

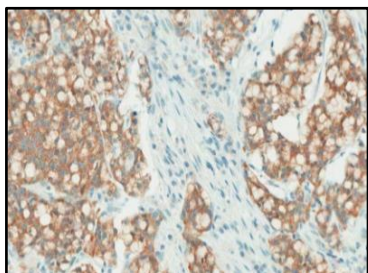
VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody

Pro použití s panelem VENTANA MMR IHC Panel

REF 760-5095

08033706001

IVD  50



Obr. 1. Barvení neoplastických buněk ve tkáni karcinomu tlustého střeva protilátkou VENTANA anti-BRAF V600E (VE1).

URČENÉ POUŽITÍ

Protilátka VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (protilátka VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) je určena ke kvalitativní detekci proteinu BRAF V600E v řezech tkáně fixovaných formalinem, zalitých parafinem. Protilátka VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) je připravena k použití v přístrojích BenchMark IHC/ISH s detekční soupravou OptiView DAB IHC Detection Kit a přídatnými reagenty.

Protilátka VENTANA anti-BRAF V600E

(VE1) je součástí panelu VENTANA MMR IHC Panel, obsahujícího protilátky 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 a VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody. Panel VENTANA MMR IHC Panel je indikován pro detekci deficiencie proteinu opravy záměny bázi jako test pro identifikaci jedinců s rizikem Lynchova syndromu u pacientů s diagnostikovaným kolorektálním karcinomem (CRC) a se stavem BRAF V600E jako pomůcka pro diferencování mezi sporadickým a pravděpodobným CRC s Lynchovým syndromem za nepřítomnosti exprese proteinu MLH1.

Tyto produkty musejí být interpretovány kvalifikovaným patologem v kombinaci s histologickým vyšetřením, relevantními klinickými informacemi a patřičnými kontrolami.

Určeno pro diagnostické použití in vitro (IVD).

SOUHRN A VYSVĚTLENÍ

Kolorektální karcinom je třetí nejčastější karcinom a v pořadí čtvrtá z nejprevalentnějších příčin úmrtí na rakovinu na světě.¹ Většina kolorektálních karcinomů vykazuje chromosomální nestabilitu, avšak přibližně 15 % karcinomů se vyvíjí alternativní cestou, charakterizovanou vadnou funkcí systému opravy záměny bázi DNA (mismatch repair, MMR). V důsledku deficiencie MMR vykazují nádory mikrosatelitní nestabilitu (MSI), vzniklou v důsledku neschopnosti proteinů MMR opravit chyby replikace DNA.

Kolorektální karcinomy s defekty MMR jsou označovány jako MMR deficientní (dMMR) nádory. Oproti tomu jsou kolorektální karcinomy bez defektů MMR označovány jako MMR proficientní (pMMR) nádory. Kolorektální karcinomy dMMR jsou často špatně diferencované a často vykazují predominanci proximálního tlustého střeva, mucinózní nebo medulární histologické charakteristiky nebo histologické charakteristiky typu pečatního prstenu a zvýšený počet lymfocytů infiltrujících nádor.^{2,3} Obecně může být deficiencie MMR způsobena buď mutacemi zárodečné linie v jednom z genů MMR s následnou ztrátou odpovídající normální alely prostřednictvím genetického nebo epigenetického mechanismu, somatických mutací v alelách, anebo epigenetickou inaktivací genu *MLH1* metylací.⁴

Čtyři nejčastěji zmutované geny MMR jsou *MLH1*, *PMS2*, *MSH2* a *MSH6*. V normálních buňkách tvoří protein MLH1 komplex (heterodimer) s proteinem PMS2, zatímco protein MSH2 tvoří komplex s proteinem MSH6.^{5,6} Pokud dojde k záměně bázi DNA, heterodimer MSH2/MSH6 se váže na DNA se zaměřenými bázemi a indukuje konformační změnu. Heterodimer MLH1/PMS2 váže komplex MSH2/MSH6 vázaný na DNA, což má za následek excizní opravu dotčené DNA.

Proteiny MLH1, PMS2, MSH2 a MSH6 jsou klinicky významné proteiny MMR kódované geny, které mohou být mutovány v rodinách s Lynchovým syndromem.^{7,8} Nositelé těchto

mutací čelí vysokému celoživotnímu riziku vývoje kolorektálního nebo jiných karcinomů v důsledku akumulace chyb replikace DNA v proliferujících buňkách. Lynchův syndrom představuje 1-6 % všech karcinomů CRC. Tyto nádory jsou důsledkem dědičnosti zárodečné linie autosomální dominantní mutace jednoho ze čtyř genů MMR, kde ztráta MLH1 nastává u většiny těchto kolorektálních karcinomů spojených s Lynchovým syndromem.^{5,9,10} U pacientů s Lynchovým syndromem bylo identifikováno více než 300 různých mutací v rodině proteinů MMR. Fenotyp nádoru spojený s Lynchovým syndromem je obecně charakterizován imunohistochemickou ztrátou exprese v proteinech MMR, zejména MLH1, PMS2, MSH2 a MSH6.¹⁰⁻¹³ Bylo prokázáno, že IHC testování MMR je užitečné při identifikaci specifického genu MMR, v němž existuje největší pravděpodobnost nalezení alterace zárodečné linie nebo somatické alterace.¹⁴

Gen *BRAF* je umístěn na chromosomu 7q34 a kóduje cytoplazmatickou serin-threonin kinázu, působící v následně kaskádě mitogenem aktivované proteinkinázové (mitogen-activated protein kinase, MAPK) signální dráze. Onkogenní mutace v genu *BRAF*, všechny v kinázové doméně, konstitutivně aktivují signální dráhu MAPK, což má za následek zvýšenou proliferaci buněk a rezistenci vůči apoptóze. Nejčastější ze všech mutací aktivujících *BRAF* (bodová mutace T1799A) má za následek substituci valinu (V) kyselinou glutamovou (E) na pozici 600 aminokyselinové sekvence a je detekována u 12 % všech kolorektálních karcinomů.^{15,16}

Jakožto součást panelu VENTANA MMR IHC Panel pomáhá protilátka VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) diferencovat sporadický a pravděpodobný karcinom CRC spojený s Lynchovým syndromem za nepřítomnosti exprese proteinu MLH1.^{17,18} U karcinomu CRC je ztráta proteinu MLH1 často důsledkem hypermetylace promotoru *MLH1* a indikuje sporadický výskyt.¹⁹ Přítomnost proteinu BRAF V600E je těsně spojena s hypermetylací promotoru *MLH1*. V důsledku toho pozitivní výsledek barvení protilátkou VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) indikuje sporadický kolorektální karcinom.

Bez ohledu na to, jakou roli hraje ve stratifikaci kolorektálního karcinomu, je mutace *BRAF V600E* detekována přibližně u 8 % všech solidních nádorů, včetně 43 % melanomů, 39 % papilárních karcinomů štítné žlázy, 12 % serózních karcinomů vaječníků, 2 % karcinomů plic a u dalších zhoubných nádorů.¹⁶ Navíc byla mutace *BRAF V600E* nedávno popsána jako molekulární marker leukémie vlasových buněk.²⁰

KLINICKÝ VÝZNAM

Lynchův syndrom byl popsán v 60. letech 20. století a identifikován jako spojení mezi ztrátou funkce MMR a rakovinou.²¹ Ztráta proteinů MMR (MLH1, PMS2, MSH2 nebo MSH6) může vést k MSI a vyššímu celoživotnímu riziku nejen CRC, ale také rakoviny žaludku, mozku, slinivky, kůže, endometria a vaječníků. Pacienti s Lynchovým syndromem mají 50 % až 80 % celoživotní riziko vzniku kolorektálního karcinomu.^{5,22,23} Lynchův syndrom je jedinečný oproti jiným dědičným rakovinovým syndromům, protože přímé testování nádorové tkáně pomáhá při identifikaci pacientů, kteří jsou potenciálně ohroženi Lynchovým syndromem, a pomáhá informovat o následném genetickém testování zárodečné linie. Rodiny s Lynchovým syndromem mají výhodu v pokročilých protokolech screeningu rakoviny.

Různé pokyny, včetně pokynů National Comprehensive Cancer Network (NCCN), doporučují, aby bylo u všech karcinomů CRC provedeno vyšetření na Lynchův syndrom pro identifikaci pacientů a rodin, které budou mít prospěch z dalšího genetického testování a poradenství.^{21, 24-27} Použití panelu VENTANA MMR IHC Panel pomůže stanovit stav MMR karcinomu CRC jeho klasifikací jako intaktního nebo se ztrátou exprese proteinu MMR. Detekce všech čtyř MMR proteinů v nádoru indikuje normální nebo intaktní MMR. Ztráta exprese MLH1 nebo MSH2 je téměř vždy provázena ztrátou jejich heterodimerního partnera PMS2, respektive MSH6. Ztráta PMS2 nebo MSH6 však nevede ke ztrátě MLH1 nebo MSH2. Ztráta PMS2, MSH2 a/nebo MSH6 je konzistentní s pravděpodobným Lynchovým syndromem a pacienti je třeba doporučit k dalšímu vyšetření a poradenství v souladu s klinickou praxí.

Ztráta proteinu MLH1 může indikovat sporadický nebo pravděpodobný výskyt Lynchova syndromu. Při 15% nebo sporadičtějším kolorektálním karcinomu je ztráta proteinu MLH1 způsobena hypermetylací promotoru *MLH1*.^{5,28,29} Je významné, že je pozorována mutace BRAF V600E přibližně u dvou třetin nádorů se ztrátou exprese MLH1 z hypermetylace promotoru *MLH1*. Oproti tomu je mutace BRAF V600E pozorována u nádorů s Lynchovým syndromem velmi zřídka.²⁸ Pokud tedy výsledek protilátky VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (protilátky VENTANA anti-MLH1 (M1)) indikuje ztrátu proteinu MLH1, protilátka VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) může stratifikovat nádor jako sporadický nebo pravděpodobný Lynchův syndrom.^{5,30} V karcinomu CRC ztráta proteinu MLH1 s pozitivním stavem BRAF V600E silně indikuje, že nádor je výsledkem sporadického výskytu s virtuální eliminací Lynchova

syndromu jako výchozí příčiny malignity.^{21,31} Když je ztráta proteinu MLH1 provázena negativním stavem BRAF V600E, je ztráta MLH1 konzistentní s vysokou pravděpodobností Lynchova syndromu.³²

PRINCIP POSTUPU

Protilátka VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) je myši monoklonální protilátka (klon VE1) produkovaná proti syntetickému peptidu představujícímu zmutovanou aminokyselinovou sekvenci BRAF z aminokyselin 596 až 606 (GLATEKSRWSG). Tato protilátka specifická pro mutaci vykazuje cytoplazmatický vzor barvení. Tato protilátka rozlišuje mutaci V600E v proteinu BRAF od proteinu BRAF divokého typu a dalších zmutovaných proteinů BRAF.^{33,34}

V kontextu IHC testování opravy záměny bází (MMR) na potenciální Lynchův syndrom je identifikace mutace BRAF V600E v případech ztráty MLH1 indikativní pro sporadický kolorektální karcinom (CRC).³²

Protilátka VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) se váže specificky na mutantní protein BRAF V600E v tkáňových řezech fixovaných formalínem, zalitých parafínem (FFPE). Protilátku lze lokalizovat s použitím haptenované sekundární protilátky s následným multimerním konjugátem anti-hapten-HRP (OptiView DAB IHC Detection Kit, kat. č. 760-700 / 06396500001). Specifický komplex protilátky a enzymu je poté vizualizován produktem precipitační enzymové reakce. Každý krok se inkubuje po přesnou dobu a při přesné teplotě. Na konci každého inkubačního kroku přístroj promyje řezy, aby zastavil reakci a odstranil nenavázaný materiál, který by bránil žádoucí reakci v následných krocích. To platí také pro ULTRA LCS (Predilute) (kat. č. 650-210 / 05424534001) nebo LCS (Predilute) (kat. č. 650-010 / 05264839001), který minimalizuje odpařování vodných reagentů ze sklička se vzorkem.

DODÁVANÝ MATERIÁL

Protilátka VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) obsahuje dostatečné množství reagentů pro 50 testů.

Jeden 5mL dávkovač protilátky VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) obsahuje přibližně 60 µg myši monoklonální protilátky.

Protilátka je naředěna ve fosforečnanovém pufru (pH 7.3) s obsahem nosičového proteinu, Brij 35 a 0.05 % konzervačního prostředku ProClin 300.

Konzentrace specifické protilátky je přibližně 12 µg/mL.

Protilátka VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) je myši monoklonální protilátka produkovaná jako purifikovaný supernatant buněčné kultury.

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

POTŘEBNÉ MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY

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

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

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

1. Doporučená kontrolní tkáň
2. Mikroskopická sklička, kladně nabitá
3. VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (kat. č. 730-7159 / 09605584001 nebo kat. č. 760-5091 / 08033668001)
4. VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody (kat. č. 730-7158 / 09607161001 nebo kat. č. 760-5094 / 08033692001)
5. VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody (kat. č. 730-7160 / 09607137001 nebo kat. č. 760-5093 / 08033684001)
6. VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (kat. č. 730-7161 / 09606769001 nebo kat. č. 760-5092 / 08033676001)
7. Negative Control (Monoclonal) (kat. č. 760-2014 / 05266670001)
8. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (kat. č. 790-4795 / 06683380001)
9. OptiView DAB IHC Detection Kit (kat. č. 760-700 / 06396500001)
10. Pro protilátku VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody – amplifikační souprava OptiView Amplification Kit (kat. č. 760-099 / 06396518001(50 testů) nebo kat. č. 860-099 / 06718663001(250 testů))
11. EZ Prep Concentrate (10X) (kat. č. 950-102 / 05279771001)

12. Reaction Buffer Concentrate (10X) (kat. č. 950-300 / 05353955001)
13. ULTRA LCS (Predilute) (kat. č. 650-210 / 05424534001)
14. LCS (Predilute) (kat. č. 650-010 / 05264839001)
15. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (kat. č. 950-224 / 05424569001)
16. Cell Conditioning Solution (CC1) (kat. č. 950-124 / 05279801001)
17. Hematoxylin II (kat. č. 790-2208 / 05277965001)
18. Bluing Reagent (kat. č. 760-2037 / 05266769001)
19. Trvalé fixační médium
20. Krycí sklo
21. Automatizovaný podavač krycích skliček
22. Obecné laboratorní vybavení
23. Přístroj BenchMark IHC/ISH

SKLADOVÁNÍ A STABILITA

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

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

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

PŘÍPRAVA VZORKŮ

Pro použití této primární protilátky s detekčními soupravami OptiView DAB IHC Detection Kit a přístroji BenchMark IHC/ISH jsou vhodné tkáně zpracované běžným způsobem FFPE. Doporučeným vhodným fixativem na tkáň je 10% neutrální pufovaný formalin.³⁵

Pro protilátku VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) se doporučuje fixace tkáně do 2 hodin od excize v 10% neutrálním pufovaném formalínu (NBF) po dobu nejméně 12 hodin na základě modelů štěpu cizí tkáně generovaných z lidských buněčných linií A2058 (melanom) a LS411N (CRC), které jsou pozitivní na expresi BRAF V600E. Doby fixace do 72 hodin v 10% NBF však poskytovaly ekvivalentní výsledky barvení BRAF V600E. Přijatelné barvení protilátkou VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) bylo také dosaženo při fixaci ve fixativu Zinc formalin po dobu 12–72 hodin.

Fixativa AFA (alkohol – formalin – kyselina octová), 95% etanol, Z-5 a PREFER se pro použití s protilátkou VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) nedoporučují. Štěpy z cizí tkáně fixované v alkoholu–formalinu nevykazují žádné barvení nebo vykazují proměnlivé barvení.

Použitá množství fixativu by měla odpovídat 15- až 20násobku objemu tkáně. Žádný fixativ neprotrhne za 24 hodin více než 2 až 3 mm pevné tkáně nebo 5 mm porézní tkáně. Fixaci lze provádět při pokojové teplotě (15–25 °C).^{35,36}

Řezy mají mít tloušťku přibližně 4 µm a mají být fixovány na kladně nabitých skličkách. Sklička je třeba obarvit neprodleně, neboť antigennost připravených tkáňových řezů se může postupem času snižovat. Avšak nebarvená sklička s tkání karcinomu CRC, uchovávaná při teplotě 5 ± 3 °C nebo 30 ± 5 °C po dobu až 8 týdnů, vykazovala podobnou intenzitu barvení protilátkou VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) jako u vzorků tkáně, připravených ze stejného bloku a barvených protilátkou VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) 1. den. Pro více informací požádejte místního zástupce společnosti Roche o kopii dokumentu „Recommended Slide Storage and Handling“ (Doporučené postupy pro skladování skliček a manipulace s nimi).

UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

1. Určeno k diagnostickému použití in vitro (IVD).
2. Pouze k odbornému použití.
3. **UPOZORNĚNÍ:** Federální zákony USA omezují prodej tohoto prostředku pouze lékařům nebo na jejich objednávku. (Rx Only)
4. Nepoužívejte nad rámec specifikovaného počtu testů.
5. Roztok ProClin 300 se používá v této reagentii jako konzervační prostředek. Je klasifikován jako dráždivý a při styku s kůží může způsobit senzibilizaci. Při manipulaci dodržujte příslušná bezpečnostní opatření. Zamezte kontaktu reagentii s očima, kůží a sliznicemi. Používejte ochranný oděv a rukavice.
6. Kladně nabitá sklička mohou být citlivá na zářivé prostředí, což má za následek nevhodné zbarvení. Požádejte zástupce společnosti Roche o další informace o tom, jak používat tyto typy skliček.
7. S materiálem lidského nebo živočišného původu je třeba nakládat jako s biologicky nebezpečným materiálem a likvidovat jej v souladu s platnými bezpečnostními

- opatřeními. V případě expozice je potřeba se řídit zdravotnickými směnicemi odpovědných orgánů.^{37,38}
- Zabraňte kontaktu reagentů s očima a sliznicemi. Jestliže se reagenty dostanou do kontaktu s citlivými oblastmi, omyjte zasažené oblasti vydatným množstvím vody.
 - Zabraňte mikrobiální kontaminaci reagentů, mohla by způsobit nepřesnost výsledků.
 - Další informace o používání tohoto prostředku obsahuje uživatelská příručka přístroje BenchMark IHC/ISH a návody k použití všech nezbytných součástí, které naleznete na internetových stránkách navifyportal.roche.com.
 - Doporučené metody likvidace jsou uvedeny v celostátních a/nebo místních předpisech.
 - Označení produktu bezpečnostními štítky se řídí hlavně pokyny GHS EU. Pro profesionální uživatele je na vyžádání k dispozici bezpečnostní list.
 - Pro nahlášení podezřelých závažných incidentů týkajících se tohoto prostředku se obraťte na místního zástupce společnosti Roche a kompetentní orgány členského státu nebo země, ve které uživatel provozuje činnost.

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

Tab. 1. Informace o rizicích.

Riziko	Kód	Věta
	H317	Může vyvolat alergickou kožní reakci.
	P261	Zamezte vdechování mlhy a par.
	P272	Kontaminovaný pracovní oděv neodnášejte z pracoviště.
	P280	Používejte ochranné rukavice.
	P333 + P313	Při podráždění kůže nebo výrážce: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.
	P362 + P364	Kontaminovaný oděv svlékněte a před opětovným použitím vyperte.
	P501	Odstraňte obsah/obal předáním do schváleného zařízení k likvidaci odpadu.

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

POSTUP BARVENÍ

Protílátka VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) byla vyvinuta pro použití v přístrojích BenchMark IHC/ISH společně s detekční soupravou OptiView DAB IHC Detection Kit a přídatnými reagenty. Doporučený barvicí protokol uvádí Tab. 2.

Vliv proměnného času a teploty znovuzískávání antigenu na robustnost testu není znám. Odchylka od doporučených podmínek pro znovuzískávání antigenu, poskytnutých v uvedeném protokolu barvení, je neznámá, a může tedy zneplatnit očekávané výsledky. Je třeba použít a zdokumentovat vhodné kontroly. Uživatelé, kteří se odchylují od uvedeného protokolu, musejí přijmout odpovědnost za interpretaci výsledků u pacientů.

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

Další podrobnosti o správném používání tohoto prostředku najdete v metodickém listu ke vkladacímu dávkovači (P/N 760-5095).

Tab. 2. Doporučený barvicí protokol pro protílátku VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) s detekční soupravou OptiView DAB IHC Detection Kit na přístrojích BenchMark IHC/ISH.

Typ postupu	Metoda		
	GX	XT	ULTRA nebo ULTRA PLUS
Odparafinování	Zvoleno	Zvoleno	Zvoleno

Typ postupu	Metoda		
	GX	XT	ULTRA nebo ULTRA PLUS
Úprava buněk (odmaskování antigenu)	CC1 64 minut	CC1 64 minut	ULTRA CC1 64 minut, 100 °C
Preprimární inhibitor peroxidázy	Zvoleno	Zvoleno	Zvoleno
Protílátka (primární)	28 minut, 37 °C	16 minut, 37 °C	16 minut, 36 °C
OptiView HQ Linker	8 minut (standardně)		
OptiView HRP Multimer	8 minut (standardně)		
Kontrastní barvivo	Hematoxylin II, 4 minuty		
Po kontrastním barvení	Bluing, 4 minuty		

Odchylka od doporučených podmínek, zejména pro znovuzískávání antigenu, poskytnutých v uvedeném protokolu, může zneplatnit očekávané výsledky. Vzhledem k různým způsobům fixace a zpracování tkání, jakož i obecnému stavu přístroje a podmínkám laboratorního prostředí může být potřeba prodloužit nebo zkrátit dobu inkubace s primární protílátkou v závislosti na jednotlivých vzorcích a vlastní preferenci. Další informace o různých fixacích naleznete v příručce „Immunohistochemistry: Principles and Advances“ (Zásady a postupy imunohistochemie).³⁶

POSTUPY KONTROLY KVALITY

Negativní reagenční kontrola

Kromě obarvení protílátkou VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) by mělo být provedeno obarvení druhého sklička myši monoklonální negativní reagenční kontrolou Negative Control (Monoclonal). Negativní reagenční kontrola se používá k posouzení nespecifického barvení. Parametry barvení pro negativní reagenční kontrolu protílátky by měly být stejné jako u primární protílátky.

Pozitivní kontrola tkáně

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

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

Vhodná pozitivní kontrola tkáně by byla překvalifikovaným případem kolorektálního karcinomu, který je pozitivní na protílátku VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). Pozitivní kontrola tkáně by měla vykazovat cytoplasmatické zbarvení jakékoli intenzity převyšující pozadí v životaschopných nádorových buňkách.

Negativní kontrola tkáně

Negativní kontrola tkáně by byla překvalifikovaným případem kolorektálního karcinomu, který je negativní na protílátku VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). Negativní kontrolu tkáně je nutno používat pouze ke sledování funkce zpracovaných tkání a testovacích reagentů a přístrojů, nikoli jako pomůcku ke stanovení konkrétní diagnózy patientských vzorků.

Ověření testu

Před počátečním použitím protílátky nebo systému barvení v diagnostickém postupu by měla být specifita protílátky ověřena barvením řady tkání se známými IHC funkčními charakteristikami reprezentující tkáň pozitivní a negativní na mutaci BRAF V600E. Viz

postupy kontroly kvality uvedené výše v této části příbalové informace a doporučení pro kontrolu kvality z programu College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist³⁹ nebo pokyny CLSI Approved Guideline.⁴⁰

INTERPRETACE BARVENÍ / OČEKÁVANÉ VÝSLEDKY

Buněčný vzor barvení u protilátky VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) je v nádorových buňkách cytoplazmatický. Vzorky kolorektálního karcinomu barvené protilátkou VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) mají klinický stav určený vyškoleným patologem na základě jeho hodnocení přítomnosti nebo absence cytoplazmatického zabarvení v nádoru. Pozitivní klinický stav je přiřazen případům s jednoznačným cytoplazmatickým zabarvením jakékoli intenzity převyšující pozadí v životaschopných nádorových buňkách. Negativní klinický stav je přiřazen případům bez zabarvení nebo s nejednoznačným cytoplazmatickým zabarvením v životaschopných nádorových buňkách. Jaderné zbarvení, slabé až silné barvení izolovaných životaschopných nádorových buněk a/nebo malých nádorových shluků je třeba považovat za negativní.

SPECIFICKÁ OMEZENÍ

Odchyłka od uvedeného protokolu barvení je neznámá a může tedy zneplatnit očekávané výsledky. Uživateli se nedoporučuje používat kyselý pufrý ke znovuzískávání antigenu, protože tyto pufrý mohou způsobovat suboptimální barvení, které se obtížně interpretuje.⁴¹ Uživateli, kteří se odchylojí od uvedeného protokolu, musejí přijmout odpovědnost za interpretaci výsledků u pacientů.

Případy barvené protilátkou VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) jsou kategorizovány jako pozitivní nebo negativní podle přítomnosti nebo absence barvení po celé oblasti nádoru. Barvení se může lišit úrovní intenzity a tato intenzita se může v rámci nádoru lišit, nemá to však vliv na klinický stav BRAF V600E.

Některé případy mohou být zvláště obtížné kvůli následujícím problémům:

- Bylo zjištěno, že protilátka VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) v některých případech vykazuje slabé cytoplazmatické a jaderné zbarvení v hladkém svalu, Purkyňových buňkách v mozečku, normálních epitelových buňkách tlustého střeva, enterocytech, intersticiálních buňkách varlat, nadledvině, hypofýze, acinárních strukturách slinivky, žlázových buňkách tenkého střeva a v některých nádorových buňkách; takové případy však nelze považovat za pozitivní na BRAF V600E.⁴² Navíc tato protilátka vykazovala mimé barvení neuroendokrinních buněk hypofýzy. Navíc tato protilátka barví také plicní řasinky.
- Nespecifické pozadí: Některé vzorky mohou vykazovat nespecifické barvení pozadí z důvodů, které nejsou dobře pochopeny. Proto má hodnocení sklíčka barveného protilátkou VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) zahrnovat srovnání tohoto sklíčka se sklíčkem obarveným s negativní reagenční kontrolou pro stanovení úrovně nespecifického barvení pozadí. V nádorových buňkách je někdy pozorováno jaderné zbarvení, jeho významnost však není objasněna.
- Artefakt tkáně nebo barvení: Histologické artefakty pocházející z postupů zpracování vzorků a mikrotomie mohou také komplikovat stanovení klinického stavu protilátky VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). Tyto artefakty mohou mimo jiné zahrnovat fixační gradienty a efekty okrajů, záchyty DAB, bubliny v jádru, nedostatečné barvení některých regionů tkáně, roztržení a přeložení tkáně a ztrátu tkáňového řezu. V některých případech může být požadováno barvení nových řezů nebo akvizice nového vzorku.

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

FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY

ANALYTICKÁ VÝKONNOST

Níže jsou uvedeny výsledky provedených testů barvení týkajících se senzitivity, specifity a preciznosti.

Senzitivita a specifita

Nebýlo pozorováno žádné neočekávané barvení protilátkou VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) na běžných a neoplastických tkáních s výjimkou těch, které jsou uvedeny v části Specifická omezení.

Tab. 3. Senzitivita/specifita protilátky VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) byla stanovena testováním běžných tkání FFPE.

Tkáň	Počet pozitivních případů / celkový počet případů	Tkáň	Počet pozitivních případů / celkový počet případů
Velký mozek	0/3	Jícen	0/3
Mozeček*	1/3	Žaludek	0/3
Nadledvinka	0/3	Tenké střevo*	2/4
Vaječník	0/3	Tlusté střevo*	5/12
Slinivka*	2/3	Játra	0/3
Lymfatická uzlina	0/3	Lingvální/slinná žláza	0/3
Hypofýza**	3/3	Ledvina	0/3
Varle*	2/3	Prostata	0/3
Štítná žláza	0/3	Močový měchýř	0/3
Prs	0/3	Příštítné tělísko	0/3
Slezina	0/3	Endometrium	0/3
Mandle	0/3	Děložní hrdlo	0/3
Brzlík	0/3	Kosterní sval	0/3
Kostní dřev	0/3	Kůže	0/3
Plice	0/3	Nerv	0/5
Srdce	0/3	Mezotel	0/3

* Slabé cytoplazmatické a jaderné zbarvení v Purkyňových buňkách v mozečku, hladkém svalu a epitelových buňkách normálního tlustého střeva, žlázových buňkách tenkého střeva, acinárních strukturách slinivky a intersticiálních buňkách varlat.

** Sřední zbarvení pozorované v neuroendokrinních buňkách hypofýzy.

Pro všechny tkáně bylo stanoveno pozitivní/negativní barvení pro prvky specifické pro tkáň a takové případy nemají být posuzovány jako pozitivní pro klinický stav BRAF V600E.¹⁶

Tab. 4. Senzitivita/specifita protilátky VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) byla stanovena testováním různých neoplastických tkání FFPE.

Patologie	Počet pozitivních případů / celkový počet případů
Glioblastom (mozek)	0/1
Meningiom (mozek)	0/1
Ependyom (mozek)	0/1
Oligodendrogliom (mozek)	0/1
Serózní adenokarcinom (vaječník)	0/1
Adenokarcinom (vaječník)	0/1
Neuroendokrinní novotvar (slinivka)	0/1
Seminom (varle)	0/2
Medulární karcinom (štítná žláza)	0/1
Papilární karcinom (štítná žláza)	21/28
Duktální karcinom in situ (prs)	0/1

Patologie	Počet pozitivních případů / celkový počet případů
Mikroinvazivní duktální karcinom (prs)	0/1
Invazivní duktální karcinom (prs)	3/131
Lymfom z B-buněk; NOS (slezina)	0/1
Malobuněčný karcinom (plíce)	0/7
Karcinom ze skvamózních buněk (plíce)	0/90
Adenokarcinom (plíce)	1/73
Neuroendokrinní karcinom (jícen)	0/1
Adenokarcinom (jícen)	0/1
Karcinom z prstenčitých buněk (žaludek)	0/1
Adenokarcinom (tenké střevo)	0/1
Stromální sarkom (tenké střevo)	1/1
Adenokarcinom (tlusté střevo)	64/234
Gastrointestinální stromální tumor (GIST) (tlusté střevo)	0/1
Adenokarcinom (konečník)	0/1
GIST (konečník)	0/1
Melanom (konečník)	0/1
Hepatocelulární karcinom (játra)	0/1
Hepatoblastom (játra)	0/1
Karcinom z jasných buněk (ledvina)	0/1
Adenokarcinom (prostata)	0/2
Adenokarcinom (děloha)	0/1
Karcinom z jasných buněk (děloha)	0/1
Karcinom ze skvamózních buněk (čípek)	0/2
Embryonální rhabdomyosarkom (příčně pruhovalý sval)	0/1
Melanom	10/24
Karcinom z bazálních buněk (kůže)	0/1
Karcinom ze skvamózních buněk (kůže)	0/1
Neuroblastom (retroperitoneum)	0/1
Mezoteliom (peritoneum)	0/1
Rhabdomyosarkom z vřetenovitých buněk (peritoneum)	0/1
Lymfom z B-buněk; NOS (lymfatická uzlina)	0/2
Hodgkinův lymfom (lymfatická uzlina)	1/1
Uroteliální karcinom (močový měchýř)	0/1
Leiomyosarkom (močový měchýř)	0/1
Osteosarkom (kost)	0/1

Patologie	Počet pozitivních případů / celkový počet případů
Leiomyosarkom (hladký sval)	0/1

Preciznost

Funkční charakteristiky na přístroji BenchMark ULTRA

Opakovatelnost v rámci cyklu a mezilehlá preciznost mezi dny

Opakovatelnost a preciznost protilátky VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) byla vyhodnocována na přístroji BenchMark ULTRA s detekční soupravou OptiView DAB IHC Detection Kit.

Opakovatelnost v rámci cyklu byla vyhodnocována na 10 vzorcích kolorektálního karcinomu (5 pozitivních a 5 negativních pro klinický stav BRAF V600E). Pět replikátů sklíček z každého ze vzorků karcinomu CRC bylo obarveno protilátkou VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) na jednom přístroji BenchMark ULTRA v průběhu jednoho dne. Každé sklíčko obarvené protilátkou VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) bylo párováno se sklíčkem barveným negativní reagenční kontrolou ze stejného případu. Všechny sady sklíček byly randomizovány jako pozitivní nebo negativní jedním patologem se zaslepenou diagnózou případu.

Rovněž byla vyhodnocována mezilehlá preciznost mezi dny na 10 vzorcích kolorektálního karcinomu (5 pozitivních a 5 negativních pro klinický stav BRAF V600E). Replikáty sklíček z každého ze vzorků karcinomu CRC byly barveny protilátkou VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) na přístroji BenchMark ULTRA v každém z 5 na sebe nenavazujících dní. Navíc bylo jedno sklíčko z každého případu obarveno negativní reagenční kontrolou. Každé sklíčko obarvené protilátkou VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) bylo párováno se sklíčkem barveným negativní reagenční kontrolou ze stejného případu. Všechny sady sklíček byly randomizovány jako pozitivní nebo negativní jedním patologem se zaslepenou diagnózou případu.

Žádné ze sklíček obarvených negativní reagenční kontrolou nevykazovalo specifické barvení a barvení pozadí bylo ≤ 0.5 . Použití sdružených dat ze všech možných párování ve studiích opakovatelnosti v rámci cyklu a mezilehlé preciznosti mezi dny prokázalo 100% pozitivní procentuální shodu (PPA), 100% negativní procentuální shodu (NPA) a 100% celkovou procentuální shodu (OPA). Souhm výsledků je uvedeno v tabulce 5.

Tab. 5. Opakovatelnost v rámci cyklu a mezilehlá preciznost mezi dny na přístroji BenchMark ULTRA u protilátky VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) měřená jako klinický stav (pozitivní/negativní).

Opakovatelnost/ Preciznost	Klinický stav	Shoda			
		Typ	n/N	%	95% CI
Opakovatelnost v rámci cyklu	Pozitivní	PPA	25/25	100.0	(86.7, 100.0)
	Negativní	NPA	25/25	100.0	(86.7, 100.0)
	Celkem	OPA	50/50	100.0	(92.9, 100.0)
Mezilehlá preciznost mezi dny	Pozitivní	PPA	50/50	100.0	(92.9, 100.0)
	Negativní	NPA	50/50	100.0	(92.9, 100.0)
	Celkem	OPA	100/100	100.0	(96.3, 100.0)

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

Mezilehlá preciznost mezi přístroji

Mezilehlá preciznost mezi přístroji přístroje BenchMark ULTRA pro protilátku VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) byla stanovována barvením replikátů sklíček 10 vzorků kolorektálního karcinomu (5 pozitivních a 5 negativních na klinický stav BRAF V600E) na 3 přístrojích BenchMark ULTRA s protilátkou VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) s použitím detekční soupravy OptiView DAB IHC Detection Kit. Navíc bylo jedno sklíčko z každého případu obarveno negativní reagenční kontrolou.

Každé sklíčko obarvené protilátkou VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) bylo párováno se sklíčkem barveným negativní reagenční kontrolou ze stejného případu. Všechny sady sklíček byly randomizovány a pak vyhodnocovány z hlediska klinického stavu

(pozitivní/negativní) jedním patologem se zaslepenou diagnózou případu. Žádné ze sklíček obarvených s negativní reagenční kontrolou nevykazovalo specifické barvení a barvení pozadí bylo ≤ 0.5 .

Pro určení mezilehlé preciznosti mezi přístroji BenchMark ULTRA byla prováděna párová srovnání klinického stavu sklíček pro každý vzorek a prokázala 100% PPA, NPA a OPA. Souhrn výsledků uvádí Tab. 6.

Tab. 6. Mezilehlá preciznost mezi přístroji BenchMark ULTRA pro protilátku VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) měřená jako klinický stav (pozitivní/negativní).

Preciznost	Klinický stav	Shoda			
		Typ	n/N	%	95% CI
Mezilehlá preciznost mezi přístroji	Pozitivní	PPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	Negativní	NPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	Celkem	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)

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

Navíc byla mezilehlá preciznost mezi přístroji pro protilátku VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) stanovována barvením replikátů sklíček 6 vzorků (2 negativních na CRC, 2 pozitivních na CRC a 2 pozitivních na karcinom štítné žlázy pro klinický stav BRAF V600E) na 3 přístrojích BenchMark XT a 3 přístrojích BenchMark GX pro protilátku VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) s použitím detekční soupravy OptiView DAB IHC Detection Kit.

Bylo provedeno 15 pozorování na případ při spojení 3 přístrojů; medián pro každý případ byl stanoven z těchto 15 pozorování. Jednotlivá pozorování stejného případu byla považována za shodná s mediánem intenzity signálu případu, pokud byla v rámci 0.5násobku intenzity signálu. Pro určení mezilehlé preciznosti mezi přístroji pro přístroje BenchMark XT a BenchMark GX byla prováděna párová srovnání skóre intenzity barvení sklíček pro každý vzorek a prokázala 98.9% OPA mezi 3 přístroji BenchMark XT a 100% OPA mezi 3 přístroji BenchMark GX. Žádné ze sklíček obarvených negativní reagenční kontrolou nevykazovalo specifické barvení a barvení pozadí bylo ≤ 0.5 na obou přístrojích BenchMark XT i BenchMark GX.

Shoda přístrojů BenchMark IHC/ISH

Shoda mezi přístroji BenchMark IHC/ISH pro protilátku VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) byla stanovována barvením vzorků kolorektálního karcinomu, karcinomu štítné žlázy a melanomu protilátkou VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) s použitím detekční soupravy OptiView DAB IHC Detection Kit. Všechna sklíčka byla vyhodnocována na klinický stav (pozitivní/negativní) jedním patologem.

Párová srovnání klinického stavu pro celkem 228 vzorků (177 kolorektálních karcinomů, 27 karcinomů štítné žlázy a 24 melanomů) byla provedena mezi přístroji BenchMark GX oproti BenchMark ULTRA a BenchMark XT oproti BenchMark ULTRA. Přístroje BenchMark GX oproti BenchMark ULTRA vykazovaly průměrnou 98.0% pozitivní shodu (APA), 99.0% průměrnou negativní shodu (ANA) 98.7% OPA. Přístroje BenchMark XT oproti BenchMark ULTRA vykazovaly 96.6% APA, 98.4% ANA a 97.8% OPA. Pro srovnání přístroje BenchMark GX s přístrojem BenchMark XT byla provedena párová srovnání celkem 230 vzorků (179 karcinomů CRC, 27 karcinomů štítné žlázy a 24 melanomů) mezi platformami. Přístroje BenchMark GX oproti BenchMark XT vykazovaly 98.7% APA, 99.4% ANA a 99.1% OPA.

Studie preciznosti hodnotitele

Preciznost u jednoho hodnotitele a mezi hodnotiteli byla vyhodnocována na 20 vzorcích kolorektálního karcinomu (10 případů pozitivních na mutaci BRAF V600E a 10 případů negativních na mutaci BRAF V600E) barvených protilátkou VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) s použitím detekční soupravy OptiView DAB IHC Detection Kit na přístroji BenchMark ULTRA. Každé sklíčko barvené protilátkou VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) bylo párováno se sklíčkem barveným H&E a sklíčkem barveným negativní reagenční kontrolou ze stejného případu.

Všechny sady sklíček byly randomizovány a vyhodnocovány 3 patologi na klinický stav BRAF V600E pozitivní nebo negativní. Patologové nebyli obeznámeni s diagnózou případů. Po dvoutýdenním eliminačním období byla sklíčka barvená protilátkou VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) znovu randomizována pro druhé vyhodnocení klinického stavu

BRAF V600E každým ze 3 patologů. Žádné ze sklíček obarvených s negativní reagenční kontrolou nevykazovalo specifické barvení a barvení pozadí bylo ≤ 0.5 .

Preciznost hodnotitele srovnávala počáteční a konečné hodnocení sklíčka jedním patologem a srovnání 20 sklíček s kolorektálním karcinomem na patologa. Srovnání od 3 patologů byla shrnuta a vykazovala 100% APA, 100% ANA a 100% OPA pro preciznost v rámci hodnotitele. Souhrn výsledků uvádí Tab. 7.

Preciznost mezi hodnotiteli srovnávala všechna hodnocení sklíček (20 kolorektálních karcinomů $\times$ 2 hodnocení/případ $\times$ 3 patologové = 120 hodnocení sklíček) na modální stav případu pro každý případ kolorektálního karcinomu. Výsledky vykazují 100% PPA, NPA a OPA pro preciznost mezi hodnotiteli. Souhrn výsledků uvádí Tab. 7.

Tab. 7. Preciznost u jednoho hodnotitele a mezi hodnotiteli pro protilátku VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) na případech karcinomu CRC dle měření klinického stavu BRAF V600E (pozitivní/negativní).

Preciznost	Klinický stav	Shoda			
		Typ	n/N	%	95% CI
U jednoho hodnotitele	Pozitivní	APA	60/60	100.0	(93.9, 100.0)
	Negativní	ANA	60/60	100.0	(93.9, 100.0)
	Celkem	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)
Mezi hodnotiteli	Pozitivní	PPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)
	Negativní	NPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)
	Celkem	OPA	120/120	100.0	(96.9, 100.0)

Poznámka: Pro preciznost u jednoho hodnotitele byly vypočítány intervaly spolehlivosti 95% CI pro APA a ANA, a to s použitím metody podle Cloppera–Pearsona; 95% CI pro OPA byl vypočítán metodou percentilový bootstrap. Pro preciznost mezi hodnotiteli byly 95% intervaly spolehlivosti CI vypočítány metodou Wilsonova skóre.

Preciznost mezi šaržemi

Preciznost mezi šaržemi protilátky VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) byla stanovena testováním 3 výrobních šarží protilátky VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), a to v triplicátech sklíček 10 případů karcinomu CRC (5 pozitivních a 5 negativních na mutaci BRAF V600E) na přístroji BenchMark ULTRA s použitím detekční soupravy OptiView DAB IHC Detection Kit.

Každé sklíčko obarvené protilátkou VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) bylo párováno se sklíčkem barveným negativní reagenční kontrolou ze stejného případu. Všechny sady sklíček byly randomizovány a hodnoceny jedním patologem se zaslepenou diagnózou případu a číslem šarže protilátky VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). Žádné ze sklíček obarvených s negativní reagenční kontrolou nevykazovalo specifické barvení a barvení pozadí bylo ≤ 0.5 .

Pro stanovení preciznosti mezi šaržemi protilátky VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) byla hodnocení klinického stavu BRAF V600E z hodnocení každého sklíčka srovnávána se stavem modálního případu pro daný případ. Hodnota OPA, PPA a NPA pro šarže protilátky VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) byla 100 % a bylo tím prokázáno, že barvení protilátkou VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) je reprodukovatelné napříč šaržemi protilátky.

Shrnutí výsledků pro preciznost mezi šaržemi protilátky VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) uvádí Tab. 8.

Tab. 8. Preciznost mezi šaržemi pro protilátku VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) dle měření klinického stavu (pozitivní/negativní).

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

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

Studie reprodukovatelnosti mezi laboratořemi

Byla provedena studie reprodukovatelnosti mezi laboratořemi pro test VENTANA MMR IHC Panel k prokázání reprodukovatelnosti každého testu VENTANA MMR IHC Panel ke stanovení klinického stavu. Do studie bylo zařazeno 6 vzorků tkáně kolorektálního karcinomu (3 intaktní a 3 případy ztráty) pro každý protein MMR a 16 vzorků tkáně kolorektálního karcinomu (8 pozitivních a 8 negativních) pro cyklus BRAF V600E na 3 přístrojích BenchMark ULTRA v každém z 5 na sebe nenavazujících dnů v průběhu 21 dní ve třech externích laboratořích. Každé skříčko barvené protilátkou bylo párováno se skříčkem barveným H&E a negativní reagenční kontrolou ze stejného případu. Všechny sady skříček byly randomizovány a vyhodnoceny celkem 6 hodnotiteli (2 hodnotitelé na pracoviště), pro které byl zaslepen klinický stav MMR studované sady. Pro každý ze 40 případů ve studii se uskutečnilo 30 pozorování ve všech dnech, na všech pracovištích a všemi hodnotiteli. Referenční stav modálního případu byl pro každý případ odvozen na základě nejčastější pozorovaného stavu ze 30 pozorování. Studie obsahovala celkem 1200 pozorování pro všech pět proteinů. Pro všechny hodnotitelné případy byla míra přijatelnosti pro morfologii a pozadí v této studii 100 %. Statistiku souhrnné shody (všech pět proteinů) mezi referenčním stavem modálního případu a individuálním pozorováním uvádí Tab. 9.

Tab. 9. Shoda mezi testem VENTANA MMR IHC Panel a referenčním stavem modálního případu.

Reprodukovatelnost mezi laboratořemi	Klinický stav	Shoda			
		Typ	n/N	%	95% CI
Všechny proteiny	Intaktní/pozitivní	PPA	598/600	99.8	(98.7, 100.0)
	Ztráta/negativní	NPA	593/600	98.9	(97.4, 99.5)
	Celkem	OPA	1191/1200	99.4	(98.6, 99.7)

Poznámka: Klinický stav je definovaný jako intaktní nebo ztráta pro expresi proteinů MMR a jako pozitivní nebo negativní na protein BRAF V600E. 95% intervaly spolehlivosti (CI) byly vypočítány s použitím zobecněného lineárního smíšeného modelu (GLMM).

Navíc byla pro protilátku VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) provedena párová srovnání mezi pracovišti, mezi dny a mezi hodnotiteli. Pro BRAF V600E obsahoval tento studovaný soubor celkem 480 pozorování. Souhrn výsledků uvádí Tab. 10. Tato data indikují reprodukovatelnost testu v 5 dnech, na 3 pracovištích a pro 6 hodnotitelů.

Tab. 10. Reprodukovatelnost mezi laboratořemi míry shody párů pro protilátku VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) měřená jako klinický stav (pozitivní nebo negativní).

Reprodukovatelnost mezi laboratořemi		Shoda			
		Typ	n/N	%	95% CI
Mezi pracovišti (3 pracoviště)		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)
Mezi dny (5 na sebe nenavazujících dnů)	Pracoviště 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)
	Pracoviště 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)
	Pracoviště 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)
		APA	242/243	99.6	(98.8, 100.0)

Reprodukovatelnost mezi laboratořemi	Shoda			
	Typ	n/N	%	95% CI
Mezi hodnotiteli (2 patologové na pracoviště)	ANA	236/237	99.6	(98.7, 100.0)
	OPA	239/240	99.6	(98.8, 100.0)

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

Funkční charakteristiky na přístroji BenchMark ULTRA PLUS

Opakovatelnost v rámci jednoho dne a preciznost mezi dny

Opakovatelnost v rámci jednoho dne (v rámci cyklu) byla vyhodnocována na 10 vzorcích karcinomu CRC (5 pozitivních a 5 negativních pro klinický stav BRAF V600E). Pět replikátů skříček z každého ze vzorků karcinomu CRC bylo obarveno protilátkou VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) na jednom přístroji BenchMark ULTRA PLUS v průběhu jednoho dne. Každé skříčko obarvené protilátkou VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) bylo párováno se skříčkem barveným negativní reagenční kontrolou ze stejného případu. Všechny páry skříček byly randomizovány jako pozitivní nebo negativní jedním patologem se zaslepenou diagnózou případu.

Rovněž byla vyhodnocována mezilehlá preciznost mezi (jednotlivými) dny na 10 vzorcích karcinomu CRC (5 pozitivních a 5 negativních pro klinický stav BRAF V600E). Replikáty skříček z každého ze vzorků karcinomu CRC byly obarveny protilátkou VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) na přístroji BenchMark ULTRA PLUS v každém z 5 na sebe nenavazujících dnů. Navíc bylo jedno skříčko z každého případu obarveno negativní reagenční kontrolou. Každé skříčko obarvené protilátkou VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) bylo párováno se skříčkem barveným negativní reagenční kontrolou ze stejného případu. Všechny páry skříček byly randomizovány jako pozitivní nebo negativní jedním patologem se zaslepenou diagnózou případu.

Žádné ze skříček obarvených s negativní reagenční kontrolou nevykazovalo specifické barvení a barvení pozadí bylo ≤ 0.5 . Použití sdružených dat ze všech možných párování ve studiích opakovatelnosti v rámci jednoho dne a preciznosti mezi dny prokázalo 100% pozitivní procentuální shodu (PPA), 100% negativní procentuální shodu (NPA) a 100% celkovou procentuální shodu (OPA). Shrnutí výsledků uvádí tabulka 11.

Tab. 11. Opakovatelnost v rámci jednoho dne a preciznost mezi dny na přístroji BenchMark ULTRA PLUS u protilátky VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) měřená jako klinický stav (pozitivní/negativní).

Opakovatelnost/ Preciznost	Klinický stav	Shoda			
		Typ	n/N	%	95% CI
Opakovatelnost v rámci jednoho dne	Pozitivní	PPA	25/25	100.0	(86.7, 100.0)
	Negativní	NPA	25/25	100.0	(86.7, 100.0)
	Celkem	OPA	50/50	100.0	(92.9, 100.0)
Preciznost mezi dny	Pozitivní	PPA	50/50	100.0	(92.9, 100.0)
	Negativní	NPA	48/48	100.0	(92.6, 100.0)
	Celkem	OPA	98/98	100.0	(96.2, 100.0)

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

Preciznost mezi jednotlivými nástroji BenchMark ULTRA PLUS

Mezilehlá preciznost mezi jednotlivými nástroji (mezi přístroji) u přístroje BenchMark ULTRA PLUS pro protilátku VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) byla stanovována barvením replikátů skříček 10 vzorků karcinomu CRC (5 pozitivních a 5 negativních na klinický stav BRAF V600E) na 3 přístrojích BenchMark ULTRA PLUS s protilátkou VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) s použitím detekční soupravy OptiView DAB IHC Detection Kit. Navíc bylo jedno skříčko z každého případu obarveno negativní reagenční kontrolou.

Každé skříčko obarvené protilátkou VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) bylo párováno se skříčkem barveným negativní reagenční kontrolou ze stejného případu. Všechny páry

sklíček byly randomizovány a pak vyhodnocovány z hlediska klinického stavu (pozitivní/negativní) jedním patologem se zaslepenou diagnózou případu. Žádné ze sklíček obarvených s negativní reagenční kontrolou nevykazovalo specifické barvení a barvení pozadí bylo ≤ 0.5 .

Pro určení preciznosti mezi jednotlivými nástroji BenchMark ULTRA PLUS byla prováděna párová srovnání klinického stavu sklíček pro každý vzorek mezi jednotlivými přístroji a prokázala 100% PPA, NPA a OPA. Souhrn výsledků je uveden v tabulce 12.

Tab. 12. Preciznost mezi jednotlivými nástroji BenchMark ULTRA PLUS pro protilátku VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) měřená jako klinický stav (pozitivní/negativní)

Preciznost	Klinický stav	Shoda			
		Typ	n/N	%	95% CI
Mezi jednotlivými nástroji	Pozitivní	PPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	Negativní	NPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	Celkem	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)

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

Shoda mezi platformami pro přístroje BenchMark ULTRA PLUS a BenchMark ULTRA

Byla provedena studie, která srovnávala účinnost barvení protilátky VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) pomocí detekční soupravy OptiView DAB IHC Detection Kit na přístroji BenchMark ULTRA PLUS oproti barvení na přístroji BenchMark ULTRA. Sto dvacet (120) případů tkáně kolorektálního karcinomu (14 pozitivních na BRAF V600E, 13 negativních na BRAF V600E, 93 neznámého stavu MMR) bylo obarveno a obarvená sklíčka byla hodnocena patologem, který určil diagnostický stav. Celková procentuální shoda byla 98.3 %. Všechny tkáně obarvené protilátkou VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) měly přijatelnou morfolologii a barvení na pozadí. Shrnutí výsledků uvádí tabulka 13.

Tab. 13. Shoda pro protilátku VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) na přístroji BenchMark ULTRA PLUS ve srovnání s přístrojem BenchMark ULTRA měřená podle klinického stavu (pozitivní/negativní)

Mezi platformami	Shoda			
	Typ	n/N	%	95% CI
ULTRA k 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)

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

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

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

Pro studii byly sekvenční případy kolorektálního karcinomu barvené H&E vyhodnocovány z hlediska indikace řádné fixace a morfologie včetně přítomnosti buněčných prvků (nádorové buňky a buňky vnitřní kontroly). Každý případ byl vyhodnocován pro stanovení, zda vzorek obsahoval minimálně 50% nádorový obsah pro poskytnutí dostatečné reprezentace nádorových buněk ve vzorku, jak je doporučováno pro molekulární testování. Po prozkoumání bylo do studie zařazeno 105 sekvenčních případů splňujících tato kritéria. Navíc bylo do studie zařazeno 13 případů kolorektálního karcinomu vykazujících stav ztráta podle IHC, aby bylo zajištěno, že byl do studie zařazen každý

marker. Řezy všech případů ve studii byly barveny IHC metodou s použitím testu VENTANA MMR IHC Panel a patřičnými negativními reagenčními kontrolami. Další řezy byly podrobeny panelu sekvenování DNA tlustého střeva. Hypermetylace promotoru *MLH1* je jedním z mechanismů, který může vést ke ztrátě exprese proteinu *MLH1* a je spojen spíše se sporadickým kolorektálním karcinomem než s potenciální diagnózou Lynchova syndromu. Proto byly všechny případy ztráty *MLH1* identifikované metodou IHC ve studii testovány na hypermetylaci promotoru *MLH1*.

V konečném souboru studie 118 případů analýza zahrnovala PPA a NPA pro všechny sdružené markery (tj. všechna sdružená pozorování), kde molekulární testování fungovalo jako referenční stav pro srovnání IHC. Analýza zahrnovala srovnání stavu proteinu MMR (intaktní/ztráta) s molekulárním stavem definovaným jako normální (žádné patogenní mutace, negativní na hypermetylaci promotoru *MLH1* a BRAF divokého typu (žádná mutace *V600E*)) nebo abnormální (přítomnost patogenní(ch) mutace(i), pozitivní na hypermetylaci promotoru *MLH1* a/nebo pozitivní na mutaci BRAF *V600E*). Pro tuto studii je patogenní mutace v rámci nádoru definovaná jako mutace zárodečné linie nebo somatická mutace s predikovaným výsledkem ztráty exprese proteinu MMR. Bodové odhady byly 99.4% PPA, 93.5% NPA a 98.8% OPA, jak uvádí Tab. 14.

Rovněž byla provedena sdružená analýza srovnávající čtyři markery IHC MMR (bez protilátky VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) s výsledky molekulárního testování. Bodové odhady byly 99.3% PPA, 89.7% NPA a 98.5% OPA, jak shrnuje Tab. 15.

Další analýza srovnávala výsledky čtyř markerů IHC MMR s výsledky molekulárního testování pro geny MMR na úrovni případu pro zahrnutí stavu všech markerů a vytvoření výstupu dMMR/pMMR pro dvě metody. Tuto analýzu uvádí Tab. 16 a analýza vykazuje 97.4% OPA mezi oběma metodami.

V rámci studie byl rovněž porovnán stav MMR u IHC a stav MMR z molekulárního testování pro jednotlivé markery MMR. Hodnota OPA každého markeru MMR v porovnání s kombinovanými výsledky panelu pro sekvenování DNA z tlustého střeva a testováním hypermetylace promotoru *MLH1* byla 100.0 % pro protilátku VENTANA anti-*MLH1* (M1), 99.1 % pro protilátku VENTANA anti-*PMS2* (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody, 98.3 % pro protilátku VENTANA anti-*MSH2* (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody a 96.6 % pro protilátku VENTANA anti-*MSH6* (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody.

Rovněž byl srovnáván klinický stav BRAF V600E v kolorektálních karcinomech získaných IHC metodou s použitím protilátky VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) s výsledky stavu mutace BRAF, stanovenými sekvenováním DNA. Všechny výsledky PPA, NPA a OPA pro IHC testování s použitím protilátky VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) se sekvenováním DNA jako referenční metody byly 100 % (Tab. 17). Bylo provedeno další testování pro ověření schopnosti protilátky VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) dále stratifikovat případy CRC vykazující ztrátu exprese proteinu *MLH1*. Z 23 případů pozitivních na BRAF V600E vykazovalo 20 případů ztrátu proteinu *MLH1* dle IHC stanovení a bylo pozitivních na hypermetylaci promotoru *MLH1*. Tyto údaje jsou konzistentní s těsným spojením pozitivního stavu BRAF V600E se stavem hypermetylace promotoru *MLH1*. Zbývající tři případy byly pMMR (intaktní pro všechny proteiny MMR). Všechny vzorky pozitivní na BRAF V600E byly identifikovány jako sporadický kolorektální karcinom. Výsledky ověřily, že protilátka VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) správně identifikuje kolorektální karcinomy s mutací BRAF V600E. Údaje také podpořily použití protilátky VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) k rozlišení mezi sporadickým a pravděpodobným kolorektálním karcinomem s Lynchovým syndromem za nepřítomnosti exprese *MLH1*.

Tab. 14. Sdružená analýza pro studii testu VENTANA MMR IHC Panel mezi IHC metodou a molekulárním testováním.

Stav* (molekulární/IHC)	Shoda			
	Typ	n/N	%	95% CI
Normální/intaktní	PPA	523/526	99.4	(98.7, 100.0)
Abnormální/ztráta	NPA	58/62	93.5	(87.1, 98.6)
Celkem	OPA	581/588	98.8	(98.0, 99.7)

* Pro IHC je stav MMR intaktní nebo ztráta pro expresi proteinu. Pro tuto analýzu byly případy negativní na BRAF V600E zařazeny do kategorie intaktní a pozitivní případy do kategorie ztráta. Molekulární testování indikuje absenci (normální) nebo přítomnost (abnormální) potenciálních patogenních mutací nebo hypermetylace promotoru *MLH1*. 95% intervaly spolehlivosti (CI) byly vypočteny pomocí metody percentilový bootstrap.

Tab. 15. Sdružená analýza shody čtyř markerů IHC MMR (bez protilátky VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) mezi IHC a molekulárním testováním.

Stav* (molekulární/IHC)	Shoda			
	Typ	n/N	%	95% CI
Normální/intaktní	PPA	428/431	99.3	(98.4, 100.0)
Abnormální/ztráta	NPA	35/39	89.7	(79.4, 97.7)
Celkem	OPA	463/470	98.5	(97.3, 99.6)

* Pro IHC je stav intaktní nebo ztráta pro expresi proteinu. Molekulární testování indikuje absenci (normální) nebo přítomnost (abnormální) potenciálních patogenních mutací nebo hypermetylace promotoru *MLH1*. 95% intervaly spolehlivosti (CI) byly vypočteny pomocí metody percentilový bootstrap.

Tab. 16. Shoda mezi výsledky čtyř markerů MMR dle IHC a molekulárním testováním stavu MMR (dMMR/pMMR).

Stav MMR*	Shoda			
	Typ	n/N	%	95% CI
pMMR	PPA	79/80	98.8	(93.3, 99.8)
dMMR	NPA	35/37	94.6	(82.3, 98.5)
Celkem	OPA	114/117	97.4	(92.7, 99.1)

* Pro IHC je stav pMMR pro případ reprezentován intaktním stavem pro všechny proteiny MMR, zatímco stav dMMR je reprezentován ztrátou jednoho nebo více proteinů MMR. Pro molekulární testování je stav pMMR reprezentován absencí patogenních mutací nebo hypermetylace promotoru *MLH1*, zatímco stav dMMR je reprezentován přítomností patogenních mutací nebo hypermetylace promotoru *MLH1*. 95% intervaly spolehlivosti (CI) byly vypočítány metodou Wilsonova skóre.

Tab. 17. Shoda mezi IHC s použitím protilátky VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) a molekulárním testováním.

Stav BRAF V600E (molekulární/IHC)	Shoda			
	Typ	n/N	%	95% CI
Pozitivní/abnormální	PPA	23/23	100.0	(85.7, 100.0)
Negativní/normální	NPA	95/95	100.0	(96.1, 100.0)
Celkem	OPA	118/118	100.0	(96.8, 100.0)

Stav pro BRAF V600E byl definován jako pozitivní nebo negativní výsledky IHC a abnormální (přítomnost mutace V600E) nebo normální (*BRAF* divokého typu) výsledky molekulárního testování. 95% intervaly spolehlivosti (CI) byly vypočítány metodou Wilsonova skóre.

LITERATURA

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. 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.
16. Vakiani E, Solit DB. KRAS and BRAF: drug targets and predictive biomarkers. J Pathol. 2011;223(2):219-229.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Tiaci 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.
21. Giardiello FM, Allen JI, Axilbund JE, Bolland 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.
22. 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.

23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. Shia J. Evolving approach and clinical significance of detecting DNA mismatch repair deficiency in colorectal carcinoma. *Semin Diagn Pathol*. 2015;32(5):352-361.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. Carson FL, Hladik C, Cappellano CH, Pathology ASfC. *Histotechnology: A Self-Instructional Text*: American Society for Clinical Pathology; 2015.
36. Roche PC, Hsi ED, Firer BL. *Immunohistochemistry: Principles and Advances. Manual of Molecular and Clinical Laboratory Immunology, 7th Edition*: American Society of Microbiology; 2006.
37. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). *Fed. Register*.
38. 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.
39. Rabinovitch A. The College of American Pathologists laboratory accreditation program. *Accreditation and Quality Assurance*. 2002;7(11):473-476.
40. 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.

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

Souhm bezpečnosti a funkčnosti naleznete zde:

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

Symboly

Společnost Ventana používá následující symboly a znaky nad rámec uvedený v normě ISO 15223-1 (pro USA: další informace naleznete na internetových stránkách elabdoc.roche.com/symbols):



Číslo položky Global Trade



Jedinečná identifikace prostředku

HISTORIE REVIZÍ

Rev.	Aktualizace
F	Aktualizace oddílu Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky ve formě dodatečných čísel P/N pro protilátky 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 a VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody.

DUŠEVNÍ VLASTNICTVÍ

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

© 2023 Ventana Medical Systems, Inc.

KONTAKTNÍ INFORMACE



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

www.roche.com

