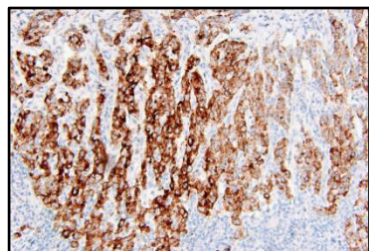


VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

REF 790-4794

06679072001

IVD  50



Figur 1. VENTANA anti-ALK (D5F3) analys av antikroppsuttryck på icke-småcelligt lungcancerom.

ANVÄNDNINGSSOMRÅDE

VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (VENTANA anti-ALK (D5F3)) är avsedd för laboratorieanvändning för detektion av det anaplastiska lymfomkinasprotein (ALK) i formalinfixerad, paraffinbäddad icke-småcelligt lungcanceromvävnad (NSCLC), som färgats med BenchMark IHC/ISH-instrumenten. Produkten är avsedd som ett hjälpmedel för att identifiera patienter som uppfyller kriterierna för behandling med

XALKORI® (crizotinib), ZYKADIA® (ceritinib), eller ALECENSA® (alectinib).

Denna produkt ska tolkas av en kvalificerad patolog och kombineras med en histologisk undersökning, relevant klinisk information och lämpliga kontroller.

Denna antikropp är avsedd för *in vitro*-diagnostisk användning (IVD).

SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

Det anaplastiska lymfomkinasprotein (ALK) tillhör insulinreceptorsuperfamiljen receptortyrosinkinaser.¹ ALK är ett membranglykoprotein av typ I som vanligtvis uttrycks i nervsystemet.² ALK-genen finns i kromosom 2p23 och består av 2 stora introner och 26 exoner.¹ Den molekylära patogenesen för ALK börjar med kromosomförändringar som går ihop med 3' kodningssekvenser för den ALK-intracellulära signaldomänen med 5' promotorelementen och kodningssekvenserna i andra gener. 5' promotorelementen och kodningssekvenserna driver överuttryck och de chimära proteinernas ligandoberoende oligomerisering, funktioner som är vanliga för de humana neoplasmerna i proteintyrosinkinaset av fusionstyp.

En inversion i kromosom 2p, som resulterade i bildningen av en fusionsgenprodukt bestående av delar av den ekinodermmikrotubulusassocierade proteinliknande 4-genen (EML4) och ALK-genen, upptäcktes 2007 i NSCLC-celler och arkiverade kliniska prover.³ En efterföljande serie av publicerade studier visade att EML4-ALK-inversionshändelser producerade minst 9 katalytiskt aktiva kinasfusionsproteinvarianter, där var och en bestod av samma delar av den ALK C-terminala kinasdomänen.⁴⁻⁸ Liksom vid ALK-genfusioner som först identifierades i anaplastiska storcelliga lymfom (ALCL), påvisades att EML4-ALK fusionsprotein hade transformerande aktivitet. I överensstämmelse med detta har EML4-ALK-uttrycket i alveolära epitelceller i lungorna på transgena möss rapporterats vara en potent onkogen faktor.⁹

KLINISK SIGNIFIKANS

Icke-småcelligt lungcancerom (NSCLC) är den vanligaste typen av lungcancer. Det finns tre vanliga typer av NSCLC: adenocarcinom, skivepitelcancerom och storcelligt cancerom.

ALK erkänns nu som en viktig onkogen drivkraft i NSCLC, och även om EML4 är den dominerande fusionspartnern, så har andra fusionspartner gener identifierats.^{10,11} Förekomsten av ALK-genförändringar tycks variera från 2-7 %, vilket innebär cirka 6 000 ALK-positiva patienter/år i USA och 40 000 patienter/år över hela jorden.^{3,4,7}

Små vävnadsprover kan lätt användas i rutinmässig immunhistokemi (IHC) och gör, tillsammans med antikroppar som upptäcker antigener som är viktiga för canceromtolkning, denna teknik till ett viktigt verktyg för patologen vid diagnos av och prognos av sjukdomen. ALK är en viktig markör i NSCLC.

Den stora majoriteten av ALK-genförändringar observerades i lungadenocarcinomprover jämfört med skivepitelcancer eller småcelliga histologier.³⁻⁸ Vissa bevis antyder en korrelation mellan ALK-genförändringar och NSCLC hos patienter som har rökarsstatus "aldrig eller lätt", men det här är eventuellt inte en statistiskt signifikant kofaktor.^{3,4,7,9} Viktigt nog sammanfaller ALK-genförändringar sällan med EGFR-, HER2- eller KRAS-mutationer, vilket visar att ALK-positivitet är en distinkt sjukdomssubtyp.⁹ XALKORI® är en selektiv ATP-kompetitiv småmolekylär hämmare av ALK, ROS1 och tyrosinkinaser för receptorn för hepatocytillväxsfaktor (c-Met/HGFr) och deras onkogena varianter (t.ex. ALK- eller ROS1-fusionsproteiner eller c-Met/HGFr-mutantvarianter). XALKORI® har visat koncentrationsberoende inhibering av ALK och c-Met-fosforylering i cellbaserade analyser med användning av tumörcellinjer. Det har också visat antitumöraktivitet hos möss med tumörxenografts som uttrycker EML4- eller NPM-ALK-fusionsproteiner eller Met.^{12,13,14}

ZYKADIA® är en kinashämmare. Mål för ZYKADIA®-inhibering identifierade i antingen biokemiska eller cellulära analyser vid kliniskt relevanta koncentrationer inkluderar ALK, insulinliknande tillväxsfaktor 1-receptor (IGF-1R), insulinreceptor (InsR) och ROS1. Bland dessa är ZYKADIA® mest aktiv mot ALK. ZYKADIA®-inhiberade autofosforylering av ALK, ALK-förmedlad fosforylering av nedströmssignaliserande proteinet STAT3 och proliferation av ALK-beroende cancerceller i *in vitro*- och *in vivo*-analyser.

ZYKADIA® inhiberade *in vitro*-proliferation av cellinjer som uttrycker EML4-ALK och NPM-ALK-fusionsproteiner och visade dosberoende inhibering av EML4-ALK-positiv NSCLC-xenograft tillväxt hos möss och råttor.¹⁵

Den kliniska betydelsen av ALK-genförändringar har visats i randomiserade, aktivt kontrollerade kliniska tester med XALKORI®, utförda av Pfizer, och med ZYKADIA®, utförda av Novartis.^{14,15}

ALECENSA® är en mycket selektiv och potent ALK- och RET-tyrosinkinashämmare, som hämmar intracellulära signalvägar som är involverade i tumörproliferation och överlevnad och därför främjar cancerdöd och hämmar tumörutveckling och proliferation.¹⁶ Baserat på prekliniska data, är ALECENSA® inte ett substrat av effluxtransportörerna (PGP eller BCRP) i blod-hjärnbarriären och kan därför distribuera in i och bibehållas i det centrala nervsystemet. ALECENSA®-inducerad tumörregression i prekliniska xenograft-modeller från mus, inklusive antitumöraktivitet i hjärnan, och förlängd överlevnad i djurmodeller med intrakraniell tumör.¹⁷ ALECENSA® tolereras väl och ger en hanterbar säkerhetsprofil.^{18,20}

Ventana har visat överensstämmelse av VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys med Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit (ALK FISH) för att bestämma ALK-status för en patients NSCLC. ALK FISH kan presentera tekniska utmaningar vid värdering av färgningsresultaten. Intrakromosomala förändringar kan framkalla svaga signaldelningar, vilket leder till potentiellt falskt negativa resultat.²¹ Studier som nyligen gjorts indikerar att IHC är känsligt och specifikt vid bestämning av ALK-status och är ett dugligt alternativ till ALK FISH.^{10,11, 21-23} Ventana har utvecklat antikroppsanalysen VENTANA anti-ALK (D5F3) och dess tillhörande poängsättningsalgoritm för att bestämma ALK-status i NSCLC-prover.

Tolkning av resultaten av en färgning med VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys på vävnadsprover bör utföras med den rekommenderade poängsättningsalgoritmen. Histologiska vävnadspreparat har fördelen av intakt vävnadsmorfologi, som hjälper till vid tolkning av ALK-positivitet för provet. Alla histologiska tester ska tolkas av en patolog, och resultaten ska kompletteras med morfologiska studier och lämpliga kontroller och användas tillsammans med övriga kliniska data och laboratoriedata. IHC-analysens målantigener påverkas av fixeringstid, typ av fixeringsmedel och ålder på snitt/objektglas. Därför måste försiktighet iaktas för att säkerställa provpreparationens kompatibilitet före färgning (se Tolkningssguiden för VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody för icke-småcelligt lungcancerom (NSCLC) P/N 1011879 och avsnittet Specifika begränsningar nedan).

PROCEDURPRINCIP

VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody är en monoklonal, primär kaninantikropp som binder till ALK i paraffinbäddade vävnadssnitt. Den specifika antikroppen kan visualiseras med hjälp av OptiView DAB IHC Detection Kit (kat. nr 760-700/06396500001) följt av OptiView Amplification Kit (kat. nr 760-099/06396518001 (50 test) eller 860-099/06718663001 (250 test)). Se relevanta produktblad för OptiView DAB IHC Detection Kit och OptiView Amplification Kit för mer information.

MEDFÖLJANDE REAGENS

VENTANA anti-ALK (D5F3)-antikroppen innefattar en rekombinant monoklonal kaninantikropp och innehåller tillräckligt med reagens för färgning av 50 objektglas.

En 5 mL dispenser med VENTANA anti-ALK (D5F3)-antikropp innehåller ca 70 µg av den monoklonala D5F3-kaninantikroppen.

Antikroppen är spädd i 0,08 M PBS med 3 % bärarprotein och 0,05 % ProClin 300 som konserveringsmedel.

Reagensets totala proteinkoncentration är cirka 10 mg/mL. Specifik antikropps-koncentration är cirka 14 µg/ml.

MATERIAL SOM BEHÖVS MEN INTE MEDFÖLJER

1. Människans blindtarm eller ALK-positiva och ALK-negativa, icke-småcelliga lungcancerprover för användning som kontrollvävnad
2. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (kat. nr 790-4795/0668380001)
3. Objektglas för mikroskop, positivt laddade
4. Torkugn som kan hålla en temperatur på 60°C ± 5 °C
5. Streckkodsetiketter
6. Xylen (för histologi)
7. Etanol eller reagensalkohol (för histologi)
 - 100 % lösning: utspädd etanol eller reagensalkohol
 - 95 % lösning: blanda 95 delar etanol eller reagensalkohol med 5 delar avjoniserat vatten
 - 80 % lösning: blanda 80 delar etanol eller reagensalkohol med 20 delar avjoniserat vatten
8. Avjoniserat eller destillerat vatten
9. OptiView DAB IHC Detection Kit (kat. nr 760-700/06396500001)
10. OptiView Amplification Kit (kat. No. 760-099 / 06396518001 (50 tester) eller 860-099 / 06718663001 (250 tester))
11. EZ Prep Concentrate (10X) (Cat. nr 950-102/05279771001)
12. Reaction Buffer Concentrate (10X) (kat. nr 950-300/05353955001)
13. LCS (Predilute) (kat. nr 650-010/05264839001)
14. ULTRA LCS (Predilute) (kat. nr 650-210/05424534001)
15. Cell Conditioning 1 (CC1) (kat. nr 950-124/05279801001)
16. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (kat. nr 950-224/05424569001)
17. Hematoxylin II (kat. nr 790-2208/05277965001)
18. Bluing Reagent (kat. nr 760-2037/05266769001)
19. Permanent monteringsmedium (Permount Fisher kat. nr SP15-500 eller motsvarande)
20. Täckglas (tillräckligt för att täcka vävnad, t.ex. VWR kat. nr 48393-060)
21. Automatiserat täckningsmedel (t.ex. Tissue-Tek SCA Automated Coverslipper)
22. Ljusk mikroskop
23. Absorberande torkduk

Färgningsreagens såsom VENTANA detection kit och tillhörande komponenter, inklusive negativa och positiva vävnadskontrollobjektglas, medföljer inte.

Eventuellt är inte alla produkter i produktbladet tillgängliga i alla länder. Rådfråga din lokala support.

FÖRVARING

Förvaras vid 2–8 °C vid mottagandet och när den inte används. Får ej frysas.

För att säkerställa rätt reagensleverans och antikroppens stabilitet måste dispenserns lock sättas på igen efter varje körning och dispensern omedelbart placeras i kylskåp i upprätt läge.

Varje antikroppsdispenser är märkt med utgångsdatum. Vid korrekt förvaring är reagenset stabilt fram till det datum som anges på etiketten. Använd inte reagenset efter detta utgångsdatum.

PROVBEREDNING

Rutinmässigt bearbetade, formalinfixerade, paraffinbäddade vävnader är lämpliga för användning med denna primära antikropp när den används med VENTANA detection kit och BenchMark IHC/ISH-instrument.

På grundval av xenograftermodeller genererade från människans NCI-H2228 NSCLC-cellinje som är positiv för ALK, rekommenderar Ventana vävnadsfixering i 10 % neutralt buffrat formalin (NBF) under minst 6 timmar.²⁴ Fixeringstider under 6 timmar resulterar i en betydande förlust av färgningsintensitet för ALK. Zinkformalinfixeringsmedel är också

godtagbart för en fixeringstid på minst 6 timmar. Mängden som används bör vara 15 till 20 gånger volymen på vävnaden. Inget fixativ tränger igenom mer än 2 till 3 mm tät vävnad eller 5 mm porös vävnad under en 24-timmarsperiod. Fixering kan göras vid rumstemperatur (15–25 °C).²⁵

Fixativ som t.ex. ättiksyra med alkoholformalin (AFA), PREFER-fixativ, B5 och andra fixeringsmedel som innehåller syra och/eller alkohol har påvisat en förlust av färgningsintensitet för ALK vid alla testade fixeringstider (1 till 72 timmar). De rekommenderas inte för användning med denna analys. Fördrojning till fixeringsstudier påvisade också en förlust av färgningsintensitet för ALK när xenograftprouver som inte fastställs inom 6 timmar efter bortskämning. Se Tolkningsguide för VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody för icke-småcelligt lungcancerom (NSCLC) P/N 1011879) för ytterligare diskussioner om effekten av provpreparation på ALK-färgningsintensitet.

Snitt ska skäras med en ungefärlig tjocklek av 4 µm och monteras på positivt laddade objektglas. Objektglasen ska färgas omedelbart eftersom antikroppsreagenterna för de skurna vävnadssnitten kan minska med tiden och äventyras om det går mer än 3 månader efter utskärning från paraffinblocket (se Tolkningsguide för VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody för icke-småcelligt lungcancerinom (NSCLC) P/N 1011879 och avsnittet Prestandaegenskaper nedan).

VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

1. För *in vitro*-diagnostiskt (IVD) bruk.
2. Endast för yrkesmässigt bruk.
3. Observera att positivt laddade objektglas kan vara känsliga för miljöpåverkan som resulterar i olämplig färgning av IHC-analyser (till exempel, brist på primär antikropp eller motfärgning på vävnaden). Se vitboken N4629_0313B-Impact of environmental stress on various histology slide types för att bättre förstå effekterna av miljöpåverkan på IHC-positivt laddade objektglas.
4. ProClin 300 lösning används som konserveringsmedel i detta reagens. Det har klassificerats som ett retande ämne och kan orsaka sensibilisering genom hudkontakt. Lätta lämpliga försiktighetsåtgärder vid hantering. Undvik att reagens kommer i kontakt med ögon, hud och slemhinnor. Använd skyddskläder och handskar.
5. Material av humant eller animaliskt ursprung ska hanteras som biologiskt riskavfall och omhändertas i enlighet med tillämpliga försiktighetsåtgärder.
6. Undvik att reagens kommer i kontakt med ögon och slemhinnor. Om reagens kommer i kontakt med känsliga områden ska dessa sköljas med stora mängder vatten.
7. Undvik mikrobiell kontaminering av reagens eftersom det kan orsaka felaktiga resultat.
8. Kontakta lokala och/eller statliga myndigheter angående rekommenderad metod för avfallshantering.
9. För ytterligare säkerhetsinformation, se säkerhetsdatabladet för produkten samt symbol- och riskfrasguiden på www.ventana.com.

FÄRGNINGSPROCEDUR

VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys har utvecklats för användning med BenchMark IHC/ISH-instrument i kombination med Rabbit Monoclonal Negative Control Ig, OptiView DAB IHC Detection Kit, OptiView Amplification Kit och tillhörande reagenser. Se Tabell 1, Tabell 2 och Tabell 3 för rekommenderade färgningsprotokoll för varje färgämningsskinn.

Denna antikropp har optimerats för specifika inkubationstider, men användaren måste validera resultat som erhålls med detta reagens. Avvikelser från färgningsprotokollet i Tabell 1, Tabell 2 eller Tabell 3 kan ge falskt positiva eller falskt negativa resultat. När det gäller BenchMark ULTRA-instrument har en ALK-specifik färgningsprocedure tagits fram, **U VENTANA ALK (D5F3)**. Innan du väljer protokollförhållanden från den ALK-specifika färgningsproceduren så måste BenchMark ULTRA-instrumentet ha VSS 12.3-programvara med OptiView v5-färgningsproceduren eller högre.

Parametrarna för de automatiserade procedurerna kan visas, skrivas ut och redigeras enligt proceduren i instrumentets användarhandbok. Se lämpligt produktblad till VENTANA detection kit för ytterligare information om immunhistokemiska färgningsprocedurer.

Tabell 1. Rekommenderat färgningsprotokoll för VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys och Rabbit Monoclonal Negative Control Ig med OptiView DAB IHC Detection Kit och OptiView Amplification Kit på ett BenchMark ULTRA-instrument.

Färgningsprocedur: U VENTANA ALK (D5F3)	
Protokollsteg	Parameterinmatning
Antikropp (primär)	VENTANA ALK AB – 16 Min\ (Välj sedan USA eller EU/Annan) eller Negative Control
Motfärgning	Hematoxylin II, 4 minuter
Efter motfärgning	Bluing, 4 minuter

Tabell 2. Rekommenderat färgningsprotokoll för VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys och Rabbit Monoclonal Negative Control Ig med OptiView DAB IHC Detection Kit och OptiView Amplification Kit på ett BenchMark XT-instrument.

Procedurtyp	Metod
IHC-synkroniseringsalternativ	Vald*
Avparaffinering	Vald
Cellkonditionering (antigenavkodning)	Cell Conditioning 1, 92 minuter, 100 °C
Pre-primär peroxidashämmare	Vald
Antikropp (primär)	Ventana anti-ALK (D5F3) eller Rabbit Mono Neg 16 minuter, 37 °C
OptiView HQ Univ Linker	12 minuter
OptiView HRP Multimer	12 minuter
OptiView Amplification	Vald
OV AMP H2O2, OV Amplifier	8 minuter
OV AMP Multimer	8 minuter
Motfärgning	Hematoxylin II, 4 minuter
Efter motfärgning	Bluing, 4 minuter

* Detta steg är endast valbart när XT OptiView DAB v4 används och är inte tillgängligt för tidigare programvaruversioner.

Tabell 3. Rekommenderat färgningsprotokoll för VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys och Rabbit Monoclonal Negative Control Ig med OptiView DAB IHC Detection Kit och OptiView Amplification Kit på ett BenchMark GX-instrument.

Procedurtyp	Metod
Avparaffinering	Vald
Cellkonditionering (antigenavkodning)	Cell Conditioning 1, 92 minuter, 100 °C
Pre-primär peroxidashämmare	Vald
Antikropp (primär)	Ventana anti-ALK (D5F3) eller Rabbit Mono Neg 16 minuter, 37 °C
OptiView HQ Univ Linker	12 minuter
OptiView HRP Multimer	12 minuter
OptiView Amplification	Vald
OV AMP H2O2, OV Amplifier	8 minuter
OV AMP Multimer	8 minuter
Motfärgning	Hematoxylin II, 4 minuter
Efter motfärgning	Bluing, 4 minuter

På grund av variationer i vävnadsfixering och -bearbetning samt generella labbinstrument- och omgivningsförhållanden, kan man behöva öka eller minska inkubationen av primärantikroppen, cellkonditioneringen eller proteasförbehandlingen, baserat på individuella prover, den detektion som används och avläsarens preferens. Ytterligare information om fixeringsvariabler finns i "Immunohistochemistry Principles and Advances".²⁶

KONTROLLER

KVALITETSKONTROLLPROCEDURER

Rabbit Monoclonal Negative Control Ig

Ett matchat objektglas med negativ reagenskontroll måste köras för varje prov för att underlätta tolkningen av resultat. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (kat. nr 790-4795/06683380001), en antikropp för negativ reagenskontroll, är speciellt matchad för denna analys och används istället för den primära antikroppen för utvärdering av icke-specifik färgning. Färgningsproceduren för den negativa reagenskontrollen ska motsvara inkubationsperioden för den primära antikroppen. Användning av ett annat negativt kontrollreagens eller underlåtenhet att använda det rekommenderade negativa kontrollreagenset kan leda till falska resultat.

Systemnivåkontroller

Systemnivåkontroller måste köras med patientprover. De kan antingen vara human blindtarm²⁶ eller kända ALK-positiva/negativa NSCLC-vävnadsprover.

Kontrollvävnader bör utgöras av färsk obduktions-, biopsi- eller kirurgiska prover, vilka preparerats och fixerats så tidigt som möjligt på ett sätt som är identiskt med behandlingen av testsnittet. Sådana vävnader kan övervaka alla analyssteg, från vävnadspreparering till färgning. Användning av vävnadssnitt, som fixerats eller beretts på annat sätt än testprovet, fungerar som kontroll för alla reagens- och metodsteg utom fixering och vävnadsberedning.

Blindtarm eller ALK-positiva/negativa NSCLC-vävnadskontroller

En ALK-positiv och ALK-negativ kontrollvävnad måste köras med varje VENTANA anti-ALK- (D5F3) analysfärgningsprocedur som utförs.

NSCLC-fall med färgning som är representativ för ett kliniskt ALK-positivt såväl som ett kliniskt ALK-negativt resultat är lämpade för optimal kvalitetskontroll, t.ex. för att detektera små mängder reagensdegradering eller instrumentrelaterade specifikationsproblem.

Human blindtarmsvävnad innehåller positiva och negativa färgningselement för ALK-proteinet och är även lämplig att använda som en systemnivåkontroll. De positiva vävnadfärgningskomponenterna används för att bekräfta att antikroppen applicerats rätt och att instrumentet fungerar på rätt sätt; de negativa vävnadfärgningskomponenterna används för att detektera små mängder reagensdegradering eller instrumentrelaterade specifikationsproblem.

Lämplig färgning av ALK-positiva och -negativa NSCLC och blindtarmsvävnadskomponenter beskrivs i Tabell 4 och Tabell 5 och i Tolkningssguide för VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody för icke-småcelligt lungcancer (NSCLC) P/N 1011879.

Kända positiva och kända negativa vävnadskontroller, som används för att övervaka prestandan av ALK-analysen på patientprover, måste fixeras och behandlas på ett liknande sätt som patientprovet. Annars kan kontrollvävnaderna endast användas för att övervaka för korrekt prestanda av testreagenserna. Vävnadskontrollerna bör inte användas som hjälp vid diagnostisering av patientprover.

Analysverifiering

Före första användning av en antikropp eller ett färgningssystem under en diagnostisk procedur, ska antikroppens specificitet verifieras genom att den testas på en serie vävnader med kända prestandaegenskaper för IHC som representerar ALK-positiva och -negativa vävnader (se Kvalitetskontrollprocedurer som anges i detta avsnitt av produktblad och rekommendationerna för kvalitetskontroll från College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist²⁷ eller godkända riktlinjer från CLSI²⁸). Dessa kvalitetskontrollprocedurer ska upprepas för varje ny sats med antikroppar eller när analysparametrarna ändras. NSCLC-vävnader med känd ALK-status eller humana blindtarmsprover är lämpliga för analysverifiering.

TOLKNING AV RESULTAT

VENTANA automatisk immunfärgningsprocedur orsakar utfällning av en brunfärgad DAB-reaktionsprodukt på de antigenställen som lokaliseras med VENTANA anti-ALK (D5F3)-antikropp. En kvalificerad patolog med erfarenhet av IHC-procedurer måste utvärdera negativa reagenskontroller och systemnivåkontroller samt kvalificera den färgade produkten innan resultaten tolkas.

Positiva/negativa vävnadskontroller på systemnivå

De färgade positiva och negativa vävnadskontrollerna ska undersökas för att säkerställa att samtliga reagenser fungerar på rätt sätt. Förekomst av rätt färgad reaktionsprodukt på den positiva kontrollvävnaden inom cytoplasman i målcellerna anger en positiv reaktivitet.

Om den positiva eller negativa vävnadskontrollen inte påvisar lämplig färgning eller påvisar en förändring i klinisk diagnostik ska resultat med testproven anses som ogiltiga.

Tabell 4. Utvärderingskriterier vid tarmvävnadskontroll. Representativa bilder finns i tolkningsguiden för VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody för icke-småcelligt lungcancer (NSCLC) P/N 1011879.

Acceptabelt	Oacceptabelt
Närvaro av kraftig granulär cytoplasmisk färgning i ganglieceller. (Se anmärkning)	Frånvaro av kraftig granulär cytoplasmisk färgning i ganglieceller.
Frånvaro av stark granulär cytoplasmisk färgning i glandulära epitelceller, muskel- och lymfatisk vävnad (ringa eller sällsynt färgning av lymfocytära celler kan observeras i lymfoida aggregat).	Överdriven, icke-specifik bakgrundsfärgning av glandulära epitelceller, muskel- eller lymfatisk vävnad som stör poängsättning.

Obs: Nerven i blindtarmsmuskelskikt visar positiv färgning.

Negativ reagenskontroll

Ospecifik färgning, om sådan förekommer, har ett diffust utseende och kan utvärderas med hjälp av den negativa kontrollobjektglas som färgats med Rabbit Monoclonal Negative Control Ig. Intakta celler ska användas för tolkning av färgningsresultaten, eftersom nekrotiska eller nedbrutna celler ofta färgas ospecifikt. Om bakgrundsfärgningen är stark ska resultaten från testprovet betraktas som ogiltiga. Exempel på acceptabla nivåer av bakgrundsfärgning för denna analys kan hittas i VENTANA ALK poängbedömningsguide för småcellig lungcancer/vävnad P/N 1011879.

Patientvävnad

Patientvävnaden måste utvärderas enligt poängsättningsalgoritmen för VENTANA anti-ALK (D5F3) som anges i Tabell 5. Se tolkningsguiden för VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody för icke-småcelligt lungcancer (NSCLC) P/N 1011879.

Tabell 5. Poängsättningsalgoritm för analysen VENTANA anti-ALK (D5F3). Representativa bilder finns i tolkningsguiden för VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody för icke-småcelligt lungcancer (NSCLC) P/N 1011879.

Klinisk tolkning	Färgningsbeskrivning
Positivt för ALK	Närvaron av kraftig granulär cytoplasmisk färgning i tumörceller (procentandelen positiva tumörceller). Här måste man bortse från vissa färgningselement, som exempelvis: • lätt cytoplasmisk marmorering i alveolära makrofager, • celler av neuralt ursprung (nerv- och ganglieceller), • glandulär epitelcellfärgning, • spridda lymfocytära celler bland infiltrerande lymfocyter. Viss bakgrundsfärgning kan också observeras i normal slemhinna i NSCLC (inklusive mucin) och i nekrotiska tumörömråden, som ska exkluderas från den kliniska utvärderingen.
Negativt för ALK	Frånvaro av kraftig granulär cytoplasmisk färgning i tumörceller.

ALLMÄNNA BEGRÄNSNINGAR

- Immunhistokemi är en diagnostisk process i flera steg som kräver specialutbildning i valen av lämpliga reagenser, vävnadsval, fixering, bearbetning, preparering av det immunhistokemiska objektglas och tolkning av färgningsresultat.
- Vävnadsfärgning är beroende av hanteringen och bearbetningen av vävnaden före färgning. Felaktig fixation, frysning, upptining, tvättning, torkning, värmning, snittning eller kontaminering med andra vävnader eller vätskor kan ge artefakter, antikroppsinfångning eller falska negativa resultat. Inkonsekventa resultat kan bero på variationer i fixations- och inbäddningsmetoder eller på naturliga oregelbundenheter i vävnaden.
- Stark eller ofullständig motfärgning kan äventyra en korrekt tolkning av resultat.
- Den kliniska tolkningen av positiv färgning, eller frånvaro av sådan, måste utvärderas inom ramen för klinisk anamnes, morfologi och andra histopatologiska kriterier. Den kliniska tolkningen av färgning, eller frånvaro av sådan, måste kompletteras med morfologiska undersökningar och systemnivåkontroller samt andra diagnostiska tester. Det är den kvalificerade patologens ansvar att vara förtrogen med de antikroppar, reagenser och metoder som används för att tolka det färgade preparatet. Färgning måste utföras i ett certifierat och licensierat laboratorium under överinseende av en patolog som ansvarar för granskning av färgade objektglas och för att de positiva och negativa kontrollerna är adekvata.
- Ventana Medical Systems, Inc. levererar antikroppar och reagens med optimal spädning, förutsatt att de bifogade instruktionerna följs. Eventuella avvikelser från rekommenderade testprocedurer kan ogiltiggöra förväntade resultat. Lämpliga kontroller måste implementeras och dokumenteras. Användare som avviker från rekommenderade testprocedurer måste ta ansvar för tolkningen av patientresultat.
- Denna produkt är inte avsedd för användning vid flödescytometri, eftersom prestandaegenskaperna inte har fastställts.
- Reagens kan uppvisa oväntade reaktioner i tidigare otestade vävnader. Möjligheten för icke förväntade reaktioner även i testade vävnadsgrupper kan inte fullständigt elimineras beroende på biologisk varians i antigenuttryck, neoplasmer eller andra patologiska vävnader.²⁹
- Vävnader från personer infekterade med hepatit B-virus och med hepatit-B-ytantigen (HBsAg) kan uppvisa icke-specifik färgning med pepparrotssperoxid.³⁰
- Falska positiva resultat kan uppstå på grund av icke-immunologisk bindning av proteiner eller substratreaktionsprodukter. De kan även orsakas av pseudoperoxidasaktivitet (erythrocyter), endogen peroxidasaktivitet (cytokrom C) eller endogent biotin (t.ex. lever, hjärna, bröst, njure), beroende på vilken typ av immunfärgning som används.³¹
- Ett negativt resultat betyder, som vid alla IHC-test, att antigenet i fråga inte detekterades, inte att antigenet är frånvarande i de analyserade cellerna eller vävnaderna.

SPECIFIKA BEGRÄNSNINGAR

- VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys har optimerats på IHC/ISH automatisk objektglasfärgare från BenchMark IHC/ISH-instrument i kombination med OptiView DAB IHC Detection Kit under 16 minuters primär antikroppsinkubationstid med OptiView Amplification-alternativet valt i protokollet.
- Patientprovobjektglas ska färgas med Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (kat. nr 790-4795/06683380001). Andra negativa kontrollreagenser är inte lämpliga för den här analysen.
- Denna analys har inte validerats för användning med cytologiska prover eller avkalkade prover.
- Patientvävnad måste färgas inom 3 månader efter snittning från vävnadsblocket. Förlust av färgningsprestanda har observerats med VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys på snitt som förvarats i rumstemperatur längre än 3 månader.
- Ventana rekommenderar att prover fixeras i minst 6 timmar i 10 % NBF eller zinkformalin. Användning av andra fixationstider eller typer av fixativ än de rekommenderade kan leda till falska negativa resultat. Fixativ såsom AFA, PREFER fixative, B5 och andra syra- och/eller alkoholinnehållande fixativ har uppvisat förlust av specifik ALK-proteinfärgning. Se tolkningsguiden för VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody för icke-småcelligt lungcancer (NSCLC) P/N 1011879 för ytterligare diskussioner.
- Vissa färgningsartefakter har uppmärksamats med VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys. Lätt cytoplasmisk marmorering i alveolära makrofager kan finnas på objektglas färgade med anti-ALK eller med negativ reagenskontroll, som indikerar att det är en artefakt i detektionssystemet som inte ska värderas som anti-ALK positiv färgning. Dessutom har punktvis färgning observerats på nekrotiska tumörömråden; sådan färgning bör också ignoreras under utvärdering av

patientprovet. Färgning av nervvävnad, inklusive nerv och enstaka lymforetikulära celler inom lymfocytiska infiltrat, har observerats med VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys. Se tolkningsguiden för VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody för icke-småcelligt lungcarcinom (NSCLC) P/N 1011879 för ytterligare diskussioner.

7. En viss variation i generell färgningsintensitet kan observeras på vävnadskontroller på grund av OptiView Amplification Kit. Se Tolkningssguiden för exempel på acceptabel färgningsprestanda.

FELSÖKNING

Om otillräcklig färgning observeras på antingen humana NSCLC- eller blindtarmvävnadskontroller på systemnivå, eller patientproverna, måste man säkerställa att underhållsproceduren har följts för BenchMark ULTRA-, BenchMark XT- eller GX-instrumentet. Om inga tekniska problem eller avvikelser förekommer ska du kontakta din lokala representant innan ytterligare en körning genomförs.

RESULTATKARAKTERISTIKA

Analytisk specificitet och känslighet bestämdes genom färgning av multipla fall av normal och neoplastisk human vävnad med VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys. Resultaten sammanfattas i Tabell 6 och Tabell 7.

Specificitet

Tabell 6. Specificitet/sensitivitet för VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys i normal vävnad. Vid testning användes formalinfixerade, paraffinbäddade normala vävnader.

Vävnad	Antal positiva/ totala fall	Vävnad	Antal positiva/ totala fall
Cerebrum	0/3*	Tymus	0/3
Cerebellum	0/3	Myeloid (benmärg)	0/3
Binjure	0/3	Lunga	0/3
Äggstock	0/3	Hjärta	0/3
Bukspottkörtel	0/3	Esofagus	0/3
Bisköldkörtel	0/3	Magsäck	0/3
Hypofys	0/3**	Tunntarm	0/3***
Testikel	0/3	Kolon	0/3***
Sköldkörtel	0/3	Lever	0/3
Bröst	0/3	Spottkörtel	0/3
Mjälte	0/3	Njure	0/3
Tonsill	0/3	Prostata	0/3
Endometrium	0/3	Cervix	0/3
Skelettmuskel	0/4	Hud	0/3
Nerv (spridd)	0/3	Mesotel och lunga	0/3

*2/3 Få gliaceller i storhjärnan visade svag till måttlig positivitet.

**3/3 Hypofysen färgas svagt.

***Ganglieceller inom 4/6 tarmvävnader färgades positivt för ALK vid varierande intensitet.

Sensitivitet

Tabell 7. Specificitet/sensitivitet för VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys i neoplastiska vävnader. Vid testning användes en mängd olika formalinfixerade, paraffinbäddade neoplastiska vävnader.

Patologi	Antal positiva/totala fall
Glioblastom	0/1
Atypiskt meningiom	0/1
Malignt ependymom	0/1
Malignt oligodendrogliom	0/1
Seröst ovarialt adenocarcinom	1/1
Adenocarcinom i äggstock	0/1
Öcellscarcinom	0/1
Adenocarcinom (bukspottkörtel)	0/1
Seminom	0/1
Embryonalt carcinom	0/1
Medullärt carcinom	0/1
Papillärt carcinom	0/1
Intraduktalt carcinom i bröst	0/1
Invasivt duktalt bröstcarcinom	0/2
Diffust B-cellslymfom	0/3
Småcelligt odifferentierat carcinom i lunga	0/1
Skivepitelcarcinom i lunga	0/1
Adenocarcinom i lunga	0/1
Skivepitelcarcinom i matstrupe	0/1
Adenocarcinom i matstrupe	0/1
Gastriskt muköst adenocarcinom	0/1
Gastrointestinalt adenocarcinom	0/1
Malignt interstitialom	0/1
Rektalt adenocarcinom	0/1
Rektalt malignt interstitialom	0/1
Hepatocellulärt carcinom	0/1
Hepatoblastom	1/1
Klarcellscarcinom i njure	0/1
Adenocarcinom i prostata	0/2
Leiomyom	0/1
Endometrialt adenocarcinom	0/1
Endometrialt klarcellscarcinom	0/1
Skivepitelcarcinom i livmoder	0/2
Embryonalt rbdomyosarkom	0/1
Analt malignt melanom	0/1

Patologi	Antal positiva/totala fall
Basalcellscarcinom	0/1
Skivepitelcarcinom	0/1
Neurofibrom	0/1
Retroperitonealt neuroblastom	1/1
Malignt mesoteliom	0/1
Hodgkins lymfom	0/1
Anaplastiska storcelliga lymfom	0/1
Övergångscellcarcinom i urinblåsa	0/1
Låggradigt leiomyosarkom	0/1
Osteosarkom	0/1
Spindelcells rabdomyosarkom	0/1
Medelgradigt leiomyosarkom	0/1

Plattformsöverensstämmelse (överbryggande studie)

VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys släpptes ursprungligen på BenchMark XT- och GX-instrumenten. En överbryggande studie utfördes i syfte att visa motsvarande prestanda hos analysen mellan BenchMark ULTRA- och BenchMark XT-instrumenten. Denna studie utvärderade klinisk ALK-status (baserat på ALK-poängsättningsalgoritmen som finns i tabell 5) i 184 unika NSCLC-prover som färgats med VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys över båda plattformarna. De efterföljande färgade glasen doldes och randomiserades och utvärderades därefter av tre patologer. Resultat från plattformsöverensstämmelse för denna studie finns i Tabell 8 och Tabell 9.

Tabell 8. Överensstämmelseresultaten mellan BenchMark XT- och BenchMark ULTRA - instrument.

Överensstämmelse för VENTANA anti-ALK (D5F3) mellan BenchMark ULTRA- och BenchMark XT-instrumenten			
BenchMark ULTRA	BenchMark XT		Totalt
	Positivt	Negativt	
Positivt	85	1	86
Negativt	1	97	98
Totalt	86	98	184

Tabell 9. Överensstämmelse för ALK-status mellan BenchMark XT- och BenchMark ULTRA-instrument.

Överensstämmelsefrekvens för plattform	Positiv överensstämmelse i procent (95 % KI)	Negativ överensstämmelse i procent (95 % KI)	Övergripande överensstämmelse i procent (95 % KI)
Överensstämmelse mellan BenchMark XT-instrument och BenchMark ULTRA-instrument	98,8 % (93,7-99,8 %)	99,0 % (94,4-99,8 %)	98,9 % (96,1-99,7 %)

Vävnadstjocklek

Vävnadstjocklek utvärderades med användning av 4 unika fall av human NSCLC (3 ALK-positiva och 1-ALK negativ) och 4 unika fall av human blindtarm. Vävnaderna snittades och testades i duplikat vid 3, 4, 5, 6, och 7 mikroner. Alla vävnadstjocklekar påvisade lämplig specifik färgning för ALK och lämpliga bakgrunds nivåer med VENTANA anti-ALK

(D5F3) antikroppsanalys. Inga prover uppvisade en förändring i klinisk ALK-status inom detta intervall av tjocklekar. Ventana rekommenderar att prover snittas till 4–6 mikroner för analysen.

Repetierbarhet och intermediära precisionsstudier

Repetierbarhet och intermediär precision hos VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys utvärderades på BenchMark ULTRA-, XT- och GX-instrument i kombination med OptiView DAB IHC Detection- och OptiView Amplification-kiten.

Tio unika NSCLC-vävnadsprover (5 ALK-positiva och 5 ALK-negativa) utvärderades på både BenchMark XT- och BenchMark ULTRA-instrument. För intradagsprecision färgades fem likadana objektglas från var och en av NSCLC-proverna över ett enda BenchMark XT- eller ett enda BenchMark ULTRA-instrument. För precisionstestning intra-instrument färgades tre likadana glasobjekt från var och en av NSCLC-proverna med VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys över tre BenchMark XT-instrument medan 2 objektglasreplikat från var och ett av NSCLC-proverna färgades över tre BenchMark ULTRA-instrument. För interdagsprecision färgades två likadana objektglas från var och en av NSCLC-proverna med VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys på en enda BenchMark XT eller BenchMark ULTRA objektglasfärgare över fem spridda dagar. Alla objektglas doldes och randomiserades inom varje instrumentvävnadskohort. Varje kohort utvärderades individuellt av en patolog med poängsättningsalgoritmen för VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys (anges i Tabell 5). Alla likadana NSCLC-prover producerade motsvarande ALK IHC-färgningsresultat. En sammanfattning av resultaten för repetierbarhet och intermediär precision för BenchMark XT- och BenchMark ULTRA-instrument kan hittas i Tabell 10 respektive Tabell 11.

En studie mellan plattformar utfördes som jämför prestandan hos VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys på BenchMark XT- och BenchMark GX-instrument. I denna studie utvärderades två multivävnadsblock som vardera innehåller åtta NSCLC-prover (3 ALK-positiva, 1 ALK-negativt per block). I den här jämförelsen färgades fem likadana objektglas på tre BenchMark XT- och tre BenchMark GX-instrument. Dessa objektglas utvärderades för lämplig färgning baserat på poängsättningsalgoritmen för VENTANA anti-ALK (D5F3) IHC som finns i Tabell 5. Alla likadana NSCLC-prover producerade motsvarande ALK IHC-färgningsresultat mellan de två plattformarna. En sammanfattning av resultaten finns i Tabell 12.

Dessutom utvärderades även repetierbarheten hos VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalysfärgning på human blindtarm (systemnivåkontroll). Åtta unika humana blindtarmsvävnader användes för denna studie. För precisionen intradag färgades tretton likadana objektglas från två multi-vävnadsblock innehållande fyra blindtarmsprover på ett enda BenchMark XT-instrument. För precisionen mellan instrument färgades fem likadana objektglas från två multi-vävnadsblock innehållande fyra blindtarmsprover med VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys, på ett enda BenchMark XT-instrument över fem spridda dagar. Alla objektglas utvärderades av en patolog med användning av poängsättningsguiden för VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys för blindtarmvävnadskontroll (i Tabell 4). Alla likadana blindtarmsprover producerade motsvarande ALK IHC-färgningsresultat. Den totala överensstämmelseprocenten för inom samma dag och mellan instrument (över tre instrument) var 100 %, medan repetierbarheten mellan dagar (över fem spridda dagar) var 98 %.

Tabell 10. Repetierbarhet och intermediär precision hos VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys på individuella, färgade NSCLC-prover på BenchMark XT-instrument.

Repetierbarhet/Precision på NSCLC-vävnad	N= Totalt antal utvärderade objektglas i kohorten	Övergripande överensstämmelse i procent för ALK-status (95 % CI)
Intradagsrepetierbarhet	50	100 % (97,5-100 %)
Intraplattformprecision (över tre BenchMark XT-instrument)	60	100 % (97,9-100 %)
Intradagsprecision (5 ej intilliggande dagar)	100	100 % (98,7-100 %)

Tabell 11. Repeterbarhet och intermediär precision hos VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys på individuella NSCLC-prover på BenchMark ULTRA-instrument.

Repeaterbarhet/Precision på NSCLC-vävnad	N= Totalt antal utvärderade objektglas i kohorten	Övergripande överensstämmelse i procent för ALK-status (95 % CI)
Intradagsrepeaterbarhet	50	100 % (92,9-100,0 %)
Intraplattformsprecision (över tre BenchMark ULTRA-instrument)	60	100 % (94,0-100,0 %)
Intradagsprecision (5 ej intilliggande dagar)	100	100 % (96,3-100,0 %)

Tabell 12. Intraplattformsprecision hos VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys på multivävnadsblock i NSCLC-prover med BenchMark XT- och BenchMark GX-instrument.

Precision på NSCLC-vävnad	N= Totalt antal utvärderade objektglas i kohorten	Övergripande överensstämmelse i procent för ALK-status
Intraplattformsprecision från BenchMark XT- till BenchMark GX-instrument (över 3 instrument)	30	100 %

Reproducerbarhet mellan olika satser

Sats-till-sats-reproducerbarheten hos VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys bestämdes genom att testa tre satser av VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys över 38 unika NSCLC-fall (21 ALK-positiva prover (från 18 unika fall) och 20 ALK-negativa NSCLC-vävnadsprover) på BenchMark XT-instrument med OptiView DAB IHC Detection- och OptiView Amplification Kits. Alla fall färgades i duplikat med vart och ett av de tre satserna av primär antikropp. Objektglasen blindades och randomiserades före utvärdering för klinisk status såsom fastställt med poängsättningsalgoritmen för VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys (som anges i Tabell 5) av tre patologer. Alla tre satser av antikropp uppvisade mer än 90 % överensstämmande färgningsresultat för ALK-status över de 41 NSCLC-vävnadsprover som utvärderats. Resultaten rapporteras som total procentuell överensstämmelse, genomsnittlig positiv överensstämmelse och genomsnittlig negativ överensstämmelsefrekvens. Den totala procentuella överensstämmelsefrekvensen mellan satser var 99,2 %; därför är färgningsresultat för VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys reproducerbart över satser av antikroppar. Resultaten finns i Tabell 13.

Sats-till-sats-reproducerbarheten hos VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys, med användning av BenchMark ULTRA-instrument, bestämdes genom att testa tre satser av VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys över 30 unika NSCLC-fall (15 ALK-positiva prover och 15 ALK-negativa NSCLC-vävnadsprover) med OptiView DAB IHC Detection- och OptiView Amplification Kits. Alla fall färgades i duplikat med vart och ett av de tre satserna av primär antikropp. Objektglasen blindades och randomiserades före utvärdering för klinisk status såsom fastställt med poängsättningsalgoritmen för VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys (som anges i Tabell 5) av en patolog. Alla tre satser av antikropp uppvisade mer än 90 % överensstämmande färgningsresultat för ALK-status över de 30 NSCLC-vävnadsprover som utvärderats. Resultaten rapporteras som total procentuell överensstämmelse, genomsnittlig positiv överensstämmelse och genomsnittlig negativ överensstämmelsefrekvens. Den totala procentuella överensstämmelsefrekvensen mellan satser var 99,1 %; därför är färgningsresultat för VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys reproducerbart över satser av antikroppar. Resultaten finns i Tabell 14.

Sats-till-sats-reproducerbarhet för VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys utvärderades också med användning av 12 unika, humana blindtarmvävnadsprover. Reproducerbarheten fastställdes genom att testa tre satser med antikroppar i kombination med tre satser av OptiView DAB IHC Detection- och OptiView Amplification Kit över tre BenchMark XT-instrument. Den genomsnittliga överensstämmelsefrekvensen för lämpliga

positiva och negativa färgningselement av blindtarmen med användning av VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys var 100 %.

Tabell 13. Överensstämmelsefrekvens för reproducerbarhet mellan olika satser över 41 NSCLC-vävnadsprover på BenchMark XT-instrumentet. Tjugott ALK-positiva prover (från 18 unika fall) och 20 ALK-negativa prover testades.

Överensstämmelsefrekvens –för reproducerbarhet mellan olika satser	Genomsnittlig positiv överensstämmelse (95 % KI)	Genomsnittlig negativ överensstämmelse (95 % KI)	Övergripande överensstämmelse i procent (95 % KI)
Medelvärde av alla tre jämförelser mellan olika satser	99,2 % (97,4-100 %)	99,1 % (96,8-100 %)	99,2 % (97,5-100 %)

Tabell 14. Överensstämmelsefrekvens för reproducerbarhet mellan olika satser över 30 NSCLC-vävnadsprover på BenchMark ULTRA-instrumentet. Femton ALK-positiva prover och femton ALK-negativa prover testades.

Överensstämmelsefrekvens –för reproducerbarhet mellan olika satser	Positiv överensstämmelse i procent (95 % KI)	Negativ överensstämmelse i procent (95 % KI)	Övergripande överensstämmelse i procent (95 % KI)
Medelvärde av alla tre jämförelser mellan olika satser	98,9 % (96,8-99,6 %)	99,3 % (97,3-99,8 %)	99,1 % (97,9-99,6 %)

Studier för precision mellan avläsare

Flera studier för precision mellan avläsare utfördes: två studier på BenchMark XT-instrumentet och en på BenchMark ULTRA-instrumentet.

I BenchMark XT-studien för precision mellan avläsare utvärderade tre patologer totalt 185 unika fall. De 185 fallen korrelerade med 100 ALK-positiva och 100 ALK-negativa block som var färgade med VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys. Fallen blindades och randomiserades före utvärdering för ALK IHC-färgning enligt poängsättningsalgoritmen för VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys i Tabell 5. Resultaten som tillhandahålls i Tabell 15 nedan återspeglar precisionsfrekvenserna mellan avläsare för unika fall från studiekohorten.

Tabell 15. Studie 1 om precision mellan avläsare på BenchMark XT-instrument

Precision mellan avläsare	Genomsnittlig positiv överensstämmelse (95 % KI)	Genomsnittlig negativ överensstämmelse (95 % KI)	Övergripande överensstämmelse i procent (95 % KI)
Medelvärde av alla tre jämförelser mellan olika avläsare	98,8 % (97,3-100 %)	99,0 % (97,7-100 %)	98,9 % (97,4-100 %)

BenchMark XT studie 2 för precision mellan avläsare utfördes på en kohort av fall från en randomiserad klinisk studie av ALK-positiva NSCLC-patientprover inskrivna med Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit. Cirka 300 fall färgades med VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys på BenchMark XT-instrument. Fallens ALK FISH-status dölles, randomiserades och tilldelades till tre läsare, som utvärderade ALK IHC-färgningsresultaten enligt poängsättningsalgoritmen för VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys som finns i Tabell 5. Resultaten som tillhandahålls i Tabell 16 återspeglar de precisionsfrekvenserna mellan avläsare från denna kliniska provningskohorten.

I studien om precision mellan avläsare för BenchMark ULTRA-instrument utvärderades en kohort på 184 unika NSCLC-fall. Kohorten bestod av 90 ALK-positiva och 94 ALK-negativa fall som färgades med VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys på BenchMark ULTRA-instrument. Fallen dölles, randomiserades och tilldelades till tre läsare, som utvärderade ALK IHC-färgningsresultaten enligt poängsättningsalgoritmen för VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys som finns i Tabell 5. Tabell 16 återspeglar precisionsfrekvenserna mellan avläsare från den här studien.

Tabell 16. Precisionen mellan avläsare i studie 2, för ALK-status i NSCLC-prover, erhållen via klinisk jämförelse av kohort nr 1 som färgats med VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys på BenchMark XT-instrument.

Precision mellan avläsare	Genomsnittlig positiv överensstämmelse (95 % KI)	Genomsnittlig negativ överensstämmelse (95 % KI)	Övergripande överensstämmelse i procent (95 % KI)
Medelvärde av alla tre jämförelser mellan olika läsare	97,6 % (95,0-99,5 %)	99,5 % (98,9-99,9 %)	99,1% (98,2-99,8 %)
Avläsare 1 vs Avläsare 2	99,1 % (97,1-100 %)	99,8 % (99,4-100 %)	99,7 % (98,2-99,9 %)
Avläsare 1 vs Avläsare 3	96,3 % (92,3-99,2 %)	99,2 % (98,3-99,8 %)	98,6 % (96,6-99,5 %)
Avläsare 2 vs Avläsare 3	97,2 % (93,5-100 %)	99,4 % (98,6-100 %)	99,0 % (97,1-99,7 %)

Tabell 17. Precisionen mellan avläsare för ALK-status i NSCLC-prover som färgats med VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys på BenchMark ULTRA-instrument.

Precision mellan avläsare	Genomsnittlig positiv överensstämmelse (95 % KI)	Genomsnittlig negativ överensstämmelse (95 % KI)	Övergripande överensstämmelse i procent (95 % KI)
Genomsnitt för alla tre Avläsarejämförelser	98,4 % (96,5-99,6 %)	98,6 % (96,9-99,7 %)	98,5 % (96,7-99,6 %)
Avläsare 1 vs Avläsare 2	98,9 % (96,8-100 %)	98,9 % (97,0-100 %)	98,9 % (96,0-99,7 %)
Avläsare 1 vs Avläsare 3	98,8 % (96,7-100 %)	99,0 % (97,2-100 %)	98,9 % (96,0-99,7 %)
Avläsare 2 vs Avläsare 3	97,6 % (94,7-99,4 %)	97,9 % (95,4-99,5 %)	97,8 % (94,4-99,1 %)

Överensstämmelse med ALK FISH

Tre kohorter användes för att jämföra färgningsresultaten från VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody med ALK FISH beträffande klinisk ALK-status. Kohorterna inkluderade en serie av humana NSCLC-vävnadsprover från primära och metastaserande tumörer, inklusive resektioner, nålbiopsier, bronkiala biopsier och formalinfixerade, paraffinbäddade (FFPE) cellblock från FNA:er. Alla studier poängsattes med hjälp av poängsättningsalgoritmen (beskrivs i Tabell 5).

Överensstämmelsestudie 1

En studie utfördes i ett externt laboratorium, för att jämföra VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody med retrospektiv Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit-data. Det externa laboratoriet färgade cirka 100 NSCLC-fall med VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody på ett BenchMark XT-instrument. VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys uppvisade >98 % total överensstämmelse med den retrospektiva Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit-datamängden på denna NSCLC-provkohort. Resultaten beskrivs i detalj i Tabell 18 och Tabell 19. Observera att 86 av de 100 fallen hade tillgängliga FISH-data och tillräcklig tumörnärvaro för jämförelse med ALK IHC-resultatet.

Tabell 18. VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys jämfört med Abbott's Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.

VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys jämfört med Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.			
VENTANA anti-ALK (D5F3) antikropp	Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		Totalt
	Positivt	Negativt	
Positivt	10	0	10
Negativt	1	75	76
Totalt	11	75	86

Tabell 19. Procentandel total, positiv och negativ överensstämmelsefrekvens för VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys jämfört med Abbott Vysis Break Apart FISH Probe Kit.

Procent total, positiv och negativ överensstämmelsefrekvens			
Frekvens	n/N	%	95 % CI [a]
Övergripande överensstämmelse i procent	85/86	98,8	93,7, 99,8
Positiv överensstämmelse i procent	10/11	90,9	62,3, 98,4
Negativ överensstämmelse i procent	75/75	100,0	95,1, 100,0

[a] Tvåsidigt 95-procentigt konfidenstervall beräknat med hjälp av poängmetoden.

Observera att det inte har verifierats att preparationen av vävnadsprover i denna studie har följt provpreparationsprocedurerna som rekommenderas för denna analys.

Överensstämmelsestudie 2

En studie utfördes i ett andra externt laboratorium, för att jämföra VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody med Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit-data på 73 NSCLC-fall (skurna inom en vecka före färgning). Det externa laboratoriet färgade fallen med VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody på ett BenchMark XT-instrument. VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys uppvisade >93 % total överensstämmelse med den retrospektiva Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit-datamängden på denna NSCLC-provkohort. Resultaten beskrivs i detalj i Tabell 20 och Tabell 21.

Tabell 20. VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys jämfört med Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.

VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys jämfört med Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit			
VENTANA anti-ALK (D5F3) antikropp	Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		Totalt
	Positivt	Negativt	
Positivt	2	4	6
Negativt	0	56	56
Totalt	2	60	62

Tabell 21. Procentandel total, positiv och negativ överensstämmelsefrekvens för VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys jämfört med Abbott Vysis Break Apart FISH Probe Kit.

Procent total, positiv och negativ överensstämmelsefrekvens			
Frekvens	n/N	%	95 % CI [a]
Övergripande överensstämmelse i procent	58/62	93,5 %	84,6-97,5
Positiv överensstämmelse i procent	2/2	100 %	34,2-100,0
Negativ överensstämmelse i procent	56/60	93 %	84,1-97,4

[a] Tvåsidigt 95-procentigt konfidensintervall beräknat med hjälp av poängmetoden.

Av de fyra icke överensstämmande (FISH-negativa, ALK IHC-positiva) fallen testades ytterligare ofärgade objektglas med en annan ALK (annan klon och annat detektionssystem). Tre av de fyra fallen överensstämde med VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys gällande detekterad ALK IHC-färgning.

Det fanns också 10 fall där FISH-resultaten var obestämda eller inte utfördes. Fyra av dessa fall var positiva med VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys och den andra ALK-klonen, och sex var negativa med ALK IHC. Det fanns ett fall som var positivt med FISH men det fanns inte tillräckligt med tillgängligt provmaterial att färga med IHC.

Överensstämmelsestudie 3

I denna studie färgades cirka 300 fall från en pågående global klinisk studie av ALK-positiva NSCLC-patienter som registrerats med Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit med VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Antibody-analys. Det här är samma kohort som tidigare diskuterades i studien om precision mellan avläsare på sida 7 i det här produktbladet. Av de cirka 300 fallen blev vissa kategoriserade som "icke informativa" av FISH eller "FISH-analys ej utförd" och färgades och utvärderades enbart i informativt syfte.

Fallens FISH-status doldes, de ordnades slumpmässigt och gavs till två avläsare vilka utvärderade färgningsresultaten. Resultaten jämfördes med den FISH-status som erhöles från den globala kliniska studien.

Resultaten av jämförelsen mellan ALK IHC och ALK FISH visas i Tabell 22 nedan.

Tabell 22. Överensstämmelse mellan VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys och Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit, som utvärderats av 2 patologer.

VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys jämfört med Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit				
VENTANA anti-ALK (D5F3) antikropp		Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		Totalt
Avläsare		Positivt	Negativt	
Avläsare 1	Positivt	37	13	50
	Negativt	11	223	234
	Totalt	48	236	284
Avläsare 2	Positivt	37	12	49
	Negativt	11	225	236
	Totalt	48	237	285

Observera att det inte har verifierats att preparationen av vävnadsprover i denna studie har följt provpreparationsprocedurerna som rekommenderas för denna analys.

Avvikande fall som var VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys ALK-positiva, ALK FISH-negativa:

- 4 fall utvärderades av minst en avläsare som ALK IHC-positiva, FISH-negativa. Vid en samstämmig granskning bestämdes det att de skulle värderas som IHC-negativa. Dessa fall hade fokal cytoplasmisk/membranfärgning och beskrivs i tolkningsguiden för VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody för icke-småcelligt lungcancerin (NSCLC) P/N 1011879.

- Det fanns 9 ALK IHC-positiva, ALK FISH-negativa fall som ansågs vara äkta avvikande fall.

Av de 9 avvikande fallen hade 7 ofärgade objektglas som var tillgängliga för ytterligare ALK-diagnostisk testning (molekylär testning och IHC-testning med en annan klon och annat detektionssystem). Dessa extra testresultat indikerade att majoriteten av de avvikande fallen gynnade den positiva IHC-utvärderingen för ALK-status när ALK FISH var negativ. (Observera att snitt/objektglas från dessa fall överskrider de rekommenderade 3 månaderna).

Avvikande fall som var VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys ALK-negativa, ALK FISH positiva:

- Det fanns 11 fall som var positiva med FISH men negativa med VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys. 10 fall hade ofärgade objektglas som var tillgängliga för ytterligare ALK-diagnostisk testning med molekylär teknik och IHC. Dessa extra testresultat indikerade att majoriteten av fallen som var negativa med VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalysen också var negativa med ett annat ALK IHC-system, men var positiva med en eller flera molekylära analyser. Observera att snitt/objektglas från dessa fall överskrider de rekommenderade 3 månaderna för ALK IHC.
- Slutligen fanns det 14 fall i kohorten som var icke-informativa med FISH (inget resultat erhöles). Av dessa värderades 3 som positiva av båda avläsarna med VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys. Dessutom fanns det 19 fall där FISH-analysen inte kunde utföras, baserat på H&E-objektglaset (främst på grund av att tumörinnehållet var för lågt). Av dessa värderade båda avläsarna ALK IHC-färgningsresultaten som positiva i 4 fall. I medeltal hade därför 21 % av fallen en positiv ALK-status med VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys där FISH-resultat inte erhöles.

En reproducerbarhetsstudie mellan olika laboratorier på BenchMark XT-Instrumentet

En reproducerbarhetsstudie mellan olika laboratorier för VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys utfördes för att demonstrera reproducerbarheten av analysen vid bestämning av klinisk ALK-status på BenchMark XT-instrumentet, med användning av NSCLC-vävnadsprover (6 ALK-positiva och 6 ALK-negativa) som kördes på 3 reagenssatser, på 3 instrument och under 5 spridda dagar på tre externa laboratorier. Provena randomiserades och utvärderades av totalt 6 avläsare (2 avläsare/laboratorium) och blindades för kohortens kliniska ALK-status. Denna kohort innehöll 180 objektglas, som genererats från 12 NSCLC-fall, positiva och negativa för ALK-uttryck av IHC och FISH. Dessa fall färgades i replikat över 21 dagar vid de tre laboratorierna. Se Tabell 23 för resultat. Acceptansgraden för morfologi och bakgrund i dessa studier var 100 %. Reproducerbarhetsstudien mellan olika laboratorier (ILR) för VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys på BenchMark XT-instrumentet tillhandahöll jämförelser för genomsnittlig positiv överenskommelse (APA) och genomsnittlig negativ överenskommelse (ANA) för mellan-plats, mellan-läsare, och mellan-körning (dag) utförda parvis med användning av utvärderbara observationer.

Tabell 23. ILR: Överensstämmelsefrekvenser för VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys på BenchMark XT-instrumentet (n = 180 utvärderade objektglas).

Överensstämmelsefrekvenser för reproducerbarhet mellan laboratorier (klinisk ALK-status)	Genomsnittlig positiv överensstämmelse (95 % KI)	Genomsnittlig negativ överensstämmelse (95 % KI)	Total procentuell överensstämmelse (95 % KI)
Mellan-plats (3 laboratorier)	93,8 % (76,2-100 %)	94,9 % (79,2-100 %)	94,4 % (83,3-100 %)
Mellan-dag (5 ej intilliggande dagar)	99,1 % (96,4-100 %)	99,2 % (96,9-100 %)	99,2 % (97,5-100 %)
Mellan-avläsare (2 avläsare/laboratorium)	98,8 % (95,2-100 %)	99,0 % (95,8-100 %)	98,9 % (96,7-100 %)

En reproducerbarhetsstudie mellan olika laboratorier på BenchMark ULTRA-instrument

En ytterligare reproducerbarhetsstudie mellan olika laboratorier för VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys slutfördes för att demonstrera reproducerbarheten av analysen vid bestämning av klinisk ALK-status på BenchMark ULTRA-instrumentet, med användning av NSCLC-vävnadsprover (7 ALK-positiva och 7 ALK-negativa) som kördes på 3 reagenssatser, 3 instrument och under 5 spridda dagar på tre externa laboratorier på BenchMark ULTRA-instrument. Proverna randomiserades och utvärderades av totalt 6 avläsare (2 avläsare/laboratorium) och blindades för kohortens kliniska ALK-status. Denna kohort innehöll 210 objektglas, som genererats från 14 NSCLC-fall, positiva och negativa för ALK-uttryck av IHC och FISH. Dessa fall färgades i replikat över 21 dagar vid de tre laboratorier. Se Tabell 24 för resultat. Den slutliga acceptansfrekvensen för all sammanslagen data var 99 %. Acceptansgraden för morfologi och bakgrund i dessa studier var 100 %. Se Tabell 25 för resultat.

ILR-studien för VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys på BenchMark ULTRA-instrumentet tillhandahöll positiv, procentuell överensstämmelse (PPA) och negativ, procentuell överensstämmelse (NPA) i alla utvärderingsbara observationer som erhöles från studien genom att samla alla laboratorier, avläsare och dagar, vid användning av konsensuspoäng som referensstandard.

Tabell 24. ILR: Överensstämmelsefrekvenser för VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys på BenchMark ULTRA-instrument (n = 210 utvärderade objektglas).

Överensstämmelsefrekvenser för reproducerbarhet mellan laboratorier (klinisk ALK-status)	Positiv överensstämmelse i procent (95 % KI)	Negativ överensstämmelse i procent (95 % KI)	Total procentuell överensstämmelse (95 % KI)
Över alla utvärderingsbara observationer	92,8 % (88,4, 95,6 %)	100,0 % (98,2, 100,0 %)	96,4 % (94,1, 97,8 %)

Tabell 25. Reproducerbarhet mellan laboratorier: Överensstämmelsefrekvenser för precisionen mellan avläsare för VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys på BenchMark ULTRA-instrument (n = 210 utvärderade objektglas).

Överensstämmelsefrekvenser för reproducerbarhet mellan laboratorier (klinisk ALK-status) överensstämmelsefrekvenser mellan avläsare	Genomsnittlig positiv överensstämmelse (95 % KI)	Genomsnittlig negativ överensstämmelse (95 % KI)	Total procentuell överensstämmelse (95 % KI)
Avläsare A1 vs A2	97,0 % (87,5-100 %)	97,3 % (89,5-100 %)	97,1 % (90,2-99,2 %)
Avläsare B1 vs B2	93,5 % (71,4-100 %)	94,7 % (81,0-100 %)	94,2 % (86,0-97,7 %)
Avläsare C1 vs C2	92,3 % (66,7-100 %)	93,2 % (74,7-100 %)	92,8 % (84,1-96,9 %)
Totalt	94,3 % (75,6-100 %)	95,1 % (81,6-100 %)	94,7 % (84,1-100 %)

Metodjämförelsestudie på BenchMark XT-instrument

Metodjämförelsestudiekohorterna genererades från två oberoende, randomiserade kliniska prövningar av crizotinib (betecknade studie nr 1 och studie nr 2) som omfattade patienter med ALK-positiv NSCLC. ALK-status för dessa patienter bestämdes med användning av Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit klinisk prövningsanalys vid multipla centrallaboratorier. Giltiga Vysis ALK FISH-resultat erhöles för totalt 1644 NSCLC-vävnadsprover (1018 och 626 prover för studie nr 1 respektive studie nr 2).

I metodjämförelsestudien med VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys sändes prover från patienter som var screenade för studie nr 1 och nr 2 till ett centralt laboratorium för infärgning med VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys och

utvärdering för ALK IHC-status baserat på kriterier för poängsättningsalgoritmen för VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys (Tabell 5). Av proverna som gav giltiga Vysis ALK FISH-resultat i klinisk prövningsscreening, gav 933 prover från studie nr 1 (Tabell 26) och 598 prover från studie nr 2 (Tabell 28) också giltiga resultat för VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys.

Antalet prover som gav ALK-positiva och ALK-negativa resultat för varje analys visas i tabellerna 26 och 28 för studiekohort nr 1 respektive nr 2. Överensstämmelsefrekvenserna mellan de två analysena visas i tabell 27 och 29 för studiekohort nr 1 respektive nr 2. De rapporterade positiva och negativa procentuella överensstämmelsefrekvenserna var 86,0 % respektive 96,3 %, för studie nr 1 (Tabell 27) och 92,7 % respektive 94,8 %, för studie nr 2 (Tabell 29).

Tabell 26. ALK-statusjämförelse i NSCLC-prover (kohort från studie nr 1) bestämdes med användning av VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys kontra Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.

ALK-status		Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		
		Positivt	Negativt	Totalt
VENTANA anti-ALK (D5F3) antikropp	Positivt	154	28	182
	Negativt	25	726	751
	Totalt	179	754	933

Tabell 27. Överensstämmelsefrekvenser mellan VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys och Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit i studie nr 1.

Överensstämmelsefrekvenser mellan ALK-analyser	Positiv överensstämmelse i procent (95 % KI)	Negativ överensstämmelse i procent (95 % KI)	Övergripande överensstämmelse i procent (95 % KI)
VENTANA anti-ALK (D5F3) antikropp och Vysis ALK Break-Apart FISH Probe Kit	86,0 % (80,2-90,4 %)	96,3 % (94,7-97,4 %)	94,3 % (92,6-95,6 %)

Tabell 28. Jämförelsekohorten för ALK-status från studie nr 2 i NSCLC-prover bestämdes med användning av VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys kontra Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.

ALK-status		Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		
		Positivt	Negativt	Totalt
VENTANA anti-ALK (D5F3) antikropp	Positivt	179	21	200
	Negativt	14	384	398
	Totalt	193	405	598

Tabell 29. Överensstämmelsefrekvenser mellan VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys och Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit i studie nr 2.

Överensstämmelsefrekvenser mellan ALK-analyser	Positiv överensstämmelse i procent (95 % KI)	Negativ överensstämmelse i procent (95 % KI)	Övergripande överensstämmelse i procent (95 % KI)
VENTANA anti-ALK (D5F3) antikropp och Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit	92,7 % (88,2-95,6 %)	94,8 % (92,2-96,6 %)	94,1 % (92,0-95,8 %)

Observera att det inte verifierats att vävnadsprover som användes i studie nr 1 och studie nr 2 framställts enligt de provframställningsförfaranden som rekommenderas för VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys.

Klinisk resultatstudie för Crizotinib

Den kliniska effektanalysen för VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys som en diagnostisk anordning för val av patienter som kan dra nytta av behandling med crizotinib, ett ALK-målinriktat medel, baserades på studie nr 1. Dessa patienter testades med VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys under metodjämförelsestudien samt en ytterligare studie. Studie nr 1 var en multicenter, multinationell, randomiserad, öppen, fas 3 effekt- och säkerhetsstudie av crizotinib kontra första linjens kemoterapi (pemetrexed/cisplatin eller pemetrexed/karboptatin) hos tidigare obehandlade patienter med ALK-positiv, framskriden icke-skvämös NSCLC. Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit (ALK FISH) användes för att bestämma ALK-positivitet och lämplighet för studie nr 1. Baserat på analysresultaten för Vysis ALK FISH hamnade 343 patienter i den randomiserade uppsättningen (172 i crizotinib-gruppen och 171 i kemoterapi-gruppen). I den kliniska resultatstudien för VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys testades vävnadsprover från studie nr 1 i efterhand med VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys. Av de 343 patienter som ingick i studie nr 1 hade 133 testats med VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys under metodjämförelsestudieprotokollet och ytterligare 39 patienter hade testats under ett separat studieprotokoll, för totalt 172 patienter testade med VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys. Av dessa patienter diagnosticerades 166 som ALK-positiva eller ALK-negativa av ALK (D5F3) IHC. Det totala effektresultatet för dessa patienter sammanfattas enligt resultaten från VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys i Tabell 30.

Tabell 30. Klinisk nytta av crizotinib (progressionsfri överlevnad) för patienter inskrivna i studie nr 1.

ALK-status		HR [a]	SE [a]	95 % CI [a]	Provstorlek	
					Kemoterapigrupp	Crizotinib-grupp
Totalt antal inskrivna	FISH+	0,454	0,139	(0,346; 0,596)	171	172
ALK IHC-testade	FISH+ [b]	0,407	0,214	(0,267; 0,618)	82	90
	FISH+/IHC+	0,401	0,237	(0,252; 0,639)	63	78
	FISH+/IHC-	1,711	0,703	(0,431; 6,789)	17	8

[A] Observerat riskförhållande (HR) för progressionsfri överlevnad (PFS) av crizotinib kontra kemoterapi; standardavvikelse (SE) och 2-sidigt 95 % konfidensintervall (CI). Resultat uppskattades med hjälp av en skiktad Cox-modell med följande skikt: ras, hjärnmetastaser och ECOG-poäng.

[B] För två ALK FISH-positiva patienter i kemoterapi-gruppen och 4 patienter i crizotinib-gruppen erhöles inget positivt eller negativt ALK-resultat.

Ytterligare imputeringsanalyser utfördes för att inkludera patienter med saknade eller ogiltiga VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalytestresultat och för att utvärdera studieslutsatsernas robusthet. Statistisk analys av avvikande patienter som inte var inskrivna i studie nr 1 involverade simulering av en rad möjliga utfall för dessa patienter. Resultat från alla hypotetiska analyser var i allmänhet liknande resultaten från den primära effektanalysen.

FISH+/IHC- avvikande fall från studie nr 1:

Metodjämförelsestudie

I metodjämförelsestudien (tabell 26 och 27) utvärderades 25 patienter från studie nr 1 som FISH+/IHC-. Medianpoängen för Vysis ALK FISH (% tumörceller positiva för ALK-genförändringar) var 20 % (medelvärde 31,6 %, SD 21,58 %) och för 14 av dessa fall var FISH-poängen 25 % eller lägre. Även om alla dessa fall hade Vysis ALK FISH-poäng över 15 %-gränsen för ALK-positivitet, var deras poäng inom den osäkra FISH-zonen (10 %–50 %). Däremot observerades att FISH-medelpoängen för alla inskrivna patienter som testades med IHC var 58 % (medel 56,9 %, SD 21,97 %).

Klinisk resultatstudie

I den kliniska resultatstudien utvärderades 25 patienter inskrivna i studie 1 som FISH+/IHC- (se sista raden i tabell 30). Åtta av dessa fall randomiserades till den kliniska studiens crizotinib-grupp. Av dessa patienter hade fem FISH-poäng som låg mycket nära FISH-gränsvärdet (15 %–18 % av tumörceller positiva för ALK-genförändringar) och uppvisade även objektiv progression eller stabil sjukdom/inget svar. Två av de 8 patienterna hade FISH-poäng utanför den osäkra FISH-zonen (66 % och 72 % av tumörceller positiva för ALK-genförändringar) och uppvisade en partiell tumörrespons. Den åttonde IHC-patienten var FISH- och felaktigt inskriven; denna patient uppvisade ett obestämt svar.

FISH-/IHC+ avvikande fall från studie nr 1

I metodjämförelsestudien för VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys utvärderades 28 fall som screenats för studie nr 1 som FISH-/IHC+. Eftersom FISH var den kliniska studieanalysen och endast fall med FISH+ var inskrivna i studie nr 1, finns inga tillgängliga utfallsdata för avvikande fall från FISH-/IHC+.

Klinisk resultatstudie för ceritinib

Den kliniska effektanalysen för VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys som en diagnostisk anordning för val av patienter som kan dra nytta av behandling med ceritinib baserades på en öppen, randomiserad, aktivt-kontrollmulticenter, fas 3 studie (studie nr 3) med oralt ceritinib. Denna studie jämförde den kliniska effekten och säkerheten vid ceritinib-behandling med den för kemoterapi (platinabaserad dublett med pemetrexed följt av pemetrexed-underhåll hos patienter utan progressiv sjukdom efter 4 cykler) hos tidigare obehandlade vuxna patienter med ALK-positiv, lokalt framskriden eller metastaserande, icke-skvämös NSCLC. VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys användes på BenchMark XT-instrumentet för att testa totalt 1778 patienter för studie 3-lämplighet, vilket krävde en positiv ALK-status. Totalt 376 patienter vars tumörer gav ALK-positiva resultat från analysen var i den randomiserade uppsättningen (189 i ceritinib-gruppen och 187 i kemoterapi-gruppen). Det totala effektresultatet för de ceritinib-behandlade patienterna sammanfattas i Tabell 31. Ceritinib visade en statistiskt signifikant och kliniskt meningsfull fördel jämfört med kemoterapi, med en riskreduktion på 45 % i PFS per BIRC (HR=0,55; 95 % CI: 0,42, 0,73; p < 0,001), för patienter som valts med VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys. Median PFS per BIRC-bedomning var 16,6 månader (95 % CI: 12,6, 27,2) och 8,1 månader (95 % CI: 5,8, 11,1) för ceritinib-respektive kemoterapi-grupper.

Tabell 31. Klinisk nytta av ceritinib (progressionsfri överlevnad) för patienter inskrivna i studie 3.

Progressionsfri överlevnad	ZYKADIA (N = 189)	Kemoterapi (N = 187)
Median, månader (95 % CI) [a]	16,6 (12,6; 27,2)	8,1 (5,8; 11,1)
HR (95 % CI) [b]	0,55 (0,42; 0,73)	
p-värde [c]	<0,0001	

HR = riskförhållande; CI = konfidensintervall; BIRC = Blindad, fristående granskningsskommitté; NR = ej uppnådd; NE = ej uppskattningsbart

[a] Uppskattades med Kaplan-Meier-metoden.

[b] En Cox-regressionsmodell stratifierat efter randomiseringstratifieringsfaktorer (allmäntillstånd enligt WHO: 0 kontra 1–2; närvaro eller frånvaro av BM, närvaro eller frånvaro av föregående neo/adjuvant kemoterapi) användes för att uppskatta riskkvot för PFS, tillsammans med 95 % CI baserat på Wald-testet.

[c] Baserat på stratifierat log rank-test (samma skiktning som [b]).

Godtagbara färgningsfrekvenser för VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys i populationen som man hade för avsikt att diagnostisera (de 1778 patienter som testats med analysen) rapporteras i Tabell 32. Även frekvensen av acceptabel morfologi och acceptabel bakgrund för objektglas färgade med VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys rapporteras också. För 122 prover misslyckades det initiala färgningsförsöket med VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys och ett andra färgningsförsök utfördes. Vid det slutliga färgningsförsöket förblev 48 av de 122 proverna oacceptabla (1 på grund av ogiltig körningskontroll, 30 på grund av oacceptabel H&E, och 12 på grund av oacceptabel negativ reagenskontroll, 1 på grund av oacceptabel bakgrund, 2 på grund av både oacceptabel bakgrund och morfologi, och 2 på grund av ej utvärderbara IHC-objektglas). VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys uppvisade hög initial och slutlig total acceptansfrekvens för färgning; 93,1 % respektive 97,3 %. Slutlig acceptansfrekvens för morfologi och bakgrund var 99 % eller högre.

Tabell 32. Initiala och slutliga färgningsprestandaegenskaper för VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys för NSCLC-studieprover screenade för inskrivning i studie nr 3.

Utvärderade färgningsattribut	Acceptansfrekvens % (n/N) (95 % CI)	
	Initial*	Slutlig**
Total ALK IHC-acceptansfrekvens för färgning	93,1 % (1656/1778) (91,9-94,2 %)	97,3 % (1730/1778) (96,4-98,0 %)
Bakgrundsfärgning	99,0 % (1655/1672) (98,4-99,4 %)	99,8 % (1727/1730) (99,5-99,9 %)
Morfologi	99,0 % (1657/1674) (98,4-99,4 %)	99,9 % (1728/1730) (99,6-100 %)

* Initialt färgningsförsök

** Slutligt färgningsförsök

Klinisk resultatstudie för alectinib

Den kliniska effektanalysen för VENTANA ALK (D5F3) antikropp som en diagnostisk anordning för val av patienter som kan dra nytta av behandling med alectinib baserades på en öppen, randomiserad, aktivt-kontrollmulticenter, fas 3 studie (studie nr BO28984) med oralt alectinib. Denna studie jämförde den kliniska effekten och säkerheten vid alectinibbehandling med crizotinibbehandling hos tidigare obehandlade vuxna patienter med ALK-positiv, lokalt framskriden eller metastaserande NSCLC. VENTANA ALK (D5F3) antikropp användes på BenchMark XT-instrumentet för att testa totalt 1239 patienter för lämplighet för studie nr BO28984, vilket krävde en positiv ALK-status genom central testning. Sammanlagt 303 patienter, vars tumörer gav ALK-positiva resultat från analysen, randomiserades och analyserades för effekt (152 i alectinib-gruppen och 151 i crizotinib-gruppen). De övergripande effektesultatet sammanfattas i Tabell 33. Alectinib påvisade en statistiskt signifikant och kliniskt meningsfull fördel jämfört med crizotinib, med en riskreduktion på 53 % i PFS, enligt prövarens bedömning (HR = 0,47; 95 % CI: 0,34, 0,65; $p < 0,0001$) och en 50 % riskreduktion i PFS per IRC (HR = 0,50, 95 % CI: 0,36, 0,7; $p < 0,0001$), för patienter som utvalts, vilka använda VENTANA ALK (D5F3) antikroppen. Median PFS enligt prövarens bedömning har inte uppnåtts i alectinib-gruppen och var enligt IRC-bedömningen 25,7 månader (95 % CI: 19,9, NE) och 10,4 månader (95 % CI: 7,7, 14,6) för alectinib- respektive crizotinib-grupper.

Tabell 33. Klinisk nytta av alectinib eller crizotinib (progressionsfri överlevnad) för patienter inskrivna i studie nr BO28984.

Progressionsfri överlevnad – Prövarbedömd	Alectinib (N = 152)	Crizotinib (N = 151)
Median, månader (95 % CI) [a]	NE (17,7, NE %)	11,1 (9,1,13,1 %)
HR (95 % CI) [b]	0,47 (0,34, 0,65 %)	
p-värde [c]	<0,0001	
Progressionsfri överlevnad – Bedömd av IRC	Alectinib (N = 152)	Crizotinib (N = 151)
Median, månader (95 % CI) [a]	25,7 (19,9, NE %)	10,4 (7,7, 14,6 %)
HR (95 % CI) [b]	0,50 (0,36, 0,70 %)	
p-värderad [c]	<0,0001	

HR = riskförhållande; CI = konfidensintervall; IRC = fristående granskningskommitté; NE = ej uppskattningsbart

[a] Uppskattades med Kaplan-Meier-metoden.

[b] Riskkvoten uppskattades med Cox-regression, stratifierad för kovariaterna Ras (asiatisk kontra icke-asiatisk) och CNS-metastaser vid baslinjen (närvaro/frånvaro) av IRC

[c] Baserat på stratifierat log rank-test (samma skiktning som [b]).

Godtagbara färgningsfrekvenser för VENTANA ALK (D5F3) antikropp i populationen som man hade för avsikt att diagnostisera (de 1239 patienter som testats med analysen) var jämförbara med resultat i studie A2301.

Slutsats

VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys är reproducerbar med sina färgningsresultat för klinisk ALK-status på BenchMark ULTRA-, BenchMark XT-, och BenchMark GX-instrumenten. Den binära poängsättningsalgoritmen är i hög grad reproducerbar mellan avläsare. Analysen överensstämmer med Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit för ALK-status. VENTANA anti-ALK (D5F3) antikroppsanalys kan användas vid identifiering av patienter som är lämpade för behandling med XALKOR® (crizotinib), ZYKADIA® (ceritinib), eller ALECENSA® (alectinib).

REFERENSER

- Kutok JL, Aster JC, et al. Molecular biology of anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large-cell lymphoma. *J Clin Onc.* 2002;20(17):3691-3702.
- Iwahara T, et al. Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene.* 1997;14:439-49.
- Soda M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature.* 2007;448(7153):561-66.
- Inamura K, et al. EML4-ALK fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers. *J Thorac Oncol.* 2008;3(1):13-17.
- Choi YL, et al. Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2008;68(13):4971-6.
- Koivunen JP, et al. EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(13):4275-83.
- Shimura K, et al. EML4-ALK fusion transcripts, but no NPM-, TPM3-, CLTC-, ATIC-, or TFG-ALK fusion transcripts, in non-small cell lung carcinomas. *Lung Cancer.* 2008;61:163-9.
- Takeuchi K, et al. Multiplex reverse transcription-PCR screening for EML4-ALK fusion transcripts. *Clin Cancer Res.* 2008;14(20):6618-24.
- Shaw AT, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol.* 2009;27(26):4247-53.
- Yi ES, et al. Correlation of IHC and FISH for ALK gene rearrangement in non-small cell lung carcinoma: IHC score algorithm for FISH. *J Thorac Oncol.* 2011;6(3):459-65.
- McLeer-Florin A, et al. Dual IHC and FISH testing for ALK gene rearrangement in lung adenocarcinomas in a routine practice: a French study. *J of Thorac Oncol.* 2012;7(2):348-54.
- Christensen JG, et al. Cytoreductive antitumor activity of PF-2341066, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experimental models of anaplastic large-cell lymphoma. *Mol Cancer Ther.* 2007;6(12 Pt 1):3314-22.
- Yamazaki S, et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of crizotinib for anaplastic lymphoma kinase inhibition and antitumor efficacy in human tumor xenograft mouse models. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;340(3):549-57.
- XALKORI package insert. Pfizer. Document ID:6427427a-821b-48b4-8f06-0477f0ae4e36. LAB-0441-6.0 June 2014
- ZYKADIA package insert Novartis. Document ID:T2015-114/T2015-115. July 2015.
- H Sakamoto, et al. CH5424802, a selective ALK inhibitor capable of blocking the resistant gatekeeper mutant. *Cancer Cell.* 2011;19(5):679-90.
- Kodama T, et al. Antitumor activity of the selective ALK inhibitor alectinib in models of intracranial metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014;75(5):1023-28.
- Gadgeel S, et al. Safety and activity of alectinib against systemic disease and brain metastases in patients with crizotinib-resistant ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (AF-002JG): results from the dose finding portion of a phase 1/2 study. *Lancet Oncol.* 2014;15(10):1119-28.
- Shaw A, et al. Alectinib in ALK-positive, crizotinib-resistant, non-small-cell lung cancer: a single-group, multicenter, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(2):234-42.
- ALECENSA package insert
- Galetta D, et al. The emerging role of ALK inhibitors in the treatment of advanced non-small cell lung cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2012 Suppl 2:S545-54.
- Jokoji R, et al. Combination of morphological feature analysis and immunohistochemistry is useful for screening of EML4-ALK-positive lung adenocarcinoma. *J Clin Pathol.* 2010;63(12):1066-70.
- Mino-Kenudson M, et al. A novel, highly sensitive antibody allows for the routine detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas by standard immunohistochemistry. *Clin Cancer Res.* 2010;16(5):1561-71.

24. Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and practice of Histotechnology, 2nd edition. St. Louis: The C.V. Mosby Company; 1980.
25. Carson F, Hladik C. Histotechnology: A Self Instructional Text, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
26. Roche PC, Hsi ED. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. In: NR Rose, ed. ASM Press; 2002.
27. NordiQC: Nordic Immunohistochemical Quality Control Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) (lung protocol). Assessment Run 39 2013.
http://www.nordiqc.org/Run-39-B16-H4/Assessment/Run39_ALK.pdf. 07-12-2013. Accessed February 26, 2014.
28. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2011.
29. CLSI. Quality Assurance for Design Control and Implementation of Immunohistochemistry Assays: Approved Guideline-Second Edition. CLSI document I/LA28-A2 (ISBN 1-56238-745-6). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 2011.
30. Herman GE, et al. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech Histochem. 1991;66(4):194-9.
31. Omata M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen. A possible source of error in immunohistochemistry. Am J Clin Pathol. 1980;73(5):626-32.
32. Nadjji M, et al. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. Lab Med. 1983;14:767.

IMMATERIELL EGENDOM

VENTANA, BENCHMARK, OPTIVIEW och logotypen för VENTANA är varumärken som tillhör Roche.

Alla övriga varumärken tillhör sina respektive ägare.

© 2017 Ventana Medical Systems, Inc.

Säljs under licens från



KONTAKTINFORMATION



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Tyskland



www.ventana.com