

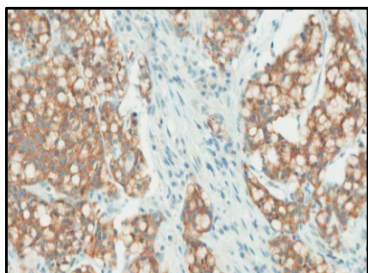
VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody

Skirtas naudojimui su „VENTANA MMR IHC Panel“

REF 760-5095

08033706001

IVD  50



1. pav. Neoplastinių ląstelių gaubtinės žarnos vėžio audinyje dažymas „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnu.

PASKIRTIS

„VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody“ („VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnas) skirtas BRAF V600E baltymo kokybiškam aptikimui formaline fiksuotuose, parafine įterptuose audinių pjūviuose. „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnas yra paruoštas naudoti „BenchMark IHC/ISH“ prietaisuose su „OptiView DAB IHC Detection Kit“ ir pagalbiniams reagentais. „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnas yra „VENTANA MMR IHC Panel“, kurį sudaro „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“ ir „VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody“, dalis. „VENTANA MMR IHC Panel“ skirtas neatitiktimų taisymo baltymo trūkumui aptikti kaip testas pacientams, kuriems diagnozuotas gaubtinės žarnos vėžys (GŽV), asmenims, kuriems yra rizika susirgti Lynch sindromu, ir, esant BRAF V600E būklei, kaip pagalbini priemonė atskirti sporadinį ir tikėtiną Lynch sindromo GŽV, kai nėra MLH1 baltymo ekspresijos.

Naudojant šiuos gaminius gaunamą rezultatą turi vertinti kvalifikuotas patologas, atsižvelgdamas į histologinį tyrimą, susijusią klinikinę informaciją ir tinkamas kontrolines medžiagas.

Skirta in vitro diagnostikai (IVD).

SANTRAUKA IR PAAIŠKINIMAS

Gaubtinės žarnos vėžys yra trečias pagal dažnumą ir ketvirta pagal paplitimą mirties nuo vėžio priežastis pasaulyje.¹ Dauguma GŽV atvejų pasižymi chromosominiu nestabilumu, tačiau maždaug 15 % vėžio atvejų vystosi alternatyviu būdu, kuriam būdinga sutrikusi DNR nesutapimo atkūrimo (MMR) sistemos funkcija. Dėl MMR trūkumo navikams būdingas mikrosatelitinis nestabilumas (MSI), atsirandantis dėl MMR baltymų negebėjimo ištaisyti DNR replikacijos klaidų.

GŽV su MMR defektais žymimi kaip MMR (dMMR) navikai su defektais. Priešingai, GŽV, neturintys MMR defektų, žymimi kaip proficientiniai MMR (pMMR) navikai. Šis dMMR gaubtinės žarnos vėžys dažnai būna prastai diferencijuotas, dažnai vyrauja proksimaliojoje gaubtinės žarnos dalyje, pasižymi mucininiais, meduliniais arba signetinio žiedo histologiniais požymiais ir padidėjusiu naviką infiltruojančių limfocitų skaičiumi.^{2,3} Apskritai MMR trūkumą gali sukelti vieno iš MMR genų gemalo linijos mutacijos, kai dėl genetinių ar epigenetinių mechanizmų prarandamas atitinkamas sveikas alelis, somatinės alelių mutacijos arba *MLH1* geno epigenetinė inaktivacija dėl metilavimo.⁴

Keturi dažniausiai mutavę MMR genai yra *MLH1*, *PMS2*, *MSH2* ir *MSH6*. Sveikose ląstelėse baltymas *MLH1* sudaro kompleksą (heterodimerą) su baltymu *PMS2*, o baltymas *MSH2* sudaro kompleksą su baltymu *MSH6*.^{5,6} Atsiradus DNR neatitiktikams, *MSH2/MSH6* heterodimeras prisijungia prie nesutampantčios DNR, sukeldamas konformacijos pokyčius. *MLH1/PMS2* heterodimeras prisijungia prie DNR prijungto *MSH2/MSH6* komplekso, todėl pažeista DNR yra pataisoma ekscizijos būdu.

MLH1, *PMS2*, *MSH2* ir *MSH6* baltymai yra kliniškai svarbūs MMR baltymai, kuriuos koduoja genai, galintys mutuoti Lynch sindromu sergančiose šeimose.^{7,8} Šių mutacijų nešiotojams dėl DNR replikacijos klaidų kaupimosi besidauginančiose ląstelėse kyla didelė rizika per visą gyvenimą susirgti gaubtinės žarnos ir kitomis vėžio formomis. Lynch

sindromas sudaro 1-6 % visų GŽV atvejų. Šie navikai atsiranda paveldėjus autosominę dominuojančią vieno iš keturių MMR genų mutaciją, o daugumoje su Lynch sindromu susijusių GŽV atvejų prarandamas *MLH1*.^{5,9,10} Lynch sindromu sergantiems pacientams nustatyta daugiau kaip 300 skirtingų MMR šeimos baltymų mutacijų. Su Lynch sindromu susijusiam naviko fenotipui įprastai būdingas imunohistocheminis MMR baltymų, ypač *MLH1*, *PMS2*, *MSH2* ir *MSH6*, ekspresijos praradimas.¹⁰⁻¹³ Įrodyta, kad MMR IHC testas yra naudingas nustatant konkretų MMR geną, kuriame greičiausiai aptinkama gemalo linija arba somatinis pakitimas.¹⁴

BRAF genas yra 7q34 chromosomoje ir koduoja citoplazminę serino-treonino kinazę, kuri veikia mitogeno aktyvuotos baltymų kinazės (MAPK) signalų grandinėje. Onkogeninės *BRAF* geno mutacijos, visos esančios kinazės domene, esmingai aktyvuoja MAPK signalinį kelią, todėl padidėja ląstelių proliferacija ir atsparumas apoptozei. Dažniausia iš visų aktyvuojančių *BRAF* mutacijų (taškinė mutacija T1799A) sukelia valino (V) pakeitimą glutamo rūgštimi (E) aminorūgščių sekos 600 padėtyje ir yra aptinkama 12 % visų GŽV.^{15,16}

Kaip „VENTANA MMR IHC Panel“ dalis, „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnas padeda atskirti sporadinį ir tikėtiną Lynch sindromo GŽV, kai nėra *MLH1* baltymo ekspresijos.^{17,18} GŽV atveju *MLH1* baltymo praradimas dažnai yra *MLH1* aktyvatoriaus hipermetilavimo pasekmė ir rodo sporadinį pasireiškimą.¹⁹ *BRAF* V600E baltymo buvimas glaudžiai susijęs su *MLH1* aktyvatoriaus hipermetilavimu. Todėl teigiamas dažymo rezultatas naudojant „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūną rodo sporadinį GŽV. *BRAF* V600E mutacija aptinkama ne tik GŽV stratifikacijoje, bet ir maždaug 8 % visų kietųjų navikų, įskaitant 43 % melanomų, 39 % papilinių skydliaukės karcinomų, 12 % serozinių kiaušidžių karcinomų, 2 % plaučių vėžio ir kitų vėžio formų.¹⁶ Be to, *BRAF* V600E mutacija neseniai buvo aprašyta kaip plaukuotųjų ląstelių leukemijos molekulinis žymuo.²⁰

KLINIKINĖ REIKŠMĖ

Lynch sindromas buvo aprašytas XX-ojo amžiaus septintajame dešimtmetyje ir nustatytas ryšys tarp MMR funkcijos praradimo bei vėžio.²¹ MMR baltymų (*MLH1*, *PMS2*, *MSH2* arba *MSH6*) praradimas gali lemti MSI ir didesnę ne tik GŽV, bet ir skrandžio, smegenų, kasos, odos, endometriumo ir kiaušidžių vėžio riziką per visą gyvenimą. Pacientams, sergantiems Lynch sindromu, rizika susirgti GŽV yra 50–80 % per visą gyvenimą.^{5,22,23} Lynch sindromas išsiskiria iš kitų paveldimų vėžio sindromų, nes tiesioginis naviko audinio tyrimas padeda nustatyti pacientus, kuriems gresia rizika sirgti Lynch sindromu, ir informuoti apie vėlesnius gemalo linijos genetinius tyrimus. Lynch sindromu sergančioms šeimoms naudingi pažangūs vėžio patikros protokolai.

[vairiose gairėse, įskaitant Nacionalinio išsamaus vėžio tinklo („National Comprehensive Cancer Network“, NCCN) gaires, rekomenduojama visus GŽV tirti dėl Lynch sindromo, kad būtų galima nustatyti pacientus ir šeimas, kuriems bus naudingi tolesni genetiniai tyrimai ir konsultacijos.^{21,24-27} Naudojant „VENTANA MMR IHC Panel“, bus lengviau nustatyti MMR būklę GŽV, klasifikuojant juos kaip nepažeistus arba praradus MMR baltymo ekspresijos atžvilgiu. Visų keturių MMR baltymų aptikimas navike rodo sveiką arba nepažeistą MMR. *MLH1* arba *MSH2* ekspresijos praradimas beveik visada susijęs su jo heterodimerinio partnerio, atitinkamai *PMS2* arba *MSH6*, praradimu. Tačiau netekus *PMS2* arba *MSH6*, *MLH1* arba *MSH2* neišnyksta. *PMS2*, *MSH2* ir (arba) *MSH6* praradimas atitinka tikėtiną Lynch sindromą, todėl pacientai turi būti siunčiami papildomiems tyrimams ir konsultacijoms pagal klinikinę praktiką.

MLH1 baltymo praradimas gali rodyti sporadinį atvejį arba galimą Lynch sindromą. 15 % ar daugiau sporadinio GŽV atvejų *MLH1* baltymas prarandamas dėl *MLH1* aktyvatoriaus hipermetilavimo.^{5,28,29} Svarbu tai, kad *BRAF* V600E mutacija nustatoma maždaug dviejuose trečdaliuose navikų, kurių *MLH1* ekspresija prarandama dėl *MLH1* aktyvatoriaus hipermetilavimo. Priešingai, *BRAF* V600E mutacija labai retai aptinkama Lynch sindromo navikuose.²⁸ Todėl, jei „VENTANA anti-*MLH1* (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody“ („VENTANA anti-*MLH1* (M1)“ antikūno) tyrimo rezultatas rodo *MLH1* baltymo praradimą, „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnas gali stratifikuoti auglį kaip sporadinį arba galimą Lynch sindromą.^{5,30} GŽV atveju *MLH1* baltymo praradimas ir teigiamas *BRAF* V600E statusas aiškiai rodo, kad navikas atsirado sporadiškai, todėl Lynch sindromas praktiškai eliminuojamas kaip pagrindinė piktybinio naviko priežastis.^{21,31} Kai *MLH1* baltymo praradimas yra kartu su neigiama *BRAF* V600E būkle, *MLH1* praradimas atitinka didelę Lynch sindromo tikimybę.³²

PROCEDŪROS PRINCIPAS

„VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ yra pelės monokloninis antikūnas (klonas VE1), pagamintas prieš sintetinį peptidą, atspindintį mutavusios *BRAF* aminorūgščių seką nuo

596 iki 606 aminorūgšties (GLATEKSRWSG). Šiam mutacijai specifiniam antikūnui būdingas citoplazminis dažymo tipas. Šis antikūnas atskiria BRAF baltymu V600E mutaciją nuo laukinio tipo BRAF baltymo ir kitų mutavusių BRAF baltymų.^{33,34}

Atliekant nesutapimų taisymo (MMR) IHC tyrimus dėl galimo Lynch sindromo, BRAF V600E mutacijos nustatymas MLH1 praradimo atvejais rodo sporadinį gaubtinės žarnos vėžį (GŽV).³²

„VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnas specifiskai jungiasi su BRAF V600E mutavusiu baltymu formaline fiksuotuose, parafine įterptuose (FFPE) audinių pjūviuose. Antikūną galima lokalizuoti naudojant haptenuotą antrinį antikūną, paskui – multimerinį antihaptenuotą ir HRP konjugatą („OptiView DAB IHC Detection Kit“, kat. Nr. 760-700 / 06396500001). Specifinis antikūno ir fermento kompleksas vizualizuojamas stebint fermentinės reakcijos produkto nuosėdas. Kiekvienas etapas inkubuojamas tiksliai nustatytą laiką ir konkrečioje temperatūroje. Kiekvieno inkubacijos etapo pabaigoje prietaisas išplauna pjūvius, kad sustabdytų reakciją ir pašalintų nesurištą medžiagą, kurios trukdytų norimai reakcijai vėlesniuose etapuose. Jame taip pat naudojamas „ULTRA LCS (Predilute)“ (kat. Nr. 650-210 / 05424534001) arba „LCS (Predilute)“ (kat. Nr. 650-010 / 05264839001), kuris sumažina vandeninių reagentų garavimą iš mėginio objekcinio stiklėlio.

RINKINYJE ESANTI MEDŽIAGA

„VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūno sudėtyje yra pakankamai reagento 50-čiai tyrimų.

Viename 5 mL „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūno dozatoriuje yra maždaug 60 µg pelės monokloninio antikūno.

Antikūnas atskiedžiamas fosfatiniu buferiniu tirpalu (pH 7.3) su nešančiuoju baltymu „Brij“ 35 ir 0.05 % „ProClin 300“ (konservantu).

Specifinio antikūno koncentracija yra maždaug 12 µg/mL.

„VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnas yra pelės monokloninis antikūnas, gaminamas kaip išgrynintas ląstelių kultūros supernatantas.

Prireikus išsamių procedūros principo, medžiagos ir metodų, mėginių paėmimo ir paruošimo analizei, kokybės kontrolės procedūrų, trikčių diagnostikos, rezultatų interpretavimo ir apribojimų aprašymų, žr. atitinkamą VENTANA aptikimo rinkinio metodo lapą.

REIKALINGOS, TAČIAU Į RINKINĮ NEĮJEINANČIOS MEDŽIAGOS

Dažymo reagentai, tokie kaip VENTANA aptikimo rinkiniai ir pagalbiniai komponentai, įskaitant neigiamą ir teigiamą audinio kontrolinius stiklėlius, į rinkinį neįeina.

Kai kurie metodo lape išvardyti gaminiai gali būti neprieinami visuose regionuose. Kreipkitės į vietinį pagalbos tarnybos atstovą.

Toliau išvardytos medžiagos ir reagentai neįeina į rinkinį, tačiau gali būti reikalingi dažymui atlikti:

1. Rekomenduojamas kontrolinis audinys
2. Mikroskopo objekciniai stiklėliai, teigiamo krūvio
3. „VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody“ (kat. Nr. 730-7159 / 09605584001 arba kat. Nr. 760-5091 / 08033668001)
4. „VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody“ (kat. Nr. 730-7158 / 09607161001 arba kat. Nr. 760-5094 / 08033692001)
5. „VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody“ (kat. Nr. 730-7160 / 09607137001 arba kat. Nr. 760-5093 / 08033684001)
6. „VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody“ (kat. Nr. 730-7161 / 09606769001 arba kat. Nr. 760-5092 / 08033676001)
7. „Negative Control (Monoclonal)“ (kat. Nr. 760-2014 / 05266670001)
8. „Rabbit Monoclonal Negative Control Ig“ (kat. Nr. 790-4795 / 06683380001)
9. „OptiView DAB IHC Detection Kit“ (kat. Nr. 760-700 / 06396500001)
10. Tik „VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody“, „OptiView Amplification Kit“ (kat. Nr. 760-099 / 06396518001 (50 tyrimų) arba kat. Nr. 860-099 / 06718663001 (250 tyrimų))
11. „EZ Prep Concentrate (10X)“ (kat. Nr. 950-102 / 05279771001)
12. „Reaction Buffer Concentrate (10X)“ (kat. Nr. 950-300 / 05353955001)
13. „ULTRA LCS (Predilute)“ (kat. Nr. 650-210 / 05424534001)
14. „LCS (Predilute)“ (kat. Nr. 650-010 / 05264839001)
15. „ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1)“ (kat. Nr. 950-224 / 05424569001)
16. „Cell Conditioning Solution (CC1)“ (kat. Nr. 950-124 / 05279801001)
17. „Hematoxylin II“ (kat. Nr. 790-2208 / 05277965001)

18. „Bluing Reagent“ (kat. Nr. 760-2037 / 05266769001)
19. Nuolatinė paruošimo terpė
20. Dengiamasis stiklėlis
21. Automatinis dengiamųjų stiklėlių uždėjimo įtaisas
22. Bendrosios paskirties laboratorinė įranga
23. „BenchMark IHC/ISH“ prietaisas

LAIKYMAS IR STABILUMAS

Po pristatymo ir nenaudojant, gaminį reikia laikyti 2–8 °C temperatūroje. Neužšaldyti.

Norėdami užtikrinti tinkamą reagento tiekimą ir antikūno stabilumą, pakeiskite dozatoriaus kamštelį po kiekvieno naudojimo ir nedelsdami įdėkite dozatorių į šaldytuvą vertikaliaje padėtyje.

Kiekvienas antikūno dozatorius turi galiojimo terminą. Tinkamai laikomas reagentas yra stabilus iki etiketėje nurodytos dienos. Nenaudokite reagento, jei jo galiojimo terminas yra pasibaigęs.

MĖGINIO PARUOŠIMAS

Įprastai apdorotus FFPE audinius tinka naudoti su šiuo pirminiu antikūnu, jei jie naudojami su „OptiView DAB IHC Detection Kit“ ir „BenchMark IHC/ISH“ prietaisais.

Rekomenduojamas audinio fiksatyvas yra 10 % neutralus buferinis formalinas.³⁵

„VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnui audinius rekomenduojama fiksuoti per 2 valandas po išpjovimo 10 % neutraliame buferiniame formalino tirpale (NBF) mažiausiai 12 valandų, remiantis ksenograftų modeliais, gautais iš A2058 (melanomos) ir LS411N (GŽV) žmogaus ląstelių linijų, kurių BRAF V600E ekspresija teigiama. Tačiau fiksavimo laikas iki 72 valandų 10 % NBF davė lygiavertius BRAF V600E dažymo rezultatus. Priimtinas „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnų dažymas taip pat buvo pasiektas fiksuojant „Zinc“ formalino fiksatoriuje 12–72 valandas.

Su „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnu nerekomenduojama naudoti alkoholio formalino (AFA), 95 % etanolio, Z-5 ir PREFER fiksatorių. Alkoholio formaline fiksuoti ksenograftų audiniai nerodo jokio arba rodo kintamą dažymą.

Naudojamas fiksatyvo kiekis turi būti 15–20 kartų didesnis už audinio tūrį. Fiksatyvas per 24 valandas neprasiskverbs daugiau nei 2–3 mm į kietąjį audinį arba 5 mm į akytą audinį. Fiksavimą galima atlikti kambario temperatūroje (15–25 °C).^{35,36}

Audiniai turi būti padalyti į 4 µm storio pjūvius ir uždėti ant teigiamo krūvio objektnių stiklėlių. Objekciniai stiklėliai turėtų būti nudažyti nedelsiant, nes audinių pjūvių antigeniškumas laikui bėgant gali sumažėti. Tačiau 5 ± 3 °C arba 30 ± 5 °C temperatūroje iki 8 savaičių laikytuose nedažytuose GŽV audinių objektniuose stiklėliuose „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūno dėmių intensyvumas buvo panašus, palyginti su audinių mėginiais, paruoštais iš to paties bloko ir nudažytais „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnu 1 dieną. Norėdami gauti daugiau informacijos, paprašykite „Roche“ atstovo pateikti „Recommended Slide Storage and Handling“ dokumento kopiją.

ĮSPĖJIMAI IR ATSARGUMO PRIEMONĖS

1. Skirta in vitro diagnostikai (IVD).
2. Gali naudoti tik profesionalai.
3. **ĮSPĖJIMAS.** Jungtinėse Amerikos Valstijose pagal federalinius įstatymus šį prietaisą galima parduoti tik gydytojui arba jo užsakymu. („Rx Only“)
4. Neviršykite nurodyto tyrimų skaičiaus.
5. „ProClin 300“ tirpalas šiame reagentu naudojamas kaip konservantas. Jis klasifikuojamas kaip dirginamoji medžiaga ir patekęs ant odos gali sukelti padidėjusį odos jautrumą. Dirbdami su šiuo reagentu imkitės reikiamų atsargumo priemonių. Venkite reagento patekimo į akis, ant odos ir gleivinių. Dėvėkite apsauginius drabužius ir pirštines.
6. Teigiamo krūvio objekciniai stiklėliai gali būti jautrūs aplinkos poveikiui, dėl to dažymas gali būti netinkamas. Daugiau informacijos apie tai, kaip naudoti tokio tipo stiklėlius, klauskite „Roche“ atstovo.
7. Žmogaus ar gyvūninės kilmės medžiagos turi būti laikomos biologiškai kenksmingomis ir jas reikia šalinti taikant atitinkamas atsargumo priemones. Medžiagoms paveikus žmogaus organizmą, reikia vadovautis atsakingųjų institucijų pateiktomis sveikatos direktyvomis.^{37,38}
8. Venkite reagento patekimo į akis ir gleivines. Jei reagento pateko į jautrias vietas, plaukite dideliu kiekiu vandens.
9. Saugokite reagentus nuo užteršimo mikrobais, nes dėl jų gali būti gauti klaidingi rezultatai.

10. Prireikus daugiau informacijos apie šio gaminio naudojimą, žr. „BenchMark IHC/ISH“ prietaiso naudotojo vadovą ir visų reikiamų komponentų naudojimo instrukcijas, kurias galite rasti navifyportal.roche.com.
11. Dėl rekomenduojamų šalinimo metodų kreipkitės į vietas ir (arba) valstybės institucijas.
12. Gaminio saugos etiketės daugiausia paremtos ES GHS gairėmis. Saugos duomenų lapai pateikiami profesionaliems naudotojams paprašius.
13. Norėdami pranešti apie pavojingus incidentus, susijusius su šiuo gaminiu, susisiekite su vietiniu „Roche“ atstovu ir valstybės narės ar šalies, kurioje gyvena naudotojas, kompetentinga institucija.

Gaminyje gali būti komponentų, pagal reglamentą (EB) Nr. 1272/2008 klasifikuojamų taip:

1. Ient. Informacija apie pavojus.

Pavojus	Kodas	Frazė
	H317	Gali sukelti alerginę odos reakciją.
	P261	Neįkvėpkite rūko ar garų.
	P272	Užterštų darbo drabužių negalima išnešti iš darbo vietos.
	P280	Mūvėti apsaugines pirštines.
	P333 + P313	Jeigu sudirginama oda arba ją išberia: kreiptis į gydytoją.
	P362 + P364	Nusivilkite užterštus drabužius ir išskalbti prieš vėl apsivelkant.
	P501	Turinį / pakuotę šalinti patvirtintoje atliekų surinkimo įstaigoje.

Šiame gaminyje yra CAS Nr. 55965-84-9, reakcijos masės, kurią sudaro 5-chlor-2-metil-2H-izotiazol-3-onas ir 2-metil-2H-izotiazol-3-onas (3:1).

DAŽYMO PROCEDŪRA

„VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnas sukurtas naudoti „BenchMark IHC/ISH“ prietaisuose kartu su „OptiView DAB IHC Detection Kit“ ir pagalbiniais reagentais. Rekomenduojami dažymo protokolai nurodyti 2. Ient.

Kintančio antigeno išgavimo laiko ir temperatūros poveikis tyrimo patikimumui nežinomas. Todėl nukrypimas nuo rekomenduojamų antigeno išgavimo sąlygų, pateiktų nurodytame dažymo protokole, yra nežinomas ir gali anuliuoti tikėtinus rezultatus. Būtina naudoti ir dokumentuoti tinkamas kontrolines medžiagas. Naudotojai, kurie nesilaiko rekomenduojamų tyrimo procedūrų, turi prisiimti atsakomybę už paciento rezultatų interpretavimą.

Automatizuotos procedūros parametrus galima peržiūrėti, išspausdinti ir taisyti pagal prietaiso naudotojo vadove pateiktą procedūrą. Daugiau informacijos apie imunohistocheminio dažymo procedūras žr. „OptiView DAB IHC Detection Kit“ metodo lapę.

Prireikus daugiau informacijos apie tinkamą šio prietaiso naudojimą, žr. įtaisyto dozatoriaus metodo lapę, kuriam priskirtas dalies Nr. 760-5095.

2. Ient. Rekomenduojamas „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūno dažymo protokolas su „OptiView DAB IHC Detection Kit“ naudojant „BenchMark IHC/ISH“ prietaisus.

Procedūros tipas	Metodas		
	GX	XT	ULTRA arba ULTRA PLUS
Deparafinavimas	Pasirinkta	Pasirinkta	Pasirinkta
Ląstelių kondicionavimas (antigeno demaskavimas)	CC1 64 min.	CC1 64 min.	ULTRA CC1, 64 min., 100 °C
Priešpirminis peroksidazės inhibitorius	Pasirinkta	Pasirinkta	Pasirinkta

Procedūros tipas	Metodas		
	GX	XT	ULTRA arba ULTRA PLUS
Antikūnas (pirminis)	28 min., 37 °C	16 min., 37 °C	16 min., 36 °C
OptiView HQ Linker	8 min. (numatytasis)		
OptiView HRP Multimer	8 min. (numatytasis)		
Kontrastinis dažymas	„Hematoxylin II“, 4 min.		
Apdorojimas po kontrastinio dažymo	„Bluing“, 4 min.		

Nukrypęs nuo rekomenduojamų sąlygų, ypač antigeno išgavimo, nurodytų protokole, laukiami rezultatai gali būti neteisingi. Dėl audinio fiksavimo, apdorojimo, bendrų laboratorijos prietaisų ir aplinkos sąlygų kintamumo gali prireikti padidinti arba sumažinti pirminio antikūno inkubacijos, ląstelių kondicionavimo intensyvumą pagal atskirus mėginius, naudojant aptikimo metodą ir vertintojo poreikius. Prireikus daugiau informacijos apie fiksavimo kintamuosius, žr. leidinį „Immunohistochemistry: Principles and Advances“.³⁶

KOKYBĖS KONTROLĖS PROCEDŪROS

Neigiama reagento kontrolė

Be dažymo antikūnu „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“, taip pat reikia naudoti antrą objekcinį stiklėlį, nudažytą pelės monokloniniu neigiamu reagentu „Negative Control (Monoclonal)“. Neigiama reagento kontrolinė medžiaga naudojama nespecifiniam dažymui įvertinti. Neigiami reagento kontrolinio antikūno dažymo parametrai turi būti tokie patys kaip ir pirminio antikūno.

Teigiama audinio kontrolė

Atliekant kiekvieną dažymo procedūrą būtina atlikti teigiamos audinio kontrolės tyrimą. Remiantis optimalia laboratorine praktika, tame pačiame objektyviame stiklyje kaip paciento audinys reikia naudoti teigiamą kontrolinį pjūvį. Jis padeda identifikuoti netinkamo reagentų užlašinimo ant stiklelio atvejus. Atitiktis kontrolei geriausia naudoti audinį, kuriam pasireiškia silpna teigiamo nusidažymo reakcija. Teigiami dažomo audinio komponentai naudojami siekiant patvirtinti, kad antikūnas buvo panaudotas ir kad prietaisais veikia tinkamai. Kontroliniame audinyje gali būti tiek teigiamų, tiek neigiamų dažymo elementų ir jis gali būti naudojamas kaip teigiamas arba neigiamas kontrolinis audinys. Kontroliniai audiniai turi būti neseniai atliktos autopsijos, biopsijos ar chirurginiu būdu paimti mėginiai, paruošti arba užfiksuoti kuo greičiau, tokiu pat būdu kaip tiriami pjūviai. Tokie audiniai gali būti naudojami visiems procedūros etapams stebėti, nuo audinių paruošimo iki dažymo. Audinių pjūviai, fiksuoti arba apdoroti kitaip negu tiriami mėginiai, užtikrins visų reagentų ir metodo veiksmų, išskyrus fiksavimą ir audinių apdorojimą, kontrolę.

Žinomas teigiamas kontrolinius mėginius reikia naudoti tik kaip apdorojamų audinių ir tyrimo reagentų tinkamo veiksmingumo stebėjimo priemonę, o ne kaip pagalbinę priemonę pacientų mėginių diagnozei nustatyti. Jeigu teigiami kontroliniai audiniai nerodo teigiamo dažymo, tiriamų mėginių rezultatai turi būti laikomi negaliojančiais.

Tinkama teigiama audinio kontrolė būtų iš anksto kvalifikuotas GŽV atvejis, kuriam nustatytas teigiamas „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūno rezultatas. Teigiama audinio kontrolė turi pasižymėti bet kokia intensyvumo gyvybingų naviko ląstelių citoplazminiu dažymu, viršijančiu foną.

Neigiama audinio kontrolė

Neigiama audinio kontrolė būtų iš anksto kvalifikuotas GŽV atvejis, kuriam „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnas yra neigiamas. Neigiamą audinių kontrolinę medžiagą reikia naudoti tik kaip apdorojamų audinių, tyrimų reagentų ir prietaisų veikimo stebėjimo priemonę, o ne kaip pagalbinę priemonę pacientų mėginių diagnozei nustatyti.

Tyrimo patikra

Prieš pirmą kartą naudojant antikūną arba dažymo sistemą diagnostinėje procedūroje, antikūno specifiškumas turi būti patikrintas tiriant seriją audinių su žinomomis IHC efektyvumo charakteristikomis, atspindinčiomis teigiamą ir neigiamą BRAF V600E mutaciją. Vadovaukitės anksčiau šiame gaminio lapelio skyriuje aprašytais kokybės kontrolės procedūromis ir „College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program“, „Anatomic Pathology Checklist“³⁹ arba „CLSI Approved Guideline“.⁴⁰

DAŽYMO INTERPRETAVIMAS / TIKĖTINI REZULTATAI

„VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūno ląstelių dažymo tipas yra citoplazminis naviko ląstelėse. GŽV mėginiams, nudažytiems antikūnu „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“, klinikinę būklę priskiria kvalifikuotas patologas, įvertinęs, ar navike yra specifinis citoplazminis dažymas, ar jo nėra. Teigiama klinikinė būklė priskiriama tiems atvejams, kai gyvybingose auglio ląstelėse virš fono yra bet koks intensyvumo nedviprasmiškas citoplazminis dažymas. Neigiama klinikinė būklė suteikiama tiems atvejams, kai gyvybingų naviko ląstelių citoplazminis dažymas yra neigiamas arba neaiškus. Branduolinis dažymas, silpnas arba stiprus atskirų gyvybingų naviko ląstelių dažymas ir (arba) nedidelį naviko telkiniai turi būti laikomi neigiamais.

SPECIFINIAI APRIBOJIMAI

Nukrypimas nuo nurodyto dažymo protokolo nežinomas ir gali anuliuoti tikėtinus rezultatus. Naudotojai įspėjami nenaudoti rūgštinių buferinių tirpalų antigenui išgauti, nes dėl šių buferinių tirpalų gali atsirasti neoptimalus dažymas, kurį sunku interpretuoti.⁴¹ Naudotojai, kurie nesilaiko rekomenduojamų tyrimo procedūrų, turi prisiimti atsakomybę už paciento rezultatų interpretavimą.

„VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnų nudažyti atvejai skirstomi į teigiamus arba neigiamus, atsižvelgiant į tai, ar dažymas yra ar nėra visame naviko plote. Dažymo intensyvumo lygis gali skirtis ir intensyvumas gali būti skirtingas visame navike; tačiau tai neturi įtakos BRAF V600E klinicinei būklei.

Kai kurie atvejai gali būti ypač sudėtingi dėl šių priežasčių:

- Nustatyta, kad „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnas retkarčiais pasižymi silpnu citoplazminiu ir branduoliniu dažymu lygiuosiuose raumenyse, smegenėlių Purkinjė ląstelėse, sveikose gaubtinės žarnos epitelio ląstelėse, enterocituose, sėklidžių intersticinėse ląstelėse, antinksčiuose, hipofizėje, acinusinėse kasos struktūrose, žarnyno liaukinėse ląstelėse ir kai kuriose auglio ląstelėse; tačiau tokie atvejai neturi būti laikomi teigiamais BRAF V600E atžvilgiu.⁴² Be to, šis antikūnas pasižymėjo vidutinišku dažymu neuroendokrininėse hipofizės ląstelėse. Be to, šis antikūnas taip pat nudažo blakstienėles plaučiuose.
- Nespecifinis fonas: kai kurie mėginiai dėl ne visai suprantamų priežasčių gali pasižymėti nespecifiniu foniniu dažymu. Todėl vertinant „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnu nudažytą objekcinį stiklį reikia palyginti šį objekcinį stiklį su neigiamu reagentu nudažytu kontroliniu objekciniu stikliu, kad būtų nustatytas nespecifinio foninio dažymo lygis. Kartais pastebimas branduolinis dažymas naviko ląstelėse; tačiau šio reiškinio reikšmė nėra suprantama.
- Audinių arba dažymo artefaktas: histologiniai artefaktai, atsirandantys dėl mėginio apdorojimo ir mikrotomijos proceso, taip pat gali apsunkinti „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūno klinikinės būklės nustatymą. Šie artefaktai gali apimti fiksavimo gradientus ir briaunų efektus, DAB sulaiikymą, branduolio burbuliukų susidarymą, dažymo trūkumą kai kuriose audinio srityse, audinio įplyšimą arba sulankstymą ir audinio pjūvio praradimą, bet tuo neapsiriboti. Kai kuriais atvejais gali reikėti pakartotino naujų pjūvių dažymo arba gauti naują mėginį.

Ne visuose prietaisuose gali būti užregistruoti visi tyrimai. Dėl daugiau informacijos kreipkitės į vietinį „Roche“ atstovą.

EFEKTYVUMO CHARAKTERISTIKOS

ANALITINIS EFEKTYVUMAS

Buvo atlikti dažymo jautrumo, specifiskumo ir tikslumo tyrimai; rezultatai išvardyti toliau.

Jautrumas ir specifiskumas

Naudojant „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūną ant sveikų ir neoplastinių audinių nepastebėta jokių netikėtų dažymų, išskyrus nurodytus skyriuje „Specifiniai apribojimai“.

3. lent. „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūno jautrumas / specifiskumas buvo nustatytas tiriant FFPE sveikus audinius.

Audinis	Teigiamų atvejų skaičius / bendras atvejų skaičius	Audinis	Teigiamų atvejų skaičius / bendras atvejų skaičius
Smegenys	0/3	Stemplė	0/3
Smegenėlės *	1/3	Skrandis	0/3

Audinis	Teigiamų atvejų skaičius / bendras atvejų skaičius	Audinis	Teigiamų atvejų skaičius / bendras atvejų skaičius
Antinksčiai	0/3	Plonoji žarna *	2/4
Kiaušidė	0/3	Gaubtinė žarna *	5/12
Kasa *	2/3	Kepenys	0/3
Limfmazgis	0/3	Liežuvis / seilių liauka	0/3
Hipofizė **	3/3	Inkstas	0/3
Sėklidė *	2/3	Prostata	0/3
Skydliaukė	0/3	Šlapimo pūslė	0/3
Krūtis	0/3	Priekšdyninė liauka	0/3
Blužnis	0/3	Endometriumas	0/3
Tonzilė	0/3	Gimdos kaklelis	0/3
Užkrūčio liauka	0/3	Skeletinis raumuo	0/3
Kaulų čiulpai	0/3	Oda	0/3
Plautis	0/3	Nervas	0/5
Širdis	0/3	Mezotelis	0/3

* Silpnas citoplazmos ir branduolio dažymas smegenėlių Purkinjė ląstelėse, sveikose gaubtinės žarnos lygiųjų raumenų ir epitelio ląstelėse, žarnyno liaukinėse ląstelėse, kasos acinusinėse struktūrose ir sėklidžių intersticinėse ląstelėse.

** Vidutinio stiprumo dažymas pastebėtas hipofizės neuroendokrininėse ląstelėse.

Visuose audiniuose buvo nustatytas teigiamas / neigiamas dažymas pagal audiniam būdingus elementus, todėl tokie atvejai neturi būti laikomi teigiamais dėl BRAF V600E klinikinės būklės.¹⁶

4. lent. „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūno jautrumas / specifiskumas buvo nustatytas tiriant įvairius FFPE neoplastinius audinius.

Patologija	Teigiamų atvejų skaičius / bendras atvejų skaičius
Glioblastoma (smegenų)	0/1
Meningioma (smegenų)	0/1
Ependimoma (smegenų)	0/1
Oligodendroglioma (smegenų)	0/1
Serozinė adenokarcinoma (kiaušidžių)	0/1
Adenokarcinoma (kiaušidžių)	0/1
Neuroendokrininė neoplazma (kasos)	0/1
Seminoma (sėklidės)	0/2
Medulinė karcinoma (skydliaukės)	0/1
Papilinė karcinoma (skydliaukės)	21/28

Patologija	Teigiamų atvejų skaičius / bendras atvejų skaičius
Duktalinė karcinoma in situ (krūties)	0/1
Mikroinvazinė duktalinė karcinoma (krūties)	0/1
Invazinė duktalinė karcinoma (krūties)	3/131
B ląstelių limfoma, neapibrėžiama (blužnies)	0/1
Smulkių ląstelių karcinoma (plaučių)	0/7
Plokščiųjų ląstelių karcinoma (plaučių)	0/90
Adenokarcinoma (plaučių)	1/73
Neuroendokrininė karcinoma (stemplės)	0/1
Adenokarcinoma (stemplės)	0/1
Žiedinių ląstelių karcinoma (skrandžio)	0/1
Adenokarcinoma (plonosios žarnos)	0/1
Stromos sarkoma (plonosios žarnos)	1/1
Adenokarcinoma (gaubtinės žarnos)	64/234
Virškinimo trakto stromos navikas (GIST) (gaubtinės žarnos)	0/1
Adenokarcinoma (tiesiosios žarnos)	0/1
GIST (tiesiosios žarnos)	0/1
Melanoma (tiesiosios žarnos)	0/1
Hepatoceliulinė karcinoma (kepenų)	0/1
Hepatoblastoma (kepenų)	0/1
Šviesių ląstelių karcinoma (inksto)	0/1
Adenokarcinoma (prostatos)	0/2
Adenokarcinoma (gimdos)	0/1
Šviesių ląstelių karcinoma (gimdos)	0/1
Plokščiųjų ląstelių karcinoma (gimdos kaklelio)	0/2
Embrioinė raiščių karcinoma (skersinio raumens)	0/1
Melanoma	10/24
Bazinių ląstelių karcinoma (odos)	0/1
Plokščiųjų ląstelių karcinoma (odos)	0/1
Neuroblastoma (retroperitoneumo)	0/1
Mezotelioma (pilvaplėvės)	0/1
Verpstės pavidalo ląstelių raiščių karcinoma (pilvaplėvės)	0/1
B ląstelių limfoma; neapibrėžiama (limfmazgio)	0/2
Hodžkino limfoma (limfmazgio)	1/1
Urotelio karcinoma (šlapimo pūslės)	0/1
Leiomiosarkoma (šlapimo pūslės)	0/1

Patologija	Teigiamų atvejų skaičius / bendras atvejų skaičius
Osteosarkoma (kaulo)	0/1
Leiomiosarkoma (lygiojo raumens)	0/1

Tikslumas

„BenchMark ULTRA“ prietaiso efektyvumo charakteristikos

Pakartojamumas serijoje ir tarpinis antikūno tikslumas skirtingomis dienomis

„VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūno pakartojamumas ir tikslumas buvo įvertintas naudojant „BenchMark ULTRA“ prietaisą su „OptiView DAB IHC Detection Kit“. Pakartojamumas serijoje buvo įvertintas naudojant 10 GŽV mėginių (5 teigiami ir 5 neigiami BRAF V600E klinicinei būklei). Per vieną dieną vienu „BenchMark ULTRA“ prietaisu buvo nudažyti penki kiekvieno GŽV mėginio objekciniai stiklai su „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnu. Kiekvienas „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnu nudažytas objekcinis stiklas buvo suporuotas su neigiamu reagentu nudažytu kontroliniu objekciniu stiklu iš to paties atvejo. Visi objekčių stiklų rinkiniai buvo atsitiktinės atrankos ir tada įvertinti kaip teigiami arba neigiami vieno patologo, kuris nežinojo atvejo diagnozės.

Taip pat buvo įvertintas tarpinis antikūno tikslumas skirtingomis dienomis, naudojant 10 GŽV mėginių (5 teigiami ir 5 neigiami BRAF V600E klinicinei būklei). Kiekvieno GŽV mėginio objekciniai stiklai buvo nudažyti „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnu, naudojant „BenchMark ULTRA“ prietaisą, kiekvieną iš 5 ne iš eilės einančių dienų. Be to, po vieną kiekvieno atvejo objekcinį stiklą nudažyta neigiamu kontroliniu reagentu. Kiekvienas „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnu nudažytas objekcinis stiklas buvo suporuotas su neigiamu reagentu nudažytu kontroliniu objekciniu stiklu iš to paties atvejo. Visi objekčių stiklų rinkiniai buvo atsitiktinės atrankos ir tada įvertinti kaip teigiami arba neigiami vieno patologo, kuris nežinojo atvejo diagnozės.

Nė viename objekciniame stiklyje, nudažytame neigiamu kontroliniu reagentu, nenustatytas specifinis dažymas, o dažymo fonas buvo ≤ 0.5 . Naudojant apibendrintus visų galimų porų duomenis, tiek pakartojamumo serijoje, tiek tarpinio antikūno tikslumo skirtingomis dienomis tyrimų rezultatai parodė 100 % teigiamą atitiktį procentais (PPA), 100 % neigiamą atitiktį procentais (NPA) ir 100 % bendrą atitiktį procentais (OPA). Rezultatų santrauka pateikta 5. lent.

5. lent. „BenchMark ULTRA“ prietaiso „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūno pakartojamumas serijoje ir tarpinis antikūno tikslumas skirtingomis dienomis, vertinant pagal klinikinę būklę (teigiamas / neigiamas).

Pakartojamumas / Tikslumas	Klinikinė būklė	Atitikimas			
		Tipas	n/N	%	95 % CI
Pakartojamumas serijoje	Teigiamas	PPA	25/25	100.0	(86.7, 100.0)
	Neigiamas	NPA	25/25	100.0	(86.7, 100.0)
	Iš viso	OPA	50/50	100.0	(92.9, 100.0)
Tarpinis tikslumas skirtingomis dienomis	Teigiamas	PPA	50/50	100.0	(92.9, 100.0)
	Neigiamas	NPA	50/50	100.0	(92.9, 100.0)
	Iš viso	OPA	100/100	100.0	(96.3, 100.0)

Pastaba. 95 % pasikliautinųjų intervalų (CI) buvo apskaičiuoti taikant Wilsono balų metodą.

Tarpinis tikslumas naudojant skirtingus prietaisus

„BenchMark ULTRA“ prietaiso tarpinis tikslumas tarp prietaisų „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnui buvo nustatomas dažant pakartotinius 10 GŽV mėginių (5 teigiami ir 5 neigiami BRAF V600E klinikinės būklės atžvilgiu) objekčius stiklus 3 „BenchMark ULTRA“ prietaisais „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnu, naudojant „OptiView

DAB IHC Detection Kit". Be to, po vieną kiekvieno atvejo objekcinį stiklį nudažyta neigiamu kontroliniu reagentu.

Kiekvienas „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnu nudažytas objekcinis stiklis buvo suporuotas su neigiamu reagentu nudažytu kontroliniu objekciniu stikliu iš to paties atvejo. Visus objekcinių stiklių rinkinius atsitiktinės atrankos tvarka atrinko ir klinikinę būklę (teigiama / neigiama) įvertino vienas patologas, nežinojęs atvejo diagnozės. Nė viename objekciniame stiklyje, nudažytame neigiamu kontroliniu reagentu, nenustatytas specifinis dažymas, o dažymo fonas buvo ≤ 0.5 .

„BenchMark ULTRA“ prietaiso tarpiniam tikslumui tarp prietaisų kiekvieno mėginio objekcinių stiklių klinikinės būklės poriniai palyginimai buvo atlikti tarp prietaisų, rodančių 100 % PPA, NPA ir OPA. Rezultatų santrauka pateikiama 6. lent.

6. lent. „BenchMark ULTRA“ prietaiso „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūno tarpinis tikslumas tarp prietaisų, matuojamas pagal klinikinę būklę (teigiamas / neigiamas).

Tikslumas	Klinikinė būklė	Atitikimas			
		Tipas	n/N	%	95 % CI
Tarpinis tikslumas naudojant skirtingus prietaisus	Teigiamas	PPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	Neigiamas	NPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	Iš viso	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)

Pastaba. 95 % pasikliautinųjų intervalų (CI) buvo apskaičiuoti taikant Wilsono balų metodą.

Be to, „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūno tarpinis tikslumas tarp skirtingų prietaisų buvo nustatytas dažant 6 mėginių (2 GŽV neigiami ir 2 GŽV bei 2 skydliaukės vėžio teigiami BRAF V600E klinikinės būklės atžvilgiu) pakartotinius objekcinius stiklius 3 „BenchMark XT“ ir 3 „BenchMark GX“ prietaisais su „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnu, naudojant „OptiView DAB IHC Detection Kit“.

Susumavus visus 3 prietaisus, kiekvieno atveju buvo 15 stebėjimų; kiekvieno atvejo mediana buvo nustatyta iš šių 15 stebėjimų. Atskiri to paties atvejo stebėjimai buvo laikomi sutampančiais su atvejo signalo intensyvumo mediana, jei jų signalo intensyvumas neviršijo 0.5 signalo intensyvumo. „BenchMark XT“ ir „BenchMark GX“ prietaisų tarpiniam tikslumui tarp prietaisų buvo atlikti kiekvieno mėginio objekcinių stiklių deimų intensyvumo balų poriniai palyginimai, kurie parodė 98.9 % OPA tarp 3 „BenchMark XT“ ir 100 % OPA 3 tarp „BenchMark GX“ prietaisų. Nė viename objekciniame stiklyje, nudažytame neigiamu kontroliniu reagentu, nenustatytas specifinis dažymas, o fono dažymas buvo ≤ 0.5 tiek „BenchMark XT“, tiek „BenchMark GX“ prietaisais.

„BenchMark IHC/ISH“ prietaisų suderinamumas

„VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūno suderinamumas „BenchMark IHC/ISH“ prietaisuose buvo nustatytas dažant GŽV, skydliaukės vėžio ir melanomos mėginius „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnu, naudojant „OptiView DAB IHC Detection Kit“. Visų objekcinių stiklių klinikinę būklę (teigiama / neigiama) vertino vienas patologas. Buvo atlikti 228 visų mėginių (177 GŽV, 27 skydliaukės vėžio ir 24 melanomų) klinikinės būklės poriniai palyginimai tarp „BenchMark GX“ ir „BenchMark ULTRA“ prietaisų ir „BenchMark XT“ ir „BenchMark ULTRA“ prietaisų. „BenchMark GX“ ir „BenchMark ULTRA“ prietaisai parodė 98.0 % teigiamos atitikties vidurkį (APA), 99.0 % neigiamos atitikties vidurkį (ANA) ir 98.7 % OPA. „BenchMark XT“ ir „BenchMark ULTRA“ prietaisai parodė 96.6 % APA, 98.4 % ANA ir 97.8 % OPA. Naudojant „BenchMark GX“ ir „BenchMark XT“ prietaisus, buvo atliktas porinis palyginimas tarp visų 230 mėginių (179 GŽV, 27 skydliaukės vėžio ir 24 melanomos). „BenchMark GX“ ir „BenchMark XT“ prietaisai parodė 98.7 % APA, 99.4 % ANA ir 99.1 % OPA.

Vertintojo tikslumo tyrimai

To paties ir skirtingų vertintojų tikslumas buvo įvertintas naudojant 20 GŽV mėginių (10 BRAF V600E mutacijos teigiamų atvejų ir 10 BRAF V600E mutacijos neigiamų atvejų), nudažytų „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnu, naudojant „OptiView DAB IHC Detection Kit“ su „BenchMark ULTRA“ prietaisais. Kiekvienas „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnu nudažytas objekcinis stiklis buvo suporuotas su H&E ir neigiamu reagentu nudažytu kontroliniu objekciniu stikliu iš to paties atvejo.

Visus objekcinių stiklių rinkinius atsitiktinės atrankos tvarka atrinko ir įvertino 3 patologai, nustatydami teigiamą arba neigiamą BRAF V600E klinikinę būklę. Patologai nežinojo atvejų diagnozių. Praėjus dviejų savaitių plovimo laikotarpiui, „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnais nudažyti objekciniai stikliai buvo iš naujo atrinkti atsitiktinės

atrankos tvarka, kad kiekvienas iš 3 patologų antrą kartą įvertintų BRAF V600E klinikinę būklę. Nė viename objekciniame stiklyje, nudažytame neigiamu kontroliniu reagentu, nenustatytas specifinis dažymas, o dažymo fonas buvo ≤ 0.5 .

Vertintojo tikslumu buvo lyginami vieno patologo atlikti pradiniai ir galutiniai objekcinių stiklių vertinimai, vienam patologui atliekant 20 GŽV objekcinių stiklių palyginimų. 3 patologų atlikti palyginimai buvo sujungti ir nustatyta, kad skirtingų vertintojų tikslumas buvo 100 % APA, 100 % ANA ir 100 % OPA. Rezultatų santrauka pateikiama 7. lent.

Vertintojų tikslumas palygintas su visų objekcinių stiklių vertinimų (20 GŽV x 2 vertinimai atvejui x 3 patologai = 120 objekcinių stiklių vertinimų) su modaline atvejo būkle kiekvienam GŽV atvejui. Rezultatai rodo, kad PPA, NPA ir OPA vertintojų tikslumas yra 100 %. Rezultatų santrauka pateikiama 7. lent.

7. lent. To paties ir skirtingų vertintojų tikslumas „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūno GŽV atvejų atžvilgiu, vertinant pagal BRAF V600E klinikinę būklę (teigiama / neigiama).

Tikslumas	Klinikinė būklė	Atitikimas			
		Tipas	n/N	%	95 % CI
Tas pats vertintojas	Teigiamas	APA	60/60	100.0	(93.9, 100.0)
	Neigiamas	ANA	60/60	100.0	(93.9, 100.0)
	Iš viso	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)
Skirtingi vertintojai	Teigiamas	PPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)
	Neigiamas	NPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)
	Iš viso	OPA	120/120	100.0	(96.9, 100.0)

Pastaba. To paties vertintojo APA ir ANA 95 % PI buvo apskaičiuoti, taikant Clopper-Pearson paremtą metodą; OPA 95 % CI buvo apskaičiuoti, taikant procentilio savirankos metodą. Tarp vertintojų 95 % CI buvo apskaičiuoti taikant Wilsono balų metodą.

Tikslumas tarp skirtingų partijų

„VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūno tikslumas tarp skirtingų partijų buvo nustatytas tiriant 3 „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūno serijas su 10 GŽV atvejų (5 teigiamų ir 5 neigiamų BRAF V600E mutacijai) trijų serijų objekciniuose stikliuose, naudojant „BenchMark ULTRA“ prietaisą su „OptiView DAB IHC Detection Kit“.

Kiekvienas „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnu nudažytas objekcinis stiklis buvo suporuotas su neigiamu reagentu nudažytu kontroliniu objekciniu stikliu iš to paties atvejo. Visus objekcinių stiklių rinkinius atsitiktinės atrankos tvarka parinko ir vertino vienas patologas, nežinojęs atvejo diagnozės ir „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūno partijos numerio. Nė viename objekciniame stiklyje, nudažytame neigiamu kontroliniu reagentu, nenustatytas specifinis dažymas, o dažymo fonas buvo ≤ 0.5 .

„VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ nustatant antikūnų tikslumą tarp skirtingų partijų, BRAF V600E klinikinę būklę, gauta įvertinus kiekvieną objekcinį stiklį, buvo lyginama su to atvejo modaline būkle. „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnų partijų OPA, PPA ir NPA buvo 100 %, o tai rodo, kad „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnų dažymas yra atkuriamas visose antikūnų partijose.

„VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnų tikslumo tarp skirtingų partijų rezultatai santrauka pateikta 8. lent.

8. lent. „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnų tikslumas tarp skirtingų partijų pagal klinikinę būklę (teigiamas / neigiamas).

Tikslumas	Klinikinė būklė	Atitikimas			
		Tipas	n/N	%	95 % CI
Tarp skirtingų partijų	Teigiamas	PPA	45/45	100.0	(92.1, 100.0)
	Neigiamas	NPA	45/45	100.0	(92.1, 100.0)
	Iš viso	OPA	90/90	100.0	(95.9, 100.0)

Pastaba. 95 % pasikliautinųjų intervalų (CI) buvo apskaičiuoti taikant Wilsono balų metodą.

Tarplaboratorinis atkuriamumo tyrimas

Siekiant įrodyti kiekvieno „VENTANA MMR IHC Panel“ tyrimo atkuriamumą kliniškai būklei nustatyti buvo atliktas „VENTANA MMR IHC Panel“ tarplaboratorinis atkuriamumo tyrimas. Tyrimas apėmė 6 kiekvieno MMR baltymo GŽV audinių mėginius (3 nepažeistus ir 3 praradimus) ir 16 BRAF V600E GŽV audinių mėginių (8 teigiamus ir 8 neigiamus), kurie buvo tiriami 3 „BenchMark ULTRA“ prietaisais 5 ne iš eilės einančias dienas 21 dienos laikotarpyje trijose išorinėse laboratorijose. Kiekvienas antikūnais nudažytas objektinis stiklėlis buvo suporuotas su H&E ir neigiamu reagentu nudažytu kontroliniu objektiniu stikleliu iš to paties atvejo. Visus objektinių stiklelių rinkinius atsitiktinės atrankos tvarka atrinko ir vertino iš viso 6 vertintojai (po 2 vertintojus iš kiekvienos vietos), kurie nebuvo informuoti apie tiriamojo rinkinio MMR klinikinę būklę. Kiekvienas iš 40 tyrimo dalyvusių atvejų buvo stebimas 30 dienų visose tyrimo vietose ir visų vertintojų. Kiekvieno atvejo modalinė referencinė būklė buvo nustatyta pagal dažniausiai stebėtą būklę iš 30 stebėjimų. Tyrimo iš viso atlikta 1200 visų penkių baltymų stebėjimų. Visų vertinamų atvejų morfologijos ir fono priimtumo dažnis šiame tyrime buvo 100 %. Apibendrintą (visų penkių baltymų) modalinio atvejo atskaitos būklės ir atskirų stebėjimų suderinamumo statistiką žr. 9. lent.

9. lent. „VENTANA MMR IHC Panel“ ir modalinio atvejo atskaitos būklės atitiktis.

Tarplaboratorinis atkuriamumas	Klinikinė būklė	Atitikimas			
		Tipas	n/N	%	95 % CI
Visi baltymai	Nepažeistas / teigiamas	PPA	598/600	99.8	(98.7, 100.0)
	Prarastas / neigiamas	NPA	593/600	98.9	(97.4, 99.5)
	Iš viso	OPA	1191/1200	99.4	(98.6, 99.7)

Pastaba. Klinikinė būklė apibrėžiama kaip nepažeista arba prarasta MMR baltymo ekspresija ir teigiama arba neigiama BRAF V600E baltymo ekspresija. 95 % CI buvo apskaičiuoti taikant apibendrintą tiesinį mišrųjį modelį (GLMM).

Be to, buvo atliktas „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnų porinis palyginimas tarp skirtingų tyrimo įstaigų, dienų ir vertintojų. BRAF V600E tyrimo rinkinyje iš viso buvo 480 stebėjimų. Rezultatų santrauka pateikiama 10. lent. Duomenys rodo tyrimo atkuriamumą per 5 dienas, 3 tyrimo vietose ir tarp 6 vertintojų.

10. lent. „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnų porinio tarplaboratorinio atkartojamumo reikšmės, išmatuotos pagal klinikinę būklę (teigiama arba neigiama).

Tarplaboratorinis atkuriamumas		Atitikimas			
		Tipas	n/N	%	95 % CI
Skirtingose tyrimo vietose (3 tyrimo vietos)		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)
Skirtingomis dienomis (5 ne iš eilės einančios dienos)	A tyrimo vieta	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)
	B tyrimo vieta	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)
	C tyrimo vieta	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)

Tarplaboratorinis atkuriamumas	Atitikimas			
	Tipas	n/N	%	95 % CI
Tarp vertintojų (2 patologai kiekvienoje tyrimo vietoje)	ANA	236/237	99.6	(98.7, 100.0)
	OPA	239/240	99.6	(98.8, 100.0)

Pastaba. 95 % CI buvo apskaičiuoti taikant procentilio savirankos metodą; tais atvejais, kai baltų įvertis buvo lygus 100 %, taikytas Wilsono baltų metodas.

„BenchMark ULTRA PLUS“ prietaiso efektyvumo charakteristikos Pakartojamumas tą pačią dieną ir tikslumas skirtingomis dienomis

Pakartojamumas tą pačią dieną (serijoje) buvo įvertintas naudojant 10 GŽV mėginių (5 teigiami ir 5 neigiami BRAF V600E pagal klinikinę būklę). Per vieną dieną vienu „BenchMark ULTRA PLUS“ prietaisu buvo nudažyti penki kiekvieno GŽV mėginio objektiniai stiklėliai su „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnu. Kiekvienas „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnu nudažytas objektinis stiklėlis buvo suporuotas su neigiamu reagentu nudažytu kontroliniu objektiniu stikleliu iš to paties atvejo. Visos objektinių stiklelių poros buvo atsitiktinės atrankos ir tada įvertintos kaip teigiamos arba neigiamos vieno patologo, kuris nežinojo atvejo diagnozės.

Taip pat buvo įvertintas tarpinis antikūno tikslumas skirtingomis dienomis, naudojant 10 GŽV mėginių (5 teigiami ir 5 neigiami BRAF V600E pagal klinikinę būklę). Kiekvieno GŽV mėginio objektiniai stiklėliai buvo nudažyti „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnu, naudojant „BenchMark ULTRA PLUS“ prietaisą, kiekvieną iš 5 ne iš eilės einančių dienų. Be to, po vieną kiekvieno atvejo objektinį stiklį nudažyta neigiamu kontroliniu reagentu. Kiekvienas „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnu nudažytas objektinis stiklėlis buvo suporuotas su neigiamu reagentu nudažytu kontroliniu objektiniu stikleliu iš to paties atvejo. Visos objektinių stiklelių poros buvo atsitiktinės atrankos ir tada įvertintos kaip teigiamos arba neigiamos vieno patologo, kuris nežinojo atvejo diagnozės.

Nė viename objektiniame stiklelyje, nudažytame neigiamu kontroliniu reagentu, nenustatytas specifinis dažymas, o dažymo fonas buvo ≤ 0.5 . Naudojant apibendrintus visų galimų porų duomenis, tiek pakartojamumo tą pačią dieną, tiek tikslumo skirtingomis dienomis tyrimų rezultatai parodė 100 % teigiamą atitiktį procentais (PPA), 100 % neigiamą atitiktį procentais (NPA) ir 100 % bendrą atitiktį procentais (OPA). Rezultatų santrauka pateikta 11. lent.

11. lent. „BenchMark ULTRA PLUS“ prietaiso „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūno pakartojamumas tą pačią dieną ir tikslumas skirtingomis dienomis, vertinant pagal klinikinę būklę (teigiamas / neigiamas)

Pakartojamumas / Tikslumas	Klinikinė būklė	Atitikimas			
		Tipas	n/N	%	95 % CI
Pakartojamumas tą pačią dieną	Teigiamas	PPA	25/25	100.0	(86.7, 100.0)
	Neigiamas	NPA	25/25	100.0	(86.7, 100.0)
	Iš viso	OPA	50/50	100.0	(92.9, 100.0)
Tikslumas skirtingomis dienomis	Teigiamas	PPA	50/50	100.0	(92.9, 100.0)
	Neigiamas	NPA	48/48	100.0	(92.6, 100.0)
	Iš viso	OPA	98/98	100.0	(96.2, 100.0)

Pastaba. 95 % pasikliautinųjų intervalų (CI) buvo apskaičiuoti taikant (Wilsono) baltų metodą.

„BenchMark ULTRA PLUS“ tikslumas tarp skirtingų prietaisų

„BenchMark ULTRA PLUS“ prietaiso tarpinis tikslumas tarp skirtingų prietaisų „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnui buvo nustatomas dažant pakartotinius 10 GŽV mėginių (5 teigiami ir 5 neigiami BRAF V600E klinikinės būklės atžvilgiu) objektinius stiklėlius 3 „BenchMark ULTRA PLUS“ prietaisais „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnu, naudojant „OptiView DAB IHC Detection Kit“. Be to, po vieną kiekvieno atvejo objektinį stiklį nudažyta neigiamu kontroliniu reagentu.

Kiekvienas „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnu nudažytas objektinis stiklis buvo suporuotas su neigiamu reagentu nudažytu kontroliniu objektiniu stikliu iš to paties atvejo. Visas objektinių stiklių poras atsitiktinės atrankos tvarka atrinko ir klinikinę būklę (teigiama / neigiama) įvertino vienas patologas, nežinojęs atvejo diagnozės. Nė viename objektiniame stiklyje, nudažytame neigiamu kontroliniu reagentu, nenustatytas specifinis dažymas, o dažymo fonas buvo ≤ 0.5 .

„BenchMark ULTRA PLUS“ prietaiso tikslumui tarp skirtingų prietaisų kiekvieno mėginio objektinių stiklių klinikinės būklės poriniai palyginimai buvo atlikti tarp prietaisų, rodančių 100 % PPA, NPA ir OPA. Rezultatų santrauka pateikta 12. lent.

12. lent. „BenchMark ULTRA PLUS“ prietaiso „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūno tikslumas tarp skirtingų prietaisų, matuojamas pagal klinikinę būklę (teigiamas / neigiamas)

Tikslumas	Klinikinė būklė	Atitikimas			
		Tipas	n/N	%	95 % CI
Tarp skirtingų prietaisų	Teigiamas	PPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	Neigiamas	NPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	Iš viso	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)

Pastaba. 95 % pasikliautinųjų intervalų (CI) buvo apskaičiuoti taikant (Wilsono) balų metodą.

„BenchMark ULTRA PLUS“ ir „BenchMark ULTRA“ prietaisų atitiktis tarp skirtingų platformų

Buvo atliktas tyrimas, kurio tikslas buvo palyginti „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūno dažymo rezultatus naudojant „OptiView DAB IHC Detection Kit“ prietaise „BenchMark ULTRA PLUS“, palyginus su prietaisu „BenchMark ULTRA“. Buvo nudažyta šimtas dvidešimt (120) gaubtinės žarnos karcinomos audinio atvejų (14 „BRAF V600E“ teigiamų, 13 „BRAF V600E“ neigiamų, 93 MMR visų dalyvavusiųjų), o nudažytus objektinius stiklius vertino patologas, kuris nustatė diagnostinę būklę. Bendra atitiktis procentais buvo 98.3 %. Visi audiniai, nudažyti „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnu, pasižymėjo priimtina morfologija ir foniniu nusidažymu. Rezultatų santrauka pateikta 13. lent.

13. lent. „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūno suderinamumas su „BenchMark ULTRA PLUS“ prietaisu, palyginti su „BenchMark ULTRA“ prietaisu, išmatuotas pagal klinikinę būklę (teigiamas / neigiamas).

Skirtingos platformos Atitiktis	Atitikimas			
	Tipas	n/N	%	95 % CI
ULTRA ir 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)

Pastaba. 95 % pasikliautinųjų intervalų (CI) buvo apskaičiuoti taikant (Wilsono) balų metodą.

Tikslumo tyrimas: „VENTANA MMR IHC Panel“ rezultatų palyginimas su molekuliniais tyrimais (DNR sekoskaita ir MLH1 aktyvatoriaus hipermetilinizimas)

Buvo atliktas tyrimas, kurio tikslas – palyginti „VENTANA MMR IHC Panel“ rezultatus su molekuliniais tyrimais, įskaitant išsamią gaubtinės žarnos DNR sekoskaitos grupę, siekiant nustatyti GŽV, kuriame (i) trūksta MMR (dMMR) ir (ii) yra BRAF V600E mutacija. Atliekant DNR sekoskaitą gaubtinės žarnos grupėje, buvo analizuojami MMR genų (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6, EPCAM), BRAF ir kitų kancerogenezei svarbių genų (pvz., PIK3CA, KRAS, NRAS, ERBB2 ir kt.) variantai. Sekoskaita apėmė visus egzonus, intronines ir gretimas sekas, taip pat dideles delecijas, dubliacijas ir mozaikiškumą.

Atliekant tyrimą, nuoseklūs GŽV atvejai buvo dažomi H&E metodu ir vertinami siekiant nustatyti tinkamos fiksacijos ir morfologijos indikacijas, įskaitant ląstelių elementų (naviko ir vidinių kontrolinių ląstelių) buvimą. Kiekvienas atvejis buvo vertinamas siekiant nustatyti, ar mėginyje yra ne mažiau kaip 50 % naviko kiekio, kad mėginyje būtų pakankamai naviko ląstelių, kaip rekomenduojama molekuliniais tyrimams. Po peržiūros į tyrimą buvo įtraukti 105 šiuos kriterijus atitinkantys nuoseklūs atvejai. Be to, siekiant užtikrinti, kad kiekvieno

žymens praradimas būtų atspindėtas tyrime, buvo įtraukta 13 GŽV atvejų, rodančių klinikinę IHC netekties būklę. Visų tyrimė dalyvavusių atvejų pjūviai buvo nudažyti IHC su „VENTANA MMR IHC Panel“ ir atitinkamomis neigiamomis reagentų kontrolinėmis medžiagomis. Papildomiems pjūviams buvo atlikta DNR sekoskaita gaubtinės žarnos grupėje. MLH1 aktyvatoriaus hipermetilinizimas yra vienas iš mechanizmų, dėl kurio gali išnykti MLH1 baltymo ekspresija, ir jis yra susijęs su sporadiniu GŽV, o ne su galima Lynch sindromo diagnoze. Todėl visi MLH1 praradimo atvejai, tyrime nustatyti IHC metodu, buvo ištirti dėl MLH1 aktyvatoriaus hipermetilinizimo.

Galutinėje 118 atvejų tyrimo aibėje analizė apėmė PPA ir NPA pagal visus žymenis (t. y. visi stebėjimai buvo sujungti), kai molekuliniai tyrimai buvo naudojami kaip IHC palyginimo atskaitos būklė. Analizė apėmė MMR baltymo būklės (nepažeistas / prarastas) ir molekulinės būklės, apibrėžtos kaip sveikas (nėra patogeninės (-ių) mutacijos (-ų), neigiama MLH1 aktyvatoriaus hipermetilinizimo reakcija ir laukinio tipo BRAF (nėra V600E mutacijos)) arba nesveikas (yra patogeninė (-ės) mutacija (-os), teigiama MLH1 aktyvatoriaus hipermetilinizimo ir (arba) teigiama BRAF V600E mutacija), palyginimą. Atliekant šį tyrimą, patogeninė mutacija navike apibrėžiama kaip generatyvinės linijos arba somatinė mutacija, dėl kurios, kaip prognozuojama, sumažės MMR baltymo ekspresija. Taškų įverčiai buvo 99.4 % PPA, 93.5 % NPA ir 98.8 % OPA, kaip parodyta 14. lent.

Taip pat atlikta jungtinė analizė, kurioje keturių MMR IHC žymenų (be „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūno) rezultatai buvo palyginti su molekulinio tyrimo rezultatais. Apibendrinti taškų įverčiai buvo 99.3 % PPA, 89.7 % NPA ir 98.5 % OPA, kaip apibendrinta 15. lent.

Atlikus papildomą analizę, keturių MMR IHC žymenų rezultatai buvo palyginti su MMR genų molekulinio tyrimų rezultatais atvejo lygmeniu, siekiant įtraukti visų žymenų būklę ir sukurti dMMR/pMMR rezultatus pagal abu metodus. Ši analizė parodyta 16. lent paveikslielyje, kuriame matyti, kad abiejų metodų OPA yra 97.4 %.

IHC MMR būklė ir molekulinio tyrimų MMR būklė taip pat buvo lyginama pagal atskirus MMR žymenis tyrimo metu. Kiekvieno MMR žymens OPA, lyginant su bendrais DNR sekoskaitos gaubtinės žarnos grupėje ir MLH1 aktyvatoriaus hipermetilinizimo tyrimo rezultatais, buvo 100.0 % „VENTANA anti-MLH1 (M1)“ antikūnui, 99.1 % „VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody“, 98.3 % „VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody“ ir 96.6 % „VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody“.

GŽV BRAF V600E klinikinė būklė, gauta IHC metodu naudojant „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūną, taip pat buvo palyginta su BRAF mutacijos būklės rezultatais, nustatytais DNR sekoskaitos metodu. Atliekant IHC tyrimą naudojant „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūną ir kaip atskaitą naudojant DNR sekoskaitą, PPA, NPA ir OPA buvo 100 % (17. lent). Buvo atlikti papildomi tyrimai, siekiant patikrinti „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūno gebėjimą toliau stratifikuoti GŽV atvejus, rodančius MLH1 baltymo ekspresijos praradimą. Iš 23 teigiamų BRAF V600E atvejų 20 atvejų buvo nustatytas teigiamas MLH1 baltymo praradimas pagal IHC ir MLH1 aktyvatoriaus hipermetilinizimą. Šie duomenys atitinka glaudų BRAF V600E teigiamos būklės ryšį su MLH1 aktyvatoriaus hipermetilinizimo būkle. Likusieji trys atvejai buvo pMMR (nepakitę visi MMR baltymai). Visi BRAF V600E teigiami mėginiai identifikuoti kaip sporadiniai GŽV. Gauti rezultatai patvirtino, kad „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnas teisingai identifikuoja GŽV, turinčius BRAF V600E mutaciją. Duomenys taip pat patvirtino, kad „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūną galima naudoti sporadiniams ir tikėtiniams Lynch sindromo GŽV atskirti, kai nėra MLH1 ekspresijos.

14. lent. „VENTANA MMR IHC Panel“ jungtinė analizė IHC ir molekulinio testų suderinamumas.

Būklė* (Molekulinis / IHC)	Atitikimas			
	Tipas	n/N	%	95 % CI
Sveikas / nepalietas	PPA	523/526	99.4	(98.7, 100.0)
Nesveikas / praradimas	NPA	58/62	93.5	(87.1, 98.6)
Iš viso	OPA	581/588	98.8	(98.0, 99.7)

* IHC atveju MMR būklė yra „nepažeista“ arba baltymų ekspresija „prarasta“. Atliekant šią analizę, BRAF V600E neigiami ir teigiami atvejai buvo priskirti atitinkamai nepakitusių arba prarastos būklės kategorijoms. Molekuliniai tyrimai rodo, kad galimų patogeninių mutacijų arba MLH1 aktyvatoriaus hipermetilinizimo nėra (sveikas) arba yra (nesveikas). 95 % CI buvo apskaičiuoti taikant procentilio savirankos metodą.

15. lent. Keturių MMR IHC žymenų (be „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūno) jungtinė analizė, IHC ir molekulinį testų suderinamumas.

Būklė* (Molekulinis / IHC)	Atitikimas			
	Tipas	n/N	%	95 % CI
Sveikas / nepalietas	PPA	428/431	99.3	(98.4, 100.0)
Nesveikas / praradimas	NPA	35/39	89.7	(79.4, 97.7)
Iš viso	OPA	463/470	98.5	(97.3, 99.6)

* IHC atveju baltymų ekspresijos būklė yra nepažeista arba prarasta. Molekuliniai tyrimai rodo, kad galimų patogeninių mutacijų arba *MLH1* aktyvatoriaus hipermetilavimo nėra (sveikas) arba yra (nesveikas). 95 % CI buvo apskaičiuoti taikant procentilio savirankos metodą.

16. lent. Keturių MMR IHC žymenų ir molekulinį testų rezultatų, kuriais nustatoma MMR būklė (dMMR/pMMR), atitikimas.

MMR būklė*	Atitikimas			
	Tipas	n/N	%	95 % CI
pMMR	PPA	79/80	98.8	(93.3, 99.8)
dMMR	NPA	35/37	94.6	(82.3, 98.5)
Iš viso	OPA	114/117	97.4	(92.7, 99.1)

* IHC atveju pMMR būklė reiškia visų MMR baltymų nepažeistą būklę, o dMMR būklė reiškia vieno ar daugiau MMR baltymų praradimą. Atliekant molekulinis tyrimus, pMMR būklė reiškia, kad nėra patogeninių mutacijų arba *MLH1* aktyvatoriaus hipermetilavimo, o dMMR būklė reiškia, kad yra patogeninių mutacijų arba *MLH1* aktyvatoriaus hipermetilavimo. 95 % pasikliautinųjų intervalų (CI) buvo apskaičiuoti taikant Wilsono balų metodą.

17. lent. Atitikimas tarp IHC naudojant „VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)“ antikūnus ir molekulinį testą.

BRAF V600E Būklė (Molekulinis / IHC)	Atitikimas			
	Tipas	n/N	%	95 % CI
Teigiamas / nesveikas	PPA	23/23	100.0	(85.7, 100.0)
Neigiamas / sveikas	NPA	95/95	100.0	(96.1, 100.0)
Iš viso	OPA	118/118	100.0	(96.8, 100.0)

BRAF V600E būklė buvo apibrėžiama kaip teigiami arba neigiami IHC rezultatai ir nenormalūs (yra V600E mutacija) arba normalūs (laukinio tipo *BRAF*) molekulinio testo rezultatai. 95 % pasikliautinųjų intervalų (CI) buvo apskaičiuoti taikant Wilsono balų metodą.

ŠALTINIAI

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, 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.
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. Tacci 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, Braghieri 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, Firfer 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.

PASTABA. Šiame dokumente dešimtainės trupmenos visada skiriamos tašku. Jis atskiria sveikąją dešimtainio skaičiaus dalį nuo trupmeninės dalies. Tūkstančių skirtukai nenaudojami.

Saugos ir veiksmingumo santrauką galima rasti čia:

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

Simboliai

Be ISO 15223-1 standarte pateiktų simbolių ir ženklų (JAV: daugiau informacijos žr. elabdoc.roche.com/symbols), „Ventana“ taip pat naudoja toliau nurodytus simbolius ir ženklus.

GTIN

Pasaulinės prekybos identifikacinis numeris

UDI

Unikalus prietaiso atpažinties numeris

PERŽIŪROS ISTORIJA

Red.	Atnaujinimai
F	Atnaujintas skyrius „Reikalingos, tačiau su rinkiniu netiekiamos medžiagos“, pridėjus papildomus „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“ ir „VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody“ dalių numerius.

INTELEKTINĖ NUOSAVYBĖ

VENTANA, BENCHMARK, OPTIVIEW ir VENTANA logotipas yra „Roche“ prekių ženklai. Visi prekių ženklai yra atitinkamų jų savininkų nuosavybė.

© 2023 Ventana Medical Systems, Inc.

KONTAKTINĖ INFORMACIJA



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

www.roche.com



0123