



# Nachweis der *BRAF*-V600E-Mutation beim metastasierten kolorektalen Karzinom

## Ein QuIP-Ringversuch

Korinna Jöhrens<sup>1</sup> · Josephine Fischer<sup>2</sup> · Markus Möbs<sup>3</sup> · Klaus Junker<sup>4</sup> · Jutta Kirfel<sup>5</sup> · Sven Perner<sup>5</sup> · Silke Laßmann<sup>6</sup> · Martin Werner<sup>6</sup> · Vanessa Borgmann<sup>7</sup> · Hendrik Bläker<sup>8</sup> · Michael Hummel<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, TU Dresden, Dresden, Deutschland

<sup>2</sup>Qualitätssicherungs-Initiative Pathologie QuIP GmbH, Berlin, Deutschland

<sup>3</sup>Institut für Pathologie, Campus Charité Mitte, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Deutschland

<sup>4</sup>Zentrum für Pathologie, Klinikum Bremen-Mitte, Bremen, Deutschland

<sup>5</sup>Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Lübeck, Deutschland

<sup>6</sup>Institut für Klinische Pathologie, Universitätsklinikum Freiburg, Freiburg, Deutschland

<sup>7</sup>Institut für Pathologie und Neuropathologie, Universitätsklinikum Tübingen, Tübingen, Deutschland

<sup>8</sup>Universitätsklinikum Leipzig, Leipzig, Deutschland

### Zusammenfassung

Ringversuche sind ein wichtiges Instrument zur Qualitätssicherung. Dies betrifft in zunehmendem Maße auch die molekulare Diagnostik in der Pathologie, von deren Ergebnissen Therapieentscheidungen in der Präzisionsonkologie direkt abhängen. Beim metastasierten kolorektalen Karzinom (mKRR) stand bisher der Nachweis von *KRAS*- und *NRAS*-Mutationen im Vordergrund, deren Abwesenheit eine Therapie mit EGFR-blockierenden Antikörpern ermöglicht. Nun ist *BRAF* als weiterer prädiktiver Marker hinzugekommen, da mKRR Patienten mit einer *BRAF*-V600E-Mutation nach systemischer Vortherapie von einer Behandlung mit Encorafenib (einem *BRAF*-Inhibitor) in Kombination mit Cetuximab (Anti-EGFR-Antikörper) profitieren. Aufgrund der 2020 erfolgten Zulassung für diese Behandlung ist es wichtig, dass der diagnostische Nachweis einer *BRAF*-V600E-Mutation zuverlässig in den Pathologien durchgeführt werden kann. Daher wurde dieser Ringversuch durchgeführt, bei dem der Nachweis der *BRAF*-V600E-Mutation entweder mittels Immunhistochemie oder molekularer Verfahren erfolgen konnte. Die Ergebnisse des Ringversuchs belegen eindeutig, dass derzeit die molekulare *BRAF*-V600E-Bestimmung dem immunhistologischen Nachweis überlegen ist.

### Schlüsselwörter

Kolorektales Karzinom · Molekularpathologie · *BRAF* Mutation · Ringversuche · Präzisionsonkologie



QR-Code scannen & Beitrag online lesen

Das Kolorektalkarzinom ist eine der häufigsten bösartigen Tumorerkrankungen. Seit Juni 2020 steht mit der EMA-Zulassung von Encorafenib (*BRAF*-Inhibitor) in Kombination mit dem EGFR-blockierenden Antikörper Cetuximab erstmals eine chemotherapiefreie gezielte Therapieoption beim *BRAF*-V600E-mutierten metastasierten kolorektalen Karzinom zur Verfügung. Um die Qualität und Repro-

duzierbarkeit der *BRAF*-V600E-Testung in den pathologischen Einrichtungen zu überprüfen, wurde von der QuIP GmbH ein Ringversuch organisiert.

Das kolorektale Karzinom ist bei Frauen nach dem Mammakarzinom die zweithäufigste bösartige Tumorerkrankung, bei Männern die dritthäufigste nach Prostata- und Lungenkrebs und umfasst insgesamt

**Tab. 1** Zusammensetzung und Sollwerte des Probenmaterials

Fall-Nr.	Mutationsstatus		Alter <sup>a</sup> des Blocks (in Monaten)	Tumorzellgehalt (in %)	
				Erster Schnitt	Letzter Schnitt
1	2	V600E	133	80	70
2	5	V600E	133	60	70
3	4	WT	26	70	50
4	7	V600E	31	90	80
5	6	WT	24	70	90
6	1	V600E	26	70	90
7	8	V600E	10	80	80
8	10	WT	24	80	75
9	3	V600E	20	70	80
10	9	V600E	20	80	70

IHC Immunhistochemie  
<sup>a</sup>Das Alter des Blocks wurde berechnet als die Spanne zwischen der Erstbefundung des Blocks bis zum Beginn des Ringversuchs am 02.06.2020

**Tab. 2** Fallbezogene Ergebnisse: molekularer BRAF-V600E-Nachweis

Fall	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Positiv	42	42	1	42	0	42	42	0	42	42
Negativ	0	0	40	0	42	0	0	42	0	0
Nicht auswertbar	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

**Tab. 3** Ergebnisbezogene Auswertung und Punkte: molekularer BRAF-V600E-Nachweis

Anzahl der Teilnehmer	Richtig positiv	Richtig negativ	Falsch positiv	Falsch negativ	Nicht auswertbar	Punkte	Erfolg
40	7	3	0	0	0	20	Ja
1	7	2	0	0	1	19	Ja
1	7	2	1	0	0	18	Ja

fast 60.000 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland. Etwa 23.000 Darmkrebspatienten versterben jährlich an ihrer Erkrankung und das relative 5-Jahres-Überleben liegt bei Männern und Frauen bei etwa 60% ([9], Tab. 3.6.1) [11]. Die zielgerichtete biomarkergetriebene Therapie hat beim Kolorektalkarzinom schon vor über 10 Jahren mit dem Nachweis von KRAS-Mutationen begonnen und nimmt durch weitere Biomarker immer weiter an Bedeutung zu. Im Falle der Abwesenheit von RAS-Mutationen besteht die Möglichkeit mit der Blockade von EGFR, eine zielgerichtete Therapieoption verwenden zu können. Es ist auch schon längere Zeit bekannt, dass 8–12% der Kolorektalkarzinome mit einer BRAF-Mutation vergesellschaftet sind [3].

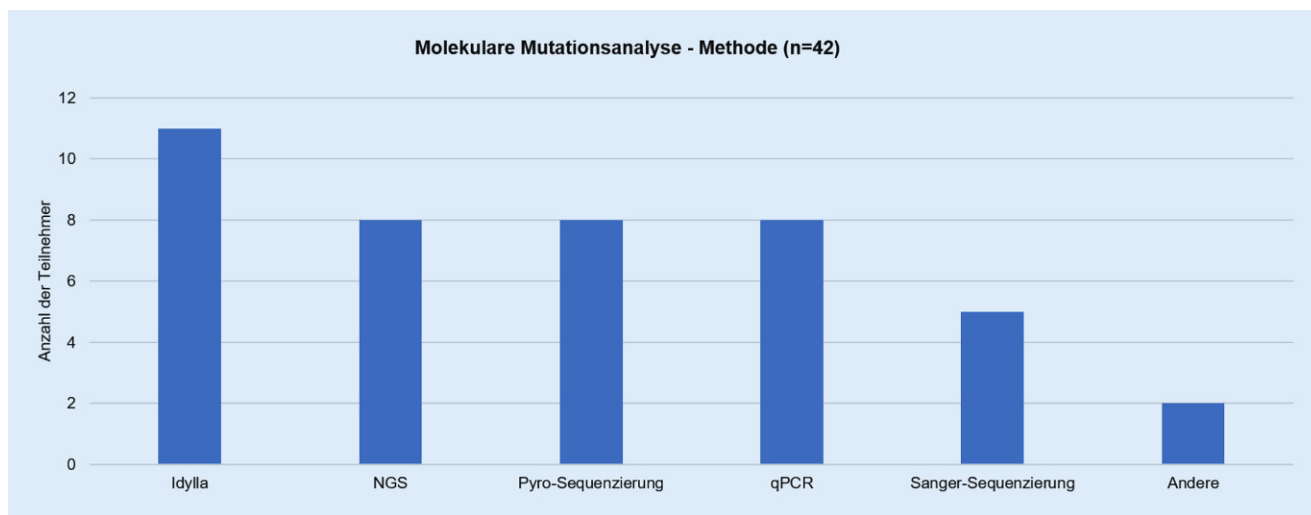
BRAF spielt eine wichtige Rolle im MAPK-Signalweg und ist damit an der Kontrolle und Steuerung des Zellwachstums entscheidend beteiligt. Während

dieser Prozess unter physiologischen Bedingungen sehr engmaschig kontrolliert abläuft, führen bestimmte BRAF-Veränderungen – wie die V600E-Mutation – zu einer konstitutiven Aktivierung der Kinaseaktivität, die nicht mehr der physiologischen Kontrolle unterliegt. Damit kann ein unkontrolliertes Zellwachstum entstehen und zur Pathogenese des metastasierten kolorektalen Karzinom (mKRK) beitragen [8]. Der weitaus größte Teil der BRAF-Mutationen finden sich beim mKRK an der Aminosäureposition 600 und bestehen im Austausch von Valin (V) durch Glutaminsäure (E). BRAF-Mutationen an anderen Positionen oder Ersatz des V600 durch eine andere Aminosäure finden beim mKRK nur sehr selten statt und haben in diesem Kontext nur untergeordnete Bedeutung [7, 12]. Das BRAF-mutierte mKRK selbst weist eine molekulare Heterogenität auf [2, 4]. Diese Heterogenität spiegelt sich auch in den 4 „consensus molecular subtypes“

(CMS) wider. BRAF-Mutationen finden sich zwar überwiegend in der Gruppe CMS1 („MSI immune“, 42%), treten aber auch in CMS2 („canonical“, 1%), CMS3 („metabolic“, 16%) und CMS4 (mesenchymal, 7%) auf. Es treten nur äußerst selten primäre BRAF-Mutationen zusammen mit KRAS-Mutationen auf [12].

Bei Vorliegen eines mikrosatelliteninstabilen mKRK zusammen mit einer BRAF-V600E-Mutation kann in der Erstlinie eine immunonkologische Therapie mit Pembrolizumab durchgeführt werden, die im Rezidivfall von einer Therapie mit Encorafenib und Cetuximab abgelöst werden kann (Fachinformation Keytruda® 2021, Fachinformation Braftovi® 2021). Jedoch existieren zum aktuellen Zeitpunkt noch keinerlei klinische Studien zur besten Therapieabfolge bezüglich dieser beiden Behandlungsprinzipien. Bei Patienten mit mikrosatellitenstabilem mKRK und einer BRAF-V600E-Mutation kommen gemäß Leitlinienempfehlung die kombinierte Behandlung aus klassischer Chemotherapie und zielgerichteter Behandlung in Betracht [1, 12]. Unabhängig vom Mikrosatellitenstatus kann die chemotherapiefreie Kombination aus Encorafenib und Cetuximab beim BRAF-V600E-mutierten mKRK generell nach systemischer Vortherapie (unabhängig davon, ob diese in adjuvanter oder palliativer Intention gegeben wurde) eingesetzt werden [6].

Seit Juni 2020 steht mit der EMA-Zulassung von Encorafenib in Kombination mit dem EGFR-blockierenden Antikörper Cetuximab auf der Basis der Studie BEACON CRC [5] erstmals eine chemotherapiefreie gezielte Therapieoption zur Verfügung. Durch die Zulassung der BRAF-V600E-Mutation als therapeutischen Marker beim mKRK findet diese Konstellation Eingang in das (molekular-)diagnostische Portfolio vieler Institute für Pathologie. Erfreulicherweise kann für den molekularen bzw. immunhistochemischen Nachweis der BRAF-V600E-Mutation auf zumeist umfangreiche Vorerfahrung bei malignen Melanomen zurückgegriffen werden [10].



**Abb. 1** ▲ Molekulare Methoden zur *BRAF*-V600E-Mutationsanalyse. NGS Next Generation Sequencing, qPCR quantitative Polymerase-Kettenreaktion

## Methodik

### Ringversuchsaufbau

Um die Qualität und Reproduzierbarkeit in den pathologischen Einrichtungen zu überprüfen, wurde von der QuIP GmbH ein Ringversuch organisiert, der den Nachweis der *BRAF*-V600E-Mutation auf Proteinebene mittels Immunhistochemie (IHC) mit einem Antikörper gegen V600E-mutiertes *BRAF* und zum Nachweis auf DNA-Ebene verschiedene molekulare Verfahren vorgesehen umfasste. Der hier beschriebene Ringversuch hat sich aufgrund der Ergebnisse klinischer Studien sowie der Vorgaben aus der Zulassung der EMA auf den Nachweis der *BRAF*-V600E-Mutation begrenzt.

### Interner Ringversuch

Das Lead-Institut (Charité Berlin) suchte aus ihrem Archiv insgesamt 15 Fälle von Kolorektalkarzinomen mit und ohne *BRAF*-V600E-Mutation heraus. Um die Eignung dieser Fälle für einen Ringversuch zu überprüfen, wurde ein interner Ringversuch, also eine dem offenen Ringversuch vorgeschaltete Testung des Probenmaterials durchgeführt. Die Organisation des internen Ringversuchs übernahm das Institut für Pathologie der Charité Berlin. Die erste Überprüfung der 15 ausgewählten Fälle übernahmen die Charité Berlin mittels molekularer Untersuchungen (Next Generati-

on Sequencing, NGS) und das kooperierende Lead-Institut (Universitätsklinikum Dresden) mittels IHC. Die Gegentestung mit molekularen Methoden wurde vom Klinikum Bremen-Mitte, dem Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, dem Universitätsklinikum Freiburg und dem Universitätsklinikum Tübingen übernommen. Hierfür wurden den 4 Panelinstituten je Fall 3 Leerschnitte á 4 µm zur Verfügung gestellt. Die Ergebnisse aus den molekularen Methoden waren aus allen 5 Instituten (Lead- und Panelinstitute) bei 14 Fällen konkordant, lediglich ein Fall konnte von einem Institut nicht ausgewertet werden. Die Gegentestung für den IHC-Teil übernahmen das Universitätsklinikum Freiburg und das Universitätsklinikum Leipzig. Den beiden Panelinstituten wurden je Fall 2 Leerschnitte á 4 µm zur Verfügung gestellt. Bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurden 11 Fälle gleich bewertet und 4 Fälle als Grenzfälle identifiziert. Als mögliche Ursache werden die unterschiedlichen Färbeprotokolle vermutet. Da die gleichen Fälle in der molekularen Untersuchung keine diskrepanten Ergebnisse zeigten und diese Fälle aus dem diagnostischen Alltag stammen, wurde ein heterogen bewerteter Fall in den offenen Ringversuch eingeschlossen. Die 10 für der Ringversuch ausgewählten Fälle wiesen einen Tumorzellgehalt von 50–90% auf und waren 10–133 Monate alt (■ Tab. 1).

### Offener Ringversuch

Die Teilnehmer erhielten 10 Fälle mit jeweils 2 Schnitte á 4 µm für den immunhistochemischen Ringversuch und 3 Schnitte á 4 µm für den molekularen Ringversuch. Die Teilnehmer hatten 28 Werktag Zeit, um die Analysen durchzuführen und die Ergebnisse online an die QuIP zurückzumelden. Für jeden richtig bewerteten Fall wurden 2 Punkte vergeben, sodass eine maximale Punktzahl von 20 erreicht werden konnte. Sofern die Ergebnisermittlung aufgrund technischer Probleme nicht möglich war, wurde ein Punkt für diesen Fall vergeben (diese Option war nur für einen Fall möglich). Für eine erfolgreiche Teilnahme mussten mindestens 18 Punkte (90%) erreicht werden. Von einer Teilnahme kann nur ausgegangen werden, wenn die pathologischen Einrichtungen Ihre Ergebnisse fristgerecht eingereicht haben. Insgesamt haben 51 Institute an diesem Ringversuch teilgenommen, wovon 42 Teilnehmer die *BRAF*-V600E-Mutationsuntersuchung mittels molekularer Verfahren und 9 Teilnehmer die IHC durchführten.

## Ergebnisse

### *BRAF*-V600E-Mutationsnachweis mittels molekularer Verfahren

Von insgesamt 42 Teilnehmern, die ein Ergebnis eingereicht haben, konnte allen 42 Teilnehmern (100%) eine erfolgreiche

<b>Tab. 4</b> Verwendete DNA-Extraktionskits				
Kategorie	Hersteller	Verwendetes DNA-Extraktionskit	Teilnehmer	Mit Erfolg (%)
Vollautomatisiert	Biocartis, Mecheln, Belgien	Idylla™ BRAF Mutation Assay	11	11 (100)
Labortechnische Einzelprozessierung	Analytik Jena GmbH, Jena, Deutschland	innuPREP FFPE DNA Kit-IPC16	1	1 (100)
	Promega GmbH, Waldorf, Deutschland	Maxwell 16 FFPE (Plus) LEV DNA Purification Kit	5	5 (100)
	Promega	Maxwell 16 LEV Blood DNA Kit	1	1 (100)
	Promega	Maxwell 16 LEV RNA FFPE Purification Kit	2	2 (100)
	Promega	Maxwell RSC DNA FFPE Kit	4	4 (100)
	Promega GmbH	ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System	1	1 (100)
	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit	4	4 (100)
	Qiagen	QIAamp DNA Micro Kit	3	3 (100)
	Qiagen	QIASymphony DSP DNA Mini Kit	1	1 (100)
	Qiagen	RNeasy FFPE Kit	2	2 (100)
	STRATIFYER Molecular Pathology GmbH, Köln, Deutschland	XTRAKT FFPE Kit	1	1 (100)
	Zymo Research, Irvine, USA	Quick-DNA™ FFPE Kit	1	1 (100)
	–	Andere	5	5 (100)

<b>Tab. 5</b> Eingesetzte Plattformen für den molekularen <i>BRAF</i> -V600E-Mutationsnachweis					
Kategorie	Methode	Hersteller	Plattform	Teilnehmer	Mit Erfolg (%)
Vollautomatisiert	–	Biocartis, Mecheln, Belgien	Idylla	11	11 (100)
Labortechnische Einzelprozessierung	NGS	Illumina, Berlin, Deutschland	Miniseq	1	1 (100)
		Illumina	MiSeq	2	2 (100)
		Illumina	NextSeq	1	1 (100)
		Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland	Ion GeneStudio S5	3	3 (100)
		Thermo Fisher	Ion Personal Genome Machine™ (PGM™)	1	1 (100)
	Pyrosequenzierung	Qiagen, Venlo, Niederlande	PyroMark	8	8 (100)
	qPCR	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	Stratagene Mx3005P	1	1 (100)
		Roche Diagnostics GmbH, Grenzach, Deutschland	LightCycler® 480	1	1 (100)
		Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland	7500 Real-Time PCR System	1	1 (100)
		Thermo Fisher	Arktik Thermal Cycler	1	1 (100)
		Thermo Fisher	Quant Studio	2	2 (100)
		ZytoMed Systems GmbH, Berlin, Deutschland	SLAN-96S	1	1 (100)
		–	Andere	1	1 (100)
		–	Andere	1	1 (100)
	Sanger-Sequenzierung	Thermo Fisher	Quant Studio	1	1 (100)
		Applied Biosystems, Waltham, USA	Genetic Analyzer 3500	1	1 (100)
		–	Andere	3	3 (100)
	HRMA, Sanger-Seq. & allelspez. PCR	Roche	LightCycler® 480	1	1 (100)
	Hybridisierung	–	Thermocycler und Wasserbad	1	1 (100)

**Tab. 6** Eingesetzte Kits bzw. Panels für den molekularen *BRAF*-V600E-Mutationsnachweis

Kategorie	Methode	Hersteller	Plattform	Teilnehmer
Vollautomatisiert	–	Biocartis, Mecheln, Belgien	Idylla™ BRAF Mutation Assay	11
Labortechnische Einzelprozessierung	NGS	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	Tumor Hotspot Panel	1
		Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland	QIAseq Human Actionable Solid Tumor Panel	1
		Qiagen	QIAseq Targeted DNA Custom Panel	1
		Thermo Fisher Scientific, Dreiech, Deutschland	Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2	1
		Thermo Fisher	Ion AmpliSeq™ Colon and Lung Cancer v2	1
		Thermo Fisher	OncoPrint Focus Assay	2
		–	Amplikon BRAF Exon 15	1
	Pyrosequenzierung	Qiagen	Therascreen BRAF Pyro Kit	4
		–	Laboratory Developed Tests (LDT)	4
	qPCR	Amoy Diagnostics, Xiamen, China	BRAF V600 Mutations Detection Kit	1
		EntroGen, Woodland Hills, USA	BRAF Mutation Analysis Kit II for Real-Time PCR	1
		Roche Diagnostics GmbH, Grenzach, Deutschland	BRAF/NRAS Mutation Test (LSR)	1
		Thermo Fisher	BRAF TaqMan® Mutation Detection Assays	1
		ViennaLab Diagnostics GmbH, Wien, Österreich	BRAF 600/601 StripAssay®	1
		–	Laboratory Developed Tests (LDT)	2
		–	Andere	1
		–	–	–
	Sanger-Sequenzierung	SCIEX, Framingham, USA	DTCS QUICK START KIT	1
		–	Laboratory Developed Tests (LDT)	2
		–	Andere	2
	HRMA, Sanger-Seq. & allelspez. PCR	–	Laboratory Developed Tests (LDT)	1
	Hybridisierung	Medipro (ViennaLab Diagnostics GmbH)	BRAF KIT	1

**Tab. 7** Fallbezogene Ergebniseinreichung der Teilnehmer

Fall	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Positiv	5	9	9	2	3	0	7	9	9	0
Negativ	4	0	0	7	6	9	1	0	0	9
Nicht auswertbar	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Teilnahme bescheinigt werden. Es gab keine Häufungen von „falschen“ Bewertungen der 10 Ringversuchsfälle (Tab. 2).

Von 420 ausgeführten Einzelanalysen waren 418 (99,5%) korrekt, ein Ergebnis (0,2%) war falsch positiv und eine Probe (0,2%) war technisch nicht auswertbar (Tab. 3). Die aus dem Ringversuch abgeleitete Sensitivität für die molekulare Analyse liegt damit bei 100,0% (294/294), die Spezifität bei 99,2% (124/125).

Die für den molekularen Ringversuch genutzten Methoden waren in 2 Hauptkategorien unterteilt (Tab. 4): 1) kommerzielles All-In-One-Testverfahren (11/42 Teil-

nehmern, 26,2%), welches vollautomatisiert Gewebeschnitte bis hin zum Ergebnis analysiert (Idylla System), und 2) labortechnische Einzelprozessierung der DNA-Extraktion gefolgt von weiteren molekularen Verfahren.

Die nach DNA-Extraktion verwendeten Methoden zum Nachweis einer *BRAF*-V600E-Mutation (Abb. 1) schlossen Parallelesequenzierung (NGS), Pyrosequenzierung, qPCR(quantitative Polymerase-Kettenreaktion)-Verfahren und Sangersequenzierung mit ein (Tab. 5).

Die Teilnehmer nutzen unterschiedliche Kits bzw. Panels sowie „laboratory de-

veloped tests“ (LDT) für den Nachweis der *BRAF*-V600E-Mutation (Tab. 6).

### *BRAF*-V600E-Mutationsnachweis mittels IHC

Von insgesamt 9 Teilnehmern, die ein Ergebnis eingereicht haben, konnte für 6 Teilnehmer (67%) eine erfolgreiche Teilnahme bescheinigt werden. Insbesondere bei den Fällen 1 und 5 (Tab. 7) gab es von den Referenzwerten abweichende Beurteilungen. Zur weiteren Klärung der diskrepanten Ergebnisse (technische Ebene/Färbung oder Interpretation) wurden alle Testsets

Tab. 8 Teilnehmerbezogene Vergabe der Punkte für den immunhistochemischen Nachweis der BRAF-V600E-Mutation							
Anzahl der Teilnehmer	Richtig positiv	Richtig negativ	Falsch positiv	Falsch negativ	Nicht auswertbar	Punkte	Erfolg
4	6	3	0	0	1	20	Ja
1	5	3	0	1	1	18	Ja
1	6	2	1	0	1	18	Ja
1	5	2	1	1	1	16	Nein
1	4	3	0	2	1	16	Nein
1	4	3	0	1	2	18	Nein

Tab. 9 Inkubationszeiten und Verdünnungen der BRAF-V600E-spezifischen Antikörper für die immunhistologischen Färbungen				
Teilnehmer	Erfolg	Antikörper	Inkubationszeit in min	Verdünnung
1	Ohne Erfolg	VE1 (Abcam, Cambridge, UK)	92	1:100 (10 µg/ml)
2	Ohne Erfolg	VE1 (Abcam)	60	1:100 (10 µg/ml)
3	Ohne Erfolg	VE1 (Abcam)	8	1:100 (10 µg/ml)
4	Mit Erfolg	VE1 (Abcam)	15	1:50 (20 µg/ml)
5	Mit Erfolg	VE1 (Abcam)	20	1:50 (20 µg/ml)
6	Mit Erfolg	VE1 (Roche Diagnostics GmbH, Grenzach, Deutschland)	32	Ready-to-use (12 µg/ml)
7	Mit Erfolg	VE1 (Roche)	32	Ready-to-use (12 µg/ml)
8	Mit Erfolg	VE1 (Roche)	16	Ready-to-use (12 µg/ml)
9	Mit Erfolg	Andere	15	1:100 (10 µg/ml)

mit den durch die Teilnehmer durchgeführten immunhistochemischen Färbungen zur Nachbegutachtung an das kooperierende Lead-Institut UK Dresden gesendet. Bei dem Fall 5 handelte es sich um den schwierigen Fall, der bereits im internen Ringversuch heterogen bewertet wurde. Aufgrund der interpretatorischen Schwierigkeiten wurde dieser Fall aus der Wertung ausgeschlossen, d. h. alle Teilnehmer bekamen hierfür die volle Punktzahl. Der Fall 1 blieb in der Wertung und war auch im Review eindeutig positiv. Zumeist war eine schwache Färbeintensität die Ursache für die Fehlbewertung durch die Teilnehmer.

Von 90 ausgeführten Einzelanalysen waren 73 (81,1 %) korrekt, 7 Einzelanalysen (7,8%) waren falsch und 10 (11,1 %) waren technisch nicht auswertbar (Tab. 8). Die Angaben zu Fall 5 zählen hierbei nicht als falsche Einzelanalysen, sondern wurden als nicht auswertbar gezählt. Die sich daraus ergebene Sensitivität für die IHC liegt bei 90,6% (48/53), die Spezifität bei 92,6% (25/27).

Für die Detektion der Proteinexpression des V600E-mutierten BRAFs verwendeten die Mehrzahl der Teilnehmer den Klon VE1 von Abcam (Cambridge, UK; 56 %) oder Roche Roche Diagnostics GmbH (Grenzach, Deutschland; 33 %). Die Inkubationszeiten variierten stark und lagen zwischen 9 und

92 min (Tab. 9). Auffallend ist, dass der Einsatz eines LTDs mit dem Klon VE1 von Abcam mit einer Verdünnung von 1:100 zu keiner erfolgreichen Teilnahme führte (Tab. 9, Abb. 2).

Die Teilnehmer verwendeten für die Detektion der V600E-mutierten BRAF-Proteinexpression das OptiView DAB IHC Detection Kit von Roche (56 %) oder das Bond Polymer Refine Detection Kit von Leica (Wetzlar, Deutschland; 44%; Abb. 3). Die teilnehmenden Institute färbten die Testschnitte am häufigsten mit dem VENTANA BenchMark ULTRA (5 Teilnehmer, 56 %), gefolgt von dem Bond-III von Leica (4 Teilnehmer, 44%; Abb. 4).

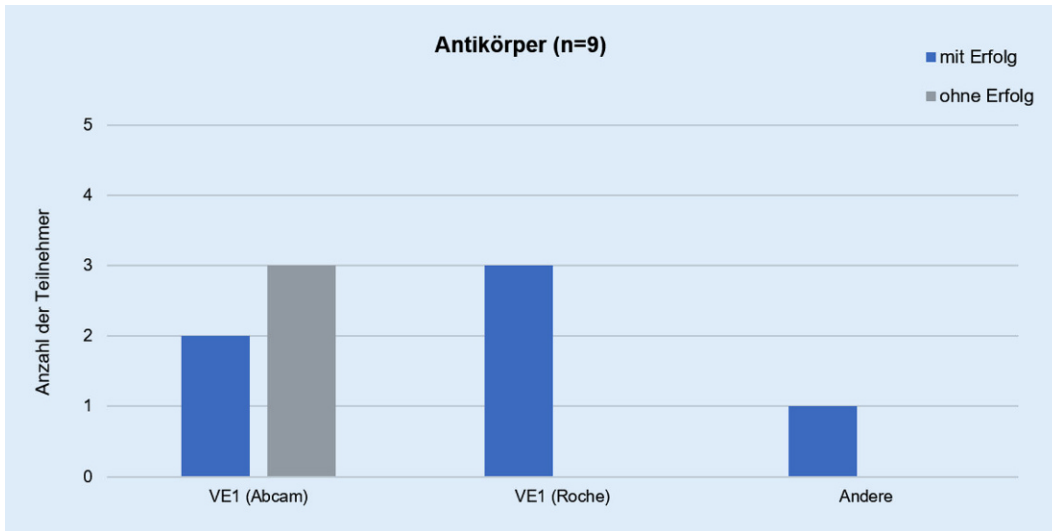
## Diskussion

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die überwiegende Teilnehmerzahl (42/51) sich für den molekularen Nachweis entschied und lediglich 9 Institute die Immunhistochemie durchgeführt haben. Die Teilnehmer des molekularen Ringversuchsteils für den BRAF-V600E-Mutationsnachweis haben trotz der großen Heterogenität der eingesetzten Verfahren (von vollautomatisierter Analyse [DNA + qPCR, „All-in-One“], DNA-Extraktion mit qPCR bis hin zu DNA-Extraktion mit PCRs und anschließender Sequenzierme-

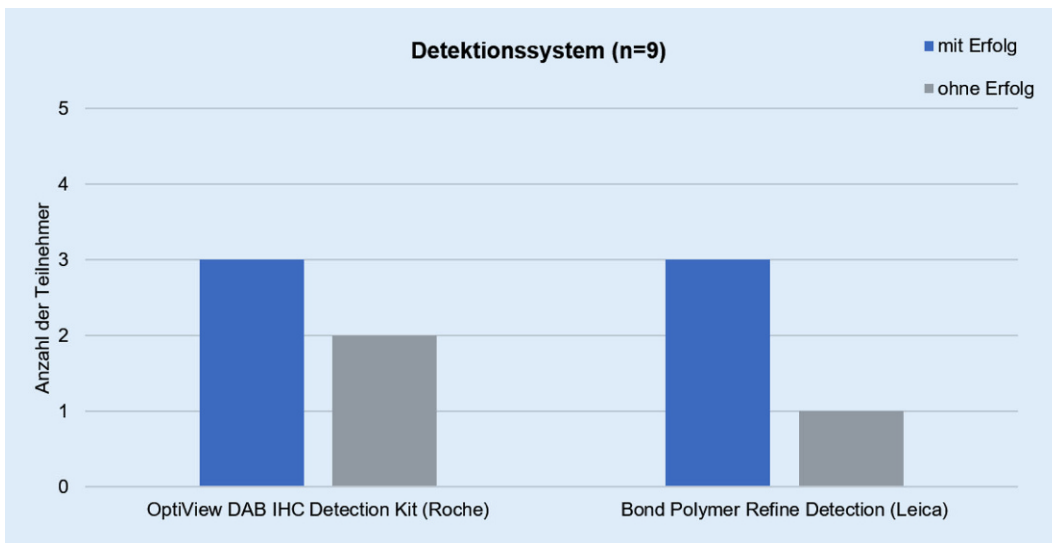
thoden) alle den Ringversuch erfolgreich durchlaufen. Im Gegensatz hierzu haben nur zwei Drittel der Teilnehmer, die Immunhistochemie zum Nachweis der BRAF-V600E-Mutation gewählt haben, den Ringversuch erfolgreich durchlaufen, obwohl ein Fall mit anspruchsvoller Interpretation nicht in die Bewertung eingeflossen ist. Ursache für die nicht erfolgreiche Teilnahme erscheint mehrheitlich eine Bewertung von geringen Färbeintensitäten zu sein. Da das Gewebeeingangsgut die Etablierung der immunhistochemischen Färbeprotokolle an einzelnen Standorten beeinflusst (z. B. Schnellprozessierung in der Fixierung, Nutzung von hauptsächlich kleinen Biopsaten) und für Ringversuche ältere, große Resektate verwendet werden, ist die schwächer ausgeprägte Färbeintensität der Ringversuchsteilnehmer ggf. hierauf zurückzuführen. Eine stets parallele Analyse eigener Gewebeproben (insbesondere die Gewebeproben der eigenen Etablierung/Validierung) mit den externen Ringversuchsproben im gleichen Färbelauf kann dies absichern.

## Fazit

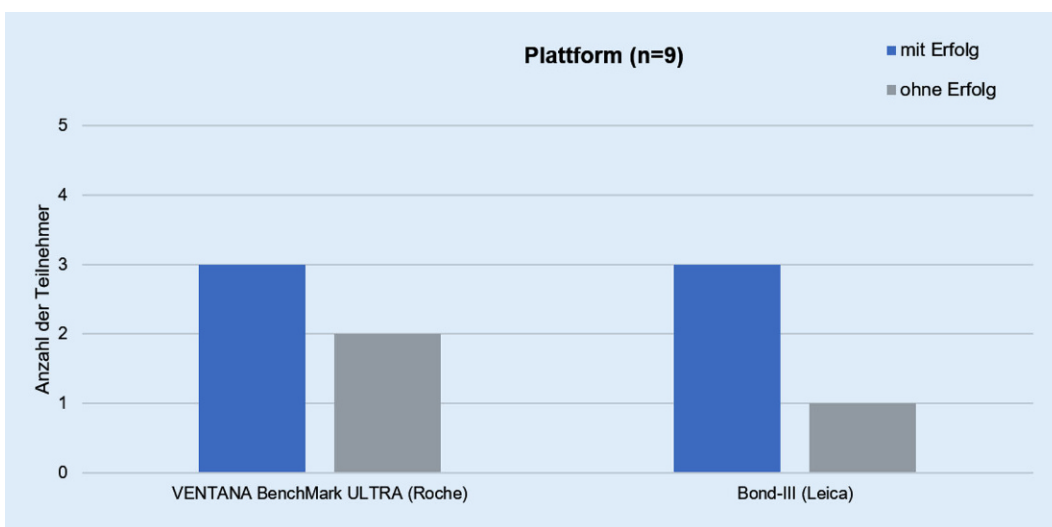
Die molekularen Nachweise der BRAF-V600E-Mutation sind in den pathologischen Instituten sehr gut etabliert und



**Abb. 2** ◀ Immunhistochemische Färbeverfahren und verwendete Antikörper



**Abb. 3** ◀ Immunhistochemische Detektionssysteme



**Abb. 4** ◀ Eingesetzte Immunfärbeautomaten

stellen eine äußerst zuverlässige Grundlage für Therapieempfehlungen mittels gezielter Behandlungsoptionen dar. Der Nachweis der *BRAF*-V600E-Mutation mittels Immunhistochemie neigt hingegen zu einer falsch negativen Bewertung von Ringversuchsgeweben und kann ggf. zum Ausschluss von Patienten führen, die aufgrund der immunhistochemisch nicht nachgewiesenen *BRAF*-V600E-Mutation einer entsprechenden Therapie nicht zugeführt werden würden. Daher stellen nach den Ergebnissen des hier beschriebenen *BRAF*-V600E-Ringversuchs die molekularen Methoden die Verfahren der Wahl für den Nachweis von *BRAF*-V600E-Mutationen in pathologischen Instituten als Grundlage für die Therapieentscheidungen dar. Die Immunhistochemie allein kann für die Therapieentscheidung nicht empfohlen werden.

#### Korrespondenzadresse

**Prof. Dr. rer. nat. Michael Hummel**  
Institut für Pathologie, Campus Charité Mitte,  
Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Virchowweg 15, 10117 Berlin, Deutschland  
michael.hummel@charite.de

**Danksagung.** Wir danken allen Teilnehmern des Ringversuchs, die diese Studie ermöglicht haben. Insbesondere danken wir Constanze Cieluch für die technische Umsetzung des Ringversuchs.

**Förderung.** Die Durchführung des Ringversuchs wurde von der Pierre Fabre Pharma GmbH unterstützt.

**Funding.** Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

#### Einhaltung ethischer Richtlinien

**Interessenkonflikt.** M. Möbs, J. Kirfel und V. Borgmann geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht. K. Jöhrens gibt folgenden Interessenkonflikt an: Referententätigkeit, Bildungsveranstaltungen und Adboards BMS, MSD, Roche Diagnostics, AstraZeneca, Agilent und Targos. H. Bläker gibt an, Bezahlung für Vorträge und für die Teilnahme an einem Beirat der Firma BMS erhalten zu haben. J. Fischer gibt an, dass die QulP GmbH Fördermittel für die Implementierung und Durchführung des Ringversuchs *BRAF* V600E Kolonkarzinom von Pierre Fabre Pharma GmbH erhalten hat. M. Hummel gibt an, Bezahlung oder Honorare für Vorträge, Präsentationen, Referententätigkeiten, Manuskripterstellung oder Bildungsveranstaltungen von den Firmen Novartis, BMS, AstraZeneca, Pierre Fabre, ThermoFisher und MSD erhalten zu haben. K. Junker gibt an, Bezahlung oder Honorare für Vorträge, Prä-

## Detection of *BRAF* V600E mutation in metastatic colorectal carcinoma. A QulP round robin test

Round robin testing is an important instrument for quality assurance. Increasingly, this also applies to the results of molecular diagnostics in pathology, which directly influence therapy decisions in precision oncology. In metastatic colorectal carcinoma (mCRC), the focus has been on detecting *KRAS* and *NRAS* mutations, whose absence allows therapy with EGFR blocking antibodies. Recently, *BRAF* has been added as another predictive marker, since mCRC patients with *BRAF* V600E mutation benefit significantly from treatment with encorafenib (a *BRAF* inhibitor) in combination with cetuximab (anti-EGFR antibody) after systemic therapy. Due to the approval of this treatment in 2020, it is a pre-requisite that *BRAF* V600E mutation detection in diagnostic pathologies is reliably performed. Therefore, this round robin test with *BRAF* V600E testing either by immunohistochemistry or molecular methods was performed. The round robin test results demonstrate that molecular *BRAF* V600E detection is currently clearly superior to immunohistochemical detection.

#### Keywords

Colorectal cancer · Molecular pathology · *BRAF* mutation · Round robin test · Precision oncology

sentationen, Referententätigkeiten, Manuskripterstellung oder Bildungsveranstaltungen von den Firmen Novartis, Roche und AstraZeneca sowie Unterstützung für die Teilnahme an Meetings und/oder Reisen und für die Teilnahme an einem Daten-Sicherheitsbeirat oder Beirat von den Firmen Novartis und Bristol Myers Squibb erhalten zu haben. S. Laßmann und M. Werner geben an, Fördermittel für die Beteiligung an der internen Testung als Panelinstitut von der QulP GmbH erhalten zu haben. S. Perner gibt an, Bezahlung oder Honorare für Beratungstätigkeiten, Expertenaussagen und für die Teilnahme an einem Daten-Sicherheitsbeirat oder Beirat von den Firmen Roche Diagnostics, Aignostics, MetaSystems, MSD, AstraZeneca, Molecular Health, Exact Sciences und CeGaT sowie für Vorträge, Präsentationen, Referententätigkeiten, Manuskripterstellung oder Bildungsveranstaltungen von den Firmen Roche Diagnostics, Novartis Pharma, Astellas Pharma, AstraZeneca, Bristol-Myers Squibb, MSD, Molecular Health, Bayer Oncology, Aignostics und Exact Sciences sowie Unterstützung für die Teilnahme an Meetings und/oder Reisen von den Firmen BMS, Roche Diagnostics und Roche Pharma erhalten zu haben.

Für diesen Beitrag wurden von den Autoren keine Studien an Menschen oder Tieren durchgeführt. Für die aufgeführten Studien gelten die jeweils dort angegebenen ethischen Richtlinien.

**Open Access.** Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden.

Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für

die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen.

Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

#### Literatur

1. AWMF S3-Leitlinie Kolorektalkarzinom 2019. [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/021-0070LI\\_S3\\_Kolorektales-Karzinom-KRK\\_2019-01.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/021-0070LI_S3_Kolorektales-Karzinom-KRK_2019-01.pdf)
2. Barras D, Missiaglia E, Wirapati P et al (2017) *BRAF* V600E mutant colorectal cancer subtypes based on gene expression. *Clin Cancer Res* 23(1):104–115
3. Davies H, Bignell GR, Cox C et al (2002) Mutations of the *BRAF* gene in human cancer. *Nature* 417(6892):949–954
4. Guinney J, Dienstmann R, Wang X et al (2015) The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* 21(11):1350–1356
5. Kopetz S, Grothey A, Yaeger R et al (2019) Encorafenib, binimetinib, and cetuximab in *BRAF* V600E-mutated colorectal cancer. *N Engl J Med* 381(17):1632–1643
6. Mauri G, Bonazzina E, Amato A et al (2021) The evolutionary landscape of treatment for *BRAF*V600E mutant metastatic colorectal cancer. *Cancers (Basel)* 13(1):137
7. McArthur GA, Chapman PB, Robert C et al (2014) Safety and efficacy of vemurafenib in *BRAF*V600E and *BRAF*V600K mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *Lancet Oncol* 15(3):323–332
8. Oikonomou E, Makrodouli E, Evagelidou M et al (2009) *BRAF*(V600E) efficient transformation and induction of microsatellite instability versus *KRAS*(G12V) induction of senescence markers in human colon cancer cells. *Neoplasia* 11(11):1116–1131
9. RKI (2019) Krebs in Deutschland für 2015/2016. [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_)



[2019/krebs\\_in\\_deutschland\\_2019.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](#)

10. Stadler R, Has C, Bruckner-Tuderman L (2018) Dermatologische Diagnostik: Suche nach dem molekularen „Fingerabdruck“. Dtsch Arztebl 115(20-21):26
11. Stintzing S, Heinemann V, Moosmann N et al (2009) The treatment of colorectal carcinoma with monoclonal antibodies: the importance of KRAS mutation analysis and EGFR status. Dtsch Arztebl Int 106(12):202–206
12. van Cutsem E, Cervantes A, Adam R et al (2016) ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. Ann Oncol 27(8):1386–1422



### Ich empfehle meinen Kolleginnen und Kollegen den Onlinekurs Geriatrie, weil ...



**Dr. med. univ. Markus Kerner**

Assistenzarzt im 2. Jahr  
Klinik für Innere Medizin 2, Schwerpunkt  
Geriatrie, Universitätsklinik Nürnberg

#### ... der Kurs perfekt für uns geeignet ist.

##### Das hat mich überzeugt!

Der Basiskurs Geriatrie ist perfekt geeignet, um sich klinisch relevantes Fachwissen für den ärztlichen Behandlungsalltag anzueignen. Die 16 Online-Module behandeln die wichtigsten Themen. Endlich gibt es einen Onlinekurs, der sich auf den geriatrischen Patienten fokussiert.

Das E-Learning ist didaktisch klug aufgebaut und im Design sehr ansprechend. Es gibt Fallbeispiele, Fragen zum Mitdenken, Merke- und Cave-Sätze und auch gute Erklärvideos, insgesamt ist alles kurz und knapp gehalten. Am Schluss kann ich mit einem Quiz meinen Wissensstand überprüfen: Macht richtig Spaß, sich durchzuklicken!

▶ [Mit diesem QR-Code zum Onlinekurs Geriatrie und zum kostenlosen Demokurs Frailty.](#)

