

**«УТВЕРЖДАЮ»**

Генеральный директор

ООО «Рош Диагностика Рус»

О.В.Нестеров

«21» мая 2012 г.



## **ИНСТРУКЦИЯ**

**по применению изделия медицинского назначения: Наборы диагностические CINtec для качественного определения антигенов p16INK4a и Ki-67**



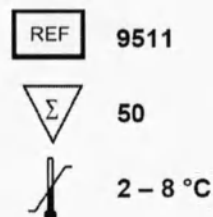
## Инструкция по применению

### Набор реагентов CINtec® Histology

Набор реагентов CINtec® Histology предназначен для качественного определения антигена p16<sup>INK4a</sup> иммуногистохимическим методом на гистологических срезах, приготовленных из фиксированных в формалине и залитых в парафин биоптатов шейки матки. Анализ срезов, окрашенных с использованием этого набора реагентов, должен осуществляться одновременно с анализом срезов, приготовленных из того же образца тканей шейки матки и окрашенных гематоксилином и эозином, что позволит унифицировать интерпретацию результатов исследования и увеличить точность диагностики цервикальной интраэпителиальной неоплазии высокой степени и рака шейки матки.



АО «МТМ Лабораториз»  
Им Неуенхеймер Фелд 583  
D-69120 Гейдельберг  
Германия  
Тел.: 00800 168 652 27  
Факс: +49 (0) 6221/64966-10  
e-mail: [info@mtmlabs.com](mailto:info@mtmlabs.com)  
[www.mtmlabs.com](http://www.mtmlabs.com)



## Содержание

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| I. Название продукта .....                                                       | 4  |
| II. Сфера применения.....                                                        | 4  |
| III. Описание .....                                                              | 4  |
| Краткая характеристика.....                                                      | 4  |
| Клиническая значимость .....                                                     | 5  |
| Принцип процедуры.....                                                           | 6  |
| IV. Реагенты.....                                                                | 6  |
| Реагенты, входящие в набор.....                                                  | 6  |
| Условия хранения .....                                                           | 8  |
| Материалы и реагенты, необходимые для исследования, но не входящие в набор ..... | 8  |
| Необходимое оборудование .....                                                   | 9  |
| V. Особые указания и меры предосторожности .....                                 | 9  |
| Меры предосторожности .....                                                      | 9  |
| Особые указания.....                                                             | 10 |
| VI. Процедура .....                                                              | 11 |
| Подготовка образцов.....                                                         | 11 |
| Залитые в парафин образцы тканей.....                                            | 11 |
| Демаскировка антигена путем нагревания .....                                     | 11 |
| Процедура окрашивания.....                                                       | 12 |
| 1. Подготовка реагентов.....                                                     | 12 |
| 1.1 Раствор для демаскировки антигена .....                                      | 12 |
| 1.2 Промывочный буфер .....                                                      | 12 |
| 1.3 Раствор субстрата-хромогена (ДАБ).....                                       | 12 |
| 1.4 Реагент для дополнительного окрашивания .....                                | 13 |
| 1.5 Среда для заключения .....                                                   | 13 |
| 2. Процедура окрашивания на автоматических иммуногистостейнерах .....            | 13 |

|                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1 Депарафинизация и регидратация.....                               | 13 |
| 2.2 Протокол окрашивания на автоматических иммуногистостейнерах ..... | 14 |
| 3. Процедура окрашивания, выполняемая вручную.....                    | 17 |
| 3.1 Депарафинизация и регидратация.....                               | 17 |
| 3.2 Протокол окрашивания для процедуры, выполняемой вручную .....     | 18 |
| VII. Контроль качества .....                                          | 20 |
| VIII. Интерпретация результатов.....                                  | 21 |
| IX. Ограничения .....                                                 | 22 |
| X. Рабочие характеристики .....                                       | 23 |
| XI. Устранение недостатков.....                                       | 28 |
| XII. Обозначения .....                                                | 30 |
| XIII. Производитель .....                                             | 30 |
| XIV. Информация о внесенных изменениях .....                          | 30 |
| XV. Информация о правообладателях .....                               | 30 |
| Приложение 1. Список литературы.....                                  | 31 |
| Приложение 2 .....                                                    | 33 |

## I. Название продукта

Набор реагентов CINtec® Histology

## II. Сфера применения

Для *in vitro* диагностики.

Набор реагентов CINtec® Histology предназначен для качественного определения антигена p16<sup>INK4a</sup> иммуногистохимическим методом на гистологических срезах, приготовленных из фиксированных в формалине и залитых в парафин биоптатов шейки матки.

Анализ срезов, окрашенных с использованием этого набора реагентов, должен осуществляться одновременно с анализом срезов, приготовленных из того же образца тканей шейки матки и окрашенных гематоксилином и эозином, что позволит унифицировать интерпретацию результатов исследования и увеличить точность диагностики цервикальной интраэпителиальной неоплазии высокой степени и рака шейки матки.

## III. Описание

### Краткая характеристика

Основным компонентом набора реагентов CINtec® Histology являются мышиные моноклональные антитела (клон Е6Н4®) к человеческому белку p16<sup>INK4a</sup>.

Белок p16<sup>INK4a</sup> представляет собой ингибитор циклин-зависимых киназ, который играет важную роль в регуляции клеточного цикла эукариот. Этот белок участвует в опосредованном белком ретинобластомы (pRB) контроле перехода клетки из фазы G1 в фазу S и запускает остановку клеточного цикла в процессе дифференцировки клеток. В окончательно дифференцированных эпителиальных клетках p16<sup>INK4a</sup> экспрессируется в количестве, которое обычно не позволяет выявить этот белок иммуногистохимическим методом.

В опухолях различных типов ген p16<sup>INK4a</sup> функционально инактивирован в результате генной мутации или гиперметиличирования промотера. Показано, что инактивация гена p16<sup>INK4a</sup>, подавляющего опухолевый рост, приводит к нарушению регуляции клеточного цикла и неконтролируемой пролиферации клеток.

В то же время в клетках эпителия шейки матки, в которых в результате репликации вирусов папилломы человека (ВПЧ) высокого онкогенного риска образуются онкобелки, запускающие процесс трансформации клеток, обнаружено значительное усиление экспрессии p16<sup>INK4a</sup> [1; 2]. Усиленная экспрессия p16<sup>INK4a</sup> на молекулярном уровне тесно связана с активностью онкобелка E7 ВПЧ высокого онкогенного риска. Показано, что усиленная экспрессия p16<sup>INK4a</sup> обусловлена опосредованной онкобелком E7 инактивацией функционального комплекса, образованного pRB и транскрипционным фактором E2F, которая является одним из ключевых механизмов трансформации клеток, индуцированной ВПЧ высокого онкогенного риска [3].

В научной литературе опубликованы результаты многочисленных исследований, в ходе которых усиленная экспрессия белка p16<sup>INK4a</sup> была обнаружена с использованием иммуногистохимического метода в очень большом количестве случаев предраковой дисплазии высокой степени (в 80–100% случаев ЦИН2 и практически во всех случаях ЦИН3) и инвазивного рака шейки матки. Частота обнаружения усиленной экспрессии p16<sup>INK4a</sup> при цервикальной интраэпителиальной неоплазии низкой степени (ЦИН1) варьируется и обычно составляет от 30 до 60% [1; 2; 4–16].

При интерпретации результатов необходимо учитывать, что p16<sup>INK4a</sup> представляет собой клеточный белок, который может экспрессироваться в определяемом количестве при дисплазии высокой степени и раке шейки матки, а также при некоторых состояниях, не связанных с дисплазией шейки матки, хотя характер экспрессии и экспрессируемое количество могут варьироваться. Гистологические препараты тканей с нормальной морфологической структурой помогают интерпретировать положительные результаты окрашивания на p16<sup>INK4a</sup> срезов, приготовленных из биоптатов шейки матки. Диффузное окрашивание, т.е. непрерывное окрашивание клеток базального и парабазального слоев, которое может сопровождаться или не сопровождаться окрашиванием клеток поверхностного слоя, расценивается как положительный результат теста на усиленную экспрессию p16<sup>INK4a</sup>. Показано, что такой характер окрашивания обеспечивает максимальный уровень чувствительности и специфичности диагностики ЦИН высокой степени [1; 4; 5]. В то же время очаговое окрашивание (окрашивание отдельных клеток или небольших групп клеток, т.е. прерывистое окрашивание, особенно клеток, расположенных за пределами базального и парабазального слоев), а также отсутствие признаков иммуногистохимической реакции расцениваются как отрицательный результат теста на усиленную экспрессию p16<sup>INK4a</sup> [1; 4; 5].

Анализ срезов, окрашенных на p16<sup>INK4a</sup> с использованием набора реагентов CINtec® Histology, должен осуществляться одновременно с анализом срезов, приготовленных из того же образца тканей шейки матки и окрашенных гематоксилином и эозином. Дополнительная информация, полученная при анализе окрашенных CINtec® срезов, в сочетании с предварительным морфологическим диагнозом, установленным при анализе срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, позволит установить окончательный диагноз.

### **Клиническая значимость**

Показано, что анализ серийных срезов, приготовленных из одного биоптата шейки матки и окрашенных гематоксилином и эозином и реагентами для иммуногистохимического выявления p16<sup>INK4a</sup>, позволяет унифицировать интерпретацию результатов исследования и увеличить точность диагностики цервикальной интраэпителиальной неоплазии высокой степени (ЦИН2+).

Патоморфологический диагноз, установленный при анализе срезов, приготовленных из биоптатов шейки матки и окрашенных гематоксилином и эозином, служит основанием для принятия решения относительно тактики ведения пациентки. Поэтому ошибочный диагноз может привести к принятию неправильного решения, т.е. к интенсивной терапии у практически здоровых женщин или к недостаточной терапии у женщин с дисплазией высокой степени, что может негативно сказаться на здоровье пациенток.

Для интерпретации результатов анализа гистологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, характерна высокая частота расхождений диагнозов, установленных патоморфологами. Результаты многочисленных исследований

свидетельствуют о довольно низкой частоте совпадений диагнозов, установленных при анализе одного и того же препарата шейки матки разными патоморфологами или одним патоморфологом через определенный промежуток времени [17–20].

Крупное многоцентровое исследование, проведенное в Соединенных Штатах, было направлено на оценку интерпретации результатов исследования гистологических препаратов шейки матки (2237 биоптатов, полученных при кольпоскопии, и 535 биоптатов, полученных при петлевой электроконизации шейки матки) группой опытных патоморфологов; воспроизводимость гистопатологических диагнозов была расценена как средняя (каппа = 0,46 для образцов, полученных при пункционной биопсии, каппа = 0,49 для образцов, полученных при петлевой электроконизации шейки матки) [17]. С использованием классификации ВОЗ и модифицированной классификации Бетезда было показано, что частота совпадений диагнозов, установленных шестью патоморфологами при анализе 125 биоптатов, полученных при кольпоскопии, была очень низкой и в том, и в другом случае [18]. Аналогичные данные были получены в ходе исследования, проведенного в Соединенном Королевстве. Результаты этого исследования свидетельствуют о низкой частоте совпадений диагнозов, установленных восьмью экспертами-патоморфологами при анализе 100 биоптатов, полученных при кольпоскопии (невзвешенное значение каппа = 0,358) [19].

Анализ дополнительных срезов, окрашенных с использованием набора реагентов CINtec® Histology, в сочетании с анализом срезов, окрашенных гематоксилином и эозином и традиционно используемых для установления диагноза, приводит к увеличению общей точности диагностики при использовании этой гистоморфологической методики.

### **Принцип процедуры**

В набор реагентов CINtec® Histology входят реагенты для определения антигена p16<sup>INK4a</sup> иммуногистохимическим методом. Набор предназначен для выполнения двухэтапной процедуры иммуногистохимического окрашивания срезов, приготовленных из фиксированных в формалине и залитых в парафин образцов тканей шейки матки, полученных при биопсии. Для определения антигена используются первичные моноклональные мышиные антитела, клон Е6Н4®, к человеческому белку p16<sup>INK4a</sup>.

Готовый к использованию реагент для визуализации представляет собой полимер, конъюгированный с пероксидазой хрена и Fab-фрагментами козьих антител к иммуноглобулинам мыши. Реагент для визуализации был подвергнут твердофазной экстракции для исключения перекрестной реактивности с иммуноглобулинами человека. Под воздействием пероксидазы хрена хромоген ДАБ превращается в видимый продукт реакции, который располагается на участках связывания антител с антигеном. После дополнительного окрашивания срезы можно заключить под покровные стекла. Результаты иммуногистохимической реакции оценивают при световой микроскопии.

## **IV. Реагенты**

### **Реагенты, входящие в набор**

Перечисленные ниже реагенты включены в каждый набор. Один набор реагентов рассчитан на 50 тестов и 50 реакций негативного контроля. Количество тестов определено, исходя из того, что на одно стекло используется 200 мкл реагентов.

**1 Реагент, блокирующий пероксидазу**

**Реагент, блокирующий пероксидазу**

2 x 11,5 мл, готовый к использованию

Раствор перекиси водорода 3%, содержит 15 ммоль/л азида натрия ( $\text{NaN}_3$ ).

Паспорт безопасности вещества (материала) предоставляется по запросу.

**2 Мышиные антитела к человеческому белку p16<sup>INK4a</sup>**

**Мышиные антитела к человеческому белку p16<sup>INK4a</sup>**

11,5 мл, готовые к использованию

Моноклональные мышиные антитела к человеческому белку p16<sup>INK4a</sup>, клон E6H4<sup>®</sup>, поставляются в буфере Трис (50 ммоль/л, pH 7,2), содержащем 15 ммоль/л азида натрия ( $\text{NaN}_3$ ).

**3 Реагент для визуализации**

**Реагент для визуализации**

2 x 11,5 мл, готовый к использованию

Полимер, конъюгированный с пероксидазой хрена и аффинно очищенными Fab-фрагментами козьих антител к иммуноглобулинам мыши. Поставляется в буфере Трис (50 ммоль/л, pH 7,2), содержащем 15 ммоль/л азида натрия ( $\text{NaN}_3$ ).

Паспорт безопасности вещества (материала) предоставляется по запросу.

**4 Реагент для негативного контроля**

**Реагент для негативного контроля**

11,5 мл, готовый к использованию

Моноклональные мышиные антитела к крысиному нейрофизину, связанному с окситоцином, поставляются в буфере Трис (50 ммоль/л, pH 7,2), содержащем 15 ммоль/л азида натрия ( $\text{NaN}_3$ ). Предназначены для верификации специфичности окрашивания. Крысиный нейрофизин, связанный с окситоцином, в тканях человека отсутствует.

**5 Забуференный субстрат ДАБ**

**Забуференный субстрат ДАБ**

31 мл

Забуференный раствор субстрата, pH 7,5, содержит < 0,1% перекиси водорода.

**6 Хромоген ДАБ**

### **Хромоген ДАБ**

0,85 мл, раствор хромогена 3,3'-диаминобензидина (ДАБ)

ДАБ относится к опасным веществам. Пожалуйста, обратите внимание на следующие фразы о безопасности и рисках:

R40 Ограниченные данные о канцерогенном действии.

R43 При попадании на кожу может вызывать сенсибилизацию.

R68 Существует риск необратимых эффектов.

S35 При утилизации данного вещества и его упаковки необходимо соблюдать меры безопасности.

S36/37 Необходимо использовать защитную одежду и перчатки.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Несмотря на то, что диаминобензидин является производным бензидина, данные о канцерогенности диаминобензидина отсутствуют. При утилизации данного вещества необходимо соблюдать федеральные, региональные и местные нормативные требования.

Паспорт безопасности вещества (материала) предоставляется по запросу.

### **7 Раствор для демаскировки антигена 10х**

#### **Раствор для демаскировки антигена 10х**

500 мл, буфер Трис, 100 ммоль/л, pH 9, содержащий 10 ммоль/л ЭДТА и 15 ммоль/л азидата натрия ( $\text{NaN}_3$ )

#### **Условия хранения**

Хранить при температуре 2–8°C. Не использовать после истечения срока годности. Данные о хранении реагентов в условиях, отличных от указанных выше, отсутствуют.

После вскрытия упаковки реагенты, входящие в набор, остаются стабильными на протяжении 6 месяцев при хранении при температуре 2–8°C. При помутнении растворов необходимо отказаться от их использования.

Разведенный промывочный буфер и разведенный раствор для демаскировки антигена остаются стабильными на протяжении 1 месяца при хранении при температуре 2–8°C. При помутнении растворов необходимо отказаться от их использования.

#### **Материалы и реагенты, необходимые для исследования, но не входящие в набор**

Промывочный буфер (10х), каталожный номер 8550 («МТМ Лабораториз»), используется вместе с реагентами из набора CIntec<sup>®</sup> Histology, но в состав набора не входит;

Впитывающие салфетки;

Гематоксилин для дополнительного окрашивания;

Дистиллированная или деионизированная вода (вода для промывания);

Этанол 95% и 70%;

Среда для заключения;

Гистологические препараты для положительного и негативного контроля;

Предметные стекла (SuperFrost® Plus или аналогичные);

Ксилол;

Покровные стекла.

### **Необходимое оборудование**

Термостат, поддерживающий температуру 60°C или ниже;

Влажная камера (необязательно);

Световой микроскоп (с объективами, обеспечивающими увеличение 4–40х);

Лабораторные стаканчики или кюветы;

Флаконы для промывания;

Таймер (с возможностью задавать интервалы от 2 до 60 минут);

Водяная баня с крышкой (с возможностью поддерживать температуру раствора для демаскировки антигена на уровне 95–99°C).

## **V. Особые указания и меры предосторожности**



### **Меры предосторожности**

1. Внимание! Некоторые из реагентов, входящих в набор, содержат опасные вещества. При обращении с реагентами из этого набора необходимо соблюдать меры безопасности, предусмотренные для обращения с опасными лабораторными реагентами.
2. Компоненты 1, 2, 4 и 7 данного набора реагентов содержат азид натрия ( $\text{NaN}_3$ ), который в чистом виде является высокотоксичным соединением. В концентрациях, в которых азид натрия присутствует в реагентах, это соединение не представляет опасности, однако при попадании в канализацию азид натрия может реагировать с медью и свинцом с образованием взрывоопасных азидов металлов. При утилизации реагентов необходимо смывать их большим количеством воды, чтобы предотвратить образование азидов металлов в канализации.
3. Компоненты 2, 3 и 4 содержат материал животного происхождения. При обращении с реагентами необходимо следовать процедурам, предусмотренным для материалов, полученных из биологических источников.
4. Паспорт безопасности вещества (материала) для данного набора реагентов предоставляется по запросу.

5. При обращении с предназначенными для гистологического исследования образцами, в том числе до и после фиксации, и с материалами, контактировавшими с образцами, а также при их утилизации необходимо соблюдать меры безопасности, предусмотренные для обращения с потенциально инфицированными материалами, и соответствующие требования к утилизации отходов.
6. Никогда не набирайте реагенты в пипетку ртом. Необходимо избегать контакта образцов и реагентов с кожей и слизистыми оболочками. При попадании образцов или реагентов на кожу и слизистые оболочки необходимо промыть их большим количеством воды.
7. Воздействие яркого света может привести к ухудшению качества реагента для визуализации и хромогена ДАБ. Не храните реагенты, входящие в состав набора, и не проводите процедуру окрашивания в условиях яркого освещения, в частности, избегайте попадания прямых солнечных лучей.
8. Используйте соответствующие средства индивидуальной защиты, чтобы предотвратить попадание реагентов, входящих в состав набора CINtec® Histology или используемых вместе с этим набором, в глаза и на кожу. Дополнительная информация представлена в паспорте безопасности вещества (материала).



### **Особые указания**

1. Для *in vitro* диагностики.
2. Только для профессионального использования.
3. Необходимо принять меры по предотвращению микробной контаминации реагентов, чтобы избежать неспецифического окрашивания.
4. Изменения продолжительности или температуры инкубации и отклонения от рекомендуемых методик могут привести к получению ошибочных результатов.
5. Не используйте реагенты из набора, если упаковка любого из компонентов повреждена. При нарушении целостности упаковки или ненадлежащем качестве компонентов набора необходимо незамедлительно сообщить об этом производителю.
6. Утилизация всех отходов и материалов должна осуществляться в соответствии с местными руководствами и нормативными требованиями.
7. Все реагенты специально разработаны для проведения данного теста. При проведении теста в соответствии с данной инструкцией замена реагентов не допускается.
8. При получении непредвиденных результатов окрашивания, которые не могут быть объяснены отклонениями от процедур и могут свидетельствовать о ненадлежащем качестве реагентов набора CINtec® Histology, необходимо незамедлительно сообщить об этом технической службе компании «МТМ Лабораториз».

9. Определить реагенты, качество которых ухудшилось в результате нарушений условий хранения или нестабильности, по внешним признакам невозможно. Поэтому для контроля качества одновременно с окрашиванием исследуемых препаратов необходимо использовать препараты для положительного и негативного контроля.

## **VI. Процедура**

### **Подготовка образцов**

Набор реагентов CINtec® Histology предназначен для иммуногистохимического исследования фиксированных образцов тканей. Подготовка образцов должна осуществляться с использованием стандартных методов фиксации тканей.

Для получения оптимальных результатов рекомендуется использовать положительно заряженные предметные стекла, такие как SuperFrost® Plus.

### **Залитые в парафин образцы тканей**

Данный набор реагентов может использоваться для окрашивания срезов, приготовленных из фиксированных в нейтральном забуференном формалине и залитых в парафин образцов тканей. Если при подготовке образцов используется другой метод фиксации, пользователь должен убедиться в пригодности этого метода.

Полученные при биопсии образцы тканей фиксируют в нейтральном забуференном формалине в течение 18–24 часов и нарезают на кусочки толщиной 3–4 мм. Кусочки ткани проводят через батарею спиртов и ксилол для дегидратации и заливают расплавленным парафином, температура которого не должна превышать 60°C. Из подготовленных таким образом блоков в гистопатологической лаборатории готовят срезы толщиной 4–5 мкм и монтируют их на предметные стекла SuperFrost® Plus.

### **Демаскировка антигена путем нагревания**

Для демаскировки антигена путем нагревания гистологические срезы, смонтированные на предметные стекла, необходимо погрузить в раствор для демаскировки антигена и нагреть в откалиброванной водяной бане, позволяющей обеспечить поддержание температуры раствора для демаскировки антигена на уровне 95–99°C. Лаборатории, расположенные высоко над уровнем моря, должны подобрать оптимальный метод поддержания необходимой температуры в водяной бане. Любые отклонения от описанной здесь процедуры не рекомендуются.

После демаскировки антигена путем нагревания гистологические срезы необходимо охладить до комнатной температуры в течение 20 минут, после чего необходимо сразу же приступить к процедуре окрашивания.

## **Процедура окрашивания**

### **1. Подготовка реагентов**

Все реагенты, используемые для иммуногистохимического окрашивания, должны быть нагреты до комнатной температуры (20–25°C) перед началом процедуры. Все последующие этапы процедуры окрашивания проводятся при комнатной температуре.

Необходимо следить за тем, чтобы во время процедуры иммуногистохимического окрашивания срезы не высыхали, поскольку это может привести к появлению артефактов.

Перед началом процедуры окрашивания необходимо подготовить следующие реагенты:

#### **1.1 Раствор для демаскировки антигена**

Подготовьте раствор для демаскировки антигена в количестве, достаточном для запланированной процедуры окрашивания, путем разведения необходимого объема раствора из флакона 7 (раствор для демаскировки антигена 10x) дистиллированной или деионизированной водой в соотношении 1:10.

После разведения раствор для демаскировки антигена можно хранить в течение одного месяца при температуре 2–8°C. При помутнении разведенного раствора необходимо отказаться от его использования.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Использование воды с высоким содержанием ионов для разведения раствора для демаскировки антигена может привести к существенному уменьшению интенсивности окрашивания. Поэтому необходимо убедиться в том, что используемая вода надлежащим образом деионизирована (т.е. убедиться в том, что ионообменная колонка, используемая для деионизации воды, была проверена в ходе технического обслуживания). Не используйте водопроводную воду!

#### **1.2 Промывочный буфер**

Используйте промывочный буфер (10x) с каталожным номером 8550, поставляемый компанией АО «МТМ Лабораториз» в комбинации с набором реагентов CINtec® Histology.

Подготовьте промывочный буфер в количестве, достаточном для всех этапов промывания запланированной процедуры окрашивания, путем разведения необходимого объема промывочного буфера (10x), каталожный номер 8550, дистиллированной или деионизированной водой в соотношении 1:10.

После разведения промывочный буфер можно хранить в течение одного месяца при температуре 2–8°C. При помутнении разведенного раствора необходимо отказаться от его использования.

#### **1.3 Раствор субстрата-хромогена (ДАБ)**

Для того чтобы приготовить раствор субстрата-хромогена, необходимо добавить одну каплю хромогена ДАБ к 2 мл забуференного субстрата ДАБ. Методика приготовления раствора описана ниже:

- i) Перенесите 2 мл забуференного субстрата ДАБ из флакона 5 в пробирку.

- ii) Добавьте одну каплю (25–30 мкл) хромогена ДАБ из флакона 6. Перемешайте получившийся раствор и нанесите на срезы при помощи пипетки.

Двух миллилитров раствора субстрата-хромогена (ДАБ), приготовленного в соответствии с приведенной выше инструкцией, обычно достаточно для окрашивания пяти гистологических срезов, включая пять соответствующих контрольных срезов.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Приготовленный раствор субстрата-хромогена (ДАБ) необходимо использовать в течение дня.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Добавление избыточного количества хромогена ДАБ к забуференному субстрату ДАБ приводит к ухудшению результатов окрашивания.

## 1.4 Реагент для дополнительного окрашивания

При использовании ДАБ для визуализации результатов иммуногистохимической реакции образуется видимый конечный продукт, нерастворимый в воде. Для дополнительного окрашивания можно использовать спиртовой или водный раствор гематоксилина. При проведении дополнительного окрашивания следуйте инструкции по применению гематоксилина, предоставляемой поставщиком.

## 1.5 Среда для заключения

Для заключения срезов после окрашивания рекомендуется использовать безводную среду для заключения, позволяющую хранить окрашенные препараты в течение длительного времени, например, среду для заключения срезов Eukitt. Также допускается использование водных сред для заключения препаратов, например Aquatex («Мерк»).

## 2. Процедура окрашивания на автоматических иммуногистостейнерах

Набор реагентов CINtec® Histology был адаптирован для использования на автоматических иммуногистостейнерах (например, Lab Vision Autostainer 480 или Dako Autostainer Plus) в соответствии с протоколом, приведенным ниже. Перед проведением процедуры окрашивания на автоматическом иммуногистостейнере необходимо подготовить гистологические препараты и реагенты, как описано в разделах 1.1–1.5 и 2.1.

### 2.1 Депарафинизация и регидратация

Перед депарафинизацией поместите стекла в термостат при температуре не более 60°C минимум на 20 минут, максимум на один час, для того чтобы уменьшить количество воды в срезах, тем самым улучшив их сцепление со стеклами, и расплавить парафин. После этого необходимо выполнить депарафинизацию и регидратацию срезов, которые должны предшествовать процедуре окрашивания. Полное удаление парафина играет ключевую роль, поскольку его остатки могут привести к усиленному неспецифическому окрашиванию. Инкубируйте стекла при комнатной температуре (20–25°C) в соответствии со следующими этапами:

- 5 (±1) минут в кювете с ксилолом;
- повторите этот этап еще раз в кювете со свежим ксилолом;
- удалите избыток жидкости;
- 3 (±1) минуты в кювете с 95% этанолом;

- повторите этот этап еще раз в кювете со свежим этанолом;
- удалите избыток жидкости;
- 3 ( $\pm$ 1) минуты в кювете с 70% этанолом;
- повторите этот этап еще раз в кювете со свежим этанолом;
- удалите избыток жидкости;
- минимум 30 секунд в кювете с дистиллированной или деионизированной водой.

Приступайте к процедуре окрашивания, как описано в разделе 2.2, Этап 1: Демаскировка антигена.

Ксилол и растворы этанола следует использовать не более чем для 40 стекол.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Пользователи должны помнить о том, что отклонения от рекомендованной температуры и продолжительности воздействия во время преаналитической подготовки образцов с использованием соответствующего оборудования могут привести к неполному удалению парафина из срезов. Оставшийся парафин может стать причиной неполного окрашивания при использовании любого гистологического красителя, включая реагенты из набора CIntec<sup>®</sup> Histology. В гистопатологических лабораториях необходимо регулярно контролировать состояние оборудования, чтобы уменьшить вероятность отклонений при подготовке образцов перед окрашиванием. Наличие резко очерченных границ в пределах окрашенных участков среза или противоречивые результаты окрашивания в пределах среза могут свидетельствовать о неадекватной или неполной преаналитической подготовке образца при использовании любого протокола иммуногистохимической реакции. При выявлении противоречивых результатов окрашивания необходимо проверить состояние оборудования и методы, используемые для преаналитической подготовки образцов.

## 2.2 Протокол окрашивания на автоматических иммуногистостейнерах

### Этап 1: Демаскировка антигена

- Наполните лабораторные стаканчики, например, пластиковые стаканчики Coplin, разведенным раствором для демаскировки антигена (см. «Процедура окрашивания», раздел 1.1).
- Поместите стаканчики с раствором для демаскировки антигена в водяную баню и нагрейте водяную баню и раствор для демаскировки антигена до температуры 95–99°C. Обратите внимание на то, что уровень воды в водяной бане необходимо отрегулировать таким образом, чтобы стаканчики были погружены в воду на 80% (по высоте). Чтобы стабилизировать температуру и избежать испарения раствора, закройте стаканчики крышками.
- Поместите стекла с депарафинизированными срезами в стаканчики с предварительно нагретым раствором для демаскировки антигена; при этом температура раствора в стаканчиках обычно понижается до менее чем 90°C.

- Доведите температуру воды в водяной бане и раствора для демаскировки антигена в стаканчиках до 95–99°C; проверьте температуру раствора для демаскировки антигена в стаканчиках.
- Инкубируйте срезы в растворе для демаскировки антигена в течение 10 ( $\pm 1$ ) минут при температуре 95–99°C; отсчет времени начинайте только после того, как температура раствора для демаскировки антигена в стаканчиках достигнет 95–99°C.
- Извлеките стаканчики со стеклами из водяной бани.
- Оставьте стаканчики с раствором для демаскировки антигена и погруженными в него стеклами на 20 ( $\pm 1$ ) минут, чтобы они могли охладиться до комнатной температуры.
- Слейте раствор для демаскировки антигена и промойте стекла в промывочном буфере (см. «Процедура окрашивания», раздел 1.2).
- Для получения оптимальных результатов после демаскировки антигена погрузите стекла в промывочный буфер на 5 минут перед окрашиванием.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Раствор для демаскировки антигена предназначен для однократного использования, не используйте его повторно.

## **Этап 2: Программирование прибора**

Перед первым применением набора реагентов CINtec® Histology для окрашивания на автоматическом иммуногистостейнере необходимо соответствующим образом перепрограммировать прибор. Следуйте инструкциям по применению используемого автоматического иммуногистостейнера.

## **Этап 3: Процедура окрашивания на автоматическом иммуногистостейнере**

- Перенесите реагенты из флаконов в градуированные контейнеры для реагентов автоматического иммуногистостейнера. Используйте предложенную прибором форму, чтобы запрограммировать объемы реагентов и продолжительность инкубации (см. пункт 4, в котором указаны соответствующие значения).
- Поместите контейнеры с реагентами в держатель для реагентов автоматического иммуногистостейнера в соответствии с предложенной компьютером схемой расположения реагентов.
- Загрузите стекла в автоматический иммуногистостейнер в соответствии с предложенной компьютером схемой расположения стекол.
- Чтобы предотвратить высыхание срезов, покройте их промывочным буфером после загрузки стекол в автоматический иммуногистостейнер.
- Запрограммируйте следующие параметры процедуры окрашивания:
  - промывание\*
  - 200 мкл реагента, блокирующего пероксидазу – 5 минут

- промывание\*
- 200 мкл первичных антител к p16<sup>INK4a</sup> или реагента для негативного контроля – 30 минут
- промывание\*
- 200 мкл реагента для визуализации – 30 минут
- промывание\*
- промывание\*
- промывание\*
- переключение
- 200 мкл раствора субстрата-хромогена (ДАБ) – 10 минут
- промывание\*
- промывание деионизированной водой после этапа инкубации с раствором субстрата-хромогена

\*Для соответствующих этапов промывания используйте промывочный буфер.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Если в автоматическом иммуногистостейнере для промывания стекол используется только промывочный буфер, после извлечения стекол из иммуногистостейнера их необходимо промыть в деионизированной воде.

#### Этап 4. Дополнительное окрашивание (инструкции для гематоксилина)

- Погрузите стекла в кювету с гематоксилином. Инкубируйте в течение 2–5 минут в зависимости от концентрации используемого раствора гематоксилина.
- Поместите стекла в кювету с водопроводной водой и аккуратно промойте под струей водопроводной воды. Убедитесь в полном вымывании гематоксилина.
- Быстро промойте стекла в кювете с дистиллированной или деионизированной водой.
- Дополнительное окрашивание может осуществляться непосредственно на автоматическом иммуногистостейнере.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** В зависимости от продолжительности инкубации и концентрации используемого раствора гематоксилина в результате дополнительного окрашивания ядра клеток приобретают синий цвет, от бледно-голубого до темно-синего. Чрезмерное или неполное дополнительное окрашивание может помешать правильной интерпретации результатов теста.

#### Этап 5. Заключение срезов

Для заключения срезов после окрашивания рекомендуется использовать безводную среду для заключения, позволяющую хранить окрашенные препараты в течение длительного времени. Также допускается использование водной среды для заключения препаратов.

Следуйте инструкции по применению среды для заключения препаратов, предоставляемой поставщиком.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Чтобы предотвратить выцветание, храните стекла в защищенном от света месте при комнатной температуре (20–25°C).

### 3. Процедура окрашивания, выполняемая вручную

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Не допускайте высыхания срезов во время процедуры окрашивания, поскольку это может привести к усиленному неспецифическому окрашиванию. Для этапов с длительной инкубацией лучше воспользоваться влажной камерой.

При использовании набора реагентов CINtec® Histology для иммуногистохимического окрашивания, выполняемого вручную, следуйте стандартным процедурам.

#### 3.1 Депарафинизация и регидратация

Перед депарафинизацией поместите стекла в термостат при температуре не более 60°C минимум на 20 минут, максимум на один час, для того чтобы уменьшить количество воды в срезах, тем самым улучшив их сцепление со стеклами, и расплавить парафин. После этого необходимо выполнить депарафинизацию и регидратацию срезов, которые должны предшествовать процедуре окрашивания. Полное удаление парафина играет ключевую роль, поскольку его остатки могут привести к усиленному неспецифическому окрашиванию. Инкубируйте стекла при комнатной температуре (20–25°C) в соответствии со следующими этапами:

- 5 (±1) минут в кювете с ксилолом;
- повторите этот этап еще раз в кювете со свежим ксилолом;
- удалите избыток жидкости;
- 3 (±1) минуты в кювете с 95% этанолом;
- повторите этот этап еще раз в кювете со свежим этанолом;
- удалите избыток жидкости;
- 3 (±1) минуты в кювете с 70% этанолом;
- повторите этот этап еще раз в кювете со свежим этанолом;
- удалите избыток жидкости;
- минимум 30 секунд в кювете с дистиллированной или деионизированной водой.

Приступайте к процедуре окрашивания, как описано в разделе 3.2, Этап 1: Демаскировка антигена.

Ксилол и растворы этанола следует использовать не более чем для 40 стекол.

### 3.2 Протокол окрашивания для процедуры, выполняемой вручную

#### Этап 1: Демаскировка антигена

- Наполните лабораторные стаканчики, например, пластиковые стаканчики Coplin, разведенным раствором для демаскировки антигена (см. «Процедура окрашивания», раздел 1.1).
- Поместите стаканчики с раствором для демаскировки антигена в водяную баню и нагрейте водяную баню и раствор для демаскировки антигена до температуры 95–99°C. Обратите внимание на то, что уровень воды в водяной бане необходимо отрегулировать таким образом, чтобы стаканчики были погружены в воду на 80% (по высоте). Чтобы стабилизировать температуру и избежать испарения раствора, закройте стаканчики крышками.
- Поместите стекла с депарафинизированными срезами в стаканчики с предварительно нагретым раствором для демаскировки антигена; при этом температура раствора в стаканчиках обычно понижается до менее чем 90°C.
- Доведите температуру воды в водяной бане и раствора для демаскировки антигена в стаканчиках до 95–99°C; проверьте температуру раствора для демаскировки антигена в стаканчиках.
- Инкубируйте срезы в растворе для демаскировки антигена в течение 10 ( $\pm 1$ ) минут при температуре 95–99°C; отсчет времени начинайте только после того, как температура раствора для демаскировки антигена в стаканчиках достигнет 95–99°C.
- Извлеките стаканчики со стеклами из водяной бани.
- Оставьте стаканчики с раствором для демаскировки антигена и погруженными в него стеклами на 20 ( $\pm 1$ ) минут, чтобы они могли охладиться до комнатной температуры.
- Слейте раствор для демаскировки антигена и промойте стекла в промывочном буфере (см. «Процедура окрашивания», раздел 1.2).
- Для получения оптимальных результатов после демаскировки антигена погрузите стекла в промывочный буфер на 5 ( $\pm 1$ ) минут перед окрашиванием.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Раствор для демаскировки антигена предназначен для однократного использования, не используйте его повторно.

#### Этап 2: Реагент, блокирующий пероксидазу

- Нанесите 200 мкл реагента, блокирующего пероксидазу, таким образом, чтобы он полностью покрывал срез.
- Инкубируйте в течение 5 ( $\pm 1$ ) минут.
- Стряхните избыточное количество реагента и поместите стекла в кювету со свежим промывочным буфером на 5 ( $\pm 1$ ) минут.

### Этап 3: Первичные антитела или реагент для негативного контроля

- Удалите избыточное количество буфера.
- Нанесите 200 мкл раствора первичных антител (мышинные антитела к человеческому белку p16<sup>INK4a</sup> или реагент для негативного контроля) таким образом, чтобы он полностью покрывал срез.
- Инкубируйте в течение 30 ( $\pm$  1) минут.
- Стряхните избыточное количество раствора и поместите стекла в кювету со свежим промывочным буфером на 5 ( $\pm$  1) минут.

### Этап 4: Реагент для визуализации

- Удалите избыточное количество буфера.
- Нанесите 200 мкл реагента для визуализации таким образом, чтобы он полностью покрывал срез.
- Инкубируйте в течение 30 ( $\pm$  1) минут.
- Стряхните избыточное количество реагента и поместите стекла в кювету со свежим промывочным буфером на 5 ( $\pm$  1) минут.
- Повторите этот этап дважды в кюветах со свежим промывочным буфером.

### Этап 5: Раствор субстрата-хромогена (ДАБ)

- Нанесите 200 мкл раствора субстрата-хромогена (ДАБ), который был приготовлен в соответствии с процедурой, описанной выше в разделе 1.3, таким образом, чтобы он полностью покрывал срез.
- Инкубируйте в течение 10 ( $\pm$  1) минут.
- Стряхните избыточное количество раствора и аккуратно промойте стекла дистиллированной или деионизированной водой.

Соберите материалы, использовавшиеся при работе с раствором субстрата-хромогена (ДАБ), в контейнер для опасных материалов и утилизируйте их надлежащим образом.

### Этап 6: Дополнительное окрашивание (инструкции для гематоксилина)

- Погрузите стекла в кювету с гематоксилином. Инкубируйте в течение 2–5 минут в зависимости от концентрации используемого раствора гематоксилина.
- Поместите стекла в кювету с водопроводной водой и аккуратно промойте под струей водопроводной воды. Убедитесь в полном вымывании гематоксилина.
- Быстро промойте стекла в кювете с дистиллированной или деионизированной водой.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** В зависимости от продолжительности инкубации и концентрации используемого раствора гематоксилина в результате дополнительного окрашивания ядра клеток приобретают синий цвет, от бледно-голубого до темно-синего. Чрезмерное или

неполное дополнительное окрашивание может помешать правильной интерпретации результатов теста.

### **Этап 7. Заключение срезов**

Для заключения срезов после окрашивания рекомендуется использовать безводную среду для заключения, позволяющую хранить окрашенные препараты в течение длительного времени. При использовании безводной среды на основе ксилола необходимо выполнить дегидратацию срезов, например, по следующей методике:

- Дистиллированная или деионизированная вода
- 3 минуты в 70% этаноле
- 3 минуты в 70% этаноле
- 3 минуты в 96% этаноле
- 3 минуты в 99% этаноле
- 5 минут в ксилоле
- 5 минут в ксилоле

Также допускается использование водной среды для заключения препаратов. Следуйте инструкции по применению среды для заключения препаратов, предоставляемой поставщиком.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Чтобы предотвратить выцветание, храните стекла в защищенном от света месте при комнатной температуре (20–25°C).

## **VII. Контроль качества**

Отклонения от рекомендованных процедур фиксации тканей и подготовки образцов в лаборатории пользователя могут привести к значительной вариабельности результатов, поэтому необходимо регулярно осуществлять контроль качества внутри лаборатории.

### **Гистологические препараты для положительного контроля**

В качестве материалов для внешнего положительного контроля следует использовать свежие образцы тканей, полученные при аутопсии, биопсии или во время хирургической операции, которые незамедлительно были фиксированы, обработаны и залиты в парафин по той же методике, что и образцы, полученные у пациентов. Гистологические препараты для положительного контроля необходимы, для того чтобы удостовериться в отсутствии нарушений в процессе подготовки тканей, приготовлении и окрашивании срезов. Для каждого из вариантов протокола следует использовать один гистологический препарат для внешнего положительного контроля при каждой процедуре окрашивания. Препараты, используемые в качестве материалов для внешнего положительного контроля, необходимо готовить из клинических образцов, для которых получены положительные результаты окрашивания на p16<sup>INK4a</sup>. Если на препаратах для положительного контроля не удалось получить положительных результатов окрашивания, результаты анализа исследуемых препаратов следует расценивать как ошибочные.

## Гистологические препараты для негативного контроля

Клетки, которые присутствуют в большинстве срезов и не экспрессируют p16<sup>INK4a</sup>, могут использоваться в качестве внутреннего негативного контроля для верификации результатов иммуногистохимической реакции. Если специфическое окрашивание обнаруживается на участках среза, используемых в качестве негативного контроля (ложноположительный результат), результаты анализа исследуемых препаратов следует расценивать как ошибочные.

## Неспецифический реагент для негативного контроля

Из каждого исследуемого образца готовят дополнительные срезы, при окраске которых вместо первичных антител используется неспецифический реагент для негативного контроля, что позволяет оценить неспецифическое окрашивание и облегчить интерпретацию результатов специфического окрашивания на участках связывания с антигеном.

Если при использовании неспецифического реагента для негативного контроля наблюдается специфическое окрашивание (ложноположительный результат), результаты анализа исследуемых препаратов следует расценивать как ошибочные.

## VIII. Интерпретация результатов

В контрольных препаратах, при окраске которых вместо первичных антител использовался реагент для негативного контроля, специфическое окрашивание должно отсутствовать.

Положительные результаты окрашивания, полученные при использовании моноклональных мышиных антител к человеческому белку p16<sup>INK4a</sup>, клон E6H4<sup>®</sup>, необходимо анализировать с учетом неспецифического фонового окрашивания, полученного при использовании реагента для негативного контроля. Как при любом иммуногистохимическом исследовании, отрицательный результат означает, что антиген не определяется используемым методом, но может присутствовать в анализируемых клетках/тканях.

При интерпретации результатов необходимо учитывать, что p16<sup>INK4a</sup> представляет собой клеточный белок, который может экспрессироваться в определяемом количестве при дисплазии высокой степени и раке шейки матки, а также при некоторых состояниях, не связанных с дисплазией шейки матки, хотя характер экспрессии и экспрессируемое количество могут варьироваться.

Результаты окрашивания оцениваются с использованием двоичной системы, включающей «положительный результат» и «отрицательный результат».

Непрерывное окрашивание клеток базального и парабазального слоев многослойного плоского эпителия шейки матки, которое может сопровождаться или не сопровождаться окрашиванием клеток поверхностного слоя, расценивается как положительный результат теста на p16<sup>INK4a</sup> (диффузное окрашивание). Фрагмент среза, результаты окрашивания которого расценены как положительные (диффузное окрашивание), приведен на рисунке 1, приложение 2.

Отсутствие признаков иммуногистохимической реакции в многослойном плоском эпителии (отрицательная реакция) или окрашивание отдельных клеток или небольших групп клеток, т.е. прерывистое окрашивание, особенно клеток, расположенных за пределами базального и парабазального слоев (очаговое окрашивание), расцениваются как отрицательный результат теста на p16<sup>INK4a</sup>. Фрагмент среза, результаты окрашивания которого расценены как отрицательные (очаговое окрашивание), приведен на рисунке 2, приложение 2.

Анализ срезов, окрашенных на p16<sup>INK4a</sup> с использованием набора реагентов CINtec® Histology, должен осуществляться одновременно с анализом срезов, приготовленных из того же образца тканей шейки матки и окрашенных гематоксилином и эозином. Дополнительная информация, полученная при анализе окрашенных CINtec® срезов, в сочетании с предварительным морфологическим диагнозом, установленным при анализе срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, позволит установить окончательный диагноз.

## IX. Ограничения

- Только для профессионального использования. Для проведения иммуногистохимических исследований требуется специальная подготовка.
- Клиническая интерпретация как положительных, так и отрицательных результатов окрашивания должна осуществляться с учетом клинической симптоматики, морфологической структуры и других гистопатологических критериев. При клинической интерпретации положительных или отрицательных результатов окрашивания также необходимо учитывать результаты морфологических исследований, выполненных с использованием соответствующих препаратов для положительного и отрицательного внутреннего и внешнего контроля, а также результаты других диагностических тестов. За анализ всех этапов подготовки и проведения процедуры, а также за окончательное заключение по результатам иммуногистохимического исследования должен отвечать квалифицированный патоморфолог, имеющий опыт работы с антителами и реагентами и владеющий необходимыми методиками.
- Результаты иммуногистохимических реакций в значительной степени зависят от качества окрашиваемых срезов. Поэтому этапы фиксации, промывания, высушивания, нагревания и приготовления срезов или контаминация другими тканями оказывают большое влияние на результат окрашивания, а отклонения от рекомендованных методик на любом из этих этапов могут привести к появлению артефактов, неспецифическому связыванию антител или ложноотрицательному результату. Противоречивые результаты могут быть обусловлены отклонениями от методов фиксации и заливки в парафин или неоднородностью ткани.
- Чрезмерное или неполное дополнительное окрашивание может помешать правильной интерпретации результатов теста.
- Производитель поставляет данные антитела/реагенты в разведениях, оптимальных для применения в соответствии с приведенными здесь инструкциями при проведении иммуногистохимического исследования фиксированных гистологических препаратов. Любые отклонения от рекомендуемых процедур

могут привести к тому, что полученные результаты будут отличаться от ожидаемых или окажутся ошибочными, поэтому необходимо дополнить тест соответствующими контрольными реакциями, которые должны быть отражены в протоколе исследования. Пользователи, допускающие отклонения от рекомендуемых процедур, должны взять на себя ответственность за интерпретацию результатов теста в таких обстоятельствах.

- Ложноположительные результаты могут быть обусловлены неспецифическим связыванием белков или продуктов реакции с субстратом, а также псевдопероксидазной активностью (эритроциты) и активностью эндогенной пероксидазы (цитохром С).
- При применении реагентов для исследования ранее не изученных тканей могут быть получены непредвиденные результаты. Вероятность получения непредвиденных результатов даже при исследовании изученных тканей полностью исключить нельзя в связи с биологической вариабельностью экспрессии антигена в новообразованиях или других тканях с измененной структурой. При получении непредвиденных результатов необходимо связаться с АО «МТМ Лабораториз» по телефону 00800 168 652 27.
- Не рекомендуется заменять реагенты, входящие в состав данного набора, на реагенты с другими номерами серий.

## **Х. Рабочие характеристики**

### Клиническое применение

Клиническое применение набора реагентов CINtec® Histology было изучено в ходе контролируемого клинического исследования, проведенного с использованием фиксированных в формалине и залитых в парафин образцов тканей шейки матки [21]. Исследование было направлено на подтверждение того, что применение набора реагентов CINtec® Histology позволяет унифицировать интерпретацию результатов исследования и увеличить точность диагностики цервикальной интраэпителиальной неоплазии высокой степени (ЦИН2+).

В ходе этого клинического исследования использовались отобранные ретроспективно образцы тканей, которые были получены при пункционной биопсии или конизации шейки матки. Из 500 образцов тканей шейки матки, отобранных в двух независимых европейских патоморфологических лабораториях, при первоначальном исследовании которых была выявлена дисплазия высокой степени, были приготовлены серийные срезы, которые были окрашены гематоксилином и эозином и реагентами из набора CINtec® Histology в соответствии с инструкциями производителя.

Каждый препарат, окрашенный гематоксилином и эозином, анализировали три европейских эксперта-патоморфолога, специализирующихся в онкогинекологии, которые давали независимое заключение по препарату. При расхождении диагнозов препараты анализировались повторно одновременно тремя экспертами, и заключение, сделанное большинством экспертов (согласованный диагноз, установленный двумя из трех экспертов), использовали в ходе исследования в качестве золотого стандарта (диагноз сравнения).

В группу участвовавших в исследовании патоморфологов были включены 12 исследователей (сертифицированные патоморфологи, регулярно анализирующие гистологические препараты, приготовленные из биоптатов шейки матки) из 4 европейских стран (Франции, Италии, Испании и Германии). На первом этапе анализа препаратов все патоморфологи давали независимое заключение по каждому случаю на основании анализа препаратов, окрашенных только гематоксилином и эозином. На протяжении всего исследования патоморфологи не знали о первоначальном диагнозе и диагнозе, который был установлен экспертами и использовался в качестве золотого стандарта. После перерыва продолжительностью более 4 недель, тот же комплект окрашенных гематоксилином и эозином препаратов (с измененной маркировкой) анализировался повторно всеми двенадцатью патоморфологами одновременно с серийными срезами, приготовленными из тех же самых образцов и окрашенными реагентами из набора CINtec® Histology.

Для оценки увеличения точности диагностики при одновременном анализе серийных срезов, окрашенных CINtec® и гематоксилином и эозином, по сравнению с анализом срезов, окрашенных только гематоксилином и эозином, заключения, данные каждым из патоморфологов в том и другом случае, сопоставляли с согласованным диагнозом, установленным тремя экспертами.

### Результаты

В выборку для анализа данных было включено 482 образца, для которых были получены парные заключения у всех патоморфологов, участвовавших в исследовании, в том числе 194 образца с отсутствием признаков дисплазии, 96 образцов с ЦИН1, 69 образцов с ЦИН2 и 123 образца с ЦИН3, исходя из согласованных диагнозов, установленных тремя экспертами.

### Точность диагностики ЦИН2+

Общая чувствительность метода диагностики ЦИН2+ увеличилась с 1787 (гематоксин и эозин) до 2018 (гематоксин и эозин в сочетании с CINtec®) заключений с истинно положительными результатами (ЦИН2+), при этом общая специфичность метода слегка уменьшилась с 3088 (гематоксин и эозин) до 3051 (гематоксин и эозин в сочетании с CINtec®) заключений с истинно отрицательными результатами ( $\leq$ ЦИН1).

*Таблица 1.* Увеличение точности диагностики ЦИН высокой степени при одновременном анализе серийных срезов, окрашенных гематоксилином и эозином и CINtec®, по сравнению с анализом срезов, окрашенных только гематоксилином и эозином; количество заключений с истинно положительными, истинно отрицательными, ложноотрицательными и ложноположительными результатами по сравнению с согласованными диагнозами, установленными экспертами (примечание: общее количество заключений патоморфологов, совпавших с согласованными диагнозами экспертов, составило 2304 заключения (192 образца с ЦИН2+ x 12 патоморфологов) с истинно положительными результатами)

|                                                                    | Истинно<br>положительные<br>результаты | Ложно-<br>отрицательные<br>результаты | Ложно-<br>положительные<br>результаты | Истинно<br>отрицательные<br>результаты |
|--------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|
| Гематоксин и эозин,<br>общее количество<br>заключений              | 1787                                   | 517                                   | 392                                   | 3088                                   |
| Гематоксин и эозин<br>+ CINtec®, общее<br>количество<br>заключений | 2018                                   | 286                                   | 429                                   | 3051                                   |

Для оценки влияния теста CINtec® Histology на точность диагностики использовали модель смешанных эффектов ANOVA для анализа псевдозначений методом «складного ножа», известного как метод Dorfman-Berbaum-Metz (DBM).

Нулевая гипотеза о том, что точность диагностики ЦИН2+ при анализе срезов, окрашенных только гематоксилином и эозином, сопоставима с точностью диагностики ЦИН2+ при анализе срезов, окрашенных гематоксилином и эозином и CINtec®, была отвергнута при  $p = 0,0004$  (AUC для гематоксилина и эозина = 0,877; AUC для гематоксилина и эозина в сочетании с CINtec® = 0,925).

Таблица 2. Увеличение чувствительности метода диагностики ЦИН высокой степени при одновременном анализе серийных срезов, окрашенных гематоксилином и эозином и CINtec®, по сравнению с анализом срезов, окрашенных только гематоксилином и эозином; согласованные диагнозы, установленные тремя экспертами при анализе срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, использовались в качестве золотого стандарта

| Диагноз     | Чувствительность метода диагностики при анализе срезов, окрашенных гематоксилином и эозином | Чувствительность метода диагностики при анализе срезов, окрашенных гематоксилином и эозином и CINtec® | Увеличение чувствительности |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| ЦИН2+       | 77%                                                                                         | 87%                                                                                                   | 13%                         |
| Только ЦИН2 | 62%                                                                                         | 75%                                                                                                   | 21%                         |
| Только ЦИН3 | 86%                                                                                         | 95%                                                                                                   | 11%                         |

При использовании согласованных диагнозов, установленных тремя экспертами, в качестве диагнозов сравнения было показано, что чувствительность метода диагностики ЦИН2+ увеличилась на 13% (чувствительность метода диагностики при анализе срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, составила 77% и увеличилась до 87% при анализе срезов, окрашенных гематоксилином и эозином и CINtec®).

Увеличение точности диагностики ЦИН2+ оказалось статистически достоверным как при анализе образцов, полученных при пункционной биопсии шейки матки ( $n = 249$ ; AUC для гематоксилина и эозина = 0,895; AUC для гематоксилина и эозина в сочетании с CINtec® = 0,929;  $p = 0,0053$ ), так и при анализе образцов, полученных при конизации шейки матки ( $n = 233$ ; AUC для гематоксилина и эозина = 0,887; AUC для гематоксилина и эозина в сочетании с CINtec® = 0,948;  $p = 0,0009$ ).

#### Частота совпадений диагнозов ЦИН2+, установленных разными патоморфологами

Для оценки увеличения частоты совпадения диагнозов ЦИН2+, установленных участвовавшими в исследовании патоморфологами, использовали форму множественной оценки для меры согласия каппа между диагнозами, установленными при анализе срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, и диагнозами, установленными при анализе срезов, окрашенных гематоксилином и эозином и CINtec®.

Таблица 3. Увеличение частоты совпадения диагнозов ЦИН2+, установленных разными патоморфологами при анализе срезов, окрашенных гематоксилином и эозином и CINtec®, и срезов, окрашенных только гематоксилином и эозином; значения каппа указаны как меры согласия с поправкой на случайность

| Диагноз                                                               | Значение каппа для анализа срезов, окрашенных гематоксилином и эозином | Значение каппа для анализа срезов, окрашенных гематоксилином и эозином и CINtec® | Статистическая достоверность |
|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| ЦИН2+, все образцы                                                    | 0,580                                                                  | 0,756                                                                            | $p < 0,0001$                 |
| ЦИН2+, только образцы, полученные при пункционной биопсии шейки матки | 0,598                                                                  | 0,748                                                                            | $p < 0,0001$                 |
| ЦИН2+, только образцы, полученные при конизации шейки матки           | 0,548                                                                  | 0,765                                                                            | $p < 0,0001$                 |

Значение каппа как мера согласия с поправкой на случайность между установленными разными патоморфологами диагнозами ЦИН2+ достоверно увеличилось при анализе срезов, окрашенных гематоксилином и эозином и CINtec®, по сравнению с анализом срезов, окрашенных только гематоксилином и эозином (значение каппа для всех образцов увеличилось с 0,580 до 0,756;  $p < 0,0001$ ).

#### Воспроизводимость результатов анализа срезов, окрашенных на p16<sup>INK4a</sup>

Была проанализирована достоверность оценки результатов окрашивания на p16<sup>INK4a</sup> срезов, приготовленных из биоптатов шейки матки, как диффузное окрашивание, очаговое окрашивание или отсутствие признаков иммуногистохимической реакции.

При сопоставлении заключений, сделанных разными патоморфологами, наблюдался высокий уровень воспроизводимости результатов оценки окрашивания на p16<sup>INK4a</sup> как положительные (диффузное окрашивание) или отрицательные (очаговое окрашивание или отсутствие признаков иммуногистохимической реакции). Значение каппа (мера согласия с поправкой на случайность) для воспроизводимости результатов оценки окрашивания на p16<sup>INK4a</sup> как положительные (диффузное окрашивание) или отрицательные (очаговое окрашивание или отсутствие признаков иммуногистохимической реакции) свидетельствует об очень высокой воспроизводимости результатов оценки, выполненной 12 патоморфологами (среднее значение каппа = 0,899; медиана = 0,903).

#### Воспроизводимость результатов

##### Воспроизводимость результатов, полученных при анализе разных образцов

Для оценки воспроизводимости результатов, полученных при анализе разных образцов, набор реагентов CINtec® Histology использовали для окрашивания 36 срезов, приготовленных из образцов тканей шейки матки с подтвержденной ЦИН2+, окрашивание выполнялось вручную. Интенсивность окрашивания участков дисплазии на всех срезах оказалась сопоставимой ( $\pm 0,5$ ). На участках с нормальной морфологической структурой специфическое окрашивание отсутствовало на всех срезах.

### Воспроизводимость результатов, полученных при анализе одних и тех же образцов

Для оценки воспроизводимости результатов, полученных при анализе одних и тех же образцов, набор реагентов CINtec® Histology использовали для окрашивания, которое выполнялось вручную или на автоматическом иммуногистостейнере трижды в разные дни. Для анализа использовали три образца тканей шейки матки с подтвержденной ЦИН2+. Из каждого образца готовили по три последовательных среза, которые использовали для окрашивания в разные дни. Интенсивность окрашивания участков дисплазии на срезах, приготовленных из одного образца, оказалась сопоставимой ( $\pm 0,5$ ) во все дни, а также при окрашивании вручную и на автоматическом иммуногистостейнере. На участках с нормальной морфологической структурой специфическое окрашивание отсутствовало на всех срезах.

### Воспроизводимость результатов, полученных при использовании реагентов разных серий

Для оценки воспроизводимости результатов, полученных при использовании наборов реагентов CINtec® Histology из трех разных серий, было выполнено окрашивание срезов, приготовленных из образцов тканей шейки матки с подтвержденной ЦИН2+. Окрашивание выполнялось вручную и на автоматическом иммуногистостейнере в соответствии с протоколом, приведенным в инструкции по применению. Интенсивность окрашивания участков дисплазии на срезах, приготовленных из одного образца, оказалась сопоставимой ( $\pm 0,5$ ) при использовании реагентов из всех трех серий, а также при окрашивании вручную и на автоматическом иммуногистостейнере. На участках с нормальной морфологической структурой специфическое окрашивание отсутствовало на всех срезах.

## XI. Устранение недостатков

| Проблема                                | Возможная причина                                                                                                        | Рекомендуемые действия                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1. Отсутствие окрашивания срезов</b> | <b>1a.</b> Отклонение от инструкции по применению                                                                        | <b>1a.</b> Внимательно прочитайте инструкцию по применению и выполняйте все приведенные в ней рекомендации.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>2. Слабое окрашивание срезов</b>     | <b>2a.</b> Недостаточная демаскировка антигена                                                                           | <b>2a.</b> Используйте свежеприготовленный раствор для демаскировки антигена и/или убедитесь в том, что температура раствора для демаскировки антигена поддерживалась в диапазоне 95–99°C в течение 10 минут, а также в том, что после этого раствор был оставлен на 20 минут для остывания до комнатной температуры.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|                                         | <b>2b.</b> Недостаточная продолжительность инкубации с реагентами                                                        | <b>2b.</b> Проверьте выполнение рекомендаций, приведенных в разделах 2.2/3.2 протокола окрашивания.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|                                         | <b>2c.</b> Неподходящий метод фиксации                                                                                   | <b>2c.</b> Убедитесь в том, что исследуемый образец не передержали в фиксаторе, и что не использовали никаких альтернативных фиксаторов.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|                                         | <b>2d.</b> Слишком высокая концентрация ионов в воде, использовавшейся для разведения раствора для демаскировки антигена | <b>2d.</b> Убедитесь в том, что ионообменная колонка, используемая для деионизации воды, была проверена в ходе технического обслуживания.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                                         | <b>2e.</b> Недостаточная депарафинизация                                                                                 | <b>2e.</b> Пользователи должны помнить о том, что отклонения от рекомендованной температуры и продолжительности воздействия во время преаналитической подготовки образцов с использованием соответствующего оборудования могут привести к неполному удалению парафина из срезов. Оставшийся парафин может стать причиной неполного окрашивания при использовании любого гистологического красителя, включая реагенты из набора CIntec® Histology. В гистопатологических лабораториях необходимо регулярно контролировать состояние оборудования, чтобы уменьшить вероятность отклонений при подготовке образцов перед окрашиванием. Наличие резко очерченных границ в пределах окрашенных участков среза или противоречивые результаты окрашивания в пределах среза могут свидетельствовать о неадекватной или неполной преаналитической подготовке образца при использовании любого протокола иммуногистохимической реакции. При выявлении противоречивых результатов окрашивания необходимо проверить состояние оборудования и методы, используемые для преаналитической подготовки образцов. |

|                                                        |                                                                                  |                                                                                                                                                                                         |
|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>3. Интенсивное фоновое окрашивание срезов</b>       | <b>3a.</b> Неполное удаление парафина                                            | <b>3a.</b> Используйте свежий ксилол и следуйте процедуре, описанной в разделах 2.1/3.1.                                                                                                |
|                                                        | <b>3b.</b> Срезы монтировали на стекла с адгезивным покрытием на основе крахмала | <b>3b.</b> Адгезивы на основе крахмала, используемые для монтирования срезов, могут обладать иммунореактивностью, поэтому от их использования лучше отказаться.                         |
|                                                        | <b>3c.</b> Недостаточное промывание срезов                                       | <b>3c.</b> Используйте свежий промывочный буфер, как в кюветах, так и во флаконах для промывания.                                                                                       |
|                                                        | <b>3d.</b> Высыхание срезов во время процедуры окрашивания                       | <b>3d.</b> Пользуйтесь влажной камерой. Протирайте не более трех или четырех стекол за один раз перед нанесением реагента.                                                              |
|                                                        | <b>3e.</b> неподходящий метод фиксации                                           | <b>3e.</b> Используйте только фиксаторы, рекомендованные в данной инструкции. Отклонение от рекомендованного метода фиксации может привести к интенсивному фоновому окрашиванию срезов. |
|                                                        | <b>3f.</b> Неспецифическое связывание реагентов с тканями                        | <b>3f.</b> Проверьте использовавшийся метод фиксации и убедитесь в отсутствии некроза.                                                                                                  |
| <b>4. Срезы не держатся на стеклах</b>                 | <b>4a.</b> Используются неподходящие стекла                                      | <b>4a.</b> Используйте рекомендованные в данной инструкции стекла SuperFrostPlus®.                                                                                                      |
| <b>5. Крайне интенсивное специфическое окрашивание</b> | <b>5a.</b> неподходящий метод фиксации                                           | <b>5a.</b> Используйте рекомендованный фиксатор и метод фиксации.                                                                                                                       |
|                                                        | <b>5b.</b> Увеличенная продолжительность инкубации с реагентами                  | <b>5b.</b> Придерживайтесь протокола окрашивания, приведенного в разделах 2.2/3.2.                                                                                                      |
|                                                        | <b>5c.</b> неподходящий раствор для промывания                                   | <b>5c.</b> Используйте промывочный буфер (10x), каталожный номер 8550.                                                                                                                  |

## ХII. Обозначения

Обозначение:



Пояснение:

Каталожный номер



Номер серии



Изделие медицинского назначения для *in vitro* диагностики



Производитель



Рассчитано на <n> тестов



Ознакомьтесь с инструкцией по применению



Срок годности



Температура хранения

## ХIII. Производитель

**Производитель:** АО «МТМ Лабораториз»  
Им Неуенхеймер Фелд 583  
D-69120 Гейдельберг  
Тел.: 00800 168 652 27  
Факс: +49 (0) 6221 64966 10  
e-mail: [info@mtmlabs.com](mailto:info@mtmlabs.com)  
[www.mtmlabs.com](http://www.mtmlabs.com)

## ХIV. Информация о внесенных изменениях

Данная инструкция по применению представляет собой версию 2.3, выпущенную в январе 2010 года.

## ХV. Информация о правообладателях

Торговые марки SuperFrost<sup>®</sup>, Eukitt, Aquatex, Мерк и автоматические иммуногистостейнеры, упоминаемые в данном документе, являются собственностью владельцев соответствующих торговых марок. Ни один из этих владельцев торговых марок не относится к дочерним компаниям АО «МТМ Лабораториз».

Торговые марки CINtec<sup>®</sup>, МТМ Лабораториз и Е6Н4<sup>®</sup> являются исключительной собственностью компании «МТМ Лабораториз» и не могут использоваться без предварительного письменного разрешения этой компании.

Набор реагентов CINtec<sup>®</sup> Histology разработан с использованием оригинальных технологий, являющихся собственностью компании «МТМ Лабораториз» и защищенных международными и национальными законами о защите интеллектуальной собственности, в том числе европейским патентом 1 092 155 (включает Германию, Соединенное Королевство, Францию, Испанию, Италию) и патентом США 6 709 832, а также соответствующими национальными патентами.

## Приложение 1. Список литературы

1. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, and von Knebel Doeberitz M. Overexpression of p16<sup>INK4a</sup> as a specific marker for dysplasia and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001, 92:276-84.
2. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, and Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol* 1998, 153:1741-8.
3. von Knebel Doeberitz M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer* 2002, 38:2229-42.
4. Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D, Kurman RJ, Schmidt D, Stoler M, and von Knebel Doeberitz M. p16<sup>INK4a</sup> immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surgical Pathol* 2002, 26:1389-99.
5. Wang SS, Trunk M, Schiffman M, Herrero R, Sherman ME, Burk RD Hildesheim A, Concepcion Bratti M, Wright TC, Rodriguez AC, Chen S, Reichert A, von Knebel Doeberitz C, Ridder R, and von Knebel Doeberitz M. Validation of p16<sup>INK4a</sup> 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.
6. Agoff SN, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB, and Koutsky LA. p16<sup>INK4a</sup> expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Modern Pathol* 2003, 16:665-73.
7. Negri G, Egarter-Vigl E, Kasal A, Romano F, Haitel A, and Mian C. p16<sup>INK4a</sup> is a useful marker for the diagnosis of adenocarcinoma of the cervix uteri and its precursors: an immunohistochemical study with immunocytochemical correlations. *Am J Surg Pathol* 2003, 27:187-93.
8. Negri G, Vittadello F, Romano F, Kasal A, Rivasi F, Girlando S, Mian C, and Egarter-Vigl E. p16<sup>INK4a</sup> expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Virchows Arch* 2004, 445:616-20.
9. Schorge JO, Lea JS, Elias KJ, Rajanbabu R, Coleman RL, Miller DS, and Ashfaq R. p16<sup>INK4a</sup> as molecular biomarker of cervical adenocarcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 2004, 190:668-73.
10. Christal L, and Valente T. The utility of p16 immunohistochemistry in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Pathology Case Reviews* 2006, 11 no.3:117.
11. Kong CS, Balzer BL, Troxell ML, Patterson BK, and Longacre TA. p16<sup>INK4a</sup> Immunohistochemistry is Superior to HPV In Situ Hybridization for the Detection of High-risk HPV in Atypical Squamous Metaplasia. *Am J Surg Pathol* 2007, 31:33-43.
12. Nucci MR, and Crum CP. Redefining Early Cervical Neoplasia: Recent Progress. *Adv Anat Pathol* 2007, 14:1-10.

13. Ishikawa M, Fujii T, Saito M, Nindl I, Ono A, Kubushiro K, Tsukazaki K, Mukai M, and Nozawa S. Overexpression of p16<sup>INK4a</sup> as an indicator for human papillomavirus oncogenic activity in cervical squamous neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 2006, 16: 347-353.
14. Kalof AN, Evans MF, Simmons-Arnold L, Beatty BG, and Cooper K. p16<sup>INK4a</sup> Immunoexpression and HPV In Situ Hybridization Signal Patterns Potential Markers of High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2005, 29: 674-679.
15. Ansari-Lari MA, Staebler A, Zaino RJ, Shah KV, and Ronnett BM. Distinction of Endocervical and Endometrial Adenocarcinomas: Immunohistochemical p16 Expression Correlated With Human Papillomavirus (HPV) DNA Detection. *Am J Surg Pathol* 2004, 28: 160-167.
16. Regauer S, and Reich O. CK17 and p16 expression patterns distinguish (atypical) immature squamous metaplasia from high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). *Histopathology* 2007, 50: 629-635.
17. Stoler MH, and Schiffman M. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations. *JAMA* 2001, 285:1500-5.
18. McCluggage WG, Walsh MY, Thornton CM, Hamilton PW, Date A, Caughley LM, and Bharucha H. Inter- and intra-observer variation in the histopathological reporting of intraepithelial lesions using a modified Bethesda grading system. *Br J Obstet Gynaecol* 1998, 105:206-10.
19. Ismail SM, Colclough AB; Dinnen JS, Eakins D, Evans DMD, Gradwell E, O'Sullivan JPO, Summerell JM, and Newcombe R. Reporting cervical intra-epithelial neoplasia (CIN): intra- and interpathologist variation and factors associated with disagreement. *Histopathology* 1990, 16:371-6.
20. De Vet HCW, Knipschild PG, Schouten HJA, Koudstaal J, Kwee W-S, Willebrand D, Sturmans F, and Arends JW. Interobserver variation in histopathological grading of cervical dysplasia. *J Clin Epidemiol* 1990, 43:1395-8.
21. Bergeron C, Ordi J, Schmidt D, Trunk MJ, Keller T, and Ridder R, for the CINtec Histology Study Group. Conjunctive p16INK4a testing significantly increases accuracy in diagnosing high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol*, in press.

## Приложение 2

Пример диффузного окрашивания

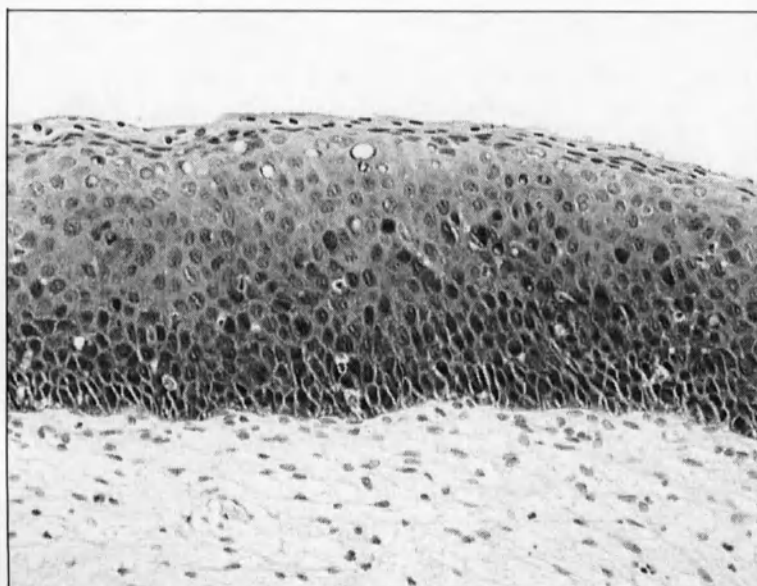


Рис. 1. ЦИНЗ

Пример очагового окрашивания

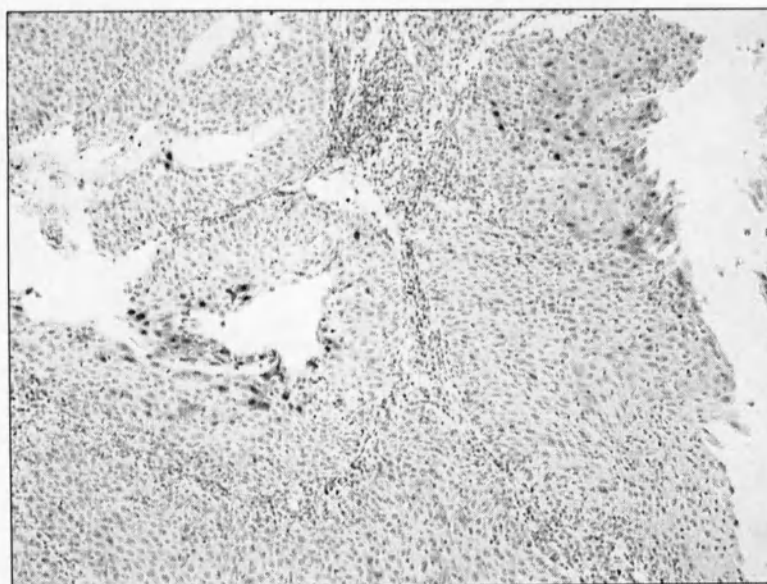


Рис. 2. Плоскоклеточная метаплазия, зрелая



Всего 34 стр.