

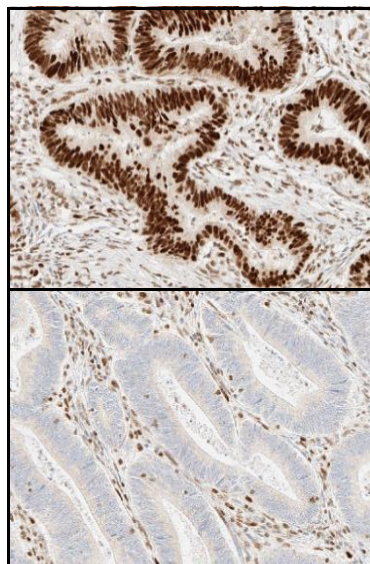
VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody

Za uporabo z VENTANA MMR IHC Panel

REF 760-5093

08033684001

IVD  50



Sl. 1. Barvanje s protitelesom VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody z Nedotaknjnim (zgoraj) ali izgubljenim (spodaj) izražanjem v tkivu raka debelega črevesa.

grozi Lynchov sindrom, pri bolnikih z diagnozo kolorektalnega raka (CRC) in pri statusu BRAF V600E, kot pripomoček za razlikovanje med sporadičnim in verjetnim Lynchovim sindromom CRC v odsotnosti izražanja beljakovine MLH1.

Rezultate, pridobljene s temi izdelki, mora interpretirati usposobljen patolog, skupaj s histološkim pregledom, relevantnimi kliničnimi informacijami in ustreznimi kontrolami.

Namenjeno za diagnostično uporabo in vitro (IVD).

POVZETEK IN OBRAZLOŽITEV

Kolorektalni rak je tretji najpogostejši rak in četrti najpogostejši vzrok smrti zaradi raka na svetu.¹ Večina CRC kaže na kromosomsko nestabilnost, vendar se približno 15 % raka razvije po alternativni poti, za katero je značilna okvara funkcije sistema za popravilo neusklajenosti DNA (MMR). Kot posledica pomanjkanja MMR imajo tumorji mikrosatelitsko nestabilnost (MSI), ki je posledica nezmožnosti beljakovin MMR, da popravijo napake replikacije DNA.

CRC z napakami MMR so označeni kot pomanjkljivi tumorji MMR (dMMR). Nasprotno pa so CRC brez napak MMR označeni kot izkušeni tumorji MMR (pMMR). Kolorektalni rak dMMR je pogosto slabo diferenciran in pogosto kaže prevlado proksimalnega debelega črevesa, mucinozne, medularne ali histološke značilnosti obročastega karcinoma in povečano število limfocitov, ki infiltrirajo tumor.^{2,3} Na splošno lahko pomanjkanje MMR povzroči mutacije zarodnih linij v enem od genov MMR s poznejšo izgubo ustreznega normalnega alela z genetskimi ali epigenetskimi mehanizmi, somatske mutacije alelov ali epigenetska inaktivacija gena *MLH1* z metilacijo.⁴

Štirje geni MMR, ki najpogosteje mutirajo, so *MLH1*, *PMS2*, *MSH2* in *MSH6*. V normalnih celicah beljakovina MLH1 tvori kompleks (heterodimer) z beljakovino PMS2, medtem ko

beljakovina MSH2 tvori kompleks z beljakovino MSH6.^{5,6} Ko pride do neusklajenosti DNA, se heterodimer MSH2/MSH6 veže na neusklajeno DNA in povzroči konformacijske spremembe. Heterodimer MLH1/PMS2 veže na DNA-vezani kompleks MSH2/MSH6, kar povzroči ekscizijsko popravilo prizadete DNA.

Beljakovine MLH1, PMS2, MSH2 in MSH6 so klinično pomembne beljakovine MMR, kodirane z geni, ki so lahko mutirale v družinah z Lynchovim sindromom.^{7,8} Nosilci teh mutacij imajo veliko življenjsko tveganje za razvoj kolorektalnega in drugih vrst raka zaradi kopičenja napak replikacije DNA v proliferirajočih celicah. Lynchov sindrom predstavlja 1–6 % vseh CRC. Ti tumorji so posledica dedovanja zarodne avtosomno dominantne mutacije v enem od štirih genov MMR, pri čemer se izguba MLH1 pojavi pri večini teh CRC, povezanih z Lynchovim sindromom.^{9,10} Več kot 300 različnih mutacij v družini beljakovin MMR so ugotovili pri bolnikih z Lynchovim sindromom. Za fenotip tumorja, ki je povezan z Lynchovim sindromom, je na splošno značilna imunohistokemijska izguba izražanja v beljakovinah MMR, zlasti MLH1, PMS2, MSH2 in MSH6.^{10,11,12,13} MMR IHC testiranje se je izkazalo za koristno pri identifikaciji specifičnega gena MMR, pri katerem je najverjetneje, da bomo našli zarodno linijo ali somatsko spremembo.¹⁴

Kot del VENTANA MMR IHC Panel, VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (protitelo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) pomaga pri razlikovanju sporadičnega in verjetnega Lynchovega sindroma CRC v odsotnosti izražanja beljakovin MLH1.^{15,16} Pri CRC je izguba beljakovin MLH1 pogosto posledica hipermetilacije promotora *MLH1* in kaže na sporadično pojavnost.¹⁷ Prisotnost beljakovine BRAF V600E je tesno povezana s hipermetilacijo promotora *MLH1*. Posledično pozitiven rezultat barvanja s protitelesom VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) kaže na sporadičen CRC.

KLINIČNA POMEBNOST

Lynchov sindrom je bil opisan v 1960-ih letih in je ugotovil povezavo med izgubo funkcije MMR in rakom.¹⁸ Izguba beljakovin MMR (MLH1, PMS2, MSH2 ali MSH6) lahko privede do MSI in večje življenjske nevarnosti ne le CRC, tudi rak želodca, možganov, trebušne slinavke, kože, endometrija in jajčnikov. Bolniki z Lynchovim sindromom imajo 50–80 % življenjskega tveganja za CRC.^{5,19,20} Lynchov sindrom je povsem drugačen od drugih dednih sindromov raka, saj neposredno testiranje tumorskih tkivnih pripomočkov pri prepoznavanju bolnikov, ki jim grozi Lynchov sindrom, in pomaga pri nadaljnjem genetskem testiranju na zarodnih linijah. Družine z Lynchovim sindromom imajo koristi od naprednih protokolov za presejanje raka.

Različne smernice, vključno s smericami National Comprehensive Cancer Network (NCCN), priporočajo, da se vse CRC pregledajo na potencialni Lynchov sindrom, da se identificirajo bolniki in družine, ki bodo imeli koristi od nadaljnjih genetskih testiranj in svetovanja.^{18,21,22,23,24} VENTANA MMR IHC Panel bo pomagal določiti status MMR CRC, tako da jih bo razvrstil kot nedotaknjene ali z izgubo izražanja beljakovin MMR. Zaznavanje vseh štirih beljakovin MMR v tumorju kaže na normalen ali nedotaknjen MMR. Izgubo izražanja MLH1 oziroma MSH2 skoraj vedno spremlja izguba heterodimernega partnerja, PMS2 oziroma MSH6. Vendar izguba PMS2 ali MSH6 ne vodi do izgube MLH1 ali MSH2. Izguba PMS2, MSH2 in/ali MSH6 je skladna z verjetnim Lynchovim sindromom, zato je treba bolnike napotiti na dodatna testiranja in svetovanja v skladu s klinično prakso.

Izguba beljakovine MLH1 lahko kaže na sporadično pojavnost ali potencialni Lynchov sindrom. Pri 15 % ali več sporadičnih CRC je izguba beljakovine MLH1 posledica hipermetilacije promotora *MLH1*.^{5,25,26} Pomembno je, da mutacijo *BRAF V600E* opazimo pri približno dveh tretjinah tumorjev z izgubo izražanja MLH1 iz hipermetilacije promotora *MLH1*. V nasprotju s tem pri tumorjih Lynchovega sindroma zelo redko opazimo mutacijo *BRAF V600E*.²⁵ Če torej rezultat VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (protitelo VENTANA anti-MLH1 (M1)) kaže na izgubo beljakovine MLH1, lahko protitelo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) stratificira tumor kot sporadičen ali verjetni Lynchov sindrom.^{5,27} V CRC izguba beljakovine MLH1 s pozitivnim statusom BRAF V600E močno kaže na to, da je tumor posledica sporadične pojavnosti, ki dejansko odpravlja Lynchov sindrom kot osnovni vzrok za malignost.^{17,28} Kadar izgubo beljakovine MLH1 spremlja negativen status BRAF V600E, je izguba MLH1 skladna z veliko verjetnostjo Lynchovega sindroma.²⁹

NAČELO DELOVANJA

Protitelo VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) je miše monoklonsko protitelo, proizvedeno proti rekombinantni človeški beljakovini MSH2. Protitelo VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) se veže na beljakovino MSH2 v rezinah tkiva (FFPE), ki so fiksirane v formalinu in vklopljene v parafin. Protitelo je mogoče lokalizirati z uporabo hapteniranega

sekundarnega protitelesa, ki mu sledi multimerni konjugat antihapten-HRP (OptiView DAB IHC Detection Kit, kat. št. 760-700 / 06396500001). Nato se specifični kompleks protitelesa in encima vizualizira z sproženim produktom encimske reakcije. Vsak korak se inkubira za natančen čas in temperaturo. Na koncu vsakega koraka inkubacije instrument spere rezine, da ustavi reakcijo in odstrani nevezani material, ki bi v naslednjih korakih oviral željeno reakcijo. Uporablja se tudi ULTRA LCS (Predilute) (kat. št. 650-210 / 05424534001) ali LCS (Predilute) (kat. št. 650-010 / 05264839001), ki zmanjšuje izhlapevanje vodnih reagentov s preparata vzorca.

PRILOŽENI MATERIALI

Protitelo VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) vsebuje dovolj reagenta za 50 testov.

En 5-mL dispencer za protitelo VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) vsebuje približno 100 µg mišjega monoklonskega protitelesa.

Protitelo je razredčeno v 0.1 M fosfatnem pufru (pH 7.3) z 0.3 % nosilne beljakovine, 0.05 % Brij 35 in 0.05 % konzervansa ProClin300.

Skupna koncentracija beljakovin v reagentu je približno 3 mg/mL. Koncentracija specifičnih protiteles je približno 20 µg/mL. Pri tem izdelku ni bila opažena znana reaktivnost nespecifičnih protiteles.

Protitelo VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) je mišje monoklonsko protitelo, proizvedeno kot prečiščen supernatant celične kulture.

Za podrobnejše opise naslednjega si preberite ustrezen pregled metod pribora za zaznavanje VENTANA: načelo delovanja, material in metode, odvzem vzorcev in priprava na analizo, postopki kontrole kakovosti, odpravljanje težav, interpretacija rezultatov in splošne omejitve.

POTREBNI MATERIALI, KI NISO PRILOŽENI

Reagenti za barvanje, kot so pribori za zaznavanje in pomožne komponente VENTANA, vključno s preparati za kontrolo z negativnimi in pozitivnimi tkivi, niso priloženi.

Vsi izdelki, navedeni v priloženem pregledu metod, morda niso na voljo na vseh območjih. Obrnite se na svojega lokalnega predstavnika za podporo.

Za barvanje bodo morda potrebni naslednji reagenti in materiali, ki niso priloženi:

1. Priporočeno kontrolno tkivo
2. Mikroskopski preparati s pozitivnim nabojem
3. VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (kat. št. 760-5091 / 08033668001)
4. VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody (kat. št. 760-5094 / 08033692001)
5. VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (kat. št. 760-5092 / 08033676001)
6. VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (kat. št. 760-5095 / 08033706001)
7. Negative Control (Monoclonal) (kat. št. 760-2014 / 05266670001)
8. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (kat. št. 790-4795 / 06683380001)
9. OptiView DAB IHC Detection Kit (kat. št. 760-700 / 06396500001)
10. OptiView Amplification Kit (kat. št. 760-099 / 06396518001 (50 testov) ali kat. št. 860-099 / 06718663001 (250 testov))
11. EZ Prep Concentrate (10X) (kat. št. 950-102 / 05279771001)
12. Reaction Buffer Concentrate (10X) (kat. št. 950-300 / 05353955001)
13. ULTRA LCS (Predilute) (kat. št. 650-210 / 05424534001)
14. LCS (Predilute) (kat. št. 650-010 / 05264839001)
15. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (kat. št. 950-224 / 05424569001)
16. Cell Conditioning Solution (CC1) (kat. št. 950-124 / 05279801001)
17. Hematoxylin II (kat. št. 790-2208 / 05277965001)
18. Bluing Reagent (kat. št. 760-2037 / 05266769001)
19. Trajno fiksno sredstvo
20. Krovno stekelce
21. Avtomatski pripomoček za nameščanje krovnih stekelc
22. Laboratorijska oprema za splošno rabo
23. Instrument BenchMark IHC/ISH

SHRANJEVANJE IN STABILNOST

Ko izdelek prejmete in kadar ga ne uporabljate, ga hranite pri temperaturi 2–8 °C. Ne zamrzujte.

Da bi zagotovili ustrezno dostavo reagenta in stabilnost protitelesa, po vsaki uporabi znova namestite pokrovček dispenzerja, dispenzer pa takoj postavite nazaj v hladilnik v pokončnem položaju.

Na vsakem dispenzerju za protitelesa je naveden datum poteka roka uporabnosti. Če je pravilno shranjen, je reagent stabilen do datuma, navedenega na etiketi. Reagenta ne uporabljajte po datumu izteka roka uporabnosti.

PRIPRAVA VZORCA

Pri uporabi pribora za zaznavanje OptiView DAB IHC Detection Kit in instrumentov BenchMark IHC/ISH so za uporabo s tem primarnim protitelesom primerna rutinsko obdelana tkiva FFPE.

Rezine je treba odrezati na debelino približno 4 µm in namestiti na preparate s pozitivnim nabojem. Za barvanje je treba uporabiti sveže odrezane preparate, saj se lahko antigenost odrezanih rezin tkiva sčasoma zmanjša. Priporočamo, da z neznanimi vzorci hkrati izvedete pozitivne in negativne kontrole.

Za VENTANA MMR IHC Panel je priporočljivo, da se tkivo fiksira v roku 6 ur po izrezu v 10 % nevtralnemu pufranemu formalinu (NBF) za 6–24 ur na podlagi barvanja tonzila. Sprejemljivo barvanje je bilo doseženo tudi s fiksacijo v cinkovem formalinu in fiksiranih sredstvih Z-5 za 6–24 ur. Ocetna kislina alkoholnega formalina (AFA), 95 % etanol in fiksirna sredstva PREFER niso priporočljivi za uporabo s VENTANA MMR IHC Panel, saj tkiva ne kažejo barvanja ali pa kažejo spremenljivo obarvanje.

Uporabljen količina fiksirnega sredstva bi morala biti od 15- do 20-krat večja od volumna tkiva. Noben fiksirno sredstvo v 24 urah ne bo prodrla v več kot 2 do 3 mm trdnega tkiva ali 5 mm poroznega tkiva. Fiksacija se lahko izvede pri sobni temperaturi (15–25 °C).^{30,31}

OPOZORILA IN VARNOSTNI UKREPI

1. Za diagnostično uporabo in vitro (IVD).
2. Samo za profesionalno uporabo.
3. **SVARILLO:** Zvezna zakonodaja ZDA dovoljuje prodajo tega izdelka zgolj na osnovi zdravniškega recepta. (Rx Only)
4. Ne uporabljajte, ko dosežete določeno število testov.
5. V tem reagentu se kot konzervans uporablja raztopina ProClin 300. Razvrščena je kot dražljiva snov in lahko ob stiku s kožo povzroči preobčutljivost. Pri delu upoštevajte previdnostne ukrepe. Izogibajte se stiku reagentov z očmi, kožo in sluznicami. Uporabljajte zaščitna oblačila in rokavice.
6. Pozitivno napolnjeni preparati so lahko izpostavljeni okoljskim obremenitvam, kar povzroči neprimerno barvanje. Za več informacij o uporabi teh vrst preparatov se obrnite na svojega predstavnika družbe Roche.
7. Z materiali človeškega ali živalskega izvora je treba ravnati kot z biološko nevarnimi materiali in jih zavreči ob upoštevanju ustreznih previdnostnih ukrepov. V primeru izpostavljenosti je treba upoštevati zdravstvene smernice pristojnih organov.^{32,33}
8. Izogibajte se stiku reagentov z očmi in sluznicami. Če reagenti pridejo v stik z občutljivimi območji, jih temeljito sperite z veliko vode.
9. Izogibajte se mikrobnim kontaminacijam reagentov, saj lahko povzroči nepravilne rezultate.
10. Za dodatne informacije o uporabi te naprave glejte uporabniški priročnik instrumenta BenchMark IHC/ISH, in navodila za uporabo vseh potrebnih komponent, ki so na voljo na dialog.roche.com.
11. O priporočenem načinu odstranjevanja se posvetujte z lokalnimi in/ali državnimi organi.
12. Varno označevanje izdelka je temelji predvsem na smernicah EU GHS. Varnostni list za profesionalnega uporabnika je na voljo na zahtevo.
13. Če želite prijaviti domnevane resne incidente, povezane s to napravo, se obrnite na lokalnega predstavnika družbe Roche in pristojni organ države članice ali države, v kateri ima uporabnik sedež.

Ta izdelek vsebuje sestavne dele, ki so v skladu z Uredbo (ES) št. 1272/2008 razvrščeni na naslednji način:

Pregl. 1. Podatki o ogroženosti.

Ogroženost	Koda	Izjava
	H317	Lahko povzroči alergijski odziv kože.
	P261	Preprečite vdihavanje prahu/dima/plina/meglence/hlapov/razpršila.
	P272	Kontaminirana delovna oblačila niso dovoljena zunaj delovnega mesta.
	P280	Nosite zaščitne rokavice.
	P333 + P313	Če nastopi draženje kože ali se pojavi izpuščaj: Poišcite zdravniško pomoč/oskrbo.
	P362 + P364	Takoj sleči kontaminirana oblačila in jih oprati pred ponovno uporabo.
	P501	Odstraniti vsebino/posodo v odobrenem obratu za odstranjevanje odpadkov.

Ta izdelek vsebuje CAS št. 55965-84-9, mešanico: 5-kloro-2-metil-4-izotiazolin-3-ona in 2-metil-2H-izotiazol-3-ona (3:1).

POSTOPEK BARVANJA

Protitelo VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) je bilo razvito za uporabo na instrumentih BenchMark IHC/ISH v kombinaciji s priborom za zaznavanje OptiView DAB IHC Detection Kit in pomožnimi reagenti. Za priporočen protokol barvanja glejte Pregl. 2.

Učinek spreminjanja časa in temperature pridobivanja antigena na robustnost testa ni znan. Tako lahko odstopanje od priporočenih pogojev za pridobivanje antigenov iz navedenega protokola razveljavi pričakovane rezultate. Uporabiti in dokumentirati je treba ustrezno kontrolo. Uporabniki, ki odstopajo od navedenega protokola, morajo sprejeti odgovornost za razlago rezultatov bolnikov. To protitelo je bilo optimizirano za specifične inkubacijske čase, vendar pa mora rezultate, pridobljene s tem reagentom, uporabnik oceniti.

Parametre za samodejne postopke lahko prikazete, natisnete in urejate v skladu s postopkom v navodilih za uporabo instrumenta. Za več podrobnosti o postopkih barvanja imunohistokemije glejte pregled metod pribora za zaznavanje OptiView DAB IHC Detection Kit.

Za več informacij o pravilni uporabi te naprave si oglejte pregled metod za linijski dispenzer, povezan s št. dela 760-5093.

Pregl. 2. Priporočen protokol barvanja za protitelo VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) s priborom za zaznavanje OptiView DAB IHC Detection Kit na instrumentih BenchMark IHC/ISH.

Vrsta postopka	Metoda		
	GX	XT	ULTRA
Deparafinizacija	Izbrano	Izbrano	Izbrano
Priprava celic (razkrivanje antigena)	CC1 40 minut,	CC1, 40 minut	ULTRA CC1, 40 minut, 100 °C
Predhodni primarni zaviralec peroksidaze	Izbrano	Izbrano	Izbrano
Protitelo (primarno)	12 minut, 37 °C	12 minut, 37 °C	12 minut, 36 °C
OptiView HQ Linker	8 minut (privzeto)		
OptiView HRP Multimer	8 minut (privzeto)		
Kontrastno barvilo	Hematoxylin II, 4 minute		

Vrsta postopka	Metoda		
	GX	XT	ULTRA
Po kontrastiranju	Bluing, 4 minute		

Odstopanje od priporočenih pogojev za pridobivanje antigenov iz navedenega protokola lahko razveljavi pričakovane rezultate. Zaradi razlik v fiksaciji in obdelavi tkiv ter splošnih laboratorijskih instrumentov in okoljskih pogojev bo morda treba povečati ali zmanjšati inkubacijo primarnih protiteles na podlagi posameznih vzorcev in želja ocenjevalca. Za nadaljnje informacije o spremembah fiksacije si oglejte »Immunohistochemistry: Principles and Advances.«³⁴

POSTOPKI KONTROLE KAKOVOSTI

Kontrola z negativnim reagentom

Poleg barvanja s protitelesom VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) je treba drug preparat obarvati z mišjim monoklonskim negativnim reagentom, Negative Control (Monoclonal). Negativni kontrolni reagent se uporablja za oceno nespecifičnega barvanja. Parametri barvanja za protitelo z negativnim kontrolnim reagentom bi morali biti enaki kot za primarno protitelo.

Kontrola s pozitivnim tkivom

Pri vsakem opravljenem postopku barvanja je treba izvesti kontrolo s pozitivnim tkivom. Optimalna laboratorijska praksa je, da pozitivno kontrolno rezino nanesete na preparat s tkivom bolnika. Tako boste preprečili morebitne napake pri nanašanju reagentov na preparat. Za kontrolo kakovosti je primernejše tkivo s šibkim pozitivnim barvanjem. S pozitivnim barvanjem komponente tkiva se potrdi, da je bilo protitelo uporabljeno in je instrument pravilno deloval. Kontrolno tkivo lahko vsebuje tako pozitivne kot negativne elemente barvanja ter se uporablja kot pozitivno in negativno kontrolno tkivo. Kontrolna tkiva naj se pridobijo s svežo avtopsijo, biopsijo ali kirurškim odvzemom vzorca in naj se pripravijo oziroma fiksirajo kakor hitro je mogoče na način, ki je identičen testnim preparatom. Takšna tkiva lahko spremljajo vse korake postopka priprave tkiva do barvanja. Uporaba rezin tkiv, fiksiranih ali obdelanih drugače od testnega vzorca, bo zagotovila nadzor nad vsemi reagenti in postopki metod, razen fiksacije in obdelave tkiva. Poznane kontrole s pozitivnim tkivom je treba uporabiti samo za spremljanje pravilnega delovanja obdelanih tkiv in testnih reagentov, ne kot pomoč pri ugotavljanju specifične diagnoze za vzorce bolnice. Če kontrole s pozitivnim tkivom ne pokažejo pozitivnega barvanja, se morajo rezultati testnih vzorcev šteti za neveljavne.

Kot kontrola s pozitivnim tkivom se lahko uporablja tkivo CRC Kliničnim statusom MSH2 Nedotaknjena ali normalnega tkiva debelega črevesa predhodno kvalificiranega s protitelesom VENTANA anti-MSH2 (G219-1129). Normalno debelo črevo se bo barvalo nedotaknjeno za MSH2 z uporabo protitelesa VENTANA anti-MSH2 (G219-1129). Kontrola s pozitivnim tkivom mora kazati nedvoumno jedrsko barvanje v vitalnih tumorskih celicah ob prisotnosti notranjih pozitivnih kontrol (jedrsko barvanje limfocitov, fibroblastov ali normalnega epitelija v bližini tumorja).

Kontrola z negativnim tkivom

Ker so beljakovine MLH1, PMS2, MSH2 in MSH6 izražene v vseh tkivih, za te biomarkerje ne obstaja normalna kontrola z negativnim tkivom. Vendar se lahko tkivo CRC Kliničnim statusom Izgube MSH2, predhodno kvalificirano s protitelesom VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) uporabi kot kontrola z negativnim tkivom. Kontrolo z negativnim tkivom je treba uporabljati samo za spremljanje pravilne učinkovitosti obdelanih tkiv, testnih reagentov in instrumentov in ne kot pomoč pri oblikovanju posebne diagnoze vzorcev bolnikov.

Preverjanje testa

Pred prvo uporabo protitelesa ali sistema za barvanje v diagnostičnem postopku je treba preveriti specifičnost protitelesa s testiranjem na seriji tkiv z znanimi značilnostmi delovanja IHC, ki predstavljajo tkiva Nedotaknjena za Klinični status MSH2. Glejte postopke kontrole kakovosti, ki so bili predhodno opisani v tem pregledu metod in priporočila za nadzor kakovosti v College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist³⁵ ali CLSI Approved Guideline.³¹

INTERPRETACIJA BARVANJA / PRIČAKOVANI REZULTATI

Vzorci celičnega barvanja za protitelo VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) je jedrski v aktivno razmnožujočih se celicah. Vzorci CRC, obarvani s protitelesom VENTANA anti-MSH2 (G219-1129), prejmejo Klinični status s strani usposobljenega patologa na podlagi ocene prisotnosti ali odsotnosti specifičnega jedrskega barvanja v tumorju. Klinični status

Nedotaknjeno se dodeli primerom z nedvoumnim jedrskim barvanjem v vitalnih tumorskih celicah ob prisotnosti sprejemljivih notranjih pozitivnih kontrol (jedrsko barvanje limfocitov, fibroblastov ali normalnega epitelija v bližini tumorja). Klinični status izguba se dodeli primerom z nedvoumno izgubo jedrskega barvanja ali žariščnim šibkim dvoumnim jedrskim barvanjem v vitalnih tumorskih celicah ob prisotnosti notranjih pozitivnih kontrol, kot je prikazano v Pregl. 3.

Če nedvoumnega jedrskega barvanja ni v notranjih pozitivnih kontrolah in/ali barvanje ozadja ovira interpretacijo, je treba test šteti za nesprejemljiv in ga je treba ponoviti. Punkatno jedrsko barvanje tumorskih celic je treba šteti za negativno (Izguba). V primerih žariščnega barvanja tumorskih celic mora biti intenzivnost jedrskega barvanja najmanj enaka intenzivnosti notranjih pozitivnih kontrol skupaj s sotočnim/neprekinjenim jedrskim barvanjem v nekaj epitelijskih žlezah ali skupkih, da bo primer dobil Klinični status Nedotaknjen. Če teh pogojev ni, se za primer navede Klinični status Izguba.

Pregl. 3. Interpretacija barvanja za protiteleso VENTANA anti-MSH2 (G219-1129).

Klinični status	Opis
Nedotaknjeno izražanje MSH2	Nedvoumno jedrsko barvanje v vitalnih tumorskih celicah ob prisotnosti notranjih pozitivnih kontrol (jedrsko barvanje limfocitov, fibroblastov ali epitelija normalnega debelega črevesa v bližini tumorja)
Izguba izražanja MSH2	Nedvoumna izguba jedrskega barvanja ali žariščno šibko dvoumno jedrsko barvanje v vitalnih tumorskih celicah ob prisotnosti notranjih pozitivnih kontrol. Punkatno jedrsko barvanje se bo štelo za negativno.

Primeri, obarvani s protitelesom VENTANA anti-MSH2 (G219-1129), so razvrščeni kot Nedotaknjeni ali Izguba glede na prisotnost ali odsotnost specifičnega barvanja v tumorju.

POSEBNE OMEJITVE

Odstopanje od priporočenih pogojev za pridobivanje antigenov iz navedenega protokola razveljavi pričakovane rezultate. Uporabiti je treba ustrezno kontrolo in jo dokumentirati. Uporabniki, ki odstopajo od navedenega protokola, morajo sprejeti odgovornost za razlago rezultatov bolnikov.

Nekateri primeri so lahko še posebej zahtevni zaradi naslednjih težav:

- Nespecifično ozadje: Nekateri vzorci lahko kažejo nespecifično barvanje ozadja iz razlogov, ki niso dobro razumljeni. Zato bi morala ocena preparata, obarvanega s protitelesom VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) vključevati primerjavo tega preparata s preparatom z negativnim kontrolnim reagentom, da se določi stopnja nespecifičnega barvanja ozadja. Če je prisotno citoplazemsko barvanje pri interpretaciji IHC se protiteleso VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) ne upošteva.
- Žariščno barvanje: Nekateri vzorci lahko kažejo žariščno barvanje v tumorskih celicah, intenzivnost barvanja pa se lahko razlikuje od šibke do močne. Na podlagi algoritma za točkovanje IHC protitelesa VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) je treba žariščno šibko dvoumno jedrsko barvanje v vitalnih tumorskih celicah ob prisotnosti notranjih pozitivnih kontrol razvrstiti kot izguba. Barvanje se lahko razlikuje glede na intenzivnost in ta intenzivnost se lahko razlikuje po celotnem tumorju; vendar to ne vpliva na Klinični status MSH2.
- Punkatno barvanje: Nekateri vzorci lahko kažejo ločeno punkatno barvanje znotraj nekaj jeder tumorja; intenzivnost barvanja se lahko razlikuje od šibke do močne. Ta vzorec barvanja je treba prezreti in če ima primer samo to vrsto vzorca barvanja, mu je treba dati Klinični status Izguba.
- Artefakt tkiva ali barvanja: Tudi histološki artefakti, ki izvirajo iz postopkov obdelave vzorcev in mikrotomije, lahko otežijo določitev Kliničnega statusa IHC protitelesa VENTANA anti-MSH2 (G219-1129). Ti artefakti lahko vključujejo, vendar niso omejeni na, gradientne fiksacije in učinke robov, ujemanje DAB, jedrsko nastajanje mehurčkov, pomanjkanje barvanja v nekaterih predelih tkiva, trganje ali zlaganje tkiva in izgubo rezin tkiva. V nekaterih primerih bo morda potrebno večkratno barvanje novih rezin ali pridobitev novega vzorca.

Na vsakem instrumentu morda niso registrirane vse analize. Za več informacij se obrnite na lokalnega predstavnika družbe Roche.

ZNAČILNOSTI DELOVANJA

ANALITIČNA UČINKOVITOST

Izvedeni so bili testi barvanja za občutljivost, specifičnost in natančnost, rezultati pa so navedeni v nadaljevanju.

Občutljivost in specifičnost

Pozitivno barvanje je jedrsko, če ni drugače določeno. Pri normalnem in neoplastičnem tkivu niso opazili nepričakovanega barvanja s protitelesom VENTANA anti-MSH2 (G219-1129). Kot je bilo pričakovano, ker je popravilo neusklajenosti prisotno v vseh aktivno razmnožujočih se celicah, je večina normalnih in neoplastičnih tkiv pokazala pozitivno barvanje.

Pregl. 4. Občutljivost/specifičnost protitelesa VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) je bila določena s testiranjem normalnih tkiv FFPE.

Tkivo	Št. pozitivnih/ vseh primerov	Tkivo	Št. pozitivnih/ vseh primerov
Veliki možgani	3/3	Požiralnik	3/3
Mali možgani	3/3	Želodec	3/3
Nadledvična žleza	3/3	Tanko črevo	3/3
Jajčnik	5/5	Debelo črevo	3/3
Trebušna slinavka	3/3	Jetra	3/3
Bezgavka	3/3	Jezik/žleza slinavka	2/3
Možganski privesek	3/3	Ledvica	3/3
Modo	3/3	Prostata	3/3
Ščitnica	3/3	Sečni mehur	3/3
Dojka	3/3	Obščitnica	3/3
Vranica	3/3	Endometrij	3/3
Tonzila	3/3	Maternični vrat	3/3
Priželjc	3/3	Skeletna mišica	3/3
Kostni mozeg	3/3	Koža	3/3
Pljuča	3/3	Živec	5/5
Srce	1/3	Mezotelij	3/3

Opomba: Beljakovine za popravilo neujemanja, kot je MSH2, so prisotni v vseh aktivno razmnožujočih se celicah. Za vsa tkiva je bilo določeno pozitivno/negativno barvanje za elemente, specifične za tkivo, ob prisotnosti pozitivnega barvanja v normalnih kontrolnih celicah (limfociti, fibroblasti in epitelne celice).

Pregl. 5. Občutljivost/specifičnost protitelesa VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) je bila določena s testiranjem različnih neoplastičnih tkiv FFPE.

Patologija	Št. pozitivnih/ vseh primerov
Glioblastom (veliki možgani)	1/1
Meningiom (veliki možgani)	1/1
Ependimom (veliki možgani)	1/1
Oligodendrogliom (veliki možgani)	1/1
Serozni adenokarcinom (jajčnik)	1/1
Adenokarcinom (jajčnik)	1/1

Patologija	Št. pozitivnih/ vseh primerov
Nevroendokrini neoplazma (trebušna slinavka)	1/1
Adenokarcinom (trebušna slinavka)	1/1
Seminom (modo)	2/2
Medularni karcinom (ščitnica)	1/1
Papilarni karcinom (ščitnica)	1/1
Mikroinvazivni duktalni karcinom (dojka)	1/1
Duktalni karcinom in situ (dojka)	1/1
Invazivni duktalni karcinom (dojka)	1/1
Limfom celic B, ki ni drugače opredeljen (vranica)	1/1
Drobnocelični karcinom (pljuča)	1/1
Ploščatocelični karcinom (pljuča)	1/1
Adenokarcinom (pljuča)	1/1
Nevroendokrini karcinom (požiralnik)	1/1
Adenokarcinom (požiralnik)	1/1
Pečatocelični karcinom (želodec)	1/1
Adenokarcinom (tanko črevo)	1/1
Stromalni sarkom (tanko črevo)	1/1
Adenokarcinom (debelo črevo)	1/1
Adenokarcinom (rektum)	1/1
Gastrointestinalni stromalni tumor (GIST) (rektum)	1/1
Hepatoblastom (jetra)	1/1
Svetlocelični karcinom (ledvica)	1/1
Adenokarcinom (prostata)	2/2
Leiomiom (maternica)	1/1
Ploščatocelični karcinom (maternični vrat)	2/2
Embrionalni rabdomiosarkom (skeletna mišica)	1/1
Ploščatocelični karcinom (koža)	1/1
Nevroblastom (retroperitonej)	1/1
Mezoteliom (potrebušnica)	1/1
Limfom celic B; ki ni drugače opredeljen (bezgavka)	2/2
Hodgkinov limfom (bezgavka)	1/1
Leiomijsarkom (sečni mehur)	1/1
Osteosarkom (kost)	1/1
Leiomijsarkom (gladka mišica)	1/1

Opomba: Beljakovine za popravilo neujemanja, kot je MSH2, so prisotni v vseh aktivno razmnožujočih se celicah. Za vsa tkiva je bilo določeno pozitivno/negativno barvanje tumorskih celic ob prisotnosti pozitivnega barvanja v normalnih kontrolnih celicah (limfociti, fibroblasti in epitelne celice).

Natančnost

Ponovljivost znotraj postopka in vmesna natančnost med dnevi

Ponovljivost in natančnost protitelesa VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) sta bili ocenjeni na instrumentu BenchMark ULTRA v kombinaciji s priborom za zaznavanje OptiView DAB IHC Detection Kit.

Ponovljivost znotraj postopka je bila ocenjena z uporabo 11 vzorcev CRC (6 Nedotaknjenih vzorcev in 5 vzorcev z izgubo za izražanje MSH2). Pet podvojenih preparatov vsakega vzorca CRC je bilo obarvanih s protitelesom VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) na enem instrumentu BenchMark ULTRA v enem dnevu. Vsak preparat, obarvan s protitelesom VENTANA anti-MSH2 (G219-1129), je bil združen s preparatom, obarvanim z negativnim kontrolnim reagentom, iz istega primera. Vsi kompleti preparatov so bili randomizirani, nato pa jih je en patolog, slep za diagnozo primera, ocenil kot Nedotaknjene ali z izgubo.

Vmesna natančnost med dnevi je prav tako bila ocenjena z uporabo 11 vzorcev CRC (6 Nedotaknjenih vzorcev in 5 vzorcev z izgubo za izražanje MSH2). Podvojeni preparati vsakega vzorca CRC so bili obarvani s protitelesom VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) na instrumentu BenchMark ULTRA v vsakem od 5 nezaporednih dni. Vsak preparat, obarvan s protitelesom VENTANA anti-MSH2 (G219-1129), je bil združen s preparatom, obarvanim z negativnim kontrolnim reagentom, iz istega primera. Vsi kompleti preparatov so bili randomizirani, nato pa jih je en patolog, slep za diagnozo primera, ocenil kot Nedotaknjene ali z izgubo.

Noben preparat, obarvan z negativnim kontrolnim reagentom, ni pokazal specifičnega barvanja, obarvanje ozadja pa bilo ≤ 0.5 . Z uporabo združenih podatkov o vseh možnih združitvah, sta študiji za ponovljivost znotraj postopka in vmesno natančnost med dnevi pokazali 100-odstotno ujemanje pozitivnega rezultata v odstotkih (PPA), 100-odstotno ujemanje negativnega rezultata v odstotkih (NPA) in 100-odstotno skupno ujemanje v odstotkih (OPA). Povzetek rezultatov je prikazan v Preglednici 6.

Pregl. 6. Ponovljivost znotraj postopka in vmesna natančnost med dnevi protitelesa VENTANA anti-MSH2 (G219-1129), izmerjena s Kliničnim statusom (Nedotaknjen/Izguba).

Ponovljivost/ Natančnost	Klinični status	Ujemanje			
		Vrsta	n/N	%	95 % CI
Ponovljivost znotraj postopka	Nedotaknjen	PPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	Izguba	NPA	25/25	100.0	(86.7, 100.0)
	Skupaj	OPA	55/55	100.0	(93.5, 100.0)
Vmesna natančnost med dnevi	Nedotaknjen	PPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)
	Izguba	NPA	50/50	100.0	(92.9, 100.0)
	Skupaj	OPA	110/110	100.0	(96.6, 100.0)

Opomba: 95 % CI je bilo izračunanih z metodo Wilson Score.

Vmesna natančnost med instrumenti

Vmesna natančnost med instrumenti BenchMark ULTRA protitelesa VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) je bila določena z barvanjem podvojenih preparatov 11 vzorcev CRC (6 Nedotaknjeni vzorci in 5 vzorcev z izgubo za izražanje MSH2) na 3 instrumentih BenchMark ULTRA s protitelesom VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) in uporabo pribora za zaznavanje OptiView DAB IHC Detection Kit.

Vsak preparat, obarvan s protitelesom VENTANA anti-MSH2 (G219-1129), je bil združen s preparatom, obarvanim z negativnim kontrolnim reagentom, iz istega primera. Vsi kompleti preparatov so bili randomizirani, nato pa jih je en patolog, slep za diagnozo primera, ocenil glede njihovega Kliničnega statusa (Nedotaknjen/Izguba). Noben preparat, obarvan z negativnim kontrolnim reagentom, ni pokazal specifičnega barvanja, obarvanje ozadja pa bilo ≤ 0.5 .

Za instrument BenchMark ULTRA je bila vmesna natančnost med instrumenti izvedena kot parna primerjava Kliničnega statusa preparatov za vsak vzorec med instrumenti in je prikazovala 100 % PPA, NPA in OPA. Povzetek rezultatov je prikazan v Pregl. 7.

Pregl. 7. Vmesna natančnost med instrumenti BenchMark ULTRA protitelesa VENTANA anti-MSH2 (G219-1129), izmerjena s Kliničnim statusom (Nedotaknjen/Izguba).

Natančnost	Klinični status	Ujemanje			
		Vrsta	n/N	%	95 % CI
Vmesna natančnost med instrumenti	Nedotaknjen	PPA	36/36	100.0	(90.4, 100.0)
	Izguba	NPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	Skupaj	OPA	66/66	100.0	(94.5, 100.0)

Opomba: 95 % CI je bilo izračunanih z metodo Wilson Score.

Poleg tega je bila vmesna natančnost med instrumenti protitelesa VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) določena z barvanjem podvojenih preparatov 6 vzorcev CRC (4 Nedotaknjeni vzorci in 2 vzorca z Izgubo za izražanje MSH2) na 3 instrumentih BenchMark XT in 3 instrumentih BenchMark GX s protitelesom VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) in uporabo pribora za zaznavanje OptiView DAB IHC Detection Kit.

Pri združevanju 3 instrumentov je bilo 15 opažanj na primer; mediana za vsak primer je bila določena iz teh 15 opažanj. Posamezna opažanja istega primera so bila skladna z mediano intenzivnostjo signala primera, če so bila znotraj intenzitete 0.5 signala. Za instrument BenchMark XT in BenchMark GX je bila vmesna natančnost med instrumenti izvedena kot parna primerjava rezultatov intenzivnosti barvanja tumorja za vsak vzorec, ki je pokazala 100 % OPA med 3 instrumenti BenchMark XT in 100 % OPA med 3 instrumenti BenchMark GX. Za vse preparate je bilo barvanje ozadja sprejemljivo (≤ 0.5) na obeh instrumentih BenchMark XT in BenchMark GX.

Skladnost instrumentov BenchMark IHC/ISH

Skladnost med instrumenti BenchMark IHC/ISH za protitelo VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) je bila določena z barvanjem vzorcev CRC s protitelesom VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) z uporabo pribora za zaznavanje OptiView DAB IHC Detection Kit. Vse preparate je glede Kliničnega statusa (Nedotaknjen/Izguba) ocenil en patolog.

Parna primerjava vzorcev CRC je bila izvedena med platformami, vključno z instrumenti BenchMark GX do BenchMark ULTRA (136 Nedotaknjenih primerov in 23 primerov z Izgubo), instrumenti BenchMark GX do BenchMark XT (134 Nedotaknjenih primerov in 23 primerov z Izgubo) in instrumenti BenchMark ULTRA do BenchMark XT (137 Nedotaknjenih primerov in 23 primerov z Izgubo). Vse pame primerjave, izvedene med platformami so pokazale 100 % povprečno ujemanje pozitivnega rezultata (APA), povprečno ujemanje negativnega rezultata (ANA) in OPA.

Študije natančnosti ocenjevalca

Natančnost pri enem ocenjevalcu in natančnost med ocenjevalci je bila ocenjena na 20 vzorcih CRC (12 Nedotaknjenih primerov in 8 primerov z Izgubo), obarvanih s protitelesom VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) in priborom za zaznavanje OptiView DAB IHC Detection Kit. Vsak preparat, obarvan s protitelesom VENTANA anti-MSH2 (G219-1129), je bil združen z H&E in s preparatom, obarvanim z negativnim kontrolnim reagentom, iz istega primera.

Vsi kompleti preparatov so bili randomizirani in ocenjeni s strani 3 patologov Kliničnega statusa MSH2 Nedotaknjen ali Izguba. Patologi so bili slepi za diagnozo primera. Po dvotedenskem čakalnem obdobju so bili preparati, obarvani s protitelesom VENTANA anti-MSH2 (G219-1129), ponovno randomizirani za drugo ocenjevanje Kliničnega statusa MSH2 s strani vsakega od 3 patologov. Noben preparat, obarvan z negativnim kontrolnim reagentom, ni pokazal specifičnega barvanja, obarvanje ozadja pa bilo ≤ 0.5 .

Natančnost pri enem ocenjevalcu je primerjala začetno in končno oceno preparatov enega patologa, ki je zagotovila 20 primerjav preparata CRC na patologa. Primerjave 3 patologov so bile zbrane in so pokazale 100.0 % APA, 100.0 % ANA in 100.0 % OPA za natančnost pri enem ocenjevalcu. Povzetek rezultatov je prikazan v Pregl. 8.

Natančnost med ocenjevalci je primerjala ocene preparatov (20 CRC x 2 oceni/primer x 3 patologi = 120 ocen preparatov) s statusom modalnega primera za vsak primer CRC. Rezultati kažejo 100.0 % PPA, NPA in OPA za natančnost med ocenjevalci. Povzetek rezultatov je prikazan v Pregl. 8.

Pregl. 8. Natančnost pri enem ocenjevalcu in natančnost med ocenjevalci protitelesa VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) na primerih CRC, izmerjena s Kliničnim statusom MSH2 (Nedotaknjen/Izguba).

Natančnost	Klinični status	Ujemanje			
		Vrsta	n/N	%	95 % CI
Pri enem ocenjevalcu	Nedotaknjen	APA	72/72	100.0	(94.9, 100.0)
	Izguba	ANA	48/48	100.0	(92.3, 100.0)
	Skupaj	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)
Med ocenjevalci	Nedotaknjen	PPA	72/72	100.0	(94.9, 100.0)
	Izguba	NPA	48/48	100.0	(92.6, 100.0)
	Skupaj	OPA	120/120	100.0	(96.9, 100.0)

Opomba: Pri enem ocenjevalcu so bili APA in ANA 95 % CI izračunani z uporabo metode na osnovi Clopper-Pearson, OPA 95 % CI pa je bil izračunan z uporabo metode ponovnega vzorčenja v percentilih. Med ocenjevalci so bili 95 % CI izračunani z metodo Wilson Score.

Natančnost med serijami

Natančnost med serijami protitelesa VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) je bila določena s testiranjem 3 proizvodnih serij protitelesa VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) na potrjenih preparatih 10 preparatov CRC (5 Nedotaknjenih in 5 z Izgubo za izražanje MSH2) na instrumentu BenchMark ULTRA, z uporabo pribora za zaznavanje OptiView DAB IHC Detection Kit.

Vsak preparat, obarvan s protitelesom VENTANA anti-MSH2 (G219-1129), je bil združen s preparatom, obarvanim z negativnim kontrolnim reagentom, iz istega primera. Komplete preparatov je randomiziral in ocenil en patolog, slep za diagnozo primera in številko serije protitelesa VENTANA anti-MSH2 (G219-1129). Noben preparat, obarvan z negativnim kontrolnim reagentom, ni pokazal specifičnega barvanja, obarvanje ozadja pa bilo ≤ 0.5 .

Za natančnost med serijami protitelesa VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) so bile vse ocene preparatov primerjane s statusom modalnega primera za vsak primer CRC. OPA med serijami protitelesa VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) je bila 100 %; kar kaže na to, da je za barvanje s protitelesom VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) možna obnovljivost med serijami protiteles.

Povzetek natančnosti med serijami protitelesa VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) je prikazan v preglednici 9.

Pregl. 9. Natančnosti med serijami protitelesa VENTANA anti-MSH2 (G219-1129), izmerjena s Kliničnim statusom (Nedotaknjen/Izguba).

Natančnost	Klinični status	Ujemanje			
		Vrsta	n/N	%	95 % CI
Med serijami	Nedotaknjen	PPA	45/45	100.0	(92.1, 100.0)
	Izguba	NPA	45/45	100.0	(92.1, 100.0)
	Skupaj	OPA	90/90	100.0	(95.9, 100.0)

Opomba: 95 % CI je bilo izračunanih z metodo Wilson Score.

Študija obnovljivosti med laboratoriji

Študija obnovljivosti med laboratoriji VENTANA MMR IHC Panel je bila zaključena za prikaz obnovljivosti vsakega testa VENTANA MMR IHC Panel za določanje Kliničnega statusa. Študija je vključevala 6 vzorcev tkiva CRC (3 Nedotaknjene in 3 z Izgubo) za vsako beljakovino MMR in 16 vzorcev tkiva CRC (8 pozitivnih in 8 negativnih) za postopek BRAF V600E, ki je bil opravljen na 3 instrumentih BenchMark ULTRA v vsakem od 5 Nezaporednih dni v 21 dneh v treh zunanjih laboratorijih. Vsak preparat, obarvan s protitelesom, je bil združen z H&E in s preparatom, obarvanim z negativnim kontrolnim reagentom, iz istega primera. Vse komplete preparatov je naključno randomiziralo in ocenilo skupno 6 ocenjevalcev (2 ocenjevalca/lokacijo), ki so bili slepi za Klinični status MMR kompleta študije. Vsak od 40 primerov v študiji je imel 30 opažanj v vseh dnevih, lokacijah in ocenjevalcih. Referenčni status modalnega primera je bil izpeljan za vsak

primer na podlagi najpogostejše opaženega statusa 30 opažanj. Študija je vključevala skupno 1200 opažanj za vseh pet beljakovin. Za vse ocenljive primere je bila stopnja sprejemljivosti za morfolgijo in ozadje v tej študiji 100 %. Povzetek združenih statistik (vseh petih beljakovin) med referenčnim statusom modalnega primera in posameznimi opažanji je prikazan v preglednici 10.

Pregl. 10. Ujemanje med VENTANA MMR IHC Panel referenčnim statusom modalnega primera.

Obnovljivost med laboratoriji	Klinični status	Ujemanje			
		Vrsta	n/N	%	95 % CI
Vse beljakovine	Nedotaknjeno/pozitivno	PPA	598/600	99.8	(98.7, 100.0)
	Izguba/negativno	NPA	593/600	98.9	(97.4, 99.5)
	Skupaj	OPA	1191/1200	99.4	(98.6, 99.7)

Opomba: Klinični status je opredeljen kot Nedotaknjen ali z Izgubo za izražanje beljakovin za beljakovine MMR in pozitiven ali negativen za beljakovino BRAF V600E. 95 % CI je bilo izračunanih s pristopom splošnega linearnega mešanega modela (GLMM).

Poleg tega so bile za protitelo VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) izvedene parne primerjave med lokacijami, med dnevi in med ocenjevalci. Za MSH2 je ta komplet študij vključeval skupno 180 opažanj. Povzetek rezultatov je prikazan v Pregl. 11. Podatki kažejo obnovljivost testa v 5 dneh, na 3 lokacijah in pri 6 ocenjevalcih.

Pregl. 11. Stopnje parnega ujemanja obnovljivosti med laboratoriji za protitelo VENTANA anti-MSH2 (G219-1129), izmerjena s Kliničnim statusom (Nedotaknjen ali Izguba).

Obnovljivost med laboratoriji		Ujemanje			
		Vrsta	n/N	%	95 % CI
Med lokacijami (3 lokacije)		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)
Med dnevi (5 nezaporednih dni)	Lokacija 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)
	Lokacija B	APA	120/120	100.0	(96.9, 100.0)
		ANA	120/120	100.0	(96.9, 100.0)
		OPA	120/120	100.0	(96.9, 100.0)
	Lokacija C	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)
Med ocenjevalci (2 patologa na lokacijo)		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)

Opomba: 95 % CI je bilo izračunanih z metodo ponovnega vzorčenja v percentilih v primerih, ko je bila ocena točke 100 %, je bila uporabljena metoda Wilson Score.

Študija točnosti: Primerjava metod rezultatov VENTANA MMR IHC Panel z molekularnim testiranjem (zaporedje DNA in hipermetilacija promotorja MLH1)

Izvedena je bila študija za primerjavo učinkovitosti VENTANA MMR IHC Panel z molekularnim testiranjem, ki vključuje celovito ploščo za sekvenciranje DNA debelega črevesa za identifikacijo CRC, ki (i) nimajo MMR (dMMR) in (ii) vsebujejo mutacijo BRAF V600E. Plošča za sekvenciranje DNA debelega črevesa je vključevala genomsko analizo različic, ki so prisotne v genih MMR (*MLH1*, *PMS2*, *MSH2*, *MSH6*, *EPCAM*), *BRAF* in drugih genih, pomembnih za rakotvornost (npr. *PIK3CA*, *KRAS*, *NRAS*, *ERBB2* itd.). Sekvenciranje je vključevalo vse eksone, intronske in bočne sekvence, pa tudi velike izbrise, podvajanja in mozaičnost.

Za študijo je H&E obarval sekvenčne primere CRC in jih ocenil glede znakov pravilne fiksacije in morfolgije, vključno s prisotnostjo celičnih elementov (tumor in celice notranje kontrole). Vsak primer so ovrednotili, da bi ugotovili, ali je vzorec vseboval najmanj 50 % vsebnosti tumorja, da bi zagotovil zadostno zastopanost tumorskih celic v vzorcu, kot je priporočeno za molekularno testiranje. Po pregledu je bilo v študijo vključenih 105 sekvenčnih primerov, ki ustrezajo tem merilom. Poleg tega je bilo vključenih 13 primerov CRC, ki kažejo Klinični status izgube zaradi IHC, da se zagotovi, da je bila v študiji predstavljena izguba vsakega označevalca. IHC je rezine vseh primerov v študiji obarval s ploščo VENTANA MMR IHC Panel in ustreznimi reagenti za negativno kontrolo. Dodatne rezine so bile izpostavljene plošči za sekvenciranje DNA debelega črevesa. Hipermetilacija promotorja *MLH1* je eden od mehanizmov, ki lahko privede do izgube izražanja beljakovine *MLH1*, in je bolj povezana s sporadično CRC kot z morebitno diagnozo Lynchovega sindroma. Zato so bili vsi primeri izgube *MLH1*, ki jih je IHC odkril v študiji, testirani glede hipermetilacije promotorja *MLH1*.

V končnem kompletu študije z 118 primeri je analiza vključevala PPA in NPA za vse združene označevalce (tj. vsa opažanja), kjer je molekularno testiranje delovalo kot referenčni status za primerjavo IHC. Analiza je vključevala primerjavo statusa beljakovine MMR (Nedotaknjeno/Izguba) z molekularnim statusom, opredeljenim kot Normalno (brez patogenih mutacij), Negativen za hipermetilacijo promotorja *MLH1* in divji tip *BRAF* (brez mutacije *V600E*) ali Nenormalen (prisotnost patogene mutacije/patogenih mutacij, pozitivnih na hipermetilacijo promotorja *MLH1* in/ali pozitivnih na mutacijo *BRAF V600E*). V tej študiji je patogene mutacija znotraj tumorja opredeljena kot zarodna ali somatska mutacija, za katero se predvideva, da bo povzročila izgubo izražanja beljakovin MMR. Točkovne ocene so bile 99.4 % PPA, 93.5 % NPA in 98.8 % OPA, kot je prikazano v Pregl. 12.

Opravljen je bil tudi združena analiza, ki je primerjala štiri označevalce MMR IHC (brez protitelesa VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) z rezultati molekularnega testiranja. Točkovne ocene so bile 99.3 % PPA, 89.7 % NPA in 98.5 % OPA, kot je povzeto v Pregl. 13.

Dodatna analiza je primerjala rezultate štirih označevalcev MMR IHC z rezultati molekularnega testiranja genov MMR na ravni primera, da bi vključila status vseh označevalcev in ustvarila rezultat dMMR/pMMR za obe metodi. Ta analiza je prikazana v Pregl. 14, in prikazuje OPA 97.4 % med obema metodama.

V študiji so primerjali tudi MMR-status IHC in MMR-status molekularnega testiranja za posamezne MMR-označevalce. OPA vsakega MMR-označevalca je bila v primerjavi s kombiniranimi rezultati testiranja plošče za sekvenciranje DNA debelega črevesa in hipermetilacije promotorja *MLH1* je bil 100.0 % za protitelo VENTANA anti-*MLH1* (M1), 99.1 % za VENTANA anti-*PMS2* (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody, 98.3 % za VENTANA anti-*MSH2* (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody in 96.6 % za VENTANA anti-*MSH6* (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody.

Klinični status BRAF V600E pri CRC, pridobljenih z IHC z uporabo protitelesa VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) je bil prav tako primerjan z rezultati statusa mutacije *BRAF*, kot jih določa sekvenciranje DNA. PPA, NPA in OPA testiranja IHC z uporabo protitelesa VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) in sekvenciranja DNA, ki je služilo kot referenca, so bili 100 % (Pregl. 15). Izvedeno je bilo dodatno testiranje, da se preveri sposobnost protitelesa VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) za nadaljnje razlojevanje primerov CRC, ki kažejo na izgubo izražanja beljakovine *MLH1*. Od 23 pozitivnih primerov BRAF V600E je 20 primerov izgubilo beljakovino *MLH1* zaradi IHC, prav tako so ti primeri bili pozitivni na hipermetilacijo promotorja *MLH1*. Ti podatki so v skladu s tesno povezanostjo pozitivnega statusa BRAF V600E s statusom hipermetilacije promotorja *MLH1*. Preostali trije primeri so bili pMMR (nedotaknjen za vse beljakovine MMR). Vsi pozitivni vzorci BRAF V600E so bili identificirani kot sporadični CRC. Rezultati so potrdili, da protitelo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) pravilno identificira CRC, ki imajo mutacijo *BRAF V600E*. Podatki so podpirali tudi uporabo protitelesa VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)

za razlikovanje med sporadičnim in verjetnim Lynchovim sindromom CRC v odsotnosti izražanja MLH1.

Pregl. 12. Združena analiza ujemanja VENTANA MMR IHC Panel med IHC in molekularnim testiranjem.

Status* (Molekularni/IHC)	Ujemanje			
	Vrsta	n/N	%	95 % CI
Normalen/ Nedotaknjen	PPA	523/526	99.4	(98.7, 100.0)
Nenormalen/ Izguba	NPA	58/62	93.5	(87.1, 98.6)
Skupaj	OPA	581/588	98.8	(98.0, 99.7)

* Pri IHC je status MMR Nedotaknjen ali Izguba za izražanje beljakovine. Za to analizo so bili BRAF V600E negativni in pozitivni primeri vključeni v kategorijo Nedotaknjen ali Izguba. Molekularno testiranje kaže na odsotnost (normalno) ali prisotnost (nenormalno) potencialnih patogenih mutacij ali hipermetilacije promotora *MLH1*. 95 % CI je bilo izračunanih z metodo ponovnega vzorčenja v percentilih.

Pregl. 13. Združena analiza za štiri označevalce MMR IHC (brez protitelesa VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) glede ujemanja med IHC in molekularnim testiranjem.

Status* (Molekularni/IHC)	Ujemanje			
	Vrsta	n/N	%	95 % CI
Normalen/ Nedotaknjen	PPA	428/431	99.3	(98.4, 100.0)
Nenormalen/ Izguba	NPA	35/39	89.7	(79.4, 97.7)
Skupaj	OPA	463/470	98.5	(97.3, 99.6)

* Pri IHC je status Nedotaknjen ali Izguba za izražanje beljakovine. Molekularno testiranje kaže na odsotnost (normalno) ali prisotnost (nenormalno) potencialnih patogenih mutacij ali hipermetilacije promotora *MLH1*. 95 % CI je bilo izračunanih z metodo ponovnega vzorčenja v percentilih.

Pregl. 14. Ujemanje med štirimi označevalci MMR IHC in rezultati molekularnih testiranj za status MMR (dMMR/pMMR).

Status MMR*	Ujemanje			
	Vrsta	n/N	%	95 % CI
pMMR	PPA	79/80	98.8	(93.3, 99.8)
dMMR	NPA	35/37	94.6	(82.3, 98.5)
Skupaj	OPA	114/117	97.4	(92.7, 99.1)

* Za IHC je status pMMR za posamezen primer predstavljen s statusom Nedotaknjen za vse beljakovine MMR, medtem ko je status dMMR predstavljen s statusom Izguba ene ali več beljakovin MMR. Za molekularno testiranje status pMMR predstavlja odsotnost patogenih mutacij ali hipermetilacije promotora *MLH1*, medtem ko status dMMR predstavlja prisotnost patogenih mutacij ali hipermetilacije promotora *MLH1*. 95 % CI je bilo izračunanih z metodo Wilson Score.

Pregl. 15. Ujemanje med IHC z uporabo protitelesa VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) in molekularnega testiranja.

BRAF V600E Status (Molekularni/IHC)	Ujemanje			
	Vrsta	n/N	%	95 % CI
Pozitiven/ nenormalen	PPA	23/23	100.0	(85.7, 100.0)
Negativen/ normalen	NPA	95/95	100.0	(96.1, 100.0)
Skupaj	OPA	118/118	100.0	(96.8, 100.0)

Status za BRAF V600E je bil definiran kot Pozitiven ali Negativen rezultat IHC in Nenormalen (prisotnost mutacije *V600E*) ali Normalen (divja vrsta *BRAF*) rezultat z molekularnim testiranjem. 95 % CI je bilo izračunanih z metodo Wilson Score.

REFERENCE

1. 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.
2. Geiersbach KB, Samowitz WS. Microsatellite instability and colorectal cancer. Arch Pathol Lab Med. 2011;135(10):1269-1277.
3. Wright CL, Stewart ID. Histopathology and mismatch repair status of 458 consecutive colorectal carcinomas. Am J Surg Pathol. 2003;27(11):1393-1406.
4. Tiwari AK, Roy HK, Lynch HT. Lynch syndrome in the 21st century: clinical perspectives. QJM. 2016;109(3):151-158.
5. Buza N, Ziai J, Hui P. Mismatch repair deficiency testing in clinical practice. Expert Rev Mol Diagn. 2016;16(5):591-604.
6. Silva FCC, Torrezaan GT, Ferreira JRO, Oliveira LP, Begnami M, et al. Germline Mutations in MLH1 Leading to Isolated Loss of PMS2 Expression in Lynch Syndrome: Implications for Diagnostics in the Clinic. Am J Surg Pathol. 2017;41(6):861-864.
7. Boyer JC, Umar A, Risinger JI, Lipford JR, Kane M, et al. Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and genetic defects in human cancer cell lines. Cancer Res. 1995;55(24):6063-6070.
8. Lawes DA, Pearson T, Sengupta S, Boulous PB. The role of MLH1, MSH2 and MSH6 in the development of multiple colorectal cancers. Br J Cancer. 2005;93(4):472-477.
9. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. N Engl J Med. 2003;348(10):919-932.
10. Peltomäki P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. J Clin Oncol. 2003;21(6):1174-1179.
11. Lynch HT, Smyrk T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). An updated review. Cancer. 1996;78(6):1149-1167.
12. Caldes T, Godino J, Sanchez A, Corbacho C, De la Hoya M, et al. Immunohistochemistry and microsatellite instability testing for selecting MLH1, MSH2 and MSH6 mutation carriers in hereditary non-polyposis colorectal cancer. Oncol Rep. 2004;12(3):621-629.
13. Shia J, Klimstra DS, Nafa K, Offit K, Guillem JG, et al. Value of immunohistochemical detection of DNA mismatch repair proteins in predicting germline mutation in hereditary colorectal neoplasms. Am J Surg Pathol. 2005;29(1):96-104.
14. 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.
15. Domingo E, Laiho P, Ollikainen M, Pinto M, Wang L, et al. BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. J Med Genet. 2004;41(9):664-668.
16. Jin M, Hampel H, Zhou X, Schunemann L, Yearsley M, et al. BRAF V600E mutation analysis simplifies the testing algorithm for Lynch syndrome. Am J Clin Pathol. 2013;140(2):177-183.

17. 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.
18. Giardiello FM, Allen JL, 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. Shia J. Evolving approach and clinical significance of detecting DNA mismatch repair deficiency in colorectal carcinoma. *Semin Diagn Pathol.* 2015;32(5):352-361.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. Carson FL, Hladik C, Cappellano CH, Pathology ASfC. Histotechnology: A Self-Instructional Text: American Society for Clinical Pathology; 2015.
31. 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.
32. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
33. 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.
34. Roche PC, Hsi ED, Firfer BL. Immunohistochemistry: Principles and Advances. Manual of Molecular and Clinical Laboratory Immunology, 7th Edition: American Society of Microbiology; 2006.
35. Rabinovitch A. The College of American Pathologists laboratory accreditation program. Accreditation and Quality Assurance. 2002;7(11):473-476.

OPOMBA: Točka (pika/ločilo) se v tem dokumentu vedno uporablja kot decimalni ločevalnik za označevanje meje med integralnimi in delnimi deli decimalne številke. Ločevalniki za tisočice se ne uporabljajo.

Povzetek varnosti in učinkovitosti je na voljo tukaj:

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

Simboli

Ventana poleg tistih, navedenih v standardu ISO 15223-1, uporablja naslednje simbole in znake (za ZDA: za opredelitev uporabljenih simbolov glejte [dialog.roche.com](https://www.dialog.roche.com)):



Globalna trgovinska številka izdelka

INTELEKTUALNA LASTNINA

VENTANA, BENCHMARK, OPTIVIEW, in logotip VENTANA so blagovne znamke družbe Roche. Vse druge blagovne znamke so last njihovih lastnikov.

Dodajanje, brisanje ali spremembe so označene z vrstico za spremembo na robu.

© 2020 Ventana Medical Systems, Inc.

PODATKI ZA STIK



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany

+800 5505 6606

www.roche.com

