

KONTAKTINĖ INFORMACIJA



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany



www.ventana.com

DĖL ŠIO INFORMACINIO LAPELIO NAUDOJIMO

Šis informacinis lapelis yra vertimas iš originalaus informacinio lapelio 1012838EN Rev C (2014-06-05). Vertimą atliko UAB „Expertus Vilnensis“. Naudoti kartu su originaliu informaciniu lapeliu.