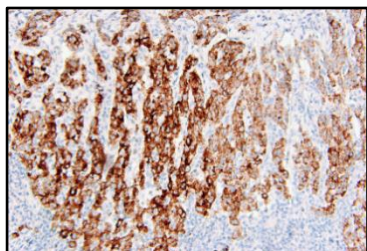


VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

REF 790-4794

06679072001

IVD  50



Slika 1. Izražanje protitelesa na nedrobnoceličnem karcinomu pljuč (non-small cell lung carcinoma) pri analizi s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3).

PREDVIDENA UPORABA

Protiteleso VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody VENTANA anti-ALK (D5F3) je namenjeno laboratorijski uporabi za odkrivanje beljakovine, imenovane anaplastična limfomska kinaza (ALK), v tkivu nedrobnoceličnega karcinoma pljuč (NSCLC), fiksiranega v formalinu in vklopljenega v parafin, obarvanega z instrumenti za samodejno imunohistokemijsko barvanje preparatov serije BenchMark IHC/ISH. Uporablja se kot pomoč pri odkrivanju bolnikov, primernih za zdravljenje z zdravilom

XALKORI® (krizotinib), ZYKADIA® (ceritinib) ali ALECENSA® (alektinib).

Rezultate, pridobljene s tem izdelkom, mora interpretirati usposobljen patolog, skupaj s histološkim pregledom, relevantnimi kliničnimi informacijami in ustreznimi kontrolami.

To protiteleso je namenjeno diagnostični uporabi *in vitro* (IVD).

POVZETEK IN OBRAZLOŽITEV

Beljakovina, imenovana anaplastična limfomska kinaza (ALK), spada v naddružino inzulinjskih receptorjev oz. receptorja tirozin kinaze.¹ ALK je membranski glikoprotein tipa I, ki se navadno izraža v živčnem sistemu.² Gen ALK se nahaja na kromosomu 2p23, sestavljen pa je iz 2 velikih intronov in 26 eksonov.¹ Molekularna patogeneza ALK se začne s kromosomskimi preureditvami, ki povežejo kodirajoče regije na 3'-koncu za domeno medceličnega signaliziranja ALK ter elemente promotora in kodirajoče regije na 5'-koncu drugih genov. Elementi promotora in kodirajoče regije na 5'-koncu povzročijo čezmerno izražanje in od ligandov neodvisno oligomerizacijo himernih beljakovin, kar je pogosto za neoplazme pri ljudeh, ki jih povzroči fuzijska beljakovina z lastnostmi tirozin kinaze.

Leta 2007 so v celičnih linijah NSCLC in arhiviranih kliničnih vzorcih odkrili inverzijo kromosoma 2p, ki je povzročila nastanek produkta fuzijskega gena, ki je vseboval dele z mikrotubuli povezanega beljakovinskega gena iglokožcev 4 (echinoderm microtubule associated protein-like 4 (EML4) gene) in gena ALK.³ Nadaljnje objavljene študije so pokazale, da je inverzija EML4-ALK ustvarila najmanj 9 katalitično aktivnih različic kinazne fuzijske beljakovine, od katerih je vsaka vsebovala enak del domene C-terminalne kinaze ALK.⁴⁻⁸ Tako kot fuzijski geni ALK, ki so bili prvič opaženi v anaplastičnem velikoceličnem limfomu (ALCL), imajo tudi fuzijske beljakovine EML4-ALK sposobnost preobrazbe. Skladno s tem so poročali, da je bilo izražanje EML4-ALK v pljučnih alveolarnih epiteljskih celicah pri transgenih miših močan onkogeni faktor.⁹

KLINIČNA POMEMBOST

NSCLC je najpogostejša vrsta pljučnega raka. Obstajajo tri običajne vrste NSCLC, in sicer adenokarcinom, ploščatocelični karcinom in velikocelični karcinom.

ALK sedaj šteje med ključne onkogene faktorje pri NSCLC. Prevladujoči fuzijski partner je EML4, vendar so ugotovili tudi druge fuzijske partnerske gene.^{10,11} Pojavnost preureditev gena ALK se giblje od 2–7 %, kar pomeni približno 6.000 ALK-pozitivnih bolnikov letno v Združenih državah Amerike (ZDA) oz. 40.000 bolnikov letno po vsem svetu.^{3,4,7}

Majhne vzorce tkiva je mogoče preprosto uporabiti za rutinsko imunohistokemijsko metodo (IHK). Ta metoda postane skupaj s protitelesi za zaznavanje antigenov pomembna za interpretacijo karcinoma ter predstavlja učinkovito orodje za patologa pri diagnosticiranju in prognozi bolezni. Eden od pomembnih označevalcev v NSCLC je ALK.

Veliko več preureditev gena ALK so ugotovili v vzorcih pljučnega adenokarcinoma kot v ploščatoceličnih ali drobnoceličnih histologijah.³⁻⁸ Nekateri dokazi kažejo na korelacijo med preureditvami gena ALK in NSCLC pri bolnikih, ki niso nikoli kadili ali so bili zmerni kadilci, čeprav to morda ni statistično pomemben kofaktor.^{3,4,7,9} Pomembno je dejstvo, da preureditve gena ALK redko sovpadajo z mutacijami EGFR, HER2 ali KRAS, kar dokazuje, da je ALK-pozitivnost ločen podtip bolezni.⁹ Zdravilo XALKORI® je selektivni ATP-kompetitivni malomolekulski zaviralec tirozinskih kinaz ALK, ROS1 in c-Met/hepatocitnega rastnega faktorja tirozin kinaze (HGFR) ter njihovih onkogenih različic (npr. fuzijskih beljakovin ALK ali ROS1 ali mutantskih različic c-Met/HGFR). Zdravilo XALKORI® je pokazalo od koncentracije odvisno zavrtje fosforilacije ALK in c-Met v celičnih analizah z uporabo tumorskih celičnih linij. Pokazalo je tudi protitumorsko učinkovanje pri miših s tumorskimi ksenotransplantati, ki so izražali fuzijske beljakovine EML4- ali NPM-ALK ali Met.^{12,13,14}

Zdravilo ZYKADIA® je zaviralec kinaze. Tarče, ki jih ZYKADIA® zavira, ugotovljene v biokemijskih ali celičnih analizah pri klinično relevantnih koncentracijah, vključujejo ALK, inzulinu podoben rastni faktor 1 (IGF-1R), inzulinjski receptor (InsR) in ROS1. Med temi zdravili ZYKADIA® najbolj učinkuje proti ALK. Zdravilo ZYKADIA® je zavrla avtofosforilacijo ALK, z ALK posredovano fosforilacijo navzdolnje signalne beljakovine STAT3 in proliferacijo od ALK odvisnih rakavih celic v analizah *in vitro* in *in vivo*.

Zdravilo ZYKADIA® je zavrla *in vitro* proliferacijo celičnih linij, ki izražajo fuzijski beljakovini EML4-ALK in NPM-ALK, ter pokazalo od odmerka odvisno zavrtje rasti ksenotransplantata z EML4-ALK-pozitivnim NSCLC pri miših in podganah.¹⁵

Klinična pomembnost preureditev gena ALK je bila dokazana v randomiziranih, aktivno nadzorovanih kliničnih preizkusih zdravila XALKORI®, ki jih je izvedla družba Pfizer, in zdravila ZYKADIA®, ki jih je izvedla družba Novartis.^{14,15}

Zdravilo ALECENSA® je visoko selektiven in močan zaviralec tirozin kinaze ALK in RET, ki zavira znotrajcelične signalne poti, ki sodelujejo pri proliferaciji tumorskih celic in preživetju, ter tako spodbuja odmrtnje rakavih celic in zavira rast tumorskih celic ter njihovo proliferacijo.¹⁶ Na osnovi predkliničnih podatkov zdravilo ALECENSA® ni substrat izločevalnih prenašalcev (PGP ali BCRP) v krvno-možganski pregradi ter se zato lahko razširi v osrednji živčni sistem in se tam ohrani. Zdravilo ALECENSA® je sprožilo regresijo tumorja pri predkliničnih modelih mišjih ksenotransplantatov, vključno s protitumorsko aktivnostjo v možganih, in podaljšalo preživetje pri modelih intrakranialnih tumorjev pri živalih.¹⁷ Zdravilo ALECENSA® se dobro prenaša in ima obvladljiv varnostni profil.¹⁸⁻²⁰

Družba Ventana je pokazala ujemanje analize s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) in kompleta Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit (ALK FISH) pri določanju statusa ALK pri bolnikih z NSCLC. ALK FISH lahko predstavlja tehnične ovire pri ocenjevanju rezultatov obarvanja. Prerazporejanje znotraj kromosomov lahko povzroči rahlo cepitev signalov, kar povzroči morebitne lažno negativne rezultate.²¹ Nedavne študije kažejo, da je IHK-analiza občutljiva in specifična za določanje statusa ALK ter je uspešna alternativa kompletu ALK FISH.^{10,11, 21-23} Družba Ventana je razvila analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) in pripadajoč algoritem za točkovanje za določanje statusa ALK v vzorcih NSCLC.

Rezultate barvanja tkivnih vzorcev analize s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) je treba interpretirati z uporabo priporočenega algoritma za točkovanje. Histološki tkivni preparati imajo prednost ohranjanja morfolologije tkiva, kar pomaga pri interpretaciji pozitivnosti vzorca na ALK. Vse histološke teste mora interpretirati patolog. Rezultate je treba dopolniti z morfološki preiskavami in ustreznimi kontrolami ter jih uporabiti skupaj z drugimi kliničnimi in laboratorijskimi podatki. Na ciljne antigene IHK-analiz vplivajo čas fiksacije, vrsta sredstva za fiksiranje in starost rezin, zato je treba zagotoviti združljivost priprave vzorca pred barvanjem (glejte Priročnik za interpretacijo za VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody za nedrobnocelični karcinom pljuč (NSCLC) kat. št. 1011879 in spodnji razdelek Posebne omejitve).

NAČELO POSTOPKA

VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody je kunčje monoklonsko primarno protiteleso, ki se veže na ALK v tkivnih rezinah, vklopljenih v parafin. Specifično protiteleso je mogoče prikazati z detekcijskim kompletom OptiView DAB IHC Detection Kit (kat. št. 760-700/06396500001), temu pa sledi komplet OptiView Amplification Kit (kat. št. 760-099/06396518001 (50 testov) ali 860-099/06718663001 (250 testov)). Več informacij poiščite v navodilih za uporabo, ki so priložena ustreznemu kompletu OptiView DAB IHC Detection Kit oz. OptiView Amplification Kit.

PRILOŽENI REAGENT

Protitelo VENTANA anti-ALK (D5F3) vsebuje rekombinantno kunčje monoklonsko protitelo in vsebuje dovolj reagenta za barvanje 50 preparatov.

En 5-mililitrski vsebnik protitelesa VENTANA anti-ALK (D5F3) vsebuje približno 70 µg kunčjega monoklonskega protitelesa (D5F3).

Protitelo je razredčeno v 0,08 M PBS s 3 % nosilne beljakovine in 0,05 % konzervansa ProClin 300.

Skupna koncentracija beljakovin v reagentu je približno 10 mg/ml. Koncentracija specifičnih protiteles je približno 14 µg/ml.

POTREBNI MATERIALI, KI NISO PRILOŽENI

- Kontrolno tkivo, kot so človeški slepič ali ALK-pozitivni in ALK-negativni vzorci nedrobnoceličnega karcinoma pljuč.
- Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (kat. št. 790-4795 / 06683380001)
- Mikroskopska objektna stekelca s pozitivnim nabojem
- Sušilna pečica, ki ohranja temperaturo 60 °C ± 5 °C
- Nalepke s črtnimi kodami
- Ksilen (histološke vrste)
- Etanol ali reagentni alkohol (histološke vrste)
 - 100-odstotna raztopina: nerazredčen etanol ali reagentni alkohol
 - 95-odstotna raztopina: zmešajte 95 delov etanola ali reagentnega alkohola in 5 delov deionizirane vode
 - 80-odstotna raztopina: zmešajte 80 delov etanola ali reagentnega alkohola in 20 delov deionizirane vode
- Deionizirana ali destilirana voda
- OptiView DAB IHC Detection Kit (kat. št. 760-700 / 06396500001)
- OptiView Amplification Kit (kat. No. 760-099 / 06396518001 (50 testov) ali 860-099 / 06718663001 (250 testov))
- EZ Prep Concentrate (10X) (kat. št. 950-102 / 05279771001)
- Reaction Buffer Concentrate (10X) (kat. št. 950-300 / 05353955001)
- LCS (Predilute) (kat. št. 650-010 / 05264839001)
- ULTRA LCS (Predilute) (kat. št. 650-210 / 05424534001)
- Cell Conditioning 1 (CC1) (kat. št. 950-124 / 05279801001)
- ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (kat. št. 950-224 / 05424569001)
- Hematoxylin II (kat. št. 790-2208 / 05277965001)
- Bluing Reagent (kat. št. 760-2037 / 05266769001)
- Trajno fiksno sredstvo (Permunt Fisher kat. št. SP15-500 ali enakovredno)
- Krovno stekelce (dovolj veliko, da pokrije tkivo, na primer VWR kat. št. 48393-060)
- Pripomoček za samodejno nanašanje krovnih stekelc (npr. Tissue-Tek SCA Automated Coverslipper)
- Svetlobni mikroskop
- Vpojni robčki

Reagenti za barvanje, kot so detekcijski kompleti in pomožne komponente VENTANA, vključno s kontrolnimi preparati z negativnimi in pozitivnimi tkivi, niso priloženi.

Vsi izdelki, navedeni v priloženih navodilih za uporabo, morda niso na voljo na vseh območjih. Obrnite se na svojega lokalnega predstavnika.

SHRANJEVANJE

Ko izdelek prejmete in kadar ga ne uporabljate, ga hranite pri temperaturi 2–8 °C. Ne zamrzujte.

Da bi zagotovili ustrezen vnos reagenta in stabilnost protitelesa, je treba po vsaki uporabi ponovno namestiti pokrovček in vsebnik takoj postaviti nazaj v hladilnik v pokončnem položaju. Vsak vsebnik s protiteleso je označen z datumom izteka roka uporabnosti. Če je pravilno shranjen, je reagent stabilen do datuma, navedenega na etiketi. Reagenta ne uporabljajte po datumu izteka roka uporabnosti.

PRIPRAVA VZORCA

Pri uporabi detekcijskih kompletov VENTANA in instrumentov za barvanje BenchMark IHC/ISH so za uporabo s tem primarnim protitelesom primerna rutinsko obdelana tkiva, fiksirana v formalinu in vklopljena v parafin.

Na osnovi modelov ksenotransplantatov, ustvarjenih iz človeške celične linije nedrobnoceličnega raka pljuč (NSCLC) NCI-H2228, ki je pozitivna na ALK, družba Ventana priporoča fiksacijo tkiva v 10-odstotnem nevtralnem pufriranem formalinu (NBF) za vsaj 6 ur.²⁴ Fiksiranje, ki traja manj kot 6 ur, povzroči znatno izgubo intenzivnosti obarvanja za ALK. Fiksacija v cinkovem formalinu je sprejemljiva, če traja vsaj 6 ur. Uporabljen količina mora biti od 15- do 20-krat večja od volumna tkiva. Nobeno sredstvo za fiksiranje v 24-urnem obdobju ne prodre več kot 2 do 3 mm globoko v neporozno oziroma 5 mm globoko v porozno tkivo. Fiksacijo lahko opravite pri sobni temperaturi (15–25 °C).²⁵

Sredstva za fiksiranje, kot so alkohol-formalin-očetna kislina (AFA), sredstvo za fiksiranje PREFER, B5 in druga kislina in/ali alkoholna sredstva za fiksiranje, so pokazala izgubo intenzivnosti obarvanja ALK pri vseh testiranih časih fiksacije (1 do 72 ur). Njihova uporaba s to analizo ni priporočena. Študije odlaganja fiksacije so pokazale tudi izgubo intenzivnosti obarvanja ALK, če vzorci ksenotransplantata niso bili fiksirani v 6 urah po izrezu. Za nadaljnje informacije o vplivu priprave vzorca na intenzivnost barvanja ALK glejte Priročnik za interpretacijo za VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody za nedrobnocelični karcinom pljuč (NSCLC), kat. št. 1011879.

Narezati je treba približno 4 µm debele rezine in jih položiti na predmetna stekelca s pozitivnim nabojem. Preparate je treba obarvati takoj, saj se lahko antigenost izrezanih tkivnih rezin sčasoma zmanjša in so lahko 3 mesece po rezanju iz parafinskega bloka neuporabne (glejte Priročnik za interpretacijo za VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody za nedrobnocelični karcinom pljuč (NSCLC) kat. št. 1011879 in razdelek Značilnosti delovanja v nadaljevanju).

OPOZORILA IN PREVIDNOSTNI UKREPI

- Za diagnostično uporabo *in vitro* (IVD).
- Samo za profesionalno uporabo.
- Upoštevajte, da so lahko preparati s pozitivnim nabojem dovzetni za okoljske vplive, kar povzroči neustrezno barvanje katere koli IHC-analize (*na primer*, pomanjkanje primarnega protitelesa ali kontrastnega barvila na tkivu). Za boljše razumevanje posledic okoljskih vplivov na preparate IHC s pozitivnim nabojem glejte belo knjigo N4629_0313B – Posledice okoljskih vplivov na različne vrste histoloških preparatov.
- Raztopina ProClin 300 se v tem reagentu uporablja kot konzervans. Razvrščena je kot dražljiva snov in lahko ob stiku s kožo povzroči preobčutljivost. Pri delu upoštevajte previdnostne ukrepe. Izogibajte se stiku reagentov z očmi, kožo in sluznicami. Uporabljajte zaščitna oblačila in rokavice.
- Z materiali človeškega ali živalskega izvora je treba ravnati kot z biološko nevarnimi materiali in jih zavreči ob upoštevanju ustreznih previdnostnih ukrepov.
- Izogibajte se stiku reagentov z očmi in sluznicami. Če reagenti pridejo v stik z občutljivimi površinami, jih temeljito sperite z veliko vode.
- Izogibajte se mikrobnim kontaminacijam reagentov, saj lahko povzročijo nepravilne rezultate.
- O priporočenem načinu odstranjevanja se posvetujte z lokalnimi in/ali državnimi organi.
- Več varnostnih informacij najdete v varnostnem listu izdelka in vodiču po simbolih in nevarnostih na www.ventana.com.

POSTOPEK BARVANJA

Analiza s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) je bila razvita za uporabo na instrumentih BenchMark IHC/ISH v kombinaciji z reagentom Rabbit Monoclonal Negative Control Ig, detekcijskim kompletom OptiView DAB IHC Detection Kit, amplifikacijskim kompletom OptiView Amplification Kit in s pomožnimi reagenti. Tabela 1, Tabela 2 in Tabela 3 prikazujejo priporočene protokole barvanja za vsak instrument.

To protitelo je bilo optimizirano za specifične inkubacijske čase, vendar mora uporabnik oceniti rezultate, pridobljene s tem reagentom. Odstopanje od protokola barvanja, ki ga prikazujejo Tabela 1, Tabela 2 in Tabela 3, lahko povzroči lažno pozitivne ali lažno negativne rezultate. Za instrument BenchMark ULTRA je bil razvit postopek barvanja, specifičen za ALK, **U VENTANA ALK (D5F3)**. Pred izbiro pogojev protokola iz postopka barvanja, specifičnega za ALK, mora biti na instrumentu BenchMark ULTRA nameščen program VSS 12.3 s postopkom barvanja OptiView v5 ali novejšim.

Parametre za avtomatske postopke je možno prikazati, natisniti in urejati v skladu s postopkom v priročniku za uporabo instrumenta. Dodatne informacije o imunohistokemijskih postopkih barvanja so na voljo v ustreznih navodilih za uporabo detekcijskega kompleta VENTANA.

Tabela 1. Priporočeni protokol barvanja za analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) in reagentom Rabbit Monoclonal Negative Control Ig z detekcijskim kompletom OptiView DAB IHC Detection Kit in amplifikacijskim kompletom OptiView Amplification Kit na instrumentu BenchMark ULTRA.

Postopek barvanja: U VENTANA ALK (D5F3)	
Korak protokola	Vnos parametra
Protitelo (primarno)	VENTANA ALK AB – 16 min.\ (Nato izberite ZDA ali EU/ostalo) ali negativno kontrolo
Kontrastiranje	Hematoxylin II, 4 minute
Po kontrastiranju	Bluing, 4 minute

Tabela 2. Priporočeni protokol barvanja za analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) in reagentom Rabbit Monoclonal Negative Control Ig z detekcijskim kompletom OptiView DAB IHC Detection Kit in amplifikacijskim kompletom OptiView Amplification Kit na instrumentu BenchMark XT.

Vrsta postopka	Metoda
Možnost sinhronizacije IHC	Izbrano*
Deparafinizacija	Izbrano
Kondicioniranje celic (razkrivanje antigena)	Cell Conditioning 1, 92 minut, 100 °C
Predhodni primarni zaviralec peroksidaze	Izbrano
Protitelo (primarno)	Ventana anti-ALK (D5F3) ali Rabbit Mono Neg 16 minut, 37 °C
OptiView HQ Univ Linker	12 minut
OptiView HRP Multimer	12 minut
OptiView Amplification	Izbrano
OV AMP H2O2, OV Amplifier	8 minut
OV AMP Multimer	8 minut
Kontrastiranje	Hematoxylin II, 4 minute
Po kontrastiranju	Bluing, 4 minute

* Ta izbirni korak je na voljo samo, ko se izvaja XT OptiView DAB v4, in ni na voljo pri prejšnjih različicah programske opreme.

Tabela 3. Priporočeni protokol barvanja za analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) in reagentom Rabbit Monoclonal Negative Control Ig z detekcijskim kompletom OptiView DAB IHC Detection Kit in amplifikacijskim kompletom OptiView Amplification Kit na instrumentu BenchMark GX.

Vrsta postopka	Metoda
Deparafinizacija	Izbrano
Kondicioniranje celic (razkrivanje antigena)	Cell Conditioning 1, 92 minut, 100 °C
Predhodni primarni zaviralec peroksidaze	Izbrano
Protitelo (primarno)	Ventana anti-ALK (D5F3) ali Rabbit Mono Neg 16 minut, 37 °C
OptiView HQ Univ Linker	12 minut
OptiView HRP Multimer	12 minut
OptiView Amplification	Izbrano
OV AMP H2O2, OV Amplifier	8 minut
OV AMP Multimer	8 minut
Kontrastiranje	Hematoxylin II, 4 minute
Po kontrastiranju	Bluing, 4 minute

Zaradi odstopanj pri fiksaciji in obdelavi tkiv ter zaradi splošnih laboratorijskih instrumentov in okoljskih pogojev bo morda treba podaljšati ali skrajšati inkubacijo primarnega protitelesa, kondicioniranje celic ali predhodno obdelavo s proteazo na podlagi posameznih vzorcev, načina ugotavljanja in preferenc uporabnika. Za več informacij o spremenljivkah pri fiksaciji glejte »Immunohistochemistry Principles and Advances«.²⁶

KONTROLE

POSTOPKI NADZORA KAKOVOSTI

Rabbit Monoclonal Negative Control Ig

Ujemajočo kontrolo s stekelcem z negativnim reagentom je treba opraviti za vsak vzorec za pomoč pri interpretaciji rezultatov. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (kat. št. 790-4795 / 06683380001), protitelo za kontrolo z negativnim reagentom, je posebej prilagojeno za to analizo in se ga uporablja namesto primarnega protitelesa za ocenjevanje nespecifičnega barvanja. Postopek barvanja za kontrolo z negativnim reagentom mora biti enak inkubacijski dobi primarnega protitelesa. Uporaba druge kontrole z negativnim reagentom ali neuporaba priporočene kontrole z negativnim reagentom lahko povzroči napačne rezultate.

Kontrole na sistemski ravni

Kontrole na sistemski ravni je treba izvajati z vzorci bolnika. Ti so lahko človeški slepič²⁶ ali vzorci tkiva NSCLC, ki so dokazano ALK-pozitivni/negativni.

Kontrolno tkivo naj se pridobi pri obdukciji, z biopsijo ali kirurškim odvzemom in naj se pripravi ali fiksira čim prej na način, enak kot pri testnih rezinah. S tovrstnimi tkivi lahko nadzorujete vse korake postopka – od priprave tkiva do konca barvanja. Uporaba tkivnih rezin, ki so fiksirane ali obdelane drugače kot preizkusni vzorec, bo omogočala nadzor vseh reagentov in korakov metode, razen za fiksacijo in pripravo tkiva.

Kontrole s slepičem ali tkivom ALK-pozitivnega/negativnega NSCLC

ALK-pozitivno in ALK-negativno kontrolno tkivo je treba pregledati pri vsakem opravljenem postopku barvanja v sklopu analize VENTANA anti-ALK (D5F3).

Primeri NSCLC z obarvanjem, ki kaže na klinično ALK-pozitivno in klinično ALK-negativne rezultate, so primerni za optimalno kontrolo kakovosti, vključno z odkrivanjem manjših ravni degradacije reagenta ali težav z instrumentom izven specifikacij.

Tkivo človeškega slepiča vsebuje pozitivne in negativne elemente barvanja beljakovine ALK in je prav tako primerno za kontrolo na sistemski ravni. Pozitivno obarvane komponente tkiva potrdijo, da je bilo protitelo uporabljeno in da instrument pravilno deluje, negativni elementi barvanja pa odkrivajo manjše ravni degradacije reagenta ali težave z instrumentom izven specifikacij.

Ustrezno obarvanje ALK-pozitivnih in negativnih tkivnih komponent NSCLC in slepiča je opisano v Tabeli 4 in Tabeli 5 ter v Priročniku za interpretacijo za VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody za nedrobnocelični karcinom pljuč (NSCLC), kat. št. 1011879.

Kontrole iz dokazano pozitivnega in negativnega tkiva, uporabljene za spremljanje delovanja analize ALK na vzorcih bolnikov, je treba fiksirati in obdelati na podoben način kot vzorec bolnika. V nasprotnem primeru se tkivne kontrole lahko uporabijo le za nadzorovanje pravilnega delovanja testnih reagentov. Tkivnih kontrol ni dovoljeno uporabiti kot pomoč pri diagnosticiranju vzorcev bolnika.

Preverjanje testa

Pred prvo uporabo protitelesa oziroma sistema za barvanje v diagnostičnem postopku potrdite specifičnost protitelesa tako, da ga preizkusite na vrsti tkiv z znanimi imunohistokemijskimi (IHK) značilnostmi, ki predstavljajo ALK-pozitivna in ALK-negativna tkiva (glejte razdelek Postopki nadzora kakovosti v teh navodilih za uporabo in priporočila glede nadzora kakovosti v dokumentu College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist²⁷ ali odobrene smernice CLSI²⁸).

Te postopke nadzora kakovosti morate ponoviti za vsako novo serijo protiteles in pri vsaki spremembi parametrov analize. Za verifikacijo analize so primerna tkiva NSCLC z znanim statusom ALK ali vzorci človeškega slepiča.

RAZLAGA REZULTATOV

Avtomatiziran postopek imunskega barvanja VENTANA povzroči, da se rjavi reakcijski produkt DAB obori na mestih, kjer se nahaja antigen, ki ga lokaliziramo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3). Usposobljen patolog z izkušnjami v postopkih IHK mora pred interpretacijo rezultatov ovrednotiti kontrole z negativnim reagentom, kontrole na sistemski ravni in kvalificirati obarvan produkt.

Kontrola s pozitivnim/negativnim tkivom na ravni sistema

Za zagotovitev pravilnega delovanja vseh reagentov morate najprej pregledati obarvane kontrole s pozitivnim in negativnim tkivom. Prisotnost ustrezno obarvanega reakcijskega produkta na kontroli s pozitivnim tkivom znotraj citoplazme celjne celice kaže pozitivno reaktivnost.

Če kontrola s pozitivnim ali negativnim tkivom ne pokaže ustreznega obarvanja ali pokaže spremembo v klinični diagnostični interpretaciji, morate vse rezultate testnih vzorcev obravnavati kot neveljavne.

Tabela 4. Ocenjevalna merila za kontrolno tkivo slepiča. Reprezentativne slike so na voljo v Priročniku za interpretacijo za VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody za nedrobnocelični karcinom pljuč (NSCLC), kat. št. 1011879.

Sprejemljivo	Nesprejemljivo
Prisotnost močnega granularnega citoplazemskega obarvanja celic ganglionov (glejte opombo).	Odsotnost močnega granularnega citoplazemskega obarvanja celic ganglionov.
Odsotnost močnega granularnega citoplazemskega obarvanja žleznih epitelijskih celic, mišičnega in limfoidnega tkiva (v limfoidnih agregatih je mogoče opaziti skromno ali redko obarvanje limfocitarnih celic).	Prekomerno nespecifično obarvanje ozadja žleznih epitelijskih celic, mišičnega ali limfoidnega tkiva, ki vpliva na točkovanje.

Opomba: živčevje v mišičnih plasteh slepiča kaže pozitivno obarvanje.

Kontrola z negativnim reagentom

Če je prisotno nespecifično obarvanje, je videti razpršeno in ga je mogoče oceniti s kontrolnim preparatom z negativnim reagentom, obarvanim z reagentom Rabbit Monoclonal Negative Control Ig. Za razlago rezultatov obarvanja je treba uporabiti nepoškodovane celice, saj je pri nekrotičnih ali degeneriranih celicah pogosto prisotno nespecifično obarvanje. Če je obarvanje ozadja čezmerno, morate vse rezultate testnih vzorcev obravnavati kot neveljavne. Primere sprejemljivih ravni obarvanja ozadja za to analizo lahko najdete v Priročniku za interpretacijo točkovanja VENTANA ALK za nedrobnocelični karcinom pljuč kat. št. 1011879.

Tkivo bolnikov

Tkivo bolnikov mora biti ocenjeno v skladu z algoritmom za točkovanje analize VENTANA anti-ALK (D5F3), ki je na voljo v Tabeli 5. Glejte Priročnik za interpretacijo za VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody za nedrobnocelični karcinom pljuč (NSCLC) kat. št. 1011879.

Tabela 5. Algoritem za točkovanje za analizo VENTANA anti-ALK (D5F3). Reprezentativne slike so na voljo v Priročniku za interpretacijo za VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody za nedrobnocelični karcinom pljuč (NSCLC) kat. št. 1011879.

Klinična interpretacija	Opis obarvanja
Pozitivno na ALK	Prisotnost močnega granularnega citoplazemskega obarvanja tumorskih celic (kakršen koli odstotek pozitivnih tumorskih celic). Določene elemente barvanja je treba izključiti, vključno z naslednjimi: • rahlo pikčasto citoplazemsko obarvanje v alveolarnih makrofagih, • celice nevralnega izvora (živčne in ganglijske celice), • obarvanje žleznega epitelijskega tkiva in • razpršene limfocitarni infiltrati. Določeno obarvanje ozadja je mogoče opaziti tudi znotraj normalne sluznice pri NSCLC (vključno z mucinom) in na nekrotičnih tumorskih mestih, ki jih je treba izključiti iz klinične ocene.
Negativno na ALK	Odsotnost močnega granularnega citoplazemskega obarvanja tumorskih celic.

SPLOŠNE OMEJITVE

- Imunohistokemija je večstopenjski diagnostični postopek, ki zahteva posebno usposabljanje za postopke izbiranja ustreznih reagentov, tkiv, fiksacije, obdelave, priprave IHC-preparata in interpretacije rezultatov obarvanja.
- Obarvanje tkiva je odvisno od ravnanja s tkivom in njegove obdelave pred barvanjem. Nepravilna fiksacija, zamrzitev, odtajanje, izpiranje, sušenje, segrevanje, rezanje ali kontaminacija z drugimi tkivi ali tekočinami lahko privede do popačenj, ujetja protiteles ali lažno negativnih rezultatov. Neskladni rezultati so lahko posledica različnih metod fiksacije in vklapljanja ali inherentnih nepravilnosti znotraj tkiva.
- Čezmerno ali nepopolno kontrastno obarvanje lahko ogrozi pravilno interpretacijo rezultatov.
- Klinična razlaga katerega koli pozitivnega barvanja ali njegove odsotnosti mora biti ovrednotena v okviru klinične anamneze, morfologije in drugih histopatoloških meril. Klinična interpretacija katerega koli obarvanja ali njegove odsotnosti mora biti dopolnjena tako z morfološkimi študijami in kontrolami na sistemski ravni kot tudi z drugimi diagnostičnimi testi. Odgovornost usposobljenega patologa je, da je seznanjen s protitelesi, reagenti in metodami za interpretacijo obarvanih preparatov. Barvanje lahko izvajajo le certificirani laboratoriji z licenco pod nadzorom patologa, ki je odgovoren za pregledovanje obarvanih preparatov ter zagotavljanje ustreznosti pozitivnih in negativnih kontrol.
- Družba Ventana Medical Systems, Inc. nudi optimalno razredčena protitelesa in reagente za uporabo po priloženih navodilih. Vsakršno odstopanje od priporočenih testnih postopkov lahko izniči pričakovane rezultate. Uporabiti morate ustrezne kontrole in njihove rezultate dokumentirati. Uporabniki, ki odstopijo od priporočenih testnih postopkov, morajo prevzeti odgovornost za interpretacijo bolnikovih rezultatov.
- Ta izdelek ni namenjen uporabi v pretočni citometriji. Značilnosti delovanja niso bile določene.
- Reagenti lahko dajo nepričakovane reakcije pri tkivih, ki predhodno niso bila testirana. Možnosti nepričakovanih reakcij zaradi biološke variabilnosti izražanja antigena v neoplazmih ali drugih patoloških tkivih ni mogoče povsem izključiti niti pri testiranih skupinah tkiva.²⁹
- Tkiva oseb, okuženih z virusom hepatitisa B, in tkiva, ki vsebujejo površinski antigen virusa hepatitisa B (HBsAg), lahko kažejo nespecifično obarvanje s hrenovo peroksidazo.³⁰
- Lažno pozitivni rezultati so lahko posledica neimunske vezave beljakovin ali produktov reakcije substrata. Prav tako jih lahko sproži psevdoperoksidazna aktivnost (eritrociti), aktivnost endogene peroksidaze (citokrom C) ali endogeni biotin (npr. v jetih, možganih, dojkah, ledvicah) glede na vrsto uporabljenega imunskega barvanja.³¹
- Kot velja za vsak IHC-test, negativen rezultat pomeni, da antigen ni bil odkrit, in ne da antigen ni prisoten v analizirani celici oziroma tkivu.

POSEBNE OMEJITVE

- Analiza s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) je optimizirana za uporabo z instrumenti BenchMark IHC/ISH v kombinaciji z detekcijskim kompletom OptiView DAB IHC Detection Kit pri 16-minutnem inkubacijskem času primarnega protitelesa, pri čemer je v protokolu izbrana možnost OptiView Amplification.
- Stekelce z bolnikovim vzorcem je treba obarvati z reagentom Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (kat. št. 790-4795 / 06683380001). Drugi reagenti za negativno kontrolo niso primerni za to analizo.
- Ta analiza ni bila odobrena za uporabo s citološkimi brisi ali dekalciniranimi vzorci.
- Tkivo bolnika mora biti obarvano v 3 mesecih po rezanju iz tkivnega bloka. Pri rezinah, ki so bile hranjene pri sobni temperaturi več kot 3 mesece, so opazili izgubo učinkovitosti obarvanja pri analizi s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3).
- Družba Ventana priporoča, da vzorce v 10-odstotnem NBF ali cinkovem formalinu fiksirate vsaj 6 ur. Časi fiksacije in vrste sredstev za fiksiranje, ki odstopajo od priporočenih, lahko povzročijo lažne negativne rezultate. Sredstva za fiksiranje, kot so AFA, sredstvo za fiksiranje PREFER, B5 in druga kislina in/ali alkoholna sredstva za fiksiranje, so pokazala izgubo specifičnega obarvanja beljakovine ALK. Za več informacij glejte Priročnik za interpretacijo za VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody za nedrobnocelični karcinom pljuč (NSCLC) kat. št. 1011879.
- Pri analizi s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) so zabeležili nekatera popačenja obarvanja. Rahlo granularno pikčasto citoplazemsko obarvanje v alveolarnih makrofagih se lahko pojavi tako pri preparatih, obarvanih s protitelesom anti-ALK, kot pri kontroli z negativnim reagentom, kar pomeni, da gre za popačenje detekcijskega sistema in se ga ne sme oceniti kot pozitivno obarvanje z anti-ALK.

Opazili so tudi pikčasto obarvanje nekrotičnih tumorskih mest, ki jih je treba za oceno bolnikovega vzorca prav tako izvesti. Pri analizi s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) so opazili obarvanje nevrálnega tkiva, vključno z živčnimi in občasno limforetikulárnimi celicami znotraj limfocitnih infiltratov. Za več informacij glejte Priročnik za interpretacijo za VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody za nedrobnocelični karcinom pljuč (NSCLC) kat. št. 1011879.

7. Do manjše spremenljivosti v skupni intenzivnosti barvanja na kontrolnih tkivih lahko pride zaradi uporabe kompleta OptiView Amplification Kit. Za primere sprejemljive učinkovitosti barvanja si oglejte Priročnik za interpretacijo.

ODPRAVLJANJE TEŽAV

Če opazite neustrezno obarvanje na kontrolah s človeškim tkivom NSCLC ali slepiča na sistemski ravni ali na bolnikovih vzorcih, preverite, ali so bili upoštevani postopki za vzdrževanje instrumentov BenchMark ULTRA, BenchMark XT ali BenchMark GX. Če ne opazite nobenih tehničnih težav ali odstopanj, se pred izvedbo ponovnega ciklusa obrnite na lokalnega zastopnika za podporo.

ZNAČILNOSTI DELOVANJA

Analitična specifičnost in občutljivost sta bili določeni z barvanjem več primerov normalnega in neoplastičnega človeškega tkiva z analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3). Rezultati so navedeni v Tabeli 6 in Tabeli 7.

Specifičnost

Tabela 6. Specifičnost/občutljivost analize s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) v normalnem tkivu. Za testiranje so bila uporabljena normalna tkiva, fiksirana v formalinu in vklopljena v parafin.

Tkivo	Št. pozitivnih/ vseh tkiv	Tkivo	Št. pozitivnih/ vseh tkiv
Možgani	0/3*	Priželjč	0/3
Mali možgani	0/3	Mieloidno tkivo (kostni mozeg)	0/3
Nadledvična žleza	0/3	Pljuča	0/3
Jajčnik	0/3	Srce	0/3
Trebušna slinavka	0/3	Požiralnik	0/3
Obščitnica	0/3	Želodec	0/3
Hipofiza	0/3**	Tanko črevo	0/3***
Modo	0/3	Debelo črevo	0/3***
Ščitnica	0/3	Jetra	0/3
Dojka	0/3	Žleza slinavka	0/3
Vranica	0/3	Ledvica	0/3
Tonzila	0/3	Prostata	0/3
Endometrij	0/3	Maternični vrat	0/3
Skeletna mišica	0/4	Koža	0/3
Živec (redko)	0/3	Mezotelij in pljuča	0/3

*2/3 Pri nekaj celicah glje v možganih se je pokazala šibka do zmerna pozitivnost.

**3/3 Hipofiza se je obarvala šibko.

***Ganglijske celice v 4/6 črevesnih tkivih so se obarvale ALK-pozitivno z različnimi stopnjami intenzivnosti.

Občutljivost

Tabela 7. Specifičnost/občutljivost analize s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) v neoplastičnih tkivih. Za testiranje so bila uporabljena različna neoplastična tkiva, fiksirana v formalinu in vklopljena v parafin.

Patologija	Št. pozitivnih/vseh tkiv
Glioblastom	0/1
Atipični meningeom	0/1
Maligni ependimom	0/1
Maligni oligodendrogliom	0/1
Serozni adenokarcinom jajčnika	1/1
Adenokarcinom jajčnika	0/1
Karcinom celic očiščkov	0/1
Adenokarcinom trebušne slinavke	0/1
Seminom	0/1
Embrionalni karcinom	0/1
Medularni karcinom	0/1
Papilarni karcinom	0/1
Intraduktalni karcinom dojke	0/1
Invazivni duktalni karcinom dojke	0/2
Difuzni limfom celic B	0/3
Drobnocelični nediferencirani karcinom pljuč	0/1
Ploščatocelični karcinom pljuč	0/1
Pljučni adenokarcinom	0/1
Ploščatocelični karcinom požiralnika	0/1
Adenokarcinom požiralnika	0/1
Mucinozni adenokarcinom želodca	0/1
Gastrointestinalni adenokarcinom	0/1
Maligni intersticialom	0/1
Adenokarcinom rektuma	0/1
Rektalni maligni intersticialom	0/1
Hepatocelularni karcinom	0/1
Hepatoblastom	1/1
Svetlocelični karcinom ledvic	0/1
Adenokarcinom prostate	0/2
Leiomiom	0/1
Adenokarcinom endometrija	0/1
Svetlocelični karcinom endometrija	0/1
Ploščatocelični karcinom maternice	0/2
Embrionalni rabdomyosarkom	0/1
Maligni melanom zadnjika	0/1

Patologija	Št. pozitivnih/vseh tkiv
Bazalnocelični karcinom	0/1
Ploščatocelični karcinom	0/1
Nevrofibrom	0/1
Nevroblastom retroperitoneja	1/1
Maligni mezoteliom	0/1
Hodgkinov limfom	0/1
Anaplastični limfom velikih celic	0/1
Prehodnocelični karcinom mehurja	0/1
Leiomijsarkom nizke stopnje	0/1
Osteosarkom	0/1
Rabdomiosarkom vretenastih celic	0/1
Leiomijsarkom srednje stopnje	0/1

Ujemanje platform (študija prenosa)

Analiza s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) je bila sprva namenjena za instrumente BenchMark XT in GX. Da bi dokazali enakovredno zmogljivost analize na instrumentih BenchMark ULTRA in BenchMark XT, je bila izvedena študija prenosa. V tej študiji so ocenili klinični status ALK (na osnovi algoritma za točkovanje ALK v Tabeli 5) v 184 edinstvenih vzorcih NSCLC, barvanih za analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) na obeh platformah. Pripravljeni obarvani preparati so bili slepi in naključno razdeljeni trem patologom, ki so jih ocenili. Rezultati ujemanja platform iz te študije prikazujeta Tabela 8 in Tabela 9.

Tabela 8. Rezultati ujemanja med instrumentoma BenchMark XT in BenchMark ULTRA.

Ujemanje VENTANA anti-ALK (D5F3) med instrumentoma BenchMark ULTRA in BenchMark XT			
BenchMark ULTRA	BenchMark XT		Skupaj
	Pozitivno	Negativno	
Pozitivno	85	1	86
Negativno	1	97	98
Skupaj	86	98	184

Tabela 9. Ujemanje statusa ALK med instrumentoma BenchMark XT in BenchMark ULTRA.

Stopnja ujemanja med platformama	Ujemanje pozitivnega rezultata v odstotkih (95 % IZ)	Ujemanje negativnega rezultata v odstotkih (95 % IZ)	Skupno ujemanje v odstotkih (95 % IZ)
Ujemanje med instrumentom BenchMark XT in instrumentom BenchMark ULTRA	98,8 % (93,7–99,8 %)	99,0 % (94,4–99,8 %)	98,9 % (96,1–99,7 %)

Debelina tkiva:

Debelina tkiva je bila ocenjena z uporabo 4 edinstvenih primerov človeškega NSCLC (3 ALK-pozitivni in 1 ALK-negativni) ter 4 edinstvenih primerov človeškega slepiča. Tkiva so bila razrezana in testirana dvojno pri 3, 4, 5, 6 in 7 mikronih. Vse debeline tkiv so pokazale ustrezno specifično obarvanje ALK in ustrezne ravni ozadja pri analizi s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3). Pri nobenem od vzorcev znotraj teh debelin ni bilo sprememb v kliničnem statusu ALK. Ventana priporoča, da se vzorce za analizo nareže na 4–6 mikronov.

Študije ponovljivosti in vmesne natančnosti

Ponovljivost in vmesna natančnost analize s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) sta bili ocenjeni na instrumentih BenchMark ULTRA, XT in GX v kombinaciji z detekcijskim kompletom OptiView DAB IHC Detection Kit in amplifikacijskim kompletom OptiView Amplification Kit.

Ocenjenih je bilo deset edinstvenih vzorcev tkiva NSCLC (5 ALK-pozitivnih in 5 ALK-negativnih) na instrumentih BenchMark XT in BenchMark ULTRA. Za oceno natančnosti v enem dnevu je bilo 5 podvojenih preparatov vsakega vzorca NSCLC obarvanih na enem instrumentu BenchMark XT ali enem instrumentu BenchMark ULTRA. Za oceno natančnosti znotraj instrumenta so bili 3 podvojeni preparati vsakega vzorca NSCLC obarvani z analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) na treh instrumentih BenchMark XT, 2 podvojena preparata vsakega vzorca NSCLC pa sta bila obarvana na treh instrumentih BenchMark ULTRA. Za oceno natančnosti med dnevi sta bila 2 podvojena preparata vsakega vzorca NSCLC obarvana z analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) na enem instrumentu BenchMark XT ali BenchMark ULTRA v 5 zaporednih dnevih. Vsi preparati so bili slepi in randomizirani v posamezne kohorte instrumentov. Vsako kohorto je posamično ocenil patolog z algoritmom za točkovanje analize s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) (na voljo v Tabeli 5). IHC-obarvanje ALK je bilo pri vsaki ponovitvi vzorca NSCLC enakovredno. Povzetek rezultatov za ponovljivost in vmesno natančnost za instrumente BenchMark XT in BenchMark ULTRA prikazujeta Tabela 10 in Tabela 11.

Študija med platformami je bila izvedena za primerjavo zmogljivosti analize s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) na instrumentih BenchMark XT in BenchMark GX. V tej študiji sta bila ocenjena dva večtkivna bloka, pri čemer je vsak vseboval 8 vzorcev NSCLC (3 ALK-pozitivne in 1 ALK-negativne v vsakem bloku). Za to primerjavo je bilo 5 podvojenih preparatov obarvanih na treh instrumentih BenchMark XT in treh instrumentih BenchMark GX. Ti preparati so bili ocenjeni za ustrezno obarvanje na osnovi algoritma točkovanja IHC-testa s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3), ki ga predstavlja Tabela 5. IHC-obarvanje ALK je bilo pri vsaki ponovitvi vzorca NSCLC na obeh platformah enakovredno. Povzetek rezultatov je v Tabeli 12.

Poleg tega je bila ocenjena tudi ponovljivost barvanja analize s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) pri človeškem slepiču (kontrola na sistemski ravni). Za to študijo je bilo uporabljenih osem edinstvenih tkiv človeškega slepiča. Za oceno natančnosti v enem dnevu je bilo 13 podvojenih preparatov iz dveh večtkivnih blokov, ki sta vsebovala 4 vzorce slepiča, obarvanih na enem instrumentu BenchMark XT. Za oceno natančnosti med instrumenti je bilo 5 podvojenih preparatov iz dveh večtkivnih blokov, ki sta vsebovala 4 vzorce slepiča, obarvanih z analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) na treh instrumentih BenchMark XT. Za oceno natančnosti med dnevi je bilo 5 podvojenih preparatov iz vsakega od obeh večtkivnih blokov, ki sta vsebovala 4 vzorce slepiča, obarvanih z analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) na enem instrumentu BenchMark XT v 5 zaporednih dnevih. Vse preparate je ocenil patolog z uporabo priročnika za točkovanje analize s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) za kontrolno tkivo slepiča (na voljo v Tabeli 4). Vsak podvojeni vzorec slepiča je pokazal enakovredne rezultate IHC-obarvanja ALK. Skupno ujemanje v odstotkih za ponovljivost v enem dnevu in med instrumenti (na 3 instrumentih) je bilo 100 %, za ponovljivost med dnevi (v 5 zaporednih dnevih) pa 98 %.

Tabela 10. Ponovljivost in vmesna natančnost analize s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) na posameznih vzorcih NSCLC, obarvanih na instrumentu BenchMark XT.

Ponovljivost/natančnost tkiva NSCLC	N = skupno število preparatov, ocenjenih v kohorti	Skupno ujemanje statusa ALK v odstotkih (95 % IZ)
Ponovljivost znotraj enega dne	50	100 % (97,5–100 %)
Natančnost v okviru platforme (na 3 instrumentih BenchMark XT)	60	100 % (97,9–100 %)
Natančnost znotraj enega dneva (5 zaporednih dni)	100	100 % (98,7–100 %)

Tabela 11. Ponovljivost in vmesna natančnost analize s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) na posameznih vzorcih NSCLC na instrumentu BenchMark ULTRA.

Ponovljivost/natančnost tkiva NSCLC	N = skupno število preparatov, ocenjenih v kohorti	Skupno ujemanje statusa ALK v odstotkih (95 % IZ)
Ponovljivost znotraj enega dne	50	100 % (92,9–100,0 %)
Natančnost v okviru platforme (na 3 instrumentih BenchMark ULTRA)	60	100 % (94,0–100,0 %)
Natančnost znotraj enega dneva (5 zaporednih dni)	100	100 % (96,3–100,0 %)

Tabela 12. Natančnost med platformami analize s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) na večtkivnem bloku vzorcev NSCLC z uporabo instrumentov BenchMark XT in BenchMark GX.

Natančnost tkiva NSCLC	N = skupno število preparatov, ocenjenih v kohorti	Skupno ujemanje statusa ALK v odstotkih
Natančnost med platformami: instrument BenchMark XT v primerjavi z instrumentom BenchMark GX (na 3 instrumentih)	30	100 %

Obnovljivost med serijami

Obnovljivost analiz s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) med serijami je bila določena s testiranjem treh serij analiz s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) pri 38 edinstvenih primerih NSCLC (21 ALK-pozitivnih vzorcev (iz 18 edinstvenih primerov) in 20 ALK-negativnih vzorcev tkiva NSCLC) na instrumentu BenchMark XT s kompletoma OptiView DAB IHC Detection in OptiView Amplification. Vsi primeri so bili obarvani dvojno z vsako od treh serij primarnega protitelesa. Preparati so bili slepi in randomizirani pred oceno kliničnega statusa v skladu z algoritmom za točkovanje analize s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) (na voljo v Tabela 5), ki so jo izvedli trije patologi. Vse tri serije protitelesa so pokazale več kot 90 % ujemanje v rezultatih obarvanja za status ALK na 41 ocenjenih vzorcih tkiva NSCLC. Rezultati so na voljo kot stopnje skupnega ujemanja v odstotkih, povprečnega pozitivnega ujemanja in povprečnega negativnega ujemanja. Stopnja skupnega ujemanja v odstotkih med serijami je bila 99,2 %, kar pomeni, da je analiza s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) obnovljiva v rezultatih obarvanja za serije protiteles. Rezultati so prikazani v Tabela 13.

Obnovljivost analiz s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) med serijami z uporabo instrumenta BenchMark ULTRA je bila določena s testiranjem treh serij analiz s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) pri 30 edinstvenih primerih NSCLC (15 ALK-pozitivnih vzorcev in 15 ALK-negativnih vzorcev tkiva NSCLC) s kompletoma OptiView DAB IHC Detection in OptiView Amplification. Vsi primeri so bili obarvani dvojno z vsako od treh serij primarnega protitelesa. Preparati so bili slepi in randomizirani pred oceno kliničnega statusa v skladu z algoritmom za točkovanje analize s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) (na voljo v Tabela 5), ki jo je izvedel patolog. Vse tri serije protitelesa so pokazale več kot 90 % ujemanje v rezultatih obarvanja za status ALK na 30 ocenjenih vzorcih tkiva NSCLC. Rezultati so na voljo kot stopnje skupnega ujemanja v odstotkih, povprečnega pozitivnega ujemanja in povprečnega negativnega ujemanja. Stopnja skupnega ujemanja v odstotkih med serijami je bila 99,1 %, kar pomeni, da je analiza s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) obnovljiva v rezultatih obarvanja za serije protiteles. Rezultati so prikazani v Tabela 14.

Obnovljivost med serijami analize s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) je bila ocenjena tudi z 12 edinstvenimi vzorci tkiva človeškega slepiča. Obnovljivost je bila določena s testiranjem treh serij protitelesa v kombinaciji s tremi serijami kompletov OptiView DAB IHC Detection in OptiView Amplification na treh instrumentih BenchMark XT. Stopnja skupnega ujemanja za ustrezne pozitivne in negativne elemente barvanja slepiča pri analizi s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) je bila 100 %.

Tabela 13. Stopnje ujemanja obnovljivosti med serijami pri 41 vzorcih tkiva NSCLC na instrumentu BenchMark XT. Testiranih je bilo enaindvajset ALK-pozitivnih vzorcev (od 18 edinstvenih primerov) in 20 ALK-negativnih vzorcev.

Stopnje ujemanja obnovljivosti med serijami	Povprečno pozitivno ujemanje (95 % IZ)	Povprečno negativno ujemanje (95 % IZ)	Skupno ujemanje v odstotkih (95 % IZ)
Povprečje vseh treh primerjav med serijami	99,2 % (97,4–100 %)	99,1 % (96,8–100,0)	99,2 % (97,5–100 %)

Tabela 14. Stopnje ujemanja obnovljivosti med serijami pri 30 vzorcih tkiva NSCLC na instrumentu BenchMark ULTRA. Testiranih je bilo 15 ALK-pozitivnih vzorcev in 15 ALK-negativnih vzorcev.

Stopnje ujemanja obnovljivosti med serijami	Ujemanje pozitivnega rezultata v odstotkih (95 % IZ)	Ujemanje negativnega rezultata v odstotkih (95 % IZ)	Skupno ujemanje v odstotkih (95 % IZ)
Povprečje vseh treh primerjav med serijami	98,9 % (96,8–99,6 %)	99,3 % (97,3–99,8 %)	99,1 % (97,9–99,6 %)

Študije natančnosti med ocenjevalci

Opravljenih je bilo več študij natančnosti med ocenjevalci: dve študiji na instrumentu BenchMark XT in ena na instrumentu BenchMark ULTRA.

V študiji natančnosti med ocenjevalci na instrumentu BenchMark XT so trije patologi ocenili skupno 185 edinstvenih primerov. 185 primerov je bilo v korelaciji s 100 ALK-pozitivnimi in 100 ALK-negativnimi bloki, ki so bili obarvani pri analizi s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3). Preparati so bili slepi in randomizirani pred oceno rezultatov IHC-barvanja ALK v skladu z algoritmom za točkovanje za analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3), ki je na voljo v Tabela 5. Rezultati, predstavljeni v Tabela 15 spodaj, odražajo stopnje natančnosti med ocenjevalci za edinstvene primere iz študijske kohorte.

Tabela 15. 1. študija natančnosti med ocenjevalci na instrumentu BenchMark XT.

Natančnost med ocenjevalci	Povprečno pozitivno ujemanje (95 % IZ)	Povprečno negativno ujemanje (95 % IZ)	Skupno ujemanje v odstotkih (95 % IZ)
Povprečje vseh primerjav treh ocenjevalcev	98,8 % (97,3–100 %)	99,0 % (97,7–100 %)	98,9 % (97,4–100 %)

2. študija natančnosti med ocenjevalci na instrumentu BenchMark XT je bila opravljena na kohorti primerov iz randomizirane klinične študije ALK-pozitivnih vzorcev bolnikov z NSCLC, v kateri so uporabili komplet Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit. Približno 300 primerov je bilo obarvanih z analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) na instrumentu BenchMark XT. Primeri so bili zaslepljeni za status ALK FISH, randomizirani in dodeljeni trem ocenjevalcem, ki so rezultate barvanja z ALK IHC ocenjevali z algoritmom točkovanja analize s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3), ki je v Tabela 5. Rezultati, predstavljeni v Tabela 16, odražajo stopnje natančnosti med ocenjevalci v tem kliničnem preskušanju.

V študiji natančnosti med ocenjevalci na instrumentu BenchMark ULTRA je bila ocenjena kohorta 184 edinstvenih primerov NSCLC. Kohorta je bila sestavljena iz 90 ALK-pozitivnih in 94 ALK-negativnih primerov, ki so bili obarvani z analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) na instrumentu BenchMark ULTRA. Primeri so bili zaslepljeni, randomizirani in dodeljeni trem ocenjevalcem, ki so rezultate barvanja z ALK IHC ocenjevali z algoritmom točkovanja analize s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3), ki je v Tabela 5. Tabela 16 kaže stopnje natančnosti med ocenjevalci v tej študiji.

Tabela 16. 2. študija natančnosti med ocenjevalci za status ALK v vzorcih NSCLC, pridobljenih iz 1. kohorte klinične primerjave metod, obarvanih z analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) na instrumentu BenchMark XT.

Natančnost med ocenjevalci	Povprečno pozitivno ujemanje (95 % IZ)	Povprečno negativno ujemanje (95 % IZ)	Skupno ujemanje v odstotkih (95 % IZ)
Povprečje vseh primerjav treh ocenjevalcev	97,6 % (95,0–99,5 %)	99,5 % (98,9–99,9 %)	99,1 % (98,2–99,8 %)
1. ocenjevalec v primerjavi z 2. ocenjevalcem	99,1 % (97,1–100 %)	99,8 % (99,4–100 %)	99,7 % (98,2–99,9 %)
1. ocenjevalec v primerjavi s 3. ocenjevalcem	96,3 % (92,3–99,2 %)	99,2 % (98,3–99,8 %)	98,6 % (96,6–99,5 %)
2. ocenjevalec v primerjavi s 3. ocenjevalcem	97,2 % (93,5–100 %)	99,4 % (98,6–100 %)	99,0 % (97,1–99,7 %)

Tabela 17. Natančnost med ocenjevalci statusa ALK v vzorcih NSCLC, obarvanih z analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) na instrumentu BenchMark ULTRA.

Natančnost med ocenjevalci	Povprečno pozitivno ujemanje (95 % IZ)	Povprečno negativno ujemanje (95 % IZ)	Skupno ujemanje v odstotkih (95 % IZ)
Povprečje vseh treh primerjav ocenjevalcev	98,4 % (96,5–99,6 %)	98,6 % (96,9–99,7 %)	98,5 % (96,7–99,6 %)
1. ocenjevalec v primerjavi s 2. ocenjevalcem	98,9 % (96,8–100 %)	98,9 % (97,0–100 %)	98,9 % (96,0–99,7 %)
1. ocenjevalec v primerjavi s 3. ocenjevalcem	98,8 % (96,7–100 %)	99,0 % (97,2–100 %)	98,9 % (96,0–99,7 %)
2. ocenjevalec v primerjavi s 3. ocenjevalcem	97,6 % (94,7–99,4 %)	97,9 % (95,4–99,5 %)	97,8 % (94,4–99,1 %)

Ujemanje s FISH-testom na ALK

Za primerjavo rezultatov obarvanja med barvanjem s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody in testom ALK FISH za določitev kliničnega statusa ALK so bile uporabljene tri kohorte. Kohorte so vključevale vrsto človeških tkivnih vzorcev NSCLC iz primarnih in metastatičnih tumorjev, vključno z resekcijami, tumorji, pridobljenimi z biopsijo, bronhialno biopsijo ter v formalinu fiksiranimi in v parafin vklopljenimi (FFPE) celicami iz citološke punkcije (FNA). Vse študije so bile točkovane z algoritmom za točkovanje (opisanim v Tabela 5).

1. študija ujemanja

V študiji, ki je bila izvedena v zunanjem laboratoriju, so primerjali protitelo VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody z retrospektivnimi podatki kompleta Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit. V zunanjem laboratoriju so obarvali približno 100 primerov NSCLC s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody na instrumentu BenchMark XT. Analiza s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) je pokazala več kot 98 % skupno ujemanje v odstotkih z retrospektivnimi podatki Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit na tej kohorti vzorcev z NSCLC. Rezultati so navedeni v Tabela 18 in Tabela 19. Upoštevajte, da so bili v 86 od 100 primerov na voljo podatki FISH in ustrezen tumor za primerjavo z rezultati IHC-testa na ALK.

Tabela 18. Analiza s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) v primerjavi z Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.

Analiza s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) v primerjavi s kompletom Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit			
Protitelo VENTANA anti-ALK (D5F3)	Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		Skupaj
	Pozitivno	Negativno	
Pozitivno	10	0	10
Negativno	1	75	76
Skupaj	11	75	86

Tabela 19. Stopnje skupnega ujemanja v odstotkih, pozitivnega in negativnega ujemanja za analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) v primerjavi z Abbott Vysis Break Apart FISH Probe Kit.

Skupno ujemanje v odstotkih, ujemanje pozitivnih in negativnih rezultatov			
Stopnja	n/N	%	95 % ZI [a]
Skupno ujemanje v odstotkih	85/86	98,8	93,7, 99,8
Ujemanje pozitivnega rezultata v odstotkih	10/11	90,9	62,3, 98,4
Ujemanje negativnega rezultata v odstotkih	75/75	100,0	95,1, 100,0

[a] 95-odstotni dvostranski interval zaupanja, izračunan z metodo točkovanja.

Upoštevajte, da priprava vzorcev tkiva v tej študiji ni bila preverjena, saj so bili upoštevani postopki za pripravo vzorcev, priporočenih za to analizo.

2. študija ujemanja

V študiji, ki je bila izvedena v drugem zunanjem laboratoriju, so primerjali VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody s podatki Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit na 73 primerih NSCLC (izrezanih v enem tednu od barvanja). V zunanjem laboratoriju so primere obarvali z VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody na instrumentu BenchMark XT. Analiza s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) je pokazala več kot 93 % skupno ujemanje v odstotkih z retrospektivnimi podatki Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit na tej kohorti vzorcev z NSCLC. Rezultati so navedeni v Tabela 20 in Tabela 21.

Tabela 20. Analiza s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) v primerjavi z Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.

Analiza s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) v primerjavi z Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit			
Protitelo VENTANA anti-ALK (D5F3)	Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		Skupaj
	Pozitivno	Negativno	
Pozitivno	2	4	6
Negativno	0	56	56
Skupaj	2	60	62

Tabela 21. Stopnje skupnega ujemanja v odstotkih, pozitivnega in negativnega ujemanja za analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) v primerjavi z Abbott Vysis Break Apart FISH Probe Kit.

Skupno ujemanje v odstotkih, ujemanje pozitivnih in negativnih rezultatov			
Stopnja	n/N	%	95 % ZI [a]
Skupno ujemanje v odstotkih	58/62	93,5 %	84,6–97,5
Ujemanje pozitivnega rezultata v odstotkih	2/2	100 %	34,2–100,0
Ujemanje negativnega rezultata v odstotkih	56/60	93 %	84,1–97,4

[a] 95-odstotni dvostranski interval zaupanja, izračunan z metodo točkovanja.

Od štirih protislovnih primerov (FISH-negativnih, IHK-pozitivnih na ALK) so bili dodatno testirani neobarvani preparati z drugo ALK (različen klon in sistem zaznavanja). Trije od štirih primerov so se ujeli z analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) pri IHK-obarvanju ALK.

V 10 primerih pa rezultatov FISH ni bilo mogoče določiti ali pa testiranje ni bilo izvedeno. Štirje od teh primerov so bili pozitivni pri analizi s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) in drugem klonu ALK, šest primerov pa je bilo pri IHK-barvanju ALK-negativnih. En primer je bil FISH-pozitiven, vendar ni bil dovolj vzorca za IHK-barvanje.

3. študija ujemanja

V tej študiji je bilo pribl. 300 primerov iz globalne klinične študije bolnikov z ALK-pozitivnim NSCLC, ki še poteka in v kateri so uporabili Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit, obarvanih z analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Antibody. Gre za kohorto, ki je opisana pri študiji natančnosti med ocenjevalci na strani 7 tega navodila za uporabo. Od približno 300 primerov jih je bilo nekaj označenih kot »nepomembnih« za analizo FISH ali pa je bilo zanje zapisano, da »analiza FISH ni bila opravljena«, obarvani in ocenjeni pa so bili samo za informativne namene.

Pri teh primerih status FISH ni bil razkrit, primeri so bili naključno izbrani in posredovani dvema ocenjevalcema, ki sta ocenila rezultate obarvanja. Rezultate so primerjali s statusom FISH, pridobljenim v globalni klinični študiji.

Rezultate primerjave IHK-testov na ALK in FISH-testov na ALK prikazuje Tabela 22 spodaj.

Tabela 22. Ujemanje analize s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) z Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit po ocenah 2 patologov.

Analiza s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) v primerjavi s kompletom Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit				
Protitelo VENTANA anti-ALK (D5F3)		Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		Skupaj
Ocenjevalec		Pozitivno	Negativno	
1. ocenjevalec	Pozitivno	37	13	50
	Negativno	11	223	234
	Skupaj	48	236	284
2. ocenjevalec	Pozitivno	37	12	49
	Negativno	11	225	236
	Skupaj	48	237	285

Upoštevajte, da priprava vzorcev tkiva v tej študiji ni bila preverjena, saj so bili upoštevani postopki za pripravo vzorcev, priporočenih za to analizo.

Neskladni rezultati, ki so bili pri analizi s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) ALK-pozitivni in ALK-negativni pri FISH-testu:

- Vsaj en ocenjevalec je ocenil 4 primere kot IHK-pozitivne in FISH-negativne na ALK. Po skupnem pregledu je bilo določeno, da jih je treba oceniti kot IHK-negativne. Pri teh primerih je šlo za središčno obarvanje citoplazme/membrane. Za razlago glejte Priročnik za interpretacijo za VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody za nedrobnocelični karcinom pljuč (NSCLC) kat. št. 1011879.

- 9 primerov, pozitivnih pri IHK-testu na ALK in negativnih pri FISH-testu na ALK, ni bilo veljavnih.

Od 9 protislovnih primerov jih je 7 imelo neobarvane preparate, ki so bili na voljo za dodatno diagnostično testiranje na ALK (molekularno testiranje in IHK-testiranje z drugim klonom in sistemom zaznavanja). Ti rezultati dodatnih testiranj so pokazali, da je bilo pri večini neujemanj opaziti pozitivno oceno IHK-ovrednotenja statusa ALK, kadar je bil status ALK pri FISH-testiranju negativen. (Upoštevajte, da so rezine v teh primerih presegale priporočeno dobo 3 mesecev.)

Neskladni rezultati, ki so bili pri analizi s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) negativni in pozitivni pri FISH-testu na ALK:

- 11 primerov je bilo pozitivnih pri testu FISH, vendar negativnih pri analizi s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3). V 10 primerih smo uporabili neobarvane preparate, ki so bili namenjeni za dodatno diagnostično testiranje ALK z molekularnimi in IHK-tehnikami. Rezultati dodatnega testiranja so pokazali, da je bila večina primerov, ki so bili negativni pri analizi s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3), negativnih tudi pri drugem sistemu IHK-testiranja na ALK, vendar pozitivnih pri eni ali več molekularnih analizah. Upoštevajte, da so rezine v teh primerih presegale priporočeno dobo 3 mesecev za IHK-testiranje na ALK.
- Poleg tega je bilo v kohorti 14 primerov z nepomembnimi rezultati pri testu FISH (pridobiti ni bilo mogoče nobenih rezultatov). Oba ocenjevalca sta 3 primere od teh ocenila kot pozitivne pri analizi s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3). Poleg tega je bilo še 19 primerov, pri katerih ni bilo mogoče opraviti analize FISH glede na preparate HE (navadno zaradi premajhnega števila tumorskih celic). Od teh sta oba ocenjevalca rezultate IHK-barvanja ALK v 4 primerih ocenila kot pozitivne. Zato je v povprečju 21 % primerov, za katere rezultati FISH niso bili pridobljeni, imelo pozitiven status ALK pri analizi s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3).

Študija obnovljivosti med laboratoriji na instrumentu BenchMark XT

Študija obnovljivosti med laboratoriji za analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) je bila izvedena za ugotavljanje obnovljivosti analize pri določanju kliničnega statusa ALK na instrumentu BenchMark XT z uporabo vzorcev tkiv NSCLC (6 ALK-pozitivnih in 6 ALK-negativnih) na 3 serijah reagenta, 3 instrumentih in v 5 nezaporednih dneh v treh zunanjih laboratorijih. Vzorci so bili randomizirani in ocenjevalci jih je skupno 6 ocenjevalcev (2 ocenjevalca/laboratorij), ki so bili slepi za klinični status ALK kohorte. Ta kohorta je vsebovala 180 preparatov, ustvarjenih iz 12 primerov NSCLC, pozitivnih in negativnih na izražanje ALK pri IHK- in FISH-testiranju. Ti primeri so bili obarvani podvojeno v 21 dneh v 3 laboratorijih. Za rezultate glejte Tabela 23. Stopnja sprejemljivosti za morfologijo in ozadje v teh študijah je bila 100 %. Študija obnovljivosti med laboratoriji za analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) na instrumentu BenchMark XT je pokazala povprečno pozitivno ujemanje (APA) in povprečno negativno ujemanje (ANA) za primerjave med laboratoriji, med ocenjevalci in med ciklusi (dnevi), opravljene v parih z uporabo ovrednotenih opazovanj.

Tabela 23. Študija obnovljivosti med laboratoriji: stopnje ujemanja za analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) na instrumentu BenchMark XT (n = 180 ocenjenih preparatov).

Stopnje ujemanja za obnovljivost med laboratoriji (klinični status ALK)	Povprečno pozitivno ujemanje (95-odstotni ZI)	Povprečno negativno ujemanje (95-odstotni ZI)	Skupno ujemanje v odstotkih (95-odstotni ZI)
Med laboratoriji (3 laboratoriji)	93,8 % (76,2–100 %)	94,9 % (79,2–100 %)	94,4 % (83,3–100 %)
Med dnevi (5 nezaporednih dni)	99,1 % (96,4–100 %)	99,2 % (96,9–100 %)	99,2 % (97,5–100 %)
Med ocenjevalci (2 ocenjevalca/laboratorij)	98,8 % (95,2–100 %)	99,0 % (95,8–100 %)	98,9 % (96,7–100 %)

Študija obnovljivosti med laboratoriji na instrumentu BenchMark ULTRA

Dodatna študija obnovljivosti med laboratoriji za analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) je bila izvedena za ugotavljanje obnovljivosti analize pri določanju kliničnega statusa ALK na instrumentu BenchMark ULTRA z uporabo vzorcev tkiv NSCLC (7 ALK-pozitivnih in 7 ALK-negativnih) na 3 serijah reagentov, 3 instrumentih in v 5 nezaporednih dneh v treh zunanjih laboratorijih na instrumentu BenchMark ULTRA. Vzorci so bili

randomizirani in ocenjevali jih je skupno 6 ocenjevalcev (2 ocenjevalca/laboratorij), ki so bili slepi za klinični status ALK kohorte. Ta kohorta je vsebovala 210 preparatov, ustvarjenih iz 14 primerov NSCLC, pozitivnih in negativnih na izražanje ALK pri IHC-in FISH-testiranju. Ti primeri so bili obarvani podvojeno v 21 dneh v 3 laboratorijih. Za rezultate glejte Tabela 24. Skupna končna stopnja sprejemljivosti barvanja za vse zbrane podatke je bila 99 %. Stopnja sprejemljivosti za morfologijo in ozadje v teh študijah je bila 100 %. Za rezultate glejte Tabela 25.

Študija obnovljivosti med laboratoriji: stopnje ujemanja za analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) na instrumentu BenchMark ULTRA je pokazala ujemanje pozitivnih rezultatov v odstotkih (PPA) in ujemanje negativnih rezultatov v odstotkih (NPA) v vseh opazovanjih iz študije, pridobljenih z zbiranjem podatkov vseh laboratorijev, ocenjevalcev in dni, pri katerih je bila soglasna ocena uporabljena kot referenčni standard.

Tabela 24. Študija obnovljivosti med laboratoriji: stopnje ujemanja za analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) na instrumentu BenchMark ULTRA (n = 210 ocenjenih preparatov).

Stopnje ujemanja za obnovljivost med laboratoriji (klinični status ALK)	Ujemanje pozitivnih rezultatov v odstotkih (95-odstotni IZ)	Ujemanje negativnih rezultatov v odstotkih (95-odstotni IZ)	Skupno ujemanje v odstotkih (95-odstotni IZ)
V vseh ovrednotenih opazovanjih	92,8 % (88,4, 95,6 %)	100,0 % (98,2, 100,0 %)	96,4 % (94,1, 97,8 %)

Tabela 25. Medlaboratorijska ponovljivost: stopnje ujemanja med ocenjevalci za analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) na instrumentu BenchMark ULTRA (n = 210 ocenjenih preparatov).

Stopnje ujemanja za obnovljivost med laboratoriji (klinični status ALK) med stopnjami ujemanja ocenjevalcev	Povprečno pozitivno ujemanje (95-odstotni IZ)	Povprečno negativno ujemanje (95-odstotni IZ)	Skupno ujemanje v odstotkih (95-odstotni IZ)
Ocenjevalci A1 v primerjavi z A2	97,0 % (87,5–100 %)	97,3 % (89,5–100 %)	97,1 % (90,2–99,2 %)
Ocenjevalci B1 v primerjavi z B2	93,5 % (71,4–100 %)	94,7 % (81,0–100 %)	94,2 % (86,0–97,7 %)
Ocenjevalci C1 v primerjavi s C2	92,3 % (66,7–100 %)	93,2 % (74,7–100 %)	92,8 % (84,1–96,9 %)
Skupaj	94,3 % (75,6–100 %)	95,1 % (81,6–100 %)	94,7 % (84,1–100 %)

Študija primerjave metod na instrumentu BenchMark XT

Kohorte študije primerjave metod so bile ustvarjene iz dveh neodvisnih, randomiziranih kliničnih preizkusov krizotiniba (Preizkus št. 1 in Preizkus št. 2), v katerih so bili vključeni bolniki z ALK-pozitivnim NSCLC. Status ALK je bil za te bolnike določen z analizo Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit v okviru kliničnega preizkusa v več centralnih laboratorijih. Veljavni rezultati analize Vysis ALK FISH so bili pridobljeni za skupno 1644 vzorcev tkiva NSCLC (1018 oz. 626 vzorcev za Preizkus št. 1 oz. Preizkus št. 2).

V študiji primerjave metod analize s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) so bili vzorci bolnikov, ocenjeni za Preizkus št. 1 in Preizkus št. 2, poslani v centralni laboratorij za barvanje z analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) in oceno statusa ALK pri IHC-testiranju v skladu z merili algoritma za točkovanje analize s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) (Tabela 5). Od vzorcev, ki so v kliničnem preizkusu pokazali veljavne rezultate pri analizi Vysis ALK FISH, je 933 vzorcev iz Preizkusa št. 1 (Tabela 26) in 598 vzorcev iz Preizkusa št. 2 (Tabela 28) pokazalo veljavne rezultate tudi pri analizi s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3).

Število vzorcev z ALK-pozitivnimi in ALK-negativnimi rezultati pri posamezni analizi je prikazano v Tabeli 26 oz. v Tabeli 28 za kohorte Preizkusa št. 1 oz. Preizkusa št. 2. Stopnje ujemanja med obema analizama so prikazane v Tabeli 27 oz. v Tabeli 29 za kohorte Preizkusa št. 1 oz. Preizkusa št. 2. Stopnje pozitivnega in negativnega ujemanja v

odstotkih so bile 86,0 % oz. 96,3 % za Preizkus št. 1 (Tabela 27) ter 92,7 % oz. 94,8 % za Preizkus št. 2 (Tabela 29).

Tabela 26. Primerjava statusa ALK v vzorcih NSCLC (kohorta iz Preizkusa št. 1), določenega pri analizi s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3), v primerjavi s kompletom Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.

Status ALK		Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		
		Pozitivno	Negativno	Skupaj
Protiteleso VENTANA anti-ALK (D5F3)	Pozitivno	154	28	182
	Negativno	25	726	751
	Skupaj	179	754	933

Tabela 27. Stopnje ujemanja med analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) in kompletom Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit v Preizkusu št. 1.

Stopnje ujemanja med analizami ALK	Ujemanje pozitivnega rezultata v odstotkih (95 % IZ)	Ujemanje negativnega rezultata v odstotkih (95 % IZ)	Skupno ujemanje v odstotkih (95 % IZ)
Protiteleso VENTANA anti-ALK (D5F3) in 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 %)

Tabela 28. Primerjava statusa ALK v vzorcih NSCLC kohorte iz Preizkusa št. 2, določenega pri analizi s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3), v primerjavi s kompletom Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.

Status ALK		Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		
		Pozitivno	Negativno	Skupaj
Protiteleso VENTANA anti-ALK (D5F3)	Pozitivno	179	21	200
	Negativno	14	384	398
	Skupaj	193	405	598

Tabela 29. Stopnje ujemanja med analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) in kompletom Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit v Preizkusu št. 2.

Stopnje ujemanja med analizami ALK	Ujemanje pozitivnega rezultata v odstotkih (95 % IZ)	Ujemanje negativnega rezultata v odstotkih (95 % IZ)	Skupno ujemanje v odstotkih (95 % IZ)
Protiteleso VENTANA anti-ALK (D5F3) in 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 %)

Upoštevajte, da vzorci tkiva, uporabljeni v Preizkusu št. 1 in Preizkusu št. 2, niso bili preverjeni, saj so bili pripravljeni v skladu s postopki za pripravo vzorcev, priporočenimi za analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3).

Študija kliničnega izida za krizotinib

Ugotavljanje klinične učinkovitosti analize s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) kot diagnostičnega pripomočka za izbiro bolnikov, ki jim lahko koristi zdravljenje s krizotinibom, učinkovino, usmerjeno proti ALK, je temeljilo na Preizkusu št. 1. Ti bolniki so

bili testirani z analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) v študiji primerjave metod ter v dodatni študiji. Preizkus št. 1 je bila večcentrična, večnacionalna, randomizirana, odprta študija učinkovitosti in varnosti krizotiniba 3. faze v primerjavi s kemoterapijo prve linije (pemetreksed/cisplatin ali pemetreksed/karboplatin) pri predhodno nezdravljenih bolnikih z ALK-pozitivnim napredovalim neploščatoceličnim NSCLC. Komplet Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit (FISH-testiranje na ALK) je bil uporabljen za določanje ALK-pozitivnosti in primarnosti za Preizkus št. 1. Na osnovi rezultatov analize Vysis pri testiranju ALK FISH je bilo 343 bolnikov v randomizirani seriji (172 v skupini s krizotinibom in 171 v skupini s kemoterapijo). V študiji kliničnega izida analize s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) so bili vzorci tkiva iz Preizkusa št. 1 naknadno testirani z analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3). Od 343 bolnikov, vključenih v Preizkus št. 1, jih je bilo 133 testiranih z analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) v skladu s protokolom študije primerjave metod, dodatnih 39 bolnikov pa je bilo testiranih v skladu s protokolom ločene študije, kar pomeni, da je bilo z analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) skupno testiranih 172 bolnikov. 166 od teh bolnikov je bilo diagnosticiranih kot ALK-pozitivnih ali ALK-negativnih pri IHK-analizi ALK (D5F3). Rezultati skupne učinkovitosti za te bolnike so povzeti v skladu z rezultati analize s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) v Tabela 30.

Tabela 30. Klinična korist krizotiniba (preživetje brez napredovanja) za bolnike, vključene v Preizkus št. 1.

Status ALK		RO [a]	SN [a]	95 % IZ [a]	Velikost vzorca	
					Skupina s kemoterapijo	Skupina s krizotinibom
Skupaj vklučenih	FISH+	0,454	0,139	(0,346, 0,596)	171	172
IHK- testirani na ALK	FISH+ [b]	0,407	0,214	(0,267, 0,618)	82	90
	FISH+//IHK+	0,401	0,237	(0,252, 0,639)	63	78
	FISH+//IHK-	1,711	0,703	(0,431, 6,789)	17	8

[a] Ugotovljeno razmerje ogroženosti (RO) za preživetje brez napredovanja (PBN) krizotiniba v primerjavi s kemoterapijo; standardna napaka (SN) in 2-stranski 95 % interval zaupanja (IZ). Rezultati so bili ocenjeni s stratificiranim Coxovim modelom z naslednjimi stratumi: rasa, možganska metastaza in ocena ECOG.

[b] Pri dveh na ALK FISH-pozitivnih bolnikih v skupini s kemoterapijo in pri 4 bolnikih v skupini s krizotinibom ni bil pridobljen ne pozitiven ne negativen rezultat IHK-testiranja na ALK.

Dodatne analize so bile izvedene za vključitev bolnikov, ki niso imeli rezultatov analize s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) ali pa so bili rezultati neveljavni, in oceno robustnosti zaključkov študije. Statistična analiza bolnikov z neskladnimi rezultati, ki niso bili vključeni v Preizkus št. 1, je vključevala simulacijo možnih izidov za te bolnike. Rezultati vseh hipotetičnih analiz so bili v splošnem podobni rezultatom primarne analize učinkovitosti.

Neskladni primeri FISH+/IHK- iz Preizkusa št. 1:

Študija primerjave metod

V študiji primerjave metod (Tabela 26 in Tabela 27) je bilo 25 bolnikov iz Preizkusa št. 1 ocenjenih kot FISH+/IHK-. Mediana vrednost testiranja Vysis ALK FISH (odstotek tumorskih celic, pozitivnih na preureditev gena ALK) za te primere je bila 20 % (povprečje 31,6 %, SD 21,58 %) in za 14 od teh primerov je bila vrednost FISH 25 % ali manj. Medtem ko so bile vrednosti testiranja Vysis ALK FISH vseh primerov nad 15 % mejno vrednostjo za ALK-pozitivnost, so bile njihove vrednosti v območju dvoumnosti pri FISH-testiranju (10 %–50 %). V nasprotju s tem je bila ugotovljena mediana FISH za vse vključene bolnike, testirane z IHK, 58 % (povprečje 56,9 %, SD 21,97 %).

Študija kliničnega izida

V študiji kliničnega izida je bilo 25 bolnikov, vključenih v Preizkus št. 1, ocenjenih kot FISH+/IHK- (glejte zadnjo vrstico v Tabeli 30). Osem od teh primerov je bilo randomiziranih v skupino klinične študije s krizotinibom. Pet od teh bolnikov je imelo vrednosti FISH zelo blizu mejne vrednosti FISH (15 %–18 % tumorskih celic, pozitivnih na preureditev gena ALK), prav tako pa so tudi izražali objektivno napredovanje ali stabilno bolezen/brez odziva. Dva od 8 bolnikov sta imela vrednosti FISH zunaj območja dvoumnosti FISH (66 % ter 72 % tumorskih celic, pozitivnih na preureditev gena ALK), prav tako je pri njima prišlo do delnega

objektivnega odziva tumorja. Osmi bolnik, ocenjen z IHK-, je bil FISH- in je bil vključen po pomoti; pri tem bolniku je prišlo do nedoločenega odziva.

Neskladni primeri FISH-/IHK+ iz Preizkusa št. 1

V študiji primerjave metod analize s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) je bilo 28 primerov, pregledanih za Preizkus št. 1, ocenjenih kot FISH-/IHK+. Glede na to, da je bila v kliničnem preizkusu uporabljena analiza FISH in da so bili v Preizkus št. 1 vključeni samo primeri z rezultatom FISH+, ni na voljo nobenih podatkov o izidu za neskladne primere FISH-/IHK+.

Študija kliničnega izida za ceritinib

Ugotavljanje klinične učinkovitosti analize s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) kot diagnostičnega pripomočka za izbiro bolnikov, ki jim lahko koristi zdravljenje s ceritinibom, je temeljilo na odprti, randomizirani, aktivno nadzorovani, večcentrični študiji oralnega ceritiniba 3. faze (Preizkus št. 3). Ta študija je primerjala klinično učinkovitost in varnost zdravljenja s ceritinibom ter kemoterapije (dubleta na osnovi platine s pemetreksedom, ki ji je sledilo vzdrževanje s pemetreksedom pri bolnikih brez napredujoče bolezni po 4 ciklih) pri predhodno nezdravljenih odraslih bolnikih z ALK-pozitivnim, lokalno napredovalnim ali metastatskim neploščatoceličnim NSCLC. Analiza s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) je bila uporabljena na instrumentu BenchMark XT pri skupno 1778 bolnikih za ugotavljanje primarnosti za Preizkus št. 3, za kar je bil potreben pozitiven status ALK. V randomizirani skupini je bilo skupno 376 bolnikov, pri katerih so rezultati analize pokazali ALK-pozitivne tumorje (189 v skupini s ceritinibom in 187 v skupini s kemoterapijo). Rezultati skupne učinkovitosti za bolnike, zdravljene s ceritinibom, so povzeti v Tabela 31. Ceritinib je pokazal statistično pomembno in klinično smiselno korist v primerjavi s kemoterapijo s 45 % zmanjšanjem tveganja pri PBN po oceni BIRC (RO = 0,55; 95 % IZ: 0,42, 0,73; $p < 0,001$), za bolnike, izbrane z analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3). Mediana PBN po oceni BIRC je bila 16,6 meseca (95 % IZ: 12,6, 27,2) in 8,1 meseca (95 % IZ: 5,8, 11,1) za skupino s ceritinibom oz. za skupino s kemoterapijo.

Tabela 31. Klinična korist ceritiniba (preživetje brez napredovanja) za bolnike, vključene v Preizkus št. 3.

Preživetje brez napredovanja	ZYKADIA (N = 189)	Kemoterapija (N = 187)
Mediana, meseci (95 % IZ) [a]	16,6 (12,6, 27,2)	8,1 (5,8, 11,1)
RO (95 % IZ) [b]	0,55 (0,42, 0,73)	
Vrednost p [c]	<0,0001	

RO = razmerje ogroženosti; IZ = interval zaupanja; BIRC = neodvisni odbor za slepo ocenjevanje; ND = ni doseženo; NO = ni ocenljivo

[a] Ocenjeno s Kaplan-Meierjevo metodo.

[b] Coxov regresijski model, stratificiran s stratifikacijskimi dejavniki pri randomizaciji (stanje bolnikove zmogljivosti po lestvici WHO: 0 v primerjavi z 1–2; prisotnost ali odsotnost kostnih metastaz, prisotnost ali odsotnost predhodne neoadjuvantne/adjuvantne kemoterapije), je bil uporabljen za oceno razmerja ogroženosti PBN, skupaj s 95 % IZ na osnovi Waldovega testa.

[c] Na osnovi stratificiranega log-rank testa (enaka stratifikacija kot [b]).

Stopnje sprejemljivosti barvanja za analizo s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) pri populaciji, predvideni za diagnostiko (1778 bolnikov, testiranih z analizo), so prikazane v Tabela 32. Prav tako so prikazane stopnje sprejemljive morfologije in sprejemljivega ozadja za preparate, obarvane pri analizi s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3). Pri 122 vzorcih poskus barvanja pri analizi s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) ni uspel, zato je bilo izvedeno ponovno barvanje. Ob končnem poskusu barvanja je 48 od 122 vzorcev ostalo nesprejemljivih (1 zaradi neveljavne kontrole ciklusa, 30 zaradi neveljavnega HE-preparata, 12 zaradi nesprejemljive kontrole z negativnim reagentom, 1 zaradi nesprejemljivega ozadja, 2 zaradi nesprejemljivega ozadja in morfologije ter 2 zaradi IHK-preparata, ki ga ni bilo mogoče oceniti). Analiza s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) je pokazala visoke stopnje sprejemljivosti začetnega in končnega skupnega obarvanja; 93,1 % oz. 97,3 %. Stopnje sprejemljivosti končne morfologije in ozadja so bile 99 % ali višje.

Tabela 32. Značilnosti delovanja začetnega in končnega barvanja pri analizi s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) za vzorce študije NSCLC, za katere je bilo preverjeno, ali so primerni za vključitev v Preizkus št. 3.

Ocenjene lastnosti obarvanja	Stopnja sprejemljivosti % (n/N) (95 % IZ)	
	Začetna*	Končna**
Skupna stopnja sprejemljivosti IHC-obarvanja ALK	93,1 % (1656/1778) (91,9–94,2 %)	97,3 % (1730/1778) (96,4–98,0 %)
Obarvanje ozadja	99,0 % (1655/1672) (98,4–99,4 %)	99,8 % (1727/1730) (99,5–99,9 %)
Morfologija	99,0 % (1657/1674) (98,4–99,4 %)	99,9 % (1728/1730) (99,6–100 %)

* začetni poskus barvanja

** končni poskus barvanja

Študija kliničnega izida za alektinib

Analiza klinične učinkovitosti protitelesa VENTANA ALK (D5F3) kot diagnostični pripomoček za izbiro bolnikov, ki jim lahko koristi zdravljenje z alektinibom, je temeljila na odprti, randomizirani, aktivno nadzorovani, večcentrični študiji oralnega alektiniba 3. faze (Preizkus št. BO28984). Ta študija je primerjala klinično učinkovitost in varnost osrednjem zdravljenju z alektinibom ter zdravljenju s krizotinibom pri predhodno nezdravljenih odraslih bolnikih z ALK-pozitivnim, lokalno napredovalim ali metastatskim NSCLC. Protiteleso VENTANA ALK (D5F3) je bilo uporabljeno na instrumentu BenchMark XT pri skupno 1239 bolnikih za ugotavljanje primernosti za vključitev v Preizkus št. BO28984, za kar je bil pri osrednjem testiranju potreben pozitiven status ALK. Skupno so bili randomizirani 303 bolniki, pri katerih so rezultati analize pokazali ALK-pozitivne tumorje, randomizirani in analizirani glede učinkovitosti (152 v skupini z alektinibom in 151 v skupini s krizotinibom). Rezultati skupne učinkovitosti za bolnike so povzeti v Tabeli 33. Alektinib je pokazal statistično pomembno in klinično pomembno korist v primerjavi s krizotinibom s 53 % zmanjšanjem tveganja pri PBN po oceni preiskovalca (HR = 0,47, 95 % IZ: 0,34, 0,65; $p < 0,0001$) in 50 % zmanjšanje tveganja pri PBN po oceni IRC (HR = 0,50, 95 % IZ: 0,36, 0,7; $p < 0,0001$) za izbrane bolnike, ki so uporabljali protiteleso VENTANA ALK (D5F3). Mediano preživetje brez napredovanja (PBN) po oceni preiskovalca v skupini z alektinibom ni bilo doseženo, po oceni IRC pa je znašalo 25,7 meseca (95 % IZ: 19,9, NO) v skupini z alektinibom in 10,4 meseca (95 % IZ: 7,7, 14,6) v skupini s krizotinibom.

Tabela 33. Klinična korist alektiniba ali krizotiniba (preživetje brez napredovanja) za bolnike, vključene v Preizkus št. BO28984.

Preživetje brez napredovanja po oceni preiskovalca	Alektinib (N = 152)	Krizotinib (N = 151)
Mediana, meseci (95 % IZ) [a]	NO (17,7, NO %)	11,1 (9,1, 13,1 %)
RO (95 % IZ) [b]	0,47 (0,34, 0,65 %)	
Vrednost p [c]	<0,0001	
Preživetje brez napredovanja po oceni IRC	Alektinib (N = 152)	Krizotinib (N = 151)
Mediana, meseci (95 % IZ) [a]	25,7 (19,9, NO %)	10,4 (7,7, 14,6 %)
RO (95 % IZ) [b]	0,50 (0,36, 0,70 %)	
Vrednost p [c]	<0,0001	

RO = razmerje ogroženosti; IZ = interval zaupanja; IRC=neodvisni odbor za ocenjevanje; NO = ni ocenljivo

[a] Ocenjeno s Kaplan-Meierjevo metodo.

[b] Razmerje ogroženosti je bilo ocenjeno s Coxovo regresijo, stratificirano po rasnih sočasnih spremenljivkah (Azijci v primerjavi z osebami, ki niso azijskega porekla) in metastaze v osrednjem živčnem sistemu ob izhodišču (prisotnost/odsotnost) po IRC.

[c] Na osnovi stratificiranega log-rank testa (enaka stratifikacija kot [b]).

Stopnje sprejemljivosti barvanja za protiteleso VENTANA ALK (D5F3) pri populaciji, predvideni za diagnostiko (1239 bolnikov, testiranih z analizo) so primerljive z rezultati preizkusa A2301.

Zaključek

Analiza s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) je obnovljiva v rezultatih obarvanja pri kliničnem statusu ALK na instrumentih BenchMark ULTRA, BenchMark XT in BenchMark GX. Binami algoritem za točkovanje ima visoko stopnjo ponovljivosti pri ocenjevalcih. Analiza je pri določanju statusa ALK skladna z Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit. Analiza s protitelesom VENTANA anti-ALK (D5F3) se lahko uporabi za določanje bolnikov, primernih za zdravljenje z zdravilom XALKORI® (krizotinib), ZYKADIA® (ceritinib), ali ALECENSA® (alektinib).

LITERATURA

- 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.

INTELEKTUALNA LASTNINA

VENTANA, BENCHMARK, OPTIVIEW in logotip VENTANA so blagovne znamke družbe Roche.

Vse druge blagovne znamke so last njihovih lastnikov.

© 2017 Ventana Medical Systems, Inc.

Prodaja se pod licenco



KONTAKT



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany



www.ventana.com