

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

Per l'uso con VENTANA MMR IHC Panel

REF 760-5095

08033706001

IVD  50

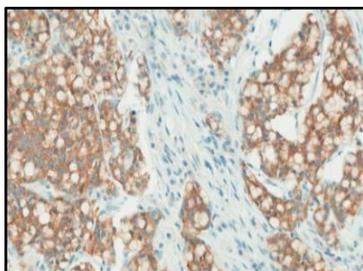


Figura 1. Colorazione con anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) di cellule neoplastiche in tessuto canceroso del colon.

USO PREVISTO

VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) è destinato alla rilevazione qualitativa della proteina BRAF V600E in sezioni di tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina. L'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) è pronto per l'uso su strumenti BenchMark IHC/ISH con OptiView DAB IHC Detection Kit e reagenti ausiliari.

L'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) fa parte di VENTANA MMR IHC Panel che include 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 e VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody. VENTANA MMR IHC Panel è indicato per la rilevazione del deficit di proteine del mismatch repair come test per l'identificazione di soggetti a rischio di sindrome di Lynch nei pazienti con diagnosi di cancro del colon-retto (CRC) e, con stato BRAF V600E, come ausilio alla differenziazione tra CRC sporadico e CRC con probabile sindrome di Lynch in assenza di espressione della proteina MLH1.

I risultati ottenuti tramite questi prodotti devono essere interpretati da un patologo qualificato in un quadro che consideri anche gli esami istologici, i dati clinici pertinenti e i controlli adeguati.

Indicato per uso diagnostico in vitro (IVD).

SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Il cancro del colon-retto è il terzo tipo di cancro più comune e la quarta causa a maggiore prevalenza al mondo nei casi di decesso per cancro.¹ La maggioranza dei CRC presenta instabilità cromosomica, sebbene il 15% circa dei cancri si sviluppi tramite un pathway alternativo caratterizzato dalla funzione deficitaria del sistema di mismatch repair (MMR) del DNA. Come conseguenza del deficit MMR, i tumori presentano instabilità microsatellitare (MSI) risultante dall'incapacità delle proteine MMR di riparare gli errori di replicazione del DNA.

I CRC con difetti MMR sono denominati tumori MMR deficienti (dMMR). Al contrario, i CRC senza difetti MMR sono denominati tumori MMR proficienti (pMMR). I cancri del colon-retto dMMR spesso sono scarsamente differenziati e presentano frequentemente predominanza nel colon prossimale, istologia mucinosa, midollare o con cellule ad anello con castone e un incremento dei numeri di linfociti infiltranti il tumore.^{2,3} In genere, il deficit MMR può essere causato da mutazioni germinali in uno dei geni MMR con successiva perdita del corrispondente allele normale tramite meccanismi genetici o epigenetici, mutazioni somatiche negli alleli o da inattivazione epigenetica del gene *MLH1* tramite metilazione.⁴

I quattro geni MMR più comunemente mutati sono *MLH1*, *PMS2*, *MSH2* ed *MSH6*. Nelle cellule normali la proteina MLH1 forma un complesso (eterodimero) con la proteina PMS2, mentre la proteina MSH2 forma un complesso con la proteina MSH6.^{5,6} Quando si verificano mismatch del DNA, l'eterodimero MSH2/MSH6 si lega al DNA affetto da mismatch, inducendo una variazione conformazionale. L'eterodimero MLH1/PMS2 si lega al complesso MSH2/MSH6 legato al DNA con conseguente riparazione per escissione del DNA interessato.

Le proteine MLH1, PMS2, MSH2 ed MSH6 sono proteine MMR rilevanti dal punto di vista clinico codificate da geni che possono risultare mutati nelle famiglie affette da sindrome di Lynch.^{7,8} Nel corso della vita i portatori di tali mutazioni sono soggetti a un alto rischio di sviluppo di cancro del colon-retto e di altri cancri a causa dell'accumulo di errori di replicazione del DNA nelle cellule proliferanti. La sindrome di Lynch ammonta a una percentuale pari a 1-6% di tutti i CRC. Questi tumori derivano dall'ereditarietà di una mutazione autosomica dominante della linea germinale in uno dei quattro geni MMR; in particolare, la perdita di MLH1 si verifica nella maggioranza di tali CRC associati alla sindrome di Lynch.^{5,9,10} Oltre 300 diverse mutazioni nella famiglia di proteine MMR sono state identificate in pazienti affetti dalla sindrome di Lynch. Il fenotipo tumorale associato alla sindrome di Lynch in genere viene caratterizzato per via immunostochimica dalla perdita di espressione nelle proteine MMR, in particolare MLH1, PMS2, MSH2 ed MSH6.¹⁰⁻¹³ È stato dimostrato che i test IHC MMR sono utili nell'identificazione dello specifico gene MMR nel quale è più probabile individuare un'alterazione somatica o della linea germinale.¹⁴

Il gene *BRAF* è localizzato sul cromosoma 7q34 e codifica una serina-treonina chinasi citoplasmatica che agisce a valle del pathway di segnalazione della proteina chinasi attivata da mitogeni (MAPK). Le mutazioni oncogeniche nel gene *BRAF*, tutte all'interno del dominio chinasi, determinano l'attivazione costitutiva del pathway di segnalazione MAPK con conseguente incremento di proliferazione cellulare e resistenza all'apoptosi. La più comune di tutte le mutazioni attivanti il gene *BRAF* (mutazione puntiforme T1799A) comporta la sostituzione di una valina (V) con un acido glutammico (E) nella posizione 600 della sequenza aminoacidica ed è rilevata nel 12% di tutti i CRC.^{15,16}

Come parte di VENTANA MMR IHC Panel, l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) è di ausilio alla differenziazione tra CRC sporadico e con probabile sindrome di Lynch in assenza di espressione della proteina MLH1.^{17,18} Nel CRC la perdita di proteina MLH1 è di frequente il risultato dell'ipermetilazione del promotore di *MLH1* e indica un'occorrenza sporadica.¹⁹ La presenza della proteina BRAF V600E è strettamente correlata all'ipermetilazione del promotore di *MLH1*. Di conseguenza, un risultato positivo della colorazione con l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) indica CRC sporadico.

Oltre al ruolo che svolge nella stratificazione dei CRC, la mutazione *BRAF V600E* è rilevata nell'8% circa di tutti i tumori solidi, in particolare nel 43% dei melanomi, nel 39% dei carcinomi papillari della tiroide, nel 12% dei carcinomi sierosi dell'ovaio, nel 2% dei cancri del polmone e in altri cancri.¹⁶ Inoltre, la mutazione *BRAF V600E* è stata recentemente descritta come indicatore molecolare della leucemia a cellule capellute.²⁰

SIGNIFICATIVITÀ CLINICA

La sindrome di Lynch è stata descritta negli anni Sessanta e ha portato all'identificazione di un legame tra perdita di funzione MMR e cancro.²¹ La perdita di proteine MMR (MLH1, PMS2, MSH2, o MSH6) può dare luogo a instabilità microsatellitare (MSI) e a un maggior rischio nel corso della vita di insorgenza non solo di CRC ma anche di cancri di stomaco, cervello, pancreas, cute, endometrio e ovaio. I pazienti affetti da sindrome di Lynch presentano un rischio del 50-80% di insorgenza di CRC nel corso della vita.^{5,22,23} La sindrome di Lynch è unica rispetto ad altre sindromi da cancro ereditario in quanto test diretti sul tessuto tumorale sono di ausilio nell'identificazione dei pazienti a rischio di potenziale sindrome di Lynch e aiutano a indirizzare i successivi test genetici della linea germinale. Le famiglie affette da sindrome di Lynch traggono beneficio dai protocolli avanzati di screening oncologico.

Varie linee guida, incluse le linee guida National Comprehensive Cancer Network (NCCN), consigliano lo screening di tutti i CRC mirato a individuare la potenziale sindrome di Lynch allo scopo di identificare le famiglie e i pazienti che possono trarre beneficio da ulteriori test genetici e counseling.^{21,24-27} L'uso di VENTANA MMR IHC Panel è di ausilio alla determinazione dello stato MMR dei CRC tramite la classificazione degli stessi come Intatto o Con perdita relativamente all'espressione delle proteine MMR. La rilevazione di tutte e quattro le proteine MMR nel tumore è indice della presenza di un sistema di MMR normale o intatto. La perdita di espressione di MLH1 o MSH2 è quasi invariabilmente associata alla perdita del partner eterodimerico, rispettivamente PMS2 o MSH6. La perdita di PMS2 o MSH6, tuttavia, non dà luogo a perdita di MLH1 o MSH2. La perdita di PMS2, MSH2 e/o MSH6 è compatibile con la probabile sindrome di Lynch e, in tal caso, ai pazienti devono essere prescritti test supplementari e counseling in linea con la pratica clinica.

La perdita di proteina MLH1 può indicare un'occorrenza sporadica o una potenziale sindrome di Lynch. Nel 15% o più dei casi di CRC sporadico, la perdita di proteina MLH1 si deve a ipermetilazione del promotore di *MLH1*.^{5,28,29} È importante sottolineare che la mutazione *BRAF V600E* si osserva in circa due terzi dei tumori con perdita di espressione di MLH1 dovuta a ipermetilazione del promotore di *MLH1*. Al contrario, la mutazione

BRAF V600E è osservata molto raramente nei tumori con sindrome di Lynch.²⁸ Pertanto, se il risultato ottenuto con VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (anticorpo VENTANA anti-MLH1 (M1)) indica perdita di proteina MLH1, l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) può stratificare il tumore come sporadico o probabile sindrome di Lynch.^{5,30} Nei casi di CRC la perdita di proteina MLH1 con uno stato BRAF V600E positivo è un'indicazione molto convincente che il tumore è il risultato di un'occorrenza sporadica, consentendo pressoché di escludere la sindrome di Lynch quale causa soggiacente della neoplasia maligna.^{21,31} Quando la perdita di proteina MLH1 si accompagna a uno stato BRAF V600E negativo, la perdita di MLH1 è compatibile con un'alta probabilità di sindrome di Lynch.³²

PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

L'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) è un anticorpo monoclonale di topo (clone VE1) prodotto contro un peptide sintetico che riproduce la sequenza aminoacidica mutata di BRAF compresa tra gli aminoacidi 596 e 606 (GLATEKSRWVG). Questo anticorpo specifico per la mutazione presenta una colorazione di tipo citoplasmatico. Questo anticorpo differenzia la mutazione V600E nella proteina BRAF dalla proteina BRAF nativa e da altre proteine BRAF mutate.^{33,34}

Nel contesto dei test IHC del mismatch repair (MMR) per l'individuazione della potenziale sindrome di Lynch, l'identificazione della mutazione BRAF V600E nei casi di perdita di espressione di MLH1 è indicativa di cancro del colon-retto (CRC) sporadico.³²

L'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) si lega in maniera specifica alla proteina BRAF V600E mutante in sezioni di tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE). L'anticorpo può essere localizzato utilizzando un anticorpo secondario marcato con un aptene e successivamente con un coniugato anti-aptene-HRP multimerico (OptiView DAB IHC Detection Kit, n. di cat. 760-700 / 06396500001). Il complesso anticorpo-enzima specifico viene quindi visualizzato con la precipitazione di un prodotto di reazione enzimatico. Ciascuna fase prevede l'incubazione per un preciso intervallo temporale e a una specifica temperatura. Al termine di ciascuna fase di incubazione, lo strumento lava le sezioni allo scopo di interrompere la reazione e rimuovere il materiale non legato che ostacolerebbe la reazione desiderata prevista per le fasi successive. Applica inoltre ULTRA LCS (Predilute) (n. di cat. 650-210 / 05424534001) o LCS (Predilute) (n. di cat. 650-010 / 05264839001), che minimizza l'evaporazione dei reagenti acquosi dal vetrino del campione.

MATERIALI FORNITI

L'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) contiene una quantità di reagente sufficiente per 50 test.

Un erogatore da 5 mL di anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) contiene circa 60 µg di anticorpo monoclonale di topo.

L'anticorpo è diluito in un tampone fosfato (pH 7.3) contenente proteina di trasporto, Brij 35, e 0.05% di conservante ProClin 300.

La concentrazione specifica dell'anticorpo è di circa 12 µg/mL.

L'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) è un anticorpo monoclonale di topo prodotto come surnatante di coltura cellulare purificato.

Fare riferimento all'opportuna scheda metodologica del kit di rilevazione VENTANA per le descrizioni dettagliate di quanto segue: Principio della procedura, Materiali e metodi, Prelievo dei campioni e preparazione per l'analisi, Procedure di controllo qualità, Risoluzione dei problemi, Interpretazione dei risultati e Limitazioni.

MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

I reagenti di colorazione, quali i kit di rilevazione VENTANA e i componenti ausiliari, compresi i vetrini dei tessuti di controllo positivi e negativi, non sono forniti.

È possibile che non tutti i prodotti elencati nella scheda metodologica siano disponibili in tutte le aree geografiche. Rivolgersi al rappresentante dell'assistenza locale.

I reagenti e materiali seguenti possono essere necessari per la colorazione ma non sono forniti:

1. Tessuto di controllo consigliato
2. Vetrini per microscopia, caricati positivamente
3. VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (n. di cat. 730-7159 / 09605584001 o n. di cat. 760-5091 / 08033668001)
4. VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody (n. di cat. 730-7158 / 09607161001 o n. di cat. 760-5094 / 08033692001)
5. VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody (n. di cat. 730-7160 / 09607137001 o n. di cat. 760-5093 / 08033684001)

6. VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (n. di cat. 730-7161 / 09606769001 o n. di cat. 760-5092 / 08033676001)
7. Negative Control (Monoclonal) (n. di cat. 760-2014 / 05266670001)
8. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (n. di cat. 790-4795 / 06683380001)
9. OptiView DAB IHC Detection Kit (n. di cat. 760-700 / 06396500001)
10. Per VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody, OptiView Amplification Kit (n. di cat. 760-099 / 06396518001 (50 test) o n. di cat. 860-099 / 06718663001 (250 test))
11. EZ Prep Concentrate (10X) (n. di cat. 950-102 / 05279771001)
12. Reaction Buffer Concentrate (10X) (n. di cat. 950-300 / 05353955001)
13. ULTRA LCS (Predilute) (n. di cat. 650-210 / 05424534001)
14. LCS (Predilute) (n. di cat. 650-010 / 05264839001)
15. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (n. di cat. 950-224 / 05424569001)
16. Cell Conditioning Solution (CC1) (n. di cat. 950-124 / 05279801001)
17. Hematoxylin II (n. di cat. 790-2208 / 05277965001)
18. Bluing Reagent (n. di cat. 760-2037 / 05266769001)
19. Montante permanente
20. Coprioggetto
21. Montavetrini automatizzato
22. Attrezzatura di laboratorio per uso generico
23. Strumento BenchMark IHC/ISH

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Alla ricezione e quando non è in uso, il prodotto va conservato a 2-8 °C. Non congelare.

Per garantire la corretta erogazione di reagente e la stabilità dell'anticorpo, dopo ogni utilizzo riposizionare il tappo dell'erogatore e riporre immediatamente l'erogatore in frigorifero in posizione verticale.

Su ogni erogatore di anticorpi è riportata la scadenza. Se conservato adeguatamente, il reagente resta stabile fino alla data indicata sull'etichetta. Non utilizzare il reagente oltre la data di scadenza indicata.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

I tessuti FFPE trattati normalmente sono idonei all'uso con questo anticorpo primario se usati con OptiView DAB IHC Detection Kit e gli strumenti BenchMark IHC/ISH. Il fissativo per i tessuti consigliato è formalina neutra tamponata al 10%.³⁵

Per l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) si consiglia di eseguire la fissazione dei tessuti, entro 2 ore dall'escissione, in formalina neutra tamponata (NBF) al 10% per almeno 12 ore in base ai modelli xenograft generati dalle linee cellulari umane A2058 (melanoma) ed LS411N (CRC), che sono positive per l'espressione di BRAF V600E. Si noti, tuttavia, che tempi di fissazione fino a 72 ore in NBF al 10% hanno fornito risultati di colorazione BRAF V600E equivalenti. È stata ottenuta una colorazione accettabile con l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) anche con fissazione nel fissativo zinco formalina per 12-72 ore.

I fissativi alcol-formalina-acido acetico (AFA), etanolo al 95%, Z-5 e PREFER non sono consigliati per l'uso con l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). I tessuti xenograft fissati in alcol-formalina-acido acetico evidenziano colorazione variabile o assenza di colorazione.

La quantità di fissativo utilizzata deve essere pari a 15-20 volte il volume di tessuto. Nessun fissativo penetrerà per più di 2-3 mm nel tessuto solido o per 5 mm nel tessuto poroso in un periodo di 24 ore. La fissazione può essere eseguita a temperatura ambiente (15-25 °C).^{35,36}

Le sezioni devono essere tagliate a uno spessore di circa 4 µm e montate su vetrini caricati positivamente. I vetrini devono essere immediatamente colorati, poiché l'antigenicità delle sezioni di tessuto tagliate può diminuire con il passare del tempo. Si noti, tuttavia, che vetrini di tessuto CRC non colorato conservati a 5 ± 3 °C o 30 ± 5 °C per un massimo di 8 settimane hanno evidenziato un'intensità di colorazione con l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) simile a quella di campioni di tessuto preparati dallo stesso blocco e colorati con l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) al giorno 1. Richiedere al proprio rappresentante dell'assistenza Roche una copia del documento "Recommended Slide Storage and Handling" per maggiori informazioni.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Per uso diagnostico in vitro (IVD).
2. Solo per uso professionale.

3. **ATTENZIONE:** negli Stati Uniti le leggi federali consentono la vendita di questo dispositivo solo da parte di un medico o solo su prescrizione medica. (Rx Only)
4. Non usare oltre il numero di test specificato.
5. La soluzione ProClin 300 viene utilizzata come conservante nel reagente. È classificata come irritante e può causare sensibilizzazione tramite contatto cutaneo. Adottare precauzioni ragionevoli durante la manipolazione. Evitare il contatto dei reagenti con occhi, cute e membrane mucose. Indossare guanti e indumenti di protezione adeguati.
6. I vetrini caricati positivamente possono essere suscettibili a sollecitazioni ambientali con conseguente colorazione inadeguata. Per ulteriori informazioni sull'uso di questo tipo di vetrini, contattare il rappresentante Roche.
7. I materiali di origine umana o animale devono essere maneggiati come materiali a rischio biologico e smaltiti adottando precauzioni appropriate. In caso di esposizione, attenersi alle direttive sanitarie delle autorità responsabili.^{37,38}
8. Evitare il contatto dei reagenti con gli occhi e le membrane mucose. Se i reagenti entrano in contatto con aree sensibili, lavare con acqua abbondante.
9. Evitare la contaminazione microbica dei reagenti, poiché può causare risultati non corretti.
10. Per ulteriori informazioni sull'uso di questo dispositivo, fare riferimento alla guida per l'utilizzatore dello strumento BenchMark IHC/ISH e alle istruzioni per l'uso di tutti i componenti necessari disponibili sul sito navifyportal.roche.com.
11. Consultare le autorità locali e/o statali in relazione al metodo di smaltimento consigliato.
12. Le etichette di sicurezza dei prodotti seguono principalmente le linee guida GHS dell'UE. La scheda dati di sicurezza è disponibile su richiesta per gli utilizzatori professionali.
13. Per segnalare sospetti incidenti gravi correlati a questo dispositivo, contattare il rappresentante locale Roche e l'autorità competente dello Stato membro o del paese in cui risiede l'utilizzatore.

Questo prodotto contiene componenti classificati come segue in conformità con il regolamento (CE) n. 1272/2008:

Tabella 1. Informazioni sui pericoli.

Pericolo	Codice	Indicazione
	H317	Può provocare una reazione allergica cutanea.
	P261	Evitare di respirare la nebbia/i vapori.
	P272	Gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro.
	P280	Indossare guanti.
	P333 + P313	In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.
	P362 + P364	Togliersi di dosso gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.
	P501	Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto autorizzato per lo smaltimento dei rifiuti.

Questo prodotto contiene il numero CAS 55965-84-9, massa di reazione di 5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3-one e 2-metil-2H-isotiazol-3-one in rapporto 3:1.

PROCEDURA DI COLORAZIONE

L'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) è stato sviluppato per l'uso sugli strumenti BenchMark IHC/ISH in abbinamento a OptiView DAB IHC Detection Kit e ai reagenti ausiliari. Fare riferimento alla Tabella 2 per il protocollo di colorazione consigliato.

Non è noto l'effetto che si ottiene sulla robustezza dell'analisi variando tempo e temperatura di recupero dell'antigene. Pertanto, lo scostamento dalle condizioni consigliate per il recupero dell'antigene riportate nel protocollo di colorazione non è noto e può inficiare i risultati attesi. Devono essere utilizzati e documentati controlli appropriati. Gli utilizzatori che impiegano un protocollo diverso da quello indicato si devono assumere ogni responsabilità relativamente all'interpretazione dei risultati dei pazienti.

È possibile visualizzare, stampare e modificare i parametri delle procedure automatizzate conformemente alla procedura descritta nella guida per l'utilizzatore dello strumento. Fare

riferimento alla scheda metodologica di OptiView DAB IHC Detection Kit per ulteriori dettagli sulle procedure di colorazione immunostochimica.

Per ulteriori informazioni dettagliate sull'uso corretto di questo dispositivo, fare riferimento alla scheda metodologica dell'erogatore in linea associato al codice 760-5095.

Tabella 2. Protocollo di colorazione consigliato per l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) con OptiView DAB IHC Detection Kit su strumenti BenchMark IHC/ISH.

Tipo di procedura	Metodo		
	GX	XT	ULTRA o ULTRA PLUS
Sparaffinatura	Selezionata	Selezionata	Selezionata
Cell conditioning (smascheramento dell'antigene)	CC1 64 minuti	CC1 64 minuti	ULTRA CC1 64 minuti, 100 °C
Inibitore della perossidasi pre-primario	Selezionata	Selezionata	Selezionata
Anticorpo (primario)	28 minuti, 37 °C	16 minuti, 37 °C	16 minuti, 36 °C
OptiView HQ Linker	8 minuti (predefinito)		
OptiView HRP Multimer	8 minuti (predefinito)		
Controcromazione	Hematoxylin II, 4 minuti		
Post-controcromazione	Bluing, 4 minuti		

Lo scostamento dalle condizioni consigliate, in particolare per il recupero dell'antigene, riportate nel protocollo può inficiare i risultati attesi. A causa della variabilità nella fissazione e processazione dei tessuti, così come della variabilità delle condizioni ambientali e degli strumenti di laboratorio, può essere necessario aumentare o diminuire il tempo di incubazione dell'anticorpo primario in base ai singoli campioni e alla preferenza del patologo. Per ulteriori informazioni sulle variabili di fissazione, fare riferimento a "Immunohistochemistry: Principles and Advances".³⁶

PROCEDURE DI CONTROLLO QUALITÀ

Controllo negativo del reagente

Oltre alla colorazione con l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), un secondo vetrino deve essere colorato con un reagente negativo monoclonale di topo, ossia con Negative Control (Monoclonal). Il controllo negativo del reagente è utilizzato per valutare la colorazione aspecifica. I parametri di colorazione dell'anticorpo di controllo negativo del reagente devono essere identici a quelli dell'anticorpo primario.

Tessuto di controllo positivo

Acquisire un tessuto di controllo positivo per ogni procedura di colorazione eseguita. La pratica di laboratorio ottimale prevede l'inclusione di una sezione di tessuto di controllo positivo sullo stesso vetrino del tessuto del paziente. Ciò contribuisce all'identificazione di eventuali errori di applicazione dei reagenti al vetrino. Il tessuto con una colorazione positiva debole è il più adatto per il controllo qualità. I componenti del tessuto a colorazione positiva vengono utilizzati per confermare l'applicazione dell'anticorpo e il funzionamento corretto dello strumento. Il tessuto di controllo può contenere elementi con colorazione positiva e negativa e serve come controllo sia positivo che negativo. I tessuti di controllo devono provenire da un campione autoptico, bioptico o chirurgico recente preparato o fissato il prima possibile in modo identico alle sezioni da testare. Tali tessuti possono consentire di controllare tutte le fasi della procedura, dalla preparazione del tessuto fino alla colorazione. L'uso di una sezione di tessuto fissata o processata diversamente rispetto al campione sottoposto a test servirà come controllo per tutti i reagenti e le fasi del metodo, tranne che per la fissazione e la processazione del tessuto. I tessuti di controllo positivi noti devono essere utilizzati solo per il monitoraggio delle prestazioni corrette di tessuti trattati e reagenti di test, non come ausilio nella determinazione della diagnosi specifica dei campioni del paziente. Se i tessuti di controllo positivi non si colorano positivamente, i risultati ottenuti con i campioni del test devono essere considerati non validi.

Un idoneo tessuto di controllo positivo è, ad esempio, un caso pre-qualificato di CRC che è positivo per l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). Il tessuto di controllo

positivo deve esibire colorazione citoplasmatica di qualsiasi intensità superiore al fondo nelle cellule tumorali vitali.

Tessuto di controllo negativo

Un tessuto di controllo negativo è, ad esempio, un caso pre-qualificato di CRC che è negativo per l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). Il tessuto di controllo negativo deve essere utilizzato solo per il monitoraggio delle prestazioni dei tessuti trattati, dei reagenti e degli strumenti del test e non come ausilio alla formulazione di una diagnosi specifica dei campioni dei pazienti.

Verifica dell'analisi

Prima dell'uso iniziale di un anticorpo o di un sistema di colorazione in una procedura diagnostica, è necessario verificare la specificità dell'anticorpo effettuando l'analisi su una serie di tessuti con caratteristiche prestazionali IHC note che rappresentino tessuti positivi e negativi per la mutazione BRAF V600E. Fare riferimento alle Procedure di controllo qualità precedentemente descritte in questa sezione del foglietto illustrativo e alle indicazioni per il controllo qualità del College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist³⁹ o a CLSI Approved Guideline.⁴⁰

INTERPRETAZIONE DELLA COLORAZIONE / RISULTATI PREVISTI

Il pattern di colorazione cellulare per l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) è citoplasmatico nelle cellule tumorali. Ai campioni CRC colorati con l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) viene assegnato uno Stato clinico da un patologo qualificato in base alla valutazione della presenza o assenza di colorazione citoplasmatica specifica nel tumore. Uno Stato clinico positivo viene assegnato ai casi con colorazione citoplasmatica inequivocabile di qualsiasi intensità superiore al fondo nelle cellule tumorali vitali. Uno Stato clinico negativo viene assegnato ai casi con assenza di colorazione o colorazione citoplasmatica equivoca nelle cellule tumorali vitali. La colorazione nucleare, la colorazione da debole a forte di cellule tumorali vitali isolate e/o di cluster tumorali di piccole dimensioni devono essere considerati negativi.

LIMITAZIONI SPECIFICHE

Lo scostamento dal protocollo di colorazione riportato non è noto e può inficiare i risultati attesi. Si sconsiglia agli utilizzatori l'uso di tamponi acidi per il recupero dell'antigene in quanto tali tamponi possono dare luogo a colorazione non ottimale di difficile interpretazione.⁴¹ Gli utilizzatori che impiegano un protocollo diverso da quello indicato si devono assumere ogni responsabilità relativamente all'interpretazione dei risultati dei pazienti.

I casi colorati con l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) sono classificati come positivi o negativi a seconda della presenza o assenza di colorazione sull'intera area tumorale. La colorazione può variare in termini di livello di intensità e l'intensità stessa può variare nell'intero tumore; ciò, tuttavia, non incide sullo Stato clinico BRAF V600E.

Alcuni casi possono presentare particolari difficoltà a causa dei seguenti problemi:

- È stato osservato che in taluni casi l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) presenta colorazione nucleare e citoplasmatica debole in muscolo liscio, cellule di Purkinje del cervelletto, cellule epiteliali del colon normale, enterociti, cellule interstiziali del testicolo, ghiandola surrenale, ghiandola pituitaria, strutture acinose del pancreas, cellule ghiandolari dell'intestino e alcune cellule tumorali; tali casi, tuttavia, non devono essere considerati positivi per BRAF V600E.⁴² Inoltre, questo anticorpo ha evidenziato colorazione moderata nelle cellule neuroendocrine nella ghiandola pituitaria. Infine, questo anticorpo colora anche le ciglia nel polmone.
- Fondo aspecifico: alcuni campioni possono presentare colorazione di fondo aspecifica per ragioni non ben comprese. Pertanto, la valutazione di un vetrino colorato con l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) deve includere un confronto tra il vetrino stesso e il vetrino colorato con il controllo negativo del reagente per determinare il livello di colorazione di fondo aspecifica. Si osserva talvolta colorazione nucleare nelle cellule tumorali; la significatività di questo fenomeno, tuttavia, non è compresa.
- Artefatto tissutale o di colorazione: anche gli artefatti istologici che hanno origine dalla processazione del campione e dai processi di microtomia possono complicare la determinazione dello Stato clinico con l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). Questi artefatti possono includere, a titolo esemplificativo, gradienti di fissazione ed effetti ai bordi, intrappolamento DAB, formazione di bolle nei nuclei, assenza di colorazione in alcune regioni del tessuto, strappi o ripiegamenti del tessuto e perdita della sezione di tessuto. In alcuni casi può essere necessario ripetere la colorazione di nuove sezioni o acquisire un nuovo campione.

Non tutte le analisi potrebbero essere registrate su ogni strumento. Per ulteriori informazioni, contattare il rappresentante locale Roche.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

PRESTAZIONI ANALITICHE

Sono stati condotti test di colorazione per la sensibilità, la specificità e la precisione; i relativi risultati sono elencati di seguito.

Sensibilità e specificità

Non è stata osservata colorazione imprevista con l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) su tessuti neoplastici e normali, salvo le eccezioni segnalate nella sezione Limitazioni specifiche.

Tabella 3. La sensibilità/specificità dell'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) è stata determinata testando tessuti normali FFPE.

Tessuto	N. casi positivi/totali	Tessuto	N. casi positivi/totali
Cervello	0/3	Esofago	0/3
Cervelletto *	1/3	Stomaco	0/3
Ghiandola surrenale	0/3	Intestino tenue *	2/4
Ovaio	0/3	Colon *	5/12
Pancreas *	2/3	Fegato	0/3
Linfonodo	0/3	Lingua/ghiandola salivare	0/3
Ipofisi (ghiandola pituitaria) **	3/3	Rene	0/3
Testicolo *	2/3	Prostata	0/3
Tiroide	0/3	Vescica	0/3
Mammella	0/3	Ghiandola paratiroidea	0/3
Milza	0/3	Endometrio	0/3
Tonsille	0/3	Cervice	0/3
Timo	0/3	Muscolo scheletrico	0/3
Midollo osseo	0/3	Cute	0/3
Polmone	0/3	Nervo	0/5
Cuore	0/3	Mesotelio	0/3

* Colorazione nucleare e citoplasmatica debole in cellule di Purkinje del cervelletto, muscolo liscio e cellule epiteliali del colon normale, cellule ghiandolari dell'intestino, strutture acinose del pancreas e cellule interstiziali del testicolo.

** Colorazione moderata osservata nelle cellule neuroendocrine nella ghiandola pituitaria.

Per tutti i tessuti, la colorazione positiva/negativa è stata determinata per elementi tessuto-specifici e tali casi non devono essere considerati positivi per lo Stato clinico BRAF V600E.¹⁶

Tabella 4. La sensibilità/specificità dell'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) è stata determinata testando una varietà di tessuti neoplastici FFPE.

Patologia	N. casi positivi/totali
Glioblastoma (cervello)	0/1
Meningioma (cervello)	0/1

Patologia	N. casi positivi/totali
Ependimoma (cervello)	0/1
Oligodendroglioma (cervello)	0/1
Adenocarcinoma sieroso (ovaio)	0/1
Adenocarcinoma (ovaio)	0/1
Neoplasia neuroendocrina (pancreas)	0/1
Seminoma (testicolo)	0/2
Carcinoma midollare (tiroide)	0/1
Carcinoma papillare (tiroide)	21/28
Carcinoma duttale in situ (mammella)	0/1
Carcinoma duttale microinvasivo (mammella)	0/1
Carcinoma duttale invasivo (mammella)	3/131
Linfoma a cellule B; NAS (milza)	0/1
Carcinoma a piccole cellule (polmone)	0/7
Carcinoma a cellule squamose (polmone)	0/90
Adenocarcinoma (polmone)	1/73
Carcinoma neuroendocrino (esofago)	0/1
Adenocarcinoma (esofago)	0/1
Carcinoma a cellule ad anello con castone (stomaco)	0/1
Adenocarcinoma (intestino tenue)	0/1
Sarcoma stromale (intestino tenue)	1/1
Adenocarcinoma (colon)	64/234
Tumore stromale gastrointestinale (GIST) (colon)	0/1
Adenocarcinoma (retto)	0/1
GIST (retto)	0/1
Melanoma (retto)	0/1
Carcinoma epatocellulare (fegato)	0/1
Epatoblastoma (fegato)	0/1
Carcinoma a cellule chiare (rene)	0/1
Adenocarcinoma (prostata)	0/2
Adenocarcinoma (utero)	0/1
Carcinoma a cellule chiare (utero)	0/1
Carcinoma a cellule squamose (cervice)	0/2
Rabdomiosarcoma embrionale (muscolatura striata)	0/1
Melanoma	10/24
Carcinoma a cellule basali (cute)	0/1
Carcinoma a cellule squamose (cute)	0/1

Patologia	N. casi positivi/totali
Neuroblastoma (retroperitoneo)	0/1
Mesotelioma (peritoneo)	0/1
Rabdomiosarcoma a cellule fusate (peritoneo)	0/1
Linfoma a cellule B; NAS (linfonodo)	0/2
Linfoma di Hodgkin (linfonodo)	1/1
Carcinoma uroteliale (vescica)	0/1
Leiomiomasarcoma (vescica)	0/1
Osteosarcoma (osso)	0/1
Leiomiomasarcoma (muscolatura liscia)	0/1

Precisione

Caratteristiche prestazionali sullo strumento BenchMark ULTRA

Ripetibilità intra-corsa di colorazione e precisione intermedia tra giorni

La ripetibilità e la precisione dell'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) sono state valutate sullo strumento BenchMark ULTRA con OptiView DAB IHC Detection Kit.

La ripetibilità intra-corsa di colorazione è stata valutata utilizzando 10 campioni CRC (5 positivi e 5 negativi per lo Stato clinico BRAF V600E). Cinque vetrini replicati da ciascuno dei campioni CRC sono stati colorati con l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) su un solo strumento BenchMark ULTRA in un unico giorno. Ciascun vetrino colorato con l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) è stato accoppiato a un vetrino colorato con il controllo negativo del reagente dallo stesso caso. Tutti i set di vetrini sono stati randomizzati e successivamente valutati come positivi o negativi da un unico patologo in cieco rispetto alla diagnosi del caso.

Anche la precisione intermedia tra giorni è stata valutata utilizzando 10 campioni CRC (5 positivi e 5 negativi per lo Stato clinico BRAF V600E). Vetrini replicati da ciascuno dei campioni CRC sono stati colorati con l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) su uno strumento BenchMark ULTRA in ciascuno di 5 giorni non consecutivi. Inoltre, un singolo vetrino da ciascun caso è stato colorato con il controllo negativo del reagente. Ciascun vetrino colorato con l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) è stato accoppiato a un vetrino colorato con il controllo negativo del reagente dallo stesso caso. Tutti i set di vetrini sono stati randomizzati e successivamente valutati come positivi o negativi da un unico patologo in cieco rispetto alla diagnosi del caso.

Nessuno dei vetrini colorati con il controllo negativo del reagente ha evidenziato colorazione specifica e la colorazione di fondo è risultata ≤ 0.5 . Utilizzando dati riuniti di tutti i possibili accoppiamenti, tanto gli studi sulla ripetibilità intra-corsa di colorazione quanto quelli sulla precisione intermedia tra giorni hanno evidenziato una concordanza percentuale positiva (PPA) del 100%, una concordanza percentuale negativa (NPA) del 100% e una concordanza percentuale complessiva (OPA) del 100%. Un riepilogo dei risultati è disponibile in Tabella 5.

Tabella 5. Ripetibilità intra-corsa di colorazione e precisione intermedia tra giorni sullo strumento BenchMark ULTRA dell'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) in base alle misure dello Stato clinico (positivo/negativo).

Ripetibilità/ Precisione	Stato clinico	Concordanza			
		Tipo	n/N	%	CI al 95%
Ripetibilità intra-corsa di colorazione	Positivo	PPA	25/25	100.0	(86.7, 100.0)
	Negativo	NPA	25/25	100.0	(86.7, 100.0)
	Totale	OPA	50/50	100.0	(92.9, 100.0)
	Positivo	PPA	50/50	100.0	(92.9, 100.0)
	Negativo	NPA	50/50	100.0	(92.9, 100.0)

Ripetibilità/ Precisione	Stato clinico	Concordanza			
		Tipo	n/N	%	CI al 95%
Precisione intermedia tra giorni	Totale	OPA	100/100	100.0	(96.3, 100.0)

Nota: gli intervalli di confidenza CI al 95% sono stati calcolati con il metodo del punteggio di Wilson.

Precisione intermedia fra gli strumenti

La precisione intermedia fra gli strumenti BenchMark ULTRA dell'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) è stata determinata colorando vetrini replicati di 10 campioni CRC (5 positivi e 5 negativi per lo Stato clinico BRAF V600E) su 3 strumenti BenchMark ULTRA con l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) utilizzando OptiView DAB IHC Detection Kit. Inoltre, un singolo vetrino da ciascun caso è stato colorato con un controllo negativo del reagente.

Ciascun vetrino colorato con l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) è stato accoppiato a un vetrino colorato con il controllo negativo del reagente dallo stesso caso. Tutti i set di vetrini sono stati randomizzati e successivamente valutati relativamente allo Stato clinico (positivo/negativo) da un unico patologo in cieco rispetto alla diagnosi del caso. Nessuno dei vetrini colorati con il controllo negativo del reagente ha evidenziato colorazione specifica e la colorazione di fondo è risultata ≤ 0.5 .

Per quanto riguarda la precisione intermedia fra gli strumenti BenchMark ULTRA, sono stati effettuati confronti a coppie dello Stato clinico dei vetrini per ciascun campione tra strumenti; tali confronti hanno evidenziato PPA, NPA e OPA pari a 100%. Un riepilogo dei risultati è disponibile in Tabella 6.

Tabella 6. Precisione intermedia fra gli strumenti BenchMark ULTRA dell'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) in base alle misure dello Stato clinico (positivo/negativo).

Precisione	Stato clinico	Concordanza			
		Tipo	n/N	%	CI al 95%
Precisione intermedia fra gli strumenti	Positivo	PPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	Negativo	NPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	Totale	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)

Nota: gli intervalli di confidenza CI al 95% sono stati calcolati con il metodo del punteggio di Wilson.

Inoltre, la precisione intermedia fra gli strumenti dell'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) è stata determinata colorando vetrini replicati di 6 campioni (2 CRC negativi e 2 CRC e 2 di cancro della tiroide positivi per lo Stato clinico BRAF V600E) su 3 strumenti BenchMark XT e 3 strumenti BenchMark GX con l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) utilizzando OptiView DAB IHC Detection Kit.

Una volta riuniti i 3 strumenti si sono ottenute 15 osservazioni per caso; la mediana di ciascun caso è stata determinata a partire da queste 15 osservazioni. Le singole osservazioni di uno stesso caso sono state ritenute concordanti con l'intensità mediana dei segnali del caso se rientravano entro 0.5 unità rispetto all'intensità del segnale. Per quanto riguarda la precisione intermedia fra gli strumenti BenchMark XT e BenchMark GX, sono stati effettuati confronti a coppie dei punteggi di intensità della colorazione dei vetrini per ciascun campione; tali confronti hanno evidenziato OPA pari a 98.9% tra i 3 strumenti BenchMark XT e OPA pari a 100% tra i 3 strumenti BenchMark GX. Nessuno dei vetrini colorati con un controllo negativo del reagente ha evidenziato colorazione specifica e la colorazione di fondo è risultata ≤ 0.5 sia sugli strumenti BenchMark XT sia sugli strumenti BenchMark GX.

Concordanza tra strumenti BenchMark IHC/ISH

La concordanza tra gli strumenti BenchMark IHC/ISH per l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) è stata determinata colorando campioni CRC, campioni di cancro della tiroide e campioni di melanoma con l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)

utilizzando OptiView DAB IHC Detection Kit. Tutti i vetrini sono stati valutati relativamente allo Stato clinico (positivo/negativo) da un unico patologo.

Sono stati effettuati confronti a coppie dello Stato clinico per un totale di 228 campioni (177 CRC, 27 di cancro della tiroide e 24 di melanoma) tra gli strumenti BenchMark GX e BenchMark ULTRA e tra gli strumenti BenchMark XT e BenchMark ULTRA. Gli strumenti BenchMark GX rispetto agli strumenti BenchMark ULTRA hanno evidenziato una concordanza positiva media (APA) del 98.0%, una concordanza negativa media (ANA) del 99.0% e un'OPA del 98.7%. Gli strumenti BenchMark XT rispetto agli strumenti BenchMark ULTRA hanno evidenziato un'APA del 96.6%, un'ANA del 98.4% e un'OPA del 97.8%. Per gli strumenti BenchMark GX rispetto agli strumenti BenchMark XT, sono stati effettuati confronti a coppie di un totale di 230 campioni (179 CRC, 27 di cancro della tiroide e 24 di melanoma) tra le piattaforme. Gli strumenti BenchMark GX rispetto agli strumenti BenchMark XT hanno evidenziato un'APA del 98.7%, un'ANA del 99.4% e un'OPA del 99.1%.

Studi sulla precisione dei patologi

La precisione intra-patologo e tra patologi è stata valutata su 20 campioni CRC (10 casi positivi per la mutazione BRAF V600E e 10 casi negativi per la mutazione BRAF V600E) colorati con l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) utilizzando OptiView DAB IHC Detection Kit su uno strumento BenchMark ULTRA. Ciascun vetrino colorato con l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) è stato accoppiato a un vetrino colorato con H&E e con controllo negativo del reagente dallo stesso caso.

Tutti i set di vetrini sono stati randomizzati e valutati da 3 patologi relativamente allo Stato clinico positivo o negativo per BRAF V600E. I patologi erano in cieco rispetto alla diagnosi del caso. Trascorso un periodo di due settimane per evitare il bias da rievocazione, i vetrini colorati con l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) sono stati nuovamente randomizzati per una seconda valutazione dello Stato clinico BRAF V600E da parte di ciascuno dei 3 patologi. Nessuno dei vetrini colorati con il controllo negativo del reagente ha evidenziato colorazione specifica e la colorazione di fondo è risultata ≤ 0.5 .

Per determinare la precisione intra-patologo sono state confrontate le valutazioni iniziali e finali dei vetrini effettuate da ciascun singolo patologo, per un totale di 20 confronti di vetrini CRC per patologo. I confronti per i 3 patologi sono stati riuniti e hanno evidenziato valori APA del 100%, ANA del 100% e OPA del 100% per la precisione intra-patologo. Un riepilogo dei risultati è disponibile in Tabella 7.

Per determinare la precisione tra patologi sono state confrontate tutte le valutazioni dei vetrini (20 CRC x 2 valutazioni/caso x 3 patologi = 120 valutazioni dei vetrini) rispetto a uno stato modale del caso per ciascun caso CRC. I risultati evidenziano valori PPA, NPA e OPA del 100% per la precisione tra patologi. Un riepilogo dei risultati è disponibile in Tabella 7.

Tabella 7. Precisione intra-patologo e precisione tra patologi dell'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) su casi CRC in base alle misure dello Stato clinico BRAF V600E (positivo/negativo).

Precisione	Stato clinico	Concordanza			
		Tipo	n/N	%	CI al 95%
Intra-patologo	Positivo	APA	60/60	100.0	(93.9, 100.0)
	Negativo	ANA	60/60	100.0	(93.9, 100.0)
	Totale	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)
Tra patologi	Positivo	PPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)
	Negativo	NPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)
	Totale	OPA	120/120	100.0	(96.9, 100.0)

Nota: per la precisione intra-patologo, gli intervalli di confidenza (CI) al 95% di APA e ANA sono stati calcolati con il metodo basato su Clopper-Pearson; il CI al 95% di OPA è stato calcolato con il metodo bootstrap a percentili. Per la precisione tra patologi, gli intervalli di confidenza (CI) al 95% sono stati calcolati con il metodo del punteggio di Wilson.

Precisione da lotto a lotto

La precisione da lotto a lotto dell'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) è stata determinata testando 3 lotti di produzione dell'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) su vetrini triplicati di 10 casi CRC (5 positivi e 5 negativi per la mutazione BRAF

V600E) su uno strumento BenchMark ULTRA utilizzando OptiView DAB IHC Detection Kit.

Ciascun vetrino colorato con l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) è stato accoppiato a un vetrino colorato con il controllo negativo del reagente dallo stesso caso. Tutti i set di vetrini sono stati randomizzati e valutati da un unico patologo in cieco rispetto alla diagnosi del caso e al numero di lotto di anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). Nessuno dei vetrini colorati con il controllo negativo del reagente ha evidenziato colorazione specifica e la colorazione di fondo è risultata ≤ 0.5 .

Per determinare la precisione da lotto a lotto di anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), lo Stato clinico BRAF V600E ottenuto dalla valutazione di ciascun vetrino è stato confrontato rispetto a uno stato modale del caso per il caso in questione. OPA, PPA ed NPA per i lotti di anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) sono risultate pari a 100%, a dimostrazione della riproducibilità della colorazione con l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) tra lotti di anticorpo.

Un riepilogo dei risultati della precisione da lotto a lotto di anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) è riportato in Tabella 8.

Tabella 8. Precisione da lotto a lotto dell'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) in base alle misure dello Stato clinico (positivo/negativo).

Precisione	Stato clinico	Concordanza			
		Tipo	n/N	%	CI al 95%
Da lotto a lotto	Positivo	PPA	45/45	100.0	(92.1, 100.0)
	Negativo	NPA	45/45	100.0	(92.1, 100.0)
	Totale	OPA	90/90	100.0	(95.9, 100.0)

Nota: gli intervalli di confidenza CI al 95% sono stati calcolati con il metodo del punteggio di Wilson.

Studio di riproducibilità inter-laboratorio

È stato condotto uno studio di riproducibilità inter-laboratorio su VENTANA MMR IHC Panel per dimostrare la riproducibilità di ciascuna analisi VENTANA MMR IHC Panel nella determinazione dello Stato clinico. Lo studio ha incluso 6 campioni di tessuto CRC (3 Intatti e 3 Con perdita) per ciascuna proteina MMR e 16 campioni di tessuto CRC (8 positivi e 8 negativi) per BRAF V600E analizzati su 3 strumenti BenchMark ULTRA in ciascuno di 5 giorni non consecutivi in un periodo di 21 giorni presso tre laboratori esterni. Ciascun vetrino colorato con l'anticorpo è stato accoppiato a un vetrino colorato con H&E e con controllo negativo del reagente dallo stesso caso. Tutti i set di vetrini sono stati randomizzati e valutati da un totale di 6 patologi (2 patologi/centro) in cieco rispetto allo Stato clinico MMR del set dello studio. Per ciascuno dei 40 casi nello studio sono state effettuate 30 osservazioni per tutti i giorni, i centri e i patologi. Lo stato di riferimento modale dei casi è stato ottenuto per ciascun caso in base allo stato osservato con maggiore frequenza per le 30 osservazioni. Lo studio ha incluso un totale di 1200 osservazioni per tutte le cinque proteine. Per tutti i casi valutabili, il tasso di accettabilità per morfologia e fondo in questo studio è risultato pari a 100%. Un riepilogo delle statistiche di concordanza riunite (tutte le cinque proteine) tra lo stato di riferimento modale dei casi e le singole osservazioni è disponibile in Tabella 9.

Tabella 9. Concordanza tra VENTANA MMR IHC Panel e stato di riferimento modale dei casi.

Riproducibilità inter-laboratorio	Stato clinico	Concordanza			
		Tipo	n/N	%	CI al 95%
Tutte le proteine	Intatto/positivo	PPA	598/600	99.8	(98.7, 100.0)
	Con perdita/negativo	NPA	593/600	98.9	(97.4, 99.5)
	Totale	OPA	1191/1200	99.4	(98.6, 99.7)

Nota: lo Stato clinico è definito come Intatto o Con perdita relativamente all'espressione di proteina per le proteine MMR e positivo o negativo per la proteina BRAF V600E. Gli intervalli di confidenza CI al 95% sono stati calcolati con un modello misto lineare generalizzato (GLMM).

Sono stati inoltre effettuati confronti a coppie tra centri, tra giorni e tra patologi per l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). Per BRAF V600E, questo set di studio ha incluso un totale di 480 osservazioni. Un riepilogo dei risultati è disponibile in Tabella 10. I dati indicano la riproducibilità dell'analisi tra 5 giorni, 3 centri e 6 patologi.

Tabella 10. Tassi di concordanza a coppie della riproducibilità inter-laboratorio per l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) in base alle misure dello Stato clinico (positivo o negativo).

Riproducibilità inter-laboratorio		Concordanza			
		Tipo	n/N	%	CI al 95%
Tra centri (3 centri)	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)	
Tra giorni (5 giorni non consecutivi)	Centro A	APA	320/320	100.0	(98.8, 100.0)
		ANA	320/320	100.0	(98.8, 100.0)
		OPA	320/320	100.0	(98.8, 100.0)
	Centro 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)
	Centro 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)
Tra patologi (2 patologi per centro)	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: gli intervalli di confidenza (CI) al 95% sono stati calcolati con il metodo bootstrap a percentili; nei casi in cui la stima puntuale era pari a 100%, è stato utilizzato il metodo del punteggio di Wilson.

Caratteristiche prestazionali sullo strumento BenchMark ULTRA PLUS

Ripetibilità all'interno dello stesso giorno e precisione da giorno a giorno

La ripetibilità all'interno dello stesso giorno (intra-corsa di colorazione) è stata valutata utilizzando 10 campioni CRC (5 positivi e 5 negativi per lo Stato clinico BRAF V600E). Cinque vetrini replicati da ciascuno dei campioni CRC sono stati colorati con l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) su uno strumento BenchMark ULTRA PLUS in un unico giorno. Ciascun vetrino colorato con l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) è stato accoppiato a un vetrino colorato con il controllo negativo del reagente dallo stesso caso. Tutte le coppie di vetrini sono state randomizzate e successivamente è stata effettuata la valutazione di Positivo o Negativo da un unico patologo in cieco rispetto alla diagnosi del caso.

Anche la precisione intermedia da giorno a giorno (tra giorni) è stata valutata utilizzando 10 campioni CRC (5 positivi e 5 negativi per lo Stato clinico BRAF V600E). Vetrini replicati da ciascuno dei campioni CRC sono stati colorati con l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) su uno strumento BenchMark ULTRA PLUS in ciascuno di 5 giorni non consecutivi. Inoltre, un singolo vetrino da ciascun caso è stato colorato con il controllo negativo del reagente. Ciascun vetrino colorato con l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) è stato accoppiato a un vetrino colorato con il controllo negativo del reagente dallo stesso caso. Tutte le coppie di vetrini sono state randomizzate e successivamente è stata effettuata la valutazione di Positivo o Negativo da un unico patologo in cieco rispetto alla diagnosi del caso.

Nessuno dei vetrini colorati con il controllo negativo del reagente ha evidenziato colorazione specifica e la colorazione di fondo è risultata ≤ 0.5 . Utilizzando dati riuniti di

tutti i possibili accoppiamenti, tanto gli studi sulla ripetibilità all'interno dello stesso giorno quanto quelli sulla precisione da giorno a giorno hanno evidenziato una concordanza percentuale positiva (PPA) del 100%, una concordanza percentuale negativa (NPA) del 100% e una concordanza percentuale complessiva (OPA) del 100%. Un riepilogo dei risultati è riportato in Tabella 11.

Tabella 11. Ripetibilità all'interno dello stesso giorno e precisione da giorno a giorno sullo strumento BenchMark ULTRA PLUS dell'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) in base alle misure dello Stato clinico (positivo/negativo)

Ripetibilità/ Precisione	Stato clinico	Concordanza			
		Tipo	n/N	%	CI al 95%
Ripetibilità all'interno dello stesso giorno	Positivo	PPA	25/25	100.0	(86.7,100.0)
	Negativo	NPA	25/25	100.0	(86.7,100.0)
	Totale	OPA	50/50	100.0	(92.9,100.0)
Precisione da giorno a giorno	Positivo	PPA	50/50	100.0	(92.9,100.0)
	Negativo	NPA	48/48	100.0	(92.6,100.0)
	Totale	OPA	98/98	100.0	(96.2,100.0)

Nota: gli intervalli di confidenza CI al 95% sono stati calcolati con il metodo del punteggio di Wilson.

Precisione da strumento a strumento su BenchMark ULTRA PLUS

La precisione intermedia da strumento a strumento (tra strumenti) BenchMark ULTRA PLUS dell'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) è stata determinata colorando vetrini replicati di 10 campioni CRC (5 positivi e 5 negativi per lo Stato clinico BRAF V600E) su 3 strumenti BenchMark ULTRA PLUS con l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) utilizzando OptiView DAB IHC Detection Kit. Inoltre, un singolo vetrino da ciascun caso è stato colorato con un controllo negativo del reagente.

Ciascun vetrino colorato con l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) è stato accoppiato a un vetrino colorato con il controllo negativo del reagente dallo stesso caso. Tutti le coppie di vetrini sono state randomizzate e successivamente valutate relativamente allo Stato clinico (positivo/negativo) da un unico patologo in cieco rispetto alla diagnosi del caso. Nessuno dei vetrini colorati con il controllo negativo del reagente ha evidenziato colorazione specifica e la colorazione di fondo è risultata ≤ 0.5 .

Per quanto riguarda la precisione da strumento a strumento su BenchMark ULTRA PLUS, sono stati effettuati confronti a coppie dello Stato clinico dei vetrini per ciascun campione tra gli strumenti; tali confronti hanno evidenziato PPA, NPA e OPA pari a 100%. Un riepilogo dei risultati è disponibile in Tabella 12.

Tabella 12. Precisione da strumento a strumento su BenchMark ULTRA PLUS dell'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) in base alle misure dello Stato clinico (positivo/negativo)

Precisione	Stato clinico	Concordanza			
		Tipo	n/N	%	CI al 95%
Da strumento a strumento	Positivo	PPA	30/30	100.0	(88.6,100.0)
	Negativo	NPA	30/30	100.0	(88.6,100.0)
	Totale	OPA	60/60	100.0	(94.0,100.0)

Nota: gli intervalli di confidenza CI al 95% sono stati calcolati con il metodo del punteggio di Wilson.

Concordanza tra piattaforme per BenchMark ULTRA PLUS e BenchMark ULTRA

È stato condotto uno studio per confrontare le prestazioni di colorazione dell'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) utilizzando OptiView DAB IHC Detection Kit sullo strumento BenchMark ULTRA PLUS rispetto allo strumento BenchMark ULTRA. Sono stati colorati centoventi (120) casi di tessuto di carcinoma del colon-retto (14 positivi per BRAF V600E, 13 negativi per BRAF V600E, 93 con stato per MMR ignoto) e i vetrini

colorati sono stati valutati da un patologo che ha determinato lo stato diagnostico. La concordanza percentuale complessiva è risultata pari a 98.3%. Tutti i tessuti colorati con l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) avevano morfologia e colorazione di fondo accettabili. Un riepilogo dei risultati è riportato in Tabella 13.

Tabella 13. Concordanza dell'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) su uno strumento BenchMark ULTRA PLUS rispetto a uno strumento BenchMark ULTRA in base alle misure di Stato clinico (positivo/negativo)

Tra piattaforme Concordanza	Concordanza			
	Tipo	n/N	%	CI al 95%
ULTRA su 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: gli intervalli di confidenza CI al 95% sono stati calcolati con il metodo del punteggio di Wilson.

Studio di accuratezza: confronto tra metodi dei risultati VENTANA MMR IHC Panel e i test molecolari (sequenziamento di DNA e ipermetilazione del promotore di MLH1)

È stato condotto uno studio per eseguire un confronto tra le prestazioni di VENTANA MMR IHC Panel e test molecolari con un esaustivo pannello colon di sequenziamento di DNA per identificare i CRC che (i) sono MMR deficienti (dMMR) e (ii) contengono la mutazione BRAF V600E. Il pannello colon di sequenziamento di DNA includeva l'analisi genomica di varianti presenti in geni MMR (*MLH1*, *PMS2*, *MSH2*, *MSH6*, *EPCAM*), *BRAF* e in altri geni che giocano un ruolo importante nella cancerogenesi (per esempio *PIK3CA*, *KRAS*, *NRAS*, *ERBB2*, eccetera). Il sequenziamento ha interessato tutti gli esoni, le sequenze introniche e fiancheggianti così come ampie delezioni, duplicazioni e mosaicismi.

Per condurre lo studio, casi CRC sequenziali sono stati colorati tramite H&E e valutati relativamente alle indicazioni di fissazione e morfologia adeguate, inclusa la presenza di elementi cellulari (cellule tumorali e di controllo interno). Ciascun caso è stato valutato per determinare se il campione presentava un contenuto di tumore minimo pari a 50% per fornire una rappresentazione sufficiente delle cellule tumorali nel campione, in linea con le indicazioni consigliate per i test molecolari. A seguito della revisione, 105 casi sequenziali che soddisfacevano tali criteri sono stati arruolati nello studio. Sono stati inoltre inclusi 13 casi CRC che presentavano uno Stato clinico Con perdita in base all'IHC allo scopo di garantire che la perdita di ciascun indicatore fosse rappresentata nello studio. Sezioni di tutti i casi dello studio sono state colorate tramite IHC con VENTANA MMR IHC Panel e gli opportuni controlli negativi del reagente. Sezioni aggiuntive sono state sottoposte al pannello colon di sequenziamento di DNA. L'ipermetilazione del promotore di *MLH1* è uno dei meccanismi che possono dare luogo alla perdita di espressione della proteina *MLH1* ed è legata al CRC sporadico anziché alla diagnosi di potenziale sindrome di Lynch. Pertanto, tutti i casi di perdita di *MLH1* identificati nello studio tramite IHC sono stati testati relativamente all'ipermetilazione del promotore di *MLH1*.

Nel set di studio finale comprendente 118 casi, l'analisi ha incluso PPA e NPA per tutti gli indicatori riuniti (ossia tutte le osservazioni riunite) in cui i test molecolari fungevano da stato di riferimento per il confronto IHC. L'analisi ha incluso un confronto tra lo stato delle proteine MMR (Intatto/Con perdita) e lo stato molecolare definito come normale (nessuna mutazione patogena, negativo per l'ipermetilazione del promotore di *MLH1* e *BRAF* nativo (nessuna mutazione *V600E*)) o anomalo (presenza di una o più mutazioni patogene, positivo per l'ipermetilazione del promotore di *MLH1* e/o positivo per la mutazione BRAF V600E). Nell'ambito di questo studio, una mutazione patogena nel tumore è definita come una mutazione germinale o somatica che si prevede comporti la perdita di espressione di proteine MMR. Le stime puntuali sono risultate pari a 99.4% PPA, 93.5% NPA e 98.8% OPA come riportato in Tabella 14.

È stata condotta anche un'analisi riunita di confronto tra i quattro indicatori IHC MMR (senza l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) e i risultati dei test molecolari. Le stime puntuali sono risultate pari a 99.3% PPA, 89.7% NPA e 98.5% OPA come riassunto in Tabella 15.

Un'ulteriore analisi ha confrontato i risultati dei quattro indicatori IHC MMR con i risultati dei test molecolari per i geni MMR a livello di caso per includere lo stato di tutti gli

indicatori e creare un esito dMMR/pMMR per i due metodi. Questa analisi è riportata in Tabella 16 ed evidenzia un'OPA del 97.4% tra i due metodi.

Lo stato MMR determinato tramite IHC e lo stato MMR determinato tramite i test molecolari sono stati confrontati anche relativamente ai singoli indicatori MMR nello studio. L'OPA di ciascun indicatore MMR, se confrontata con i risultati combinati del pannello colon di sequenziamento di DNA e dei test di ipermetilazione del promotore di MLH1, è risultata pari a 100.0% per l'anticorpo VENTANA anti-MLH1 (M1), a 99.1% per VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody, a 98.3% per VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody e a 96.6% per VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody.

Anche lo Stato clinico BRAF V600E nei CRC ottenuto tramite IHC utilizzando l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) è stato confrontato con i risultati dello stato mutazionale del gene BRAF determinato tramite sequenziamento di DNA. PPA, NPA e OPA dei test IHC utilizzando l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) con il sequenziamento di DNA come riferimento sono risultate pari a 100% (Tabella 17). Ulteriori test sono stati condotti per verificare la capacità dell'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) di stratificare ulteriormente i casi CRC che presentano una perdita di espressione di proteina MLH1. Tra i 23 casi BRAF V600E positivi, 20 presentavano perdita di proteina MLH1 in base all'IHC ed erano positivi per l'ipermetilazione del promotore di *MLH1*. Tali dati sono coerenti con la stretta associazione tra stato BRAF V600E positivo e stato di ipermetilazione del promotore di *MLH1*. I restanti tre casi erano pMMR (intatti per tutte le proteine MMR). Tutti i campioni BRAF V600E positivi sono stati identificati come CRC sporadico. I risultati hanno permesso di verificare che l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) identifica correttamente i CRC che possiedono la mutazione *BRAF V600E*. I dati supportano inoltre l'uso dell'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) per differenziare tra CRC sporadico e CRC con probabile sindrome di Lynch in assenza di espressione della proteina MLH1.

Tabella 14. Analisi riunita della concordanza VENTANA MMR IHC Panel tra IHC e test molecolari.

Stato* (Molecolare/IHC)	Concordanza			
	Tipo	n/N	%	CI al 95%
Normale/Intatto	PPA	523/526	99.4	(98.7, 100.0)
Anomalo/Con perdita	NPA	58/62	93.5	(87.1, 98.6)
Totale	OPA	581/588	98.8	(98.0, 99.7)

*Per l'IHC, lo stato MMR è definito come Intatto o Con perdita relativamente all'espressione delle proteine. Per questa analisi, i casi BRAF V600E negativi e positivi sono stati inclusi rispettivamente nelle categorie Intatto o Con perdita. I test molecolari indicano l'assenza (normale) o la presenza (anomalo) di potenziali mutazioni patogene o dell'ipermetilazione del promotore di *MLH1*. Gli intervalli di confidenza CI al 95% sono stati calcolati con il metodo bootstrap a percentili.

Tabella 15. Analisi riunita per quattro indicatori IHC MMR (senza l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) relativamente alla concordanza tra IHC e test molecolari.

Stato* (Molecolare/IHC)	Concordanza			
	Tipo	n/N	%	CI al 95%
Normale/Intatto	PPA	428/431	99.3	(98.4, 100.0)
Anomalo/Con perdita	NPA	35/39	89.7	(79.4, 97.7)
Totale	OPA	463/470	98.5	(97.3, 99.6)

*Per l'IHC, lo stato è definito come Intatto o Con perdita relativamente all'espressione delle proteine. I test molecolari indicano l'assenza (normale) o la presenza (anomalo) di potenziali mutazioni patogene o dell'ipermetilazione del promotore di *MLH1*. Gli intervalli di confidenza CI al 95% sono stati calcolati con il metodo bootstrap a percentili.

Tabella 16. Concordanza tra i quattro indicatori IHC MMR e i risultati dei test molecolari relativamente allo stato MMR (dMMR/pMMR).

Stato MMR*	Concordanza			
	Tipo	n/N	%	CI al 95%
pMMR	PPA	79/80	98.8	(93.3, 99.8)
dMMR	NPA	35/37	94.6	(82.3, 98.5)
Totale	OPA	114/117	97.4	(92.7, 99.1)

*Per l'IHC, lo stato pMMR per un caso è rappresentato da uno stato Intatto per tutte le proteine MMR, mentre lo stato dMMR è rappresentato dallo stato Con perdita di una o più proteine MMR. Per i test molecolari, lo stato pMMR è rappresentato dall'assenza di mutazioni patogene o dell'ipermetilazione del promotore di *MLH1*, mentre lo stato dMMR è rappresentato dalla presenza di mutazioni patogene o dell'ipermetilazione del promotore di *MLH1*. Gli intervalli di confidenza (CI) al 95% sono stati calcolati con il metodo del punteggio di Wilson.

Tabella 17. Concordanza tra IHC utilizzando l'anticorpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) e i test molecolari.

BRAF V600E Stato (Molecolare/IHC)	Concordanza			
	Tipo	n/N	%	CI al 95%
Positivo/anomalo	PPA	23/23	100.0	(85.7, 100.0)
Negativo/normale	NPA	95/95	100.0	(96.1, 100.0)
Totale	OPA	118/118	100.0	(96.8, 100.0)

Lo stato per BRAF V600E è stato definito come risultati IHC positivi o negativi e come risultati anomali (presenza della mutazione V600E) o normali (*BRAF* nativo) in base ai test molecolari. Gli intervalli di confidenza (CI) al 95% sono stati calcolati con il metodo del punteggio di Wilson.

BIBLIOGRAFIA

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. Peltomaki 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. 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.
21. 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.
22. Egoavil C, Alenda C, Castillejo A, Paya A, Peiro G, et al. Prevalence of Lynch syndrome among patients with newly diagnosed endometrial cancers. *PLoS One*. 2013;8(11):e79737.
23. Connell LC, Mota JM, Braghiroli MI, Hoff PM. The Rising Incidence of Younger Patients With Colorectal Cancer: Questions About Screening, Biology, and Treatment. *Curr Treat Options Oncol*. 2017;18(4):23.
24. Provenzale D, Gupta S, Ahnen DJ, Bray T, Cannon JA, et al. Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal Version 1.2016. *NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology*. *J Natl Compr Canc Netw*. 2016;14(8):1010-1030.
25. Balmana J, Balaguer F, Cervantes A, Arnold D, Group EGW. Familial risk-colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol*. 2013;24 Suppl 6:vi73-80.
26. Evaluation of Genomic Applications in P, Prevention Working G. Recommendations from the EGAPP Working Group: genetic testing strategies in newly diagnosed individuals with colorectal cancer aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome in relatives. *Genet Med*. 2009;11(1):35-41.
27. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(4):261-268.
28. Parsons MT, Buchanan DD, Thompson B, Young JP, Spurdle AB. Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. *J Med Genet*. 2012;49(3):151-157.
29. Shia J. Evolving approach and clinical significance of detecting DNA mismatch repair deficiency in colorectal carcinoma. *Semin Diagn Pathol*. 2015;32(5):352-361.
30. Thiel A, Heinonen M, Kantonen J, Gylling A, Lahtinen L, et al. BRAF mutation in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. *Virchows Arch*. 2013;463(5):613-621.
31. Toon CW, Chou A, DeSilva K, Chan J, Patterson J, et al. BRAFV600E immunohistochemistry in conjunction with mismatch repair status predicts survival in patients with colorectal cancer. *Mod Pathol*. 2014;27(5):644-650.
32. Koinuma K, Shitoh K, Miyakura Y, Furukawa T, Yamashita Y, et al. Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas. *Int J Cancer*. 2004;108(2):237-242.
33. Capper D, Preusser M, Habel A, 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: nel presente documento si utilizza sempre un punto come separatore decimale per separare la parte intera di un numero decimale da quella frazionaria. I separatori per le migliaia non sono utilizzati.

Un riepilogo dei dati su sicurezza e prestazioni è disponibile qui:

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

Simboli

Ventana usa i seguenti simboli e segni in aggiunta a quelli elencati nello standard ISO 15223-1 (per gli Stati Uniti: visitare il sito elabdoc.roche.com/symbols per maggiori informazioni):

GTIN	Numero prodotto globale
UDI	Identificazione unica del dispositivo

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Rev.	Aggiornamenti
F	Aggiornamenti alla sezione Materiali necessari ma non forniti con ulteriori codici per 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 e VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody.

PROPRIETÀ INTELLETTUALE

VENTANA, BENCHMARK, OPTIVIEW e il logo VENTANA sono marchi commerciali di Roche. Tutti gli altri marchi commerciali sono di proprietà dei rispettivi titolari.

© 2023 Ventana Medical Systems, Inc.

INFORMAZIONI DI CONTATTO

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

www.roche.com

