

## VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

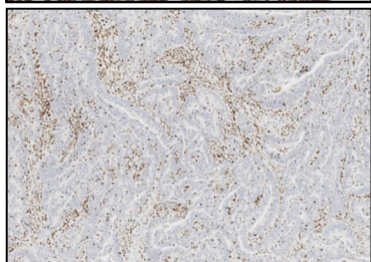
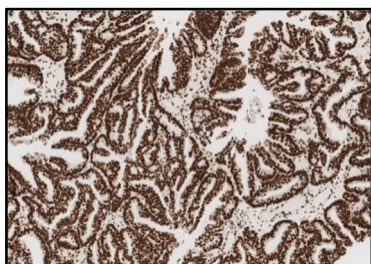
Pro použití s panelem VENTANA MMR RxDx Panel

Pro použití s panelem VENTANA MMR IHC Panel

**REF** 760-5092

08033676001

**IVD** 50



Obr. 1. Barvení s protilátkou VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody s intaktní expresí (nahore) nebo se ztrátou exprese (dole) v tkáni karcinomu endometria.

### URČENÉ POUŽITÍ

Protílátka VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (protílátka VENTANA anti-MSH6 (SP93)) je určena k laboratornímu použití při kvalitativní imunohistochemické detekci proteinu MSH6 v řezech tkáně fixovaných formalínem, zalitých parafínem (FFPE) pomocí světelné mikroskopie.

Protílátka VENTANA anti-MSH6 (SP93) je připravena k použití v přístrojích BenchMark ULTRA, XT a GX s detekčními soupravami OptiView DAB IHC Detection Kit a přídatnými reagenциemi.

Protílátka VENTANA anti-MSH6 (SP93) je součástí panelu VENTANA MMR RxDx Panel a panelu VENTANA MMR IHC Panel, viz Tab. 1.

BRAF- VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody

Výsledky testu u tohoto panelu musejí být interpretovány kvalifikovaným patologem v kombinaci s histologickým vyšetřením, relevantními klinickými informacemi a správnými kontrolami.

Tento produkt je určen pro diagnostické použití in vitro (IVD).

### SOUHRN A VYSVĚTLENÍ

Protílátka VENTANA anti-MSH6 (SP93) je klíčící monoklonální protílátka vyrobená proti syntetickému peptidu odpovídající vnitřnímu regionu lidského proteinu MSH6. Protílátka VENTANA anti-MSH6 (SP93) rozpoznává MSH6, což je jeden z několika klinicky důležitých proteinů opravy záměny bází DNA (MMR).<sup>1,2</sup> Protílátka VENTANA anti-MSH6 (SP93) je součástí panelů VENTANA MMR RxDx Panel a VENTANA MMR IHC Panel, což jsou systémy založené na imunohistochemii (IHC) pro identifikaci nádorů s nedostatečnou expresí některého ze 4 proteinů MMR (např. MLH1, PMS2, MSH2, MSH6), které jsou běžně všudypřítomně exprimovány v proliferujících normálních a maligních buňkách.<sup>3</sup> Tyto nádory se považují za nádory MMR deficientní (dMMR).

MMR je konzervovaný molekulární mechanismus, jehož funkcí je oprava nesprávných substitucí bází, k nimž spontánně dochází během replikace DNA.<sup>4</sup> Metody založené na polymerázové řetězové reakci (PCR) ukázaly, že selhání mechanismu MMR často vede k mikrosatelitní nestabilitě (MSI), což je stav, kdy jsou do DNA vloženy krátké tandemové repetice nukleotidů.<sup>5,6,7</sup> Když je počet repetic roven 30 % analyzovaných mikrosatelitových lokusů nebo větší, lze MSI dále charakterizovat jako MSI-High (MSI-H). Defekty v MMR aparátu byly přičítány mutacím v MMR proteinech, nejčastěji MLH1, PMS2, MSH2 a MSH6.

Proteiny MLH1 a PMS2 běžně fungují společně v heterodimerním komplexu, stejně jako proteiny MSH2 a MSH6. Když MMR funguje běžným způsobem, heterodimer MSH6/MSH2 se váže na neodpovídající DNA. Tato vazba indukuje konformační změnu, díky níž se heterodimer MLH1/PMS2 může vázat na komplex MSH6/MSH2 navázaný na DNA, což vede k excizní opravě poškozené DNA.<sup>7,8</sup> Mutace v těchto proteinech nebo jejich nedostatky vedou k časté MSI a somatické mutaci v důsledku chyby replikace. Testování MMR IHC může být užitečné při identifikaci nádorů se změnami v MMR.<sup>9</sup>

### KLINICKÝ VÝZNAM

#### Karcinom endometria (EC)

EC je nejčastějším gynekologickým maligním onemocněním a čtvrtým nejčastějším karcinomem u žen v Severní Americe.<sup>10,11</sup> Jedná se o jednu z hlavních příčin úmrtí souvisejících s rakovinou na světě.<sup>12</sup> Je známo, že EC často vykazuje mnoho genetických změn, včetně MSI.<sup>10</sup> Přibližně 20–40 % karcinomů endometria je dMMR nebo vykazuje MSI.<sup>13,14,15</sup> Zatímco léčba karcinomu endometria se liší v závislosti na stupni, histologii a stadiu onemocnění, hodnocení stavu MMR tumorů EC je užitečné pro prognózu a řízení léčby.<sup>16</sup>

Terapeutické strategie lékařů přetvářejí nově se objevující imunoterapie, zejména ty, které modifikují buněčné dráhy zahrnující proteiny programované buněčné smrti 1 (PD-1) nebo proteiny programované buněčné smrti ligandu 1 (PD-L1). PD-1 je inhibiční receptor exprimovaný na T-buňkách po aktivaci T-buněk, který je udržován ve stavech chronické stimulace, jako je chronická infekce nebo rakovina.<sup>17</sup> Exprese PD-L1 byla pozorována v imunitních buňkách a maligních buňkách a bylo uvedeno, že aberantní exprese PD-L1 na nádorových buňkách brání protinádorové imunitě, což vede k úniku imunitní odpovědi.<sup>17,18</sup> Přerušení dráhy PD-L1/PD-1 představuje tedy zajímavou strategii pro znovuoživení nádorově specifické imunity T-buněk. Několik studií prokázalo, že deficiencie MMR koreluje s vyšší expresí PD-1 nebo PD-L1, pravděpodobně kvůli zvýšené expresi neoantigenů, která je spojená se zátěží mutací nádorů, jež je výsledkem chyb replikace.<sup>10,19</sup> MMR proteiny tedy mohou být užitečné jako prediktivní biomarkery pro terapii cílenou na PD-1; konkrétně může ztráta exprese jednoho nebo více MMR proteinů predikovat zvýšenou pravděpodobnost reakce na takovou terapii.<sup>20,21,22</sup> Inhibitory PD-1 mohou být prospěšné u rakoviny s vysokou frekvencí deficiencie MMR a/nebo MSI-H, například karcinomu endometria.<sup>19,20,22</sup> Pacientky s EC, u kterých se uvažuje o léčbě cílené na PD-1, proto budou mít prospěch z doprovodného diagnostického testu (CDx), který určí, zda mohou být vhodné pro léčbu s inhibicí kontrolního bodu PD-1 nebo PD-L1.

Ztráta exprese kteréhokoliv ze základních MMR proteinů, včetně MLH1, PMS2, MSH2 nebo MSH6, způsobuje deficienci MMR. Protílátka VENTANA anti-MSH6 (SP93), jako součást panelu VENTANA MMR RxDx Panel, slouží jako pomůcka při určování stavu MMR IHC nádorů tím, že je klasifikuje jako intaktní nebo se ztrátou exprese MMR proteinu. Přítomnost barvení všech čtyř proteinových markerů MMR v nádoru pomocí panelu VENTANA MMR RxDx Panel ukazuje, že se jedná o MMR proficientní případ

Tab. 1. Diagnostické indikace pro panely VENTANA MMR Panel.

Název panelu	Panel protílátka [a]	Klinická aplikace
VENTANA MMR RxDx Panel	MLH1, PMS2, MSH2 a MSH6	Panel VENTANA MMR RxDx Panel je indikován jako pomůcka při identifikaci pacientek s deficientním MMR (dMMR) karcinomem endometria, které jsou vhodné pro léčbu přípravkem JEMPERLI (dostarlimabem) v souladu se schváleným označením terapeutického přípravku.
VENTANA MMR IHC Panel	MLH1, PMS2, MSH2, MSH6 a BRAF V600E	Panel VENTANA MMR IHC Panel je indikován pro detekci nedostatku proteinu jako test pro identifikaci jedinců s rizikem Lynchova syndromu u pacientů s diagnostikovaným kolorektálním karcinomem (CRC) a se stavem BRAF V600E coby pomůcka pro diferencování mezi sporadickým a pravděpodobným Lynchovým syndromem CRC za nepřítomnosti exprese proteinu MLH1.

[a] MLH1- VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody  
PMS2- VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody  
MSH2- VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody  
MSH6- VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

(pMMR). Nepřítomnost barvení pro některý z markerů MMR proteinů pomocí panelu VENTANA MMR RxDx Panel naznačuje, že se jedná o případ dMMR.

### Kolorektální karcinom (CRC) a Lynchův syndrom

Kolorektální karcinom je třetí nejčastější karcinom a v pořadí čtvrtá z nejprevalentnějších příčin úmrtí na rakovinu na světě.<sup>23</sup> Většina kolorektálních karcinomů vykazuje chromosomální nestabilitu, avšak přibližně 15 % karcinomů se vyvíjí alternativní cestou, charakterizovanou vadnou funkcí systému opravy záměny bází DNA (mismatch repair (MMR)). Kolorektální karcinomy dMMR jsou často špatně diferencované a často vykazují predominanci proximálního tlustého střeva, mucinózní nebo medulární histologické charakteristiky nebo histologické charakteristiky typu pečetního prstenu a zvýšený počet lymfocytů infiltrujících nádor.<sup>24,25</sup> Obecně může být deficeience MMR způsobena buď mutacemi zárodečné linie v jednom z genů MMR s následnou ztrátou odpovídající normální alely prostřednictvím genetického nebo epigenetického mechanismu, somatických mutací v alelách, anebo epigenetickou inaktivací genu MLH1 metylací.<sup>26</sup> Lynchův syndrom byl popsán v 60. letech 20. století a identifikován jako spojený mezi ztrátou funkce MMR a rakovinou.<sup>27</sup> Ztráta proteinů MMR (MLH1, PMS2, MSH2 nebo MSH6) může vést k MSI a vyššímu celoživotnímu riziku nejen kolorektálního karcinomu, ale také rakoviny žaludku, mozku, slinivky, kůže, endometria a vaječníků. Pacienti s Lynchovým syndromem mají 50–80% celoživotní riziko kolorektálního karcinomu.<sup>7,28,29</sup> Lynchův syndrom je jedinečný oproti jiným dědičným syndromům rakoviny, protože přímé testování nádorové tkáně pomáhá v identifikaci pacientů, kteří jsou ohroženi Lynchovým syndromem, a pomáhá k informování o následném genetickém testování zárodečné linie. Rodiny s Lynchovým syndromem mají výhodu v pokročilých protokolech screeningu rakoviny.

Různé pokyny, včetně pokynů National Comprehensive Cancer Network (NCCN), doporučují, aby bylo u všech kolorektálních karcinomů provedeno vyšetření na potenciální Lynchův syndrom pro identifikaci pacientů a rodin, které budou mít prospěch z dalšího genetického testování a poradenství.<sup>27,30,31,32,33</sup> Použití panelu VENTANA MMR IHC Panel pomůže stanovit stav MMR kolorektálního karcinomu jeho klasifikací jako intaktního nebo se ztrátou exprese proteinu MMR. Ztráta exprese MLH1 nebo MSH2 je téměř vždy provázena ztrátou jejich heterodimerního partnera PMS2, respektive MSH6. Ztráta PMS2 nebo MSH6 však nevede ke ztrátě MLH1 nebo MSH2. Ztráta PMS2, MSH2 a/nebo MSH6 je konzistentní s pravděpodobným Lynchovým syndromem a pacienti je třeba doporučit k dalšímu vyšetření a poradenství v souladu s klinickou praxí.

Ztráta proteinu MLH1 může indikovat sporadický nebo pravděpodobný výskyt Lynchova syndromu. Při 15% nebo sporadičtějším kolorektálním karcinomu je ztráta proteinu MLH1 způsobena hypermethylací promotoru MLH1.<sup>7,34,35</sup> Je významné, že je pozorována mutace BRAF V600E přibližně u dvou třetin nádorů se ztrátou exprese MLH1 z hypermethylace promotoru MLH1. Oproti tomu je mutace BRAF V600E pozorována u nádorů s Lynchovým syndromem velmi zřídka.<sup>34</sup> Proto pokud výsledek protilátky VENTANA anti-MLH1 (M1) indikuje ztrátu proteinu MLH1, protilátka VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) může stratifikovat nádor jako sporadický nebo pravděpodobný Lynchův syndrom.<sup>7,36</sup> V kolorektálním karcinomu ztráta proteinu MLH1 s pozitivním stavem BRAF V600E silně indikuje, že nádor je výsledkem sporadického výskytu, v podstatě s eliminací Lynchova syndromu jako výchozí příčiny malignity.<sup>37,38</sup> Když je ztráta proteinu MLH1 provázena negativním stavem BRAF V600E, je ztráta MLH1 konzistentní s vysokou pravděpodobností Lynchova syndromu.<sup>39</sup>

### PRINCIP POSTUPU

Protilátka VENTANA anti-MSH6 (SP93) je králičí monoklonální protilátka vyrobená proti syntetickému peptidu odpovídající vnitřnímu regionu lidskému proteinu MSH6. Protilátka VENTANA anti-MSH6 (SP93) se váže na protein MSH6 v tkáňových řezech FFPE. Protilátku lze lokalizovat s použitím haptenované sekundární protilátky s následným multimerním konjugátem anti-hapten-HRP (OptiView DAB IHC Detection Kit, kat. č. 760-700 / 06396500001). Specifický komplex protilátky a enzymu je poté vizualizován produktem precipitační enzymové reakce. Každý krok se inkubuje po přesnou dobu a při přesné teplotě. Přístroj BenchMark ULTRA na konci každého kroku inkubace promyje fezy, aby zastavil reakci a odstranil nenavázaný materiál, který by bránil reakci v následných krocích. To platí také ULTRA LCS (Predilute) (kat. č. 650-210 / 05424534001) nebo LCS (Predilute) (kat. č. 650-010 / 05264839001), který minimalizuje odpařování vodných reagentů ze sklička se vzorkem.

Kromě obarvení protilátkou VENTANA anti-MSH6 (SP93) by mělo být provedeno obarvení druhého sklička králičí monoklonální negativní reagenční kontrolou Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (kat. č. 790-4795 / 06683380001). Negativní reagenční kontrola se používá k posouzení barvení pozadí.

### DODÁVANÝ MATERIÁL

Protilátka VENTANA anti-MSH6 (SP93) obsahuje dostatečné množství reagentie pro 50 testů.

Jeden 5 mL dávkovač protilátky VENTANA anti-MSH6 (SP93) obsahuje přibližně 5 µg králičí monoklonální protilátky.

Protilátka je naředěna v Tris-HCl s obsahem nosičového proteinu a 0.10 % konzervačního prostředku ProClin 300.

Koncentrace specifické protilátky je přibližně 1 µg/mL. Pro tento produkt není známa žádná nespecifická reaktivita protilátky.

Protilátka VENTANA anti-MSH6 (SP93) je rekombinantní králičí monoklonální protilátka vyráběná jako purifikovaný supernatant buněčné kultury.

Podrobné pokyny pro interpretaci barvení s panelem VENTANA MMR RxDx Panel nebo VENTANA MMR IHC Panel ve specifických indikacích naleznete v příslušné interpretační příručce:

- VENTANA MMR RxDx Panel Interpretation Guide for EC indication (P/N 1020315EN)
- Interpretation Guide for Staining Colorectal Tissue for VENTANA MMR IHC Panel (P/N 1016703EN)

V metodickém listu k příslušné detekční soupravě VENTANA naleznete podrobné popisy: principu postupu, materiálu a metod, odběru vzorků a přípravy pro analýzu, postupů kontroly kvality, řešení problémů, interpretace výsledků a omezení.

### POTŘEBNÉ MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY

Barvicí reagentie, například detekční soupravy VENTANA a pomocné materiály, včetně skliček pro negativní a pozitivní kontrolu tkáně, nejsou součástí dodávky.

Všechny produkty uvedené v metodickém listu nemusejí být dostupné ve všech zeměpisných oblastech. Obráťte se na místní servisní zastoupení.

Následující reagentie a materiály jsou při barvení potřebné, nejsou však součástí dodávky:

1. Doporučená kontrolní tkáň
2. VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (kat. č. 760-5091 / 08033668001)
3. VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody (kat. č. 760-5094 / 08033692001)
4. VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody (kat. č. 760-5093 / 08033684001)
5. Pouze pro panel VENTANA MMR IHC Panel: VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (kat. č. 760-5095 / 08033706001)
6. Negative Control (Monoclonal) (kat. č. 760-2014 / 05266670001)
7. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (kat. č. 790-4795 / 06683380001)
8. Mikroskopická sklička, kladně nabitá
9. OptiView DAB IHC Detection Kit (kat. č. 760-700 / 06396500001)
10. Pouze pro primární protilátku VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody: amplifikační souprava OptiView Amplification Kit (kat. č. 760-099 / 06396518001 nebo kat. č. 860-099 / 06718663001)
11. EZ Prep Concentrate (10X) (kat. č. 950-102 / 05279771001)
12. Reaction Buffer Concentrate (10X) (kat. č. 950-300 / 05353955001)
13. ULTRA LCS (Predilute) (kat. č. 650-210 / 05424534001)
14. LCS (Predilute) (kat. č. 650-010 / 05264839001)
15. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (kat. č. 950-224 / 05424569001)
16. Cell Conditioning Solution (CC1) (kat. č. 950-124 / 05279801001)
17. Hematoxylin II (kat. č. 790-2208 / 05277965001)
18. Bluing Reagent (kat. č. 760-2037 / 05266769001)
19. Trvalé fixační médium
20. Krycí sklo
21. Automatizovaný podavač krycích skliček
22. Obecné laboratorní vybavení
23. Přístroj BenchMark IHC/ISH

### SKLADOVÁNÍ A STABILITA

Po přijetí a mezi použitími uchovávejte při teplotě 2–8 °C. Nezmrazujte.

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

Každý dávkovač protilátky má stanovenou dobu expirace. Při řádném skladování zůstane reagenzie stabilní do data uvedeného na štítku. Po uplynutí data expirace reagenzi nepoužívejte.

### PŘÍPRAVA VZORKŮ

Pro použití této primární protilátky s detekčními soupravami VENTANA a přístroji BenchMark IHC/ISH jsou vhodné tkáně FFPE zpracované běžným způsobem. Tkáň by pro použití s protilátkami panelu VENTANA MMR RxDx Panel či VENTANA MMR IHC Panel měla být fixována bezprostředně po excizi. Ukázalo se, že prodleva fixace delší než 6 hodin má nepříznivý účinek na intenzitu barvení tkáně. Fixace tkání se doporučuje v 10% neutrálním pufovaném formalínu (NBF) po dobu nejméně 6 hodin a maximálně 72 hodin. Doby fixace kratší než 6 hodin a delší než 72 hodin mohou vést u MLH1 ke ztrátě zabarvení. Použité množství NBF by mělo odpovídat 15–20násobku objemu tkáně. Žádný fixativ nepronikne za 24 hodin více než 2 až 3 mm pevné tkáně nebo 5 mm porézní tkáně. Fixaci lze provádět při pokojové teplotě (15–25 °C).<sup>40,41,42</sup>

Fixativy, jako je zinkový formalin, Z-5, 95% alkohol, alkohol – formalin – kyselina octová (AFA) a fixativ PREFER, prokázaly slabé nebo proměnlivé barvení; jejich použití se pro tento test nedoporučuje. Uživatelé, kteří se odchylují od uvedené přípravy vzorků, musejí přijmout odpovědnost za interpretaci výsledků u pacientů.

Řezy by měly mít tloušťku přibližně 4 µm a měly by být fixovány na kladně nabitých sklíčkách. Žádné jiné tloušťky nebyly validovány. Sklíčka by měla být obarvena neprodleně, protože antigenost připravených tkáňových řezů se může v průběhu času snižovat a 45 dní po přípravě řezu z FFPE tkáňového bloku může být již ohrožena. Pro více informací požádejte místního zástupce společnosti Roche o kopii dokumentu „Recommended Slide Storage and Handling“, který uvádí doporučené postupy pro skladování sklíček a manipulaci s nimi.

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

### UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

1. Určeno k diagnostickému použití in vitro (IVD).
2. Pouze k odbornému použití.
3. UPOZORNĚNÍ: Federální zákony USA omezují prodej tohoto prostředku pouze lékařům nebo na jejich objednávku. (Rx Only).
4. Nepoužívejte nad rámec specifikovaného počtu testů.
5. Roztok ProClin 300 se používá v této reagenzi jako konzervační prostředek. Je klasifikován jako dráždivý a při styku s kůží může způsobit senzibilizaci. Při manipulaci dodržujte příslušná bezpečnostní opatření. Zamezte kontaktu reagenzi s očima, kůží a sliznicemi. Používejte ochranný oděv a rukavice.
6. Kladně nabitá sklíčka mohou být citlivá na zátěž prostředí, což má za následek nevhodné zbarvení. Požádejte zástupce společnosti Roche o další informace o tom, jak používat tyto typy sklíček.
7. S materiálem lidského nebo živočišného původu je třeba nakládat jako s nebezpečným biologickým materiálem a likvidovat jej v souladu s platnými bezpečnostními opatřeními. V případě expozice je potřeba se řídit zdravotnickými směrnici odpovědných orgánů.<sup>43,44</sup>
8. Zabraňte kontaktu reagenzi s očima a sliznicemi. Jestliže se reagenzie dostanou do kontaktu s citlivými oblastmi, omyjte zasažené oblasti vydatným množstvím vody.
9. Zabraňte mikrobiální kontaminaci reagenzi, mohla by způsobit nepřesnost výsledků.
10. Další informace o používání tohoto prostředku obsahuje uživatelská příručka přístroje BenchMark IHC/ISH a návody k použití všech nezbytných součástí, které naleznete na internetových stránkách [dialog.roche.com](http://dialog.roche.com).
11. Doporučené metody likvidace jsou uvedeny v celostátních a/nebo místních předpisech.
12. Označení produktu bezpečnostními štítky se řídí hlavně pokyny GHS EU. Pro profesionální uživatele je na vyžádání k dispozici bezpečnostní list.
13. Pro nahlášení podezřelých závažných incidentů týkajících se tohoto prostředku se obraťte na místního zástupce společnosti Roche a kompetentní orgány členského státu nebo země, ve které uživatel provozuje činnost.

Tento produkt obsahuje součásti klasifikované následovně podle nařízení (ES) č. 1272/2008:

Tab. 2. Informace o rizicích.

Riziko	Kód	Věta
Varování	H317	Může vyvolat alergickou kožní reakci.

Riziko	Kód	Věta
	H412	Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky.
	P261	Zamezte vdechování prachu/dýmu/plynu/mlhy/par/aerosolů.
	P273	Zabraňte uvolnění do životního prostředí.
	P280	Používejte ochranné rukavice.
	P333 + P313	Při podráždění kůže nebo vyrážce: Vyhledejte lékařskou pomoc / ošetření.
	P362 + P364	Kontaminovaný oděv svlékněte a před opětovným použitím vyperte.
	P501	Odstraňte obsah/obal předáním do schváleného zařízení k likvidaci odpadu.

Tento produkt obsahuje látku s č. CAS 55965-84-9, směs: 5-chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-onu a 2-methyl-2H-isothiazol-3-onu (3 : 1).

### POSTUP BARVENÍ

Protílátka VENTANA anti-MSH6 (SP93) byla vyvinuta pro použití v přístroji BenchMark IHC/ISH společně s detekční soupravou OptiView DAB IHC Detection Kit a přidavnými reagenziemi. Doporučený barvicí protokol pro panel VENTANA MMR RxDx Panel nebo VENTANA MMR IHC Panel uvádí Tab. 3.

Tato protílátka byla optimalizována pro specifické inkubační doby, uživatel však musí výsledky získané pomocí této reagenzie validovat. Vliv proměnlivého času a teploty při získávání antigenu (kondicionování buněk) a inkubaci protilátek dle doporučeného barvicího protokolu, viz Tab. 3, může mít za následek suboptimální barvení a falešně deficientní a falešně proficientní výsledky. Důrazně doporučujeme neodchylovat se od doporučeného barvicího protokolu (viz Tab. 3). Je třeba použít a zdokumentovat vhodné kontroly. Uživatelé, kteří se odchylují od uvedeného protokolu, musejí přijmout odpovědnost za interpretaci výsledků u pacientů.

Parametry automatických procesů lze zobrazit, vytisknout a upravovat podle postupů uvedených v uživatelské příručce přístroje. Další podrobné informace o postupech IHC barvení naleznete v metodickém listu k příslušné detekční soupravě VENTANA.

Tab. 3. Doporučený postup barvení a barvicí protokol panelu GX MMR Panel, XT MMR Panel a ULTRA MMR Panel pro protílátku VENTANA anti-MSH6 (SP93) a negativní kontrolu Rabbit Monoclonal Negative Control Ig s detekční soupravou OptiView DAB IHC Detection Kit na přístrojích BenchMark IHC/ISH pro panel VENTANA MMR RxDx Panel nebo VENTANA MMR IHC Panel.

Typ postupu	Metoda		
	GX	XT	ULTRA
Protílátka (primární)	Vybraná anti-MSH6 Rabbit Mono Ab nebo Vybraná Negative Control	Vybraná anti-MSH6 Rabbit Mono Ab nebo Vybraná Negative Control	Vybraná anti-MSH6 Rabbit Mono Ab nebo Vybraná Negative Control
Odparafinování	Zvoleno	Zvoleno	Zvoleno
Úprava buněk (odmaskování antigenu)	CC1, 64 minut	CC1, 64 minut	ULTRA CC1, 64 minut, 100 °C
Preprimární inhibitor peroxidázy	Zvoleno	Zvoleno	Zvoleno
Protílátka (primární)	12 minut, 37 °C	12 minut, 37 °C	12 minut, 36 °C
OptiView HQ Linker	8 minut (standardně)		
OptiView HRP Multimer	8 minut (standardně)		
Kontrastní barvivo	Hematoxylin II, 4 minuty		



Typ postupu	Metoda		
	GX	XT	ULTRA
Po kontrastním barvení	Bluing, 4 minuty		

Poznámka: Jakákoliv odchylka od doporučených postupů testu může výsledky zneplatnit. Musejí být použity a zdokumentovány příslušné kontroly. Uživatelé, kteří se odchylují od doporučených postupů testu, musejí přijmout odpovědnost za interpretaci výsledků u pacientů.

Vzhledem k různým způsobům fixace a zpracování tkání, jakož i obecnému stavu přístroje a podmínkám laboratorního prostředí může být potřeba prodloužit nebo zkrátit dobu inkubace primární protilátky a dobu inkubace s úpravou buněk v závislosti na jednotlivých vzorcích a preferenci patologa. Další informace o různých fixacích naleznete v příručce „Immunohistochemistry Principles and Advances“ (Zásady a postupy imunohistochemie).<sup>41</sup>

Pokud vnitřní pozitivní kontroly příslušné zbarvení nevykazují, je třeba považovat výsledky u testovaných vzorků za neplatné.

## POSTUPY KONTROLY KVALITY

### Vnitřní pozitivní kontroly

Jako vnitřní pozitivní kontroly poslouží normální tkáňové prvky (např. lymfocyty, fibroblasty nebo normální epitel) v bezprostřední blízkosti nádoru. Jednoznačné jaderné zbarvení v těchto buňkách validuje cyklus barvení. Pokud vnitřní pozitivní kontroly příslušné zbarvení nevykazují, je třeba považovat výsledky u testovaných vzorků za neplatné.

### Negativní reagenční kontrola

Negativní reagenční kontrola by měla být použita k barvení sousedního řezu tkáně pacientského vzorku na samostatném sklíčku vedle sklíčka obarveného protilátkou VENTANA anti-MSH6 (SP93). K hodnocení nespecifického zbarvení se namísto primární protilátky doporučuje králíčí monoklonální protilátka s negativní reagenční kontrolou (Rabbit Monoclonal Negative Control Ig). Parametry barvení pro negativní reagenční kontrolu protilátky by měly být stejné jako u primární protilátky.

### Pozitivní kontrola tkáně

S každým provedeným postupem barvení musí být provedena pozitivní kontrola tkáně. Nejvhodnějším laboratorním postupem je uložit řez pro pozitivní kontrolu na stejné sklíčko jako tkáň pacienta. Při nanášení reagentů na sklíčko pak lze snáze zjistit případné závady. Pro kontrolu kvality je nejvhodnější tkáň se slabým pozitivním zbarvením. Složky tkáně s pozitivním zbarvením se používají k potvrzení, že byla použita protilátka a že přístroj správně fungoval. Kontrolní tkáň může obsahovat pozitivně i negativně zbarvené prvky a sloužit jako tkáň pro pozitivní i negativní kontrolu. Kontrolními tkáněmi by měly být čerstvý vzorek z pitvy, biopsie nebo operace, zpracované nebo fixované co nejdříve stejným způsobem jako testované řezy. Takové tkáně mohou sledovat všechny kroky postupu, od přípravy tkáně až po barvení. Použití tkáňového řezu fixovaného nebo zpracovaného odlišně od testovaného vzorku poskytne kontrolu všech reagentů a kroků metody kromě fixace a zpracování tkáně.

Znamé pozitivní kontroly tkání je nutno používat pouze ke sledování správné funkce zpracovaných tkání a testovacích reagentů, nikoli jako pomůcku ke stanovení konkrétní diagnózy pacientských vzorků. Pokud pozitivní kontroly tkání pozitivní zbarvení nevykazují, je třeba považovat výsledky u testovaných vzorků za neplatné.

Tkáň EC či CRC s klinickým stavem MSH6 intaktní nebo tkáň normálního tlustého střeva či normálního endometria, prekalifikovaná protilátkou VENTANA anti-MSH6 (SP93), může být použita jako pozitivní kontrola tkáně. Normální tlusté střevo nebo normální endometrium se bude barvit jako intaktní pro MSH6 s použitím protilátky VENTANA anti-MSH6 (SP93). Pozitivní kontrola tkáně by měla vykazovat jednoznačné jaderné zbarvení životaschopných nádorových buněk za přítomnosti vnitřních pozitivních kontrol (jaderné zbarvení v lymfocytech, fibroblastech nebo normálním epitelu tlustého střeva v blízkosti nádoru).

### Negativní kontrola tkáně

Protože jsou proteiny MLH1, PMS2, MSH2 a MSH6 exprimovány ve všech tkáních, normální negativní kontrola tkáně pro tyto biomarkery neexistuje. Tkáň EC nebo CRC s klinickým stavem MSH6 ztráta, prekalifikovaná protilátkou VENTANA anti-MSH6 (SP93), může však být použita jako negativní kontrolní tkáň. Negativní kontrolní tkáň je nutno používat pouze ke sledování správné funkce zpracovaných tkání a testovacích reagentů a přístrojů, nikoli jako pomůcku ke stanovení konkrétní diagnózy pacientských vzorků.

## OVĚŘENÍ TESTU

Před počátečním použitím protilátky nebo systému barvení v diagnostickém postupu by měla být specifická protilátka ověřena barvením řady tkání se známými IHC funkčními charakteristikami reprezentující tkáň s klinickým stavem intaktní pro protein MSH6. (Viz postupy kontroly kvality uvedené výše v této části příbalové informace a doporučení pro kontrolu kvality z programu College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist<sup>45</sup> nebo pokyny CLSI Approved Guideline.<sup>46</sup>)

## INTERPRETACE BARVENÍ / OČEKÁVANÉ VÝSLEDKY

Protilátka VENTANA anti-MSH6 (SP93) má v aktivně proliferujících buňkách jaderný vzor barvení. Nádorová tkáň barvená protilátkou VENTANA anti-MSH6 (SP93) má přiřazen klinický stav určený vyskoleným patologem na základě jeho hodnocení přítomnosti nebo absence jaderného zbarvení v nádoru. Klinický stav intaktní je přiřazen případům s jednoznačným jaderným zbarvením životaschopných nádorových buněk za přítomnosti přijatelných vnitřních pozitivních kontrol (jaderné zbarvení v lymfocytech, fibroblastech nebo normálním epitelu v blízkosti nádoru). Klinický stav Ztráta je přiřazen případům s jednoznačnou ztrátou jaderného zbarvení nebo s fokálním slabým jednoznačným jaderným zbarvením životaschopných nádorových buněk za přítomnosti vnitřních pozitivních kontrol, jak je uvedeno v Tab. 4.

Pokud je jednoznačné jaderné zbarvení nepřítomno ve vnitřních pozitivních kontrolách a/nebo barvení pozadí ruší interpretaci, test je třeba považovat za nepřijatelný a je třeba jej opakovat. Tečkované jaderné zbarvení nádorových buněk je třeba považovat za negativní (ztráta). V případech s fokálním zbarvením nádorových buněk mohou některé vzorky vykazovat fokální zbarvení v nádorových buňkách a intenzita zbarvení může být různá: od slabé po silnou. Na základě hodnotícího algoritmu pro panel VENTANA MMR RxDx Panel je třeba fokální slabé jednoznačné jaderné zbarvení životaschopných nádorových buněk za přítomnosti vnitřních pozitivních kontrol zařadit jako klinický stav ztráty. Na druhou stranu by fokální silné jednoznačné jaderné zbarvení v životaschopných nádorových buňkách za přítomnosti vnitřních pozitivních kontrol mělo být zařazeno jako klinický stav intaktní.

Tab. 4. Interpretace barvení pro protilátka VENTANA anti-MSH6 (SP93)

Klinický stav	Popis
Expresí intaktního MSH6	Jednoznačné jaderné zbarvení životaschopných nádorových buněk za přítomnosti přijatelných vnitřních pozitivních kontrol (např. jaderné zbarvení v lymfocytech, fibroblastech nebo normálním epitelu tlustého střeva v blízkosti nádoru)
Ztráta exprese MSH6	Jednoznačná ztráta jaderného zbarvení nebo fokální slabé jednoznačné jaderné zbarvení životaschopných nádorových buněk za přítomnosti přijatelných vnitřních pozitivních kontrol. Tečkované jaderné zbarvení je třeba považovat za negativní.

Případy barvené protilátkou VENTANA anti-MSH6 (SP93) jsou kategorizovány jako intaktní nebo ztráta podle přítomnosti nebo absence specifického zbarvení v nádoru. Interpretaci celkového stavu MMR na úrovni panelu uvádí Tab. 5 níže.

Tab. 5. Interpretace barvení pro panel VENTANA MMR RxDx Panel

Proficientní (negativní)	Deficientní (pozitivní)
Všechny 4 markery (MLH1, PMS2, MSH2 a MSH6) v panelu vykazují intaktní expresi proteinu	Alespoň 1 marker (MLH1, PMS2, MSH2 a MSH6) v panelu vykazuje ztrátu exprese proteinu

## SPECIFICKÁ OMEZENÍ

Odchylka od doporučených podmínek pro znovuzískávání antigenu, poskytnutých v uvedeném protokolu, může zneplatnit očekávané výsledky. Je třeba použít a zdokumentovat vhodné kontroly. Uživatelé, kteří se odchylují od uvedeného protokolu, musejí přijmout odpovědnost za interpretaci výsledků u pacientů.

Protilátka VENTANA anti-MSH6 (SP93) byla schválena pouze pro použití na přístrojích BenchMark ULTRA, XT a GX s detekční soupravou OptiView DAB IHC Detection Kit a není schválena pro použití s jinými detekčními metodami nebo automatizovanými barvicími přístroji.

Některé případy mohou být zvláště obtížné kvůli následujícím problémům:

- Nespecifické pozadí: Některé vzorky mohou vykazovat nespecifické barvení pozadí z důvodů, které nejsou dobře pochopeny. Z tohoto důvodu musí hodnocení sklíčka

s protilátkou VENTANA anti-MSH6 (SP93) zahrnovat srovnání sklíčka se sklíčkem s negativní reagenční kontrolou pro stanovení úrovně nespecifického barvení pozadí. Pokud je přítomno cytoplazmatické zabarvení, nemá být v interpretaci IHC protilátky VENTANA anti-MSH6 (SP93) bráno v úvahu.

- Fokální barvení: Některé vzorky mohou vykazovat fokální zabarvení v nádorových buňkách; intenzita barvení může být různá: od slabé po silnou. Dle specifikace IHC hodnotícího algoritmu protilátky VENTANA anti-MSH6 (SP93) je třeba fokálně slabé, nejednoznačné jaderné zbarvení životaschopných nádorových buněk za přítomnosti přijatelného barvení vnitřních pozitivních kontrol kategorizovat jako ztrátu.
- Tečkované zabarvení: Některé vzorky mohou vykazovat diskrétní tečkované zabarvení v několika jádrech nádoru a intenzita zabarvení může být různá od slabé po silnou. Tento vzor barvení by měl být ignorován. Pokud je přítomen pouze tento typ vzoru barvení, klinický stav je ztráta.
- Skvrnitost: Na rozdíl od tečkovaného zbarvení má skvrnitost jemnější a zrnitější vzhled a může být fokální anebo se může vyskytovat na mnoha nádorových buňkách. Tento vzor barvení, pokud je zaznamenán v jádrech nádorových buněk, by měl být ignorován a sklíčku by měl být přiřazen klinický stav ztráty.
- Artefakt tkáně nebo barvení: Histologické artefakty pocházející z postupů zpracování vzorků a mikrotomie mohou také komplikovat IHC stanovení klinického stavu protilátky VENTANA anti-MSH6 (SP93). Tyto artefakty mohou mimo jiné zahrnovat fixační gradienty a efekty okrajů, záchyty DAB, bubliny v jádru, nedostatečné barvení některých regionů tkáně, roztržení a přeložení tkáně a ztrátu řezu tkáně. V některých případech může být požadováno barvení nových řezů nebo akvizice nového vzorku.

Všechny testy nemusejí být registrovány na každém přístroji. Pro více informací kontaktujte místního zástupce společností Roche.

## FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY

### ANALYTICKÁ VÝKONNOST

Byly provedeny testy barvení na senzitivitu, specificku, opakovatelnost a mezilehlou preciznost barvení, stejně jako testy na preciznost hodnotitele, reprodukovatelnost mezi laboratořemi. Byly získány klinické výstupy a výsledky jsou uvedeny v následující části.

#### Senzitivita a specificku

Analytická senzitivita byla hodnocena charakterizováním prevalence dMMR ve vzorcích tkáně karcinomu endometria pro zamýšlené použití. Celková prevalence pro deficienci MMR ve vzorcích tkáně karcinomu endometria byla 22.5 %, což koreluje s prevalencí dMMR, která je pro karcinom endometria uváděna v literatuře.<sup>30</sup>

Analytická specificku byla stanovena barvením několika případů běžných a neoplastických lidských tkání protilátkou VENTANA anti-MSH6 (SP93). Výsledky jsou uvádějí Tab. 6 a Tab. 7. Pozitivní barvení je jaderné, pokud není uvedeno jinak. Nebylo pozorováno žádné neočekávané barvení u protilátky VENTANA anti-MSH6 (SP93) na normálních a neoplastických tkáních. Podle očekávání, vzhledem k tomu, že MMR je přítomna ve všech aktivně proliferujících buňkách, většina normálních a neoplastických tkání vykazovala pozitivní barvení.

Tab. 6. Specificku barvení s protilátkou VENTANA anti-MSH6 (SP93) u běžných tkání FFPE.

Tkáň	Počet pozitivních případů / celkový počet případů	Tkáň	Počet pozitivních případů / celkový počet případů
Nadledvinka	3/3	Plice	4/4
Močový měchýř	3/3	Lymfatická uzlina	3/3
Kostní dřev	3/3	Mezotel	3/3
Vaječník	5/5	Slinivka	3/3
Prs	3/3	Přístřední tělísko	3/3
Mozeček	3/3	Periferní nerv	5/5
Velký mozek	3/3	Prostata	3/3
Děložní hrdlo	3/3	Kosterní sval	3/3

Tkáň	Počet pozitivních případů / celkový počet případů	Tkáň	Počet pozitivních případů / celkový počet případů
Tlusté střevo	3/3	Kůže	3/3
Endometrium	2/3	Slezina	3/3
Jícen	3/3	Žaludek	3/3
Srdce	3/3	Varle	3/3
Hypofýza	3/3	Brzlík	3/3
Střevo	3/3	Štítná žláza	4/4
Ledvina	3/3	Lingvální/Slinná žláza	3/3
Játra	3/3	Mandle	3/3

Poznámka: Proteiny opravující záměnu bází, jako je MSH6, jsou přítomny ve všech aktivně proliferujících buňkách. Pro všechny tkáně bylo stanovováno pozitivní/negativní barvení prvků specifických pro nádor za přítomnosti pozitivního barvení v normálních kontrolních buňkách (lymfocyty, fibroblasty a epitelové buňky).

Tab. 7. Specificku barvení s protilátkou VENTANA anti-MSH6 (SP93) u různých neoplastických tkání FFPE.

Patologie	Počet pozitivních případů / celkový počet případů
Glioblastom (mozek)	1/1
Meningiom (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 in situ (prs)	1/1
Mikroinvazivní duktální karcinom (prs)	1/1
Invazivní duktální karcinom (prs)	1/1
Lymfom z B-buněk; NOS (slezina)	1/1
Malobuněčný karcinom (plíce)	1/1
Karcinom ze skvamózních buněk (plíce)	1/1
Adenokarcinom (plíce)	1/1
Neuroendokrinní karcinom (jícen)	1/1
Adenokarcinom (jícen)	1/1
Karcinom z prstenčitých buněk (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) (konečník)	1/1
Hepatocelulární karcinom (játra)	1/1
Hepatoblastom (játra)	1/1
Karcinom z jasných buněk (ledvina)	1/1
Adenokarcinom (prostata)	2/2
Adenokarcinom (děloha)	1/1
Karcinom z jasných buněk (endometrium)	1/1
Karcinom ze skvamózních buněk (čípek)	2/2
Embryonální rhabdomyosarkom (příčně pruhovaný sval)	1/1
Karcinom ze skvamózních buněk (kůže)	1/1
Neuroblastom (retroperitoneum)	1/1
Mezoteliom (peritoneum)	1/1
Lymfom z B-buněk; NOS (lymfatická uzlina)	2/2
Hodgkinův lymfom (lymfatická uzlina)	1/1
Difúzní anaplastický velkobuněčný lymfom	1/1
Leiomyosarkom (močový měchýř)	1/1
Osteosarkom	1/1
Rhabdomyosarkom z vřetenovitých buněk (peritoneum)	1/1
Leiomyosarkom (hladký sval)	1/1

Poznámka: Proteiny opravující záměnu bází, jako je MSH6, jsou přítomny ve všech aktivně proliferujících buňkách. Pro všechny tkáně bylo stanovováno pozitivní/negativní barvení nádorových buněk za přítomnosti pozitivního barvení v normálních kontrolních buňkách (lymfocyty, fibroblasty a epitelové buňky).

### Preciznost – panel VENTANA MMR RxDx Panel

#### Studie opakovatelnosti a mezilehlá preciznosti - studie na úrovni markeru

V této studii bylo hodnoceno dvacet osm (15 intaktních a 13 ztrát) případů FFPE z různých tkání solidních nádorů, včetně 6 (3 intaktní a 3 ztráty) případů karcinomu endometria. Koncept studie ověřily preciznost barvení na nádorových tkáních obarvených protilátkou VENTANA anti-MSH6 (SP93).

- Tři šarže MSH6 (SP93) (mezi šaržemi protilátky)
- Tři šarže detekční soupravy OptiView DAB IHC Detection Kit (mezi detekčními soupravami)
- Tři přístroje BenchMark ULTRA (mezi přístroji)
- V průběhu 3 dnů (mezi dny)
- Napříč všemi podmínkami mezilehlé preciznosti (v rámci cyklu)

Každému případu byl přiřazen jeden režim na základě vzorků agregovaných podle testovací podmínky pro preciznost mezi šaržemi protilátky, mezi šaržemi detekční soupravy, mezi přístroji a mezi dny. U podmínky v rámci cyklu byly pro srovnání u každého případu připraveny duplicitní vzorky na jeden cyklus testu. Všechna sklička byla zaslepena a randomizována a poté vyhodnocena s využitím interpretace barvení pro

protilátku VENTANA anti-MSH6 (SP93) (Tab. 4). Výsledky shrnuje Tab. 8 pro případy karcinomu endometria a Tab. 9 pro různé tkáně solidních nádorů včetně karcinomu endometria.

Tab. 8. Opakovatelnost a mezilehlá preciznost protilátky VENTANA anti-MSH6 (SP93) u tkání karcinomu endometria dle měření klinického stavu MSH6 (intaktní/ztráta).

Opakovatelnost/preciznost	Shoda			
	Typ	n/N	%	95% CI
Mezi šaržemi protilátky	PPA	18/18	100.0	(82.4, 100.0)
	NPA	18/18	100.0	(82.4, 100.0)
	OPA	36/36	100.0	(90.4, 100.0)
Mezi detekčními soupravami	PPA	18/18	100.0	(82.4, 100.0)
	NPA	18/18	100.0	(82.4, 100.0)
	OPA	36/36	100.0	(90.4, 100.0)
Mezi přístroji (BenchMark ULTRA)	PPA	18/18	100.0	(82.4, 100.0)
	NPA	18/18	100.0	(82.4, 100.0)
	OPA	36/36	100.0	(90.4, 100.0)
Mezi dny	PPA	18/18	100.0	(82.4, 100.0)
	NPA	18/18	100.0	(82.4, 100.0)
	OPA	36/36	100.0	(90.4, 100.0)
V rámci cyklu	PPA	27/27	100.0	(87.5, 100.0)
	NPA	27/27	100.0	(87.5, 100.0)
	OPA	54/54	100.0	(93.4, 100.0)

Poznámka: Pozitivní procentuální shoda (PPA), negativní procentuální shoda (NPA), celková procentuální shoda (OPA).

Poznámka: Oboustranný 95% interval spolehlivosti (CI) byl vypočítán za použití metody percentilový bootstrap se 2000 vzorků bootstrap. Interval spolehlivosti CI pro 100% PPA, NPA a OPA byly vypočítány pomocí metody Wilsonova skóre.

Poznámka: Pro účely této analýzy byl stav markeru intaktní považován za negativní a stav markeru ztráta byl považován za pozitivní.

Tab. 9. Opakovatelnost a mezilehlá preciznost protilátky VENTANA anti-MSH6 (SP93) u různých tkání solidních nádorů, včetně karcinomu endometria dle měření klinického stavu MSH6 (intaktní/ztráta).

Opakovatelnost/preciznost	Shoda			
	Typ	n/N	%	95% CI
Mezi šaržemi protilátky	PPA	78/78	100.0	(95.3, 100.0)
	NPA	90/90	100.0	(95.9, 100.0)
	OPA	168/168	100.0	(97.8, 100.0)
Mezi detekčními soupravami	PPA	78/78	100.0	(95.3, 100.0)
	NPA	90/90	100.0	(95.9, 100.0)
	OPA	168/168	100.0	(97.8, 100.0)
Mezi přístroji (BenchMark ULTRA)	PPA	78/78	100.0	(95.3, 100.0)
	NPA	90/90	100.0	(95.9, 100.0)
	OPA	168/168	100.0	(97.8, 100.0)
Mezi dny	PPA	78/78	100.0	(95.3, 100.0)
	NPA	90/90	100.0	(95.9, 100.0)

Opakovatelnost/preciznost	Shoda			
	Typ	n/N	%	95% CI
V rámci cyklu	OPA	168/168	100.0	(97.8, 100.0)
	PPA	117/117	100.0	(96.8, 100.0)
	NPA	135/135	100.0	(97.2, 100.0)
	OPA	252/252	100.0	(98.5, 100.0)

Poznámka: Pozitivní procentuální shoda (PPA), negativní procentuální shoda (NPA), celková procentuální shoda (OPA).

Poznámka: Oboustranný 95% interval spolehlivosti (CI) byl vypočítán za použití metody percentilový bootstrap se 2000 vzorků bootstrap. Interval spolehlivosti CI pro 100% PPA, NPA a OPA byly vypočítány pomocí metody Wilsonova skóre.

Poznámka: Pro účely této analýzy byl stav markeru intaktní považován za negativní a stav markeru ztráta byl považován za pozitivní.

### Mezilehlá preciznost mezi dny - studie na úrovni markeru

Do této studie bylo zařazeno dvacet čtyř (12 intaktních a 12 ztrát) případů FFPE s různými tkání solidních nádorů, včetně 8 (4 intaktní a 4 ztráty) případů karcinomu endometria. Koncept studie ověřila preciznost barvení na nádorových tkáních obarvených protilátkou VENTANA anti-MSH6 (SP93) po dobu 5 na sebe nenavazujících dnů.

U každého vzorku byl stanoven režim výsledku barvení jako nejčastěji pozorovaný výsledek barvení mezi 10 testovanými vzorky obarvenými v 5 na sebe nenavazujících dnech s použitím jedné šarže protilátky a jedné šarže detekční soupravy na jednom přístroji. Výsledek z každého testovaného vzorku byl poté porovnán s příslušným režimem a zařazen jako shodný nebo neshodný. Všechna sklička byla zaslepena a randomizována a poté vyhodnocena s využitím interpretace barvení pro protilátku VENTANA anti-MSH6 (SP93) (Tab. 4). Výsledky shrnuje Tab. 10 pro případy karcinomu endometria a Tab. 11 pro různé tkáně solidních nádorů včetně karcinomu endometria.

Tab. 10. Mezilehlá preciznost mezi dny pro protilátku VENTANA MMR anti-MSH6 (SP93) u tkání karcinomu endometria dle měření klinického stavu MSH6 (intaktní/ztráta).

Opakovatelnost/preciznost	Shoda			
	Typ	n/N	%	95% CI
Mezi dny	PPA	40/40	100.0	(91.2, 100.0)
	NPA	40/40	100.0	(91.2, 100.0)
	OPA	80/80	100.0	(95.4, 100.0)

Poznámka: Pozitivní procentuální shoda (PPA), negativní procentuální shoda (NPA), celková procentuální shoda (OPA).

Poznámka: Oboustranný 95% interval spolehlivosti (CI) byl vypočítán za použití metody percentilový bootstrap se 2000 vzorků bootstrap. Interval spolehlivosti CI pro 100% PPA, NPA a OPA byly vypočítány pomocí metody Wilsonova skóre.

Poznámka: Pro účely této analýzy byl stav markeru intaktní považován za negativní a stav markeru ztráta byl považován za pozitivní.

Tab. 11. Mezilehlá preciznost mezi dny pro protilátku VENTANA anti-MSH6 (SP93) u různých tkání solidních nádorů, včetně karcinomu endometria, dle měření klinického stavu MSH6 (intaktní/ztráta).

Opakovatelnost/preciznost	Shoda			
	Typ	n/N	%	95% CI
Mezi dny	PPA	120/120	100.0	(96.9, 100.0)
	NPA	120/120	100.0	(96.9, 100.0)
	OPA	240/240	100.0	(98.4, 100.0)

Poznámka: Pozitivní procentuální shoda (PPA), negativní procentuální shoda (NPA), celková procentuální shoda (OPA).

Poznámka: Oboustranný 95% interval spolehlivosti (CI) byl vypočítán za použití metody percentilový bootstrap se 2000 vzorků bootstrap. Interval spolehlivosti CI pro 100% PPA, NPA a OPA byly vypočítány pomocí metody Wilsonova skóre.

Poznámka: Pro účely této analýzy byl stav markeru intaktní považován za negativní a stav markeru ztráta byl považován za pozitivní.

### Mezilehlá preciznost mezi platformami a mezi přístroji - studie na úrovni markeru

Do této studie bylo zahrnuto deset (5 intaktních a 5 ztrát) případů FFPE s karcinomu endometria. Koncept studie ověřila mezilehlou preciznost na tkáních karcinomu endometria obarvených protilátkou VENTANA anti-MSH6 (SP93) na platformách BenchMark ULTRA, XT a GX a mezi 3 přístroji BenchMark ULTRA, 3 přístroji BenchMark XT a 3 přístroji BenchMark GX. Pro každý případ byl stanoven režim výsledku barvení jako nejčastěji pozorovaný výsledek barvení. Všechna sklička byla zaslepena a randomizována a poté vyhodnocena s využitím interpretace barvení pro protilátku VENTANA anti-MSH6 (SP93) (Tab. 4). Výsledek každého testovaného vzorku byl srovnán s příslušným režimem a zařazen jako shodný nebo neshodný. Výsledky pro mezilehlou preciznost mezi platformami a mezi přístroji BenchMark ULTRA, XT a GX pro případy karcinomu endometria shrnuje Tab. 12.

Tab. 12. Mezilehlá preciznost mezi platformami a mezi přístroji pro protilátku VENTANA anti-MSH6 (SP93) u tkání karcinomu endometria dle měření klinického stavu MSH6 (intaktní/ztráta).

Opakovatelnost/preciznost	Shoda			
	Typ	n/N	%	95% CI
Mezi platformami	PPA	90/90	100.0	(95.9, 100.0)
	NPA	90/90	100.0	(95.9, 100.0)
	OPA	180/180	100.0	(97.9, 100.0)
Mezi přístroji (BenchMark XT)	PPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	NPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)
Mezi přístroji (BenchMark ULTRA)	PPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	NPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)
Mezi přístroji (BenchMark GX)	PPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	NPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)

Poznámka: Pozitivní procentuální shoda (PPA), negativní procentuální shoda (NPA), celková procentuální shoda (OPA).

Poznámka: Oboustranný 95% interval spolehlivosti (CI) byl vypočítán za použití metody percentilový bootstrap se 2000 vzorků bootstrap. Interval spolehlivosti CI pro 100% PPA, NPA a OPA byly vypočítány pomocí metody Wilsonova skóre.

Poznámka: Pro účely této analýzy byl stav markeru intaktní považován za negativní a stav markeru ztráta byl považován za pozitivní.

### Shoda přístroje BenchMark IHC/ISH - studie na úrovni markeru

Do této studie bylo zahrnuto čtyřicet čtyři (23 intaktních a 21 ztrát) případů FFPE s karcinomu endometria. Koncept studie ověřila shodný klinický stav a intenzitu barvení na tkáních karcinomu endometria obarvených protilátkou VENTANA anti-MSH6 (SP93) na platformách BenchMark ULTRA, BenchMark XT a BenchMark GX. Všechna sklička byla zaslepena a randomizována a poté vyhodnocena s využitím interpretace barvení pro protilátku VENTANA anti-MSH6 (SP93) (Tab. 4). Výsledek každého testovaného vzorku byl srovnán s klinickým stavem odvozeným ze sklička obarveného na přístroji BenchMark ULTRA. Poté byl zařazen jako shodný nebo neshodný. Výsledky migrace v testu pro případy karcinomu endometria shrnuje Tab. 13.



Tab. 13. Shoda mezi platformami pro protilátku VENTANA anti-MSH6 (SP93) u tkání karcinomu endometria dle měření klinického stavu MSH6 (intaktní/ztráta).

Shoda	Shoda			
	Typ	n/N	%	95% CI
BenchMark ULTRA: BenchMark XT	PPA	21/21	100.0	(84.5, 100.0)
	NPA	23/23	100.0	(85.7, 100.0)
	OPA	44/44	100.0	(92.0, 100.0)
BenchMark ULTRA: BenchMark GX	PPA	21/21	100.0	(84.5, 100.0)
	NPA	22/23	95.7	(79.0, 99.2)
	OPA	43/44	97.7	(88.2, 99.6)

Poznámka: Pozitivní procentuální shoda (PPA), negativní procentuální shoda (NPA), celková procentuální shoda (OPA).

Poznámka: Oboustranný 95% interval spolehlivosti (CI) byl vypočítán za použití metody percentilový bootstrap se 2000 vzorků bootstrap. Interval spolehlivosti CI pro 100% PPA, NPA a OPA byly vypočítány pomocí metody Wilsonova skóre.

Poznámka: Pro účely této analýzy shody byl stav markeru intaktní považován za negativní a stav markeru ztráta byl považován za pozitivní.

#### Preciznost hodnotitele - studie na úrovni panelu

Preciznost mezi hodnotiteli a preciznost u jednoho hodnotitele byla posouzena vyhodnocením shody stavu MMR mezi 3 hodnotiteli a u jednotlivých hodnotitelů s využitím 134 (72 proficientních a 62 deficientních) případů z různých druhů nádorů, včetně 34 (17 proficientních a 17 deficientních) případů karcinomu endometria. V této studii byly hodnoceny případy FFPE z každého z následujících orgánových soustav a traktů: močové, reprodukční, gastrointestinální, endokrinní, hepato-pankreatobiliární, měkké tkáně / kůže, hrudník a další (hlava a krk). Vzorky byly před hodnocením stavu MSH6 (intaktní nebo ztráta) a stavu MMR na úrovni panelu (proficientní nebo deficientní) pomocí hodnotícího algoritmu panelu VENTANA MMR Rx/Dx Panel (Tab. 5) zaslepeny a randomizovány. Hodnotitelé hodnotili všechny vzorky dvakrát s minimálně dvoutýdenním intervalem mezi jednotlivými hodnoceními. Míry shody mezi hodnotiteli a u jednoho hodnotitele shrnuje Tab. 14 pro případy karcinomu endometria a Tab. 15 pro různé tkáně solidních nádorů včetně karcinomu endometria.

Tab. 14. Preciznost panelu VENTANA MMR Rx/Dx Panel u jednoho hodnotitele a mezi hodnotiteli na tkáně karcinomu endometria měřená podle klinického stavu MMR (proficientní/deficientní).

Preciznost	Shoda			
	Typ	n/N	%	95% CI
V rámci hodnotitele	APA	100/101	99.0	(97.0, 100.0)
	ANA	102/103	99.0	(97.1, 100.0)
	OPA	101/102	99.0	(97.1, 100.0)
Mezi hodnotiteli	APA	98/100	98.0	(93.8, 100.0)
	ANA	102/104	98.1	(94.4, 100.0)
	OPA	100/102	98.0	(94.1, 100.0)

Poznámka: Průměrná pozitivní shoda (APA), průměrná negativní shoda (ANA), celková procentuální shoda (OPA).

Poznámka: Oboustranný 95% interval spolehlivosti (CI) byl vypočítán za použití metody percentilový bootstrap se 2000 vzorků bootstrap.

Poznámka: Pro účely této analýzy byl stav panelu MMR deficientní (dMMR) považován za pozitivní a stav panelu MMR proficientní (pMMR) byl považován za negativní.

Tab. 15. Preciznost u jednoho hodnotitele a mezi hodnotiteli pro panel VENTANA MMR Rx/Dx Panel u různých tkání solidního nádoru, včetně karcinomu endometria, dle měření klinického stavu MMR (proficientní/deficientní).

Preciznost	Shoda			
	Typ	n/N	%	95% CI
V rámci hodnotitele	APA	(364/366)	99.5	(98.6, 100.0)
	ANA	(598/600)	99.7	(99.2, 100.0)
	OPA	(481/483)	99.6	(99.0, 100.0)
Mezi hodnotiteli	APA	(364/366)	99.5	(98.3, 100.0)
	ANA	(596/598)	99.7	(99.0, 100.0)
	OPA	(480/482)	99.6	(98.8, 100.0)

Poznámka: Průměrná pozitivní shoda (APA), průměrná negativní shoda (ANA), celková procentuální shoda (OPA).

Poznámka: Oboustranný 95% interval spolehlivosti (CI) byl vypočítán za použití metody percentilový bootstrap se 2000 vzorků bootstrap.

Poznámka: Pro účely této analýzy byl stav panelu MMR deficientní (dMMR) považován za pozitivní a stav panelu MMR proficientní (pMMR) byl považován za negativní.

#### Studie reprodukovatelnosti mezi laboratořemi - studie na úrovni panelu

Byla provedena studie reprodukovatelnosti mezi laboratořemi pro panel VENTANA MMR Rx/Dx Panel k prokázání reprodukovatelnosti testu při určování stavu MMR u vzorků EC. Studie zahrnovala 30 archivních, deidentifikovaných vzorků FFPE, které byly obarveny na přístroji BenchMark ULTRA v každé ze 3 externích laboratoří každý den ze 3 na sebe nenavazující dnů (celkové období minimálně 20 dnů). Každý den barvení na každém pracovišti byl vytvořen panel 5 skliček [4 sklička obarvená protilátkami biomarkerů a 1 skličko obarvené negativní kontrolou Negative Control (Monoclonal) pomocí barvicího protokolu PMS2], který byl nezávisle vyhodnocen 2 patology na pracovišti pro stav každého markeru (intaktní nebo ztráta) a pro stav MMR (deficientní nebo proficientní). Studie zahrnovala celkem 540 pozorování u 30 případů vzorků (včetně 4 nejasných vzorků) obarvených během 3 dnů na 3 pracovištích se 2 hodnotiteli na pracoviště. Výsledky stavu MMR u všech hodnotitelů, pracovišť a dnů pro případy byly spojeny a analyzovány oproti režimům hodnotitelů pro stejné případy, aby se stanovila celková reprodukovatelnost stavu MMR. Souhrn mír shod ve všech hodnotitelných pozorováních s použitím režimů hodnotitele na úrovni případu pro stav MMR na úrovni panelu uvádí jako odkaz Tab. 16.

Tab. 16. Reprodukovatelnost mezi laboratořemi pro celkové míry shody pro panel VENTANA MMR Rx/Dx Panel u karcinomu endometria.

Reprodukovatelnost mezi laboratořemi	Shoda			
	Typ	n/N	%	95% CI
Celková	PPA	263/268	98.1	(95.5, 100.0)
	NPA	269/269	100.0	(98.6, 100.0)
	OPA	532/537	99.1	(97.8, 100.0)
Pracoviště – stratifikováno	PPA	263/268	98.1	(95.5, 100.0)
	NPA	269/269	100.0	(98.6, 100.0)
	OPA	532/537	99.1	(97.8, 100.0)
Hodnotitel – stratifikováno	PPA	263/265	99.2	(98.1, 100.0)
	NPA	272/272	100.0	(98.6, 100.0)
	OPA	535/537	99.6	(99.1, 100.0)



Poznámka: Pozitivní procentuální shoda (PPA), negativní procentuální shoda (NPA), celková procentuální shoda (OPA).

Poznámka: Oboustranný 95% interval spolehlivosti (CI) byl vypočítán za použití metody percentilový bootstrap se 2000 replikátů.

Poznámka: Pro účely této analýzy byl stav panelu MMR deficientní (dMMR) považován za pozitivní a stav panelu MMR proficientní (pMMR) byl považován za negativní.

Kromě toho byla provedena párová srovnání stavu MMR mezi jednotlivými pracovišti, mezi hodnotiteli a mezi dny. Test je reprodukovatelný ve 3 dnech, na 3 pracovištích a pro 6 hodnotitelů, viz souhrn, který uvádí Tab. 17.

Tab. 17. Reprodukovatelnost mezi laboratořemi párových mír shod pro panel VENTANA MMR RxDx Panel u karcinomu endometria.

Reprodukovatelnost mezi laboratořemi	Shoda			
	Typ	n/N	%	95% CI
Mezi pracovišti	APA	3072/3132	98.1	(95.3, 100.0)
	ANA	3216/3276	98.2	(95.7, 100.0)
	OPA	3144/3204	98.1	(95.5, 100.0)
Mezi hodnotiteli	APA	258/263	98.1	(95.3, 100.0)
	ANA	268/273	98.2	(95.7, 100.0)
	OPA	263/268	98.1	(95.5, 100.0)
Mezi dny	APA	518/522	99.2	(98.1, 100.0)
	ANA	542/546	99.3	(98.2, 100.0)
	OPA	530/534	99.3	(98.1, 100.0)

Poznámka: Průměrná pozitivní shoda (APA), průměrná negativní shoda (ANA), celková procentuální shoda (OPA).

Poznámka: Oboustranný 95% interval spolehlivosti (CI) byl vypočítán za použití metody percentilový bootstrap se 2000 replikátů.

Poznámka: Pro účely této analýzy byl stav panelu MMR deficientní (dMMR) považován za pozitivní a stav panelu MMR proficientní (pMMR) byl považován za negativní.

## KLINICKÁ VÝKONNOST

### Klinická výkonnost dostarlimabu (JEMPERLI) ve studii GARNET

Účinnost a bezpečnost přípravku JEMPERLI byla zkoumána ve studii GARNET, multicentrické, nekontrolované, otevřené studii s více paralelními kohortami. Studie GARNET zahrnovala expanzní kohorty subjektů s recidivujícími nebo pokročilými solidními nádory, u nichž byly omezené dostupné možnosti léčby. Do kohorty A1 byly zařazeny pacientky s EC s deficientním systémem opravy záměny bázi (dMMR) / vysokou mikrosatelitní nestabilitou (MSI-H), u nichž došlo k progresi při léčbě režimem zahrnujícím platinu anebo po ní.

Pacientky dostávaly 500 mg dostarlimabu každé 3 týdny po dobu 4 cyklů a následně 1000 mg dostarlimabu každých 6 týdnů. Léčba pokračovala až do nepřijatelné toxicity nebo progresse onemocnění po dobu až dvou let.

Hlavními cílovými ukazateli účinnosti byly míra objektivní odpovědi (ORR) a doba trvání odpovědi (DOR), které byly hodnoceny zaslepeným hodnocením nezávislých centrálních radiologů (BICR) podle Response Evaluation Criteria in Solid Tumors v1.1 (RECIST v1.1; Kritéria hodnocení odpovědi solidního nádoru na léčbu). Populace pro hodnocení účinnosti byla definována jako pacientky, které měly měřitelné onemocnění podle BICR na počátku léčby a byly sledovány minimálně 24 týdnů nebo byly sledovány méně než 24 týdnů u léčbu přerušily z důvodu nežádoucích účinků nebo progresse onemocnění.

První plánovaná průběžná analýza pro studii GARNET zahrnovala pacientky s dMMR EC zařazené do studie GARNET před datem klinického ukončení (CCOD) 8. července 2019. Populaci pro hodnocení účinnosti pro první průběžnou analýzu tvořila kohorta 71 pacientek s dMMR EC. Populaci pro hodnocení účinnosti pro druhou plánovanou průběžnou analýzu tvořila skupina 209 pacientů s dMMR solidními nádory, včetně EC, kteří byli do studie zařazeni před CCOD 1. března 2020.

Funkční charakteristiky panelu VENTANA MMR RxDx Panel byly měřeny hodnocením jeho schopnosti identifikovat pacientky s EC (první průběžná analýza), které

pravděpodobně budou reagovat na léčbu přípravkem JEMPERLI (tj. pomocí panelu výsledky účinnosti pozorované ve studii GARNET). Hodnocení diagnostické výkonnosti, usilující o stanovení účinnosti přípravku JEMPERLI u pacientek s rekurentním nebo pokročilým dMMR EC, které by mohly být zařazeny do studie GARNET, využilo panel VENTANA MMR RxDx Panel (test CDx) konkrétně spíše k vyšetření pro zařazení než pro test klinického hodnocení (CTA). Tyto analýzy si vyžádaly překlenovací přístup, protože pacienti nebyli za účelem zařazení do studie GARNET vyšetřováni pomocí testu CDx. Hodnocení diagnostické výkonnosti pro panel VENTANA MMR RxDx Panel použilo pouze podskupinu případů z populace pro hodnocení bezpečnosti pro žádost o registraci biologického léčivého přípravku (BLA – Biologics License Application); pacienti, aby byli zahrnuti do analýz diagnostické výkonnosti, museli splnit kritéria diagnostické studie v průběžných analýzách.

### Klinické výsledky studie GARNET - EC(dMMR)

Souhrn výsledků účinnosti u subjektů s dMMR EC v primárním souboru analýzy účinnosti BLA uvádí Tab. 18.

Tab. 18. Výsledky účinnosti studie GARNET u pacientek s dMMR/MSI-H EC

Cílový parametr	JEMPERLI N = 108
Míra objektivní odpovědi (ORR)	
ORR, n (%)	47 (43.5 %) [a]
(95 % CI)	(34.0, 53.4)
Míra úplné odpovědi n (%)	11 (10.2 %)
Míra částečné odpovědi n (%)	36 (33.3 %)
Míra kontroly onemocnění (DCR) (95 % CI)	55.6 % (45.7, 65.1)
Stabilní onemocnění % (95 % CI)	12 % (6.6, 19.7)
Doba trvání odpovědi (DOR)	
Medián v měsících (rozsah)	Nedosaženo [b] (2.6, 28.1+)
Pravděpodobnost udržení odpovědi po 6 měsících podle K-M (95 % CI)	97.9 % (85.8, 99.7)
Pravděpodobnost udržení odpovědi po 12 měsících podle K-M (95 % CI)	90.9 % (73.7, 97.1)

[a] V době ukončení (1. března 2020)

[b] V době ukončení nebylo dosaženo mediánu DOR.

K-M: odhad Kaplanovy-Meierovy křivky.

CI: interval spolehlivosti.

MSI-H: vysoká mikrosatelitní nestabilita.

### Klinická výkonnost panelu VENTANA MMR RxDx Panel pro populaci s karcinomem endometria dMMR ve studii GARNET

Do populace pro hodnocení diagnostického výkonu účinnosti panelu VENTANA MMR RxDx Panel u EC byly zařazené pacientky zařazené do studie GARNET, které před CCOD pro první plánovanou průběžnou analýzu obdržely hodnocenou léčbu a jejichž způsobilost pro tuto studii byla potvrzena pomocí CTA, definovaného jako jakýkoli místně nebo centrálně prováděný test MMR IHC jiný než pomocí panelu VENTANA MMR RxDx Panel.

V rámci přemosťovací analýzy byla vypočtena shoda stavu MMR mezi výsledky CTA a CDx s použitím výsledků CTA jako reference. Pro účely analýz byl stav MMR proficientní považován za negativní a stav MMR deficientní byl považován za pozitivní. Ze všech klinických vzorků z původní populace, u níž byla v rámci studie GARNET studována bezpečnost přípravku pro BLA, s hodnotitelným výsledkem CDx i s hodnotitelným výsledkem CTA, uvádí výsledky shody mezi testy Tab. 19.

Tab. 19. Shoda stavu MMR mezi CTA pro studii GARNET a panelem VENTANA MMR RxDx Panel pro populaci EC.

Populace analýzy [a]	Shoda		
	Míra [b]	n/N	% (95% CI)
Shoda IU	PPA	51/55	92.7 (82.7, 97.1)
	NPA	68/68	100.0 (94.7, 100.0)
	OPA	119/123	96.7 (91.9, 98.7)
Shoda ITD	PPA	70/76	92.1 (83.8, 96.3)
	NPA	90/91	98.9 (94.0, 99.8)
	OPA	160/167	95.8 (91.6, 98.0)

Poznámka: Pozitivní procentuální shoda (PPA), negativní procentuální shoda (NPA), celková procentuální shoda (OPA).

Poznámka: Oboustranné 95% intervaly spolehlivosti (CI) byly vypočítány metodou Wilsonova skóre.

[a] Analýzy byly provedeny v populaci shody (všichni pacienti v populaci pro hodnocení bezpečnosti přípravku s hodnotitelným výsledkem barvení pomocí panelu VENTANA MMR RxDx Panel (CDx)). Populace diagnostického záměru (Intent-to-Diagnose, ITD) a populace shody byly v této studii ekvivalentní. Populace shody určeného použití (IU) zahrnuje pouze podmnožinu pacientů, kteří jsou také v populaci IU (tj. u nichž byl proveden pokus o testování pomocí panelu VENTANA MMR RxDx Panel podle požadavků diagnostického protokolu).

[b] Pro účely analýz byl stav MMR deficitní (dMMR) považován za pozitivní a stav MMR proficientní (pMMR) byl považován za negativní.

Byly provedeny další analýzy k odhadu účinnosti léčiva u pacientek s rekurentním nebo pokročilým EC, jejichž nádory byly nebo by byly dMMR při testování pomocí panelu VENTANA MMR RxDx Panel, včetně primární analýzy s použitím různých přístupů vícenásobné imputace (MI), a analýzy senzitivity s použitím dolních hranic pozorovaných 95% CI pro PPA a NPA jako předpokládané PPA, resp. NPA, a s použitím upraveného předpokladu pro prevalenci případů, které by byly dMMR, kdyby byly testovány pomocí CTA. Tyto analýzy využívající imputovaný stav CDx k hodnocení účinnosti v populaci vybrané na základě CDx přinesly výsledky ORR a DOR podobné těm, které byly skutečně pozorovány v populaci s dMMR EC ve studii GARNET, vybrané pomocí CTA.

## Preciznost – panel VENTANA MMR IHC Panel

### Opakovatelnost v rámci cyklu a mezilehlá preciznost mezi dny

Opakovatelnost a mezilehlá preciznost protilátky VENTANA anti-MSH6 (SP93) byla vyhodnocována na přístroji BenchMark ULTRA v kombinaci s detekční soupravou OptiView DAB IHC Detection Kit.

Opakovatelnost v rámci cyklu byla vyhodnocována na 10 vzorcích kolorektálního karcinomu (5 intaktních a 5 ztrát pro expresi MSH6). Pět replikátů sklíček z každého ze vzorků kolorektálního karcinomu bylo barveno protilátkou VENTANA anti-MSH6 (SP93) na jednom přístroji BenchMark ULTRA v průběhu jednoho dne. Každé sklíčko barvené protilátkou VENTANA anti-MSH6 (SP93) bylo párováno s barveným sklíčkem negativní reagenční kontroly ze stejného případu. Všechny sady sklíček byly randomizovány a poté hodnoceny jako intaktní nebo ztráta jedním patologem se zaslepenou diagnózou případu.

Mezilehlá preciznost mezi dny byla vyhodnocována na 10 vzorcích kolorektálního karcinomu (5 intaktních a 5 ztrát pro expresi MSH6). Replikáty sklíček z každého ze vzorků kolorektálního karcinomu byly barveny protilátkou VENTANA anti-MSH6 (SP93) na přístroji BenchMark ULTRA v každém z 5 na sebe nenavazujících dnů. Každé sklíčko barvené protilátkou VENTANA anti-MSH6 (SP93) bylo párováno s barveným sklíčkem negativní reagenční kontroly ze stejného případu. Všechny sady sklíček byly randomizovány a poté hodnoceny jako intaktní nebo ztráta jedním patologem se zaslepenou diagnózou případu.

Žádné ze sklíček barvené negativní reagenční kontrolou nevykazovalo specifické barvení a barvení pozadí bylo  $\leq 0.5$ . Použití sdružených dat ze všech možných párování ve studiích opakovatelnosti v rámci cyklu a mezilehlé preciznosti mezi dny prokázalo 100% pozitivní procentuální shodu (PPA), 100% negativní procentuální shodu (NPA) a 100% celkovou procentuální shodu (OPA). Souhrn výsledků uvádí Tab. 20.

Tab. 20. Opakovatelnost v rámci cyklu a mezilehlá preciznost mezi dny pro protilátku VENTANA anti-MSH6 (SP93) dle měření klinického stavu (intaktní nebo ztráta).

Opakovatelnost/ Preciznost	Klinický stav	Shoda			
		Typ	n/N	%	95% CI
Opakovatelnost v rámci cyklu	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)
Mezilehlá preciznost mezi 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: Pozitivní procentuální shoda (PPA), negativní procentuální shoda (NPA), celková procentuální shoda (OPA).

Poznámka: Oboustranné 95% intervaly spolehlivosti (CI) byly vypočítány metodou Wilsonova skóre.

### Mezilehlá preciznost mezi přístroji

Mezilehlá preciznost mezi přístroji pro přístroj BenchMark ULTRA a pro protilátku VENTANA anti-MSH6 (SP93) byla stanovována barvením replikátů sklíček 10 vzorků kolorektálního karcinomu (5 intaktních a 5 ztrát pro expresi MSH6) na 3 přístrojích BenchMark ULTRA s protilátkou VENTANA anti-MSH6 (SP93) s použitím detekční soupravy OptiView DAB IHC Detection Kit.

Každé sklíčko barvené protilátkou VENTANA anti-MSH6 (SP93) bylo párováno s barveným sklíčkem negativní reagenční kontroly ze stejného případu. Všechny sady sklíček byly randomizovány a pak vyhodnocovány z hlediska klinického stavu (intaktní nebo ztráta) jedním patologem se zaslepenou diagnózou případu. Žádné ze sklíček barvené negativní reagenční kontrolou nevykazovalo specifické barvení a barvení pozadí bylo  $\leq 0.5$ .

Pro určení mezilehlé preciznosti mezi přístroji pro přístroj BenchMark ULTRA byla prováděna párová srovnání klinického stavu sklíček pro každý vzorek a prokázala 100% PPA, NPA a OPA. Souhrn výsledků uvádí Tab. 21.

Tab. 21. Mezilehlá preciznost mezi přístroji pro přístroj BenchMark ULTRA a pro protilátku VENTANA anti-MSH6 (SP93) měřená dle klinického stavu (intaktní nebo ztráta).

Preciznost	Klinický stav	Shoda			
		Typ	n/N	%	95% CI
Mezilehlá preciznost 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: Pozitivní procentuální shoda (PPA), negativní procentuální shoda (NPA), celková procentuální shoda (OPA).

Poznámka: Oboustranné 95% intervaly spolehlivosti (CI) byly vypočítány metodou Wilsonova skóre.

Navíc byla mezilehlá preciznost mezi přístroji pro protilátku VENTANA anti-MSH6 (SP93) stanovována barvením replikátů sklíček 6 vzorků kolorektálního karcinomu (4 intaktních a 2 ztrát pro expresi MSH6) na 3 přístrojích BenchMark XT a 3 přístrojích BenchMark GX s protilátkou VENTANA anti-MSH6 (SP93) s použitím detekční soupravy OptiView DAB IHC Detection Kit.

Bylo provedeno 15 pozorování na případ při spojení 3 přístrojů; medián pro každý případ byl stanoven z těchto 15 pozorování. Jednotlivá pozorování stejného případu byla

považována za shodná s mediánem intenzity signálu případu, pokud byla v rámci 0.5násobku intenzity signálu. Pro určení meziřehlé preciznosti mezi přístroji pro přístroje BenchMark XT a BenchMark GX byla prováděna párová srovnání skóre intenzity barvení nádoru pro každý vzorek a prokázala 100% OPA mezi 3 přístroji BenchMark XT a 100% OPA mezi 3 přístroji BenchMark GX. Pro všechna sklička bylo barvení pozadí přijatelné ( $\leq 0.5$ ) na obou přístrojích BenchMark XT i BenchMark GX.

### Shoda přístrojů BenchMark IHC/ISH

Shoda mezi přístroji BenchMark IHC/ISH pro protilátku VENTANA anti-MSH6 (SP93) byla stanovována barvením vzorků kolorektálního karcinomu protilátkou VENTANA anti-MSH6 (SP93) s použitím detekční soupravy OptiView DAB IHC Detection Kit. Všechna sklička byla vyhodnocována na klinický stav (intaktní/ztráta) jedním patologem.

Byla prováděna párová srovnání vzorků kolorektálního karcinomu mezi platformami zahrnujícími přístroje BenchMark GX vůči BenchMark ULTRA (134 intaktních a 20 případů ztráty) BenchMark GX vůči BenchMark XT (133 intaktních a 21 případů ztráty) a přístroje BenchMark ULTRA vůči BenchMark XT (136 intaktních a 20 případů ztráty). Všechna párová srovnání provedená mezi platformami vykazovala 100% průměrnou pozitivní shodu (APA), průměrnou negativní shodu (ANA) i OPA.

### Studie preciznosti hodnotitele

Preciznost u jednoho hodnotitele a mezi hodnotiteli byla vyhodnocována na 20 vzorcích kolorektálního karcinomu (11 intaktních a 9 případů ztráty) barvených protilátkou VENTANA anti-MSH6 (SP93) a s použitím detekční soupravy OptiView DAB IHC Detection Kit. Každé skličko obarvené protilátkou VENTANA anti-MSH6 (SP93) bylo párováno se skličkem obarveným hematoxylinem a eosinem (H&E) a skličkem s negativní reagenční kontrolou ze stejného případu.

Všechny sady skliček byly randomizovány a vyhodnocovány 3 patology na klinický stav intaktní nebo ztráta MSH6. Patologové nebyli obeznámeni s diagnózou případů. Po dvoutýdenním eliminačním období byla sklička barvená protilátkou VENTANA anti-MSH6 (SP93) znovu randomizována pro druhé vyhodnocení klinického stavu MSH6 každým ze 3 patologů. Žádné ze skliček barvené negativní reagenční kontrolou nevykazovalo specifické barvení a barvení pozadí bylo  $\leq 0.5$ .

Preciznost u hodnotitele srovnávala počáteční a konečné hodnocení sklička jedním patologem a srovnání 20 skliček s kolorektálním karcinomem na patologa. Srovnání od 3 patologů byla shrnuta a vykazovala 98.5% APA, 98.1% ANA a 98.3% OPA pro preciznost u jednoho hodnotitele. Souhrn výsledků uvádí Tab. 22.

Preciznost mezi hodnotiteli srovnávala všechna hodnocení skliček (20 kolorektálních karcinomů  $\times$  2 hodnocení/případ  $\times$  3 patologové = 120 hodnocení skliček) na modální stav případu pro každý případ kolorektálního karcinomu. Výsledky vykazují 100% PPA, 98.1% NPA a 99.2% OPA pro preciznost mezi hodnotiteli. Souhrn výsledků uvádí Tab. 22.

Tab. 22. Preciznost u jednoho hodnotitele a mezi hodnotiteli pro protilátku VENTANA anti-MSH6 (SP93) na případech kolorektálního karcinomu dle měření klinického stavu MSH6 (intaktní/ztráta).

Preciznost	Klinický stav	Shoda			
		Typ	n/N	%	95% CI
V rámci hodnotitele	Intaktní	APA	66/67	98.5	(88.0, 100.0)
	Ztráta	ANA	52/53	98.1	(83.3, 100.0)
	Celkem	OPA	59/60	98.3	(85.0, 100.0)
Mezi hodnotiteli	Intaktní	PPA	66/66	100.0	(94.5, 100.0)
	Ztráta	NPA	53/54	98.1	(90.2, 99.7)
	Celkem	OPA	119/120	99.2	(95.4, 99.9)

Poznámka: Průměrná pozitivní shoda (APA), průměrná negativní shoda (ANA), celková procentuální shoda (OPA).

Poznámka: Pro preciznost u jednoho hodnotitele byly vypočítány 95% intervaly spolehlivosti (CI) pro APA a ANA s použitím metody podle Cloppera-Pearsona; hodnota 95% CI pro OPA byla vypočítána metodou percentilový bootstrap. Pro preciznost mezi hodnotiteli byly intervaly spolehlivosti 95% CI vypočítány metodou Wilsonova skóre.

### Preciznost mezi šaržemi

Preciznost mezi šaržemi protilátky VENTANA anti-MSH6 (SP93) byla stanovena testováním 3 výrobních šarží protilátky VENTANA anti-MSH6 (SP93) každé z nich na skličkách v triplicátu z 10 vzorků kolorektálního karcinomu (5 intaktních a 5 ztrát exprese

MSH6) na přístroji BenchMark ULTRA s použitím detekční soupravy OptiView DAB IHC Detection Kit.

Každé skličko barvené protilátkou VENTANA anti-MSH6 (SP93) bylo párováno s barveným skličkem negativní reagenční kontroly ze stejného případu. Sady skliček byly randomizovány a hodnoceny jedním patologem se zaslepenou diagnózou případu a číslem šarže protilátky VENTANA anti-MSH6 (SP93). Žádné ze skliček barvené negativní reagenční kontrolou nevykazovalo specifické barvení a barvení pozadí bylo  $\leq 0.5$ .

Pro stanovení preciznosti protilátky VENTANA anti-MSH6 (SP93) mezi šaržemi byla hodnocení všech skliček srovnávána s modálním stavem případu pro každý případ kolorektálního karcinomu. Hodnota OPA mezi šaržemi protilátky VENTANA anti-MSH6 (SP93) byla 100 %; bylo tak prokázáno, že barvení protilátkou VENTANA anti-MSH6 (SP93) je reprodukovatelné mezi šaržemi protilátky.

Shrnutí výsledků pro preciznost mezi šaržemi pro protilátku VENTANA anti-MSH6 (SP93) uvádí Tab. 23.

Tab. 23. Preciznost mezi šaržemi protilátky VENTANA anti-MSH6 (SP93) měřená jako klinický stav (intaktní nebo ztráta).

Preciznost	Klinický stav	Shoda			
		Typ	n/N	%	95% CI
Mezi šaržemi	Intaktní	PPA	45/45	100.0	(92.1, 100.0)
	Ztráta	NPA	45/45	100.0	(92.1, 100.0)
	Celkem	OPA	90/90	100.0	(95.9, 100.0)

Poznámka: Pozitivní procentuální shoda (PPA), negativní procentuální shoda (NPA), celková procentuální shoda (OPA).

Poznámka: Oboustranné 95% intervaly spolehlivosti (CI) byly vypočítány metodou Wilsonova skóre.

### Studie reprodukovatelnosti mezi laboratořemi

Byla provedena studie reprodukovatelnosti mezi laboratořemi pro test VENTANA MMR IHC Panel k prokázání reprodukovatelnosti každého testu na panelu VENTANA MMR IHC Panel ke stanovení klinického stavu. Do studie bylo zařazeno 6 vzorků tkáně kolorektálního karcinomu (3 intaktní a 3 případy ztráty) pro každý protein MMR a 16 vzorků tkáně kolorektálního karcinomu (8 pozitivních a 8 negativních) pro cyklus BRAF V600E na 3 přístrojích BenchMark ULTRA v každém z 5 na sebe nenavazujících dnů v průběhu 21 dní ve třech externích laboratořích. Každé skličko barvené protilátkou bylo párováno se skličkem barveným H&E a negativní reagenční kontrolou ze stejného případu. Všechny sady skliček byly randomizovány a vyhodnoceny celkem 6 hodnotiteli (2 hodnotitelé na pracoviště), pro které byl zaslepen klinický stav MMR studované sady. Pro každý ze 40 případů ve studii se uskutečnilo 30 pozorování ve všech dnech, na všech pracovištích a všemi hodnotiteli. Referenční stav modálního případu byl pro každý případ odvozen na základě nejčastěji pozorovaného stavu ze 30 pozorování. Studie obsahovala celkem 1200 pozorování pro všech pět proteinů. Pro všechny hodnotitelné případy byla míra přijatelnosti pro morfologii a pozadí v této studii 100 %. Statistiku souhrnné shody (všech pěti proteinů) mezi referenčním stavem modálního případu a individuálním pozorováním uvádí Tab. 24.

Tab. 24. Shoda mezi panelem VENTANA MMR IHC Panel a referenčním stavem modálního případu.

Reprodukovatelnost mezi laboratořemi	Klinický stav	Shoda			
		Typ	n/N	%	95% CI
Všechny proteiny	Intaktní/pozitivní	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: Pozitivní procentuální shoda (PPA), negativní procentuální shoda (NPA), celková procentuální shoda (OPA).

Poznámka: Klinický stav je definovaný jako intaktní nebo ztráta pro expresi proteinů MMR jako pozitivní nebo negativní na protein BRAF V600E.

Poznámka: Oboustranné 95% intervaly spolehlivosti (CI) byly vypočítány s použitím zobecněného lineárního smíšeného modelu (GLMM).



Navíc byla provedena párová srovnání mezi pracovišti, mezi dny a mezi hodnotiteli pro protilátku VENTANA anti-MSH6 (SP93). Pro MSH6 obsahoval tento studovaný soubor celkem 180 pozorování. Souhrn výsledků uvádí Tab. 25. Tato data indikují reprodukovatelnost testu v 5 dnech, na 3 pracovištích a pro 6 hodnotitelů.

Tab. 25. Reprodukovatelnost mezi laboratořemi míry shody párů pro protilátku VENTANA anti-MSH6 (SP93) měřená jako klinický stav (intaktní nebo ztráta).

Reprodukovatelnost mezi laboratořemi		Shoda			
		Typ	n/N	%	95% CI
Mezi pracovišti (3 pracoviště)		APA	360/364	98.9	(96.8, 100.0)
		ANA	352/356	98.9	(96.6, 100.0)
		OPA	356/360	98.9	(96.7, 100.0)
Mezi dny (5 na sebe nenavazujících dnů)	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	120/124	96.8	(90.9, 100.0)
		ANA	112/116	96.6	(88.9, 100.0)
		OPA	116/120	96.7	(90.0, 100.0)
	Pracoviště C	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)
Mezi hodnotiteli (2 patologové na pracoviště)		APA	90/91	98.9	(96.8, 100.0)
		ANA	88/89	98.9	(96.6, 100.0)
		OPA	89/90	98.9	(96.7, 100.0)

Poznámka: Průměrná pozitivní shoda (APA), průměrná negativní shoda (ANA), celková procentuální shoda (OPA).

Poznámka: Oboustranné 95% intervaly spolehlivosti (CI) byly vypočítány s použitím metody percentilový bootstrap; v případech, kdy byl odhad bodu 100 %, byla použita metoda Wilsonova skóre.

### Studie přesnosti: metoda srovnání výsledků panelu VENTANA MMR IHC Panel s molekulárním testováním (sekvenování DNA a hypermetylace promotoru MLH1)

Byla provedena studie pro srovnání výkonu testu VENTANA MMR IHC Panel s molekulárním testováním včetně komplexního panelu sekvenování DNA z tlustého střeva pro identifikaci kolorektálních karcinomů, které (i) jsou MMR deficientní (dMMR) a (ii) obsahují mutaci BRAF V600E. Panel pro sekvenování DNA z tlustého střeva zahrnoval genomovou analýzu variant přítomných v genech MMR (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6, EPCAM), BRAF a dalších genech důležitých v karcinogenezi (např. PIK3CA, KRAS, NRAS, ERBB2 atd.). Sekvenování zahrnovalo všechny exony, intronické a přilehlé sekvence a rovněž velké delece, duplikace a mozaicismus.

Pro studii byly sekvenční případy kolorektálního karcinomu barvené H&E vyhodnocovány z hlediska indikace řádné fixace a morfolgie včetně přítomnosti buněčných prvků (nádorové buňky a buňky vnitřní kontroly). Každý případ byl vyhodnocován pro stanovení, zda vzorek obsahoval minimálně 50% nádorový obsah pro poskytnutí dostatečné reprezentace nádorových buněk ve vzorku, jak je doporučováno pro molekulární testování. Po prozkoumání bylo do studie zařazeno 105 sekvenčních případů splňujících tato kritéria. Navíc bylo do studie zařazeno 13 případů kolorektálního karcinomu vykazujících stav ztráta podle IHC, aby bylo zajištěno, že byl do studie zařazen každý marker. Řezy všech případů ve studii byly barveny IHC metodou s použitím testu VENTANA MMR IHC Panel a patřičnými negativními reagenčními kontrolami. Další řezy byly podrobeny panelu sekvenování DNA tlustého střeva. Promotor hypermetylace MLH1 je jedním z mechanismů, který může vést ke ztrátě exprese proteinu MLH1 a je spojen spíše se sporadickým kolorektálním karcinomem než s potenciální diagnózou Lynchova syndromu. Proto byly všechny případy ztráty MLH1 identifikované metodou IHC ve studii testovány na hypermetylaci promotoru MLH1.

V konečném souboru studie 118 případů analýza zahrnovala PPA a NPA pro všechny sružené markery (tj. všechna sružená pozorování), kde molekulární testování fungovalo jako referenční stav pro srovnání IHC. Analýza zahrnovala srovnání stavu proteinu MMR (intaktní/ztráta) s molekulárním stavem definovaným jako normální (žádné patogenní mutace, negativní na promotor hypermetylace MLH1 a BRAF divokého typu (žádná mutace V600E)) nebo abnormální (přítomnost patogenní/ch mutace(i), pozitivní na promotor hypermetylace MLH1 a/nebo pozitivní na mutaci BRAF V600E). Pro tuto studii je patogenní mutace v rámci nádoru definovaná jako zárodečná linie nebo somatická mutace s predikovaným výsledkem ztráty exprese proteinu MMR. Bodové odhady byly 99.4% PPA, 93.5% NPA a 98.8% OPA, jak uvádí Tab. 26.

Rovněž byla provedena sružená analýza srovnávající čtyři markery IHC MMR (bez protilátky VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) s výsledky molekulárního testování. Bodové odhady byly 99.3% PPA, 89.7% NPA a 98.5% OPA, jak shrnuje Tab. 27.

Další analýza srovnávala výsledky čtyř markerů IHC MMR s výsledky molekulárního testování pro geny MMR na úrovni případu pro zahrnutí stavu všech markerů a vytvoření výstupu dMMR/pMMR pro dvě metody. Tuto analýzu uvádí Tab. 28 a vykazuje 97.4% OPA mezi oběma metodami.

V rámci studie byl rovněž porovnán stav MMR u IHC a stav MMR z molekulárního testování pro jednotlivé markery MMR. Hodnota OPA každého markeru MMR v porovnání s kombinovaným výsledkem panelu pro sekvenování DNA tlustého střeva a testováním hypermetylace promotoru 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).

Rovněž byl srovnáván klinický stav BRAF V600E v kolorektálních karcinomech získaných IHC metodou s použitím protilátky VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) s výsledky stavu mutace BRAF, stanovenými sekvenováním DNA. Všechny výsledky testování PPA, NPA a OPA metodou IHC s použitím protilátky VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) s použitím sekvenování DNA jako reference byly 100 % (Tab. 29). Bylo provedeno další testování pro ověření schopnosti protilátky VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) dále stratiifikovat případy kolorektálního karcinomu vykazující ztrátu exprese proteinu MLH1. Z 23 případů pozitivních na BRAF V600E vykazovalo 20 případů ztrátu proteinu MLH1 dle IHC stanovení a bylo pozitivních na hypermetylaci promotoru MLH1. Tyto údaje jsou konzistentní s těsným spojením pozitivního stavu BRAF V600E se stavem hypermetylace promotoru MLH1. Zbývající tři případy byly pMMR (intaktní pro všechny proteiny MMR). Všechny vzorky pozitivní na BRAF V600E byly identifikovány jako sporadický kolorektální karcinom. Výsledky ověřily, že protilátka VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) správně identifikuje kolorektální karcinomy s mutací BRAF V600E. Údaje jsou také podpořeny použitím protilátky VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) k rozlišení mezi sporadickým a pravděpodobným Lynchovým syndromem u kolorektálního karcinomu při absenci exprese MLH1.

Tab. 26. Sružená analýza pro shodu panelu VENTANA MMR IHC Panel mezi IHC metodou a molekulárním testováním.

Stav (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)

Poznámka: Pozitivní procentuální shoda (PPA), negativní procentuální shoda (NPA), celková procentuální shoda (OPA).

Poznámka: Pro IHC je stav MMR intaktní nebo ztráta pro expresi proteinu. Pro tuto analýzu byly případy negativní na BRAF V600E zařazeny do kategorie intaktní a pozitivní případy do kategorie ztráta. Molekulární testování indikuje absenci (normální) nebo přítomnost (abnormální) potenciálních patogenních mutací nebo hypermetylace promotoru MLH1.

Poznámka: Oboustranné 95% intervaly spolehlivosti (CI) byly vypočítány metodou percentilový bootstrap.



Tab. 27. Sdružená analýza shody čtyř markerů MMR IHC (bez protilátky VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) mezi IHC a molekulárním testováním.

Stav* (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)

Poznámka: Pozitivní procentuální shoda (PPA), negativní procentuální shoda (NPA), celková procentuální shoda (OPA).

Poznámka: Pro IHC je stav intaktní nebo ztráta pro expresi proteinu. Molekulární testování indikuje absenci (normální) nebo přítomnost (abnormální) potenciálních patogenních mutací nebo hypermetylace promotoru MLH1.

Poznámka: Oboustranné 95% intervaly spolehlivosti (CI) byly vypočítány metodou percentilový bootstrap.

Tab. 28. Shoda mezi výsledky čtyř markerů IHC MMR a molekulárním testováním stavu MMR (dMMR/pMMR).

Stav 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)

Poznámka: Pozitivní procentuální shoda (PPA), negativní procentuální shoda (NPA), celková procentuální shoda (OPA).

Poznámka: Pro IHC je stav pMMR pro případ reprezentován intaktním stavem pro všechny proteiny MMR, zatímco stav dMMR je reprezentován ztrátou jednoho nebo více proteinů MMR. Pro molekulární testování je stav pMMR reprezentován absencí patogenních mutací promotoru hypermetylace MLH1, zatímco stav dMMR je reprezentován přítomností patogenních mutací promotoru hypermetylace MLH1.

Poznámka: Oboustranné 95% intervaly spolehlivosti (CI) byly vypočítány metodou Wilsonova skóre.

Tab. 29. Shoda mezi IHC s použitím protilátky VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) a molekulárním testováním.

BRAF V600E stav (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)

Poznámka: Pozitivní procentuální shoda (PPA), negativní procentuální shoda (NPA), celková procentuální shoda (OPA).

Poznámka: Stav pro BRAF V600E byl definován jako pozitivní nebo negativní výsledky IHC a abnormální (přítomnost mutace V600E) nebo normální (BRAF divokého typu) výsledky molekulárního testování.

Poznámka: Oboustranné 95% intervaly spolehlivosti (CI) byly vypočítány metodou Wilsonova skóre.

## LITERATURA

- Boyer JC, Umar A, Risinger JI, 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, et al. The role of MLH1, MSH2, and MSH6 in the development of multiple colorectal cancers. *Br J Cancer.* 2005;93(4):472-477.

- Kheirelseid EA, Miller N, Chang KH, et al. Mismatch repair protein expression in colorectal cancer. *J. Gastrointest Oncol.* 2013;4(4):397-408.
- Hsieh P, Yamane K. DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mech Ageing Dev.* 2008;129(7-8):391-407.
- Naboush A, Roman C, Shapira I. Immune checkpoint inhibitors in malignancies with mismatch repair deficiency: a review of the state of the current knowledge. *J Investig Med.* 2017;65(4):754-758.
- Chang L, Chang M, Chang HM, et al. Microsatellite instability: a predictive biomarker for cancer immunotherapy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2018;26(2):e15-e21.
- Buza N, Ziai J, Hui P. Mismatch repair deficiency testing in clinical practice. *Expert Rev Mol Diagn.* 2016;16(5):591-604.
- Silva FCC, Torrezaan GT, Ferreira JRO, 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.
- 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.
- Yamashita H, Nakayama K, Ishikawa M, et al. Microsatellite instability is a biomarker for immune checkpoint inhibitors in endometrial cancer. *Oncotarget.* 2017;9(5):5652-5664.
- Siegel R, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019;69(1):7-34.
- Pisani P, Bray F, Parkin DM. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int J Cancer.* 2002;97(1):72-81.
- Kato M, Takano M, Miyamoto M, et al. DNA mismatch repair-related protein loss as a prognostic factor in endometrial cancers. *J Gynecol Oncol.* 2015;26(1):40-45.
- Mathews KS, Estes JM, Conner MG, et al. Lynch syndrome in women less than 50 years of age with endometrial cancer. *Obstet Gynecol.* 2008;111(5):1161-6.
- Kim SR, Pina A, Albert A, et al. Does MMR status in endometrial cancer influence response to adjuvant therapy? *Gynecol Oncol.* 2018;151(1):76-81.
- Tran AQ and Gehrig P. Recent advances in Endometrial Cancer. *F1000 Research* 2017;6(F1000 Faculty Rev):81-90.
- Blank C, Mackensen A. Contribution of the PD L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. *Cancer Immunol Immunother.* 2007;56(5):739-745.
- Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature.* 2014;515(7528):563-567.
- Xiao X, Dong D, He W, et al. Mismatch repair deficiency is associated with MSI phenotype, increased tumor-infiltrating lymphocytes and PD-L1 expression in immune cells in ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2018;149(1):146-154.
- Le DT, Durham JN, Smith KN, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science.* 2017;357(6349):409-413.
- Sloan EA, Ring KL, Willis BC, et al. PD-L1 expression in mismatch repair-deficient endometrial carcinomas, including Lynch syndrome-associated and MLH1 promoter hypermethylated tumors. *Am J Surg Pathol.* 2017;41(3):326-333.
- Dudley JC, Lin MT, Le DT, et al. Microsatellite instability as a biomarker for PD-1 blockade. *Clin Cancer Res.* 2016;22(4):813-820.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013.
- 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.
- 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.

29. 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.
30. 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.
31. Balmana J, Balaguer F, Cervantes A, Arnold D, Group EGW. Familial risk-colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol.* 2013;24 Suppl 6:vi73-80.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. Shia J. Evolving approach and clinical significance of detecting DNA mismatch repair deficiency in colorectal carcinoma. *Semin Diagn Pathol.* 2015;32(5):352-361.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. Carson F, Hladik C. *Histotechnology: A Self Instructional Text*, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
41. Roche PC, Hsi ED. *Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 6th edition. In: NR Rose, ed. ASM Press; 2002.
42. Sheehan DC, Hrapchak BB. *Theory and Practice of Histotechnology*, 2nd Edition. St. Louis, Missouri: The C.V. Mosby Company; 1980.
43. *Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories.* (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
44. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
45. Rabinovitch A. The College of American Pathologists laboratory accreditation program. *Accreditation and Quality Assurance.* 2002;7(11):473-476.
46. CLSI. *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.
47. Lorenzi M, Amonkar M, Zhang J, et al. Epidemiology of Microsatellite Instability High (MSI-H) and Deficient Mismatch Repair(dMMR)in Solid Tumors: A Structured Literature Review. *J. Oncology.* 2020; (22):1-17.

POZNÁMKA: V tomto dokumentu se jako symbol pro oddělování celého čísla a desetinných míst používá vždy tečka. Oddělovače pro tisíce se nepoužívají.

Souhrn bezpečnosti a funkčnosti naleznete zde:

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

## SYMBOLY

Společnost Ventana používá následující symboly a znaky nad rámec uvedený v normě ISO 15223-1 (pro USA: definici použitých symbolů naleznete na internetových stránkách [dialog.roche.com](http://dialog.roche.com)):



Číslo položky Global Trade



Jedinečná identifikace prostředku

## DUŠEVNÍ VLASTNICTVÍ

VENTANA, BENCHMARK, OPTIVIEW a logo VENTANA jsou ochranné známky společnosti Roche. Všechny ostatní ochranné známky jsou majetkem příslušných vlastníků.

© 2022 Ventana Medical Systems, Inc.

## KONTAKTNÍ INFORMACE



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

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

