

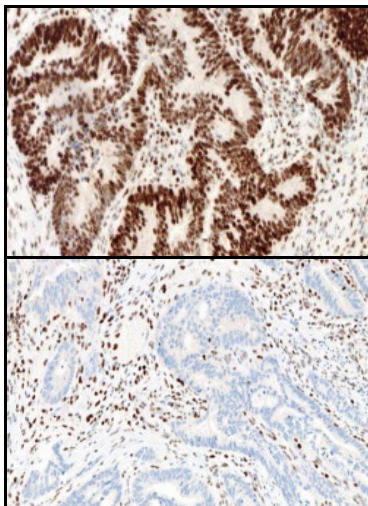
## VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody

K použití s VENTANA MMR IHC Panel

**REF** 760-5094

08033692001

**IVD**  50



Obr. 1. Barvení VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody jako Intaktní (nahore) nebo Ztráta (dole) ve souvislosti s expresí ve tkáni karcinomu tlustého střeva

k identifikaci jedinců ohrožených rizikem Lynchova syndromu u pacientů s diagnostikovaným kolorektálním karcinomem (CRC) a se statusem BRAF V600E, jako pomůcka v rozlišení mezi sporadickým CRC a pravděpodobným Lynchovým syndromem za nepřítomnosti exprese proteinu MLH1.

Tyto produkty by měl interpretovat kvalifikovaný patolog v kombinaci s histologickým vyšetřením, relevantními klinickými informacemi a správnými kontrolami.

Určeno k *in vitro* diagnostice (IVD).

### SOUHRN A VYSVĚTLENÍ

Kolorektální karcinom je třetím nejčastějším karcinomem a čtvrtou nejčastější příčinou úmrtí na světě.<sup>1</sup> Většina CRC vykazuje chromozomální nestabilitu, avšak přibližně 15 % karcinomů se vyvíjí alternativní dráhou charakterizovanou defektní funkcí systému korekce nesprávného párování bazí DNA (mismatch repair, MMR). Následkem MMR deficiencie nádory vykazují mikrosatelitní nestabilitu (MSI) plynoucí v neschopnost proteinů MMR opravovat chyby replikace DNA.

CRC s MMR defekty jsou označovány jako MMR (dMMR) deficientní nádory. Naproti tomu CRC bez MMR defektů jsou označovány jako MMR (pMMR) proficientní nádory. dMMR kolorektální karcinomy jsou často špatně diferencované a často vykazují proximální predominanci tlustého střeva, histologické rysy mucinózní, medulární nebo pečetního prstenu a zvýšené počty nádor infiltrujících lymfocytů.<sup>2,3</sup> Obecně může být MMR deficiencie způsobena buď mutacemi zárodečné linie v jednom z genů MMR s následnou ztrátou odpovídající normální alely genetickými nebo epigenetickými mechanismy, somatickými mutacemi v alelách nebo epigenetickou inaktivací genu *MLH1* methylací.<sup>4</sup>

Čtyřmi nejčastěji mutovanými geny MMR jsou *MLH1*, *PMS2*, *MSH2* a *MSH6*. V normálních buňkách proteinu MLH1 tvoří komplex (heterodimer) s proteinem PMS2, zatímco protein MSH2 tvoří komplex s proteinem MSH6.<sup>5,6</sup> Když dojde k nesprávnému párování DNA, heterodimer MSH2/MSH6 se váže na nesprávně spárovanou DNA, čímž

navodí konformační změnu. Heterodimer MLH1/PMS2 se váže na komplexy MSH2/MSH6, které již jsou navázané na DNA, což vede k excizní opravě postižené DNA. Proteiny MLH1, PMS2, MSH2 a MSH6 jsou klinicky významné proteiny MMR kódované geny, které mohou být mutované v rodinách s Lynchovým syndromem.<sup>7,8</sup> Nositelé těchto mutací mají vysoké riziko rozvoje kolorektálního karcinomu a dalších karcinomů v průběhu celého života kvůli hromadění chyb replikace DNA v proliferujících buňkách. Lynchův syndrom představuje 1–6 % všech CRC. Tyto nádory jsou následkem zděděné autozomální dominantní mutace zárodečné linie v jednom ze čtyř genů MMR, se ztrátou MLH1 objevující se u většiny těchto CRC spojených s Lynchovým syndromem.<sup>5,9,10</sup> U pacientů s Lynchovým syndromem bylo identifikováno více než 300 různých mutací v rodině proteinů MMR. Fenotyp nádoru spojeného s Lynchovým syndromem je obecně charakterizován imunohistochemickou ztrátou exprese v proteinech MMR, konkrétně MLH1, PMS2, MSH2 a MSH6.<sup>10-13</sup> Bylo prokázáno, že MMR IHC testování je užitečné v identifikaci tohoto specifického genu MMR, ve kterém lze s nejvyšší pravděpodobností nalézt změnu zárodečné linie nebo somatickou změnu<sup>14</sup>

Jako součást VENTANA MMR IHC Panel, VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (protilátka VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) napomáhá diferencovat sporadický CRC a CRC s pravděpodobným Lynchovým syndromem za absence exprese proteinu MLH1.<sup>15,16</sup> U CRC je ztráta proteinu MLH1 často následkem hypermethylace promotéru *MLH1* a indikuje sporadický výskyt.<sup>17</sup> Přítomnost proteinu BRAF V600E je úzce spojena s hypermethylací promotéru *MLH1*. Následkem toho pozitivní barvení protilátkou VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) indikuje sporadický CRC.

### KLINICKÝ VÝZNAM

Lynchův syndrom byl popsán v 60. letech minulého století a identifikoval spojení mezi ztrátou funkce MMR a karcinomem.<sup>18</sup> Ztráta proteinů MMR (MLH1, PMS2, MSH2 nebo MSH6) může vést k MSI a vyššímu celoživotnímu riziku nikoli pouze CRC, ale také karcinomů žaludku, mozku, sleziny, pokožky, endometria a vaječníků. Pacienti s Lynchovým syndromem mají celoživotní 50–80% riziko CRC.<sup>5,19,20</sup> Lynchův syndrom se liší od ostatních dědičných rakovinných syndromů, protože přímé testování nádorové tkáně pomáhá identifikaci pacientů ohrožených rizikem Lynchova syndromu a napomáhá informovanosti o následném genetickém testování zárodečné linie. Pro rodiny s Lynchovým syndromem jsou přínosné pokročilé protokoly testování karcinomů.

Různé pokyny, včetně pokynů National Comprehensive Cancer Network (NCCN), doporučují, aby byly všechny CRC screenovány na potenciální Lynchův syndrom kvůli identifikaci pacientů a rodin, pro které bude přínosné další genetické testování a poradenství.<sup>18,21-24</sup> Použití VENTANA MMR IHC Panel pomůže stanovení MMR statusu CRC tím, že jejich expresi proteinu MMR klasifikuje jako intaktní nebo jako ztrátu. Detekce všech čtyř proteinů MMR v nádoru indikuje normální nebo intaktní MMR. Ztráta exprese MLH1 nebo MSH2 je téměř vždy doprovázena ztrátou jeho heterodimerového partnera, PMS2, respektive MSH6. Avšak ztráta PMS2 nebo MSH6 nevede ke ztrátě MLH1 či MSH2. Ztráta PMS2, MSH2 a/nebo MSH6 je konzistentní s pravděpodobným Lynchovým syndromem, a pacienti je vhodné odeslat k dalšímu testování a poradenství v souladu s klinickou praxí.

Ztráta proteinu MLH1 může indikovat sporadický výskyt nebo potenciální Lynchův syndrom. V 15 % či více případů sporadického CRC je ztráta proteinu MLH1 způsobena hypermethylací promotéru *MLH1*.<sup>5,25,26</sup> Důležité je, že mutace BRAF V600E je pozorována u přibližně dvou třetin nádorů se ztrátou exprese MLH1 způsobenou hypermethylací promotéru *MLH1*. Naproti tomu je mutace BRAF V600E velmi zřídka pozorována u nádorů s Lynchovým syndromem.<sup>25</sup> Proto, jestliže výsledek VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (protilátka VENTANA anti-MLH1 (M1)) indikuje ztrátu proteinu MLH1, protilátka VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) může nádor stratifikovat jako sporadický nebo pravděpodobný Lynchův syndrom.<sup>5,27</sup> U CRC ztráta proteinu MLH1 s pozitivním statusem BRAF V600E silně indikuje, že je nádor výsledkem sporadického výskytu, a doslova eliminuje Lynchův syndrom jako základní příčinu malignance.<sup>17,28</sup> Když je ztráta proteinu MLH1 doprovázena negativním statusem BRAF V600E, je ztráta MLH1 konzistentní s vysokou pravděpodobností Lynchova syndromu.<sup>29</sup>

### PRINCIPY METODY

VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody (protilátka VENTANA anti-PMS2 (A16-4)) je myší monoklonální protilátka produkovaná proti rekombinantnímu proteinu PMS2. Protilátka VENTANA anti-PMS2 (A16-4) se váže na protein PMS2 v tkáňových řezech fixovaných ve formalínu a zalitých v parafínu (FFPE). Tato protilátka může být lokalizována pomocí haptenuované sekundární protilátky a následně multimerním konjugátem anti-hapten-HRP (OptiView DAB IHC Detection Kit, kat. č. 760-700 /

06396500001) a OptiView Amplification Kit (kat. č. 760-099 / 06396518001 (50 testů) nebo 860-099 / 06718663001 (250 testů)). Specifický komplex protilátky a enzymu je vizualizován srážejícím se produktem reakce s enzymem. Každý krok zahrnuje inkubaci po přesně stanovenou dobu při přesně stanovené teplotě. Na konci každého inkubačního kroku promyje každý barvicí automat BenchMark ULTRA, XT a GX řezy, aby se zastavila reakce a odstranil se nenavázaný materiál, který by v dalších krocích bránil požadované reakci. To platí také pro ULTRA LCS (ULTRA LCS (Predilute), kat. č. 650-210 / 05424534001) nebo LCS (LCS predilute, kat. č. 650-010 / 05264839001), který minimalizuje odpařování vodných reagensů z preparátu.

Kromě barvení protilátkou VENTANA anti-PMS2 (A16-4) by mělo být druhé sklíčko nabarveno myší monoklonální negativní reagensy, Negative Control (Monoclonal) (kat. č. 760-2014 / 05266670001). K vyhodnocení intenzity obarvení pozadí se používá negativní reagenční kontrola.

## DODÁVANÉ REAGENCIE

Protílátka VENTANA anti-PMS2 (A16-4) obsahuje dostatečné množství reagensie k provedení 50 testů.

Jeden 5ml dávkovač protilátky VENTANA anti-PMS2 (A16-4) obsahuje přibližně 5 µg myší monoklonální protilátky.

Protílátka je naředěna v 0,08 M PBS s obsahem 3% nosného proteinu a 0,05% ProClin300 jako konzervační látky.

Celková koncentrace proteinu v reagensii je přibližně 3 mg/ml. Koncentrace specifické protilátky je asi 1 µg/ml. U tohoto produktu nebyla pozorována žádná známá nespecifická reaktivita protilátky.

Protílátka VENTANA anti-PMS2 (A16-4) je myší monoklonální protílátka vyráběná jako supernatant buněčné kultury.

Podrobné popisy nalezete v příbalové informaci k příslušné detekční soupravě VENTANA: (1) Princip metody, (2) Potřebný materiál a reagensie, které nejsou součástí balení, (3) Odběr vzorků a příprava pro analýzu, (4) Postupy pro kontrolu jakosti, (5) Řešení problémů, (6) Interpretace výsledků a (7) Obecná omezení.

## POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ BALENÍ

Barvicí činidla, například detekční soupravy VENTANA a pomocné materiály, včetně kontrolních sklíček pro negativní a pozitivní tkáň, nejsou součástí dodávky.

Následující reagensie a materiály jsou k barvení zapotřebí, ale nejsou součástí dodávky:

- Další protilátky VENTANA MMR IHC Panel:
  - VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (kat. č. 760-5091 / 08033668001)
  - VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody (kat. č. 760-5093 / 08033684001)
  - VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (kat. č. 760-5092 / 08033676001)
  - VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (kat. č. 760-5095 / 08033706001)
- Negative Control (Monoclonal) (kat. č. 760-2014 / 05266670001)
- Mikroskopická sklíčka, pozitivně nabitá
- Štítky s čárovým kódem (odpovídající testované negativní reagenční kontrole a primární protilátce)
- Xylen (histologický stupeň)
- Etanol nebo reagenční alkohol (histologický stupeň)
  - 100% roztok: nezředěný etanol nebo reagenční alkohol
  - 95% roztok: směs 95 dílů etanolu nebo reagenčního alkoholu s 5 díly deionizované vody
  - 80% roztok: směs 80 dílů etanolu nebo reagenčního alkoholu s 20 díly deionizované vody
- Deionizovaná nebo destilovaná voda
- OptiView DAB IHC Detection Kit (kat. č. 760-700 / 06396500001)
- OptiView Amplification Kit (kat. č. 760-099 / 06396518001 nebo kat. 860-099 / 06718663001)
- EZ Prep Concentrate (10X) (kat. č. 950-102 / 05279771001)
- Reaction Buffer Concentrate (10X) (kat. č. 950-300 / 0533955001)
- ULTRA LCS (Predilute) (kat. č. 650-210 / 05424534001) nebo LCS (LCS predilute kat. č. 650-010 / 05264839001)

- ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (kat. č. 950-224 / 05424569001) nebo Cell Conditioning 1 (CC1) kat. č. 950-124 / 05279801001)
- Hematoxylin II (kat. č. 790-2208 / 05277965001)
- Bleuing Reagent (kat. č. 760-2037 / 05266769001)
- Trvalé fixační médium (Permout Fisher kat. č. SP15-500 nebo ekvivalentní)
- Krycí sklíčko (dostatečně velké pro překrytí tkáně, např. VWR kat. č. 48393-060)
- Automatické krycí sklíčko (jako např. Tissue-Tek SCA Automated Coverslipper)
- Světelný mikroskop
- Absorpční utěrky

## SKLADOVÁNÍ

Po přijetí a mezi použitím uchovávejte při teplotě 2–8 °C. Chraňte před mrazem.

Aby byla zajištěna správná funkčnost reagensie a stabilita protilátky, musí se dávkovač po každém použití uzavřít víčkem a okamžitě umístit ve svislé poloze do chladničky.

Každý dávkovač s protilátkou má stanovenou dobu expirace. Při řádném skladování zůstane reagensie stabilní do data uvedeného na štítku. Po uplynutí data expirace reagensii nepoužívejte.

## PŘÍPRAVA VZORKŮ

Pro použití této primární protilátky s přístroji OptiView DAB IHC Detection Kit, BenchMark ULTRA, XT a GX jsou vhodné FFPE tkáně zpracované běžným způsobem.

Je třeba nařezat řezy silně zhruba 4 µm a fixovat je na pozitivně nabitá podložní sklíčka. V zájmu zachování antigenosti čerstvě nařezaných tkáňových řezů by se pro barvení měly používat čerstvě pořízené řezy. Vyšetření neznámých vzorků doporučujeme provádět souběžně s pozitivními a negativními kontrolními vzorky.

Pro VENTANA MMR IHC Panel se doporučuje, aby byla tkáň fixována do 6 hodin od pořízení řezu v 10% neutrálním pufovaném formalinu (NBF) po 6–24 hodin na základě barvení v mandli. Přijatelného barvení bylo rovněž dosaženo s fixací v zinkovém formalinu a fixativu Z-5 po 6–24 hodin. Použití alkohol formalinu (AFA), 95% etanolu a PREFER s VENTANA MMR IHC Panel jako fixativ se nedoporučuje, protože se tkáň nebarví vůbec, nebo se barví variabilně.

Použitá množství fixačního prostředku by měla odpovídat 15 až 20 násobku objemu tkáně. Během 24 hodin neproniknou fixativa do větší hloubky než 2 až 3 mm pevné tkáně nebo 5 mm porézní tkáně. Fixaci lze provádět při pokojové teplotě (15–25 °C).<sup>30,31</sup>

Vyšetření neznámých vzorků doporučujeme provádět souběžně s pozitivními a negativními kontrolními vzorky.

## UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ PŘEDPISY

- Tepelné namáhání protilátky VENTANA anti-PMS2 (A16-4) a její stabilita při používání nejsou v současné době stanoveny a uživatelé by měli sledovat změny stability ve vlastnostech barvení (např. zvýšené barvení pozadí nebo sníženou intenzitu barvení) při opakovaných použitích.
- K *in vitro* diagnostice (IVD).
- Pouze k odbornému použití.
- Roztok ProClin 300 slouží v této reagensii jako konzervační prostředek. Je klasifikován jako dráždivý a při styku s pokožkou může způsobit senzibilizaci. Při manipulaci dodržujte příslušná bezpečnostní opatření. Zamezte kontaktu reagensii s očima, pokožkou a sliznicemi. Používejte vhodný ochranný oděv a rukavice.
- S materiálem lidského nebo živočišného původu je třeba nakládat jako s nebezpečným biologickým materiálem a likvidovat jej v souladu s platnými bezpečnostními opatřeními.
- Zabraňte kontaktu reagensii s očima a sliznicemi. Jestliže se reagensie dostanou do kontaktu s citlivými oblastmi, omyjte je vydatným množstvím vody.
- Zabraňte mikrobiální kontaminaci reagensii, mohla by způsobit nepřesnost výsledků.
- Doporučené metody likvidace jsou uvedeny v celostátních a místních předpisech.
- Další informace o bezpečnosti naleznete v bezpečnostních listech a v příručce s výkladem symbolů a rizik na adrese [www.ventana.com](http://www.ventana.com).

## POSTUP BARVENÍ

Protílátka VENTANA anti-PMS2 (A16-4) byla vyvinuta k použití na přístrojích BenchMark ULTRA, XT a GX v kombinaci s OptiView DAB IHC Detection Kit, OptiView Amplification Kit a doplňkovými reagensii. Tabulka 1 uvádí barvicí protokol k použití s protilátkou VENTANA anti-PMS2 (A16-4). Účinek měnicího se času a teploty při získávání antigenu

na robustnost analýzy není znám. Proto může odchylka od doporučených podmínek získávání antigenu uvedených v protokolu způsobit neplatnost získaných výsledků. Je třeba používat a dokumentovat příslušné kontroly. Uživatelé, kteří se od poskytnutého protokolu odchýlí, musí přijmout odpovědnost za interpretaci výsledků pacientů.

Parametry automatických postupů lze zobrazovat, tisknout a upravovat podle postupu uvedeného v návodu k obsluze přístroje. Podrobnější informace o postupech imunohistochemického barvení naleznete v příbalovém letáku OptiView DAB IHC Detection Kit.

Tabulka 1. Protokol pro barvení protilátky VENTANA anti-PMS2 (A16-4) s OptiView DAB IHC Detection Kit a OptiView Amplification Kit na přístrojích BenchMark ULTRA, XT a GX

Typ postupu	Metoda		
	BenchMark ULTRA Přístroj	BenchMark XT Přístroj	BenchMark GX Přístroj
Odparafinování	Zvoleno	Zvoleno	Zvoleno
Kondicionování buněk (odmaskování antigenu)	Cell Conditioning 1, 92 minuty, 100°C	Cell Conditioning 1, 92 minuty	Cell Conditioning 1, 92 minuty
Pre-Primary Peroxidase Inhibitor	Zvoleno	Zvoleno	Zvoleno
Protilátka (primární)	32 minuty, 36°C	44 minuty, 37°C	52 minuty, 37°C
OptiView HQ Linker	8 minut (standardně)		
OptiView HRP Multimer	8 minut (standardně)		
OV AMP H2O2/OV Amplifier	4 minuty		
OV AMP Multimer	4 minuty		
Kontrastní barvivo	Hematoxylin II, 4 minuty		
Po kontrastním barvení	Bluing, 4 minuty		

Odchylka od doporučených podmínek uvedených v protokolu může obzvláště při získávání antigenu, způsobit neplatnost získaných výsledků. Avšak vzhledem k různým způsobům fixace a zpracování tkáně a rovněž ke všeobecným podmínkám laboratorních přístrojů a okolního prostředí může být zapotřebí prodloužit nebo zkrátit dobu inkubace primární protilátky podle konkrétních vzorků a přístroje. Další informace o různých fixacích viz příručka „Immunohistochemistry: Principles and Advances“.<sup>32</sup>

## POSTUPY KONTROLY KVALITY

### Negative Reagent Control

Společnost Ventana Medical Systems, Inc. důrazně doporučuje použití Negative Reagent Control k barvení sousedících řezů vzorků pacientovy tkáně na jiném sklíčku, než je sklíčko s barvením protilátkou VENTANA anti-PMS2 (A16-4). Negative Reagent Control myší monoklonální protilátka (Negative Control (Monoclonal), kat. č. 760-2014 / 05266670001) se doporučuje k použití namísto primární protilátky při hodnocení nespecifického barvení. Parametry barvení pro protilátku Negative Reagent Control by měly být stejné, jako u primární protilátky.

### Pozitivní kontrola tkáně

S každým provedeným barvicím postupem je třeba provést pozitivní kontrolu tkáně. Nejvhodnější je uložit řez pro pozitivní kontrolu na stejné sklíčko jako tkáň od pacienta. Tento postup pomáhá odhalit případy, kdy na preparát s testovaným vzorkem pacienta nebyla nanášena primární protilátka nebo jiná důležitá reagentie. Tkáň se slabým pozitivním zbarvením je pro optimální kontrolu kvality vhodnější. Složky tkáně s pozitivním zbarvením slouží k potvrzení, že protilátka byla přidána a přístroj pracuje správně. Tkáň může obsahovat pozitivně i negativně zbarvené buňky nebo složky tkáně a může sloužit jako tkáň pro pozitivní i negativní kontrolu. Jako kontrolní vzorky by se měly použít čerstvé vzorky z pitvy, biopsie nebo operace zpracované a fixované co nejdříve stejným

způsobem jako testované řezy. Takové tkáně mohou monitorovat všechny kroky analýzy, od přípravy tkáně až po barvení. Použití tkáňového řezu fixovaného nebo zpracovaného jiným způsobem než testovaný vzorek zajistí kontrolu pro všechny reagentie a všechny kroky metody kromě fixace a zpracování tkáně.

Známe pozitivní kontroly tkání lze používat pouze ke sledování správné funkce zpracovaných tkání a testovacích reagentií, nikoliv jako pomůcku k formulaci specifické diagnózy vzorků pacientů. Pokud se u tkání určených pro pozitivní kontrolu pozitivně zbarvení neobjeví, lze považovat výsledky testovacích vzorků za neplatné.

CRC tkáň s klinickým statusem PMS2 Intaktní nebo normální tkáň tlustého střeva prekvalifikovaná s protilátkou VENTANA anti-PMS2 (A16-4) může být použita jako pozitivní tkáňová kontrola. Normální tlusté střevo se bude barvit jako Intaktní pro PMS2 pomocí protilátky VENTANA anti-PMS2 (A16-4). Pozitivní tkáňová kontrola by měla vykazovat jednoznačné zbarvení jader ve viabilním nádoru a/nebo elementy normální tkáně tlustého střeva. U všech tkání by se interní pozitivní kontrolní buňky (tj. lymfocyty, fibroblasty nebo normální epitel v blízkosti nádoru) všechny měly barvit pozitivně v jádře.

### Negativní kontrola tkáně

Protože proteiny MLH1, PMS2, MSH2 a MSH6 jsou exprimovány ve všech tkáních, normální negativní tkáňová kontrola pro tyto biomarkery neexistuje. Avšak CRC tkáň s klinickým statusem PMS2 Ztráta prekvalifikovaná s protilátkou VENTANA anti-PMS2 (A16-4) může být použita jako negativní tkáňová kontrola. Negativní tkáňové kontroly se mají používat pouze ke sledování správné funkce zpracovaných tkání, testových reagentií a přístrojů, nikoliv jako pomůcka při formulaci konkrétní diagnózy vzorků pacientů.

### Ověření testu

Před prvním použitím protilátky nebo systému pro barvení v rámci diagnostického postupu by měla být ověřena specifická protilátky testováním na sérii tkání se známou charakteristikou účinnosti IHC představujících tkáň Intaktní pro klinický status proteinu PMS2. (Viz Postupy kontroly kvality popsané dříve v této části příbalového letáku a doporučení ohledně kontroly kvality stanovená v checklistu College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist<sup>33</sup> nebo CLSI Approved Guideline.<sup>31</sup>)

## INTERPRETACE ZBARVENÍ / OČEKÁVANÉ VÝSLEDKY

Vzor buněčného barvení pro protilátku VENTANA anti-PMS2 (A16-4) je jaderný v aktivně proliferujících buňkách. CRC barvenému s protilátkou VENTANA anti-PMS2 (A16-4) přiděli vyškolený patolog klinický status na základě svého hodnocení přítomnosti nebo nepřítomnosti specifického zbarvení jader v nádoru. Klinický status Intaktní je přidělen v případech jednoznačného zbarvení jader ve viabilních nádorových buňkách, v přítomnosti přijatelných interních pozitivních kontrol (zabarvení jader v lymfocytech, fibroblastech nebo normálním epitelu v sousedství nádoru). Klinický status Ztráta je přidělen v případech jednoznačné ztráty zbarvení jader nebo fokálního slabého jednoznačného zbarvení jader ve viabilních nádorových buňkách v přítomnosti interních pozitivních kontrol, jak ukazuje Tabulka 2.

Pokud není v interních pozitivních kontrolách přítomno jednoznačné zbarvení jader a/nebo barvení pozadí narušuje interpretaci, test by měl být považován za nepřijatelný a je třeba jej zopakovat. Bodové zbarvení jader nádorových buněk by mělo být považováno za negativní výsledek (Ztráta). V případech s fokálním barvením nádorových buněk by měla být intenzita zbarvení jader alespoň stejná, jako interní pozitivní kontrola společně s konfluentním/kontinuálním barvením jader v několika epitelových žlázách nebo hnízdech, aby případ obdržel klinický status Intaktní. Za absence těchto podmínek se případu připsuje klinický status Ztráta.

Tabulka 2. Interpretace barvení pro protilátku VENTANA anti-PMS2 (A16-4)

Klinický status	Popis
Expres PMS2 Intaktní	Jednoznačné zbarvení jader ve viabilních nádorových buňkách, v přítomnosti interních pozitivních kontrol (zabarvení jader v lymfocytech, fibroblastech nebo normálním epitelu tlustého střeva v sousedství nádoru)
Ztráta exprese PMS2	Jednoznačná ztráta zbarvení jader nebo fokální slabé jednoznačné zbarvení jader ve viabilních nádorových buňkách v přítomnosti interních pozitivních kontrol

Případy protilátky VENTANA anti-PMS2 (A16-4) jsou kategorizovány jako Intaktní nebo Ztráta podle přítomnosti či absence specifického zbarvení nádoru.

### SPECIFICKÁ OMEZENÍ

Ventana Medical Systems, Inc. dodává protilátky a činidla pro použití optimálně naředěné, pokud jsou dodrženy pokyny, které jsou součástí produktu. Odchyłka od doporučených podmínek uvedených v protokolu při získávání antigenu, proto může učinit získané výsledky neplatnými. Je třeba používat a dokumentovat příslušné kontroly. Uživatelé, kteří se od poskytnutého protokolu odchyli, musí přijmout odpovědnost za interpretaci výsledků pacientů.

U VENTANA MMR IHC Panel se doporučuje fixování tkáňových vzorků do 6 hodin po odběru na 6–24 hodin v 10% neutrálním pufovaném formalínu. Přijatelné barvení je pozorováno po fixaci na 6–24 hodin zinkovým formalímem nebo Z-5. 95% alkohol, alkohol-formalín-kyselina octová (AFA) ani PREFER se k fixování tkání nedoporučují.

Některé případy mohou být obzvláště obtížné kvůli následujícím problémům:

- Nespecifické pozadí: Některé vzorky mohou vykazovat nespecifické barvení pozadí z důvodů, které nejsou dobře prozkoumány. Z tohoto důvodu hodnocení sklíčka s protilátkou VENTANA anti-PMS2 (A16-4) musí zahrnovat srovnání sklíčka se sklíčkem obsahujícím Negative Reagent Control pro stanovení úrovně barvení pozadí. Cytoplazmatické barvení, pokud je přítomno, by mělo být při IHC interpretaci protilátky VENTANA anti-PMS2 (A16-4) ignorováno.
- Fokální obarvení: Některé vzorky mohou vykazovat fokální barvení v nádorových buňkách a intenzita barvení se může lišit od slabého po silné. Na základě algoritmu IHC skórování protilátky VENTANA anti-PMS2 (A16-4) by mělo být fokální slabé jednoznačné barvení jádra ve viabilních nádorových buňkách v přítomnosti interních pozitivních kontrol klasifikováno jako Ztráta. Barvení se může lišit v úrovni intenzity a tato intenzita se může lišit napříč nádorem; to však neovlivňuje klinický status MMR.
- Bodové barvení: Některé vzorky mohou vykazovat diskretní bodové barvení v několika jádrech nádoru; intenzita tohoto barvení se může lišit od slabého po silné. Tento vzor barvení by měl být ignorován a jestliže má určitý případ pouze tento typ vzoru barvení, měl by mu být udělen klinický status Ztráta.
- Artefakt tkáně nebo barvení: Histologické artefakty plynoucí ze zpracování vzorku a mikrotomických procesů mohou také komplikovat stanovení klinického IHC statusu protilátky VENTANA anti-PMS2 (A16-4) IHC. Tyto artefakty mohou zahrnovat mimo jiné fixační gradienty a okrajové efekty, zachycení DAB, jaderné bubliny, nedostatky barvení v některých oblastech tkáně, trhání nebo skládání tkáně a ztrátu tkáňového řezu. V některých případech může být zapotřebí opakovaného barvení nových řezů nebo získání nového vzorku.

### CHARAKTERISTIKY ÚČINNOSTI PROTILÁTKY VENTANA ANTI-PMS2 (A16-4)

#### Analytická senzitivita/specifita

Analytická specifita a senzitivita byly stanoveny obarvením více případů normálních a neoplastických lidských tkání protilátkou VENTANA anti-PMS2 (A16-4). Výsledky jsou uvedeny v Table 3 a Tabulce 4. Pozitivní barvení je jaderné, pokud není uvedeno jinak. Na normálních ani neoplastických tkáních nebylo s protilátkou VENTANA anti-PMS2 (A16-4) pozorováno žádné neočekávané barvení. Protože korekce nesprávného párování bazí je přítomna ve všech aktivně proliferujících buňkách, většina normálních a neoplastických tkání vykazovala podle očekávání pozitivní barvení.

Tabulka 3. Analytická senzitivita / specifita protilátky VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Barvení v normálních FFPE tkáních

Tkáň	Počet pozitivních případů / celkový počet případů	Tkáň	Počet pozitivních případů / celkový počet případů
Nadledvinka	3/3	Plíce	3/3
Močový měchýř	3/3	Lymfatické uzliny	3/3
Kostní dřeň	3/3	Mezotel	2/3
Vaječník	4/4	Slinivka břišní	3/3
Prs	3/3	Příštitné tělísko	3/3

Tkáň	Počet pozitivních případů / celkový počet případů	Tkáň	Počet pozitivních případů / celkový počet případů
Mozeček	3/3	Periferní nerv	4/4
Mozek	3/3	Prostata	3/3
Děložní čípek	3/3	Kosterní sval	2/3
Tlusté střevo	3/3	Kůže	3/3
Endometrium	3/3	Slezina	3/3
Jícen	3/3	Žaludek	3/3
Srdce	2/3	Varle	3/3
Hypofýza	3/3	Brzlík	3/3
Střevo	3/3	Štítná žláza	4/4
Ledvina	3/3	Jazyk / Slinná žláza	3/3
Játra	3/3	Mandle	3/3

Poznámka: Proteiny korekce nesprávného párování bazí, jako jsou PMS2, jsou přítomny ve všech aktivně proliferujících buňkách. Ve všech tkáních bylo pozitivní/negativní barvení stanoveno pro tkáňově specifické prvky v přítomnosti pozitivního barvení v normálních kontrolních buňkách (lymfocyty, fibroblasty a epitelální buňky).

Tabulka 4. Analytická senzitivita / specifita protilátky VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Barvení v různých FFPE neoplastických tkáních

Patologie	Počet pozitivních případů / celkový počet případů
Glioblastom (mozek)	1/1
Ependymom (mozek)	1/1
Oligodendrogliom (mozek)	1/1
Serózní adenokarcinom (vaječník)	1/1
Adenokarcinom (vaječník)	1/1
Pankreatický neuroendokrinní novotvar (slinivka)	1/1
Seminom (varle)	2/2
Medulární karcinom (štítná žláza)	1/1
Papilární karcinom (štítná žláza)	1/1
Duktální karcinom <i>in situ</i> (prs)	1/1
Mikroinvazivní duktální karcinom (prs)	1/1
Invazivní duktální karcinom (prs)	1/1
Malobuněčný karcinom (plíce)	1/1
Karcinom z dlaždicových buněk (plíce)	1/1
Neuroendokrinní karcinom (jícen)	1/1
Signet ring karcinom (žaludek)	1/1
Adenokarcinom (tenké střevo)	1/1

Patologie	Počet pozitivních případů / celkový počet případů
Stromální sarkom (tenké střevo)	1/1
Adenokarcinom (tlusté střevo)	1/1
Adenokarcinom (konečník)	1/1
Gastrointestinální stromální tumor (GIST) (rektum)	1/1
Hepatoblastom (játra)	1/1
Karcinom z jasných buněk (ledvina)	1/1
Adenokarcinom (prostata)	1/1
Karcinom z dlaždicových buněk (cervix)	1/1
Embryonální rhabdomyosarkom (pruhované svaly)	1/1
Karcinom z dlaždicových buněk (kůže)	1/1
Neuroblastom (retroperitoneum)	1/1
Mezoteliom (peritoneum)	1/1
B-buněčný lymfom; NOS (lymfatické uzliny)	2/2
Hodgkinův lymfom (lymfatické uzliny)	1/1
Leiomyosarkom (močový měchýř)	1/1
Osteosarkom	1/1
Leiomyosarkom (hladká svalovina)	1/1

Poznámka: Proteiny korekce nesprávného spárování bazí, jako jsou PMS2, jsou přítomny ve všech aktivně proliferujících buňkách. Ve všech tkáních bylo pozitivní/negativní barvení stanoveno pro buňky nádoru v přítomnosti pozitivního barvení v normálních kontrolních buňkách (lymfocyty, fibroblasty a epitelální buňky).

### Opakovatelnost v rámci jednoho dne a přesnost mezi jednotlivými dny

Opakovatelnost a přesnost protilátky VENTANA anti-PMS2 (A16-4) byly hodnoceny na přístroji BenchMark ULTRA v kombinaci se soupravou OptiView DAB IHC Detection Kit a OptiView Amplification Kit.

Opakovatelnost v rámci jednoho dne byla hodnocena pomocí 10 vzorků 10 CRC (5 Intaktních a 5 Ztrát pro expresi PMS2). Pět replikátových sklíček z každého vzorku CRC bylo barveno s protilátkou VENTANA anti-PMS2 (A16-4) na jednom přístroji BenchMark ULTRA v jeden den. Každé sklíčko s barvením protilátkou VENTANA anti-PMS2 (A16-4) bylo spárováno se sklíčkem s Negative Reagent Control ze stejného případu. Všechny páry sklíček byly randomizovány a poté hodnoceny jako Intaktní nebo Ztráta jedním patologem zaslepených vůči diagnóze případů.

Přesnost mezi jednotlivými dny byla hodnocena pomocí 10 vzorků CRC (5 Intaktních a 5 Ztrát pro expresi PMS2). Replikáty z každého vzorku CRC byly barveny s protilátkou VENTANA anti-PMS2 (A16-4) na jednom přístroji BenchMark ULTRA v každý z 5 po sobě následujících dní. Každé sklíčko s barvením protilátkou VENTANA anti-PMS2 (A16-4) bylo spárováno se sklíčkem s Negative Reagent Control ze stejného případu. Všechny páry sklíček byly randomizovány a poté hodnoceny jako Intaktní nebo Ztráta jedním patologem zaslepených vůči diagnóze případů.

Žádné ze sklíček s Negative Reagent Control nevykazovalo specifické barvení a barvení pozadí bylo  $\leq 0,5$ . Pomocí poolovaných dat ze všech možných párů jak studie opakovatelnost v rámci jednoho dne, tak studie přesnosti mezi jednotlivými dny prokázaly 100% pozitivní procentuální shodu (PPA), 100% negativní procentuální shodu (NPA) a 100% celkovou procentuální shodu (OPA). Souhrn výsledků naleznete v tabulce 5.

Tabulka 5. Opakovatelnost v rámci jednoho dne a přesnost mezi jednotlivými dny s protilátkou VENTANA anti-PMS2 (A16-4) měřené pomocí klinického statusu (Intaktní nebo Ztráta)

Reprodukovatelnost/ Přesnost	Klinický status	Shoda			
		Typ	n/N	%	95% CI
Reprodukovatelnost v rámci jednoho dne	Intaktní	PPA	25/25	100,0	(86,7;100,0)
	Ztráta	NPA	25/25	100,0	(86,7;100,0)
	Celkem	OPA	50/50	100,0	(92,9;100,0)
Přesnost mezi jednotlivými dny	Intaktní	PPA	50/50	100,0	(92,9;100,0)
	Ztráta	NPA	50/50	100,0	(92,9;100,0)
	Celkem	OPA	100/100	100,0	(96,3;100,0)

Poznámka: 95% CI byly vypočítány metodou stanovení (Wilsonova) skóre.

### Přesnost mezi přístroji BenchMark

BenchMark ULTRA Přesnost protilátky VENTANA anti-PMS2 (A16-4) mezi jednotlivými přístroji byla stanovena barvením replikátových sklíček 10 vzorků CRC (5 Intaktních a 5 Ztrát pro expresi PMS2) napříč 3 přístroji BenchMark ULTRA s protilátkou VENTANA anti-PMS2 (A16-4) pomocí OptiView DAB IHC Detection Kit a OptiView Amplification Kit. Replikátová sklíčka z každého vzorku CRC byla barvena s protilátkou VENTANA anti-PMS2 (A16-4) na 3 přístrojích BenchMark ULTRA.

Každé sklíčko s barvením protilátkou VENTANA anti-PMS2 (A16-4) bylo spárováno se sklíčkem s Negative Reagent Control ze stejného případu. Všechny páry sklíček byly randomizovány a poté hodnoceny klinickým statutem (Intaktní nebo Ztráta) jedním patologem zaslepeným vůči diagnóze případů. Žádné ze sklíček s Negative Reagent Control nevykazovalo specifické barvení a barvení pozadí bylo  $\leq 0,5$ .

Pro přesnost mezi jednotlivými přístroji BenchMark ULTRA byla provedena párová srovnání klinického statusu sklíček pro každý vzorek mezi přístroji, která prokázala 100% PPA, NPA a OPA. Souhrn výsledků naleznete v Tabulce 6.

Tabulka 6. BenchMark ULTRA Přesnost protilátky VENTANA anti-PMS2 (A16-4) mezi jednotlivými přístroji měřená pomocí klinického statusu (Intaktní nebo Ztráta)

Přesnost	Klinický status	Shoda			
		Typ	n/N	%	95% CI
Mezi přístroji	Intaktní	PPA	30/30	100,0	(88,6;100,0)
	Ztráta	NPA	30/30	100,0	(88,6;100,0)
	Celkem	OPA	60/60	100,0	(94,0;100,0)

Poznámka: 95% CI byly vypočítány metodou stanovení (Wilsonova) skóre.

Navíc přesnost protilátky VENTANA anti-PMS2 (A16-4) mezi jednotlivými přístroji byla stanovena barvením replikátových sklíček 6 vzorků CRC (4 Intaktních a 2 Ztrát pro expresi PMS2) napříč 3 přístroji BenchMark XT a 3 přístroji BenchMark GX s protilátkou VENTANA anti-PMS2 (A16-4) pomocí OptiView DAB IHC Detection Kit.

Bylo provedeno 15 pozorování na případ při poolování 3 přístrojů; medián každého případu byl stanoven z těchto 15 pozorování. Jednotlivá pozorování stejného případu byla považována za konkordantní s intenzitou signálu daného případu, pokud byla v rámci 0,5 intenzity signálu. Pro přesnost mezi přístroji BenchMark XT a BenchMark GX bylo provedeno párové srovnání skóre intenzity barvení nádoru pro každý vzorek, které prokázalo 100% OPA mezi 3 přístroji BenchMark XT a 100% OPA mezi 3 přístroji BenchMark GX. Na všech sklíčkách bylo barvení pozadí přijatelné ( $\leq 0,5$ ) jak na přístroji BenchMark XT, tak GX.

### Konkordance přístroje BenchMark mezi platformami

Konkordance mezi přístroji BenchMark ULTRA, XT a GX pro protilátku VENTANA anti-PMS2 (A16-4) byla stanovena barvením vzorků CRC s protilátkou VENTANA anti-PMS2 (A16-4) pomocí OptiView DAB IHC Detection Kit. U všech sklíček hodnotil nezávislý patolog klinický status (Intaktní/Ztráta).

Párová srovnání vzorků CRC byla provedena mezi platformami včetně GX ku ULTRA (135 případů Intaktních a 32 případů Ztrát), GX ku XT (126 případů Intaktních a 30 případů Ztrát) a ULTRA ku XT (135 případů Intaktních a 31 případů Ztrát). Všechna párová srovnání provedená mezi platformami prokazovala 100% průměrnou pozitivní shodu (APA), průměrnou negativní shodu (ANA) a OPA.

### Studie přesnosti pracovníků

Přesnost v rámci jednotlivých hodnocení pracovníka a přesnost mezi pracovníky byly hodnoceny na 20 CRC (13 případů Intaktních a 7 případů ztrát) barvených protilátkou VENTANA anti-PMS2 (A16-4) a OptiView DAB IHC Detection Kit s OptiView Amplification Kit. Každé sklíčko s barvením protilátkou VENTANA anti-PMS2 (A16-4) bylo spárováno se sklíčkem s Negative Reagent Control ze stejného případu.

Všechny páry sklíček byly randomizovány a hodnotili je 3 patologové na klinický status PMS2 Intaktní nebo Ztráta. Patologové byli zaslepeni vůči diagnóze případu. Po čtyři týdny dlouhém vymývacím období byla sklíčka barvená s protilátkou VENTANA anti-PMS2 (A16-4) opětovně randomizována na druhé hodnocení klinického statusu PMS2 každým ze 3 patologů. Žádné ze sklíček s Negative Reagent Control nevykazovalo specifické barvení a barvení pozadí bylo  $\leq 0,5$ .

Přesnost mezi jednotlivými hodnoceními jednoho pracovníka srovnávala počáteční a konečná hodnocení sklíček od jednoho patologa s poskytnutím 20 srovnání sklíček (20 CRC) každému patologovi. Srovnání od 3 patologů byla poolována a prokázala 100% APA, 100% ANA a 100% OPA pro přesnost v rámci jednoho pracovníka. Souhrn výsledků naleznete v tabulce 7.

Přesnost mezi jednotlivými pracovníky srovnávala všechna hodnocení sklíček (20 CRC x 2 hodnocení/případ x 3 patologové = 120 hodnocení sklíček) se statusem modelového případu pro každý případ CRC. Výsledky prokázaly 100% PPA, NPA a OPA pro přesnost mezi jednotlivými pracovníky. Souhrn výsledků naleznete v tabulce 7.

Tabulka 7. Přesnost v rámci jednoho pracovníka a přesnost napříč jednotlivými pracovníky u protilátky VENTANA anti-PMS2 (A16-4) na případech CRC měřená pomocí klinického statusu PMS2 (Intaktní/Ztráta).

Přesnost	Klinický stav	Shoda			
		Typ	n/N	%	95% CI
V rámci pracovníka	Intaktní	APA	78/78	100,0	(95,3;100,0)
	Ztráta	ANA	42/42	100,0	(91,2;100,0)
	Celkem	OPA	60/60	100,0	(94,0;100,0)
Mezi pracovníky	Intaktní	PPA	78/78	100,0	(95,3;100,0)
	Ztráta	NPA	42/42	100,0	(91,6;100,0)
	Celkem	OPA	120/120	100,0	(96,9;100,0)

Poznámka: Pro přesnost v rámci jednoho pracovníka byly 95% CI APA a ANA 95% vypočteny pomocí Clopper-Pearsonovy metody; OPA 95% CI byl vypočítán pomocí metody percentilu bootstrap. Pro přesnost mezi pracovníky byly 95% CI vypočítány metodou (Wilsonova) skóre.

### Přesnost mezi šaržemi

Přesnost protilátky VENTANA anti-PMS2 (A16-4) mezi šaržemi byla stanovena testováním 3 produkčních šarží protilátky VENTANA anti-PMS2 (A16-4), každé na triplicátových sklíčkách 10 CRC (5 Intaktních a 5 ztrát pro PMS2 expresi) na přístroji BenchMark ULTRA pomocí OptiView DAB IHC Detection Kit a OptiView Amplification Kit.

Každé sklíčko s barvením protilátkou VENTANA anti-PMS2 (A16-4) bylo spárováno se sklíčkem s Negative Reagent Control ze stejného případu. Páry sklíček byly randomizovány a hodnotil je jeden patolog zaslepený vůči diagnóze případu a číslu šarže protilátky VENTANA anti-PMS2 (A16-4). Žádné ze sklíček s Negative Reagent Control nevykazovalo specifické barvení a barvení pozadí bylo  $\leq 0,5$ .

Pro přesnost protilátky VENTANA anti-PMS2 (A16-4) mezi jednotlivými šaržemi byla všechna hodnocení sklíček srovnána se statusem modálního případu pro každý případ CRC. OPA mezi šaržemi protilátky VENTANA anti-PMS2 (A16-4) pro status byla 100 %; to prokazuje, že barvení s protilátkou VENTANA anti-PMS2 (A16-4) je reprodukovatelné napříč jednotlivými šaržemi protilátky.

Shrnutí výsledků přesnosti protilátky VENTANA anti-PMS2 (A16-4) mezi šaržemi je zobrazeno v Tabulce 8.

Tabulka 8. Přesnost protilátky VENTANA anti-PMS2 (A16-4) mezi jednotlivými šaržemi měřená pomocí klinického statusu (Intaktní nebo Ztráta)

Přesnost	Klinický status	Shoda			
		Typ	n/N	%	95% CI
Mezi jednotlivými šaržemi	Intaktní	PPA	44/44	100,0	(92,0;100,0)
	Ztráta	NPA	43/43	100,0	(91,8;100,0)
	Celkem	OPA	87/87	100,0	(95,8;100,0)

Poznámka: 95% CI byly vypočítány metodou stanovení (Wilsonova) skóre.

### Studie reprodukovatelnosti mezi laboratořemi

Studie mezilaboratorní reprodukovatelnosti VENTANA MMR IHC Panel byla provedena za účelem prokázání reprodukovatelnosti každého testu VENTANA MMR IHC Panel ke stanovení klinického statusu. Tato studie zahrnovala 6 vzorků tkáně CRC (3 Intaktní a 3 Ztráty) pro každý protein MMR a 16 vzorků tkáně CRC (8 pozitivních a 8 negativních) pro BRAF V600E spuštěné na 3 přístrojích BenchMark ULTRA v každý z 5 po sobě nenásledujících dní po 21 dní ve třech externích laboratořích. Každé sklíčko s barvením protilátkou bylo spárováno se sklíčkem barveným H&E a Negative Reagent Control ze stejného případu. Všechna sklíčka byla randomizována a hodnocena celkem 6 pracovníky (2 pracovníci/laboratoř), kteří byli zaslepeni vůči klinickému statusu MMR studijní skupiny. Každý ze 40 případů ve studii měl 30 pozorování napříč všemi dny, pracovišti a pracovníky. Referenční status modálního případu byl odvozen pro každý z případů na základě nejčastěji pozorovaného statusu ze 30 pozorování. Tato studie zahrnovala celkem 1 200 pozorování pro všech pět proteinů. U všech hodnotitelných případů byl podíl přijatelnosti pro morfologii a pozadí v této studii 100 %. Shrnutí poolovaných (pro všech pět proteinů) statistik shody mezi referenčním statusem modálního případu a jednotlivými pozorováními jsou uvedeny v Tabulce 9.

Tabulka 9. Shoda mezi VENTANA MMR IHC Panel a referenčním statusem modálního případu

Opakovatelnost mezi laboratořemi	Klinický status	Shoda			
		Typ	n/N	%	95% CI
Všechny proteiny	Intaktní/positivní	PPA	598/600	99,8	(98,7;100,0)
	Ztráta/negativní	NPA	593/600	98,9	(97,4; 99,5)
	Celkem	OPA	1191/1200	99,4	(98,6; 99,7)

Poznámka: Klinický status je definován jako Intaktní nebo Ztráta pro expresi proteinu MMR a pozitivní či negativní pro protein BRAF V600E. 95% CI byly vypočteny pomocí generalizovaného lineárního smíšeného modelu (GLMM).

Kromě toho byla provedena párová srovnání mezi pracovišti, mezi dnem a mezi pracovníky pro protilátku VENTANA anti-PMS2 (A16-4). U PMS2 tato studijní sada zahrnovala celkem 180 pozorování. Souhrn výsledků naleznete v tabulce 10. Údaje indikují reprodukovatelnost analýzy napříč 5 dny, 3 pracovišti a 6 pracovníky.

**Tabulka 10.** Podíl párové shody při hodnocení mezilaboratorní reprodukovatelnosti pro protilátku VENTANA anti-PMS2 (A16-4) měřené klinickým statusem (Intaktní nebo Ztráta)

Opakovatelnost mezi laboratořemi		Shoda			
		Typ	n/N	%	95% CI
Mezi pracovišti (3 pracoviště)		APA	344/360	95,6	(90,7;100,0)
		ANA	344/360	95,6	(90,7;100,0)
		OPA	344/360	95,6	(91,1;100,0)
Mezi dny (5 po sobě nenásledujících dní)	Pracoviště A	APA	120/120	100,0	(96,9;100,0)
		ANA	120/120	100,0	(96,9;100,0)
		OPA	120/120	100,0	(96,9;100,0)
	Pracoviště B	APA	120/120	100,0	(96,9;100,0)
		ANA	120/120	100,0	(96,9;100,0)
		OPA	120/120	100,0	(96,9;100,0)
	Pracoviště C	APA	104/120	86,7	(69,2;100,0)
		ANA	104/120	86,7	(69,2;100,0)
		OPA	104/120	86,7	(73,3;100,0)
Mezi pracovníky (2 patologové na pracoviště)		APA	90/90	100,0	(95,9;100,0)
		ANA	90/90	100,0	(95,9;100,0)
		OPA	90/90	100,0	(95,9;100,0)

Poznámka: 95% CI byly vypočítány metodou percentilu bootstrap; v případech, kdy činil odhad bodů 100 %, byla použita metoda stanovení (Wilsonova) skóre.

### Studie přesnosti: Metodické srovnání výsledků VENTANA MMR IHC Panel s molekulárním testováním (DNA sekvenování a hypermethylace promotéru MLH1)

Byla provedena studie srovnávající výkon VENTANA MMR IHC Panel s molekulárním testováním včetně rozsáhlého panelu sekvenování DNA tlustého střeva pro identifikaci CRC, které (i) jsou MMR deficientní (dMMR) a (ii) obsahují mutaci *BRAF V600E*. Panel sekvenování DNA tlustého střeva zahrnoval genomickou analýzu variant přítomných v genech MMR (*MLH1*, *PMS2*, *MSH2*, *MSH6*, *EPCAM*), *BRAF* a dalších genech důležitých při karcinogenezi (např. *PIK3CA*, *KRAS*, *NRAS*, *ERBB2*, atd.). Sekvenování zahrnovalo všechny exony, intronové a flanking sekvence, stejně jako velké delece, duplikace a mozaiky.

Pro tuto studii byly sekvenční případy CRC barveny pomocí H&E a hodnoceny na indikace řádné fixace a morfologie včetně přítomnosti buněčných elementů (nádorové buňky a buňky interní kontroly). Každý případ byl hodnocen pro stanovení toho, zda vzorek obsahoval minimálně 50 % obsahu nádoru, aby poskytl dostatečné zastoupení nádorových buněk ve vzorku, jak je doporučeno pro molekulární testování. Po kontrole bylo do této studie přijato 105 po sobě následujících případů splňujících tato kritéria. Kromě toho bylo přijato 13 případů CRC vykazujících klinický status Ztráta podle IHC, aby bylo zajištěno zastoupení ztráty každého markeru ve studii. Řezy byly ve všech případech ve studii barveny IHC s VENTANA MMR IHC Panel a vhodnými kontrolami Negative Reagent Control. Další řezy byly vystaveny panelu sekvenování DNA tlustého střeva. Hypermethylace promotéru *MLH1* je jedním z mechanismů, které mohou vést ke ztrátě exprese proteinu *MLH1*, a je spojena se sporadickými CRC, nikoli s diagnózou Lynchova syndromu. Proto všechny případy ztráty *MLH1* identifikované pomocí IHC ve studii byly testovány na hypermethylaci promotéru *MLH1*.

V konečné studii 118 případů analýza zahrnovala PPA a NPA pro všechny markery poolované (tj. všechna pozorování poolována), kde molekulární testování sloužilo jako referenční status pro IHC srovnání. Analýza zahrnovala srovnání statusu proteinu MMR (Intaktní/Ztráta) s molekulárním statusem definovaným jako Normální (bez patologických mutací), negativní na hypermethylaci promotéru *MLH1* a *BRAF* divokého typu (bez mutace *V600E*) nebo Abnormální (přítomnost patogenních mutací, pozitivní na

hypermethylaci promotéru *MLH1* a/nebo pozitivní na mutaci *BRAF V600E*). Bodové odhady byly 99,4 % PPA, 93,5 % NPA a 98,8 % OPA, jak ukazuje Tabulka 11.

Poolovaná analýza srovnávající čtyři MMR IHC markery (bez protilátky VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) s molekulárním testováním byla rovněž provedena. Bodové odhady byly 99,3 % PPA, 89,7 % NPA a 98,5 % OPA, jak je shrnuto v Tabulce 12.

Další analýza srovnávala výsledky čtyř markerů MMR IHC s výsledky molekulárního testování na geny MMR na úrovni případů tak, aby byl zahrnut status všech markerů a vytvořen výstup dMMR/pMMR pro tyto dvě metody. Tato analýza je zobrazena v Tabulce 13 a vykazuje OPA 97,4 % mezi těmito dvěma metodami.

IHC MMR status a status molekulárního testování MMR byly také srovnávány pro individuální markery MMR v této studii. OPA každého markeru MMR při srovnání s kombinovanými výsledky panelu sekvenování DNA tlustého střeva a testování hypermethylace promotéru *MLH1* byla 100,0 % pro protilátku VENTANA anti-*MLH1* (M1), 99,1 % pro protilátku VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody, 98,3 % pro protilátku VENTANA anti-*MSH2* (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody a 96,6 % pro protilátku VENTANA anti-*MSH6* (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody.

Klinický status *BRAF V600E* v CRC získaný pomocí IHC s použitím protilátky VENTANA anti-*BRAF V600E* (VE1) byl také srovnán s výsledky mutačního statusu *BRAF* stanovenými sekvenováním DNA. PPA, NPA a OPA IHC testování pomocí protilátky použitím protilátky VENTANA anti-*BRAF V600E* (VE1) pomocí sekvenování DNA jako reference všechny představovaly 100 % (Tabulka 14). Další testování bylo provedeno k ověření schopnosti protilátky VENTANA anti-*BRAF V600E* (VE1) dále stratiifikovat případy CRC vykazující ztrátu exprese proteinu *MLH1*. Z 23 případů pozitivních *BRAF V600E* mělo 20 případů ztrátu proteinu *MLH1* pomocí IHC a bylo pozitivních na hypermethylaci promotéru *MLH1*. Tyto údaje jsou konzistentní s úzkou spojitostí pozitivního statusu *BRAF V600E* se statusem hypermethylace promotéru *MLH1*. Zbývající tři případy byly pMMR (intaktní pro všechny proteiny MMR). Všechny *BRAF V600E* pozitivní vzorky byly identifikovány jako sporadické CRC. Výsledky ověřily, že protilátka VENTANA anti-*BRAF V600E* (VE1) správně identifikuje CRC mající mutaci *BRAF V600E*. Tyto údaje také podpořily požití protilátky VENTANA anti-*BRAF V600E* (VE1) k diferenciaci mezi sporadickým CRC a CRC s pravděpodobným Lynchovým syndromem za nepřítomnosti exprese *MLH1*.

**Tabulka 11.** Poolovaná analýza shody VENTANA MMR IHC Panel mezi IHC a molekulárním testováním

Status* (Molekulární/IHC)	Shoda			
	Typ	n/N	%	95% CI
Normální/Intaktní	PPA	523/526	99,4	(98,7;100,0)
Abnormální/Ztráta	NPA	58/62	93,5	(87,1; 98,6)
Celkem	OPA	581/588	98,8	(98,0; 99,7)

\*Pro IHC je MMR s Intaktní nebo Ztráta exprese proteinu. Pro tuto analýzu byly *BRAF V600E* negativní a pozitivní případy zahrnuty do kategorie Intaktní, respektive Ztráta. Molekulární testování indikuje nepřítomnost (Normální) nebo přítomnost (Abnormální) potenciálních patogenních mutací nebo hypermethylace promotéru *MLH1*. 95% CI byly vypočítány metodou percentilu bootstrap.

**Tabulka 12.** Poolovaná analýza pro čtyři markery MMR IHC (bez protilátky VENTANA anti-*BRAF V600E* (VE1)) Shoda mezi IHC a molekulárním testováním

Status* (Molekulární/IHC)	Shoda			
	Typ	n/N	%	95% CI
Normální/Intaktní	PPA	428/431	99,3	(98,4;100,0)
Abnormální/Ztráta	NPA	35/39	89,7	(79,4; 97,7)
Celkem	OPA	463/470	98,5	(97,3; 99,6)

\*Pro IHC je status Intaktní nebo Ztráta exprese proteinu. Molekulární testování indikuje nepřítomnost (Normální) nebo přítomnost (Abnormální) potenciálních patogenních mutací nebo hypermethylace promotéru *MLH1*. 95% CI byly vypočítány metodou percentilu bootstrap.

**Tabulka 13.** Shoda mezi čtyřmi markery MMR IHC a výsledky molekulárního testování pro status MMR (dMMR/pMMR)

Status MMR*	Shoda			
	Typ	n/N	%	95% CI
pMMR	PPA	79/80	98,8	(93,3;99,8)
dMMR	NPA	35/37	94,6	(82,3; 98,5)
Celkem	OPA	114/117	97,4	(92,7; 99,1)

\*Pro IHC je pMMR status pro daný případ představován statusem Intaktní pro všechny proteiny MMR, zatímco status dMMR je představován Ztrátou jednoho nebo více proteinů MMR. Pro molekulární testování je pMMR status představován absencí patogenních mutací nebo hypermethylací promotéru MLH1, zatímco status dMMR je představován přítomností patogenních mutací nebo hypermethylace promotéru MLH1. 95% CI byly vypočítány metodou stanovení (Wilsonova) skóre.

**Tabulka 14.** Shoda mezi IHC pomocí protilátky VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) a molekulárním testováním

BRAF V600E Status (Molekulární/IHC)	Shoda			
	Typ	n/N	%	95% CI
Pozitivní/Abnormální	PPA	23/23	100,0	(85,7; 100,0)
Negativní/Normální	NPA	95/95	100,0	(96,1; 100,0)
Celkem	OPA	118/118	100,0	(96,8; 100,0)

Status pro BRAF V600E byl definován jako Pozitivní nebo Negativní IHC výsledky a Abnormální (přítomnost mutace V600E) nebo Normální (BRAF divokého typu) výsledky molekulárním testováním. 95% CI byly vypočítány metodou stanovení (Wilsonova) skóre.

## LITERATURA

- Yuan L, Chi Y, Chen W, Chen X, Wei P, et al. Immunohistochemistry and microsatellite instability analysis in molecular subtyping of colorectal carcinoma based on mismatch repair competency. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(11):20988-21000.
- Geiersbach KB, Samowitz WS. Microsatellite instability and colorectal cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135(10):1269-1277.
- Wright CL, Stewart ID. Histopathology and mismatch repair status of 458 consecutive colorectal carcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2003;27(11):1393-1406.
- Tiwari AK, Roy HK, Lynch HT. Lynch syndrome in the 21st century: clinical perspectives. *QJM.* 2016;109(3):151-158.
- Buza N, Ziai J, Hui P. Mismatch repair deficiency testing in clinical practice. *Expert Rev Mol Diagn.* 2016;16(5):591-604.
- Silva FCC, Torrezan GT, Ferreira JRO, Oliveira LP, Begnami M, et al. Germline Mutations in MLH1 Leading to Isolated Loss of PMS2 Expression in Lynch Syndrome: Implications for Diagnostics in the Clinic. *Am J Surg Pathol.* 2017;41(6):861-864.
- Boyer JC, Umar A, Risinger JI, Lipford JR, Kane M, et al. Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and genetic defects in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 1995;55(24):6063-6070.
- Lawes DA, Pearson T, Sengupta S, Boulous PB. The role of MLH1, MSH2 and MSH6 in the development of multiple colorectal cancers. *Br J Cancer.* 2005;93(4):472-477.
- Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2003;348(10):919-932.
- Peltomaki P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol.* 2003;21(6):1174-1179.
- Lynch HT, Smyrk T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). An updated review. *Cancer.* 1996;78(6):1149-1167.
- Caldes T, Godino J, Sanchez A, Corbacho C, De la Hoya M, et al. Immunohistochemistry and microsatellite instability testing for selecting MLH1, MSH2 and MSH6 mutation carriers in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2004;12(3):621-629.
- Shia J, Klimstra DS, Nafa K, Offit K, Guillem JG, et al. Value of immunohistochemical detection of DNA mismatch repair proteins in predicting germline mutation in hereditary colorectal neoplasms. *Am J Surg Pathol.* 2005;29(1):96-104.
- Cunningham JM, Tester DJ, Thibodeau SN. Mutation detection in colorectal cancers : direct sequencing of DNA mismatch repair genes. *Methods Mol Med.* 2001;50:87-98.
- Domingo E, Laiho P, Ollikainen M, Pinto M, Wang L, et al. BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *J Med Genet.* 2004;41(9):664-668.
- Jim M, Hampel H, Zhou X, Schunemann L, Yearsley M, et al. BRAF V600E mutation analysis simplifies the testing algorithm for Lynch syndrome. *Am J Clin Pathol.* 2013;140(2):177-183.
- Deng G, Bell I, Crawley S, Gum J, Terdiman JP, et al. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10(1 Pt 1):191-195.
- Giardiello FM, Allen JI, Axilbund JE, Boland CR, Burke CA, et al. Guidelines on Genetic Evaluation and Management of Lynch Syndrome: A Consensus Statement by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Diseases of the Colon & Rectum.* 2014;57(8):1025-1048.
- Egoavil C, Alenda C, Castillejo A, Paya A, Peiro G, et al. Prevalence of Lynch syndrome among patients with newly diagnosed endometrial cancers. *PLoS One.* 2013;8(11):e79737.
- Connell LC, Mota JM, Braghiroli MI, Hoff PM. The Rising Incidence of Younger Patients With Colorectal Cancer: Questions About Screening, Biology, and Treatment. *Curr Treat Options Oncol.* 2017;18(4):23.
- Provenzale D, Gupta S, Ahnen DJ, Bray T, Cannon JA, et al. Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal Version 1.2016. *NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology.* *J Natl Compr Canc Netw.* 2016;14(8):1010-1030.
- Balmansa J, Balaguer F, Cervantes A, Arnold D, Group EGW. Familial risk-colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol.* 2013;24 Suppl 6:v73-80.
- Evaluation of Genomic Applications in P, Prevention Working G. Recommendations from the EGAPP Working Group: genetic testing strategies in newly diagnosed individuals with colorectal cancer aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome in relatives. *Genet Med.* 2009;11(1):35-41.
- Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(4):261-268.
- Parsons MT, Buchanan DD, Thompson B, Young JP, Spurdle AB. Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. *J Med Genet.* 2012;49(3):151-157.
- Shia J. Evolving approach and clinical significance of detecting DNA mismatch repair deficiency in colorectal carcinoma. *Semin Diagn Pathol.* 2015;32(5):352-361.
- Thiel A, Heinonen M, Kantonen J, Gylling A, Lahtinen L, et al. BRAF mutation in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. *Virchows Arch.* 2013;463(5):613-621.
- Toon CW, Chou A, DeSilva K, Chan J, Patterson J, et al. BRAFV600E immunohistochemistry in conjunction with mismatch repair status predicts survival in patients with colorectal cancer. *Mod Pathol.* 2014;27(5):644-650.
- Koinuma K, Shitoh K, Miyakura Y, Furukawa T, Yamashita Y, et al. Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas. *Int J Cancer.* 2004;108(2):237-242.
- Carson FL, Hladik C, Cappellano CH. *Pathology ASfC. Histotechnology: A Self-Instructional Text: American Society for Clinical Pathology;* 2015.
- CSLI. *Quality Assurance for Design Control and Implementation of Immunohistochemistry Assays: Approved Guideline-Second Edition.* CLSI document I/LA28-A2 (ISBN 1-56238-745-6). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 2011.
- Roche PC, Hsi ED, Firfer BL. *Immunohistochemistry: Principles and Advances. Manual of Molecular and Clinical Laboratory Immunology, 7th Edition: American Society of Microbiology;* 2006.
- Rabinovitch A. The College of American Pathologists laboratory accreditation program. *Accreditation and Quality Assurance.* 2002;7(11):473-476.



#### DUŠEVNÍ VLASTNICTVÍ

VENTANA, BENCHMARK, OPTIVIEW a logo VENTANA jsou ochrannými známkami společnosti Roche.

Všechny další ochranné známky patří příslušným vlastníkům.

© 2018 Ventana Medical Systems, Inc.

#### KONTAKTNÍ INFORMACE



Ventana Medical Systems, Inc.  
1910 E. Innovation Park Drive  
Tucson, Arizona 85755  
USA  
+1 520 887 2155  
+1 800 227 2155 (USA)



[www.ventana.com](http://www.ventana.com)



Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Strasse 116  
D-68305 Mannheim  
Germany