

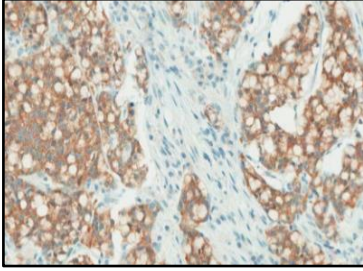
VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody

VENTANA MMR IHC Panel ile kullanım için

REF 760-5095

08033706001

IVD  50



Şekil 1. Kolon kanseri dokusunda neoplastik hücrelerin VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoruna ile boyanması.

KULLANIM AMACI

VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoruna), formalinle sabitlenmiş, parafine gömülü doku kesitlerinde BRAF V600E proteininin kalitatif şekilde saptanmasına yöneliktir. VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoruna BenchMark IHC/ISH cihazları üzerinde OptiView DAB IHC Detection Kit ve yardımcı reaktifler ile kullanıma hazırdır.

VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoruna VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody,

VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody, VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody ve VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody ürünlerini içeren VENTANA MMR IHC Panel ürününün bir parçasıdır. VENTANA MMR IHC Panel, kolorektal kanser (CRC) teşhisi konmuş hastalarda Lynch sendromu riski altında bulunan bireylerin tespitine yönelik bir test olarak yanlış eşleşme oranını proteinin eksikliğinin saptanması için ve BRAF V600E durumu ile birlikte MLH1 proteini ekspresyonunun yokluğunda sporadik ile olası Lynch sendromu CRC'si arasında ayırım yapmak için yardımcı olarak endikedir.

Bu ürünler, uzman bir patoloj tarafından histolojik inceleme, ilgili klinik bilgiler ve doğru kontrollerle birlikte yorumlanmalıdır.

İn vitro diagnostik (IVD) kullanım amaçlıdır.

ÖZET VE AÇIKLAMA

Kolorektal kanser dünyadaki en yaygın kanserler arasında üçüncü, en yaygın kanser ölümü sebepleri arasında ise dördüncü sıradadır.¹ CRC vakalarının çoğu kromozomal instabilite göstermektedir, ancak kanser vakalarının yaklaşık %15'i DNA yanlış eşleşme oranını (MMR) sisteminin kusurlu işlev göstermesiyle karakterize edilen alternatif bir yol üzerinden gelişmektedir. MMR eksikliğinin bir sonucu olarak, tümörler MMR proteinlerinin DNA replikasyon hatalarını onaramamasından kaynaklanan mikrosatellit instabilitesi (MSI) sergiler.

MMR bozuklukları barındıran CRC'ler, eksik MMR (dMMR) tümörleri olarak ifade edilir. Bunun aksine, MMR bozuklukları barındırmayan CRC'ler yeterli MMR (pMMR) tümörleri olarak ifade edilir. dMMR kolorektal kanserleri sıklıkla iyi bir şekilde ayırt edilemez ve çoğu zaman proksimal kolon predominansı, müsinoz, medüller veya taşlı yüzük histolojisi özellikleri ve artmış miktarlarda tümör infiltrat edici lenfosit gösterir.^{2,3} Genel olarak, MMR eksikliği MMR genlerinden birinde germ hattı mutasyonlarının ardından genetik veya epigenetik mekanizmalar vasıtasıyla ilgili normal alelin kaybedilmesinden, alellerde somatik mutasyonlardan veya metilasyon vasıtasıyla MLH1 geninin epigenetik inaktivasyonundan kaynaklanır.⁴

En yaygın mutasyon geçiren dört MMR geni MLH1, PMS2, MSH2 ve MSH6'dır. Normal hücrelerde MLH1 proteini, PMS2 proteini ile kompleks (heterodimer) oluştururken MSH2 proteini, MSH6 proteini ile kompleks oluşturur.^{5,6} Yanlış DNA eşleşmeleri gerçekleştiğinde MSH2/MSH6 heterodimeri yanlış eşleşmiş DNA'ya bağlanarak uyumsuz bir değişikliğe neden olur. MLH1/PMS2 heterodimeri DNA'ya bağlı MSH2/MSH6 kompleksini bağlayarak etkilenen DNA'nın ekzizyon oranınıyla sonuçlanır.

MLH1, PMS2, MSH2 ve MSH6 proteinleri, Lynch sendromu olan ailelerde mutasyona uğrayabilen genler tarafından kodlanan, klinik açıdan önemli MMR proteinleridir.^{7,8} Bu mutasyonların taşıyıcıları, çoğalan hücrelerde DNA replikasyon hatalarının birikmesi

sebebiyle ömür boyu yüksek bir kolorektal veya başka tür kansere yakalanma riski altında olur. Lynch sendromu tüm CRC'lerin %1-6'sını temsil etmektedir. Bu tümörler dört MMR geninden birinde bir germ hattı otozomal dominant mutasyonunun kalıtımından kaynaklanır ve Lynch sendromuyla ilişkili CRC'lerin çoğunluğunda MLH1 kaybı gerçekleşir.^{5,9,10} Lynch sendromu olan hastalarda, MMR protein ailesinde 300'ü aşkın farklı mutasyon tespit edilmiştir. Genel olarak Lynch sendromuyla ilişkili tümör fenotipi özellikle MLH1, PMS2, MSH2 ve MSH6 olmak üzere MMR proteinlerinde immünohistokimyasal ekspresyon kaybı ile karakterizedir.¹⁰⁻¹³ MMR IHC testlerinin, bir germ hattı değişikliği veya somatik değişiklik bulunmasının en muhtemel olduğu spesifik MMR geninin belirlenmesinde faydalı olduğu gösterilmiştir.¹⁴

BRAF geni, 7q34 kromozomu üzerinde bulunur ve mitojenle etkinleşen protein kinazı (MAPK) sinyal yolağından aşağı yönde hareket eden bir sitoplazmik serin-treonin kinazı kodlar. BRAF geninde, her biri kinaz alanında bulunan onkojenik mutasyonlar esas olarak MAPK sinyal yolağını etkinleştirerek artan hücre proliferasyonu ve apoptoz direncine yol açar. Tüm etkinleştirici BRAF mutasyonlarının en yaygın olanı (T1799A nokta mutasyonu), amino asit sekansının pozisyon 600 kısmında glutamik aside (E) valin (V) ikamesiyle sonuçlanır ve tüm CRC'lerin %12'sinde saptılır.^{15,16}

VENTANA MMR IHC Panel ürününün bir parçası olarak, VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoruna MLH1 proteini ekspresyonunun yokluğunda sporadik ve olası Lynch sendromu CRC'sinin ayırt edilmesine yardımcı olur.^{17,18} CRC'de MLH1 proteininin kaybı sıklıkla MLH1 promotörünün hipermetilasyonundan kaynaklanır ve sporadik bir oluşuma işaret eder.¹⁹ BRAF V600E proteininin varlığı MLH1 promotörünün hipermetilasyonu ile yakından bağlantılıdır. Sonuç olarak, VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoruna ile pozitif boyama, sporadik CRC'ye işaret eder.

CRC'nin sınıflandırılmasındaki rolünden ayrı olarak, BRAF V600E mutasyonu melanomların %43'ü, papiller tiroit kansinomlarının %39'u, seröz yumurtalık kansinomlarının %12'si, akciğer kanserlerinin %2'si olmak üzere tüm solid tümörlerin yaklaşık %8'inde ve diğer kanserlerde saptılır.¹⁶ Ayrıca BRAF V600E mutasyonu son dönemde tüylü hücreli lösemilerin moleküler bir belirteci olarak tanımlanmıştır.²⁰

KLİNİK ANLAMLILIK

Lynch sendromu 1960'larda tanımlanmış ve MMR işlevinin kaybı ile kanser arasında bir bağlantıyı tanımlamıştır.²¹ MMR proteinlerinin (MLH1, PMS2, MSH2 veya MSH6) kaybı MSI'ya ve yalnızca CRC ile sınırlı kalmayıp aynı zamanda mide, beyin, pankreas, deri, endometriyum ve yumurtalık kanserleri için de ömür boyu daha yüksek riske yol açabilir. Lynch sendromu olan hastalar CRC için ömür boyu %50-80 risk altındadır.^{5,22,23} Lynch sendromu diğer kalıtsal kanser sendromlarına göre benzersizdir çünkü doğrudan tümör dokusu üzerinde testler potansiyel Lynch sendromu açısından risk altında olan hastaların tespitine ve takip eden germ hattı genetik testleri için bilgi edinilmesine yardımcı olmaktadır. Lynch sendromu olan aileler gelişmiş kanser tarama protokollerinden yararlanır.

National Comprehensive Cancer Network (NCCN) yönergeleri dahil olmak üzere çeşitli yönergeler, ek genetik testlerden ve danışmanlıktan yararlanabilecek hastaların ve ailelerin tespit edilmesi için tüm CRC vakalarının Lynch sendromu açısından taranmasını tavsiye etmektedir.^{21,24-27} VENTANA MMR IHC Panel kullanımı, CRC vakalarını intakt veya MMR proteini ekspresyonu açısından kayıp olarak sınıflandırma yoluyla MMR durumunun belirlenmesine yardımcı olacaktır. Tümörde dört MMR proteininin hepsinin saptanması normal veya intakt MMR'ye işaret eder. Neredeyse her zaman olmak üzere MLH1 veya MSH2 ekspresyonunun kaybına bunun heterodimer partnerinin, yani sırasıyla PMS2 veya MSH6'nın kaybı eşlik eder. Bununla birlikte, PMS2 veya MSH6 kaybı MLH1 veya MSH2 kaybına yol açmaz. PMS2, MSH2 ve/veya MSH6 kaybı olası Lynch sendromuyla tutarlıdır ve hastalar klinik uygulama ile tutarlı ek testler ve danışmanlık için yönlendirilmelidir.

MLH1 proteini kaybı sporadik bir oluşuma veya potansiyel Lynch sendromuna işaret edebilir. Sporadik CRC'nin %15'inde veya daha fazlasında MLH1 proteininin kaybı MLH1 promotörünün hipermetilasyonundan kaynaklanır.^{5,28,29} Önemli bir ayırıcı olarak, BRAF V600E mutasyonu MLH1 promotörü hipermetilasyonundan kaynaklı MLH1 ekspresyonu kaybı bulunan tümörlerin yaklaşık üçte ikisinde gözlemlenmektedir. Buna karşın BRAF V600E mutasyonu, Lynch sendromu tümörlerinde çok nadir gözlemlenmektedir.²⁸ Dolayısıyla VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (VENTANA anti-MLH1 (M1) antikoruna) sonucunun MLH1 proteini kaybına işaret etmesi durumunda VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoruna tümörü sporadik veya olası Lynch sendromu olarak sınıflandırılabilir.^{5,30} CRC'de, pozitif BRAF V600E durumuyla birlikte MLH1 proteini kaybı, kuvvetli bir şekilde tümörün sporadik oluşum sonucu olduğuna işaret eder ve malignitenin altta yatan sebebi olarak Lynch sendromunu neredeyse eler.^{21,31} MLH1

proteini kaybına negatif BRAF V600E durumu eşlik ettiğinde, MLH1 kaybı yüksek bir Lynch sendromu olasılığıyla tutarlı olur.³²

PROSEDÜR PRENSİBİ

VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikor, amino asit 596-606 arası (GLATEKSRWSG) BRAF mutasyonlu amino asit sekansını temsil eden sentetik bir peptide karşı üretilen bir fare monoklonal antikorudur (klon VE1). Bu mutasyona özgü antikor, bir sitoplazmik boyama modeli sergiler. Bu antikor, BRAF proteinindeki V600E mutasyonunu yabancı tip BRAF proteininden ve diğer mutasyonlu BRAF proteinlerinden ayırt eder.^{33,34}

Potansiyel Lynch sendromu açısından yanlış eşleşme onarımı (MMR) IHC testleri bağlamında, MLH1 kaybı vakalarında BRAF V600E mutasyonunun saptanması sporadik kolorektal kansere (CRC) işaret eder.³²

VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikor, formalinle sabitlenmiş, parafine gömülü (FFPE) doku kesitlerinde özellikle BRAF V600E mutant proteinine bağlanır. Antikor, haptentli bir sekonder antikor takiben multimer anti-haptent-HRP konjugatı (OptiView DAB IHC Detection Kit, Kat. No. 760-700 / 06396500001) kullanılarak lokalize edilebilir. Spesifik antikor-enzim kompleksi, daha sonra bir çökelme enzim reaksiyon ürünüyle görselleştirilir. Her bir adım belirli bir süre ve sıcaklıkta inkübe edilir. Her bir inkübasyon adımının sonunda, reaksiyonun durdurulması ve takip eden adımlarda istenen reaksiyona engel olacak bağlanmamış materyalin giderilmesi amacıyla cihaz kesitleri yıkar. Bu, aköz reaktiflerin numune slaytından buharlaşmasını en aza indiren ULTRA LCS (Predilute) (Kat. No. 650-210 / 05424534001) veya LCS (Predilute) (Kat. No. 650-010 / 05264839001) ürünü için de geçerlidir.

ÜRÜNLE BİRLİKTE VERİLEN MALZEME

VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikor, 50 test için yeterli miktarda reaktif içerir.

Bir adet 5 mL'lik VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikor dağıtıcısı yaklaşık 60 µg fare monoklonal antikor içerir.

Antikor, taşıyıcı protein, Brij 35 ve bir koruyucu olan %0.05 ProClin 300 ile fosfat tamponu (pH 7.3) içinde seyreltilir.

Spesifik antikor konsantrasyonu yaklaşık 12 µg/mL'dir.

VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikor, saflaştırılmış hücre kültürü üst fazı olarak üretilen bir fare monoklonal antikorudur.

Şu konularda ayrıntılı açıklamalar için uygun VENTANA saptama kiti yöntem tablosuna bakın: Prosedür Prensibi, Materyal ve Metotlar, Numune Toplama ve Analiz için Hazırlama, Kalite Kontrol Prosedürleri, Sorun Giderme, Sonuçların Yorumlanması ve Kısıtlamalar.

GEREKİLİ OLAN FAKAT ÜRÜNLE BİRLİKTE VERİLMİYEN MALZEMELER

VENTANA saptama kiti gibi boyama reaktifleri ve negatif ve pozitif doku kontrolü slaytlarını da içeren yardımcı bileşenler, ürünle birlikte verilmemektedir.

Yöntem tablosunda listelenen ürünlerin hepsi tüm bölgelerde mevcut olmayabilir. Yerel destek temsilcinizle iletişime geçin.

Aşağıda yer alan reaktifler ve malzemeler boyama için gerekli olabilir fakat ürünle birlikte verilmez:

1. Önerilen kontrol dokusu
2. Mikroskop slaytları, pozitif yüklü
3. VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (Kat. No. 730-7159 / 09605584001 veya Kat. No. 760-5091 / 08033668001)
4. VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody (Kat. No. 730-7158 / 09607161001 veya Kat. No. 760-5094 / 08033692001)
5. VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody (Kat. No. 730-7160 / 09607137001 veya Kat. No. 760-5093 / 08033684001)
6. VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (Kat. No. 730-7161 / 09606769001 veya Kat. No. 760-5092 / 08033676001)
7. Negative Control (Monoclonal) (Kat. No. 760-2014 / 05266670001)
8. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (Kat. No. 790-4795 / 06683380001)
9. OptiView DAB IHC Detection Kit (Kat. No. 760-700 / 06396500001)
10. VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody için OptiView Amplification Kit (Kat. No. 760-099 / 06396518001 (50 test) veya Kat. No. 860-099 / 06718663001 (250 test))
11. EZ Prep Concentrate (10X) (Kat. No. 950-102 / 05279771001)
12. Reaction Buffer Concentrate (10X) (Kat. No. 950-300 / 05353955001)

13. ULTRA LCS (Predilute) (Kat. No. 650-210 / 05424534001)
14. LCS (Predilute) (Kat. No. 650-010 / 05264839001)
15. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (Kat. No. 950-224 / 05424569001)
16. Cell Conditioning Solution (CC1) (Kat. No. 950-124 / 05279801001)
17. Hematoxylin II (Kat. No. 790-2208 / 05277965001)
18. Bluing Reagent (Kat. No. 760-2037 / 05266769001)
19. Kalıcı sabitleme ortamı
20. Lamel
21. Otomatik lamel yerleştirici
22. Genel amaçlı laboratuvar ekipmanı
23. BenchMark IHC/ISH cihazı

SAKLAMA VE STABİLİTE

Alındıktan sonra ve kullanmadığınız zamanlarda 2-8 °C'de saklayın. Dondurmayın.

Reaktifin uygun bir şekilde uygulandığından ve antikor stabilitesinden emin olmak için dağıtıcı kapağını her kullanımdan sonra yerine takın ve dağıtıcıyı derhal soğutucuya dikey konumda yerleştirin.

Her antikor dağıtıcısının bir son kullanma tarihi vardır. Düzgün bir şekilde saklanması halinde, reaktif etikette belirtilen tarihe kadar stabil kalır. Reaktif son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.

NUMUNE HAZIRLAMA

Rutin olarak işlenmiş FFPE dokuları, OptiView DAB IHC Detection Kit ve BenchMark IHC/ISH cihazları ile birlikte kullanıldığında bu primer antikorla kullanım için uygundur.

Önerilen doku sabitleyici %10 nötr tamponlu formalindir.³⁵

VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoruna yönelik olarak, BRAF V600E ekspresyonu için pozitif olan A2058 (melanom) ve LS411N (CRC) insan hücre dizilerinden oluşturulan ksenograft modellerine dayalı şekilde en az 12 saat boyunca %10 nötr tamponlu formalin (NBF) içerisinde eksizyonu takip eden 2 saat içinde doku fiksasyonu tavsiye edilir. Bununla beraber %10 NBF içerisinde 72 saate kadar fiksasyon süreleri eşdeğer BRAF V600E boyama sonuçları vermiştir. Kabul edilebilir VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikor boyaması aynı zamanda 12-72 saat süreyle çinko formalin sabitleyicide fiksasyon ile elde edilmiştir.

VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikor ile alkol formalin (AFA), %95 Etanol Z-5 ve PREFER sabitleyicilerin kullanımı tavsiye edilmemektedir. Alkol formalinde sabitlenen ksenograft dokuları boyama göstermemekte veya değişken boyama göstermektedir.

Kullanılan sabitleyici miktarı, doku hacminin 15 ila 20 katı olmalıdır. Hiçbir sabitleyici, solid dokunun 2 ila 3 mm'sinden fazlasına veya gözenekli dokunun 5 mm'den fazlasına 24 saatlik bir sürede nüfuz etmeyecektir. Fiksasyon oda sıcaklığında (15-25 °C) gerçekleştirilebilir.^{35,36}

Kesitler yaklaşık 4 µm kalınlığında kesilmeli ve pozitif yüklü slaytlara yerleştirilmelidir. Kesilmiş doku kesitlerinin antijenitesi zaman geçtikçe azalacağı için, slaytlar hemen boyanmalıdır. Bununla beraber, 8 haftaya kadar süreyle 5 ± 3 °C veya 30 ± 5 °C'de saklanan boyanmamış CRC doku slaytları, aynı blokta hazırlanan ve 1. günde VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikor ile boyanan doku numunelerine kıyasla benzer VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikor boyama yoğunluğu sergilemiştir. Daha fazla bilgi için, Roche temsilcinizden "Recommended Slide Storage and Handling" belgesinin bir kopyasını isteyin.

UYARILAR VE ÖNLEMLER

1. İn vitro diagnostik (IVD) kullanıma yöneliktir.
2. Sadece profesyonel kullanım içindir.
3. **DİKKAT:** Amerika Birleşik Devletleri'nde, Federal yasa bu cihazın satışını bir doktora veya doktor siparişiyle yapılacak şekilde sınırlamaktadır. (Rx Only)
4. Belirtilen test sayısının üzerinde kullanmayın.
5. ProClin 300 çözeltisi, bu reaktifte koruyucu olarak kullanılmıştır. Tahrir edici olarak sınıflandırılmıştır ve deriyle temas ettiğinde hassasiyete yol açabilir. Kullanırken uygun önlemleri alın. Reaktiflerin göz, deri ve mukoz membranlarla temas etmesini önleyin. Koruyucu giysi ve eldiven kullanın.
6. Pozitif yüklü slaytlar, uygun olmayan boyamaya yol açan çevresel streslere yatkın olabilir. Bu tür slaytların kullanımı hakkında daha fazla bilgi almak için Roche temsilcinizle danışın.
7. İnsan veya hayvan kaynaklı materyaller, biyoteknik materyaller oldukları varsayılarak kullanılmalı ve uygun önlemler alınarak atılmalıdır. Maruz kalma durumunda, sorumlu otoritelerin sağlık direktifleri izlenmelidir.^{37,38}

- Reaktiflerin göz ve mukoz membranlarla temas etmesini önleyin. Reaktifler hassas bölgelerle temas ederse bu bölgeleri bol suyla yıkayın.
- Yanlış sonuçlar alınmasına neden olabileceği için reaktiflerin mikrobiyal kontaminasyona maruz kalmasını önleyin.
- Bu cihazın kullanımı hakkında daha fazla bilgi için BenchMark IHC/ISH cihazı Kullanıcı Kılavuzuna ve tüm gerekli bileşenlerin navifyportal.roche.com adresinde bulunan kullanım talimatlarına bakın.
- Önerilen imha yöntemleri hakkında bilgi almak için yerel ve/veya resmi kurumlara danışın.
- Ürün güvenliği etiketi, öncelikli olarak EU GHS yönergelerini izler. Güvenlik bilgi formu profesyonel kullanıcı için talep üzerine temin edilir.
- Bu cihazla ilgili şüphelenilen ciddi olayları raporlamak için yerel Roche temsilcisi ve kullanıcının bulunduğu Üye Devlet veya Ülkenin yetkili makamıyla iletişime geçin.

Bu ürün, Düzenleme (EC) No. 1272/2008 uyarınca aşağıdaki şekilde sınıflandırılan bileşenler içermektedir:

Tablo 1. Tehlike bilgileri.

Tehlike	Kod	Beyan
	H317	Alerjik deri reaksiyonuna yol açabilir.
	P261	Sis veya buharı solumaktan kaçının.
	P272	Kirlenmiş kıyafetlerin iş yeri dışına çıkarılmasına izin vermeyin.
	P280	Koruyucu eldiven takın.
	P333 + P313	Deride tahriş veya kızarıklık meydana gelirse tıbbi tavsiye/yardım alın.
	P362 + P364	Kirlenmiş giysilerinizi çıkarın ve yeniden kullanmadan önce yıkayın.
	P501	İçerdiği/kabı uygun bir atık imha tesisine atın.

Bu ürün CAS No. 55965-84-9 içerir, reaksiyon kütlesi: 5-kloro-2-metil-2H-izotiazol-3-on ve 2-metil-2H-izotiazol-3-on (3:1).

BOYAMA PROSEDÜRÜ

VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikorunu BenchMark IHC/ISH cihazları üzerinde OptiView DAB IHC Detection Kit ve yardımcı reaktifler ile kullanım için geliştirilmiştir. Önerilen boyama protokolü için bkz. Tablo 2.

Antijen alımında değişen süre ve sıcaklıkların tayin sağlamlığı üzerindeki etkisi bilinmemektedir. Dolayısıyla, boyama ile ilgili olarak listelenen protokolda antijen alımı için tavsiye edilen koşullardan sapmanın etkisi bilinmemektedir ve beklenen sonuçları geçersiz kılabilir. Uygun kontroller kullanılmalı ve belgelenmelidir. Listelenen protokolden sapan kullanıcılar, hasta sonuçlarının yorumlanmasına ilişkin sorumluluğu kabul etmelidir.

Otomatik prosedürlere ilişkin parametreler, cihazın Kullanıcı Kılavuzundaki prosedüre göre görüntülenebilir, yazdırılabilir ve düzenlenebilir. İmmünohistokimyasal boyama prosedürleriyle ilgili ayrıntılı bilgi için OptiView DAB IHC Detection Kit yöntem tablosuna bakın.

Bu cihazın uygun kullanımına ilişkin ayrıntılar için P/N 760-5095 ile ilişkili olan iç hat dağıtıcı yöntem tablosuna bakın.

Tablo 2. BenchMark IHC/ISH cihazlarında OptiView DAB IHC Detection Kit ile VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoru için önerilen boyama protokolü.

Prosedür Tipi	Yöntem		
	GX	XT	ULTRA veya ULTRA PLUS
Deparafinizasyon	Seçili	Seçili	Seçili
Hücre İyileştirme (Antijen Ortaya Çıkarma)	CC1 64 dakika	CC1 64 dakika	ULTRA CC1 64 dakika, 100 °C
Ön Primer Peroksidaz İnhibitörü	Seçili	Seçili	Seçili

Prosedür Tipi	Yöntem		
	GX	XT	ULTRA veya ULTRA PLUS
Antikor (Primer)	28 dakika, 37 °C	16 dakika, 37 °C	16 dakika, 36 °C
OptiView HQ Linker	8 dakika (varsayılan)		
OptiView HRP Multimer	8 dakika (varsayılan)		
Karşıt Boya	Hematoxylin II, 4 dakika		
Karşıt Boyama Sonrası	Bliuing, 4 dakika		

Listelenen protokolda özellikle de antijen alımı için tavsiye edilen koşullardan sapma beklenen sonuçları geçersiz kılabilir. Genel laboratuvar cihazları ve çevresel koşulların yanı sıra doku fiksasyonu ve işlemesindeki değişkenlikler nedeniyle bağımsız numunelere ve okuyucu tercihlerine bağlı olarak, primer antikor inkübasyonunun artırılması veya azaltılması gerekebilir. Fiksasyon değişkenleri hakkında daha fazla bilgi için bkz. "Immunohistochemistry: Principles and Advances." ³⁶

KALİTE KONTROL PROSEDÜRLERİ

Negatif Reaktif Kontrolü

VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoruyla boyamaya ek olarak, ikinci bir slayt bir fare monoklonal negatif reaktif olan Negative Control (Monoclonal) ile boyanmalıdır. Negatif reaktif kontrolü nonspesifik boyamanın değerlendirilmesi için kullanılır. Negatif reaktif kontrol antikoruna yönelik boyama parametreleri, primer antikor boyama parametreleriyle aynı olmalıdır.

Pozitif Doku Kontrolü

Gerçekleştirilen her boyama prosedürü için bir pozitif doku kontrolü çalıştırılmalıdır. En uygun laboratuvar uygulaması, hasta dokusuyla aynı slayt üzerinde bir pozitif kontrol kesiti dahil etmektir. Bu, slayta reaktif uygulamadaki hataları belirlemeye yardımcı olur. Pozitif boyaması zayıf doku, kalite kontrol açısından en uygun olandır. Pozitif boyama doku bileşenleri antikorun uygulandığını ve cihazın uygun şekilde işlev gösterdiğini teyit etmek için kullanılır. Kontrol dokusu, hem pozitif hem de negatif boyama elementleri içerebilir ve hem pozitif hem de negatif kontrol dokusu görevi görebilir. Kontrol dokuları, test kesitleriyle aynı şekilde mümkün olan en kısa sürede hazırlanmış veya sabitlenmiş taze otopsi, biyopsi numunesi veya cerrahi numune olmalıdır. Bu gibi dokular, doku hazırlığından boyamaya kadar prosedürün tüm adımlarını izleyebilir. Test numunesinden farklı şekilde sabitlenmiş veya işlenmiş bir doku kesitinin kullanılması, tüm reaktifler ve fiksasyon ile doku işleme hariç yöntem adımları için kontrol sağlar.

Bilinen pozitif doku kontrolleri, hasta örneklerinin spesifik teşhisinin belirlenmesinde bir yardımcı olarak değil, yalnızca işlenen dokuların ve test reaktiflerinin doğru performansını izlemek için kullanılmalıdır. Pozitif doku kontrolleri pozitif boyama ortaya koymazsa test numuneleri sonuçları geçersiz sayılmalıdır.

Uygun bir pozitif doku kontrolü, VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoru için pozitif olan, ön yeterliliğe sahip bir CRC vakası olur. Pozitif doku kontrolü, arka planın üzerindeki canlı tümör hücrelerinde herhangi bir yoğunlukta sitoplazmik boyama sergilemelidir.

Negatif Doku Kontrolü

Bir negatif doku kontrolü, VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoru için negatif olan, ön yeterliliğe sahip bir CRC vakası olur. Negatif doku kontrolü, hasta örneklerinin spesifik teşhisinin formülasyonunda bir yardımcı olarak değil, yalnızca işlenen dokuların, test reaktiflerinin ve cihazların performansını izlemek için kullanılmalıdır.

Tayin Doğrulaması

Diagnostik bir prosedürde bir antikor veya boyama sisteminin ilk kullanımından önce, antikorun spesifikitesi BRAF V600E mutasyonu için pozitif ve negatif dokuları temsil eden, bilinen IHC performansı özelliklerine sahip bir dizi doku üzerinde testler yoluyla doğrulanmalıdır. Ürün prospektüsünün bu bölümünde önceden ana hatlarıyla açıklanan Kalite Kontrol Prosedürlerine ve College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist³⁹ veya CLSI Approved Guideline.⁴⁰ Kalite Kontrol belgelerine bakın.

BOYAMA YORUMLARI / BEKLENEN SONUÇLAR

VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoru için selüler boyama modeli tümör hücrelerinde sitoplazmiktir. VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoru ile boyanan CRC numunelerine, eğitimli bir patolog tarafından tümörde spesifik sitoplazmik boyama

varlığının veya yokluğunun değerlendirilmesine dayalı olarak bir Klinik Durum atanır. Pozitif bir Klinik Durum, arka planın üzerindeki canlı tümör hücrelerinde açık bir şekilde herhangi bir yoğunlukta sitoplazmik boyama barındıran vakalara atanır. Negatif bir Klinik Durum, canlı tümör hücrelerinde boyama barındırmayan veya açık olmayan bir şekilde sitoplazmik boyama barındıran vakalara atanır. Nükleer boyama, izole canlı tümör hücrelerinde zayıf ile güçlü arası boyama ve/veya küçük tümör grupları negatif kabul edilmelidir.

ÖZEL KISITLAMALAR

Boyama ile ilgili olarak listelenmiş protokolden sapma bilinmemektedir ve beklenen sonuçları geçersiz kılabilir. Asidik tamponlar yorumlanması zor olan, optimum altı boyama ile sonuçlanabileceği için kullanıcıların antijen alımında bu tamponları kullanmaması tavsiye edilir.⁴¹ Listelenen protokolden sapan kullanıcılar, hasta sonuçlarının yorumlanmasına ilişkin sorumluluğu kabul etmelidir.

VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoru ile boyanan vakalar tüm tümör alanında boyama varlığına veya yokluğuna göre Pozitif veya Negatif olarak kategorilendirilir. Boyama yoğunluğunun seviyesi değişebilir ve söz konusu yoğunluk tümör genelinde farklılık gösterebilir ancak bu, BRAF V600E Klinik Durumunu etkilememektedir.

Bazı vakalar aşağıdaki hususlar sebebiyle özellikle güç olabilir:

- VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikorumun düz kasta, serebellumun Purkinje hücrelerinde, normal kolon epitelyal hücrelerinde, enterositlerde, testis interstisyel hücrelerinde, adrenal bezde, hipofiz bezinde, pankreasın asinar yapılarında, bağırsak glandüler hücrelerinde ve bazı tümör hücrelerinde zaman zaman zayıf sitoplazmik ve nükleer boyama sergilediği tespit edilmiştir, ancak bu tür vakalar BRAF V600E için pozitif kabul edilmemelidir.⁴² Ek olarak bu antikör, hipofiz bezindeki nöroendokrin hücrelerinde orta seviye boyama göstermiştir. Ayrıca söz konusu antikör, akciğerde siliyayı da boyamaktadır.
- Non-spesifik arka plan: Bazı numuneler tam olarak anlaşılabilen nedenlerle non-spesifik arka plan boyaması sergileyebilir. Dolayısıyla VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoru ile boyalı bir slaytın değerlendirilmesine, non-spesifik arka plan boyamasının seviyesini belirleme amacıyla ilgili slaytın negatif reaktif kontrolü ile - boyalı slayt ile karşılaştırılması da dahil edilmelidir. Bazen tümör hücrelerinde nükleer boyama gözlemlenmektedir, ancak bunun anlamlılığı anlaşılmamıştır.
- Doku veya Boyama Artefaktı: Örnek işlemlerinden ve mikrotomi işlemlerinden kaynaklanan histolojik artefaktlar da VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoru Klinik Durumunun belirlenmesini karmaşılaştırabilir. Bu artefaktlar; fiksasyon gradyanları ve kenar etkileri, DAB hapsolmesi, nükleer kabarcıklanma, dokunun bazı bölgelerinde boyama olmayışı, dokunun yırtılması veya katlanması ve doku kesitinin kaybını içerir ancak bunlarla sınırlı değildir. Bazı durumlarda, yeni kesitlerin tekrar boyanması veya yeni bir numune edinilmesi gerekebilir.

Tüm tاینرler her cihaz üzerinde kayıtlı olmayabilir. Daha fazla bilgi için lütfen yerel Roche temsilcinizle iletişime geçin.

PERFORMANS ÖZELLİKLERİ

ANALİTİK PERFORMANS

Hassasiyet, spesifite ve kesinlikle ilgili boyama testleri yürütülmüştür ve sonuçları aşağıda listelenmiştir.

Hassasiyet ve Spesifite

Özel Kısıtlamalar bölümünde belirtilenler hariç olmak üzere, VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoru ile normal ve neoplastik dokular üzerinde beklenmedik boyama gözlemlenmemiştir.

Tablo 3. VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikorumun Hassasiyeti/Spesifitesi, FFPE normal dokuların test edilmesiyle belirlenmiştir.

Doku	Pozitif/toplam vaka sayısı	Doku	Pozitif/toplam vaka sayısı
Serebrum	0/3	Özofagus	0/3
Serebellum *	1/3	Mide	0/3
Adrenal bez	0/3	İnce bağırsak *	2/4
Yumurtalık	0/3	Kolon *	5/12
Pankreas *	2/3	Karaciğer	0/3

Doku	Pozitif/toplam vaka sayısı	Doku	Pozitif/toplam vaka sayısı
Lenf düğümü	0/3	Dil/tükürük bezi	0/3
Hipofiz bezi **	3/3	Böbrek	0/3
Testis *	2/3	Prostat	0/3
Tiroit	0/3	Mesane	0/3
Meme	0/3	Paratiroid bezi	0/3
Dalak	0/3	Endometriyum	0/3
Bademcik	0/3	Rahim boynu	0/3
Timüs	0/3	İskelet kası	0/3
Kemik iliği	0/3	Deri	0/3
Akciğer	0/3	Sinir	0/5
Kalp	0/3	Mezotelyum	0/3

* Serebellumun Purkinje hücrelerinde, düz kasta ve normal kolon epitelyal hücrelerinde, bağırsak glandüler hücrelerinde, pankreasın asinar yapılarında ve testis interstisyel hücrelerinde zayıf sitoplazmik ve nükleer boyama.

** Hipofiz bezindeki nöroendokrin hücrelerinde orta seviye boyama gözlemlenmiştir.

Tüm dokular için, pozitif/negatif boyama dokuya özgü unsurlara yönelik olarak belirlenmiştir ve bu tür vakalar BRAF V600E Klinik Durumu için pozitif kabul edilmemelidir.¹⁶

Tablo 4. VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikorumun Hassasiyeti/Spesifitesi, çeşitli FFPE neoplastik dokuların test edilmesiyle belirlenmiştir.

Patoloji	Pozitif/toplam vaka sayısı
Gliyoblastom (Serebrum)	0/1
Menenjiyom (Serebrum)	0/1
Ependimom (Serebrum)	0/1
Oligodendrogliom (Serebrum)	0/1
Seröz adenokarsinom (Yumurtalık)	0/1
Adenokarsinom (Yumurtalık)	0/1
Nöroendokrin neoplazma (Pankreas)	0/1
Seminom (Testis)	0/2
Medüller karsinom (Tiroit)	0/1
Papiller karsinom (Tiroit)	21/28
İn situ duktal karsinom (Meme)	0/1
Mikroinvaziv duktal karsinom (Meme)	0/1
İnvaziv duktal karsinom (Meme)	3/131
B hücreli lenfoma; NOS (Dalak)	0/1
Küçük hücreli karsinom (Akciğer)	0/7
Skumöz hücreli karsinom (Akciğer)	0/90
Adenokarsinom (Akciğer)	1/73
Nöroendokrin karsinom (Özofagus)	0/1

Patoloji	Pozitif/toplam vaka sayısı
Adenokarsinom (Özofagus)	0/1
Taşlı yüzük hücreli karsinom (Mide)	0/1
Adenokarsinom (İnce bağırsak)	0/1
Stromal sarkom (İnce bağırsak)	1/1
Adenokarsinom (Kolon)	64/234
Gastrointestinal stromal tümör (GIST) (Kolon)	0/1
Adenokarsinom (Rektum)	0/1
GIST (Rektum)	0/1
Melanom (Rektum)	0/1
Hepatoselüler karsinom (Karaciğer)	0/1
Hepatoblastom (Karaciğer)	0/1
Berrak hücreli karsinom (Böbrek)	0/1
Adenokarsinom (Prostat)	0/2
Adenokarsinom (Rahim)	0/1
Berrak hücreli karsinom (Rahim)	0/1
Skumöz hücreli karsinom (Rahim boynu)	0/2
Embriyal rabdomiyosarkom (Çizgili kas)	0/1
Melanom	10/24
Bazal hücreli karsinom (Deri)	0/1
Skumöz hücreli karsinom (Deri)	0/1
Nöroblastom (Retropériton)	0/1
Mezotelyom (Periton)	0/1
İğ hücreli rabdomiyosarkom (Periton)	0/1
B hücreli lenfoma; NOS (Lenf düğümü)	0/2
Hodgkin lenfoma (Lenf düğümü)	1/1
Ürotelyal karsinom (Mesane)	0/1
Leyomyosarkom (Mesane)	0/1
Osteosarkom (Kemik)	0/1
Leyomyosarkom (Düz kas)	0/1

Kesinlik

BenchMark ULTRA Cihazı Üzerinde Performans Özellikleri

İşlem İçi Tekrarlanabilirlik ve Günler Arası Ara Kesinlik

VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikorunun tekrar edilebilirliği ve kesinliği BenchMark ULTRA cihazı üzerinde OptiView DAB IHC Detection Kit ile değerlendirilmiştir.

İşlem İçi Tekrarlanabilirlik, 10 CRC numunesi (BRAF V600E Klinik Durumu için 5 Pozitif ve 5 Negatif) kullanılarak değerlendirilmiştir. CRC numunelerinin her birinden beş kopya slayt, VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoru ile tek bir BenchMark ULTRA cihazı üzerinde, tek bir gün içinde boyanmıştır. Her bir VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoru boyalı slayt, aynı vakadan bir negatif reaktif kontrolü boyalı slayt ile eşleştirilmiştir. Tüm slayt setleri randomize hale getirilmiş ve ardından vaka teşhisine körlenmiş tek bir patoloj tarafından Pozitif veya Negatif olarak değerlendirilmiştir.

Günler Arası Ara Kesinlik de 10 CRC numunesi (BRAF V600E Klinik Durumu için 5 Pozitif ve 5 Negatif) kullanılarak değerlendirilmiştir. CRC numunelerinin her birinden kopya slaytlar, VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoru ile bir BenchMark ULTRA cihazı üzerinde, 5 ardıl olmayan günün her birinde boyanmıştır. Ek olarak her vakadan tek bir slayt negatif reaktif kontrolü ile boyanmıştır. Her bir VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoru boyalı slayt, aynı vakadan bir negatif reaktif kontrolü boyalı slayt ile eşleştirilmiştir. Tüm slayt setleri randomize hale getirilmiş ve ardından vaka teşhisine körlenmiş tek bir patoloj tarafından Pozitif veya Negatif olarak değerlendirilmiştir.

Negatif reaktif kontrolü ile boyanan slaytların hiçbirisi spesifik boyama göstermemiş ve arka plan boyaması ≤ 0.5 olmuştur. Mümkün olan tüm eşleşmelere ait havuzlanmış verilerin kullanımıyla, hem İşlem İçi Tekrarlanabilirlik, hem de Günler Arası Ara Kesinlik çalışmaları %100 pozitif uyum yüzdesi (PPA), %100 negatif uyum yüzdesi (NPA) ve %100 genel uyum yüzdesi (OPA) sergilemiştir. Sonuçların özeti Tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 5. BenchMark ULTRA cihazı VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoronun Klinik Duruma (Pozitif/Negatif) göre ölçülen İşlem İçi Tekrarlanabilirliği ve Günler Arası Ara Kesinliği.

Tekrar Edilebilirlik/ Kesinlik	Klinik Durum	Uyum			
		Tipi	n/N	%	%95 CI
İşlem İçi Tekrarlanabilirlik	Pozitif	PPA	25/25	100.0	(86.7, 100.0)
	Negatif	NPA	25/25	100.0	(86.7, 100.0)
	Toplam	OPA	50/50	100.0	(92.9, 100.0)
Günler Arası Ara Kesinlik	Pozitif	PPA	50/50	100.0	(92.9, 100.0)
	Negatif	NPA	50/50	100.0	(92.9, 100.0)
	Toplam	OPA	100/100	100.0	(96.3, 100.0)

Not: %95 CI değerleri Wilson Puan yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır.

Cihazlar Arası Ara Kesinlik

VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoronun BenchMark ULTRA Cihazı Cihazlar Arası Ara Kesinliği, 10 CRC numunesinin (BRAF V600E Klinik Durumu için 5 Pozitif ve 5 Negatif) kopya slaytlarının 3 BenchMark ULTRA cihazı üzerinde VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoru ile, OptiView DAB IHC Detection Kit kullanılarak boyanması üzerinden belirlenmiştir. Ek olarak her vakadan tek bir slayt bir negatif reaktif kontrolü ile boyanmıştır.

Her bir VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoru boyalı slayt, aynı vakadan bir negatif reaktif kontrolü boyalı slayt ile eşleştirilmiştir. Tüm slayt setleri randomize hale getirilmiş ve ardından vaka teşhisine körlenmiş tek bir patoloj tarafından Klinik Duruma (Pozitif/Negatif) yönelik olarak değerlendirilmiştir. Negatif reaktif kontrolü ile boyanan slaytların hiçbirisi spesifik boyama göstermemiş ve arka plan boyaması ≤ 0.5 olmuştur.

BenchMark ULTRA Cihazı Cihazlar Arası Ara Kesinliğine yönelik olarak, cihazlar arasında her bir numune için slaytların Klinik Durumunun ikili karşılaştırmaları yapılmış ve %100 PPA, NPA ve OPA sergilemiştir. Sonuçların özeti Tablo 6 içinde görülebilir.

Tablo 6. VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoronun Klinik Duruma (Pozitif/Negatif) göre ölçülen BenchMark ULTRA Cihazı Cihazlar Arası Ara Kesinliği.

Kesinlik	Klinik Durum	Uyum			
		Tipi	n/N	%	%95 CI
Cihazlar Arası Ara Kesinlik	Pozitif	PPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	Negatif	NPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	Toplam	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)

Not: %95 CI değerleri Wilson Puan yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır.

Ek olarak, VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoronun Cihazlar Arası Ara Kesinliği, 6 numunenin (BRAF V600E Klinik Durumu için 2 CRC negatif ve 2 CRC ve 2 Tiroit kanseri pozitif) kopya slaytlarının 3 BenchMark XT ve 3 BenchMark GX cihazı üzerinde OptiView DAB IHC Detection Kit kullanılarak VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoru ile boyanması üzerinden belirlenmiştir.

3 cihaz bir arada havuzlandığında vaka başına 15 gözlem olmuştur; her bir vaka için medyan değer bu 15 gözlemden belirlenmiştir. Aynı vakanın ayrı gözlemleri, 0.5 sinyal yoğunluğu dahilinde olmaları durumunda ortalama vaka sinyal yoğunluğu ile uyumlu kabul edilmiştir. BenchMark XT ve BenchMark GX cihazı Cihazlar Arası Ara Kesinliğine yönelik olarak, her bir numune için slaytların boyama yoğunluğu puanlarının ikili karşılaştırmaları yapılmış ve 3 BenchMark XT cihazı arasında %98.9 OPA, 3 BenchMark GX cihazı arasında ise %100 OPA sergilemiştir. Bir negatif reaktif kontrolü ile boyanan slaytların hiçbirisi spesifik boyama göstermemiş ve arka plan boyaması hem BenchMark XT hem de BenchMark GX cihazları üzerinde ≤ 0.5 olmuştur.

BenchMark IHC/ISH Cihazı Uyumu

BenchMark IHC/ISH cihazlarında VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoru için uyum, CRC numunelerinin, tiroit kanseri ve melanom numunelerinin VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoru ile, OptiView DAB IHC Detection Kit kullanılarak boyanması üzerinden belirlenmiştir. Tüm slaytlar Klinik Durum (Pozitif/Negatif) için tek bir patoloğ tarafından değerlendirilmiştir.

BenchMark GX ile BenchMark ULTRA cihazları ve BenchMark XT ile BenchMark ULTRA cihazları arasında toplam 228 numune (177 CRC, 27 tiroit kanseri ve 24 melanom) için Klinik Durumun ikili karşılaştırmaları yapılmıştır. BenchMark GX ile BenchMark ULTRA cihazları %98.0 ortalama pozitif uyum (APA), %99.0 ortalama negatif uyum (ANA) ve %98.7 OPA sergilemiştir. BenchMark XT ile BenchMark ULTRA cihazları %96.6 APA, %98.4 ANA ve %97.8 OPA sergilemiştir. BenchMark GX ile BenchMark XT cihazları için, platformlar arasında toplam 230 numunenin (179 CRC, 27 tiroit kanseri ve 24 melanom) ikili karşılaştırmaları yapılmıştır. BenchMark GX ile BenchMark XT cihazları %98.7 APA, %99.4 ANA ve %99.1 OPA sergilemiştir.

Okuyucu Kesinliği Çalışmaları

Okuyucu İçi ve Okuyucular Arası kesinlik, bir BenchMark ULTRA cihazı üzerinde OptiView DAB IHC Detection Kit kullanılarak VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoru ile boyanmış 20 CRC numunesi (BRAF V600E mutasyonu için pozitif olan 10 vaka ve BRAF V600E mutasyonu için negatif olan 10 vaka) üstünde değerlendirilmiştir. Her bir VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoru boyalı slayt, bir H&E ve aynı vakadan bir negatif reaktif kontrolü boyalı slayt ile eşleştirilmiştir.

Tüm slayt setleri randomize hale getirilmiş ve 3 patoloğ tarafından Pozitif veya Negatif BRAF V600E Klinik Durumu için değerlendirilmiştir. Patoloğlar vaka teşhisine körlenmiştir. İki haftalık bir arınma süresinin ardından, VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoru boyalı slaytlar 3 patoloğun her biri tarafından BRAF V600E Klinik Durumunun ikinci bir değerlendirmesi için tekrar randomize edilmiştir. Negatif reaktif kontrolü ile boyanan slaytların hiçbirisi spesifik boyama göstermemiş ve arka plan boyaması ≤ 0.5 olmuştur.

Okuyucu İçi kesinlik, tek bir patoloğdan ilk ve son slayt değerlendirmelerini karşılaştırarak patoloğ başına 20 CRC slayt karşılaştırması sunmuştur. 3 patoloğdan karşılaştırmalar havuzlanmış ve Okuyucu İçi kesinlik için %100 APA, %100 ANA ve %100 OPA sergilemiştir. Sonuçların özeti Tablo 7 içinde görülebilir.

Okuyucular Arası kesinlik, tüm slayt değerlendirmelerini (20 CRC x 2 değerlendirme/vaka x 3 patoloğ = 120 slayt değerlendirme) her bir CRC vakası için bir modal vaka durumuyla karşılaştırmıştır. Sonuçlar, Okuyucular Arası kesinlik için %100 PPA, NPA ve OPA sergilemektedir. Sonuçların özeti Tablo 7 içinde görülebilir.

Tablo 7. VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikorusunun CRC Vakalarında BRAF V600E Klinik Durumuna (Pozitif/Negatif) göre ölçülen Okuyucu İçi ve Okuyucular Arası Kesinliği.

Kesinlik	Klinik Durum	Uyum			
		Tipi	n/N	%	%95 CI
Okuyucu İçi	Pozitif	APA	60/60	100.0	(93.9, 100.0)
	Negatif	ANA	60/60	100.0	(93.9, 100.0)
	Toplam	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)
Okuyucular Arası	Pozitif	PPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)
	Negatif	NPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)
	Toplam	OPA	120/120	100.0	(96.9, 100.0)

Not: Okuyucu İçi için, APA ve ANA %95 CI değerleri Clopper-Pearson esaslı yöntem kullanılarak, OPA %95 CI değeri ise yüzdelik bootstrap yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Okuyucular Arası için, %95 CI değerleri Wilson Puan yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır.

Lotlar Arası Kesinlik

VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikorusunun Lotlar Arası Kesinliği, VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikorusunun 3 üretim lotunun 10 CRC vakasının (BRAF V600E mutasyonu için 5 Pozitif ve 5 Negatif) üçlü slaytları üzerinde, bir BenchMark ULTRA cihazında OptiView DAB IHC Detection Kit kullanılarak test edilmesi üzerinden belirlenmiştir.

Her bir VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoru boyalı slayt, aynı vakadan bir negatif reaktif kontrolü boyalı slayt ile eşleştirilmiştir. Tüm slayt setleri randomize hale getirilmiş ve vaka teşhisi ile VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikor lot numarasına körlenmiş tek bir patoloğ tarafından değerlendirilmiştir. Negatif reaktif kontrolü ile boyanan slaytların hiçbirisi spesifik boyama göstermemiş ve arka plan boyaması ≤ 0.5 olmuştur.

VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoru Lotlar Arası Kesinliği için, her bir slayt değerlendirilmesinde elde edilen BRAF V600E Klinik Durumu söz konusu vakaya yönelik bir modal vaka durumuyla karşılaştırılmıştır. VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikor lotları için OPA, PPA ve NPA %100 olarak VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoru boyamasının antikor lotları arasında tekrarlanabilir olduğunu göstermiştir.

VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoru Lotlar Arası Kesinliği için sonuçların bir özeti Tablo 8 içerisinde gösterilmektedir.

Tablo 8. VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikorusunun Klinik Duruma (Pozitif/Negatif) göre ölçülen Lotlar Arası Kesinliği.

Kesinlik	Klinik Durum	Uyum			
		Tipi	n/N	%	%95 CI
Lotlar Arası	Pozitif	PPA	45/45	100.0	(92.1, 100.0)
	Negatif	NPA	45/45	100.0	(92.1, 100.0)
	Toplam	OPA	90/90	100.0	(95.9, 100.0)

Not: %95 CI değerleri Wilson Puan yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır.

Laboratuvarlar Arası Tekrarlanabilirlik Çalışması

Klinik Durumu belirlemek üzere her bir VENTANA MMR IHC Panel tayininin tekrarlanabilirliğini göstermek için VENTANA MMR IHC Panel ürününe yönelik bir Laboratuvarlar Arası Tekrarlanabilirlik Çalışması tamamlanmıştır. Çalışma, her bir MMR proteini için 6 CRC doku numunesini (3 İntakt ve 3 Kayıp) ve BRAF V600E için 16 CRC doku numunesini (8 Pozitif ve 8 Negatif) kapsamış, bunlar üç harici laboratuvarında 21 günlük bir süreçte 5 aralı olmayan günün her birinde 3 BenchMark ULTRA cihazında çalıştırılmıştır. Her bir antikor boyalı slayt, bir H&E ve aynı vakadan negatif reaktif kontrolü boyalı slayt ile eşleştirilmiştir. Tüm slayt setleri randomize hale getirilmiş ve çalışma setinin MMR Klinik Durumuna körlenmiş olan toplam 6 okuyucu (2 okuyucu/tesis) tarafından değerlendirilmiştir. Çalışmadaki 40 vakanın her biri tüm günlerde, tesislerde ve okuyuculara 30 gözleme sahip olmuştur. Modal vaka referans durumu, her bir vaka için 30 gözlemin en sık gözlemlenen durumuna dayalı olarak türetilmiştir. Çalışmaya beş proteinin tamamı için toplam 1200 gözlem dahil olmuştur. Tüm değerlendirilebilir vakalara yönelik olarak, bu çalışmada morfoloji ve arka plan için kabul edilebilirlik oranı %100 olmuştur. Modal vaka referans durumu ile ayrı gözlemler arasındaki havuzlanmış (beş proteinin tamamı) uyum istatistiklerinin bir özeti Tablo 9 içerisinde mevcuttur.

Tablo 9. VENTANA MMR IHC Panel ile Modal Vaka Referans Durumu Arasındaki Uyum.

Laboratuvarlar Arası Tekrarlanabilirlik	Klinik Durum	Uyum			
		Tipi	n/N	%	%95 CI
Tüm Proteinler	İntakt/Pozitif	PPA	598/600	99.8	(98.7, 100.0)
	Kayıp/Negatif	NPA	593/600	98.9	(97.4, 99.5)
	Toplam	OPA	1191/1200	99.4	(98.6, 99.7)

Not: Klinik Durum, MMR proteinine yönelik olarak protein ekspresyonu için İntakt veya Kayıp, BRAF V600E proteinine yönelik olarak ise Pozitif veya Negatif olarak tanımlanır. %95 CI değerleri bir genelleştirilmiş lineer karışık model (GLMM) yaklaşımı kullanılarak hesaplanmıştır.

Ek olarak, VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoru için Tesisler Arası, Günler Arası ve Okuyucular Arası ikili karşılaştırmalar yapılmıştır. BRAF V600E için bu çalışma setine

toplam 480 gözlem dahil olmuştur. Sonuçların özeti Tablo 10 içinde görülebilir. Veriler 5 gün, 3 tesis ve 6 okuyucu arasında tayin tekrarlanabilirliğini göstermektedir.

Tablo 10. VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoruna için Klinik Duruma (Pozitif/Negatif) göre ölçülen Laboratuvarlar Arası Tekrarlanabilirlik İkili Uyum Oranları.

Laboratuvarlar Arası Tekrarlanabilirlik		Uyum			
		Tipi	n/N	%	%95 CI
Tesisler Arası (3 tesis)		APA	960/972	98.8	(97.2, 100.0)
		ANA	936/948	98.7	(97.0, 100.0)
		OPA	948/960	98.8	(97.1, 100.0)
Günler Arası (5 ardıl olmayan gün)	Tesis A	APA	320/320	100.0	(98.8, 100.0)
		ANA	320/320	100.0	(98.8, 100.0)
		OPA	320/320	100.0	(98.8, 100.0)
	Tesis B	APA	320/320	100.0	(98.8, 100.0)
		ANA	320/320	100.0	(98.8, 100.0)
		OPA	320/320	100.0	(98.8, 100.0)
	Tesis C	APA	320/332	96.4	(92.0, 100.0)
		ANA	296/308	96.1	(90.4, 100.0)
		OPA	308/320	96.3	(91.3, 100.0)
	Okuyucular Arası (tesis başına 2 patoloj)	APA	242/243	99.6	(98.8, 100.0)
		ANA	236/237	99.6	(98.7, 100.0)
		OPA	239/240	99.6	(98.8, 100.0)

Not: %95 CI değerleri yüzdelik bootstrap yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır; nokta tahmininin %100 olduğu durumlarda Wilson Puan yöntemi kullanılmıştır.

BenchMark ULTRA PLUS Cihazı Üzerinde Performans Özellikleri Gün İçi Tekrar Edilebilirlik ve Günler Arası Kesinlik

Gün İçi (İşlem İçi) Tekrar Edilebilirlik, 10 CRC numunesi (BRAF V600E Klinik Durumu için 5 Pozitif ve 5 Negatif) kullanılarak değerlendirilmiştir. CRC numunelerinin her birinden beş kopya slayt, VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoru ile tek bir BenchMark ULTRA PLUS cihazı üzerinde, tek bir gün içinde boyanmıştır. Her bir VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoru boyalı slayt, aynı vakadan bir negatif reaktif kontrolü boyalı slayt ile eşleştirilmiştir. Tüm slayt çiftleri randomize hale getirilmiş ve ardından vaka teşhisine körlenmiş tek bir patoloj tarafından Pozitif veya Negatif olarak değerlendirilmiştir.

Günler Arası (Günler Arası) Ara Kesinlik de 10 CRC numunesi (BRAF V600E Klinik Durumu için 5 Pozitif ve 5 Negatif) kullanılarak değerlendirilmiştir. CRC numunelerinin her birinden kopya slaytlar, VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoru ile bir BenchMark ULTRA PLUS cihazı üzerinde, 5 ardıl olmayan günün her birinde boyanmıştır. Ek olarak her vakadan tek bir slayt negatif reaktif kontrolü ile boyanmıştır. Her bir VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoru boyalı slayt, aynı vakadan bir negatif reaktif kontrolü boyalı slayt ile eşleştirilmiştir. Tüm slayt çiftleri randomize hale getirilmiş ve ardından vaka teşhisine körlenmiş tek bir patoloj tarafından Pozitif veya Negatif olarak değerlendirilmiştir.

Negatif reaktif kontrolü ile boyanan slaytların hiçbirisi spesifik boyama göstermemiş ve arka plan boyaması ≤ 0.5 olmuştur. Mümkün olan tüm eşleşmelere ait havuzlanmış verilerin kullanımıyla, hem Gün İçi Tekrar Edilebilirlik hem de Günler Arası Kesinlik çalışmaları %100 pozitif uyum yüzdesi (PPA), %100 negatif uyum yüzdesi (NPA) ve %100 genel uyum yüzdesi (OPA) sergilemiştir. Verilerin özeti Tablo 11 içerisinde gösterilmektedir.

Tablo 11. BenchMark ULTRA PLUS Cihazı VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoronun Klinik Duruma (Pozitif/Negatif) göre Ölçülen Gün İçi Tekrar Edilebilirliği ve Günler Arası Kesinliği

Tekrar Edilebilirlik/ Kesinlik	Klinik Durum	Uyum			
		Tipi	n/N	%	%95 CI
Gün İçi Tekrar Edilebilirlik	Pozitif	PPA	25/25	100.0	(86.7,100.0)
	Negatif	NPA	25/25	100.0	(86.7,100.0)
	Toplam	OPA	50/50	100.0	(92.9,100.0)
Günler Arası Kesinlik	Pozitif	PPA	50/50	100.0	(92.9,100.0)
	Negatif	NPA	48/48	100.0	(92.6,100.0)
	Toplam	OPA	98/98	100.0	(96.2,100.0)

Not: %95 CI değerleri Puan (Wilson) yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır.

BenchMark ULTRA PLUS Cihazlar Arası Kesinlik

VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoronun BenchMark ULTRA PLUS Cihazlar Arası Ara Kesinliği, 10 CRC numunesinin (BRAF V600E Klinik Durumu için 5 Pozitif ve 5 Negatif) kopya slaytlarının 3 BenchMark ULTRA PLUS cihazı üzerinde VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoru ile, OptiView DAB IHC Detection Kit kullanılarak boyanması üzerinden belirlenmiştir. Ek olarak her vakadan tek bir slayt bir negatif reaktif kontrolü ile boyanmıştır.

Her bir VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoru boyalı slayt, aynı vakadan bir negatif reaktif kontrolü boyalı slayt ile eşleştirilmiştir. Tüm slayt çiftleri randomize hale getirilmiş ve ardından vaka teşhisine körlenmiş tek bir patoloj tarafından Klinik Duruma (Pozitif/Negatif) yönelik olarak değerlendirilmiştir. Negatif reaktif kontrolü ile boyanan slaytların hiçbirisi spesifik boyama göstermemiş ve arka plan boyaması ≤ 0.5 olmuştur.

BenchMark ULTRA PLUS Cihazlar Arası Kesinliğine yönelik olarak, cihazlar arasında her bir numune için slaytların Klinik Durumunun ikili karşılaştırmaları yapılmış ve %100 PPA, NPA ve OPA sergilemiştir. Sonuçların özeti Tablo 12'de verilmiştir.

Tablo 12. VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoronun Klinik Duruma (Pozitif/Negatif) göre Ölçülen BenchMark ULTRA PLUS Cihazlar Arası Kesinliği

Kesinlik	Klinik Durum	Uyum			
		Tipi	n/N	%	%95 CI
Cihazlar Arası	Pozitif	PPA	30/30	100.0	(88.6,100.0)
	Negatif	NPA	30/30	100.0	(88.6,100.0)
	Toplam	OPA	60/60	100.0	(94.0,100.0)

Not: %95 CI değerleri Puan (Wilson) yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır.

BenchMark ULTRA PLUS ve BenchMark ULTRA için Platformlar Arası Uyum

VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoru boyama performansını BenchMark ULTRA PLUS cihazında ve BenchMark ULTRA cihazında OptiView DAB IHC Detection Kit kullanılarak karşılaştırmak için bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Yüz yirmi (120) kolorektal karsinom vakası (BRAF V600E için 14 pozitif, BRAF V600E için 13 negatif, durumu bilinmeyen 93 MMR) boyanmıştır ve boyanan slaytlar teşhis durumunu belirleyen bir patoloj tarafından değerlendirilmiştir. Genel uyum yüzdesi %98.3 olmuştur. VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoruyla boyanan tüm dokular, kabul edilebilir oranda morfolojiye ve arka plan boyamasına sahiptir. Verilerin özeti Tablo 13 içerisinde gösterilmektedir.

Tablo 13. VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikorunun Klinik Duruma (Pozitif/Negatif) göre Ölçülen BenchMark ULTRA cihazına kıyasla BenchMark ULTRA PLUS cihazı üzerindeki uyumu

Platformlar Arası Uyum	Uyum			
	Tipi	n/N	%	%95 CI
ULTRA ila ULTRA PLUS	PPA	34/35	97.1	(85.5, 99.5)
	NPA	84/85	98.8	(93.6, 99.8)
	OPA	118/120	98.3	(94.1, 99.5)

Not: %95 CI değerleri Puan (Wilson) yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır.

Doğruluk Çalışması: VENTANA MMR IHC Panel Sonuçlarının Moleküler Testlerle (DNA Sekanslama ve MLH1 promotör hipermetilasyonu) Yöntem Açısından Karşılaştırılması

VENTANA MMR IHC Panel performansının (i) MMR eksikliği olan (dMMR) ve (ii) BRAF V600E mutasyonunu içeren CRC'lerin tespiti için kapsamlı bir DNA sekanslama kolon paneli dahil olmak üzere moleküler testlerle karşılaştırılması için bir çalışma yürütülmüştür. DNA sekanslama kolon paneline MMR genlerinde (*MLH1*, *PMS2*, *MSH2*, *MSH6*, *EPCAM*), BRAF içerisinde ve karsinogenez açısından önemli olan diğer genlerde bulunan (örn. *PIK3CA*, *KRAS*, *NRAS*, *ERBB2* vb.) değişkenlerin genomik analizi de dahil olmuştur. Sekanslamaya tüm eksonların, intronik sekansların ve yan sekansların yanı sıra büyük delesyonlar, duplikasyonlar ve mozaikizm dahil olmuştur.

Çalışma için, sıralı CRC vakaları H&E ile boyanmış ve selüler unsurların (tümör ve dahili kontrol hücreleri) varlığı dahil olmak üzere uygun fiksasyon ve morfoloji göstergeleri açısından değerlendirilmiştir. Her bir vaka, numunenin moleküler testler için tavsiye edilen şekilde örnekte tümör hücrelerinin yeterli derecede temsiliyi sağlamak üzere minimum %50 tümör içeriği bulundurup bulundurmadığını belirlemek için değerlendirilmiştir. İncelemeyi takiben söz konusu kriterleri karşılayan 105 sıralı vaka çalışmaya katılmıştır. Ek olarak, IHC'ye göre Kayıp Klinik durum gösteren 13 CRC vakası, çalışmada her bir belirtece yönelik Kayıp temsil edilmesini sağlamak üzere dahil edilmiştir. Çalışmadaki tüm vakaların kesitleri IHC yoluyla VENTANA MMR IHC Panel ve uygun negatif reaktif kontrolleri ile boyanmıştır. Ek kesitler DNA sekanslama kolon paneline tabi tutulmuştur. *MLH1* promotör hipermetilasyonu, *MLH1* proteinini ekspresyonu kaybına yol açabilen mekanizmalardan biridir ve potansiyel Lynch sendromu teşhisinden çok sporadik CRC ile bağlantılıdır. Dolayısıyla, çalışmada IHC ile tespit edilen tüm *MLH1* kaybı vakaları *MLH1* promotörünün hipermetilasyonu açısından test edilmiştir.

118 vakadan oluşan son çalışma setinde, analize havuzlanan tüm belirteçler için PPA ve NPA dahil olmuştur, burada moleküler testler IHC karşılaştırması için referans durum olarak görev görmüştür. Analize MMR protein durumunun (İntakt/Kayıp) Normal (patojenik mutasyon yok, *MLH1* promotör hipermetilasyonu ve yabancı tip BRAF V600E mutasyonu yok) açısından negatif veya Anormal (patojenik mutasyonlar var, *MLH1* promotör hipermetilasyonu açısından pozitif ve/veya BRAF V600E mutasyonu açısından pozitif) olarak tanımlanan moleküler durumla bir karşılaştırması dahil edilmiştir. Bu çalışma için tümörde patojenik bir mutasyon, MMR proteinini ekspresyonunun kaybıyla sonuçlanması öngörülen bir germ hattı mutasyonu veya somatik mutasyon olarak tanımlanmaktadır. Nokta tahminleri Tablo 14 içerisinde gösterilen şekilde %99.4 PPA, %93.5 NPA ve %98.8 OPA olmuştur.

Dört MMR IHC belirtecini (VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikorunu olmadan) moleküler test sonuçlarıyla karşılaştıran havuzlanmış bir analiz de gerçekleştirilmiştir. Nokta tahminleri Tablo 15 içerisinde özetlenen şekilde %99.3 PPA, %89.7 NPA ve %98.5 OPA olmuştur.

Ek bir analiz, vaka seviyesindeki MMR genleri tüm belirteçlerin durumunu kapsayacak ve iki yöntem için bir dMMR/pMMR sonucu oluşturacak şekilde dört MMR IHC belirtecinin sonuçlarını moleküler testlerin sonuçlarıyla karşılaştırmıştır. Bu analiz, Tablo 16 içinde gösterilmekte ve iki yöntem arasında %97.4'lük bir OPA sergilemektedir.

Çalışmadaki aynı MMR belirteçleri için aynı zamanda IHC MMR durumu ve moleküler test MMR durumu da karşılaştırılmıştır. Her bir MMR belirtecinin OPA değeri, DNA sekanslama kolon panelinin ve *MLH1* promotör hipermetilasyonu testlerinin birleştirilmiş sonuçlarıyla karşılaştırıldığında VENTANA anti-*MLH1* (M1) antikoruna için %100.0, VENTANA anti-*PMS2* (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody için %99.1, VENTANA anti-*MSH2* (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody için %98.3 ve VENTANA anti-*MSH6* (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody için %96.6 olmuştur.

CRC'lerde VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikorunu kullanarak IHC yoluyla elde edilen BRAF V600E Klinik durumu da DNA sekanslama yoluyla belirlenen BRAF mutasyon durumu sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikorunu kullanarak yapılan ve DNA sekanslamanın referans olduğu IHC testlerinin PPA, NPA ve OPA değerlerinin tamamı %100 olmuştur (Tablo 17). VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikorunun bir *MLH1* protein ekspresyonu kaybı gösteren CRC vakalarında ileri sınıflandırma kabiliyetini doğrulamak için ek testler gerçekleştirilmiştir. 23 pozitif BRAF V600E vakası arasında 20 vakada IHC yoluyla *MLH1* proteinini kaybı bulunmuş ve bunlar *MLH1* promotör hipermetilasyonu açısından pozitif olmuştur. Bu veriler, BRAF V600E pozitif durumunun *MLH1* promotör hipermetilasyonu durumu ile yakın ilişkisi açısından tutarlıdır. Kalan üç vaka pMMR (tüm MMR proteinleri açısından intakt) olmuştur. Tüm BRAF V600E pozitif numuneler sporadik CRC olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikorunun BRAF V600E mutasyonuna sahip CRC'yi doğru şekilde tespit ettiğini doğrulamaktadır. Veriler aynı zamanda *MLH1* ekspresyonu olmayan durumlarda sporadik ile olası Lynch sendromlu CRC arasında ayırım yapmak için VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikorunu kullanımını da desteklemiştir.

Tablo 14. IHC ve moleküler testler arasında VENTANA MMR IHC Panel uyumuna yönelik havuzlanmış analiz.

Durum* (Moleküler/IHC)	Uyum			
	Tipi	n/N	%	%95 CI
Normal/İntakt	PPA	523/526	99.4	(98.7, 100.0)
Anormal/Kayıp	NPA	58/62	93.5	(87.1, 98.6)
Toplam	OPA	581/588	98.8	(98.0, 99.7)

* IHC için, MMR Durumu protein ekspresyonu açısından İntakt veya Kayıp olur. Bu analiz için, BRAF V600E negatif ve pozitif vakalar sırasıyla İntakt veya Kayıp kategorilerine dahil edilmiştir. Moleküler testler potansiyel patojenik mutasyonların veya *MLH1* promotör hipermetilasyonunun yokluğunu (Normal) ya da varlığını (Anormal) gösterir. %95 CI değerleri yüzdelik bootstrap yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır.

Tablo 15. IHC ve moleküler testler arasında dört MMR IHC belirtecini (VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikorunu olmadan) uyumuna yönelik havuzlanmış analiz.

Durum* (Moleküler/ IHC)	Uyum			
	Tipi	n/N	%	%95 CI
Normal/İntakt	PPA	428/431	99.3	(98.4, 100.0)
Anormal/Kayıp	NPA	35/39	89.7	(79.4, 97.7)
Toplam	OPA	463/470	98.5	(97.3, 99.6)

* IHC için, Durum protein ekspresyonu açısından İntakt veya Kayıp olur. Moleküler testler potansiyel patojenik mutasyonların veya *MLH1* promotör hipermetilasyonunun yokluğunu (Normal) ya da varlığını (Anormal) gösterir. %95 CI değerleri yüzdelik bootstrap yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır.

Tablo 16. MMR durumuna (dMMR/pMMR) yönelik olarak dört MMR IHC belirteci ve moleküler test sonuçları arasında uyum.

MMR Durumu*	Uyum			
	Tipi	n/N	%	%95 CI
pMMR	PPA	79/80	98.8	(93.3, 99.8)
dMMR	NPA	35/37	94.6	(82.3, 98.5)
Toplam	OPA	114/117	97.4	(92.7, 99.1)

*IHC için, bir vakaya yönelik pMMR durumu tüm MMR proteinleri için İntakt durumu ile temsil edilirken dMMR durumu bir veya daha fazla MMR proteininin Kayıp durumu ile temsil edilir. Moleküler testler için, pMMR durumu patojenik mutasyonların veya *MLH1* promotör hipermetilasyonunun yokluğuyla temsil edilirken dMMR durumu patojenik mutasyonların veya *MLH1* promotör hipermetilasyonunun varlığıyla temsil edilir. %95 CI değerleri Wilson Puan yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır.

Tablo 17. VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) antikoru kullanılan IHC ile moleküler testler arasında uyum.

BRAF V600E Durumu (Moleküler/IHC)	Uyum			
	Tipi	n/N	%	%95 CI
Pozitif/Anormal	PPA	23/23	100.0	(85.7, 100.0)
Negatif/Normal	NPA	95/95	100.0	(96.1, 100.0)
Toplam	OPA	118/118	100.0	(96.8, 100.0)

BRAF V600E için durum, Pozitif veya Negatif IHC sonuçları ve moleküler testlere göre Anormal (V600E mutasyonu varlığı) veya Normal (yabani tip BRAF) sonuçlar olarak tanımlanmıştır. %95 CI değerleri Wilson Puan yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır.

REFERANSLAR

- 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.
- Buza N, Ziai J, Hui P. Mismatch repair deficiency testing in clinical practice. Expert Rev Mol Diagn. 2016;16(5):591-604.
- Silva FCC, Torrezan GT, Ferreira JRO, Oliveira LP, Begnami M, et al. Germline Mutations in MLH1 Leading to Isolated Loss of PMS2 Expression in Lynch Syndrome: Implications for Diagnostics in the Clinic. Am J Surg Pathol. 2017;41(6):861-864.
- Boyer JC, Umar A, Risinger JI, Lipford JR, Kane M, et al. Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and genetic defects in human cancer cell lines. Cancer Res. 1995;55(24):6063-6070.
- Lawes DA, Pearson T, Sengupta S, Boulous PB. The role of MLH1, MSH2 and MSH6 in the development of multiple colorectal cancers. Br J Cancer. 2005;93(4):472-477.
- Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. N Engl J Med. 2003;348(10):919-932.
- Peltomäki P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. J Clin Oncol. 2003;21(6):1174-1179.
- Lynch HT, Smyrk T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). An updated review. Cancer. 1996;78(6):1149-1167.
- Caldes T, Godino J, Sanchez A, Corbacho C, De la Hoya M, et al. Immunohistochemistry and microsatellite instability testing for selecting MLH1, MSH2 and MSH6 mutation carriers in hereditary non-polyposis colorectal cancer. Oncol Rep. 2004;12(3):621-629.
- Shia J, Klimstra DS, Nafa K, Offit K, Guillem JG, et al. Value of immunohistochemical detection of DNA mismatch repair proteins in predicting germline mutation in hereditary colorectal neoplasms. Am J Surg Pathol. 2005;29(1):96-104.
- Cunningham JM, Tester DJ, Thibodeau SN. Mutation detection in colorectal cancers: direct sequencing of DNA mismatch repair genes. Methods Mol Med. 2001;50:87-98.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature. 2002;417(6892):949-954.
- Vakiani E, Solit DB. KRAS and BRAF: drug targets and predictive biomarkers. J Pathol. 2011;223(2):219-229.
- 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.
- 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.
- 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.
- Tiacci E, Schiavoni G, Forconi F, Santi A, Trentin L, et al. Simple genetic diagnosis of hairy cell leukemia by sensitive detection of the BRAF-V600E mutation. Blood. 2012;119(1):192-195.
- Giardiello FM, Allen JI, Axilbund JE, Boland CR, Burke CA, et al. Guidelines on Genetic Evaluation and Management of Lynch Syndrome: A Consensus Statement by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. Diseases of the Colon & Rectum. 2014;57(8):1025-1048.
- Egoavil C, Alenda C, Castillejo A, Paya A, Peiro G, et al. Prevalence of Lynch syndrome among patients with newly diagnosed endometrial cancers. PLoS One. 2013;8(11):e79737.
- Connell LC, Mota JM, Braghiroli MI, Hoff PM. The Rising Incidence of Younger Patients With Colorectal Cancer: Questions About Screening, Biology, and Treatment. Curr Treat Options Oncol. 2017;18(4):23.
- Provenzale D, Gupta S, Ahnen DJ, Bray T, Cannon JA, et al. Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal Version 1.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. J Natl Compr Canc Netw. 2016;14(8):1010-1030.
- 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.
- Evaluation of Genomic Applications in P, Prevention Working G. Recommendations from the EGAPP Working Group: genetic testing strategies in newly diagnosed individuals with colorectal cancer aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome in relatives. Genet Med. 2009;11(1):35-41.
- Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. J Natl Cancer Inst. 2004;96(4):261-268.
- Parsons MT, Buchanan DD, Thompson B, Young JP, Spurdle AB. Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. J Med Genet. 2012;49(3):151-157.
- Shia J. Evolving approach and clinical significance of detecting DNA mismatch repair deficiency in colorectal carcinoma. Semin Diagn Pathol. 2015;32(5):352-361.
- Thiel A, Heinonen M, Kantonen J, Gylling A, Lahtinen L, et al. BRAF mutation in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. Virchows Arch. 2013;463(5):613-621.
- Toon CW, Chou A, DeSilva K, Chan J, Patterson J, et al. BRAFV600E immunohistochemistry in conjunction with mismatch repair status predicts survival in patients with colorectal cancer. Mod Pathol. 2014;27(5):644-650.
- Koinuma K, Shitoh K, Miyakura Y, Furukawa T, Yamashita Y, et al. Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas. Int J Cancer. 2004;108(2):237-242.
- Capper D, Preusser M, Habel A, Sahm F, Ackermann U, et al. Assessment of BRAF V600E mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody. Acta Neuropathol. 2011;122(1):11-19.
- Capper D, Berghoff AS, Magerle M, Ilhan A, Wohrer A, et al. Immunohistochemical testing of BRAF V600E status in 1,120 tumor tissue samples of patients with brain metastases. Acta Neuropathol. 2012;123(2):223-233.
- Carson FL, Hladik C, Cappellano CH, Pathology ASfC. Histotechnology: A Self-Instructional Text: American Society for Clinical Pathology; 2015.
- Roche PC, Hsi ED, Firer BL. Immunohistochemistry: Principles and Advances. Manual of Molecular and Clinical Laboratory Immunology, 7th Edition: American Society of Microbiology; 2006.
- Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
- 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.
- Rabinovitch A. The College of American Pathologists laboratory accreditation program. Accreditation and Quality Assurance. 2002;7(11):473-476.
- 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.

41. Kuan SF, Navina S, Cressman KL, Pai RK. Immunohistochemical detection of BRAF V600E mutant protein using the VE1 antibody in colorectal carcinoma is highly concordant with molecular testing but requires rigorous antibody optimization. Hum Pathol. 2014;45(3):464-472.
42. Day F, Muranyi A, Singh S, Shanmugam K, Williams D, et al. A mutant BRAF V600E-specific immunohistochemical assay: correlation with molecular mutation status and clinical outcome in colorectal cancer. Target Oncol. 2015;10(1):99-109.

NOT: Bu belgede, ondalık bir sayının tam sayı ve kesir kısımlarını ayırmak için ondalık ayırıcı olarak her zaman nokta kullanılmıştır. Binlik basamaklar için ayırıcı kullanılmamıştır.

Güvenlik ve performans özetini burada bulabilirsiniz:

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

Semboller

Ventana, ISO 15223-1 standardında listelenenlere ek olarak aşağıdaki sembol ve işaretleri kullanmaktadır (ABD için: daha fazla bilgi için elabdoc.roche.com/symbols adresine bakın):

GTIN

Küresel Ticari Ürün Numarası

UDI

Benzersiz Cihaz Tanımlaması

REVİZYON GEÇMİŞİ

Rev	Güncellemeler
F	Gerekli Olan Fakat Ürünle Birlikte Verilmeyen Malzemeler bölümünde VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody, VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody, VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody ve VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody ürünleri için ilave P/N'ler şeklinde güncellemeler yapıldı.

FİKRİ MÜLKİYET

VENTANA, BENCHMARK, OPTIVIEW ve VENTANA logosu Roche şirketinin ticari markalarıdır. Tüm diğer ticari markalar, ilgili sahiplerinin mülkiyetindedir.

© 2023 Ventana Medical Systems, Inc.

İLETİŞİM BİLGİLERİ



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

www.roche.com

 0123