



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
2020 - Año del General Manuel Belgrano

Disposición

Número:

Referencia: 1-47-3110-7573/18-0

VISTO el expediente N° 1-47-3110-7573/18-0 del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica y,

CONSIDERANDO:

Que por los presentes actuados la firma PRODUCTOS ROCHE S.A.Q.e.I solicita autorización de modificación del registro del Producto para diagnóstico de uso “in vitro” denominado: Anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (Ref: 790-4855).

Que lo solicitado se encuadra dentro de los alcances de la Disposición ANMAT N° 2674/99 y la documentación aportada ha satisfecho los requisitos de la normativa aplicable.

Que en el expediente de referencia consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos para Diagnóstico que establece que se autoriza la modificación solicitada.

Que el Instituto Nacional de Productos Médicos ha tomado la intervención de su competencia.

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por los Decretos N° 1490/92 y sus modificatorios.

Por ello;

EL ADMINISTRADOR NACIONAL DE LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE
MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA

D I S P O N E:

ARTÍCULO 1°.- Autorízase la modificación del Certificado N° PM 740-535 del producto para diagnóstico de uso in vitro denominado: Anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (Ref: 790-4855), autorizado según Disposición N° 12410/17.

ARTICULO 2°.- Acéptese la incorporación al certificado de la referencia del producto: 2) VENTANA Anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (Ref: 760-5095), además de lo ya autorizado, con los Datos Característicos que figuran al pie de la presente.

ARTICULO 3°.- Autorízase los textos de los proyectos de rótulo/s y de instrucciones de uso que obran en documento N° IF-2019-90580458-APN-DNPM#ANMAT.

ARTICULO 4°.- Practíquese la atestación correspondiente en el Certificado de Inscripción N° PM 740-535 cuando el mismo se presente acompañado de la presente Disposición.

ARTÍCULO 5°.- Regístrese. Inscríbase en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica al nuevo producto. Por el Departamento de Mesa de Entrada, notifíquese al interesado, haciéndole entrega de la presente Disposición, conjuntamente con rótulos e instrucciones de uso autorizados. Gírese a la Dirección de Gestión de Información Técnica a los fines de confeccionar el legajo correspondiente. Cumplido, archívese.

DATOS IDENTIFICATORIOS CARACTERISTICOS

NUEVO NOMBRE COMERCIAL: 1) Anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (Ref: 790-4855); 2) VENTANA Anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (Ref: 760-5095).

INDICACIÓN DE USO: 1) No modifica; 2) Anticuerpo monoclonal que forma parte del VENTANA MMR IHC Panel y está destinado a la tinción cualitativa en cortes de tejido fijado en formol e incluido en parafina, como ayuda en la identificación de la proteína mutante BRAF V600E, junto a los instrumentos BenchMark ULTRA, XT y GX con OptiView DAB IHC Detection Kit.

FORMA DE PRESENTACIÓN: 1) No modifica; 2) ENVASES POR 50 DETERMINACIONES, CONTENIENDO: 1 vial x 5 ml.

PERIODO DE VIDA ÚTIL Y CONDICIONES DE CONSERVACIÓN: 1) No modifica; 2) VEINTISEIS (26) meses desde la fecha de elaboración, conservado entre 2 y 8 °C.

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL FABRICANTE: 1) No modifica; 2) Ventana Medical Systems Inc. 1910 E. Innovation Park Drive, Tucson, AZ 85755. (USA) para Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, 68305 Mannheim, (ALEMANIA).

Expediente N° 1-47-3110-7573-18-0

Digitally signed by GARAY Valeria Teresa
Date: 2020.02.07 13:29:06 ART
Location: Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL
ELECTRÓNICA - GDE
Date: 2020.02.07 13:29:34 -03:00

PROYECTO DE ROTULOS

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

Rótulos externos:



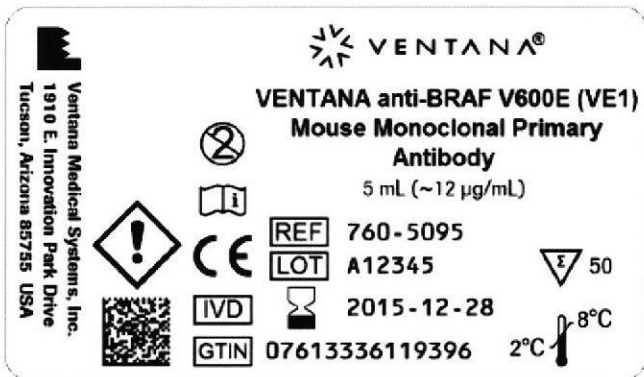
Sobre-rótulo externo colocado locamente

Directora Técnica: Farm. Vanesa Diambra – Farmacéutica
Autorizado por la A.N.M.A.T. PM-740-535
Productos Roche S.A.Q. e I. (División Diagnóstica).
Otto Krause 4211
Tortuguitas, Malvinas Argentinas, Pcia. de Buenos Aires

República Argentina

Uso profesional exclusivo

Rótulos interno:



Farm. ANGRA MAJALANI
FARM. PROD. ROCHE S.A. Q. e I.
DIVISION DIAGNÓSTICA
COORDINADORA TÉCNICA

FORM. AMINUMAJDALANI
 PRODUCTOR KOCHÉ S.A. Q.E.L.
 DIVISION DIAGNOSTICA
 COOPERATIVA TECNICA

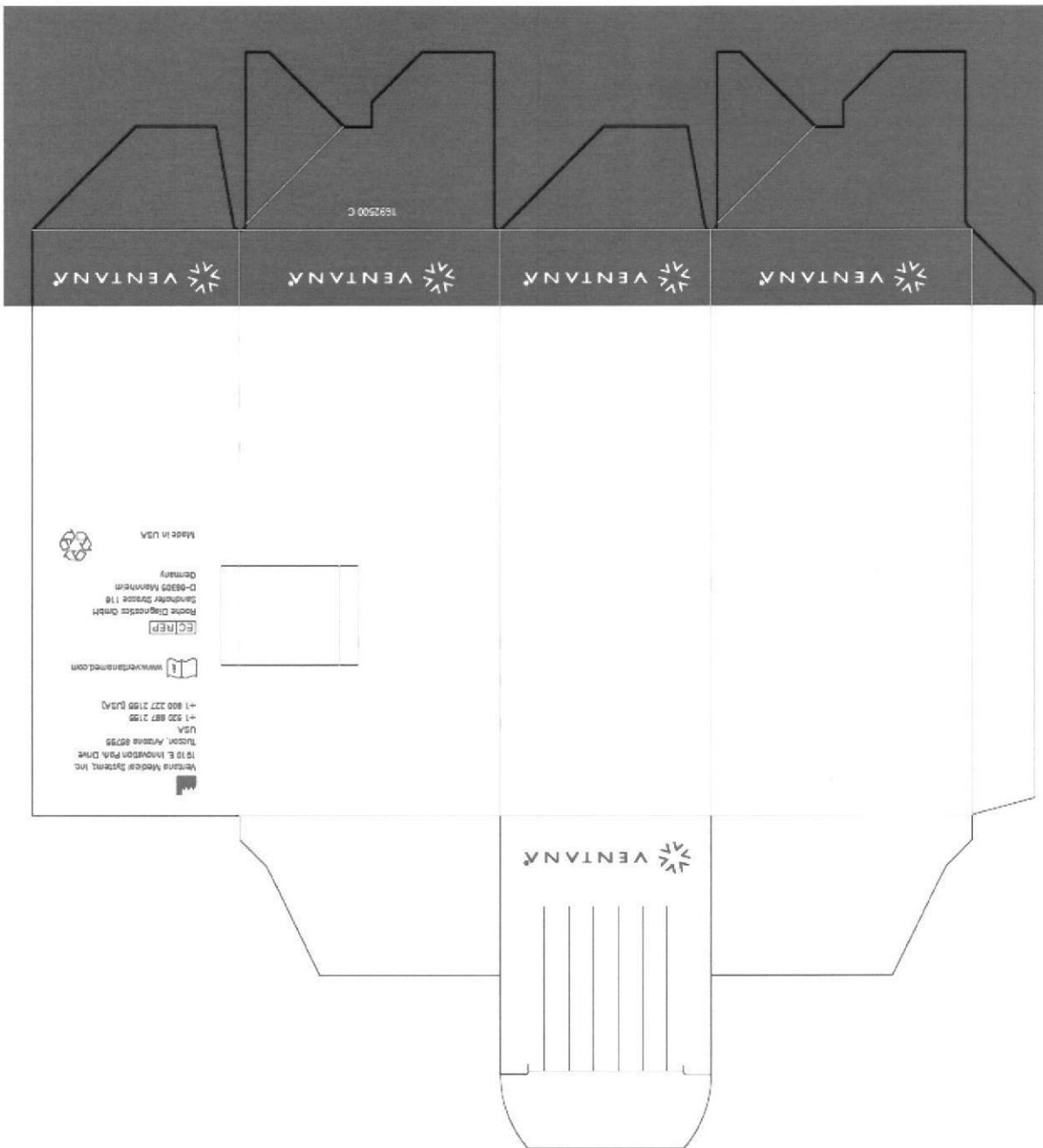


Imagen del empaque secundario





Ampliación de la imagen: Fabricante declarado en empaque secundario



Ventana Medical Systems, Inc.
1910 E. Innovation Park Drive
Tucson, Arizona 85755
USA
+1 520 887 2155
+1 800 227 2155 (USA)



www.ventanamed.com



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany



Made in USA


Firma: AMIR MAJDALANI
PR. DE LOS ROCHES S.A. Q. e. I.
LABORATORIO DIAGNÓSTICA
CO-DIRECTORA TÉCNICA

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

Para uso con el VENTANA MMR IHC Panel

REF 760-5095

08033706001

IVD  50

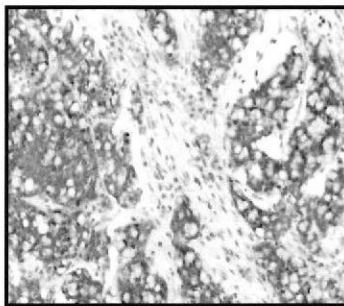


Figura 1. Tinción con VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody de células neoplásicas en tejido de cáncer de colon

USO PREVISTO

VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) está destinado a la detección cualitativa de proteína BRAF V600E en secciones de tejido fijado con formol y embebido en parafina. El anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) está listo para usar en los instrumentos BenchMark ULTRA, XT y GX con OptiView DAB IHC Detection Kit y reactivos auxiliares.

El anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) es parte del VENTANA MMR IHC Panel que incluye VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody, VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody, VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody y VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody. El VENTANA MMR IHC Panel está indicado para la detección de la deficiencia de la proteína de reparación de errores de emparejamiento como prueba para la identificación de individuos con riesgo de sufrir el síndrome de Lynch en pacientes a los que se ha diagnosticado cáncer colorrectal (CRC) y, con el estado de BRAF V600E, como ayuda para diferenciar entre CRC con síndrome de Lynch esporádico y probable en ausencia de expresión de la proteína MLH1.

Estos productos deben ser interpretados por un anatomopatólogo cualificado junto con un examen histológico, la información clínica pertinente y los controles adecuados.

Para uso diagnóstico *in vitro* (IVD).

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El cáncer colorrectal es el tercer cáncer más común y la cuarta causa más frecuente de muerte en el mundo.¹ La mayoría de los CRC muestra inestabilidad cromosómica, no obstante, aproximadamente el 15 % de los cánceres se desarrollan a través de una vía alternativa caracterizada por la función defectuosa del sistema de reparación de errores de emparejamiento del DNA (MMR). Como consecuencia de la deficiencia de la MMR, los tumores presentan inestabilidad de microsátelites (IMS) como resultado de la incapacidad de las proteínas MMR para reparar errores de replicación del DNA.

Los CRC con defectos de la MMR se marcan como tumores deficientes en MMR (dMMR). En contraste, los CRC sin defectos de la MMR se marcan como tumores proficientes en MMR (pMMR). Los cánceres colorrectales dMMR a menudo se diferencian escasamente y con frecuencia muestran predominancia en el colon proximal, características histológicas mucinosas, medulares o en anillo de sello y mayor número de infiltración tumoral de linfocitos.^{2,3} En general, la deficiencia de MMR puede estar causada por mutaciones de la línea germinal en uno de los genes de la MMR con la subsiguiente pérdida del correspondiente alelo normal a través de mecanismos genéticos o epigenéticos, mutaciones somáticas en los alelos, o por la inactivación epigenética del gen *MLH1* a través de metilación.⁴

Los cuatro genes MMR que mutan con mayor frecuencia son *MLH1*, *PMS2*, *MSH2* y *MSH6*. En células normales, la proteína MLH1 forma un complejo (heterodímero) con la proteína PMS2, mientras que la proteína MSH2 forma un complejo con la proteína MSH6.^{5,6} Cuando se produce el error de emparejamiento del DNA, el heterodímero MSH2/MSH6 se une al DNA mal emparejado, induciendo un cambio conformacional.

Los heterodímeros MLH1/PMS2 se unen a los complejos de MSH2/MSH6 unidos al DNA produciendo la reparación por la escisión del DNA afectado.

Las proteínas MLH1, PMS2, MSH2 y MSH6 son proteínas MMR clínicamente importantes codificadas por genes que pueden mutar en familias con el síndrome de Lynch.^{7,8} Los portadores de estas mutaciones tienen un alto riesgo durante toda su vida de desarrollar cánceres colorrectales y otros cánceres debido a la acumulación de errores de replicación del DNA en células proliferantes. El síndrome de Lynch representa un 1-6 % de todos los CRC. Estos tumores son el resultado de la herencia de una mutación dominante autosómica de la línea germinal en uno de los cuatro genes MMR, y en la mayoría de estos CRC asociados al síndrome de Lynch se produce la pérdida de MLH1.^{5,9,10} Se han identificado más de 300 mutaciones diferentes en la familia MMR de proteínas en pacientes con síndrome de Lynch. El fenotipo del tumor asociado con el síndrome de Lynch se caracteriza generalmente por la pérdida inmunohistoquímica de expresión en proteínas MMR, particularmente MLH1, PMS2, MSH2 y MSH6.¹⁰⁻¹³ Las pruebas IHC de MMR han demostrado ser útiles en la identificación del gen MMR específico en el cual es más probable encontrar una alteración de la línea germinal o somática.¹⁴

El gen BRAF localizado en el cromosoma 7q34 codifica una serina_treonina cinasa citoplasmática que actúa debajo de la vía señalada con proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK). Las mutaciones oncogénicas en el gen *BRAF* dentro del dominio de la cinasa, activan constitutivamente la vía señalada con MAPK, lo que provoca un aumento de la proliferación celular y resistencia a la apoptosis. La más común de todas las mutaciones activadoras de *BRAF* (mutación de punto T1799A) da como resultado la sustitución de valina (V) por ácido glutámico (E) en la posición 600 de la secuencia de aminoácidos y se detecta en el 12 % de todos los CRC.^{15,16}

Como parte del VENTANA MMR IHC Panel, el VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) ayuda a diferenciar entre el CRC con síndrome de Lynch esporádico y probable en ausencia de la expresión de la proteína MLH1.^{17,18} En el CRC, la pérdida de la proteína MLH1 es frecuentemente el resultado de la hipermetilación del promotor *MLH1* e indica una ocurrencia esporádica.¹⁹ La presencia de la proteína BRAF V600E está estrechamente vinculada a la hipermetilación del promotor *MLH1*. Como resultado, un resultado de tinción positiva con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) indica CRC esporádico.

Aparte de su función en la estratificación de CRC, la mutación de *BRAF V600E* se detecta en aproximadamente el 8 % de todos los tumores sólidos, incluyendo el 43 % de los melanomas, el 39 % de los carcinomas papilares de tiroides, el 12 % de los carcinomas serosos de ovarios, el 2 % de los cánceres de pulmón y en otros cánceres.¹⁶ Además, la mutación de *BRAF V600E* se ha descrito recientemente como un marcador molecular de leucemia de células pilosas.²⁰

IMPORTANCIA CLÍNICA

El síndrome de Lynch fue descrito en los años 60 y se identificó un vínculo entre la pérdida de la función de MMR y el cáncer.²¹ La pérdida de proteínas MMR (MLH1, PMS2, MSH2 o MSH6) puede ocasionar IMS y un mayor riesgo durante toda la vida de desarrollar no solo CRC, sino además cánceres de estómago, cerebro, páncreas, piel, endometrio y ovarios. Los pacientes con síndrome de Lynch tienen un riesgo durante toda la vida de desarrollar CRC del 50-80 %.^{5,22,23} El síndrome de Lynch es único entre otros síndromes de cánceres hereditarios ya que las pruebas directas en tejido tumoral ayudan en la identificación de pacientes en riesgo por síndrome de Lynch potencial y ayuda a informar las subsiguientes pruebas genéticas de línea germinal. Las familias con síndrome de Lynch se benefician de protocolos de detección de cáncer avanzados. Diversas directrices, incluyendo las de la National Comprehensive Cancer Network (NCCN), recomiendan que se investiguen todos los CRC para detectar un potencial síndrome de Lynch potencial a fin de identificar a pacientes y familias que se beneficiarán de posteriores pruebas genéticas y asesoramiento.^{21,24-27} El uso del VENTANA MMR IHC Panel ayudará a determinar el estado de la MMR de los CRC y se clasificarán como Intacto o Pérdida para la expresión de la proteína MMR. La detección de las cuatro proteínas MMR en el tumor indica MMR normal o intacto. La pérdida de la expresión de MLH1 o MSH2 va acompañada casi invariablemente de la pérdida de su socio heterodímero, PMS2 o MSH6, respectivamente. Sin embargo, la pérdida de PMS2 o MSH6 no conduce a la pérdida de MLH1 o MSH2. La pérdida de PMS2, MSH2 y/o MSH6 es coherente con un probable síndrome de Lynch, y los pacientes deben someterse a pruebas adicionales y a recibir asesoramiento conforme a la práctica clínica.

La pérdida de la proteína MLH1 puede indicar una ocurrencia esporádica o posible síndrome de Lynch. En el 15 % o más de los CRC esporádicos, la pérdida de la proteína


M. AMIRA MAJDALANI
PRODUCTOS ROCHE S.A.Q. e.l.
DIVISIÓN DIAGNÓSTICA
COORDINADORA TÉCNICA



MLH1 se debe a la hipermetilación del promotor *MLH1*.^{5,28,29} Es importante destacar que se observa la mutación de BRAF V600E en aproximadamente dos tercios de los tumores con pérdida de expresión de MLH1 a partir de la hipermetilación del promotor *MLH1*. En contraste, la mutación de BRAF V600E se observa muy raramente en tumores con síndrome de Lynch.²⁸ Por consiguiente, si el resultado del anticuerpo VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (anticuerpo VENTANA anti-MLH1 (M1)) indica pérdida de la proteína MLH1, el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) puede estratificar el tumor como síndrome de Lynch esporádico o probable.^{5,30} En el CRC, la pérdida de proteína MLH1 con un estado de BRAF V600E positivo indica claramente que el tumor es el resultado de una ocurrencia esporádica, eliminando virtualmente el síndrome de Lynch como causa subyacente de malignidad.^{21,31} Cuando la pérdida de proteína MLH1 va acompañada de un estado de BRAF V600E negativo, la pérdida de MLH1 es coherente con una alta probabilidad de síndrome de Lynch.³²

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) es un anticuerpo monoclonal de ratón (clone VE1) producido contra el péptido sintético que representa la secuencia de aminoácidos con mutación de BRAF del aminoácido 596 al 606 (GLATEKSRWSG). Este anticuerpo con esta mutación específica muestra un patrón de tinción citoplasmática. Este anticuerpo diferencia la mutación V600E en la proteína BRAF respecto a la proteína BRAF de tipo salvaje y de las otras proteínas BRAF con mutación.^{33, 34}

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

El anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) se une a la proteína mutante BRAF V600E en secciones de tejido (FFPE) fijados con formol y embebidos en parafina. El anticuerpo se puede localizar mediante un anticuerpo secundario haptenado seguido de un conjugado antihapteno-HRP multímero (OptiView DAB IHC Detection Kit, N.º Cat. 760-700 / 06396500001). El complejo anticuerpo-enzima específico se visualiza entonces con un producto de reacción de precipitación de la enzima. Cada paso se incuba durante un tiempo y a una temperatura precisos. Al final de cada paso de incubación, los instrumentos BenchMark ULTRA, XT y GX enjuagan las secciones para detener la reacción y eliminar el material no unido que impediría la reacción deseada en los pasos siguientes. Lo mismo ocurre con ULTRA LCS (ULTRA LCS (Predilute), N.º Cat. 650-210 / 05424534001) o LCS (LCS predilute, N.º Cat. 650-010 / 05264839001), que minimiza la evaporación de los reactivos acuosos del portaobjetos de la muestra. Además de la tinción con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), es necesario teñir un segundo portaobjetos con un reactivo negativo monoclonal de ratón, Negative Control (Monoclonal) (N.º Cat. 760-2014 / 05266670001). El control de reactivos negativo se utiliza para evaluar la tinción de fondo.

REACTIVO SUMINISTRADO

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

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

Este anticuerpo se ha diluido en 0,1 M de tampón fosfato (pH 7,3) con una proteína transportadora al 0,3 %, Brij 35 al 0,05 % y ProClin300 al 0,05 %, un conservante.

La concentración total de proteína del reactivo es aproximadamente de 3 mg/mL.

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

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

Consultar el folleto correspondiente del kit de detección VENTANA para descripciones detalladas de: (1) Principios del procedimiento, (2) Materiales y reactivos necesarios pero no suministrados, (3) Extracción y preparación de la muestra para su análisis, (4) Procedimientos de control de calidad, (5) Resolución de problemas, (6) Interpretación de los resultados y (7) Limitaciones generales.

MATERIALES NECESARIOS, PERO NO SUMINISTRADOS

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

Los reactivos y materiales siguientes son necesarios para la tinción pero no se incluyen:

1. Anticuerpos VENTANA MMR IHC Panel adicionales:

- VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (N.º Cat. 760-5091 / 08033668001)
 - VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody (N.º Cat. 760-5094 / 08033692001)
 - VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody (N.º Cat. 760-5093 / 08033684001)
 - VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (N.º Cat. 760-5092 / 08033676001)
2. Negative Control (Monoclonal) (N.º Cat. 760-2014 / 05266670001)
 3. Portaobjetos para microscopio con carga positiva
 4. Etiquetas de código de barras (compatibles con el control de reactivo negativo y el anticuerpo primario que se está analizando)
 5. Xileno (grado histológico)
 6. Etanol o alcohol reactivo (grado histológico)
 - Solución al 100 %: etanol o alcohol reactivo sin diluir
 - Solución al 95 %: mezcla de 95 partes de etanol o alcohol reactivo con 5 partes de agua desionizada
 - Solución al 80 %: mezcla de 80 partes de etanol o alcohol reactivo con 20 partes de agua desionizada
 7. Agua desionizada o destilada
 8. OptiView DAB IHC Detection Kit (N.º Cat. 760-700 / 06396500001)
 9. Para VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody, OptiView Amplification Kit (N.º Cat. 760-099 / 06396518001 o N.º Cat. 860-099 / 06718663001)
 10. EZ Prep Concentrate (10X) (N.º Cat. 950-102 / 05279771001)
 11. Reaction Buffer Concentrate (10X) (N.º Cat. 950-300 / 05353955001)
 12. ULTRA LCS (Predilute) (N.º Cat. 650-210 / 05424534001) o LCS (LCS predilute N.º Cat. 650-010 / 05264839001)
 13. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (N.º Cat. 950-224 / 05424569001) o Cell Conditioning 1 (CC1) (N.º Cat. 950-124 / 05279801001)
 14. Hematoxylin II (N.º Cat. 790-2208 / 0527965001)
 15. Bluing Reagent (N.º Cat. 760-2037 / 05266769001)
 16. Medio de montaje permanente (Permount Fisher N.º Cat. SP15-500 o equivalente)
 17. Cubreobjetos (suficiente para cubrir el tejido, como VWR N.º) Cat. 48393-060)
 18. Montador de portaobjetos automatizado (como el Tissue-Tek SCA Automated Coverslipper)
 19. Microscopio óptico
 20. Toallitas absorbentes

ALMACENAMIENTO

Tras la recepción y cuando no se utilice, consérvese de 2 a 8 °C. No congelar.

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

En cada dispensador de anticuerpos se marca la fecha de caducidad. Si se almacena correctamente, el reactivo se mantendrá estable hasta la fecha indicada en la etiqueta. No utilice el reactivo después de la fecha de caducidad.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Deben realizarse cortes de un grosor aproximado de 4 µm y colocarse en portaobjetos de vidrio con carga positiva. Deben utilizarse secciones recién preparadas para la tinción, ya que la antigenicidad de las secciones de tejido puede disminuir con el tiempo.

Los tejidos FFPE que se procesan de manera habitual son adecuados para su uso con este anticuerpo primario al utilizarse con OptiView DAB IHC Detection Kit y el instrumento BenchMark ULTRA. El fijador de tejidos recomendado es formol tamponado neutro al 10%.³⁵

Para el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), se recomienda fijar el tejido en un plazo de 2 horas desde la escisión en formol tamponado neutro al 10 % durante al menos 12 horas sobre la base de modelos de xenoinjertos generados a partir de líneas celulares humanas A2058 (melanoma) y LS411N (CRC), que sean positivas para la expresión de BRAF V600E. Sin embargo, los tiempos de fijación de hasta 72 horas en formol tamponado neutro al 10 % dieron resultados de tinción de BRAF V600E equivalentes.

Dr. AMIR MAJDALANI
PRODUCTOS ROCHE S.A. Q.E.I.
DIVISION DIAGNÓSTICA
COORDINADORA TÉCNICA



También se consiguió una tinción aceptable con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) con fijación en formol-zinc durante 12-72 horas.

No se recomienda el uso de alcohol, formol y ácido acético (AFA), etanol al 95 % y fijadores Z-5 y PREFER con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). Los tejidos de xenoinjertos fijados en alcohol formol no muestran tinción o esta es variable.

La cantidad de fijador usada debe ser de 15 a 20 veces superior al volumen de tejido. Ningún fijador penetrará más de 2 a 3 mm en el tejido sólido o 5 mm en el tejido poroso en un periodo de 24 horas. La fijación se puede llevar a cabo a temperatura ambiente (de 15 a 25 °C).¹⁴

Deben realizarse secciones embebidas en parafina de un grosor aproximado de 4 µm y colocarse en portaobjetos de vidrio con carga positiva. Los portaobjetos deben teñirse inmediatamente tras cortarlos del bloque de parafina, ya que la antigenicidad de los cortes de tejido puede disminuir con el tiempo. No obstante, los portaobjetos de tejido de CRC sin teñir almacenados a 5±3 °C o 30±5 °C durante un máximo de 8 semanas demostraron una intensidad de tinción con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) similar a la de las muestras de tejido preparadas del mismo bloque y tefidas con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) el día 1.

Se recomienda que los controles positivos y negativos se ejecuten simultáneamente con muestras desconocidas.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico *in vitro* (IVD).
2. Solo para uso profesional.
3. La solución ProClin 300 se utiliza como conservante en este reactivo. Está clasificada como irritante y puede ocasionar sensibilización por contacto con la piel. Adopte precauciones razonables cuando la manipule. Evite el contacto de reactivos con los ojos, la piel y las membranas mucosas. Utilice ropa protectora y guantes.
4. Los materiales de origen animal o humano deben manipularse como materiales peligrosos para el medioambiente y eliminarse con las precauciones adecuadas.
5. Evite el contacto de los reactivos con los ojos y las membranas mucosas. Si los reactivos entran en contacto con zonas sensibles, lávelas con agua abundante.
6. Evite la contaminación microbiana de los reactivos, dado que podría dar lugar a unos resultados incorrectos.
7. Consulte a las autoridades locales o nacionales sobre el método de eliminación recomendado.
8. Para obtener información de seguridad complementaria, consulte la hoja de datos de seguridad del producto y la guía de símbolos y peligros que encontrará en la página www.ventana.com.

PROCEDIMIENTO DE TINCIÓN

El anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) se ha desarrollado para su uso en los instrumentos BenchMark ULTRA, XT y GX en combinación con OptiView DAB IHC Detection Kit y reactivos auxiliares. En la Tabla 1 se indica el protocolo de tinción con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). Se desconoce el efecto de variar el tiempo y la temperatura de la recuperación antigénica en el ensayo sobre la solidez del ensayo. Por tanto, la desviación respecto a las condiciones recomendadas para la recuperación antigénica proporcionadas en el protocolo indicado sobre tinción es desconocida y puede invalidar los resultados esperados. Deben emplearse y documentarse los controles apropiados. Los usuarios que se desvíen del protocolo indicado deben aceptar la responsabilidad por la interpretación de los resultados de los pacientes.

Los parámetros de los procedimientos automatizados se pueden mostrar, imprimir y editar según el procedimiento descrito en el manual del usuario de los instrumentos. Consulte el prospecto del paquete del OptiView DAB IHC Detection Kit para obtener más detalles sobre los procedimientos de tinción IHC.

Tabla 1. Protocolo de tinción para el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) con OptiView DAB IHC Detection Kit en un instrumento BenchMark ULTRA, XT y GX

Tipo de procedimiento	Método		
	BenchMark ULTRA Instrumento	BenchMark XT Instrumento	BenchMark GX Instrumento
Desparafinación	Seleccionado	Seleccionado	Seleccionado
Acondicionamiento celular	Cell Conditioning 1	Cell Conditioning 1	Cell Conditioning 1

Tipo de procedimiento	Método		
	BenchMark ULTRA Instrumento	BenchMark XT Instrumento	BenchMark GX Instrumento
(desenmascaramiento antigénico)	64 minutos, 100 °C	64 minutos	64 minutos
Pre-Primary Peroxidase Inhibitor	Seleccionado	Seleccionado	Seleccionado
Anticuerpo (primario)	16 minutos, 36 °C	16 minutos, 37 °C	28 minutos, 37 °C
OptiView HQ Linker	8 minutos (predeterminado)		
OptiView HRP Multimer	8 minutos (predeterminado)		
Contratinción	Hematoxylin II, 4 minutos		
Post-contratinción	Bluing, 4 minutos		

La desviación respecto a las condiciones recomendadas, especialmente para la recuperación antigénica, proporcionadas en el protocolo indicado puede invalidar los resultados esperados. No obstante, debido a las variaciones en la fijación y el procesado del tejido, así como a las condiciones generales de los equipos y del entorno del laboratorio, puede ser necesario aumentar o disminuir el tiempo de incubación del anticuerpo primario en función de las muestras individuales y de las preferencias del lector. Para obtener más información sobre las variables de fijación, consulte "Inmunohistoquímica: Principios y avances".³⁶

PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD

Control de reactivos negativo

Ventana Medical Systems, Inc. recomienda encarecidamente que se utilice un control de reactivos negativo para teñir una sección adyacente del tejido de muestra del paciente en un portaobjetos separado del portaobjetos teñido con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). Un anticuerpo monoclonal de ratón de control de reactivos negativo (Negative Control (Monoclonal) N.º Cat. 760-2014 / 05266670001) se recomienda para el uso en lugar del anticuerpo primario para evaluar la tinción no específica. El protocolo de tinción para el anticuerpo de control de reactivos negativo debe ser idéntico al del anticuerpo primario.

Control tisular positivo

Cada vez que se realice el procedimiento de tinción, debe procesarse un control positivo del tejido. La práctica de laboratorio óptima consiste en incluir una sección de control positivo en el mismo portaobjetos que el tejido del paciente. Esta práctica ayuda a identificar un fallo en la aplicación del anticuerpo primario o de otro reactivo esencial al portaobjetos de la prueba del paciente. Un tejido con una tinción positiva débil es más adecuada para un control de calidad óptimo. Los componentes de tinción positiva del tejido se utilizan para confirmar que el anticuerpo se ha aplicado y que el instrumento funciona correctamente. Este tejido puede contener componentes celulares/tisulares de tinción tanto positiva como negativa y ambos sirven como tejidos de control positivo y negativo. Los tejidos de control deben ser muestras frescas de autopsia, biopsia o cirugía preparadas o fijadas con la mayor brevedad posible mediante un proceso idéntico al de las secciones en estudio. Estos tejidos deben monitorizar todos los pasos del procedimiento, desde la preparación del tejido a su tinción. El uso de un corte de tejido fijado o procesamiento de forma diferente a la muestra en estudio permitirá el control de todos los reactivos y pasos del método excepto la fijación y el procesamiento del tejido.

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

Un control de tejido positivo adecuado sería un caso precalificado de CRC que sea positivo para el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). El control de tejido positivo debe mostrar tinción citoplasmática de cualquier intensidad en células tumorales viables sobre el fondo.

Farm. AMIRANAJDALANI
PRODUCTOS ROCHE S.A. Q.e.I.
DIVISIÓN DIAGNÓSTICA
COORDINADORA TÉCNICA



Control negativo de tejido

Un control de tejido negativo sería un caso precualificado de CRC que sea negativo con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). El control de tejido negativo se usará solo para controlar el comportamiento correcto de los tejidos procesados, los reactivos de prueba y los instrumentos, y no como ayuda para formular un diagnóstico específico para las muestras del paciente.

Verificación del ensayo

Antes del uso inicial de un anticuerpo o sistema de tinción en un procedimiento de diagnóstico, se debe verificar la especificidad del reactivo realizando pruebas sobre una serie de tejidos con características de rendimiento IHC conocidas que representen tejidos positivos y negativos para la mutación de BRAF V600E. (Consulte los Procedimientos de control de calidad anteriormente descritos en esta sección del prospecto del producto y las recomendaciones sobre Control de calidad del College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist³⁷ o las CLSI Approved Guideline.³⁸)

INTERPRETACIÓN DE LAS TINCIONES Y RESULTADOS PREVISTOS

El patrón de tinción celular para el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) es citoplasmático en células tumorales. Un patólogo experimentado asignará al CRC teñido con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) un Estado clínico basado en su evaluación de la presencia o la ausencia de tinción citoplasmática específica en el tumor. Se asigna un Estado clínico de Positivo a los casos con tinción citoplasmática inequívoca de cualquier intensidad en células tumorales viables sobre el fondo. Se asigna un Estado clínico de Negativo a los casos sin tinción o con tinción citoplasmática equívoca en células tumorales viables. La tinción nuclear, la tinción de débil a fuerte de células tumorales viables aisladas y/o grupos de tumores debe considerarse negativa.

LIMITACIONES ESPECÍFICAS

Ventana Medical Systems, Inc. suministra anticuerpos y reactivos a una dilución óptima para su uso, siempre que se sigan las instrucciones proporcionadas. La desviación del protocolo indicado en la tinción es desconocida y puede invalidar los resultados esperados. Se advierte a los usuarios contra el uso de tampones ácidos para la recuperación antigénica ya que estos tampones pueden dar como resultado una tinción insuficiente que es difícil de interpretar.³⁹ Los usuarios que se desvíen del protocolo indicado deben aceptar la responsabilidad por la interpretación de los resultados de los pacientes.

Las muestras de tejido deben fijarse en las 2 horas siguientes a la recogida, durante al menos 12 horas con formol tamponado neutro al 10 %. Se recomienda no fijar tejidos con alcohol al 95%, fijador PREFER, fijador Z-5 o alcohol, formol y ácido acético (AFA).

Los casos teñidos con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) se categorizan como Positivo o Negativo según la presencia o ausencia de tinción en toda el área del tumor. La tinción puede variar en el nivel de intensidad y esta intensidad puede variar en diferentes partes del tumor; no obstante, esto no afecta al Estado clínico de BRAF V600E. Algunos casos pueden ser especialmente difíciles debido a los siguientes problemas:

- Se ha detectado que el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) muestra ocasionalmente tinción citoplasmática débil y tinción nuclear en el músculo liso, células de Purkinje del cerebelo, células epiteliales de colon normal, enterocitos, células intersticiales de los testículos, glándula suprarrenal, glándula pituitaria, estructuras acinares del páncreas, células glandulares del intestino y algunas células tumorales; no obstante, tales casos no deben considerarse positivos para BRAF V600E.⁴⁰ Además, este anticuerpo mostró tinción moderada en células neuroendocrinas en la hipófisis. Además, este anticuerpo también tiñe los cilios del pulmón.
- Fondo no específico: Algunas muestras pueden presentar tinción de fondo no específica por razones que no se comprenden bien. Por este motivo, la evaluación de un portaobjetos teñido con anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) debe incluir una comparación del portaobjetos con el portaobjetos de control de reactivos negativo para determinar el nivel de tinción del fondo no específica. A veces, se observa tinción de los núcleos en células tumorales; sin embargo no se conoce el significado que tiene.
- Tejido o artefactos de tinción: Los artefactos histológicos resultantes del procesamiento de la muestra y los procesos de microtomía también pueden completar la determinación del Estado clínico del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). Estos artefactos pueden incluir, entre otros, gradientes de fijación y efectos de borde, bloqueo de DAB, burbujas en el núcleo, ausencia de tinción en algunas regiones del

tejido, ruptura o pliegue del tejido, y pérdida de la sección de tejido. En algunos casos puede ser necesario repetir la tinción de nuevos cortes o tomar una muestra nueva.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO DEL ANTICUERPO VENTANA ANTI-BRAF V600E (VE1)

Sensibilidad/Especificidad analíticas

La sensibilidad y la especificidad analíticas se determinaron mediante tinción de múltiples casos de tejido humano normal y neoplásico con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). Los resultados se indican en la Tabla 2 y en la Tabla 3. No se observó tinción inesperada con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) en tejidos normales y neoplásicos, con las excepciones indicadas en la sección LIMITACIONES ESPECÍFICAS.

Tabla 2. Sensibilidad/Especificidad analíticas de la tinción con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) en tejidos FFPE normales

Tejido	N.º de casos positivos / total	Tejido	N.º de casos positivos / total
Glándula suprarrenal	0/3	Pulmón	0/3
Vejiga	0/3	Ganglio linfático	0/3
Médula ósea	0/3	Mesotelio	0/3
Ovario	0/3	Páncreas	2/3*
Mama	0/3	Glándula paratiroides	0/3
Cerebelo	1/3*	Nervio periférico	0/5
Telencéfalo	0/3	Próstata	0/3
Cuello uterino	0/3	Músculo esquelético	0/3
Colon	5/12*	Piel	0/3
Endometrio	0/3	Bazo	0/3
Esófago	0/3	Estómago	0/3
Corazón	0/3	Testículo	2/3*
Hipófisis	3/3**	Timo	0/3
Intestino	2/4*	Tiroides	0/3
Riñón	0/3	Lengua/Glándula salival	0/3
Hígado	0/3	Amígdala	0/3

Nota: *Tinción citoplasmática débil y tinción nuclear en células de Purkinje del cerebelo, músculo liso y células epiteliales de colon normal, células glandulares del intestino, estructuras acinares del páncreas y células intersticiales de los testículos.

**Tinción moderada observada en células neuroendocrinas en la hipófisis.

Para todos los tejidos, se determinó tinción positiva/negativa para elementos específicos del tejido y tales casos no deben considerarse positivos para el Estado clínico de BRAF V600E.¹⁶

Tabla 3. Sensibilidad/Especificidad analíticas de la tinción con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) en una variedad de tejidos FFPE neoplásicos.

Patología	N.º de casos positivos / total
Glioblastoma (cerebro)	0/1
Meningioma (cerebro)	0/1
Ependimoma (cerebro)	0/1

Farm. AMIR NAJDALANI
PRODUCTOS ROCHE S.A. Q.E.I.
DIVISION DIAGNÓSTICA
COORDINADORA TÉCNICA

Forma ANÁLISIS MAJALANI
 PRODUCTOS ROCHE S.A. de I.
 DIAGNÓSTICA
 TECNICA

1015767ES Rev B

5 / 9

2018-01-31
 FT0700-410m

Nota: Los intervalos de confianza del 95 % se calcularon utilizando el método de puntuación de Wilson.

Repetibilidad/ Estado clínico	Tipo	n/N	%	IC del 95 %	Repetibilidad/ Estado clínico		
					Positivo	Negativo	Total
Acuerdo	Positivo	25/25	100.0	(86.7; 100.0)	PPA	100.0	100.0
	Negativo	25/25	100.0	(86.7; 100.0)	NPA	100.0	100.0
	Total	50/50	100.0	(82.9; 100.0)	OPA	100.0	100.0
	Positivo	50/50	100.0	(82.9; 100.0)	PPA	100.0	100.0
	Negativo	50/50	100.0	(82.9; 100.0)	NPA	100.0	100.0
	Total	100/100	100.0	(96.3; 100.0)	OPA	100.0	100.0

Tabla 4. Repetibilidad intradía y precisión interdía del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) medidas por el Estado clínico (Positivo/Negativo)

La repetibilidad intradía se evaluó utilizando 10 muestras de CRC (5 de Positivo y 5 de Negativo) para el Estado clínico de BRAF V600E. Se hicieron cinco portabjeltos duplicados de cada una de las muestras de CRC con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) en un solo instrumento Benchmark ULTRA en un mismo día. Cada portabjeltos teñido con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) se emparejó con un portabjeltos teñido de control de reactivos negativo del mismo caso. Un solo patólogo, para el que se enmascaró el diagnóstico del caso, aleatorizó y posteriormente evaluó todos los portabjeltos como Positivo o Negativo.

La precisión interdía se evaluó también utilizando 10 muestras de CRC (5 de Positivo y 5 de Negativo) para el Estado clínico de BRAF V600E. Se hicieron portabjeltos duplicados de cada una de las muestras de CRC con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) en un instrumento Benchmark ULTRA durante 5 días no consecutivos. Además, se teñió un único portabjeltos de cada caso con el control de reactivos negativo. Cada portabjeltos teñido con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) se emparejó con un portabjeltos teñido de control de reactivos negativo del mismo caso. Un solo patólogo, para el que se enmascaró el diagnóstico del caso, aleatorizó y posteriormente evaluó todos los portabjeltos como Positivo o Negativo.

Ninguno de los portabjeltos teñidos con el control de reactivos negativo mostró tinción específica, y la tinción de fondo fue ≤ 0.5 . Utilizando datos agrupados de todos los emparejamientos posibles, los estudios tanto de repetibilidad intradía como de precisión interdía demostraron un acuerdo de porcentaje positivo del 100 % (PPA), un acuerdo de porcentaje negativo del 100 % (NPA) y un acuerdo de porcentaje global del 100 % (OPA). En la Tabla 4 se resumen los resultados.

Repetibilidad intradía y precisión interdía

Patología	N.º de casos positivos / total
Neuroblastoma (retroperitoneo)	0/1
Mesotelioma (peritoneo)	0/1
Linfoma de células B NOS (ganglio linfático)	0/2
Linfoma de Hodgkin (ganglio linfático)	1/1
Carcinoma de células transicionales (vejiga)	0/1
Leiomiomasarcoma (vejiga)	0/1
Osteosarcoma	0/1
Rabdomiomasarcoma de células fusiformes (peritoneo)	0/1
Leiomiomasarcoma (músculo liso)	0/1

Patología	N.º de casos positivos / total
Oligodendroglioma (cerebro)	0/1
Adenocarcinoma seroso (ovario)	0/1
Adenocarcinoma (ovario)	0/1
Neoplasia neuroendocrina pancreática (páncreas)	0/1
Seminoma (testículos)	0/2
Carcinoma medular (Tiroides)	0/1
Carcinoma papilar (Tiroides)	21/28
Carcinoma ductal in situ (mama)	0/1
Carcinoma ductal microinvasivo (mama)	0/1
Carcinoma ductal invasivo (mama)	3/131
Linfoma de linfocitos B, NOS (bazo)	0/1
Adenocarcinoma (pulmón)	1/73
Carcinoma de células pequeñas (pulmón)	0/7
Carcinoma de células escamosas (pulmón)	0/90
Carcinoma neuroendocrino (esófago)	0/1
Adenocarcinoma (esófago)	0/1
Carcinoma en anillo de sello (estómago)	0/1
Adenocarcinoma (intestino delgado)	0/1
Sarcoma estromal (intestino delgado)	1/1
Adenocarcinoma (colon)	64/234
Tumor estromal gastrointestinal (GIST) (colon)	0/1
Adenocarcinoma (recto)	0/1
Tumor estromal gastrointestinal (GIST) (recto)	0/1
Melanoma (recto)	0/1
Carcinoma hepatocelular (hígado)	0/1
Hepatoblastoma (hígado)	0/1
Carcinoma de células claras (riñón)	0/1
Adenocarcinoma (próstata)	0/2
Leiomioma (útero)	0/0
Adenocarcinoma (útero)	0/1
Carcinoma de células claras (útero)	0/1
Carcinoma de células escamosas (cuello uterino)	0/2
Rabdomiomasarcoma embriónico (músculo estrado)	0/1
Melanoma maligno	10/24
Carcinoma de células basales (piel)	0/1
Carcinoma de células escamosas (piel)	0/1
Neurofibroma (lumbal)	0/0



HERRERA MORALES
 PRODUCTOS S.A. Q.E.
 COMERCIALIZADORA
 TECNICA

Se evaluó la precisión intra e inter lectores en 20 CRC (10 casos positivos para mutación de BRAF V600E y 10 casos negativos para mutación de BRAF V600E) teñidos con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) utilizando el OptView DAB IHC Detección

Estudios de precisión de lectores

Se realizaron comparaciones por pares del Estado clínico para un total de 228 muestras (177 CRC, 27 cánceres de tiroides y 24 melanomas) entre GX con ULTRA y XT con Benchmark GX con XT, se realizaron comparaciones por pares de un total de 230 muestras (179 CRC, 27 cánceres de tiroides y 24 melanomas) entre plataformas Benchmark GX con XT, se realizó un APA del 98,4 % y OPA del 97,8 %. Para ULTRA demostró un APA del 98,6 %, ANA del 98,4 % y OPA del 97,8 %. Para Benchmark GX con XT, acuerdo negativo medio (ANA) del 99,0 % y OPA del 98,7 %, Benchmark XT con ULTRA, Benchmark GX con ULTRA demostró un acuerdo positivo medio (APA) del 98,0 %, acuerdo negativo medio (ANA) del 99,0 % y OPA del 98,7 %. Para Se realizaron comparaciones por pares del Estado clínico para un total de 228 muestras (177 CRC, 27 cánceres de tiroides y 24 melanomas) entre GX con ULTRA y XT con Benchmark GX con XT, se realizaron comparaciones por pares de un total de 230 muestras (179 CRC, 27 cánceres de tiroides y 24 melanomas) entre plataformas Benchmark GX con XT, se realizó un APA del 98,4 % y OPA del 97,8 %. Para ULTRA demostró un APA del 98,6 %, ANA del 98,4 % y OPA del 97,8 %. Para Benchmark GX con XT, acuerdo negativo medio (ANA) del 99,0 % y OPA del 98,7 %, Benchmark XT con ULTRA, Benchmark GX con ULTRA demostró un acuerdo positivo medio (APA) del 98,0 %, acuerdo negativo medio (ANA) del 99,0 % y OPA del 98,7 %. Para

Concordancia de plataforma Benchmark

La concordancia entre los instrumentos Benchmark ULTRA, XT y GX para el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) se determinó teniendo muestras de CRC, cáncer de tiroides y melanoma con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) utilizando el OptView DAB IHC Detección Kit. Todos los portabojos fueron evaluados para determinar el Estado clínico (Positivo/Negativo) por un solo patólogo. Se realizaron comparaciones por pares del Estado clínico para un total de 228 muestras (177 CRC, 27 cánceres de tiroides y 24 melanomas) entre GX con ULTRA y XT con Benchmark GX con XT, se realizaron comparaciones por pares de un total de 230 muestras (179 CRC, 27 cánceres de tiroides y 24 melanomas) entre plataformas Benchmark GX con XT, se realizó un APA del 98,4 % y OPA del 97,8 %. Para ULTRA demostró un APA del 98,6 %, ANA del 98,4 % y OPA del 97,8 %. Para Benchmark GX con XT, acuerdo negativo medio (ANA) del 99,0 % y OPA del 98,7 %, Benchmark XT con ULTRA, Benchmark GX con ULTRA demostró un acuerdo positivo medio (APA) del 98,0 %, acuerdo negativo medio (ANA) del 99,0 % y OPA del 98,7 %. Para

Nota: Los intervalos de confianza del 95 % se calcularon utilizando el método de puntuación de Wilson.

Precisión	Estado clínico	Entre instrumentos		
		Positivo	Negativo	Total
IC del 95 %	%	30/30	100,0	(88,6;100,0)
		30/30	100,0	(88,6;100,0)
Tipo	n/N	PPA	100,0	(94,0;100,0)
		NPA	100,0	(88,6;100,0)
Acuerdo	%	30/30	100,0	(94,0;100,0)
		60/60	100,0	(94,0;100,0)

Además, la precisión entre instrumentos del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) se determinó teniendo portabojos duplicados de 6 muestras de CRC BRAF V600E) en 3 instrumentos Benchmark XT y 3 Benchmark GX con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) utilizando el OptView DAB IHC Detección Kit. Se realizaron 15 observaciones por caso al agrupar los 3 instrumentos, y se determinó la mediana para cada caso de estas 15 observaciones. Las observaciones individuales de ese mismo caso se consideraron concordantes con la intensidad de la señal del caso mediano si estaban dentro de la intensidad de señal de 0,5. Para la precisión entre instrumentos Benchmark XT y Benchmark GX, se realizaron comparaciones por pares de puntuaciones de intensidad de la tinción del tumor de cada muestra y se demostró un acuerdo de 98,9% entre los 3 instrumentos Benchmark XT y OPA del 100 % entre los 3 instrumentos Benchmark GX. Ninguno de los portabojos teñidos con el control de reactivos negativo mostró tinción específica, y la tinción de fondo fue $\leq 0,5$ tanto en instrumentos Benchmark XT como en instrumentos GX.

Precisión entre instrumentos Benchmark

La precisión entre instrumentos Benchmark ULTRA del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) se determinó teniendo portabojos duplicados de 10 muestras de CRC (5 de Positivo y 5 de Negativo) para el Estado clínico de BRAF V600E (VE1) utilizando el OptView DAB IHC Detección Kit. Además, se teñó un único portabojos de cada caso con un control de reactivo negativo.

Precisión entre lotes

La precisión entre lotes del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) se determinó probando 3 lotes de producción del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), cada uno de ellos en portabojos triplicados de 10 casos de CRC (5 de Positivo y 5 de Negativo) para la mutación de BRAF V600E en un instrumento Benchmark ULTRA utilizando el OptView DAB IHC Detección Kit. Cada portabojos teñido con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) se emparejó con un portabojos teñido de control de reactivos negativo del mismo caso. Todos los pares de portabojos fueron aleatorizados y evaluados por un solo patólogo, para el que se enmascaró el diagnóstico del caso y el número de lote del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). Ninguno de los portabojos teñidos con el control de reactivos negativo mostró tinción específica, y la tinción de fondo fue $\leq 0,5$. Para la precisión entre lotes del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), el Estado clínico de BRAF V600E obtenido de la evaluación de cada portabojos se comparó con el estado de un caso modal para ese caso. El OPA, PPA y NPA para los lotes de anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) fue del 100 % para el estado, demostrando que la tinción del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) es reproducible en todos los lotes de anticuerpo.

Nota: Para la precisión intra lectores, los IC del 95 % de APA y ANA se calcularon utilizando el método basado en Clopper-Pearson, el IC del 95 % de OPA se calculó utilizando el método bootstrap para determinación de percentiles. Para la precisión entre lectores, los IC del 95 % se calcularon utilizando el método de puntuación de Wilson.

Precisión	Estado clínico	Tipo	n/N	%	IC del 95 %
Acuerdo	%	60/60	100,0	(93,9;100,0)	%
		60/60	100,0	(93,9;100,0)	
Intra lector	%	60/60	100,0	(93,9;100,0)	%
		60/60	100,0	(93,9;100,0)	
Entre lectores	%	60/60	100,0	(94,0;100,0)	%
		60/60	100,0	(94,0;100,0)	
Total	%	60/60	100,0	(96,9;100,0)	%
		60/60	100,0	(96,9;100,0)	

Tabla 6. Precisión intra e inter lectores del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) en casos de CRC medida por Estado clínico de BRAF V600E (Positivo/Negativo)

La precisión entre lectores se comparó todas las evaluaciones de portabojos (20 CRC x 2 evaluaciones/casos x 3 patólogos = 120 evaluaciones de portabojos) con un estado de caso modal para cada caso de CRC. Los resultados demuestran PPA, NPA y OPA del 100 % para la precisión entre lectores. En la Tabla 6 se resumen los resultados.

La precisión intra lectores se comparó las evaluaciones de los portabojos iniciales y finales de un solo patólogo, proporcionando 20 comparaciones de secciones de CRC por patólogo. Se agruparon las comparaciones de 3 patólogos y demostraron APA del 100 %, ANA del 100 % y acuerdo de porcentaje global (OPA) del 100 % para la precisión intra lectores. En la Tabla 6 se resumen los resultados.

La precisión entre lectores se comparó todas las evaluaciones de portabojos (20 CRC x 2 evaluaciones/casos x 3 patólogos = 120 evaluaciones de portabojos) con un estado de caso modal para cada caso de CRC. Los resultados demuestran PPA, NPA y OPA del 100 % para la precisión entre lectores. En la Tabla 6 se resumen los resultados.

La precisión intra lectores se comparó las evaluaciones de los portabojos iniciales y finales de un solo patólogo, proporcionando 20 comparaciones de secciones de CRC por patólogo. Se agruparon las comparaciones de 3 patólogos y demostraron APA del 100 %, ANA del 100 % y acuerdo de porcentaje global (OPA) del 100 % para la precisión intra lectores. En la Tabla 6 se resumen los resultados.

La precisión entre lectores se comparó todas las evaluaciones de portabojos (20 CRC x 2 evaluaciones/casos x 3 patólogos = 120 evaluaciones de portabojos) con un estado de caso modal para cada caso de CRC. Los resultados demuestran PPA, NPA y OPA del 100 % para la precisión entre lectores. En la Tabla 6 se resumen los resultados.





Tabla 7. Precisión entre lotes del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) medida por el Estado clínico (Positivo/Negativo)

Precisión	Estado clínico	Acuerdo			
		Tipo	n/N	%	IC del 95 %
Entre lotes	Positivo	PPA	45/45	100,0	(92,1;100,0)
	Negativo	NPA	45/45	100,0	(92,1;100,0)
	Total	OPA	90/90	100,0	(95,9;100,0)

Nota: Los intervalos de confianza del 95 % se calcularon utilizando el método de puntuación de Wilson.

Estudio de reproducibilidad interlaboratorio

Se realizó un estudio de reproducibilidad entre laboratorios del VENTANA MMR IHC Panel para demostrar la reproducibilidad de cada ensayo VENTANA MMR IHC Panel a fin de determinar el Estado clínico. El estudio incluía 6 muestras de tejido CRC (3 de Intacto y 3 de Pérdida) para cada proteína MMR y 16 muestras de tejido CRC (8 Positiva y 8 Negativa) para BRAF V600E realizado en 3 instrumentos BenchMark ULTRA durante 5 días no consecutivos a lo largo de 21 días en tres laboratorios externos. Cada portaobjetos teñido con el anticuerpo se emparejó con un portaobjetos teñido con H&E y control de reactivos negativo del mismo caso. Todos los conjuntos de portaobjetos se aleatorizaron y evaluaron por un total de 6 lectores (2 lectores por centro) que se enmascararon al Estado clínico de MMR del conjunto de estudio. Se realizaron 30 observaciones de cada uno de los 40 casos del estudio en todos los días, centros y lectores. El estado de referencia del caso modal se obtuvo de cada caso sobre el estado más frecuentemente observados en las 30 observaciones. El estudio incluyó un total de 1200 observaciones para las cinco proteínas. Para todos los casos evaluables, el índice de aceptabilidad de morfología y fondo en estos estudios fue del 100 %. En la Tabla 8 se resumen los resultados de las estadísticas del acuerdo agrupadas (las cinco proteínas) entre el estado de referencia del caso modal y las observaciones individuales.

Tabla 8. Acuerdo entre el VENTANA MMR IHC Panel y el estado de referencia del caso modal

Reproducibilidad entre laboratorios	Estado clínico	Acuerdo			
		Tipo	n/N	%	IC del 95 %
Todas las proteínas	Intacto/Positivo	PPA	598/600	99,8	(98,7;100,0)
	Pérdida/Negativa	NPA	593/600	98,9	(97,4, 99,5)
	Total	OPA	1191/1200	99,4	(98,6, 99,7)

Nota: El Estado clínico se define como Intacto o Pérdida para la expresión de las proteínas MMR y Positiva o Negativa para la proteína BRAF V600E. Los IC del 95 % se calcularon utilizando un enfoque de modelo lineal generalizado (GLMM).

Además, se realizaron comparaciones por pares entre centros, entre días y entre lectores para el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). Para BRAF V600E, este conjunto de estudio incluía un total de 480 observaciones. En la Tabla 9 se resumen los resultados. Los datos indican reproducibilidad del ensayo en 5 días, 3 centros y 6 lectores.

Tabla 9. Índices de acuerdo por pares de reproducibilidad entre laboratorios para el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) medidos por el Estado clínico (Positivo o Negativo)

Reproducibilidad entre laboratorios	Acuerdo			
	Tipo	n/N	%	IC del 95 %
Entre centros (3 centros)	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)

Reproducibilidad entre laboratorios		Acuerdo			
		Tipo	n/N	%	IC del 95 %
Entre días (5 días no consecutivos)	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)
Entre lectores (2 patólogos por 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: Los intervalos de confianza del 95 % se calcularon utilizando el método bootstrap para la determinación de percentiles; en los casos en que la estimación en puntos fue del 100 %, se utilizó el método de puntuación de Wilson.

Estudio de precisión: Comparación del método de resultados VENTANA MMR IHC Panel con pruebas moleculares (secuenciación de DNA e hipermetilación del promotor MLH1)

Se llevó a cabo un estudio para comparar el rendimiento del VENTANA MMR IHC Panel con las pruebas moleculares incluyendo un amplio panel de colon de secuenciación de DNA para la identificación de los CRC que (i) son deficientes en MMR (dMMR) y (ii) contienen la mutación de BRAF V600E. El panel de colon de secuenciación de DNA incluía análisis genómico de las variantes presentes en los genes MMR (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6, EPCAM), BRAF y otros genes importantes en la carcinogénesis (por ej., PIK3CA, KRAS, NRAS, ERBB2, etc.). La secuenciación incluía todos los exones, fragmentos intrónicos y secuencias complementarias así como grandes eliminaciones, duplicaciones y mosaicismo.

Para el estudio, se tiñeron casos de CRC secuenciales mediante H&E y se evaluaron las indicaciones de fijación y morfología adecuadas incluyendo la presencia de elementos celulares (células de control interno y tumorales). Se evaluó cada caso para determinar si la muestra contenía un mínimo de contenido de tumor del 50 % para proporcionar suficiente representación de células tumorales en la muestra como se recomienda para las pruebas moleculares. Tras la revisión, se incorporaron en el estudio 105 casos secuenciales que cumplieran estos criterios. Además, se incluyeron 13 casos de CRC que presentaban un Estado clínico de Pérdida por IHC para garantizar que la Pérdida de cada marcador estaba representada en el estudio. Se tiñeron secciones de tejido de todos los casos en el estudio mediante IHC con el VENTANA MMR IHC Panel y los controles de reactivos negativos adecuados. Se sometieron secciones de tejido adicionales al panel de colon de secuenciación de DNA. La hipermetilación del promotor MLH1 es uno de los mecanismos que pueden conducir a la pérdida de expresión de la proteína MLH1, y está vinculado a CRC esporádico en lugar de a un potencial diagnóstico de síndrome de Lynch. Por tanto, todos los casos de pérdida de MLH1 identificados mediante IHC en el estudio fueron probados para detectar hipermetilación del promotor MLH1.

En el conjunto de estudio final de 118 casos, el análisis incluía PPA y NPA para todos los marcadores agrupados (es decir, todas las observaciones agrupadas) donde las pruebas moleculares sirvieron como estado de referencia para la comparación IHC. El análisis incluía una comparación del estado de la proteína MMR (Intacto/Pérdida) con el estado molecular definido como Normal (sin mutación patogénica, negativo para hipermetilación del promotor MLH1 y BRAF de tipo salvaje (sin mutación V600E)) o Anómalo (presencia de mutación patogénica, positivo para hipermetilación del promotor MLH1 y/o positivo para la mutación de BRAF V600E). Las estimaciones en puntos fueron de PPA del 99,4 %, NPA del 93,5 % y OPA del 98,8 % como se muestra en la Tabla 10.

AMIR AJDALANI
FACTORY OF ROCHE S.A.Q.E.I.
LABORATORIO DIAGNÓSTICA
COLLEZIONE TÉCNICA

Se llevó también a cabo un análisis agrupado que comparaba los cuatro marcadores IHC MMR (sin el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) como los resultados de pruebas moleculares. Las estimaciones en puntos fueron de PPA del 99,3 %, NPA del 89,7 % y OPA del 98,5 % como se resume en la Tabla 11.

Un análisis adicional comparaba los resultados de los cuatro marcadores IHC de MMR con los resultados de las pruebas moleculares para los genes MMR a nivel de caso para incluir el estado de todos los marcadores y crear un resultado dMMR/pMMR para los dos métodos. Este análisis se muestra en la Tabla 12 y presenta un OPA del 97,4 % entre los dos métodos.

El estado de MMR IHC y el estado de MMR en pruebas moleculares se comparó además para los marcadores de MMR individuales dentro del estudio. El OPA de cada marcador de MMR, en comparación con los resultados combinados del panel de colon de secuenciación de DNA y la prueba de hipermetilación del promotor MLH1, fue del 100,0 % para el anticuerpo VENTANA anti-MLH1 (M1), 99,1 % para VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody, 98,3 % para VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody y 96,6 % para VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody.

El Estado clínico de BRAF V600E en los CRC obtenido mediante IHC utilizando el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) se comparó también con los resultados mutacionales de BRAF determinados mediante la secuenciación de DNA. El PPA, NPA y OPA en las pruebas IHC con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) utilizando la secuenciación de DNA como referencia fueron del 100 % (Tabla 13). Se realizaron pruebas adicionales para verificar la capacidad del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) para estratificar más casos de CRC que mostraban una pérdida de expresión de la proteína MLH1. De los 23 casos de BRAF V600E positivos, 20 casos presentaban pérdida de la proteína MLH1 por IHC y fueron positivos para hipermetilación del promotor *MLH1*. Estos datos son coherentes con la estrecha asociación existente entre el estado positivo de BRAF V600E y el estado de hipermetilación del promotor *MLH1*. Los tres casos restantes fueron pMMR (intacto para todas las proteínas MMR). Todas las muestras BRAF V600E positivas fueron identificadas como CRC esporádico. Los resultados verificaron que el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) identifica correctamente los CRC que presentan mutación de BRAF V600E. Los datos respaldaron además el uso del anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) para diferenciar entre CRC con síndrome de Lynch esporádico y probable en ausencia de la expresión de MLH1.

Tabla 10. Análisis agrupado para acuerdo de VENTANA MMR IHC Panel entre las pruebas IHC y moleculares

Estado* (Molecular/IHC)	Acuerdo			
	Tipo	n/N	%	IC del 95 %
Normal/Intacto	PPA	523/526	99,4	(98,7;100,0)
Anómalo/Pérdida	NPA	58/62	93,5	(87,1, 98,6)
Total	OPA	581/588	98,8	(98,0, 99,7)

*Para IHC, el estado de MMR es Intacto o Pérdida para la expresión de la proteína. Para este análisis, se incluyeron casos BRAF V600E negativos y positivos en las categorías Intacto o Pérdida, respectivamente. Las pruebas moleculares indican ausencia (Normal) o presencia (Anómalo) de posibles mutaciones patogénicas o hipermetilación del promotor *MLH1*. Los intervalos de confianza del 95 % se calcularon utilizando el método bootstrap para la determinación de percentiles.

Tabla 11. Análisis agrupado para cuatro marcadores de MMR (sin anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) Acuerdo entre pruebas IHC y moleculares

Estado* (Molecular/IHC)	Acuerdo			
	Tipo	n/N	%	IC del 95 %
Normal/Intacto	PPA	428/431	99,3	(98,4;100,0)
Anómalo/Pérdida	NPA	35/39	89,7	(79,4, 97,7)
Total	OPA	463/470	98,5	(97,3, 99,6)

*Para IHC, el estado es Intacto o Pérdida para la expresión de la proteína. Las pruebas moleculares indican ausencia (Normal) o presencia (Anómalo) de posibles mutaciones

patogénicas o hipermetilación del promotor *MLH1*. Los intervalos de confianza del 95 % se calcularon utilizando el método bootstrap para la determinación de percentiles.

Tabla 12. Acuerdo entre los cuatro marcadores mediante IHC de MMR y resultados de pruebas moleculares para el estado MMR (dMMR/pMMR)

Estado MMR*	Acuerdo			
	Tipo	n/N	%	IC del 95 %
pMMR	PPA	79/80	98,8	(93,3;99,8)
dMMR	NPA	35/37	94,6	(82,3, 98,5)
Total	OPA	114/117	97,4	(92,7, 99,1)

*Para IHC, el estado de pMMR para un caso se representa por el estado de Intacto para todas las proteínas MMR, mientras que el estado de dMMR se representa por Pérdida de una o varias proteínas MMR. Para las pruebas moleculares, el estado de pMMR se representa por la ausencia de mutaciones patogénicas o hipermetilación del promotor *MLH1*, mientras que el estado de dMMR se representa por la presencia de mutaciones patogénicas o hipermetilación del promotor *MLH1*. Los intervalos de confianza del 95 % se calcularon utilizando el método de puntuación de Wilson.

Tabla 13. Acuerdo entre IHC con el anticuerpo VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) y pruebas moleculares

BRAF V600E Estado (Molecular/IHC)	Acuerdo			
	Tipo	n/N	%	IC del 95 %
Positivo/Anómalo	PPA	23/23	100,0	(85,7, 100,0)
Negativo/Normal	NPA	95/95	100,0	(96,1, 100,0)
Total	OPA	118/118	100,0	(96,8, 100,0)

El estado de BRAF V600E se definió como Positivo o Negativo según los resultados de las pruebas IHC y Anómalo (presencia de la mutación V600E) o Normal (BRAF de tipo salvaje) según los resultados de las pruebas moleculares. Los intervalos de confianza del 95 % se calcularon utilizando el método de puntuación de Wilson.

BIBLIOGRAFÍA

- Yuan L, Chi Y, Chen W, Chen X, Wei P, et al. Immunohistochemistry and microsatellite instability analysis in molecular subtyping of colorectal carcinoma based on mismatch repair competency. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(11):20988-21000.
- 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, Torrezaan GT, Ferreira JRO, Oliveira LP, Begnami M, et al. Germline Mutations in MLH1 Leading to Isolated Loss of PMS2 Expression in Lynch Syndrome: Implications for Diagnostics in the Clinic. *Am J Surg Pathol.* 2017;41(6):861-864.
- 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.

Farm. MAJALAN
PRODUTOS ROCHÉ S.A. Q.e.I.
CONDOMÍNIO DIAGNÓSTICA
CONSECTORA TÉCNICA



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:v73-80.
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. Rabinovitch A. The College of American Pathologists laboratory accreditation program. *Accreditation and Quality Assurance*. 2002;7(11):473-476.
38. CSLI. *Quality Assurance for Design Control and Implementation of Immunohistochemistry Assays: Approved Guideline-Second Edition*. CLSI document ILA28-A2 (ISBN 1-56238-745-6). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 2011.
39. 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.
40. 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.

PROPIEDAD INTELECTUAL

VENTANA, BENCHMARK, OPTIVIEW y el logotipo de VENTANA son marcas comerciales de Roche.

Todas las demás marcas comerciales pertenecen a sus respectivos propietarios.

© 2018 Ventana Medical Systems, Inc.

INFORMACIÓN DE CONTACTO



Ventana Medical Systems, Inc.
1910 E. Innovation Park Drive
Tucson, Arizona 85755
USA
+1 520 887 2155
+1 800 227 2155 (USA)



www.ventana.com



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany



FORMA MAJALANI
ROCHE S.A. Q. 1
DIAGNÓSTICA
TÉCNICA



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
2019 - Año de la Exportación

Hoja Adicional de Firmas
Anexo

Número:

Referencia: 3110-7573-18-0

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 12 pagina/s.

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE
Date: 2019.10.04 15:39:08 -03:00

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL
ELECTRONICA - GDE
Date: 2019.10.04 15:39:10 -03:00