

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

Zur Verwendung mit VENTANA MMR IHC Panel

REF 760-5095

08033706001

IVD  50

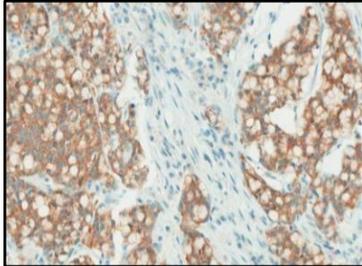


Abb. 1. Färbung neoplastischer Zellen in Kolonkarzinomgewebe mit VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper.

VERWENDUNGSZWECK

VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper) ist für den qualitativen Nachweis von BRAF V600E-Protein in Schnitten von formalinfixiertem, paraffineingebettetem Gewebe bestimmt. Der VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper wurde zur Verwendung auf BenchMark IHC/ISH Geräten mit OptiView DAB IHC Detection Kit und entsprechenden Hilfsreagenzien entwickelt.

Der VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper ist Teil des VENTANA MMR IHC Panel, zu dem der VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody, der VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody, der VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody und der VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody gehören. Das VENTANA MMR IHC Panel ist für den Nachweis eines Defekts von Fehlpaarungs-Reparaturproteinen zur Identifizierung von Patienten mit Risiko für Lynch-Syndrom bei diagnostiziertem Kolorektalkarzinom (CRC) bestimmt. Bei BRAF V600E-Status dient es auch zur Unterstützung bei der Unterscheidung zwischen einem sporadischen CRC und einem wahrscheinlichen Lynch-Syndrom-CRC mit fehlender Expression des MLH1-Proteins.

Diese Produkte müssen von einem qualifizierten Pathologen in Verbindung mit histologischen Untersuchungen, klinisch relevanten Informationen und geeigneten Kontrollen ausgewertet werden.

Zur Verwendung in der In-vitro-Diagnostik (IVD).

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Kolorektalkarzinome sind die dritthäufigste Form von Krebs und die vierthäufigste Todesursache bei Krebserkrankungen weltweit.¹ Bei den meisten CRCs liegt eine chromosomale Instabilität vor. Etwa 15 % dieser Krebserkrankungen entwickeln sich jedoch über einen alternativen Weg, der durch einen Defekt im System zur Reparatur von DNA-Fehlpaarungen (MMR-System) gekennzeichnet ist. Infolge des MMR-Defekts weisen die Tumoren eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) auf, die auf das Unvermögen der MMR-Proteine zurückzuführen ist, Fehler bei der DNA-Replikation zu reparieren.

CRCs mit MMR-Defekt werden als dMMR(deficient MMR)-Tumoren bezeichnet, CRCs ohne MMR-Defekt dagegen als pMMR(proficient MMR)-Tumoren. Die dMMR-Formen des Kolorektalkarzinoms sind häufig kaum differenziert, überproportional oft im proximalen Kolon lokalisiert und weisen histologisch muzinöse, medulläre oder Siegelring-Merkmale auf sowie eine erhöhte Anzahl von tumorinfiltrierenden Lymphozyten.^{2,3} Generell kann ein MMR-Defekt entweder durch Keimbahnmutationen in einem der MMR-Gene mit anschließendem Verlust des jeweiligen normalen Allels durch genetische oder epigenetische Mechanismen, durch somatische Mutationen in den Allelen oder durch epigenetische Inaktivierung des *MLH1*-Gens durch Methylierung verursacht werden.⁴

Die vier am häufigsten mutierten MMR-Gene sind *MLH1*, *PMS2*, *MSH2* und *MSH6*. In normalen Zellen bildet das *MLH1*-Protein mit dem *PMS2*-Protein einen Komplex (Heterodimer), während das *MSH2*-Protein mit dem *MSH6*-Protein einen Komplex bildet.^{5,6} Im Falle einer DNA-Fehlpaarung bindet das *MSH2/MSH6*-Heterodimer daran und induziert dort eine Konformationsänderung. Das *MLH1/PMS2*-Heterodimer bindet den DNA-gebundenen *MSH2/MSH6*-Komplex, was zur Exzisionsreparatur der betroffenen DNA führt.

Die Proteine *MLH1*, *PMS2*, *MSH2* und *MSH6* sind klinisch wichtige MMR-Proteine und werden von Genen codiert, die in Familien mit Lynch-Syndrom gegebenenfalls mutiert sind.^{7,8} Bei Trägern dieser Mutationen besteht aufgrund der Akkumulation von DNA-Replikationsfehlern in proliferierenden Zellen ein hohes Lebenszeitrisiko für die Entwicklung von Kolorektalkarzinom und anderen Krebsformen. Bei 1-6 % aller CRCs handelt es sich um das Lynch-Syndrom. Diese Tumoren resultieren aus der Vererbung einer autosomal-dominanten Keimbahnmutation in einem der vier MMR-Gene. Bei den meisten dieser mit dem Lynch-Syndrom assoziierten CRCs liegt ein Verlust von *MLH1* vor.^{5,9,10} Bei Patienten mit Lynch-Syndrom wurden mehr als 300 verschiedene Mutationen der MMR-Proteinfamilie identifiziert. Der mit dem Lynch-Syndrom assoziierte Tumor-Phänotyp ist im Allgemeinen durch einen immunhistochemischen Verlust der Expression von MMR-Proteinen gekennzeichnet, insbesondere von *MLH1*, *PMS2*, *MSH2* und *MSH6*.¹⁰⁻¹³ Bei der Identifizierung des jeweiligen MMR-Gens, in dem eine Keimbahnveränderung oder somatische Veränderung am wahrscheinlichsten zu finden ist, haben sich immunhistochemische (IHC) MMR-Tests als nützlich erwiesen.¹⁴

Das *BRAF*-Gen befindet sich auf Chromosom 7q34 und codiert eine zytoplasmatische Serin-Threonin-Kinase, die nachgeordnet zum mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK)-Signalweg agiert. Onkogene Mutationen im *BRAF*-Gen, alle innerhalb der Kinasedomäne, bewirken eine konstitutive Aktivierung des MAPK-Signalwegs, was zu einer erhöhten Zellproliferation und Apoptoseresistenz führt. Die häufigste aller aktivierenden *BRAF*-Mutationen (Punktmutation T1799A) führt zu einer Substitution von Valin (V) durch Glutaminsäure (E) an Position 600 der Aminosäuresequenz und ist in 12 % aller CRC nachweisbar.^{15,16}

Als Teil von VENTANA MMR IHC Panel ermöglicht der VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper die Unterscheidung zwischen sporadischem CRC und wahrscheinlichem Lynch-Syndrom mit fehlender *MLH1*-Proteinexpression.^{17,18} Bei einem CRC ist der Verlust des *MLH1*-Proteins häufig das Ergebnis einer Hypermethylierung des *MLH1*-Promotors und weist auf ein sporadisches Auftreten hin.¹⁹ Das Vorhandensein des *BRAF* V600E-Proteins ist eng mit der Hypermethylierung des *MLH1*-Promotors verbunden. Daher spricht ein positives Färbegergebnis mit dem VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper für ein sporadisches CRC.

Abgesehen von ihrer Rolle bei der Stratifizierung von CRC ist die *BRAF* V600E-Mutation in ungefähr 8 % aller soliden Tumoren nachweisbar, beispielsweise bei 43 % der Melanome, 39 % der papillären Schilddrüsenkarzinome, 12 % der serösen Ovarialkarzinome, 2 % der Lungenkarzinome und bei anderen Krebsformen.¹⁶ Darüber hinaus wurde die *BRAF* V600E-Mutation vor Kurzem als molekularer Marker für Haarzell-Leukämie beschrieben.²⁰

KLINISCHE BEDEUTUNG

Das Lynch-Syndrom wurde in den 1960er Jahren erstmals beschrieben und stellte einen Zusammenhang zwischen dem Verlust der MMR-Funktion und Krebs her.²¹ Der Verlust von MMR-Proteinen (*MLH1*, *PMS2*, *MSH2* oder *MSH6*) kann zu MSI und einem höheren Lebenszeitrisiko nicht nur für CRC, sondern auch für Krebserkrankungen des Magens, des Gehirns, der Bauchspeicheldrüse, der Haut, der Gebärmutter-schleimhaut und der Eierstöcke führen. Bei Patienten mit Lynch-Syndrom besteht ein 50- bis 80%iges Lebenszeitrisiko für CRC.^{5,22,23} Das Lynch-Syndrom unterscheidet sich von anderen erblichen Krebsyndromen, da direkte Tests von Tumorgewebe die Identifizierung von Patienten mit einem Risiko für ein potenzielles Lynch-Syndrom unterstützen und zur Grundlage für anschließende Keimbahn-Genests beitragen. Familien mit Lynch-Syndrom können von modernen Krebsvorsorgemaßnahmen profitieren.

In verschiedenen Leitlinien, einschließlich der des National Comprehensive Cancer Network (NCCN), wird empfohlen, alle CRCs auf Vorliegen eines potenziellen Lynch-Syndroms zu untersuchen, um Patienten und Familien zu identifizieren, bei denen weitere Genests und eine entsprechende Beratung sinnvoll wären.^{21,24-27} Die Verwendung von VENTANA MMR IHC Panel unterstützt die Bestimmung des MMR-Status von CRCs durch Feststellung der Intaktheit bzw. des Verlustes der Expression von MMR-Protein. Der Nachweis aller vier MMR-Proteine im Tumor bedeutet ein normales bzw. intaktes MMR-System. Der Verlust der *MLH1*- oder *MSH2*-Expression geht fast immer mit dem Verlust des Heterodimer-Partners *PMS2* oder *MSH6* einher. Der Verlust von *PMS2* oder *MSH6* führt jedoch nicht zum Verlust von *MLH1* oder *MSH2*. Der Verlust von *PMS2*, *MSH2* und/oder *MSH6* bedeutet, dass wahrscheinlich ein Lynch-Syndrom vorliegt. Im Einklang mit der klinischen Praxis sollten bei diesen Patienten zusätzliche Tests und eine Beratung durchgeführt werden.

Der Verlust von *MLH1*-Protein kann auf ein sporadisches Auftreten oder ein mögliches Lynch-Syndrom hinweisen. Bei 15 % oder mehr der sporadischen CRC-Fälle ist der Verlust des *MLH1*-Proteins auf die Hypermethylierung des *MLH1*-Promotors

zurückzuführen.^{5,28,29} Ein wichtiger Punkt ist, dass bei etwa zwei Drittel der Tumoren mit Verlust der MLH1-Expression aufgrund der Hypermethylierung des *MLH1*-Promotors die BRAF V600E-Mutation vorhanden ist. Beim Lynch-Syndrom wird die BRAF V600E-Mutation dagegen sehr selten beobachtet.²⁸ Wenn das Ergebnis des Tests mit VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (VENTANA anti-MLH1 (M1) Antikörper) auf einen Verlust des MLH1-Proteins hindeutet, kann die Tumorerkrankung daher mithilfe des VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörpers als sporadisch oder wahrscheinliches Lynch-Syndrom stratifiziert werden.^{5,30} Der Verlust von MLH1-Protein mit einem positiven BRAF V600E-Status des CRCs deutet stark darauf hin, dass es sich um einen sporadischen Tumor handelt, sodass das Lynch-Syndrom als zugrunde liegende Ursache für das Malignom praktisch ausgeschlossen werden kann.^{21,31} Wenn der Verlust des MLH1-Proteins von einem negativen BRAF V600E-Status begleitet ist, korreliert der MLH1-Verlust mit einer hohen Wahrscheinlichkeit mit dem Vorliegen des Lynch-Syndroms.³²

VERFAHRENSPRINZIP

Der VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper ist ein monoklonaler Maus-Antikörper (Klon VE1), der gegen ein synthetisches Peptid hergestellt wird, das die mutierte Aminosäuresequenz von BRAF von Aminosäure 596 bis 606 (GLATEKSRWWSG) darstellt. Dieser mutationsspezifische Antikörper zeigt ein zytoplasmatisches Färbemuster. Er ermöglicht die Differenzierung der V600E-Mutation im BRAF-Protein vom Wildtyp-BRAF-Protein und anderen BRAF-Proteinmutationen.^{33,34}

Im Zusammenhang mit IHC-Tests zur Erkennung von DNA-Fehlpaarungsreparaturproteinen (MMR) als Marker für ein potenzielles Lynch-Syndrom weist die Identifizierung der BRAF V600E-Mutation in Fällen eines Verlustes von MLH1 auf ein sporadisches Kolorektalkarzinom (CRC) hin.³²

Der VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper bindet spezifisch an das mutierte BRAF V600E-Protein in formalinfixierten, paraffineingebetteten (FFPE) Gewebeschnitten. Der Antikörper kann durch einen haptenierten sekundären Antikörper, gefolgt von einem Anti-Hapten-HRP-Multimer-Konjugat (OptiView DAB IHC Detection Kit, Art.-Nr. 760-700 / 06396500001) lokalisiert werden. Die Sichtbarmachung des spezifischen Antikörper-Enzym-Komplexes erfolgt mithilfe eines Enzymreaktionsproduktes, das einen Niederschlag bildet. Bei jedem Schritt wird der Komplex für einen genau festgelegten Zeitraum und bei einer genau festgelegten Temperatur inkubiert. Am Ende jedes Inkubationsschrittes werden die Schnitte auf dem Gerät gewaschen, um die Reaktion zu stoppen und ungebundenes Material zu entfernen, das andernfalls in den folgenden Schritten den Eintritt der gewünschten Farbreaktion verhindern könnte. Darüber hinaus wird auch ULTRA LCS (Predilute) (Art.-Nr. 650-210 / 05424534001) oder LCS (Predilute) (Art.-Nr. 650-010 / 05264839001) angewendet, was die Verdunstung der wasserhaltigen Reagenzien vom Objektträger minimiert.

IM LIEFERUMFANG ENTHALTENES MATERIAL

Der VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper enthält ausreichendes Reagenzmaterial für 50 Tests.

Ein 5-mL-Spender mit VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper enthält etwa 60 µg eines monoklonalen Maus-Antikörpers.

Der Antikörper ist in Phosphatpuffer (pH 7.3) mit dem Trägerprotein Brij 35 und 0.05 % ProClin 300, einem Konservierungsmittel, verdünnt.

Die spezifische Antikörperkonzentration beträgt etwa 12 µg/mL.

Der VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper ist ein monoklonaler Maus-Antikörper, der als gereinigter Zellkulturüberstand hergestellt wird.

Eine ausführliche Beschreibung der folgenden Punkte ist dem Methodenblatt des entsprechenden VENTANA Nachweiskits zu entnehmen: Verfahrensprinzip, Materialien und Methoden, Probensammlung und -vorbereitung zur Analyse, Qualitätskontrollverfahren, Fehlerbehebung, Interpretation der Ergebnisse und Einschränkungen.

NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE, ABER ERFORDERLICHE MATERIALIEN

Färbereagenzien wie die VENTANA Nachweiskits und Hilfskomponenten, einschließlich der Objektträger mit negativen und positiven Gewebekontrollen, werden nicht mitgeliefert. Möglicherweise sind nicht alle in dem Methodenblatt aufgeführten Produkte in allen Regionen verfügbar. Wenden Sie sich an den zuständigen Kundendienst.

Die folgenden möglicherweise für die Färbung benötigten Reagenzien und Materialien sind nicht im Lieferumfang enthalten:

- Empfohlenes Kontrollgewebe
- Objektträger, positiv geladen
- VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (Art.-Nr. 730-7159 / 09605584001 oder Art.-Nr. 760-5091 / 08033668001)
- VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody (Art.-Nr. 730-7158 / 09607161001 oder Art.-Nr. 760-5094 / 08033692001)
- VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody (Art.-Nr. 730-7160 / 09607137001 oder Art.-Nr. 760-5093 / 08033684001)
- VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (Art.-Nr. 730-7161 / 09606769001 oder Art.-Nr. 760-5092 / 08033676001)
- Negative Control (Monoclonal) (Art.-Nr. 760-2014 / 05266670001)
- Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (Art.-Nr. 790-4795 / 06683380001)
- OptiView DAB IHC Detection Kit (Art.-Nr. 760-700 / 06396500001)
- Für VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody, OptiView Amplification Kit (Art.-Nr. 760-099 / 06396518001 [50 Tests] oder Art.-Nr. 860-099 / 06718663001 [250 Tests])
- EZ Prep Concentrate (10X) (Art.-Nr. 950-102 / 05279771001)
- Reaction Buffer Concentrate (10X) (Art.-Nr. 950-300 / 05353955001)
- ULTRA LCS (Predilute) (Art.-Nr. 650-210 / 05424534001)
- LCS (Predilute) (Art.-Nr. 650-010 / 05264839001)
- ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (Art.-Nr. 950-224 / 05424569001)
- Cell Conditioning Solution (CC1) (Art.-Nr. 950-124 / 05279801001)
- Hematoxylin II (Art.-Nr. 790-2208 / 05277965001)
- Bluing Reagent (Art.-Nr. 760-2037 / 05266769001)
- Dauerhaftes Eindeckmedium
- Deckglas
- Eindeckautomat
- Allgemeine Laborgeräte
- BenchMark IHC/ISH Gerät

LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Bei Annahme, und wenn nicht verwendet, bei 2-8 °C lagern. Nicht einfrieren.

Um die ordnungsgemäße Abgabe der Reagenzien und die Stabilität des Antikörpers zu gewährleisten, muss die Spender-Verschlusskappe nach jedem Gebrauch wieder aufgesetzt und der Spender sofort in aufrechter Position in den Kühlschrank gestellt werden.

Jeder Antikörperspender ist mit einem Verfallsdatum versehen. Bei korrekter Lagerung ist das Reagenz bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil. Das Reagenz darf nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.

PROBENVORBEREITUNG

Für diesen primären Antikörper eignet sich routinemäßig präpariertes FFPE-Gewebe, wenn es mit OptiView DAB IHC Detection Kit und einem BenchMark IHC/ISH Gerät verwendet wird. Als Gewebefixierungsmittel wird 10%iges neutral gepuffertes Formalin empfohlen.³⁵

Für den VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper wird empfohlen, das Gewebe innerhalb von 2 Stunden nach der Exzision in 10 % mindestens 12 Stunden lang in neutral gepuffertem Formalin (NBF) zu fixieren. Die Grundlage dafür waren Xenotransplantatmodelle mit den humanen Zelllinien A2058 (Melanom) und LS411N (CRC), die hinsichtlich der Expression von BRAF V600E positiv sind. Jedoch wurden auch mit einer Fixierungsdauer von bis zu 72 Stunden in 10 % NBF äquivalente BRAF V600E-Färberegebnisse erzielt. Auch bei Fixierung in Zink-Formalin-Fixativ über 12-72 Stunden war das Färberegebnis mit dem VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper akzeptabel.

Alkohol-Formalin-Eisessig (AFA), 95 % Ethanol, Z-5 und PREFER Fixiermittel sind für die Verwendung mit dem VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper nicht empfohlen. In Alkohol-Formalin fixiertes Xenotransplantatgewebe weist keine oder eine variable Färbung auf.

Die zu verwendende Menge an Fixativ sollte das 15- bis 20-fache Volumen des Gewebes betragen. Kein Fixiermittel dringt innerhalb von 24 Stunden mehr als 2 bis 3 mm in festes Gewebe oder mehr als 5 mm in poröses Gewebe ein. Die Fixierung kann bei Raumtemperatur stattfinden (15-25 °C).^{35,36}

Es sollten etwa 4 µm dicke Gewebeschnitte erstellt und auf positiv geladene Objektträger aufgebracht werden. Die Objektträger sind möglichst sofort zu färben, da die Antigenität der Gewebeschnitte mit der Zeit nachlassen kann. Ungefärbte, bei 5 ±3 °C oder 30 ±5 °C bis zu 8 Wochen lang gelagerte Objektträger mit CRC-Gewebe ergaben mit dem VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper jedoch eine ähnliche Färbungsintensität wie die von demselben Block abgetrennten Gewebeproben, die an Tag 1 mit dem VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper gefärbt wurden. Bitte Sie Ihren Roche Vertreter um ein Exemplar des Informationsblattes „Recommended Slide Storage and Handling“, das weiterführende Informationen enthält.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Zur Verwendung in der In-vitro-Diagnostik (IVD).
- Nur zur professionellen Verwendung.
- WICHTIGER HINWEIS:** In den USA ist der Verkauf dieses Produkts laut Bundesgesetz nur durch einen Arzt oder auf Anordnung eines Arztes zulässig. (Rx Only (verschreibungspflichtig))
- Nur für die angegebene Testanzahl verwenden.
- ProClin 300 Lösung wird als Konservierungsmittel in diesem Reagenz verwendet. Es ist als Reizstoff eingestuft und kann eine Sensibilisierung durch Hautkontakt hervorrufen. Beim Umgang mit diesem Mittel angemessene Vorsichtsmaßnahmen zu treffen. Kontakt mit Augen, Haut und Schleimhäuten vermeiden. Schutzhandschuhe und entsprechende Schutzkleidung tragen.
- Positiv geladene Objektträger können gegenüber umgebungsbedingten Belastungen anfällig sein, die zu einer nicht adäquaten Färbung führen. Mehr Informationen über die Verwendung dieser Arten von Objektträgern erhalten Sie von Ihrem Roche Servicetechniker.
- Materialien menschlichen oder tierischen Ursprungs müssen als biogefährliche Materialien behandelt und mit den erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen entsorgt werden. Im Falle einer Exposition sind die Richtlinien der zuständigen Gesundheitsbehörden zu beachten.^{37,38}
- Kontakt der Reagenzien mit Augen und Schleimhäuten vermeiden. Bei Kontakt von Reagenzien mit empfindlichen Körperteilen mit reichlich Wasser spülen.
- Mikrobielle Kontamination der Reagenzien vermeiden, da dies zu fehlerhaften Versuchsergebnissen führen kann.
- Weiterführende Informationen zur Verwendung dieses Produkts sind dem Benutzerhandbuch des BenchMark IHC/ISH Geräts und den Gebrauchsanweisungen der benötigten Komponenten auf navifyportal.roche.com zu entnehmen.
- Anweisungen zur vorschriftsmäßigen Entsorgung sind bei den zuständigen kommunalen und/oder staatlichen Behörden erhältlich.
- Die Kennzeichnung der Produktsicherheit erfolgt in erster Linie nach der EU-GHS-Verordnung. Sicherheitsdatenblätter sind für professionelle Benutzer auf Anfrage erhältlich.
- Bei Verdacht auf ein schwerwiegendes Ereignis im Zusammenhang mit diesem Produkt wenden Sie sich an den Roche-Vertreter vor Ort und melden das Ereignis bei der zuständigen Behörde des EU-Mitgliedstaats bzw. des Landes, in dem sich der Benutzer befindet.

Dieses Produkt enthält Bestandteile, die nach Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 wie folgt eingestuft sind:

Tabelle 1. Gefahrenhinweis.

Gefahr	Code	Hinweis
	H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
	P261	Nebel oder Dämpfe nicht einatmen.
	P272	Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.
	P280	Schutzhandschuhe tragen.
	P333 + P313	Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
	P362 + P364	Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

Gefahr	Code	Hinweis
	P501	Inhalt/Behälter einer zugelassenen Müllentsorgungsanlage zuführen.

Dieses Produkt enthält CAS-Nr. 55965-84-9, eine Reaktionsmasse von: 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1).

FÄRBEVERFAHREN

Der VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper wurde zur Verwendung auf BenchMark IHC/ISH Geräten in Kombination mit OptiView DAB IHC Detection Kit und entsprechenden Hilfsreagenzien entwickelt. Das empfohlene Färbeprotokoll ist in Tabelle 2 zu finden.

Die Auswirkung einer Veränderung von Zeit und Temperatur bei der Antigenerkennung auf die Robustheit des Assays ist nicht bekannt. Daher ist eine Abweichung von den empfohlenen Bedingungen für die Antigenerkennung, die im aufgeführten Färbeprotokoll angegeben sind, nicht bekannt, die erwarteten Ergebnisse können dadurch ungültig sein. Es sollten geeignete Kontrollen verwendet und dokumentiert werden. Benutzer, die vom aufgeführten Protokoll abweichen, tragen die Verantwortung für die Interpretation der Patientenergebnisse.

Die Parameter für die automatisierten Verfahren können gemäß dem Verfahren im Benutzerhandbuch des Geräts angezeigt, gedruckt und bearbeitet werden. Weitere Informationen zu immunhistochemischen Färbeverfahren können dem Methodenblatt von OptiView DAB IHC Detection Kit entnommen werden.

Weitere Hinweise zur ordnungsgemäßen Verwendung dieses Produkts sind dem Methodenblatt des integrierten Spenders (Art.-Nr. 760-5095) zu entnehmen.

Tabelle 2. Empfohlenes Färbeprotokoll für den VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper mit OptiView DAB IHC Detection Kit auf BenchMark IHC/ISH Geräten.

Verfahrenstyp	Methode		
	GX	XT	ULTRA oder ULTRA PLUS
Entparaffinisierung	Ausgewählt	Ausgewählt	Ausgewählt
Zellkonditionierung (Antigendemaskierung)	CC1, 64 Minuten	CC1, 64 Minuten	ULTRA CC1, 64 Minuten, 100 °C
Vor-Primär-Peroxidase-Inhibitor	Ausgewählt	Ausgewählt	Ausgewählt
Primärer Antikörper	28 Minuten, 37 °C	16 Minuten, 37 °C	16 Minuten, 36 °C
OptiView HQ Linker	8 Minuten (Standard)		
OptiView HRP Multimer	8 Minuten (Standard)		
Gegenfärbung	Hematoxylin II, 4 Minuten		
Abschließende Gegenfärbung	Bluing, 4 Minuten		

Eine Abweichung von den empfohlenen Bedingungen, insbesondere für die Antigenerkennung, die im aufgeführten Protokoll angegeben sind, kann die erwarteten Ergebnisse ungültig machen. Durch die Unterschiede bei der Gewebefixierung und -aufbereitung sowie der allgemeinen Merkmale der verwendeten Laborgeräte und der herrschenden Laborbedingungen kann es erforderlich sein, die Inkubationsdauer für den primären Antikörper je nach verwendeten Proben und nach Ermessen des Ablesers zu verlängern oder zu verkürzen. Weiterführende Informationen über Fixierungsvariablen siehe „Immunohistochemistry: Principles and Advances“.³⁶

QUALITÄTSKONTROLLVERFAHREN

Negative Reagenzkontrolle

Zusätzlich zur Färbung mit dem VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper sollte ein zweiter Objektträger mit einem monoklonalen Maus-Negativkontrollreagenz, Negative Control (Monoclonal), gefärbt werden. Die negative Reagenzkontrolle wird verwendet, um die unspezifische Färbung zu beurteilen. Die Parameter für die Färbung mit dem als negative Reagenzkontrolle verwendeten Antikörper sollten mit dem für den primären Antikörper identisch sein.

Positive Gewebekontrolle

Bei jedem Färbeverfahren muss eine positive Gewebekontrolle mitgeführt werden. Im Rahmen der optimalen Laborpraxis wird jedem Objektträger mit Patientengewebe ein Schnitt mit positivem Kontrollgewebe hinzugefügt. Auf diese Weise können Fehler bei Anwendung der Reagenzien auf den Objektträger erkannt werden. Gewebe mit schwach positiver Färbung ist zur Qualitätskontrolle am besten geeignet. Die Gewebebestandteile mit positiver Färbung dienen zur Bestätigung, dass der Antikörper aufgetragen wurde und das Gerät korrekt funktioniert hat. Kontrollgewebe kann sowohl positiv als auch negativ färbende Bestandteile enthalten und damit als Positiv- wie auch als Negativkontrolle verwendet werden. Das Kontrollgewebe muss eine frische Probe einer Sektion, Biopsie oder eines chirurgischen Eingriffs sein und so schnell wie möglich auf identische Weise wie die Probenschnitte präpariert oder fixiert werden. Mit diesen Geweben können alle Verfahrensschritte von der Gewebepreparation bis zur Färbung kontrolliert werden. Die Verwendung eines Gewebeschnitts, der anders als die Testprobe fixiert oder aufgearbeitet wurde, ermöglicht die Kontrolle aller Reagenzien und Methodenschritte mit Ausnahme der Fixierung und Gewebeaufbereitung.

Nachweislich positive Gewebekontrollen dürfen nur zur Kontrolle der korrekten Leistung von aufbereitetem Gewebe und von Testreagenzien verwendet werden und nicht zur Unterstützung bei der Erstellung einer bestimmten Diagnose ausgehend von den Patientenproben. Wenn mit den positiven Gewebekontrollen keine positive Färbung nachgewiesen werden kann, gelten die Ergebnisse der Testproben als ungültig.

Eine geeignete positive Gewebekontrolle wäre ein vorab als geeignet identifizierter Fall von CRC, der positive Färbung mit dem VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper aufweist. Die positive Gewebekontrolle sollte eine zytoplasmatische Färbung jeglicher Intensität in viablen Tumorzellen aufweisen, die stärker als die Hintergrundfärbung ist.

Negative Gewebekontrolle

Eine negative Gewebekontrolle wäre ein vorab als geeignet identifizierter Fall von CRC, der keine Färbung mit dem VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper aufweist. Die negative Gewebekontrolle sollte nur zur Kontrolle der Leistung von aufbereitetem Gewebe, Testreagenzien und Geräten verwendet werden und nicht zur Unterstützung bei der Erstellung einer bestimmten Diagnose ausgehend von den Patientenproben.

Assay-Verifizierung

Vor der erstmaligen Verwendung eines Antikörpers oder Färbesystems in einem Diagnoseverfahren muss die Spezifität des Antikörpers überprüft werden. Zu diesem Zweck wird eine Reihe von Geweben mit bekannten IHC-Leistungsmerkmalen und bekanntem positivem bzw. negativem Status hinsichtlich der BRAF V600E-Mutation getestet. Siehe hierzu die in diesem Abschnitt der Produktbeilage ausgeführten Hinweise zu Qualitätskontrollverfahren und die Empfehlungen zur Qualitätskontrolle in der Anatomic Pathology Checklist des College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program³⁹ oder die CLSI Approved Guideline.⁴⁰

AUSWERTUNG DER FÄRBUNG / ERWARTETE ERGEBNISSE

Das zelluläre Färbemuster des VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörpers in Tumorzellen ist zytoplasmatisch. Mit dem VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper gefärbte CRC-Proben werden von einem geschulten Pathologen basierend auf der Beurteilung des Vorhandenseins oder Nichtvorhandenseins einer spezifischen zytoplasmatischen Färbung im Tumor hinsichtlich ihres klinischen Status klassifiziert. Ein positiver klinischer Status wird Fällen mit eindeutiger zytoplasmatischer Färbung jeglicher Intensität in viablen Tumorzellen, die stärker als die Hintergrundfärbung ist, zugewiesen. Ein negativer klinischer Status wird Fällen ohne Färbung oder nicht eindeutiger zytoplasmatischer Färbung in viablen Tumorzellen zugewiesen. Eine Zellkernfärbung, eine schwache bis starke Färbung von isolierten viablen Tumorzellen und/oder kleinen Tumorklustern sollte als negativ eingestuft werden.

SPEZIFISCHE EINSCHRÄNKUNGEN

Die Konsequenzen einer Abweichung von dem empfohlenen Färbeprotokoll sind nicht bekannt, können aber die erwarteten Ergebnisse ungültig machen. Benutzer werden vor der Verwendung von sauren Puffern zur Antigenerkennung gewarnt, da diese Puffer zu einer suboptimalen und schwer auszuwertenden Färbung führen können.⁴¹ Benutzer, die vom aufgeführten Protokoll abweichen, tragen die Verantwortung für die Interpretation der Patientenergebnisse.

Mit dem VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper gefärbte Fälle werden basierend auf dem Vorhandensein oder Nichtvorhandensein einer Färbung im gesamten Tumorbereich als „Positiv“ oder „Negativ“ klassifiziert. Die Intensität der Färbung kann variieren, und die Intensität kann im gesamten Tumor variieren. Dies hat jedoch keinen Einfluss auf den klinischen BRAF V600E-Status.

In manchen Fällen ist die Auswertung aufgrund der folgenden Sachverhalte besonders schwierig:

- Es wurde festgestellt, dass der VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper mitunter eine schwache zytoplasmatische und nukleäre Färbung in der glatten Muskulatur, in Purkinje-Zellen des Kleinhirns, normalen Kolonepithelzellen, Enterozyten, Interstitialzellen des Hodens, in der Nebenniere, in der Hypophyse, in Azinarstrukturen der Bauchspeicheldrüse, Drüsenzellen des Darms und einigen Tumorzellen ergibt. Solche Fälle sind jedoch nicht als positiv für BRAF V600E zu betrachten.⁴² Dieser Antikörper ergab außerdem eine mäßige Färbung in neuroendokrinen Zellen der Hypophyse und färbt Zilien in der Lunge.
- Unspezifischer Hintergrund: Manche Proben können aus Gründen, die nicht vollständig geklärt sind, eine unspezifische Hintergrundfärbung aufweisen. Aus diesem Grund muss die Bewertung eines mit dem VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper gefärbten Objektträgers einen Vergleich mit dem Objektträger mit der negativen Reagenzkontrolle beinhalten, um den Grad der unspezifischen Hintergrundfärbung zu bestimmen. Mitunter ist eine Zellkernfärbung in Tumorzellen festzustellen, deren Bedeutung jedoch nicht geklärt ist.
- Gewebe- oder Färbungsartefakte: Auch histologische Artefakte infolge der Probenvorbereitung und des Schneidens des Gewebes mit dem Mikrotom können die Bestimmung des klinischen-Status mit dem VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper erschweren. Bei solchen Artefakten kann es sich beispielsweise um Fixierungsgradienten und Randeffekte, DAB Trapping, Blasenbildung im Kern bzw. „Nuclear Bubbling“, fehlende Färbung in einigen Regionen des Gewebes, Einreißen oder Falten des Gewebes und Verlust des Gewebeschnitts handeln. Mitunter kann eine Wiederholung der Färbung neuer Schnitte oder die Gewinnung einer neuen Probe erforderlich sein.

Es sind möglicherweise nicht alle Assays auf jedem Gerät registriert. Weitere Informationen erhalten Sie von Ihrem Roche-Vertreter vor Ort.

LEISTUNGSMERKMALE

ANALYTISCHE LEISTUNG

Es wurden Färbetests auf Sensitivität, Spezifität und Präzision durchgeführt; die Ergebnisse sind unten aufgeführt.

Sensitivität und Spezifität

Bei normalem und bei neoplastischem Gewebe wurde mit dem VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper keine unerwartete Färbung festgestellt, ausgenommen der im Abschnitt „Spezifische Einschränkungen“ genannten.

Tabelle 3. Sensitivität/Spezifität des VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörpers wurden durch das Testen von normalem FFPE-Gewebe ermittelt.

Gewebe	Anzahl positiver/ aller Fälle	Gewebe	Anzahl positiver/ aller Fälle
Großhirn	0/3	Speiseröhre	0/3
Kleinhirn*	1/3	Magen	0/3
Nebenniere	0/3	Dünndarm*	2/4
Eierstock	0/3	Dickdarm*	5/12
Bauchspeicheldrüse*	2/3	Leber	0/3
Lymphknoten	0/3	Zunge/Speicheldrüse	0/3
Hirnanhangsdrüse**	3/3	Niere	0/3
Hoden*	2/3	Prostata	0/3
Schilddrüse	0/3	Blase	0/3
Brust	0/3	Nebenschilddrüse	0/3
Milz	0/3	Gebärmutter Schleimhaut	0/3
Tonsille	0/3	Gebärmutterhals	0/3
Thymus	0/3	Skelettmuskel	0/3

Gewebe	Anzahl positiver/ aller Fälle	Gewebe	Anzahl positiver/ aller Fälle
Knochenmark	0/3	Haut	0/3
Lunge	0/3	Nerv	0/5
Herz	0/3	Mesothel	0/3

* Schwache zytoplasmatische und nukleäre Färbung in Purkinje-Zellen des Kleinhirns und der glatten Muskulatur sowie Epithelzellen des normalen Dickdarms, Drüsenzellen des Darms, Azinarstrukturen der Bauchspeicheldrüse und interstitiellen Zellen des Hodens.

** Mittelstarke Färbung in neuroendokrinen Zellen der Hypophyse.

In allen Geweben wurde eine positive/negative Färbung gewebespezifischer Elemente festgestellt. Solche Fälle sind hinsichtlich des klinischen BRAF V600E-Status nicht als positiv zu betrachten.¹⁶

Tabelle 4. Sensitivität/Spezifität des VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörpers wurden durch Testen von verschiedenen neoplastischen FFPE-Geweben ermittelt.

Pathologie	Anzahl positiver/ aller Fälle
Glioblastom (Cerebrum)	0/1
Meningeom (Cerebrum)	0/1
Ependymom (Cerebrum)	0/1
Oligodendrogliom (Cerebrum)	0/1
Seröses Adenokarzinom (Ovarien)	0/1
Adenokarzinom (Ovarien)	0/1
Neuroendokrine Neoplasie (Pankreas)	0/1
Seminom (Hoden)	0/2
Medulläres Karzinom (Schilddrüse)	0/1
Papilläres Karzinom (Schilddrüse)	21/28
Duktales Karzinom in situ (Brust)	0/1
Mikroinvasives duktales Karzinom (Brust)	0/1
Invasives duktales Karzinom (Brust)	3/131
B-Zell-Lymphom; NOS (Milz)	0/1
Kleinzelliges Karzinom (Lunge)	0/7
Plattenepithelkarzinom (Lunge)	0/90
Adenokarzinom (Lunge)	1/73
Neuroendokrines Karzinom (Ösophagus)	0/1
Adenokarzinom (Ösophagus)	0/1
Siegelringzellkarzinom (Magen)	0/1
Adenokarzinom (Dünndarm)	0/1
Stromasarkom (Dünndarm)	1/1
Adenokarzinom (Kolon)	64/234
Gastrointestinaler Stromatumor (GIST) (Kolon)	0/1

Pathologie	Anzahl positiver/ aller Fälle
Adenokarzinom (Rektum)	0/1
GIST (Rektum)	0/1
Melanom (Rektum)	0/1
Hepatozelluläres Karzinom (Leber)	0/1
Hepatoblastom (Leber)	0/1
Klärzellkarzinom (Niere)	0/1
Adenokarzinom (Prostata)	0/2
Adenokarzinom (Uterus)	0/1
Klärzellkarzinom (Uterus)	0/1
Plattenepithelkarzinom (Zervix)	0/2
Embryonales Rhabdomyosarkom (quergestreifte Muskulatur)	0/1
Melanom	10/24
Basalzellkarzinom (Haut)	0/1
Plattenepithelkarzinom (Haut)	0/1
Neuroblastom (Retroperitoneum)	0/1
Mesotheliom (Peritoneum)	0/1
Spindelzell-Rhabdomyosarkom (Peritoneum)	0/1
B-Zell-Lymphom; NOS (Lymphknoten)	0/2
Hodgkin-Lymphom (Lymphknoten)	1/1
Urothelkarzinom (Blase)	0/1
Leiomyosarkom (Blase)	0/1
Osteosarkom (Knochen)	0/1
Leiomyosarkom (glatte Muskulatur)	0/1

Präzision

Leistungsmerkmale des BenchMark ULTRA Geräts

Wiederholbarkeit innerhalb eines Laufs und Inter-Tages-Laborpräzision

Die Wiederholbarkeit und Präzision des VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörpers wurden auf dem BenchMark ULTRA Gerät mit OptiView DAB IHC Detection Kit ermittelt. Die Wiederholbarkeit innerhalb eines Laufs wurde mithilfe von 10 CRC-Proben ermittelt (5 mit positivem und 5 mit negativem klinischem BRAF V600E-Status). Von jeder der CRC-Proben wurden innerhalb eines einzigen Tages fünf Replikate mit dem VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper auf einem BenchMark ULTRA Gerät gefärbt. Jedem mit dem VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper gefärbten Objektträger wurde ein mit der negativen Reagenzkontrolle gefärbter Objektträger aus demselben Fall als Gegenstück zugeordnet. Alle Objektträgerreihen wurden randomisiert und dann von einem einzigen Pathologen, der gegenüber der Falldiagnose verblindet war, als „Positiv“ oder „Negativ“ bewertet.

Auch die Inter-Tages-Laborpräzision wurde mithilfe von 10 CRC-Proben ermittelt (5 mit positivem und 5 mit negativem klinischem BRAF V600E-Status). Von jeder der CRC-Proben wurden an jedem von 5 nicht aufeinanderfolgenden Tagen Replikate mit dem VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper auf einem BenchMark ULTRA Gerät gefärbt. Zusätzlich wurde jeweils ein einzelner Objektträger mit einer negativen Reagenzkontrolle gefärbt. Jedem mit dem VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper gefärbten Objektträger wurde ein mit der negativen Reagenzkontrolle gefärbter

Objektträger aus demselben Fall als Gegenstück zugeordnet. Alle Objektträgerreihen wurden randomisiert und dann von einem einzigen Pathologen, der gegenüber der Falldiagnose verblindet war, als „Positiv“ oder „Negativ“ bewertet.

Keiner der mit der negativen Reagenzkontrolle gefärbten Objektträger zeigte eine spezifische Färbung, und die Hintergrundfärbung war ≤ 0.5 . Mit gepoolten Daten aller möglichen Paarungen zeigte sowohl die Studie zur Wiederholbarkeit innerhalb eines Laufs als auch die Studie zur Inter-Tages-Laborpräzision eine positive prozentuale Übereinstimmung (PPA), eine negative prozentuale Übereinstimmung (NPA) und eine prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA) von jeweils 100 %. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 5 zu finden.

Tabelle 5. Wiederholbarkeit innerhalb eines Laufs und Inter-Tages-Laborpräzision des VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörpers auf BenchMark ULTRA Geräten, gemessen anhand des klinischen Status (positiv/negativ).

Wiederholbarkeit/ Präzision	Klinischer Status	Übereinstimmung			
		Typ	n/N	%	95 %-CI
Wiederholbarkeit innerhalb eines Laufs	Positiv	PPA	25/25	100.0	(86.7, 100.0)
	Negativ	NPA	25/25	100.0	(86.7, 100.0)
	Gesamt	OPA	50/50	100.0	(92.9, 100.0)
Inter-Tages- Laborpräzision	Positiv	PPA	50/50	100.0	(92.9, 100.0)
	Negativ	NPA	50/50	100.0	(92.9, 100.0)
	Gesamt	OPA	100/100	100.0	(96.3, 100.0)

Hinweis: 95 %-CIs wurden mit der Wilson-Score-Methode berechnet.

Inter-Geräte-Laborpräzision

Die Inter-Geräte-Laborpräzision des VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörpers auf BenchMark ULTRA Geräten wurde unter Verwendung von OptiView DAB IHC Detection Kit bestimmt, indem Objektträgerreplikate mit 10 CRC-Proben (5 mit positivem und 5 mit negativem klinischem BRAF V600E-Status) auf 3 BenchMark ULTRA Geräten mit dem VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper gefärbt wurden. Zusätzlich wurde jeweils ein einzelner Objektträger mit einer negativen Reagenzkontrolle gefärbt.

Jedem mit dem VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper gefärbten Objektträger wurde ein mit der negativen Reagenzkontrolle gefärbter Objektträger aus demselben Fall als Gegenstück zugeordnet. Alle Objektträgerreihen wurden randomisiert und dann von einem einzigen Pathologen, der gegenüber der Falldiagnose verblindet war, hinsichtlich des klinischen Status (positiv/negativ) bewertet. Keiner der mit der negativen Reagenzkontrolle gefärbten Objektträger zeigte eine spezifische Färbung, und die Hintergrundfärbung war ≤ 0.5 .

Zur Ermittlung der Inter-Geräte-Laborpräzision auf BenchMark ULTRA Geräten wurden paarweise Vergleiche des klinischen Status von Objektträgern mit jeder Probe zwischen Geräten durchgeführt, die eine PPA, NPA und OPA von jeweils 100 % ergaben. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 6 zu finden.

Tabelle 6. Inter-Geräte-Laborpräzision des VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörpers auf BenchMark ULTRA Geräten, gemessen anhand des klinischen Status (positiv/negativ).

Präzision	Klinischer Status	Übereinstimmung			
		Typ	n/N	%	95 %-CI
Inter-Geräte- Laborpräzision	Positiv	PPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	Negativ	NPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	Gesamt	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)

Hinweis: 95 %-CIs wurden mit der Wilson-Score-Methode berechnet.

Zusätzlich wurde die Inter-Geräte-Laborpräzision des VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörpers unter Verwendung von OptiView DAB IHC Detection Kit bestimmt, indem Objektträgerreplikate mit 6 CRC-Proben (2 CRC-negativ und 2 CRC sowie

2 Schilddrüsenkarzinome mit positivem klinischem BRAF V600E-Status) auf 3 BenchMark XT und 3 BenchMark GX Geräten mit dem VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper gefärbt wurden.

Bei Kombination der 3 Geräte lagen 15 Beobachtungen pro Fall vor, aus denen der Medianwert für jeden Fall berechnet wurde. Einzelne Beobachtungen desselben Falls wurden als mit der medianen Signalintensität des Falls übereinstimmend angesehen, wenn sie innerhalb einer Signalintensität von 0.5 lagen. Zur Ermittlung der Inter-Geräte-Laborpräzision auf dem BenchMark XT und dem BenchMark GX Gerät wurden paarweise Vergleiche der Intensitätswerte der Färbung der Objektträger mit jeder Probe durchgeführt und ergaben eine OPA zwischen den 3 BenchMark XT Geräten von 98.9 % und eine OPA zwischen den 3 BenchMark GX Geräten von 100 %. Keiner der mit der negativen Reagenzkontrolle gefärbten Objektträger zeigte eine spezifische Färbung, und die Hintergrundfärbung war sowohl auf den BenchMark XT als auch auf den BenchMark GX Geräten ≤ 0.5 .

Konkordanz zwischen BenchMark IHC/ISH Geräten

Zur Bestimmung der Konkordanz von BenchMark IHC/ISH Geräten bei Verwendung des VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörpers wurden CRC-, Schilddrüsenkarzinom- und Melanomproben mit dem VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper und OptiView DAB IHC Detection Kit gefärbt. Alle Objektträger wurden von einem einzigen Pathologen hinsichtlich des klinischen Status (positiv/negativ) bewertet.

Es wurden paarweise Vergleiche der insgesamt 228 Proben (177 CRC, 27 Schilddrüsenkarzinome und 24 Melanome) zwischen BenchMark GX und BenchMark ULTRA Geräten sowie BenchMark XT und BenchMark ULTRA Geräten hinsichtlich des klinischen Status durchgeführt. Die Vergleiche zwischen BenchMark GX und BenchMark ULTRA Geräten ergaben eine durchschnittliche positive Übereinstimmung (APA) von 98.0 %, eine durchschnittliche negative Übereinstimmung (ANA) von 99.0 % und eine OPA von 98.7 %. Die Vergleiche zwischen BenchMark XT und BenchMark ULTRA Geräten ergaben eine APA von 96.6 %, eine ANA von 98.4 % und eine OPA von 97.8 %. Mit insgesamt 230 Proben (179 CRC, 27 Schilddrüsenkarzinome und 24 Melanome) wurden paarweise Vergleiche zwischen BenchMark GX und BenchMark XT Geräten durchgeführt. Die Vergleiche zwischen BenchMark GX und BenchMark XT Geräten ergaben eine APA von 98.7 %, eine ANA von 99.4 % und eine OPA von 99.1 %.

Studien zur Ableserpräzision

Die Intra- und die Inter-Ableserpräzision wurden mithilfe von 20 CRC-Proben (10 Fälle mit positivem BRAF V600E-Mutationsstatus und 10 Fälle mit negativem BRAF V600E-Mutationsstatus) untersucht, die mit dem VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper unter Verwendung von OptiView DAB IHC Detection Kit auf einem BenchMark ULTRA Gerät gefärbt wurden. Jedem mit dem VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper gefärbten Objektträger wurde ein mit H&E und ein mit einer negativen Reagenzkontrolle gefärbter Objektträger aus demselben Fall als Gegenstück zugeordnet.

Alle Objektträgerreihen wurden randomisiert und von 3 Pathologen hinsichtlich des klinischen BRAF V600E-Status (positiv/negativ) bewertet. Die Pathologen waren gegenüber der Falldiagnose verblindet. Nach einer zweiwöchigen Auswaschungsphase wurden die mit dem VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper gefärbten Objektträger für eine zweite Bewertung des klinischen BRAF V600E-Status durch jeden der 3 Pathologen erneut randomisiert. Keiner der mit der negativen Reagenzkontrolle gefärbten Objektträger zeigte eine spezifische Färbung, und die Hintergrundfärbung war ≤ 0.5 .

Zur Feststellung der Intra-Ableserpräzision wurden die erste und die letzte Bewertung jedes Objektträgers eines einzelnen Pathologen verglichen, sodass sich 20 CRC-Objektträgervergleiche pro Pathologe ergaben. Die Vergleiche der 3 Pathologen wurden kombiniert und ergaben hinsichtlich der Intra-Ableserpräzision eine APA von 100 %, eine ANA von 100 % und eine OPA von 100 %. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 7 zu finden.

Zur Feststellung der Inter-Ableserpräzision wurden pro CRC-Fall alle Bewertungen der Objektträger (20 CRC x 2 Bewertungen/Fall x 3 Pathologen = 120 Bewertungen der Objektträger) mit einem modalen Fallstatus verglichen, was eine PPA, eine NPA und eine OPA von jeweils 100 % ergab. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 7 zu finden.

Tabelle 7. Intra- und Inter-Ableserpräzision des VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörpers bei Bestimmung von CRC-Fällen, gemessen anhand des klinischen BRAF V600E-Status (positiv/negativ).

Präzision	Klinischer Status	Übereinstimmung			
		Typ	n/N	%	95 %-CI
Intra-Ableser	Positiv	APA	60/60	100.0	(93.9, 100.0)
	Negativ	ANA	60/60	100.0	(93.9, 100.0)
	Gesamt	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)
Inter-Ableser	Positiv	PPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)
	Negativ	NPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)
	Gesamt	OPA	120/120	100.0	(96.9, 100.0)

Hinweis: Bei der Bestimmung der Intra-Ableserpräzision wurden die 95 %-CIs der APA und ANA mit der Clopper-Pearson-Methode berechnet. Das 95 %-CI der OPA wurde mit der Perzentil-Bootstrap-Methode berechnet. Bei der Bestimmung der Inter-Ableserpräzision wurden die 95 %-CIs mit der Wilson-Score-Methode berechnet.

Inter-Chargen-Präzision

Die Inter-Chargen-Präzision des VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörpers wurde unter Verwendung von OptiView DAB IHC Detection Kit bestimmt, indem 3 Produktionschargen des VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörpers jeweils auf Objektträgertriplikaten mit 10 CRC-Fällen (5 positiv und 5 negativ für die BRAF V600E-Mutation) auf einem BenchMark ULTRA Gerät analysiert wurden.

Jedem mit dem VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper gefärbten Objektträger wurde ein mit der negativen Reagenzkontrolle gefärbter Objektträger aus demselben Fall als Gegenstück zugeordnet. Die Objektträgerreihen wurden randomisiert und dann von einem einzigen Pathologen, der gegenüber der Falldiagnose und der Chargennummer des VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörpers verblindet war, bewertet. Keiner der mit der negativen Reagenzkontrolle gefärbten Objektträger zeigte eine spezifische Färbung, und die Hintergrundfärbung war ≤ 0.5 .

Zur Ermittlung der Inter-Chargen-Präzision des VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörpers wurde der durch Bewertung jedes Objektträgers festgestellte klinische BRAF V600E-Status mit einem modalen Fallstatus des betreffenden Falls verglichen. Die OPA, PPA und NPA mit den VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörperchargen betrug jeweils 100 %, d. h. die Färbung mit dem VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper ist unabhängig von der Antikörpercharge reproduzierbar.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse für die Inter-Chargen-Präzision des VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörpers ist in Tabelle 8 gezeigt.

Tabelle 8. Inter-Chargen-Präzision des VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörpers, gemessen anhand des klinischen Status (positiv/negativ).

Präzision	Klinischer Status	Übereinstimmung			
		Typ	n/N	%	95 %-CI
Inter-Chargen	Positiv	PPA	45/45	100.0	(92.1, 100.0)
	Negativ	NPA	45/45	100.0	(92.1, 100.0)
	Gesamt	OPA	90/90	100.0	(95.9, 100.0)

Hinweis: 95 %-CIs wurden mit der Wilson-Score-Methode berechnet.

Studie zur Inter-Labor-Reproduzierbarkeit

Zum Nachweis der Reproduzierbarkeit jedes VENTANA MMR IHC Panel Assays bei der Bestimmung des klinischen Status wurde eine Studie zur Inter-Labor-Reproduzierbarkeit von VENTANA MMR IHC Panel durchgeführt. Für die Studie wurden 6 CRC-Gewebeprobe (3 mit intakter Expression und 3 mit Verlust der Expression) für jedes MMR-Protein und 16 CRC-Gewebeprobe (8 positiv und 8 negativ) für BRAF V600E an jedem von 5 nicht aufeinanderfolgenden Tagen 21 Tage lang in drei externen Laboren auf 3 BenchMark ULTRA Geräten getestet. Jedem mit Antikörper gefärbten Objektträger

wurden ein mit H&E und ein mit der negativen Reagenzkontrolle gefärbter Objektträger aus demselben Fall als Gegenstück zugeordnet. Alle Objektträgerreihen wurden randomisiert und von insgesamt 6 Ablesern (2 Ableser/Einrichtung), die hinsichtlich des klinischen MMR-Status der Studienreihen verblindet waren, bewertet. Jeder der 40 Fälle in der Studie wurde über alle Tage, Einrichtungen und Ableser hinweg gerechnet 30 Mal untersucht. Der modale Fallreferenzstatus wurde für jeden Fall basierend auf dem am häufigsten festgestellten Status der 30 Bewertungen abgeleitet. Die Studie umfasste insgesamt 1200 Bewertungen für alle fünf Proteine. Bei allen bewertbaren Fällen betrug die Akzeptanzrate für Morphologie und Hintergrund in dieser Studie 100 %. Eine Zusammenfassung der gepoolten (alle fünf Proteine) Übereinstimmungsstatistiken zwischen dem modalen Fallreferenzstatus und einzelnen Beobachtungen ist in Tabelle 9 zu finden.

Tabelle 9. Übereinstimmung zwischen VENTANA MMR IHC Panel und dem modalen Fallreferenzstatus.

Inter-Labor-Reproduzierbarkeit	Klinischer Status	Übereinstimmung			
		Typ	n/N	%	95 %-CI
Alle Proteine	„Intact“ (Intakt)/Positiv	PPA	598/600	99.8	(98.7, 100.0)
	„Loss“ (Verlust)/Negativ	NPA	593/600	98.9	(97.4, 99.5)
	Gesamt	OPA	1191/1200	99.4	(98.6, 99.7)

Hinweis: Der klinische Status ist definiert als intakt hinsichtlich oder Verlust der Expression von MMR-Proteinen und als positiv oder negativ hinsichtlich des BRAF V600E-Proteins. 95 %-CIs wurden unter Verwendung eines verallgemeinerten linearen Mischmodells (Generalized Linear Mixed Model, GLMM) berechnet.

Zusätzlich wurden paarweise Vergleiche zwischen Einrichtung, Tag und Ableser für den VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper durchgeführt. Diese Studie ergab insgesamt 480 Beobachtungen auf BRAF V600E. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 10 zu finden. Die Daten zeigen die Reproduzierbarkeit des Assays über 5 Tage, 3 Einrichtungen und 6 Ableser.

Tabelle 10. Übereinstimmungsraten bei paarweisen Vergleichen zur Feststellung der Inter-Labor-Reproduzierbarkeit für den VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper, gemessen anhand des klinischen Status (positiv oder negativ).

Inter-Labor-Reproduzierbarkeit		Übereinstimmung			
		Typ	n/N	%	95 %-CI
Inter-Einrichtung (3 Einrichtungen)		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)
Inter-Tag (5 nicht aufeinanderfolgende Tage)	Einrichtung 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)
	Einrichtung 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)
	Einrichtung C	APA	320/332	96.4	(92.0, 100.0)
		ANA	296/308	96.1	(90.4, 100.0)
		OPA	308/320	96.3	(91.3, 100.0)
		APA	242/243	99.6	(98.8, 100.0)
		ANA	236/237	99.6	(98.7, 100.0)

Inter-Labor-Reproduzierbarkeit	Übereinstimmung			
	Typ	n/N	%	95 %-CI
Inter-Ableser (2 Pathologen je Einrichtung)	OPA	239/240	99.6	(98.8, 100.0)

Hinweis: 95 % CIs wurden unter Verwendung der Perzentil-Bootstrap-Methode berechnet. In Fällen, in denen die Punktschätzung 100 % betrug, wurde die Wilson-Score-Methode verwendet.

Leistungsmerkmale des BenchMark ULTRA PLUS Geräts Intra-Tages-Wiederholpräzision und Inter-Tages-Präzision

Die Wiederholbarkeit innerhalb eines Tages (eines Laufs) wurde mithilfe von 10 CRC-Proben ermittelt (5 mit positivem und 5 mit negativem BRAF V600E-Status). Von jeder der CRC-Proben wurden innerhalb eines einzigen Tages fünf Replikate mit dem VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper auf einem BenchMark ULTRA PLUS Gerät gefärbt. Jedem mit dem VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper gefärbten Objektträger wurde ein mit der negativen Reagenzkontrolle gefärbter Objektträger aus demselben Fall als Gegenstück zugeordnet. Alle Objektträgerpaare wurden randomisiert und dann von einem einzigen Pathologen, der gegenüber der Falldiagnose verblindet war, als „positiv“ oder „negativ“ bewertet.

Auch die Inter-Tages-Laborpräzision wurde mithilfe von 10 CRC-Proben ermittelt (5 mit positivem und 5 mit negativem klinischem BRAF V600E-Status). Von jeder der CRC-Proben wurden an jedem von 5 nicht aufeinanderfolgenden Tagen Replikate mit dem VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper auf einem BenchMark ULTRA PLUS Gerät gefärbt. Zusätzlich wurde jeweils ein einzelner Objektträger mit einer negativen Reagenzkontrolle gefärbt. Jedem mit dem VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper gefärbten Objektträger wurde ein mit der negativen Reagenzkontrolle gefärbter Objektträger aus demselben Fall als Gegenstück zugeordnet. Alle Objektträgerpaare wurden randomisiert und dann von einem einzigen Pathologen, der gegenüber der Falldiagnose verblindet war, als „positiv“ oder „negativ“ bewertet.

Keiner der mit der negativen Reagenzkontrolle gefärbten Objektträger zeigte eine spezifische Färbung, und die Hintergrundfärbung war ≤ 0.5 . Mit gepoolten Daten aller möglichen Paarungen zeigte sowohl die Studie zur Intra-Tages-Wiederholpräzision als auch die Studie zur Inter-Tages-Präzision eine positive prozentuale Übereinstimmung (PPA), eine negative prozentuale Übereinstimmung (NPA) und eine prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA) von jeweils 100 %. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 11 zu finden.

Tabelle 11. Intra-Tages-Wiederholpräzision und Inter-Tages-Präzision des VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörpers auf BenchMark ULTRA PLUS Geräten, gemessen anhand des klinischen Status (positiv/negativ)

Wiederholbarkeit/ Präzision	Klinischer Status	Übereinstimmung			
		Typ	n/N	%	95 %-CI
Intra-Tages-Wiederholpräzision	Positiv	PPA	25/25	100.0	(86.7,100.0)
	Negativ	NPA	25/25	100.0	(86.7,100.0)
	Gesamt	OPA	50/50	100.0	(92.9,100.0)
Inter-Tages-Präzision	Positiv	PPA	50/50	100.0	(92.9,100.0)
	Negativ	NPA	48/48	100.0	(92.6,100.0)
	Gesamt	OPA	98/98	100.0	(96.2,100.0)

Hinweis: 95 %-CIs wurden mit der (Wilson-) Score-Methode berechnet.

Inter-Geräte-Präzision von BenchMark ULTRA PLUS Geräten

Die Inter-Geräte-Laborpräzision des VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörpers auf BenchMark ULTRA PLUS Geräten wurde unter Verwendung von OptiView DAB IHC Detection Kit bestimmt, indem Objektträgerreplikate mit 10 CRC-Proben (5 mit positivem und 5 mit negativem klinischem BRAF V600E-Status) auf 3 BenchMark ULTRA PLUS

Geräten mit dem VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper gefärbt wurden. Zusätzlich wurde jeweils ein einzelner Objektträger mit einer negativen Reagenzkontrolle gefärbt.

Jedem mit dem VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper gefärbten Objektträger wurde ein mit der negativen Reagenzkontrolle gefärbter Objektträger aus demselben Fall als Gegenstück zugeordnet. Alle Objektträgerpaare wurden randomisiert und dann von einem einzigen Pathologen, der gegenüber der Falldiagnose verblindet war, hinsichtlich des klinischen Status (positiv/negativ) bewertet. Keiner der mit der negativen Reagenzkontrolle gefärbten Objektträger zeigte eine spezifische Färbung, und die Hintergrundfärbung war ≤ 0.5 .

Zur Ermittlung der Inter-Geräte-Präzision auf dem BenchMark ULTRA PLUS Gerät wurden paarweise Vergleiche des klinischen Status von Objektträgern jeder Probe zwischen Geräten durchgeführt, die eine PPA, NPA und OPA von jeweils 100 % ergaben. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 12 zu finden.

Tabelle 12. Inter-Geräte-Präzision des VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörpers auf BenchMark ULTRA PLUS Geräten, gemessen anhand des klinischen Status (positiv/negativ)

Präzision	Klinischer Status	Übereinstimmung			
		Typ	n/N	%	95 %-CI
Inter-Geräte	Positiv	PPA	30/30	100.0	(88.6,100.0)
	Negativ	NPA	30/30	100.0	(88.6,100.0)
	Gesamt	OPA	60/60	100.0	(94.0,100.0)

Hinweis: 95 %-CIs wurden mit der (Wilson-) Score-Methode berechnet.

Inter-Plattform-Übereinstimmung bei BenchMark ULTRA PLUS und BenchMark ULTRA

In einer Studie wurde die Färbeleistung von VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper unter Verwendung von OptiView DAB IHC Detection Kit auf dem BenchMark ULTRA PLUS Gerät und auf dem BenchMark ULTRA Gerät verglichen. Es wurden einhundertzwanzig (120) Kolorektalkarzinom-Gewebeproben (14 positiv für BRAF V600E und 13 negativ für BRAF V600E, 93 MMR-All-comers) gefärbt, und die gefärbten Objektträger wurden von einem Pathologen bewertet, der den Diagnosestatus bestimmte. Die prozentuale Gesamtübereinstimmung betrug 98.3 %. Bei allen mit dem VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper gefärbten Geweben waren die Morphologie und die Hintergrundfärbung akzeptabel. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 13 zu finden.

Tabelle 13. Übereinstimmung der Färbung mit einem VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper auf einem BenchMark ULTRA PLUS Gerät verglichen mit einem BenchMark ULTRA Gerät, gemessen anhand des klinischen Status (positiv/negativ)

Zwischen Plattformen Konkordanz	Übereinstimmung			
	Typ	n/N	%	95 %-CI
ULTRA oder 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)

Hinweis: 95 %-CIs wurden mit der (Wilson-) Score-Methode berechnet.

Genauigkeitsstudie: Methodenvergleich der mit VENTANA MMR IHC Panel erzielten Ergebnisse mit molekularen Tests (DNA-Sequenzierung und Hypermethylierung des MLH1-Promotors)

Es wurde ein Vergleich der Leistung von VENTANA MMR IHC Panel und molekularen Tests durchgeführt, einschließlich einer umfassenden DNA-Sequenzierung eines Kolon-Panels zur Identifizierung von CRCs, bei denen es sich um (i) dMMR (defiziente MMR)-Tumoren handelte, die (ii) die BRAF V600E-Mutation enthielten. Die DNA-Sequenzierung des Kolon-Panels umfasste eine Genomanalyse auf Varianten von MMR-Genen (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6, EPCAM), BRAF sowie anderen für die Karzinogenese wichtigen Genen (z. B. PIK3CA, KRAS, NRAS, ERBB2 usw.). Die Sequenzierung umfasste alle

Exons, Introns und flankierenden Sequenzen sowie große Deletionen, Duplikationen und Mosaikismen.

Für die Studie wurden sequenzielle CRC-Fälle mit H&E gefärbt und hinsichtlich einer korrekten Fixierung und Morphologie einschließlich des Vorhandenseins zellulärer Elemente (Tumor- und interne Kontrollzellen) untersucht. Jeder Fall wurde dahingehend bewertet, ob die Probe einen Tumorgehalt von mindestens 50 % enthielt, um eine ausreichende Darstellung der Tumorzellen in der Probe zu gewährleisten, wie es für molekulare Tests empfohlen wird. Die Prüfung ergab 105 sequenzielle Fälle, die diese Kriterien erfüllten und für die Studie verwendet wurden. Zusätzlich wurden 13 CRC-Fälle analysiert, bei denen mittels IHC der klinische Status „Loss“ (Verlust) festgestellt worden war, um sicherzustellen, dass in der Studie auch Fälle mit Verlust der jeweiligen Marker vertreten waren. Von jedem Fall in der Studie wurden Schnitte mit VENTANA MMR IHC Panel und geeigneten negativen Reagenzkontrollen mittels IHC gefärbt. Mit weiteren Schnitten wurde eine DNA-Sequenzierung des Kolon-Panels durchgeführt.

Hypermethylierung des *MLH1*-Promotors ist einer der Mechanismen, die zum Verlust der *MLH1*-Proteinexpression führen können, und wird eher mit sporadischem CRC als mit einer möglichen Lynch-Syndrom-Diagnose in Verbindung gebracht. Daher wurden alle mittels IHC in der Studie identifizierten Fälle mit Verlust von *MLH1* auf Hypermethylierung des *MLH1*-Promotors getestet.

In der endgültigen in der Studie verwendeten Serie von 118 Fällen wurden auch die PPA und die NPA aller Marker in Kombination (d. h. alle kombinierten Beobachtungen) ermittelt, wobei die molekularen Tests als Referenzstatus für den IHC-Vergleich dienen. Die Analyse umfasste einen Vergleich des MMR-Proteinstatus (Intakt/Verlust) mit dem molekularen Status, definiert als „Normal“ (keine pathogene(n) Mutation(en), negativ hinsichtlich einer Hypermethylierung des *MLH1*-Promotors und Wildtyp-*BRAF* (keine *V600E*-Mutation)) oder „Abnormal“ (Vorhandensein mindestens einer pathogenen Mutation, positiv hinsichtlich einer Hypermethylierung des *MLH1*-Promotors und/oder positiv hinsichtlich der *BRAF* *V600E*-Mutation). Per Definition in dieser Studie ist eine Keimbahn- oder somatische Mutation, die voraussichtlich zum Verlust der MMR-Proteinexpression führt, eine pathogene Mutation. Punktschätzungen ergaben eine PPA von 99.4 %, eine NPA von 93.5 % und eine OPA von 98.8 % (siehe Tabelle 14).

Außerdem wurde eine kombinierte Analyse zum Vergleich der vier MMR-IHC-Marker (ohne den VENTANA anti-*BRAF* *V600E* (VE1) Antikörper) mit den Ergebnissen molekularer Tests durchgeführt. Punktschätzungen ergaben eine PPA von 99.3 %, eine NPA von 89.7 % und eine OPA von 98.5 % (siehe Tabelle 15).

In einer weiteren Analyse wurden die Ergebnisse für die vier MMR-IHC-Marker mit den Ergebnissen der molekularen Tests mit den MMR-Genen auf Fallebene verglichen, um den Status aller Marker zu berücksichtigen und ein dMMR/pMMR-Ergebnis mit den beiden Methoden zu erstellen. Diese Analyse ist in Tabelle 16 gezeigt und ergab eine OPA von 97.4 % zwischen den beiden Methoden.

Weiterhin wurde der mittels IHC ermittelte MMR-Status und der durch molekulare Tests ermittelte MMR-Status einzelner MMR-Marker innerhalb der Studie verglichen. Beim Vergleich der kombinierten Ergebnissen der DNA-Sequenzierung des Kolon-Panels mit dem Test auf Hypermethylierung des *MLH1*-Promotors betrug die OPA jedes MMR-Markers bei Anwendung des VENTANA anti-*MLH1* (M1) Antikörpers 100.0 %, bei Anwendung von VENTANA anti-*PMS2* (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody 99.1 %, bei Anwendung von VENTANA anti-*MSH2* (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody 98.3 % und bei Anwendung von VENTANA anti-*MSH6* (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody 96.6 %.

Ferner wurde der mittels IHC unter Verwendung des VENTANA anti-*BRAF* *V600E* (VE1) Antikörpers ermittelte klinische Status der CRCs in Bezug auf *BRAF* *V600E* mit dem durch DNA-Sequenzierung festgestellten *BRAF*-Mutationsstatus verglichen. Die PPA, NPA und OPA der IHC-Tests mit dem VENTANA anti-*BRAF* *V600E* (VE1) Antikörper bei Verwendung der DNA-Sequenzierung als Referenz betragen jeweils 100 % (Tabelle 17). In zusätzlichen Tests wurde die Eignung des VENTANA anti-*BRAF* *V600E* (VE1) Antikörpers zur weiteren Stratifizierung von CRC-Fällen mit Verlust der Expression von *MLH1*-Protein untersucht. Von den 23 positiven *BRAF* *V600E*-Fällen wiesen 20 Fälle mittels IHC einen Verlust des *MLH1*-Proteins auf und waren positiv hinsichtlich einer Hypermethylierung des *MLH1*-Promotors. Diese Daten stimmen mit der engen Verbindung eines positiven *BRAF* *V600E*-Status mit dem Hypermethylierungsstatus des *MLH1*-Promotors überein. Die verbleibenden drei Fälle waren pMMR (intakte Expression aller MMR-Proteine). Alle *BRAF* *V600E*-positiven Proben erwiesen sich als sporadische CRCs. Die Ergebnisse bestätigten, dass der VENTANA anti-*BRAF* *V600E* (VE1) Antikörper CRCs mit der *BRAF* *V600E*-Mutation korrekt identifiziert. Die Daten belegen auch die Eignung des VENTANA anti-*BRAF* *V600E* (VE1) Antikörpers zur Unterscheidung zwischen sporadischem CRC und wahrscheinlichem Lynch-Syndrom-CRC bei Nichtvorhandensein der *MLH1*-Expression.

Tabelle 14. Kombinierte Analyse auf Übereinstimmung zwischen IHC mit VENTANA MMR IHC Panel und molekularen Tests.

Status* (Molekulare Tests/IHC)	Übereinstimmung			
	Typ	n/N	%	95 %-CI
Normal/„Intact“ (Intakt)	PPA	523/526	99.4	(98.7, 100.0)
Abnormal/„Loss“ (Verlust)	NPA	58/62	93.5	(87.1, 98.6)
Gesamt	OPA	581/588	98.8	(98.0, 99.7)

* Bei der IHC ist der Status der MMR-Proteinexpression „Intact“ (Intakt) oder „Loss“ (Verlust). In dieser Analyse wurden in den Kategorien „Intact“ (Intakt) bzw. „Loss“ (Verlust) *BRAF* *V600E*-negative und -positive Fälle eingeschlossen. Molekulare Tests geben Aufschluss über Nichtvorhandensein (Normal) bzw. Vorhandensein (Abnormal) potenzieller pathogener Mutationen oder einer Hypermethylierung des *MLH1*-Promotors. 95 %-CIs wurden unter Verwendung der Perzentil-Bootstrap-Methode berechnet.

Tabelle 15. Kombinierte Analyse zur Ermittlung der Übereinstimmung zwischen IHC und molekularen Tests bei vier MMR-IHC-Markern (ohne den VENTANA anti-*BRAF* *V600E* (VE1) Antikörper).

Status* (Molekulare Tests/IHC)	Übereinstimmung			
	Typ	n/N	%	95 %-CI
Normal/„Intact“ (Intakt)	PPA	428/431	99.3	(98.4, 100.0)
Abnormal/„Loss“ (Verlust)	NPA	35/39	89.7	(79.4, 97.7)
Gesamt	OPA	463/470	98.5	(97.3, 99.6)

* Bei der IHC ist der Status der Proteinexpression „Intact“ (Intakt) oder „Loss“ (Verlust). Molekulare Tests geben Aufschluss über Nichtvorhandensein (Normal) bzw. Vorhandensein (Abnormal) potenzieller pathogener Mutationen oder einer Hypermethylierung des *MLH1*-Promotors. 95 %-CIs wurden unter Verwendung der Perzentil-Bootstrap-Methode berechnet.

Tabelle 16. Ergebnisse zur Übereinstimmung zwischen den vier MMR-IHC-Markern und den Ergebnissen molekularer Tests in Bezug auf den MMR-Status (dMMR/pMMR).

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

* Bei der IHC ist der pMMR-Status als Vorliegen des Status „Intact“ (Intakt) in Bezug auf alle MMR-Proteine definiert, während der dMMR-Status als „Loss“ (Verlust) mindestens eines MMR-Proteins definiert ist. Bei molekularen Tests ist der pMMR-Status als Nichtvorhandensein pathogener Mutationen oder einer Hypermethylierung des *MLH1*-Promotors definiert, wohingegen der dMMR-Status durch Vorhandensein pathogener Mutationen oder einer Hypermethylierung des *MLH1*-Promotors definiert ist. 95 %-CIs wurden mit der Wilson-Score-Methode berechnet.

Tabelle 17. Übereinstimmung zwischen IHC mit VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Antikörper und molekularen Tests.

BRAF V600E-Status (molekular/IHC)	Übereinstimmung			
	Typ	n/N	%	95 %-CI
Positiv/Abnormal	PPA	23/23	100.0	(85.7, 100.0)
Negativ/Normal	NPA	95/95	100.0	(96.1, 100.0)
Gesamt	OPA	118/118	100.0	(96.8, 100.0)

Der BRAF V600E-Status war definiert als „Positiv“ oder „Negativ“ entsprechend dem IHC-Ergebnis und als „Abnormal“ (Vorhandensein der V600E-Mutation) oder „Normal“ (Wildtyp-BRAF) entsprechend dem Ergebnis im molekularen Test. 95 % CIs wurden mit der Wilson-Score-Methode berechnet.

LITERATURANGABEN

- 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.
- Jin M, Hampel H, Zhou X, Schunemann L, Yearsley M, et al. BRAF V600E mutation analysis simplifies the testing algorithm for Lynch syndrome. *Am J Clin Pathol.* 2013;140(2):177-183.
- Deng G, Bell I, Crawley S, Gum J, Terdiman JP, et al. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10(1 Pt 1):191-195.
- Tiacci E, Schiavoni G, Forconi F, Santi A, Trentin L, et al. Simple genetic diagnosis of hairy cell leukemia by sensitive detection of the BRAF-V600E mutation. *Blood.* 2012;119(1):192-195.
- Giardiello FM, Allen JI, Axilbund JE, Boland CR, Burke CA, et al. Guidelines on Genetic Evaluation and Management of Lynch Syndrome: A Consensus Statement by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Diseases of the Colon & Rectum.* 2014;57(8):1025-1048.
- Egoavil C, Alenda C, Castillejo A, Paya A, Peiro G, et al. Prevalence of Lynch syndrome among patients with newly diagnosed endometrial cancers. *PLoS One.* 2013;8(11):e79737.
- Connell LC, Mota JM, Braghiroli MI, Hoff PM. The Rising Incidence of Younger Patients With Colorectal Cancer: Questions About Screening, Biology, and Treatment. *Curr Treat Options Oncol.* 2017;18(4):23.
- Provenzale D, Gupta S, Ahnen DJ, Bray T, Cannon JA, et al. Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal Version 1.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2016;14(8):1010-1030.
- Balmana J, Balaguer F, Cervantes A, Arnold D, Group EGW. Familial risk-colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol.* 2013;24 Suppl 6:vi73-80.
- Evaluation of Genomic Applications in P, Prevention Working G. Recommendations from the EGAPP Working Group: genetic testing strategies in newly diagnosed individuals with colorectal cancer aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome in relatives. *Genet Med.* 2009;11(1):35-41.
- Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(4):261-268.
- Parsons MT, Buchanan DD, Thompson B, Young JP, Spurdle AB. Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. *J Med Genet.* 2012;49(3):151-157.
- Shia J. Evolving approach and clinical significance of detecting DNA mismatch repair deficiency in colorectal carcinoma. *Semin Diagn Pathol.* 2015;32(5):352-361.
- Thiel A, Heinonen M, Kantonen J, Gylling A, Lahtinen L, et al. BRAF mutation in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. *Virchows Arch.* 2013;463(5):613-621.
- Toon CW, Chou A, DeSilva K, Chan J, Patterson J, et al. BRAFV600E immunohistochemistry in conjunction with mismatch repair status predicts survival in patients with colorectal cancer. *Mod Pathol.* 2014;27(5):644-650.
- Koinuma K, Shitoh K, Miyakura Y, Furukawa T, Yamashita Y, et al. Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas. *Int J Cancer.* 2004;108(2):237-242.
- Capper D, Preusser M, Habel A, 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.
- Capper D, Berghoff AS, Magerle M, Ilhan A, Wohrer A, et al. Immunohistochemical testing of BRAF V600E status in 1,120 tumor tissue samples of patients with brain metastases. *Acta Neuropathol.* 2012;123(2):223-233.
- Carson FL, Hladik C, Cappellano CH, Pathology ASfC. *Histotechnology: A Self-Instructional Text: American Society for Clinical Pathology;* 2015.
- Roche PC, Hsi ED, Firfer BL. *Immunohistochemistry: Principles and Advances. Manual of Molecular and Clinical Laboratory Immunology, 7th Edition: American Society of Microbiology;* 2006.
- Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). *Fed. Register.*
- Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
- Rabinovitch A. The College of American Pathologists laboratory accreditation program. *Accreditation and Quality Assurance.* 2002;7(11):473-476.
- CLSI. *Quality Assurance for Design Control and Implementation of Immunohistochemistry Assays: Approved Guideline-Second Edition.* CLSI

document I/LA28-A2 (ISBN 1-56238-745-6). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 2011.

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

HINWEIS: In diesem Dokument wird statt einem Komma ein Punkt als Dezimaltrennzeichen verwendet, um die Vorkomma- von den Nachkommastellen zu trennen. Es werden keine Tausendertrennzeichen verwendet.

Eine Zusammenfassung der Sicherheit und Leistung ist verfügbar auf:

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

Symbole

Ventana verwendet die folgenden Symbole und Zeichen zusätzlich zu den Symbolen und Zeichen gemäß Norm ISO 15223-1 (USA: siehe elabdoc.roche.com/symbols für weitere Informationen):

GTIN Internationale Artikelnummer

UDI Eindeutige Gerätekenung (UDI)

VERSIONSVERLAUF

Rev.	Updates
F	Für den Abschnitt „Nicht im Lieferumfang enthaltene, aber erforderliche Materialien“ liegen Updates in Form zusätzlicher Artikelnummern für 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 und VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody vor.

GEISTIGES EIGENTUM

VENTANA, BENCHMARK, OPTIVIEW und das VENTANA Logo sind Marken von Roche. Alle sonstigen Marken sind Eigentum der jeweiligen Inhaber.

© 2023 Ventana Medical Systems, Inc.

KONTAKTDATEN



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

www.roche.com

