

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

Para su uso con VENTANA MMR IHC Panel

REF 760-5095

08033706001

IVD  50

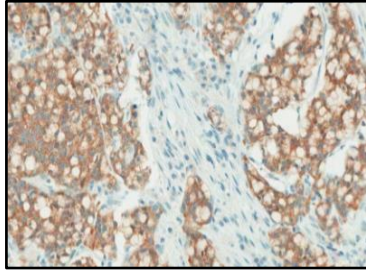


Figura 1. Tinción de células neoplásicas en tejido de cáncer de colon con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1).

USO PREVISTO

El anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) está destinado a la detección cualitativa de la proteína BRAF V600E en secciones de tejido fijado con formol y embebido en parafina. El anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) está preparado para su uso en los instrumentos BenchMark IHC/ISH con OptiView DAB IHC Detection Kit y sus reactivos auxiliares.

El anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) forma parte del panel VENTANA MMR IHC Panel, en el que se incluyen los anticuerpos 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 y VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody. El panel VENTANA MMR IHC Panel está indicado para la detección de la deficiencia de proteínas reparadoras de errores de emparejamiento como una prueba que pueda identificar a aquellos individuos que corren el riesgo de sufrir el síndrome de Lynch en pacientes a los que se ha diagnosticado un cáncer colorrectal (CRC); además, junto con el estado de BRAF V600E, puede servir de ayuda para diferenciar casos de CRC esporádico o con posible síndrome de Lynch cuando se presenta ausencia de expresión de la proteína MLH1.

La interpretación de estos productos debe correr a cargo de un anatomopatólogo cualificado junto con un examen histológico, la información clínica pertinente y los controles adecuados.

Destinado para uso diagnóstico in vitro (IVD).

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El cáncer colorrectal es el tercer tipo de cáncer más habitual y la cuarta causa de fallecimientos por cáncer más frecuente en el mundo.¹ En la mayor parte de los CRC se observa inestabilidad cromosómica, aunque aproximadamente el 15 % de los cánceres se desarrollan a través de una vía alternativa que se caracteriza por una función deficiente del sistema reparador de errores (MMR) en el ADN. Como consecuencia de esta deficiencia en el sistema MMR, los tumores presentan inestabilidad del microsatélite (MSI) que proviene de la imposibilidad de las proteínas MMR de reparar los errores de replicación del ADN.

Los casos de CRC con defectos en el sistema MMR se conocen como tumores con deficiencia de MMR (dMMR). En cambio, los casos de CRC sin defectos en el sistema MMR se conocen como tumores con competencia de MMR (pMMR). Los cánceres colorrectales dMMR a menudo no se pueden diferenciar correctamente y suelen presentar predominancia en el colon proximal, unas características histológicas mucinosas, medulares o en anillo de sello y una mayor cantidad de linfocitos que infiltran el tumor.^{2, 3} En general, la causa de la deficiencia del sistema MMR se puede encontrar en las mutaciones hereditarias de uno de los genes MMR, que provoca la consecuente pérdida del alelo normal correspondiente por mecanismos genéticos o epigenéticos, mutaciones somáticas en los alelos o inactivación epigenética del gen *MLH1* mediante metilación.⁴

Los cuatro genes MMR que presentan mutaciones más habitualmente son *MLH1*, *PMS2*, *MSH2* y *MSH6*. En las células normales, la proteína MLH1 forma un complejo

(heterodímero) con la proteína PMS2, mientras que la proteína MSH2 forma un complejo con la proteína MSH6.^{5, 6} Cuando se produce un error de emparejamiento en el ADN, el heterodímero MSH2/MSH6 se une al ADN con errores, lo que provoca un cambio conformacional. El heterodímero MLH1/PMS2 se une al complejo MSH2/MSH6 ligado al ADN, dando lugar a una reparación por escisión en el ADN afectado.

Las proteínas MLH1, PMS2, MSH2 y MSH6 son proteínas MMR con importancia clínica que están codificadas por genes que pueden haber sufrido mutaciones en las familias con el síndrome de Lynch.^{7, 8} Las personas portadoras de estas mutaciones presentan un alto riesgo de por vida de desarrollar cáncer colorrectal o de otro tipo como resultado de la acumulación de errores de replicación del ADN en células proliferativas. El síndrome de Lynch representa entre el 1 y el 6 % de los casos de CRC. Estos tumores son el resultado de la herencia de una mutación autosómica dominante de la estirpe germinal de uno de los cuatro genes del sistema MMR, con una pérdida de MLH1 que se presenta en la mayoría de estos casos de cáncer colorrectal (CRC) asociados con el síndrome de Lynch.^{5, 9, 10} Se han identificado más de 300 mutaciones diferentes en la familia de proteínas MMR en los pacientes con síndrome de Lynch. El fenotipo del tumor asociado con el síndrome de Lynch se caracteriza generalmente por la pérdida de expresión inmunohistoquímica de proteínas MMR, en concreto, MLH1, PMS2, MSH2 y MSH6¹⁰⁻¹³. Las pruebas de IHC de MMR han demostrado ser muy útiles en la identificación del gen MMR específico en el que hay más probabilidades de encontrar una alteración somática o de estirpe germinal¹⁴.

El gen *BRAF* está ubicado en el cromosoma 7q34 y codifica una serina-treonina-cinasa citoplasmática que actúa con posterioridad a la vía de señalización de la proteína-cinasa activada por mitógenos (MAPK). Las mutaciones oncogénicas en el gen *BRAF*, que están todas situadas en el dominio cinasa, activan constitutivamente la vía de señalización MAPK dando lugar a una mayor proliferación celular y resistencia a la apoptosis. La más habitual de todas las mutaciones de activación del gen *BRAF* (mutación en el punto T1799A) da lugar a una sustitución de la valina (V) por ácido glutámico (E) en la posición 600 de la secuencia del aminoácido y se detecta en el 12 % de todos los casos de CRC^{15, 16}.

El anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), como parte del panel VENTANA MMR IHC Panel, contribuye a la diferenciación de los casos de CRC esporádico o con posible síndrome de Lynch cuando existe ausencia de expresión de la proteína MLH1^{17, 18}. En los casos de CRC, la pérdida de la proteína MLH1 suele producirse como resultado de la hipermetilación del promotor de *MLH1* e indica que el cáncer es de origen esporádico¹⁹. La presencia de la proteína BRAF V600E está estrechamente vinculada a la hipermetilación del promotor de *MLH1*. Como resultado, una tinción positiva con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) indicaría un CRC esporádico.

Aparte del papel que desempeña en la estratificación de los CRC, la mutación *BRAF V600E* se detecta en aproximadamente el 8 % de todos los tumores sólidos, entre otros, en el 43 % de los melanomas, en el 39 % de los carcinomas papilares de la tiroides, en el 12 % de los carcinomas serosos de ovario, en el 2 % de los cánceres de pulmón y en otros tipos de cáncer¹⁶. Además, la mutación *BRAF V600E* se ha descrito recientemente como un marcador molecular de la tricoleucemia²⁰.

IMPORTANCIA CLÍNICA

El síndrome de Lynch se describió en los años 60 y se identificó una vinculación entre la pérdida de la función MMR y el cáncer²¹. La pérdida de las proteínas MMR (MLH1, PMS2, MSH2 o MSH6) puede dar lugar a inestabilidad del microsatélite (MSI) y un mayor riesgo de por vida no solo de padecer CRC, sino también cáncer de estómago, cerebral, de páncreas, de piel, endometrial o de ovario. Los pacientes con síndrome de Lynch tienen un riesgo de por vida de entre el 50 y el 80 % de padecer CRC^{5, 22, 23}. El síndrome de Lynch es único en comparación con otros tipos de síndromes de cáncer hereditarios, dado que las pruebas directas en los tejidos tumorales contribuyen a la identificación de aquellos pacientes que corren el riesgo de padecer el síndrome de Lynch y sirven de ayuda para fundamentar otras pruebas genéticas de estirpe germinal posteriores. Las familias con síndrome de Lynch pueden beneficiarse de los protocolos avanzados de diagnóstico de cáncer.

Varias directrices, como las pautas que brinda National Comprehensive Cancer Network (NCCN), recomiendan analizar todos los casos de CRC para detectar si existe síndrome de Lynch, a fin de identificar a pacientes y familias que puedan sacar partido de otras pruebas genéticas y de orientación adicional^{21, 24-27}. El panel VENTANA MMR IHC Panel sirve de ayuda para determinar el estado de MMR de los casos de CRC mediante la clasificación de la expresión de las proteínas MMR como intacta o perdida. La detección de las cuatro proteínas MMR en el tumor indica un estado MMR intacto o normal. La pérdida de la expresión de MLH1 o de MSH2 suele ir acompañada de la

pérdida de su par heterodímero, PMS2 o MSH6, respectivamente. Sin embargo, la pérdida de PMS2 o de MSH6 no da lugar a la pérdida de MLH1 o MSH2. La pérdida de PMS2, MSH2 y/o MSH6 es coherente con la posibilidad de padecer síndrome de Lynch, y debería derivarse a los pacientes para llevar a cabo más pruebas, así como ofrecer orientación consecuente con la práctica clínica.

La pérdida de la proteína MLH1 puede indicar un caso de origen esporádico o un posible síndrome de Lynch. En un 15 % o más de los casos de CRC esporádico, la pérdida de la proteína MLH1 se debe a la hipermetilación del promotor de *MLH1*^{5, 28, 29}. Cabe destacar que la mutación BRAF V600E se observa en aproximadamente dos tercios de los tumores con pérdida de la expresión de MLH1 a causa de la hipermetilación del promotor *MLH1*. Sin embargo, la mutación BRAF V600E casi nunca se observa en los tumores cuando existe síndrome de Lynch²⁸. Por lo tanto, si el resultado del anticuerpo VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (anticuerpo VENTANA anti-MLH1 (M1)) indica la pérdida de la proteína MLH1, el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) es capaz de diferenciar si el tumor es esporádico o existe posibilidad de que se presente el síndrome de Lynch^{5, 30}. En los casos de CRC, la pérdida de la proteína MLH1 con un estado de BRAF V600E positivo indica una gran probabilidad de que se trate de un tumor de origen esporádico, lo que elimina casi por completo la posibilidad de que la causa subyacente de la neoplasia maligna sea el síndrome de Lynch^{21, 31}. Cuando la pérdida de la proteína MLH1 va acompañada de un estado de BRAF V600E negativo, esta pérdida de MLH1 resulta coherente con una alta probabilidad de que exista síndrome de Lynch³².

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) es un anticuerpo monoclonal de ratón (clon VE1) dirigido contra un péptido sintético que representa la secuencia mutada de aminoácidos del gen BRAF desde el aminoácido 596 al 606 (GLATEKSRWSG). El anticuerpo específico de la mutación presenta un patrón de tinción citoplasmática. Este anticuerpo diferencia la mutación V600E en la proteína BRAF de la proteína BRAF natural y de otras proteínas BRAF con mutaciones.^{33,34}

En el contexto de las pruebas de IHC de reparación de los errores de emparejamiento (MMR) para detectar un posible síndrome de Lynch, la identificación de la mutación BRAF V600E en los casos con pérdida de la expresión de MLH1 indica un caso esporádico de cáncer colorrectal (CRC)³².

El anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) se une a la proteína BRAF V600E mutante de forma específica en secciones de tejido fijado con formol y embebido en parafina (FFPE). El anticuerpo se puede localizar mediante un anticuerpo secundario haptenado, seguido por un conjugado multimérico de peroxidasa de rábano (HRP) antihapteno (OptiView DAB IHC Detection Kit, n.º cat. 760-700 / 06396500001). El complejo anticuerpo-enzima específico se puede visualizar mediante un precipitado obtenido como producto de la reacción enzimática. En cada paso deben aplicarse con precisión tanto el tiempo como la temperatura de incubación. Cuando finaliza cada uno de los pasos de incubación, las secciones se enjuagan en el instrumento con el fin de detener la reacción y eliminar el material que no se ha ligado y que podría impedir la reacción que se quiere lograr en los pasos posteriores. Lo mismo sucede con ULTRA LCS (Predilute), (n.º de cat. 650-210 / 05424534001) o LCS (Predilute) (n.º de cat. 650-010 / 05264839001), que reducen al máximo la evaporación de los reactivos acuosos del portaobjetos que contiene la muestra.

MATERIAL SUMINISTRADO

El anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) contiene reactivo suficiente para 50 pruebas.

Un dispensador de 5 mL de anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) contiene aproximadamente 60 µg de anticuerpo monoclonal de ratón.

El anticuerpo se diluye en un tampón fosfato (pH 7.3) con una proteína transportadora, Brij 35, y ProClin 300 al 0.05 %, un conservante.

La concentración del anticuerpo específico es aproximadamente de 12 µg/mL.

El anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) es un anticuerpo monoclonal de ratón producido como sobrenadante de un cultivo celular purificado.

Consulte en la hoja de datos correspondiente del kit de detección de VENTANA las descripciones detalladas de: Principio del procedimiento, Material y métodos, Recogida y preparación de muestras para análisis, Procedimientos de control de calidad, Resolución de problemas, Interpretación de los resultados y Limitaciones.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

No se suministran reactivos de tinción como los kits de detección de VENTANA ni componentes auxiliares, incluyendo portaobjetos de control de tejido negativos y positivos.

No todos los productos que aparecen en la hoja de datos están disponibles en todos los lugares. Consulte al representante local de asistencia técnica de Roche.

No se suministran los reactivos y materiales siguientes, pero pueden ser necesarios para la tinción:

1. Tejido de control recomendado
2. Portaobjetos para microscopio con carga positiva
3. VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (n.º cat. 730-7159 / 09605584001 o n.º cat. 760-5091 / 08033668001)
4. VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody (n.º cat. 730-7158 / 09607161001 o n.º cat. 760-5094 / 08033692001)
5. VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody (n.º cat. 730-7160 / 09607137001 o n.º cat. 760-5093 / 08033684001)
6. VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (n.º cat. 730-7161 / 09606769001 o n.º cat. 760-5092 / 08033676001)
7. Negative Control (Monoclonal) (n.º cat. 760-2014 / 05266670001)
8. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (n.º cat. 790-4795 / 06683380001)
9. OptiView DAB IHC Detection Kit (n.º cat. 760-700 / 06396500001)
10. Para VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody, OptiView Amplification Kit (n.º cat. 760-099 / 06396518001 (50 pruebas) o n.º cat. 860-099 / 06718663001 (250 pruebas))
11. EZ Prep Concentrate (10X) (n.º cat. 950-102 / 05279771001)
12. Reaction Buffer Concentrate (10X) (n.º cat. 950-300 / 05353955001)
13. ULTRA LCS (Predilute) (n.º cat. 650-210 / 05424534001)
14. LCS (Predilute) (n.º cat. 650-010 / 05264839001)
15. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (n.º cat. 950-224 / 05424569001)
16. Cell Conditioning Solution (CC1) (n.º cat. 950-124 / 05279801001)
17. Hematoxylin II (n.º cat. 790-2208 / 05277965001)
18. Bluing Reagent (n.º cat. 760-2037 / 05266769001)
19. Medio de montaje permanente
20. Cubreobjetos de cristal
21. Montador automático
22. Equipo de laboratorio de uso general
23. Instrumento BenchMark IHC/ISH

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Tras la recepción y cuando no se utilice, consérvese entre 2 y 8 °C. No lo congele.

Para garantizar una dispensación adecuada del reactivo y la estabilidad del anticuerpo, vuelva a poner el tapón del dispensador después de cada uso y almacene inmediatamente el dispensador en la nevera, en posición vertical.

Todos los dispensadores de anticuerpos tienen una fecha de caducidad. Si se almacena correctamente, el reactivo se mantendrá estable hasta la fecha indicada en la etiqueta. No usar el reactivo después de la fecha de caducidad.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Los tejidos FFPE que se procesan de forma habitual resultan adecuados para su uso con este anticuerpo primario cuando se utilizan con OptiView DAB IHC Detection Kit y los instrumentos BenchMark IHC/ISH. El fijador de tejido recomendado es formol tamponado neutro al 10 %³⁵.

En el caso del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), se recomienda que se lleve a cabo la fijación de tejido en un plazo máximo de 2 horas tras la resección en formol tamponado neutro (NBF) al 10 % durante al menos 12 horas sobre la base de modelos de xenoinjerto generados a partir de las estirpes celulares humanas A2058 (melanoma) y LS411N (CRC), que son positivas en cuanto a la expresión de BRAF V600E. Sin embargo, los tiempos de fijación de hasta 72 horas en NBF al 10 % dieron lugar a resultados de tinción de BRAF V600E equivalentes. También se consiguió una tinción aceptable con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) mediante la fijación con formol-cinc durante un periodo de 12-72 horas.

Los fijadores alcohol-formol-ácido acético (AFA), etanol al 95 %, Z-5 y PREFER no se recomiendan para su uso con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). Los

tejidos de xenoinjerto fijados con alcohol-formol-ácido acético no presentaron tinción o esta fue variable.

La cantidad usada de fijador debe ser de entre 15 y 20 veces el volumen de tejido. Ningún fijador se infiltrará en tejido sólido de más de 2 o 3 mm ni en tejido poroso de 5 mm durante un periodo de 24 horas. La fijación se puede llevar a cabo a temperatura ambiente (de 15 a 25 °C).^{35,36}


Se deben realizar cortes de unas 4 µm de grosor y colocarse en portaobjetos con carga positiva. Los portaobjetos deben teñirse inmediatamente, ya que la antigenicidad de los cortes de tejido puede disminuir con el tiempo. Sin embargo, los portaobjetos con tejidos de CRC sin teñir almacenados a 5 ± 3 °C o 30 ± 5 °C durante un máximo de 8 semanas presentaron una intensidad de tinción similar con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) en comparación con las muestras de tejido que se prepararon a partir del mismo bloque y se tiñeron con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) el primer día. Solicite a su representante de servicio de Roche una copia de «Recommended Slide Storage and Handling» para obtener más información al respecto.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico in vitro (IVD).
2. Solo para uso profesional.
3. **PRECAUCIÓN:** En Estados Unidos, las normas nacionales restringen la venta de este dispositivo a médicos autorizados o por orden de estos. (Rx Only)
4. No utilizar por encima del número especificado de ensayos.
5. La solución ProClin 300 se utiliza como conservante en este reactivo. Está clasificada como irritante y puede ocasionar sensibilización por contacto con la piel. Adopte precauciones razonables cuando la manipule. Evite el contacto de reactivos con los ojos, la piel y las membranas mucosas. Utilice ropa protectora y guantes.
6. Los portaobjetos con carga positiva pueden verse afectados por presiones ambientales, dando lugar a una tinción incorrecta. Póngase en contacto con su representante de servicio de Roche para obtener más información sobre el uso de este tipo de portaobjetos.
7. Los materiales de origen animal o humano deben manipularse como materiales biopeligrosos para el medio ambiente y eliminarse con las precauciones adecuadas. En caso de exposición, deberán seguirse las directivas sanitarias de las autoridades responsables.^{37,38}
8. Evite el contacto de los reactivos con los ojos y las membranas mucosas. Si los reactivos entran en contacto con zonas sensibles, lávelas con agua abundante.
9. Evite la contaminación microbiana de los reactivos, dado que podría dar lugar a resultados incorrectos.
10. Para obtener más información sobre el uso de este dispositivo, consulte el Manual del usuario del instrumento BenchMark IHC/ISH y las instrucciones de uso de todos los componentes necesarios que puede encontrar en navifyportal.roche.com.
11. Consulte a las autoridades locales o nacionales sobre el método de eliminación recomendado.
12. El etiquetado de seguridad de los productos sigue principalmente las directrices del SGA de la UE. Está disponible bajo petición la hoja de datos de seguridad para los usuarios profesionales.
13. Para comunicar la sospecha de incidentes graves relacionados con este dispositivo, póngase en contacto con su representante local de servicio Roche y con las autoridades competentes del Estado o País Miembro de residencia del usuario.

Este producto contiene componentes clasificados como sigue de conformidad con el Reglamento (CE) n.º 1272/2008:

Tabla 1. Información de riesgos.

Riesgo	Código	Declaración
	H317	Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
	P261	Evite inhalar la niebla o los vapores.
	P272	Las prendas de trabajo contaminadas no podrán sacarse del lugar de trabajo.
	P280	Llevar guantes de protección.
	P333 + P313	En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

Riesgo	Código	Declaración
	P362 + P364	Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.
	P501	Eliminar el contenido/el recipiente en una planta de eliminación de residuos aprobada.

Este producto contiene CAS n.º 55965-84-9, una masa de reacción de 5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3-ona y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona (3:1).

PROCEDIMIENTO DE TINCIÓN

El anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) se ha desarrollado para su uso en los instrumentos BenchMark IHC/ISH junto con OptiView DAB IHC Detection Kit y sus reactivos auxiliares. Consulte la Tabla 2 para ver los protocolos de tinción recomendados.

Se desconoce el efecto que puede causar la variación del tiempo y la temperatura a la hora de recuperar el antígeno en la solidez del ensayo. Por lo tanto, de la variación de las condiciones recomendadas para la recuperación del antígeno que se recogen en el protocolo en cuanto a la tinción es desconocida y puede invalidar los resultados previstos. Deben emplearse los controles adecuados y documentarlos. Los usuarios que no sigan los protocolos recomendados deberán hacerse responsables de la interpretación de los resultados del paciente.

Los parámetros de los procedimientos automatizados se pueden mostrar, imprimir y editar según el procedimiento descrito en el Manual del usuario del instrumento. Consulte la hoja de datos de OptiView DAB IHC Detection Kit para obtener más detalles sobre los procedimientos de tinción de inmunohistoquímica.

Para obtener más información sobre el uso correcto de este dispositivo, consulte la hoja de datos del dispensador en línea asociado con P/N 760-5095.

Tabla 2. Protocolo de tinción recomendado para el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) con OptiView DAB IHC Detection Kit en instrumentos BenchMark IHC/ISH.

Tipo de procedimiento	Método		
	GX	XT	ULTRA o ULTRA PLUS
Desparafinado	Seleccionado	Seleccionado	Seleccionado
Acondicionamiento celular (desenmascaramiento del antígeno)	CC1 64 minutos	CC1 64 minutos	ULTRA CC1 64 minutos 100 °C
Inhibidor preprimario de peroxidasa	Seleccionado	Seleccionado	Seleccionado
Anticuerpo (Primario)	28 minutos, 37 °C	16 minutos, 37 °C	16 minutos, 36 °C
OptiView HQ Linker	8 minutos (predeterminado)		
OptiView HRP Multimer	8 minutos (predeterminado)		
Contratinción	Hematoxylin II, 4 minutos		
Post-contratinción	Bluing, 4 minutos		

Por lo tanto, la variación de las condiciones recomendadas, especialmente para la recuperación del antígeno, que se recogen en el protocolo puede invalidar los resultados previstos. Debido a variaciones en la fijación y el procesamiento del tejido, así como a las condiciones generales de los instrumentos y del entorno del laboratorio, puede que sea necesario aumentar o disminuir el tiempo de incubación del anticuerpo primario en función de las muestras particulares y de las preferencias del lector. Para obtener más información sobre las variables de fijación, consulte «Immunohistochemistry: Principles and Advances».³⁶

PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD

Control de reactivo negativo

Además de la tinción con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), se debe teñir un segundo portaobjetos con el reactivo de control negativo monoclonal de ratón Negative Control (Monoclonal). El control de reactivo negativo sirve para evaluar la tinción no

específica. Los parámetros de tinción del control de reactivo negativo deben ser idénticos a los establecidos para el anticuerpo primario.

Control de tejido positivo

Es necesario incluir un control de tejido positivo en cada sesión de procedimiento de tinción que se lleve a cabo. La práctica de laboratorio óptima consiste en incluir una sección de control positivo en el mismo portaobjetos que contiene el tejido del paciente. Esto contribuye a identificar fallos al aplicar los reactivos al portaobjetos. Un tejido con una tinción débil positiva es más adecuado para el control de calidad. Los componentes de tinción positiva del tejido sirven para comprobar que el anticuerpo se ha aplicado y el instrumento ha funcionado correctamente. El tejido de control puede contener elementos de tinción tanto positiva como negativa y ambos sirven como tejidos de control positivo y negativo. El tejido de control debe ser una muestra de autopsia reciente, biopsia o cirugía, preparada o fijada con la mayor brevedad con un proceso idéntico al de las secciones de prueba. Estos tejidos se utilizarán para hacer un seguimiento de todos los pasos que conlleva el proceso, desde la preparación del tejido hasta la tinción. El uso de una sección de tejido fijada o procesada de forma diferente a la muestra de la prueba actuará como control en todos los pasos de reactivo y del método, salvo en los de fijación y procesamiento de tejidos.

Los controles de tejido positivos conocidos solo se deben usar para monitorizar el comportamiento correcto de los reactivos de la prueba y de los tejidos procesados, y no como ayuda para establecer un diagnóstico específico de las muestras del paciente. Si los controles de tejido positivos no muestran una tinción positiva, los resultados de las muestras de la prueba se deben considerar no válidos.

Un control de tejido positivo adecuado sería un caso de CRC cualificado con anterioridad que tuviera resultado positivo para el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). El control de tejido positivo debería presentar una tinción citoplasmática de cualquier intensidad en las células tumorales viables sobre el fondo.

Control tisular negativo

Un control de tejido negativo adecuado sería un caso de CRC cualificado con anterioridad que tuviera resultado negativo para el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). Los controles de tejido negativos deberían utilizarse únicamente para monitorizar el rendimiento de los tejidos procesados, de los reactivos de la prueba y de los instrumentos, y no como ayuda para establecer un diagnóstico específico de las muestras del paciente.

Verificación del ensayo

Antes de comenzar a utilizar un anticuerpo o un sistema de tinción en un procedimiento diagnóstico, se debe comprobar la especificidad del anticuerpo mediante pruebas en una serie de tejidos que contengan características de rendimiento en inmunohistoquímica conocidas y que representen tejidos positivos y negativos a la mutación de BRAF V600E. Consulte los apartados anteriores de la presente sección Procedimientos de control de calidad del prospecto y las recomendaciones sobre control de calidad del College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist³⁹ o de la CLSI Approved Guideline⁴⁰.

INTERPRETACIÓN DE LAS TINCIONES Y RESULTADOS PREVISTOS

El patrón de tinción celular del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) es citoplasmático en las células tumorales. Los anatomopatólogos cualificados asignan un estado clínico a las muestras de CRC teñidas con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) en función de su evaluación de la presencia o ausencia de tinción citoplasmática específica en el tumor. Se asigna el estado clínico positivo a aquellos casos que presentan tinción citoplasmática inequívoca de cualquier intensidad en las células tumorales viables sobre el fondo. Se asigna el Estado clínico negativo a aquellos casos que no presentan tinción o la tinción citoplasmática es equívoca en las células tumorales viables. La tinción nuclear, una tinción de débil a fuerte en células tumorales viables aisladas y/o grupos pequeños de tumor debería considerarse negativa.

LIMITACIONES ESPECÍFICAS

Los efectos que puede producir la variación en el protocolo que se recomienda en la tinción son desconocidos y podría invalidar los resultados previstos. Se desaconseja el uso de los tampones ácidos por parte del usuario para la recuperación del antígeno, dado que este tipo de tampones pueden dar lugar a una tinción por debajo de su nivel óptimo que dificulte la interpretación.⁴¹ Aquellos usuarios que sigan el protocolo recomendado deberán hacerse responsables de la interpretación de los resultados del paciente.

Los casos con tinción con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) se clasifican como positivos o negativos en función de la presencia o la ausencia de tinción sobre toda

la zona tumoral. Es posible que el nivel de intensidad de la tinción varíe en las diferentes zonas del tumor; sin embargo, estas variaciones no tienen ninguna repercusión en el estado clínico de BRAF V600E.

Algunos casos pueden resultar especialmente complejos debido a los siguientes problemas:

- Se ha descubierto que el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) puede presentar, de forma ocasional, una tinción nuclear y citoplasmática débil en tejidos de músculo liso, en las células de Purkinje del cerebelo, en células epiteliales normales de colon, en enterocitos, en células intersticiales de testículos, en la glándula suprarrenal, en la glándula pituitaria, en estructuras acinosas del páncreas, en células glandulares del intestino y en algunas células tumorales; no obstante, este tipo de casos no se deberían considerar positivos en BRAF V600E⁴². Además, este anticuerpo produce una tinción moderada en las células neuroendocrinas de la glándula pituitaria. El anticuerpo también tiñe los cilios del pulmón.
- Fondo no específico: Algunas muestras pueden presentar tinción de fondo no específica por motivos que todavía no se conocen en profundidad. Por esta razón, en la evaluación del portaobjetos teñido con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) debe incluirse una comparación del portaobjetos con el portaobjetos teñido con control de reactivo negativo a fin de determinar el nivel de tinción de fondo no específica. Se ha observado de forma ocasional una tinción nuclear en células tumorales; no obstante, su importancia no se conoce en profundidad.
- Tejido o artefacto de tinción: Los artefactos histológicos que se originan en el procesamiento de las muestras y en los procedimientos de microtomía pueden dificultar la determinación del estado clínico del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). Entre estos artefactos figuran los gradientes de fijación y efectos periféricos, la captura de DAB, el burbujeo en el núcleo, la ausencia de tinción en algunas regiones del tejido, los desgarros o dobleces en el tejido y la pérdida de la sección de tejido. En algunos casos, es posible que sea necesario repetir la tinción de nuevas secciones o adquirir otra muestra.

Es posible que no estén todos los ensayos registrados en cada instrumento. Póngase en contacto con el representante local de servicio Roche para obtener más información.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

RENDIMIENTO DE ANÁLISIS

Se realizaron pruebas de tinción para evaluar la sensibilidad, especificidad y precisión y los resultados se indican a continuación.

Sensibilidad y especificidad

No se observaron tinciones no previstas con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) en tejidos normales o neoplásicos, a excepción de las que se han recogido en la sección Limitaciones específicas.

Tabla 3. La sensibilidad/especificidad del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) se determinó analizando tejidos normales FFPE.

Tejido	N.º de casos positivos/total	Tejido	N.º de casos positivos/total
Cerebro	0/3	Esófago	0/3
Cerebelo *	1/3	Estómago	0/3
Glándula suprarrenal	0/3	Intestino delgado *	2/4
Ovario	0/3	Colon *	5/12
Páncreas *	2/3	Hígado	0/3
Ganglio linfático	0/3	Glándula salival/lingual	0/3
Glándula pituitaria **	3/3	Riñón	0/3
Testículos *	2/3	Próstata	0/3
Tiroides	0/3	Vejiga	0/3
Mama	0/3	Glándula paratiroidea	0/3

Tejido	N.º de casos positivos/total	Tejido	N.º de casos positivos/total
Bazo	0/3	Endometrio	0/3
Amígdala	0/3	Cuello del útero	0/3
Timo	0/3	Músculo esquelético	0/3
Médula ósea	0/3	Piel	0/3
Pulmón	0/3	Nervio	0/5
Corazón	0/3	Mesotelio	0/3

* Tinción nuclear y citoplasmática débil en las células de Purkinje del cerebelo, en músculo liso y en células epiteliales normales de colon, en células glandulares del intestino, en estructuras acinosas del páncreas y en células intersticiales de los testículos.

** Observación de tinción moderada en células neuroendocrinas de la glándula pituitaria.

En todos los tejidos, la tinción positiva y negativa se determinó en los elementos específicos del tejido y esos casos no deberían considerarse positivos en cuanto al Estado clínico de BRAF V600E.¹⁶

Tabla 4. La sensibilidad/especificidad del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) se determinó analizando una variedad de tejidos neoplásicos FFPE.

Patología	N.º de casos positivos/total
Glioblastoma (cerebro)	0/1
Meningioma (cerebro)	0/1
Ependimoma (cerebro)	0/1
Oligodendroglioma (cerebro)	0/1
Adenocarcinoma seroso (ovario)	0/1
Adenocarcinoma (ovario)	0/1
Neoplasia neuroendocrina (páncreas)	0/1
Seminoma (testículos)	0/2
Carcinoma medular (tiroides)	0/1
Carcinoma papilar (tiroides)	21/28
Carcinoma ductal in situ (mama)	0/1
Carcinoma ductal microinvasivo (mama)	0/1
Carcinoma ductal invasivo (mama)	3/131
Linfoma de linfocitos B; sin especificar (bazo)	0/1
Carcinoma de células pequeñas (pulmón)	0/7
Carcinoma de células escamosas (pulmón)	0/90
Adenocarcinoma (pulmón)	1/73
Carcinoma neuroendocrino (esófago)	0/1
Adenocarcinoma (esófago)	0/1

Patología	N.º de casos positivos/total
Carcinoma de células en anillo de sello (Estómago)	0/1
Adenocarcinoma (intestino delgado)	0/1
Sarcoma estromal (intestino delgado)	1/1
Adenocarcinoma (colon)	64/234
Tumor estromal gastrointestinal (GIST) (colon)	0/1
Adenocarcinoma (recto)	0/1
GIST (recto)	0/1
Melanoma (recto)	0/1
Carcinoma hepatocelular (hígado)	0/1
Hepatoblastoma (hígado)	0/1
Carcinoma de células claras (riñón)	0/1
Adenocarcinoma (próstata)	0/2
Adenocarcinoma (útero)	0/1
Carcinoma de células claras (útero)	0/1
Carcinoma de células escamosas (cuello uterino)	0/2
Rabdomiosarcoma embrionario (músculo estriado)	0/1
Melanoma	10/24
Carcinoma de células basales (piel)	0/1
Carcinoma de células escamosas (piel)	0/1
Neuroblastoma (retroperitoneo)	0/1
Mesotelioma (peritoneo)	0/1
Rabdomiosarcoma de células fusiformes (peritoneo)	0/1
Linfoma de linfocitos B, sin especificar (ganglio linfático)	0/2
Linfoma de Hodgkin (ganglio linfático)	1/1
Carcinoma urotelial (vejiga)	0/1
Leiomiomasarcoma (vejiga)	0/1
Osteosarcoma (hueso)	0/1
Leiomiomasarcoma (músculo liso)	0/1

Precisión

Características de rendimiento en el instrumento BenchMark ULTRA

Repetibilidad dentro del análisis y precisión intermedia entre días

Se han evaluado la repetibilidad y la precisión del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) en el instrumento BenchMark ULTRA junto con OptiView DAB IHC Detection Kit.

La repetibilidad dentro del análisis se evaluó mediante 10 muestras de CRC (5 con estado clínico positivo de BRAF V600E y 5 con estado clínico negativo). Se tiñeron cinco portaobjetos replicados de cada muestra de CRC con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) en un solo instrumento BenchMark ULTRA en un solo día. Cada uno de los portaobjetos teñidos con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) se emparejó

con un portaobjetos teñido con el control de reactivo negativo del mismo caso. Todos los conjuntos de portaobjetos se aleatorizaron y un solo anatomopatólogo los evaluó para asignar los estados positivo o negativo sin tener conocimiento de los diagnósticos de los casos.

La precisión intermedia entre días también se evaluó mediante 10 muestras de CRC (5 con Estado clínico positivo de BRAF V600E y 5 con Estado clínico negativo). Se tiñeron portaobjetos replicados de cada muestra de CRC con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) en un instrumento BenchMark ULTRA cada uno de los 5 días no consecutivos. Además, se tiñó un solo portaobjetos de cada caso con un control de reactivo negativo. Cada uno de los portaobjetos teñidos con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) se emparejó con un portaobjetos teñido con el control de reactivo negativo del mismo caso. Todos los conjuntos de portaobjetos se aleatorizaron y un solo anatomopatólogo los evaluó para asignar los estados positivo o negativo sin tener conocimiento de los diagnósticos de los casos.

Ninguno de los portaobjetos teñidos con el control de reactivo negativo mostraba tinción específica y la tinción de fondo era ≤ 0.5 . Mediante los datos combinados de todos los emparejamientos posibles, ambos estudios, el de repetibilidad dentro del análisis y el de precisión intermedia entre días, presentaron un porcentaje de concordancia positiva del 100 % (PPA), un porcentaje de concordancia negativa del 100 % (NPA) y un porcentaje de concordancia global del 100 % (OPA). En la Tabla 5 se resumen los resultados.

Tabla 5. Repetibilidad dentro del análisis y precisión intermedia entre días del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) en el instrumento BenchMark ULTRA usando el estado clínico (positivo o negativo) como parámetro de medida.

Repetibilidad/ Precisión	Estado clínico	Concordancia			
		Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Repetibilidad dentro del análisis	Positivo	PPA	25/25	100.0	(86.7, 100.0)
	Negativo	NPA	25/25	100.0	(86.7, 100.0)
	Total	OPA	50/50	100.0	(92.9, 100.0)
Precisión intermedia entre días	Positivo	PPA	50/50	100.0	(92.9, 100.0)
	Negativo	NPA	50/50	100.0	(92.9, 100.0)
	Total	OPA	100/100	100.0	(96.3, 100.0)

Nota: Los datos de CI del 95 % se calcularon mediante el método de puntuación de Wilson.

Precisión intermedia entre instrumentos

La precisión intermedia entre instrumentos del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) en el instrumento BenchMark ULTRA se determinó mediante la tinción de portaobjetos replicados de 10 muestras de CRC (5 con estado clínico positivo de BRAF V600E y 5 con estado negativo) en 3 instrumentos BenchMark ULTRA con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) y el kit OptiView DAB IHC Detection Kit. Además, se tiñó un solo portaobjetos de cada caso con un control de reactivo negativo.

Cada uno de los portaobjetos teñidos con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) se emparejó con un portaobjetos teñido con el control de reactivo negativo del mismo caso. Todos los conjuntos de portaobjetos se aleatorizaron y un solo anatomopatólogo los evaluó para asignar el estado clínico (positivo/negativo) sin tener conocimiento de los diagnósticos de los casos. Ninguno de los portaobjetos teñidos con el control de reactivo negativo mostraba tinción específica y la tinción de fondo era ≤ 0.5 .

Para estudiar la precisión intermedia entre instrumentos en el instrumento BenchMark ULTRA, se llevaron a cabo comparaciones entre pares del Estado clínico de los portaobjetos de cada muestra entre instrumentos, que dieron como resultado unos porcentajes de PPA, NPA y OPA del 100 %. En la Tabla 6 se resumen los resultados.

Tabla 6. Precisión intermedia entre instrumentos del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) en el instrumento BenchMark ULTRA usando el estado clínico (positivo o negativo) como parámetro de medida.

Precisión	Estado clínico	Concordancia			
		Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Precisión intermedia entre instrumentos	Positivo	PPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	Negativo	NPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	Total	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)

Nota: Los datos de CI del 95 % se calcularon mediante el método de puntuación de Wilson.

Además, la precisión intermedia entre instrumentos del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) se determinó mediante la tinción de portaobjetos replicados de 6 muestras (2 de CRC con estado clínico negativo y 2 de CRC y 2 de cáncer de tiroides con estado clínico positivo en BRAF V600E) en 3 instrumentos BenchMark XT y en 3 instrumentos BenchMark GX con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) y el kit OptiView DAB IHC Detection Kit.

Cuando se combinaron los datos de los 3 instrumentos, se obtuvieron 15 observaciones por caso; la mediana de cada caso se determinó a partir de estas 15 observaciones. Las observaciones individuales de ese mismo caso se consideraron concordantes con la mediana de la intensidad de la señal del caso si estaban dentro de la intensidad de la señal de 0.5. Para estudiar la precisión intermedia entre instrumentos en los instrumentos BenchMark XT y BenchMark GX, se llevaron a cabo comparaciones entre pares de las puntuaciones de intensidad de la tinción de los portaobjetos, que dieron como resultado un valor de OPA del 98.9 % entre los 3 instrumentos BenchMark XT y un valor de OPA del 100 % entre los 3 instrumentos BenchMark GX. Ninguno de los portaobjetos teñidos con el control de reactivo negativo mostró tinción específica y la tinción de fondo fue ≤ 0.5 en ambos instrumentos (BenchMark XT y BenchMark GX).

Concordancia entre instrumentos BenchMark IHC/ISH

La concordancia entre instrumentos BenchMark IHC/ISH para el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) se determinó mediante la tinción de muestras de CRC, cáncer de tiroides y melanoma con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) junto con OptiView DAB IHC Detection Kit. Un solo anatomopatólogo fue el encargado de evaluar todos los portaobjetos para determinar el estado clínico (positivo/negativo).

Se llevaron a cabo comparaciones de pares del Estado clínico del total de las 228 muestras (177 de CRC, 27 de cáncer de tiroides y 24 de melanomas) entre los instrumentos BenchMark GX y BenchMark ULTRA y los instrumentos BenchMark XT y BenchMark ULTRA. La comparación de los instrumentos BenchMark GX y BenchMark ULTRA dio como resultado un promedio de concordancia positiva (APA) del 98.0 %, un promedio de concordancia negativa (ANA) del 99.0 % y un OPA del 98.7 %. La comparación de los instrumentos BenchMark XT y BenchMark ULTRA dio como resultado un promedio de concordancia positiva (APA) del 96.6 %, un promedio de concordancia negativa (ANA) del 98.4 % y un OPA del 97.8 %. En el caso de los instrumentos BenchMark GX y BenchMark XT, las comparaciones entre pares del total de 230 muestras (179 de CRC, 27 de cáncer de tiroides y 24 de melanoma) se llevaron a cabo entre plataformas. La comparación de los instrumentos BenchMark GX y BenchMark XT dio como resultado un APA del 98.7 %, un ANA del 99.4 % y un OPA del 99.1 %.

Estudios de precisión del lector

Se evaluó la precisión en un mismo lector y entre lectores mediante 20 muestras de CRC (10 casos positivos de mutación BRAF V600E y 10 casos negativos de mutación BRAF V600E) teñidas con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) junto con OptiView DAB IHC Detection Kit en un instrumento BenchMark ULTRA. Cada uno de los portaobjetos teñidos con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) se emparejó con un portaobjetos teñido con el control de reactivo negativo y con H y E del mismo caso.

Todos los conjuntos de portaobjetos se aleatorizaron y fueron evaluados por tres anatomopatólogos para determinar el estado clínico de BRAF V600E como positivo o negativo. Los diagnósticos de los casos estaban enmascarados. Tras un periodo de reposo de dos semanas, los portaobjetos teñidos con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) se volvieron a aleatorizar para someterlos a una segunda evaluación de determinación del estado clínico de BRAF V600E, que llevaron a cabo los tres

anatomopatólogos. Ninguno de los portaobjetos teñidos con el control de reactivo negativo mostró tinción específica; asimismo, la tinción de fondo fue ≤ 0.5 .

Para estudiar la precisión en un mismo lector se compararon las evaluaciones de los portaobjetos iniciales y finales de un solo anatomopatólogo de un total de 20 comparaciones de portaobjetos de CRC por anatomopatólogo. Los datos de las comparaciones de los tres anatomopatólogos se combinaron y dieron como resultado un APA del 100 %, un ANA del 100 % y un OPA del 100 % en cuanto a la precisión en un mismo lector. En la Tabla 7 se resumen los resultados.

En el estudio de precisión entre lectores se compararon todas las evaluaciones de los portaobjetos (20 muestras de CRC x 2 evaluaciones/caso x 3 anatomopatólogos = 120 evaluaciones de portaobjetos) con un estado de caso modal en cada caso de CRC. El resultado de la precisión entre lectores fue del 100 % en el caso del PPA, del NPA y del OPA. En la Tabla 7 se resumen los resultados.

Tabla 7. Precisión en un mismo lector y entre lectores del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) en casos de CRC usando el estado clínico de BRAF V600E (positivo o negativo) como parámetro de medida.

Precisión	Estado clínico	Concordancia			
		Tipo	n/N	%	CI del 95 %
En un mismo lector	Positivo	APA	60/60	100.0	(93.9, 100.0)
	Negativo	ANA	60/60	100.0	(93.9, 100.0)
	Total	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)
Entre lectores	Positivo	PPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)
	Negativo	NPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)
	Total	OPA	120/120	100.0	(96.9, 100.0)

Nota: En el estudio de precisión en un mismo lector, los CI del 95 % de los índices APA y ANA se calcularon mediante el método de Clopper-Pearson; el CI del 95 % del índice OPA se calculó mediante el método bootstrap percentil. Los datos de CI del 95 % del estudio de precisión entre lectores se calcularon mediante el método de puntuación de Wilson.

Precisión entre lotes

La precisión entre lotes del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) se determinó mediante el análisis de 3 lotes de producción del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), cada uno en portaobjetos por triplicado de 10 muestras de CRC (5 con mutación BRAF V600E positiva y 5 con mutación negativa) en un instrumento BenchMark ULTRA junto con OptiView DAB IHC Detection Kit.

Cada uno de los portaobjetos teñidos con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) se emparejó con un portaobjetos teñido con el control de reactivo negativo del mismo caso. Todos los conjuntos de portaobjetos se aleatorizaron y fueron evaluados por un solo anatomopatólogo que no conocía los diagnósticos de los casos ni el número de lote del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). Ninguno de los portaobjetos teñidos con el control de reactivo negativo mostró tinción específica; asimismo, la tinción de fondo fue ≤ 0.5 .

En el caso del estudio de precisión entre lotes del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), el estado clínico de BRAF V600E obtenido a partir de la evaluación de cada portaobjetos se comparó con el estado del caso modal de ese caso. Los índices OPA, PPA y NPA para los lotes del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) fueron del 100 %, lo que demostró que la tinción con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) se puede reproducir con todos los lotes de anticuerpos.

En la Tabla 8 se muestra un resumen de los resultados del estudio de precisión entre lotes del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1).

Tabla 8. Precisión entre lotes del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) usando el estado clínico (positivo o negativo) como parámetro de medida.

Precisión	Estado clínico	Concordancia			
		Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Entre lotes	Positivo	PPA	45/45	100.0	(92.1, 100.0)

Precisión	Estado clínico	Concordancia			
		Tipo	n/N	%	CI del 95 %
	Negativo	NPA	45/45	100.0	(92.1, 100.0)
	Total	OPA	90/90	100.0	(95.9, 100.0)

Nota: Los datos de CI del 95 % se calcularon mediante el método de puntuación de Wilson.

Estudio de reproducibilidad entre laboratorios

Se llevó a cabo un estudio de reproducibilidad entre laboratorios del panel VENTANA MMR IHC Panel para demostrar la reproducibilidad de cada ensayo VENTANA MMR IHC Panel a la hora de determinar el Estado clínico. En el estudio se incluyeron 6 muestras de tejido de CRC (3 intactas y 3 con pérdida) para cada proteína MMR y 16 muestras de tejido de CRC (8 positivas y 8 negativas) para el análisis de BRAF V600E en 3 instrumentos BenchMark ULTRA en cada uno de los 5 días no consecutivos de un periodo de 21 días en tres laboratorios externos. Cada uno de los portaobjetos teñidos con el anticuerpo se emparejó con un portaobjetos teñido con el control de reactivo negativo y con H y E del mismo caso. Todos los conjuntos de portaobjetos se aleatorizaron y fueron evaluados por un total de 6 lectores (2 lectores por sitio) que no conocían el estado clínico de MMR del conjunto del estudio. Entre todos los días, sitios y lectores, se realizaron 30 observaciones para cada uno de los 40 casos del estudio. El estado de referencia del caso modal se derivó a cada caso en función del estado más recurrente de las 30 observaciones. En el estudio se incluyeron un total de 1200 observaciones de las cinco proteínas. En todos los casos que se podían evaluar, la tasa de aceptabilidad en cuanto a morfología y fondo del estudio fue del 100 %. En la Tabla 9 se muestra un resumen de las estadísticas de concordancia combinadas (de las cinco proteínas) entre el estado de referencia del caso modal y las observaciones individuales.

Tabla 9. Concordancia entre VENTANA MMR IHC Panel y el estado de referencia del caso modal.

Reproducibilidad entre laboratorios	Estado clínico	Concordancia			
		Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Todas las proteínas	Intacta/positivo	PPA	598/600	99.8	(98.7, 100.0)
	Perdida/negativo	NPA	593/600	98.9	(97.4, 99.5)
	Total	OPA	1191/1200	99.4	(98.6, 99.7)

Nota: El estado clínico se define como intacto o con pérdida en lo referente a la expresión de las proteínas MMR y como positivo o negativo en el caso de la proteína BRAF V600E. Los CI del 95 % se calcularon mediante un enfoque de modelo mixto lineal generalizado (GLMM).

Además, las comparaciones entre pares se llevaron a cabo entre sitios, entre días y entre lectores para el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). En el caso de BRAF V600E, en el conjunto del estudio se incluyeron un total de 480 observaciones. En la Tabla 10 se resumen los resultados. Los datos indican una reproducibilidad del ensayo en 5 días, 3 sitios y 6 lectores.

Tabla 10. Índices de concordancia entre pares de reproducibilidad entre laboratorios del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) usando el estado clínico (positivo o negativo) como parámetro de medida.

Reproducibilidad entre laboratorios		Concordancia			
		Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Entre sitios (3 sitios)		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)
	Sitio A	APA	320/320	100.0	(98.8, 100.0)

Reproducibilidad entre laboratorios		Concordancia			
		Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Entre días (5 días no consecutivos)		ANA	320/320	100.0	(98.8, 100.0)
		OPA	320/320	100.0	(98.8, 100.0)
	Sitio 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)
	Sitio 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)
	Entre lectores (2 anatomopatólogos por sitio)	APA	242/243	99.6	(98.8, 100.0)
ANA		236/237	99.6	(98.7, 100.0)	
OPA		239/240	99.6	(98.8, 100.0)	

Nota: Los datos de CI del 95 % se calcularon mediante el método bootstrap percentil; en aquellos casos en los que la estimación de punto fue del 100 %, se utilizó el método de puntuación de Wilson.

Características de rendimiento en el instrumento BenchMark ULTRA PLUS

Repetibilidad en el mismo día y precisión entre días

La repetibilidad en el mismo día (dentro del análisis) se evaluó mediante 10 muestras de CRC (5 con Estado clínico positivo de BRAF V600E y 5 con Estado clínico negativo). Se tiñeron cinco portaobjetos replicados de cada muestra de CRC con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) en un solo instrumento BenchMark ULTRA PLUS en un solo día. Cada uno de los portaobjetos teñidos con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) se emparejó con un portaobjetos teñido con el control de reactivo negativo del mismo caso. Todos los pares de portaobjetos se aleatorizaron y un solo anatomopatólogo los evaluó para asignar los estados positivo o negativo sin tener conocimiento de los diagnósticos de los casos.

La precisión intermedia entre días también se evaluó mediante 10 muestras de CRC (5 con Estado clínico positivo de BRAF V600E y 5 con Estado clínico negativo). Se tiñeron portaobjetos replicados de cada muestra de CRC con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) en un solo instrumento BenchMark ULTRA PLUS cada uno de los 5 días no consecutivos. Además, se tiñó un solo portaobjetos de cada caso con un control de reactivo negativo. Cada uno de los portaobjetos teñidos con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) se emparejó con un portaobjetos teñido con el control de reactivo negativo del mismo caso. Todos los pares de portaobjetos se aleatorizaron y un solo anatomopatólogo los evaluó para asignar los estados positivo o negativo sin tener conocimiento de los diagnósticos de los casos.

Ninguno de los portaobjetos teñidos con el control de reactivo negativo mostró tinción específica; asimismo, la tinción de fondo fue ≤ 0.5 . Mediante los datos combinados de todos los emparejamientos posibles, ambos estudios, el de repetibilidad en el mismo día y el de precisión entre días, presentaron un porcentaje de concordancia positiva del 100 % (PPA), un porcentaje de concordancia negativa del 100 % (NPA) y un porcentaje de concordancia global del 100 % (OPA). En la Tabla 11 se facilita un resumen de los resultados.

Tabla 11. Repetibilidad en el mismo día y precisión entre días del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) en el instrumento BenchMark ULTRA PLUS usando el estado clínico (positivo o negativo) como parámetro de medida.

Repetibilidad/ Precisión	Estado clínico	Concordancia			
		Tipo	n/N	%	CI del 95 %
	Positivo	PPA	25/25	100.0	(86.7,100.0)

Repetibilidad/ Precisión	Estado clínico	Concordancia			
		Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Repetibilidad en el mismo día	Negativo	NPA	25/25	100.0	(86.7,100.0)
	Total	OPA	50/50	100.0	(92.9,100.0)
Precisión entre días	Positivo	PPA	50/50	100.0	(92.9,100.0)
	Negativo	NPA	48/48	100.0	(92.6,100.0)
	Total	OPA	98/98	100.0	(96.2,100.0)

Nota: Los datos de CI del 95 % se calcularon mediante el método de puntuación de Wilson.

Precisión entre instrumentos en el instrumento BenchMark ULTRA PLUS

La precisión intermedia entre instrumentos del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) en el instrumento BenchMark ULTRA PLUS se determinó mediante la tinción de portaobjetos replicados de 10 muestras de CRC (5 con estado clínico de BRAF V600E positivo y 5 con estado negativo) en 3 instrumentos BenchMark ULTRA PLUS con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) y OptiView DAB IHC Detection Kit. Además, se tiñó un solo portaobjetos de cada caso con un control de reactivo negativo.

Cada uno de los portaobjetos teñidos con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) se emparejó con un portaobjetos teñido con el control de reactivo negativo del mismo caso. Todos los pares de portaobjetos se aleatorizaron y un solo anatomopatólogo los evaluó para asignar el estado clínico (positivo/negativo) sin tener conocimiento de los diagnósticos de los casos. Ninguno de los portaobjetos teñidos con el control de reactivo negativo mostró tinción específica; asimismo, la tinción de fondo fue ≤ 0.5 .

Para estudiar la precisión entre instrumentos en el instrumento BenchMark ULTRA PLUS, se llevaron a cabo comparaciones entre pares del Estado clínico de los portaobjetos de cada muestra entre instrumentos, que dieron como resultado unos porcentajes de PPA, NPA y OPA del 100 %. En la Tabla 12 se resumen los resultados.

Tabla 12. Precisión entre instrumentos del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) en el instrumento BenchMark ULTRA PLUS usando el estado clínico (positivo o negativo) como parámetro de medida.

Precisión	Estado clínico	Concordancia			
		Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Entre instrumentos	Positivo	PPA	30/30	100.0	(88.6,100.0)
	Negativo	NPA	30/30	100.0	(88.6,100.0)
	Total	OPA	60/60	100.0	(94.0,100.0)

Nota: Los datos de CI del 95 % se calcularon mediante el método de puntuación de Wilson.

Concordancia entre plataformas para los instrumentos BenchMark ULTRA PLUS y BenchMark ULTRA

Se llevó a cabo un estudio para comparar el rendimiento de tinción del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) con OptiView DAB IHC Detection Kit en el instrumento BenchMark ULTRA PLUS frente al instrumento BenchMark ULTRA. Se tiñeron ciento veinte (120) casos de tejido de carcinoma colorrectal (14 positivos en BRAF V600E, 13 negativos en BRAF V600E y 93 con todas las MMR) y un anatomopatólogo evaluó los portaobjetos con tinción para determinar el estado de diagnóstico. El porcentaje de concordancia global fue del 98.3 %. Todos los tejidos teñidos con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) tuvieron una morfología y una tinción de fondo aceptables. En la Tabla 13 se facilita un resumen de los resultados.

Tabla 13. Concordancia del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) en el instrumento BenchMark ULTRA PLUS en comparación con el instrumento BenchMark ULTRA usando el estado clínico (positivo o negativo) como parámetro de medida.

Concordancia entre plataformas	Concordancia			
	Tipo	n/N	%	CI del 95 %
ULTRA frente a 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)

Nota: Los datos de CI del 95 % se calcularon mediante el método de puntuación de Wilson.

Estudio de exactitud: comparación de métodos con los resultados de VENTANA MMR IHC Panel y el análisis molecular (secuenciación de ADN e hipermetilación del promotor de MLH1)

Se llevó a cabo un estudio para comparar el rendimiento de VENTANA MMR IHC Panel con el análisis molecular, que incluía un panel de detección del cáncer de colon mediante una secuenciación completa de ADN identificar los CRC que: (i) tienen una deficiencia de MMR (dMMR); y (ii) contienen la mutación *BRAF V600E*. El panel de detección del cáncer de colon por secuenciación de ADN incorporaba el análisis genómico de las variantes presentes en los genes MMR (*MLH1*, *PMS2*, *MSH2*, *MSH6* y *EPCAM*), *BRAF* y otros genes importantes para la carcinogénesis (por ejemplo, *PIK3CA*, *KRAS*, *NRAS*, *ERBB2*, etc.). La secuenciación incluyó todos los exones, fragmentos intrónicos y secuencias flanqueadoras, así como deleciones importantes, duplicaciones y mosaicismos.

En el estudio, los casos secuenciales de CRC se tiñeron con H y E y fueron evaluados a fin de obtener indicaciones sobre la fijación adecuada y la morfología, incluida la presencia de elementos celulares (células tumorales y de control interno). Cada caso se evaluó para determinar si la muestra contenía un mínimo de un 50 % de contenido tumoral de forma que facilitase suficiente representación de células tumorales en la muestra tal y como se recomienda de cara al análisis molecular. Tras la revisión, 105 casos secuenciales que cumplían con estos criterios se incluyeron en el estudio. Además, otros 13 casos de CRC que presentaban un Estado clínico Pérdida mediante IHC se incluyeron para garantizar que el estado Pérdida de cada marcador estuviese representado en el estado. Las secciones de todos los casos del estudio se tiñeron mediante IHC con el panel VENTANA MMR IHC Panel y los controles de reactivo negativo correspondientes. Se sometieron secciones adicionales a una secuenciación de ADN con el panel de colon. La hipermetilación del promotor de *MLH1* es uno de los mecanismos que pueden dar lugar a la pérdida de la expresión de la proteína *MLH1* y está asociada al CRC esporádico, más que a un diagnóstico de posible síndrome de Lynch. Por lo tanto, todos los casos de pérdida de expresión de *MLH1* que se identificaron mediante IHC en el estudio se analizaron para comprobar si existía hipermetilación del promotor de *MLH1*.

En el conjunto final del estudio de 118 casos, se incluyeron en el análisis los índices PPA y NPA de todos los marcadores combinados (es decir, todas las observaciones agrupadas), y el análisis molecular sirvió como estado de referencia para la comparación con las pruebas de IHC. En el análisis se incluyó una comparación del estado de la proteína MMR (intacto/con pérdida) con el estado molecular, que se definió como normal (sin mutaciones patógenas, negativo en hipermetilación del promotor de *MLH1* y con *BRAF* natural (sin mutación *V600E*)) o anómalo (con presencia de mutaciones patógenas, positivo en hipermetilación del promotor de *MLH1* y positivo en la mutación *BRAF V600E*). A efectos de este estudio, la mutación patógena dentro del tumor se definió como una mutación somática o hereditaria que se prevé que vaya a dar lugar a la pérdida de la expresión de la proteína MMR. Las estimaciones puntuales fueron del 99.4 % para la PPA, del 93.5 % para la NPA y del 98.8 % para la OPA, tal y como se muestra en la Tabla 14.

También se llevó a cabo un análisis combinado que comparó los cuatro marcadores de IHC de MMR (sin el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) con los resultados del análisis molecular. Las estimaciones puntuales fueron del 99.3 % para la PPA, del 89.7 % para la NPA y del 98.5 % para la OPA, tal y como se resume en la Tabla 15.

En un análisis adicional se llevó a cabo la comparación de los resultados de los cuatro marcadores de IHC de MMR con los resultados del análisis molecular de los genes MMR a nivel de caso para incorporar el estado de todos los marcadores y generar un resultado

dMMR/pMMR para ambos métodos. En la Tabla 16 se muestra este análisis, que presentó un 97.4 % de OPA entre ambos métodos.

El estado de MMR obtenido mediante IHC y el estado de MMR obtenido mediante análisis molecular también se compararon en el caso de los marcadores individuales de MMR dentro del estudio. La OPA de cada marcador de MMR, en comparación con los resultados combinados del panel de detección del cáncer de colon por secuenciación de ADN y el análisis de hipermetilación del promotor de *MLH1*, fue del 100.0 % para el anticuerpo VENTANA anti-*MLH1* (M1), del 99.1 % para VENTANA anti-*PMS2* (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody, del 98.3 % para VENTANA anti-*MSH2* (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody y del 96.6 % para VENTANA anti-*MSH6* (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody.

El estado clínico de *BRAF V600E* en los CRC que se obtuvo mediante IHC con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) se comparó a su vez con los resultados del estado mutacional de *BRAF* determinados a través de la secuenciación de ADN. Los índices PPA, NPA y OPA del análisis mediante IHC con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) utilizando la secuenciación de ADN como referencia fueron del 100 % (Tabla 17). Se llevaron a cabo pruebas adicionales para verificar la capacidad del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) de estratificar aún más los casos de CRC que mostraban una pérdida de la expresión de la proteína *MLH1*. De los 23 casos positivos en *BRAF V600E*, en 20 casos se observó la pérdida de la proteína *MLH1* mediante IHC y el resultado de hipermetilación del promotor de *MLH1* fue positivo. Estos datos resultan coherentes con la estrecha asociación del estado positivo de *BRAF V600E* con el estado de hipermetilación del promotor de *MLH1*. Los otros tres casos restantes fueron pMMR (la expresión de todas las proteínas MMR estaba intacta). Todas las muestras positivas en *BRAF V600E* se identificaron como CRC esporádico. Los resultados verificaron que el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) identifica correctamente los CRC que contienen la mutación *BRAF V600E*. Los datos también respaldan el uso del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) para diferenciar los casos de CRC esporádicos de aquellos con probable síndrome de Lynch en ausencia de expresión de *MLH1*.

Tabla 14. Análisis combinado para determinar la concordancia de VENTANA MMR IHC Panel entre las pruebas de IHC y el análisis molecular.

Estado* (Molecular/IHC)	Concordancia			
	Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Normal/Intacta	PPA	523/526	99.4	(98.7, 100.0)
Anómalo/Pérdida	NPA	58/62	93.5	(87.1, 98.6)
Total	OPA	581/588	98.8	(98.0, 99.7)

* En el caso de la IHC, el estado de MMR es intacto o con pérdida en cuanto a la expresión de la proteína. En este análisis, los casos positivos y negativos en *BRAF V600E* se incluyeron en las categorías de estado intacto y con pérdida, respectivamente. El análisis molecular indica ausencia (normal) o presencia (anómalo) de mutaciones posiblemente patógenas o hipermetilación del promotor de *MLH1*. Los datos de CI del 95 % se calcularon mediante el método bootstrap percentil.

Tabla 15. Análisis combinado para determinar la concordancia de cuatro marcadores de IHC de MMR (sin el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) entre las pruebas de IHC y el análisis molecular.

Estado* (análisis molecular/IHC)	Concordancia			
	Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Normal/Intacta	PPA	428/431	99.3	(98.4, 100.0)
Anómalo/Pérdida	NPA	35/39	89.7	(79.4, 97.7)
Total	OPA	463/470	98.5	(97.3, 99.6)

*En el caso de la IHC, el estado es Intacta o Pérdida en cuanto a la expresión de la proteína. El análisis molecular indica ausencia (normal) o presencia (anómalo) de mutaciones posiblemente patógenas o hipermetilación del promotor de *MLH1*. Los datos de CI del 95 % se calcularon mediante el método bootstrap percentil.

Tabla 16. Concordancia entre los cuatro marcadores de IHC de MMR y los resultados del análisis molecular para obtener el estado de MMR (dMMR/pMMR).

Estado de MMR*	Concordancia			
	Tipo	n/N	%	CI del 95 %
pMMR	PPA	79/80	98.8	(93.3, 99.8)
dMMR	NPA	35/37	94.6	(82.3, 98.5)
Total	OPA	114/117	97.4	(92.7, 99.1)

* En lo que respecta a las pruebas de IHC, el estado pMMR de un caso está reflejado en el estado intacto de todas las proteínas MMR, mientras que el estado dMMR se refleja en el estado con pérdida de una o varias proteínas MMR. En el caso del análisis molecular, el estado pMMR está representado por la ausencia de mutaciones patógenas o de hipermetilación del promotor de *MLH1*, mientras que el estado dMMR está representado por la presencia de mutaciones patógenas o de hipermetilación del promotor de *MLH1*. Los datos de CI del 95 % se calcularon mediante el método de puntuación de Wilson.

Tabla 17. Concordancia entre las pruebas de IHC con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) y el análisis molecular.

Estado de BRAF V600E (análisis molecular/IHC)	Concordancia			
	Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Positivo/Anómalo	PPA	23/23	100.0	(85.7, 100.0)
Negativo/Normal	NPA	95/95	100.0	(96.1, 100.0)
Total	OPA	118/118	100.0	(96.8, 100.0)

El estado de BRAF V600E se definía como positivo o negativo en los resultados de IHC y Anómalo (presencia de la mutación de V600E) o Normal (*BRAF* de tipo silvestre) en los de análisis molecular. Los datos de CI del 95 % se calcularon mediante el método de puntuación de Wilson.

REFERENCIAS

- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013.
- Geiersbach KB, Samowitz WS. Microsatellite instability and colorectal cancer. Arch Pathol Lab Med. 2011;135(10):1269-1277.
- Wright CL, Stewart ID. Histopathology and mismatch repair status of 458 consecutive colorectal carcinomas. Am J Surg Pathol. 2003;27(11):1393-1406.
- Tiwari AK, Roy HK, Lynch HT. Lynch syndrome in the 21st century: clinical perspectives. QJM. 2016;109(3):151-158.
- Buza N, Ziai J, Hui P. Mismatch repair deficiency testing in clinical practice. Expert Rev Mol Diagn. 2016;16(5):591-604.
- Silva FCC, Torrezan GT, Ferreira JRO, Oliveira LP, Begnami M, et al. Germline Mutations in *MLH1* Leading to Isolated Loss of PMS2 Expression in Lynch Syndrome: Implications for Diagnostics in the Clinic. Am J Surg Pathol. 2017;41(6):861-864.
- Boyer JC, Umar A, Risinger JI, Lipford JR, Kane M, et al. Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and genetic defects in human cancer cell lines. Cancer Res. 1995;55(24):6063-6070.
- Lawes DA, Pearson T, Sengupta S, Boulos PB. The role of *MLH1*, *MSH2* and *MSH6* in the development of multiple colorectal cancers. Br J Cancer. 2005;93(4):472-477.
- Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. N Engl J Med. 2003;348(10):919-932.
- Peltomaki P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. J Clin Oncol. 2003;21(6):1174-1179.
- Lynch HT, Smyrk T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). An updated review. Cancer. 1996;78(6):1149-1167.
- Caldes T, Godino J, Sanchez A, Corbacho C, De la Hoya M, et al. Immunohistochemistry and microsatellite instability testing for selecting *MLH1*, *MSH2* and *MSH6* mutation carriers in hereditary non-polyposis colorectal cancer. Oncol Rep. 2004;12(3):621-629.
- Shia J, Klimstra DS, Nafa K, Offit K, Guillem JG, et al. Value of immunohistochemical detection of DNA mismatch repair proteins in predicting germline mutation in hereditary colorectal neoplasms. Am J Surg Pathol. 2005;29(1):96-104.
- Cunningham JM, Tester DJ, Thibodeau SN. Mutation detection in colorectal cancers: direct sequencing of DNA mismatch repair genes. Methods Mol Med. 2001;50:87-98.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, et al. Mutations of the *BRAF* gene in human cancer. Nature. 2002;417(6892):949-954.
- Vakiani E, Solit DB. KRAS and BRAF: drug targets and predictive biomarkers. J Pathol. 2011;223(2):219-229.
- Domingo E, Laiho P, Ollikainen M, Pinto M, Wang L, et al. BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. J Med Genet. 2004;41(9):664-668.
- Lin M, Hampel H, Zhou X, Schunemann L, Yearsley M, et al. BRAF V600E mutation analysis simplifies the testing algorithm for Lynch syndrome. Am J Clin Pathol. 2013;140(2):177-183.
- Deng G, Bell I, Crawley S, Gum J, Terdiman JP, et al. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Clin Cancer Res. 2004;10(1 Pt 1):191-195.
- Tiacci E, Schiavoni G, Forconi F, Santi A, Trentin L, et al. Simple genetic diagnosis of hairy cell leukemia by sensitive detection of the BRAF-V600E mutation. Blood. 2012;119(1):192-195.
- Giardiello FM, Allen JI, Axilbund JE, Boland CR, Burke CA, et al. Guidelines on Genetic Evaluation and Management of Lynch Syndrome: A Consensus Statement by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. Diseases of the Colon & Rectum. 2014;57(8):1025-1048.
- Egoavil C, Alenda C, Castillejo A, Paya A, Peiro G, et al. Prevalence of Lynch syndrome among patients with newly diagnosed endometrial cancers. PLoS One. 2013;8(11):e79737.
- Connell LC, Mota JM, Braghiroli MI, Hoff PM. The Rising Incidence of Younger Patients With Colorectal Cancer: Questions About Screening, Biology, and Treatment. Curr Treat Options Oncol. 2017;18(4):23.
- Provenzale D, Gupta S, Ahnen DJ, Bray T, Cannon JA, et al. Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal Version 1.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. J Natl Compr Canc Netw. 2016;14(8):1010-1030.
- Balmans J, Balaguer F, Cervantes A, Arnold D, Group EGW. Familial risk-colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. Ann Oncol. 2013;24 Suppl 6:vi73-80.
- Evaluation of Genomic Applications in P, Prevention Working G. Recommendations from the EGAPP Working Group: genetic testing strategies in newly diagnosed individuals with colorectal cancer aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome in relatives. Genet Med. 2009;11(1):35-41.
- Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. J Natl Cancer Inst. 2004;96(4):261-268.
- Parsons MT, Buchanan DD, Thompson B, Young JP, Spurdle AB. Correlation of tumour BRAF mutations and *MLH1* methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. J Med Genet. 2012;49(3):151-157.
- Shia J. Evolving approach and clinical significance of detecting DNA mismatch repair deficiency in colorectal carcinoma. Semin Diagn Pathol. 2015;32(5):352-361.
- Thiel A, Heinonen M, Kantonen J, Gylling A, Lahtinen L, et al. BRAF mutation in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. Virchows Arch. 2013;463(5):613-621.
- Toon CW, Chou A, DeSilva K, Chan J, Patterson J, et al. BRAFV600E immunohistochemistry in conjunction with mismatch repair status predicts survival in patients with colorectal cancer. Mod Pathol. 2014;27(5):644-650.

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, Sahn 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.

NOTA: En este documento se ha usado el punto como separador decimal para marcar el borde entre la parte entera y la parte fraccionaria de los numerales con decimales. No se han usado separadores para las unidades de millar.

El resumen de los aspectos de seguridad y rendimiento se puede ver a continuación:

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

Símbolos

Ventana usa los siguientes símbolos y signos además de los indicados en la norma ISO 15223-1 (para EE. UU.: consulte elabdoc.roche.com/symbols para obtener más información):



Número mundial de artículo comercial



Identificación única del dispositivo

HISTORIAL DE REVISIONES

Rev.	Actualizaciones
F	Actualización de la sección Materiales necesarios pero no suministrados para añadir las referencias de 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 y VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody.

PROPIEDAD INTELECTUAL

VENTANA, BENCHMARK, OPTIVIEW y el logotipo de VENTANA son marcas comerciales de Roche. Todas las demás marcas comerciales pertenecen a sus respectivos propietarios.

© 2023 Ventana Medical Systems, Inc.

INFORMACIÓN DE CONTACTO



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

www.roche.com

