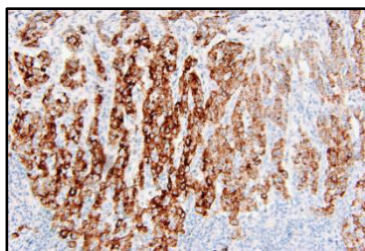


VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

REF 790-4794

06679072001

IVD  50



Rys. 1. Tkanka niedrobnokomórkowego raka płuc wybarwiona przy użyciu testu VENTANA anti-ALK (D5F3).

PRZEZNACZENIE

Przeciwciało VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody jest przeznaczone do użytku laboratoryjnego do jakościowej detekcji białka — kinazy chłoniaka anaplastycznego (anaplastic lymphoma kinase, ALK) — w utrwalonej w formalinie i zatopionej w parafinie tkance niedrobnokomórkowego raka płuc (non-small cell lung carcinoma, NSCLC) wybarwionej w aparacie BenchMark IHC/ISH. Stosowanie przeciwciała jest wskazane pomocniczo

podczas identyfikacji pacjentów kwalifikujących się do terapii preparatami XALKORI® (kryzotynib), ZYKADIA® (certynib), ALECENSA® (alektynib) lub lorlatynib.

Wynik powinien zostać zinterpretowany przez wykwalifikowanego patomorfologa na podstawie badań histopatologicznych, odpowiednich danych klinicznych i badań kontrolnych.

To przeciwciało jest przeznaczone do stosowania w diagnostyce in vitro (IVD).

STRESZCZENIE I INFORMACJE OGÓLNE

Kinaza chłoniaka anaplastycznego (ALK) to białko będące receptorem o aktywności kinazy tyrozynowej i należące do nadrodziny receptorów insuliny.¹ ALK jest glikoproteiną błonową typu I, której ekspresja w prawidłowych warunkach zachodzi w układzie nerwowym.² Gen kodujący ALK znajduje się na chromosomie 2p23 i obejmuje 2 duże introny i 26 eksonów.¹ W ramach patogenezы molekularnej obejmującej białko ALK dochodzi najpierw do przegrupowań chromosomalnych, na skutek których sekwencje kodujące wewnątrzkomórkową domenę sygnałową ALK na końcu 3' łączą się z elementami promotorowymi i sekwencjami kodującymi innych genów na końcu 5'. Elementy promotorowe i sekwencje kodujące na końcu 5' stymulują nadekspresję chimer białkowych oraz powstawanie oligomerów w sposób niezależny od ligandów — procesy te występują powszechnie w ludzkich nowotworach obejmujących ekspresję fuzyjnej kinazy tyrozynowej.

Inwersję w obrębie chromosomu 2p, prowadzącą do powstania genu fuzyjnego zawierającego fragmenty genów EML4 (ang. echinoderm microtubule associated protein-like 4) i ALK, odkryto w roku 2007 w liniach komórkowych NSCLC i archiwalnych próbkach klinicznych.³ Opublikowane wyniki dalszych badań prowadzonych w tym zakresie wskazują, że w wyniku inwersji, za sprawą której dochodzi do fuzji EML4-ALK, powstaje co najmniej 9 katalitycznie aktywnych wariantów fuzyjnej kinazy, a każdy z tych wariantów zawiera ten sam fragment C-końcowej domeny kinazy ALK.⁴⁻⁸ Podobnie jak w przypadku fuzji genu ALK odkrytych najpierw w chłoniaku anaplastycznym z dużych komórek (anaplastic large-cell lymphoma, ALCL), wykazano, że białko fuzyjne EML4-ALK ma aktywność transformującą. Jest to zgodne z obserwacją poczynioną w przypadku transgeniczných myszy, u których ekspresja białka EML4-ALK w nabłonkowych komórkach pęcherzyków płuc jest istotnym czynnikiem onkogennym.⁹

ZNACZENIE KLINICZNE

NSCLC jest najczęstszym typem raka płuc. Gen ALK jest obecnie uznawany za kluczowy czynnik stymulujący onkogenezę w NSCLC. W większości przypadków to gen EML4 tworzy z nim fuzję, jednak zidentyfikowano także inne geny, które mogą być jego partnerem w ramach genu fuzyjnego.^{10,11} Obserwowana częstość występowania przegrupowań genu ALK wynosi 2–7%, co przekłada się na około 6000 pacjentów ALK-

dotadnich rocznie w Stanach Zjednoczonych (USA) i 40000 takich pacjentów rocznie na całym świecie.^{3,4,7}

Porównując próbki tkanki gruczolakoraka płuc oraz raków o histologiach płaskonabłonkowych i drobnokomórkowych, to właśnie w przypadku gruczolakoraka obserwowano znaczącą większość przegrupowań genu ALK w raku płuc.³⁻⁸ Istnieją dowody sugerujące korelację między przegrupowaniami genu ALK a rakiem NSCLC u pacjentów, którzy „nigdy nie palili tytoniu lub palili niewiele”, jednak współwystępowanie tego czynnika może nie być istotne statystycznie.^{3,4,7,9} Należy zwrócić uwagę, że przegrupowania genu ALK rzadko występują jednocześnie z mutacjami genów EGFR, HER2 lub KRAS, co wskazuje, że status dodatni względem ALK jest cechą osobnego podtypu tej choroby.⁹

Preparat XALKORI® to selektywny, drobnocząsteczkowy, ATP-kompetycyjny inhibitor kinaz tyrozynowych ALK, ROS1 i c-Met/Hepatocyte Growth Factor Receptor (HGFR) oraz ich wariantów onkogennych (np. białek fuzyjnych ALK lub ROS1 albo wariantów mutacyjnych c-Met/HGFR). Wykazano, że XALKORI® powoduje zależną od stężenia inhibicję fosforylacji kinazy ALK i c-Met w testach komórkowych wykorzystujących linie komórek nowotworowych. Ma również udowodnioną aktywność przeciwnowotworową u myszy z ksenografiami guzów wykazujących ekspresję białek fuzyjnych EML4- lub NPM-ALK albo Met.^{12,13,14}

Preparat ZYKADIA® to inhibitor kinazy. Do celów działania inhibitora ZYKADIA® rozpoznanych w testach biochemicznych lub komórkowych w stężeniach istotnych klinicznie należą ALK, receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (IGF-1R), receptor insuliny (InsR) oraz ROS1. Spośród tych receptorów preparat ZYKADIA® jest najbardziej aktywny przeciwko ALK. W badaniach prowadzonych in vitro i in vivo preparat ZYKADIA® powodował inhibicję autofosforylacji ALK, fosforylacji dalszego białka sygnałowego STAT3 zachodzącej pod wpływem ALK oraz proliferacji komórek rakowych zależnych od ALK.

Preparat ZYKADIA® prowadził do inhibicji proliferacji in vitro linii komórkowych wykazujących ekspresję białek fuzyjnych EML4-ALK i NPM-ALK oraz do zależnej od dawki inhibicji wzrostu EML4-ALK-dodatnich ksenografów NSCLC u myszy i szczurów.¹⁵

Znaczenie kliniczne przegrupowań genu ALK zostało wykazane w randomizowanych badaniach klinicznych prowadzonych z grupą kontrolną otrzymującą aktywne leczenie (badanie dotyczące preparatu XALKORI® zostało przeprowadzone przez firmę Pfizer, natomiast badanie dotyczące preparatu ZYKADIA® przeprowadziła firma Novartis).^{14,15}

Preparat ALECENSA® jest wysoce selektywnym i silnie działającym inhibitorem kinazy tyrozynowej ALK i RET, który powoduje inhibicję wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych zaangażowanych w proliferację i przeżycie komórek nowotworowych, a zatem przyczynia się do śmierci komórek rakowych i powoduje inhibicję wzrostu i proliferacji tych komórek.¹⁶ Na podstawie danych przedklinicznych ustalono, że preparat ALECENSA® nie jest substratem transporterów wypływu (PGP ani BCRP) w barierze krew-mózg, dzięki czemu może przenikać do ośrodkowego układu nerwowego i być tam zatrzymywany. W badaniach przedklinicznych prowadzonych na ksenografie w modelu mysim preparat ALECENSA® powodował regresję nowotworu, co obejmowało aktywność przeciwnowotworową w mózgu i przedłużenie przeżycia modeli zwierzęcych z nowotworem śródczaszkowym.¹⁷ Preparat ALECENSA® jest dobrze tolerowany i zapewnia łatwy do kontrolowania profil bezpieczeństwa.¹⁸⁻²⁰

Lorlatynib to selektywny, drobnocząsteczkowy, kompetycyjny względem adenozynotrifosforanu (ATP) inhibitor kinazy tyrozynowej ALK trzeciej generacji, który może przenikać przez barierę krew-mózg. Został opracowany w taki sposób, aby przenikał przez barierę krew-mózg oraz przezwyciężał główne mechanizmy oporności, które rozwijają się po wcześniejszym leczeniu inhibitorem ALK, albo im zapobiegał. Lorlatynib jest również silnie działającym inhibitorem kinazy tyrozynowej ROS1.²¹ In vitro lorlatynib silnie hamuje aktywność katalityczną niezmutowanej ALK i szerokiego zakresu klinicznie istotnych zmutowanych kinaz ALK, w tym tych, które odpowiadają za oporność na inhibitory kinazy tyrozynowej ALK pierwszej i drugiej generacji.²² Lorlatynib wykazuje znaczną aktywność przeciwnowotworową przy niskich nanomolowych wolnych stężeniach w osoczu modeli zwierzęcych będących nosicielami mutacji ALK, w tym mutacji, które odpowiadają za oporność na inhibitory ALK pierwszej i drugiej generacji. U modeli zwierzęcych z wszczepami ortotopowymi lorlatynib powodował kurczenie się guza i przedłużał przeżycie poprzez penetrację bariery krew-mózg i osiągnięcie skutecznej ekspozycji mózgu.^{23,24}

Wykazano zgodność testu VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (VENTANA anti-ALK (D5F3)) z testem Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit (ALK FISH) w zakresie ustalania statusu ekspresji białka ALK w tkankach raka NSCLC pobranych od pacjentów. W przypadku testu ALK FISH mogą występować trudności techniczne w ocenie wyników barwienia. Przegrupowania

wewnątrzchromosomalne mogą powodować nieznaczne dzielenie sygnału, potencjalnie prowadzące do uzyskania wyników fałszywie ujemnych.²⁵ Ostatnie badania wykazały, że metoda IHC jest czuła i pozwala na swoiste określenie statusu ekspresji białka ALK, stanowiąc obiecującą alternatywę dla testu ALK FISH.^{10,11,25,26,27} Test VENTANA anti-ALK (D5F3) i powiązany z nim algorytm oceniania opracowano, aby ustalać status ekspresji białka ALK w próbkach raka NSCLC.

Do standardowych testów immunohistochemicznych (IHC) wystarczające są małe próbki tkanki, dzięki czemu technika ta — stosowana wraz z przeciwciałami wykrywającymi antygeny wspomagające diagnostykę raka — jest dla patomorfologa efektywnym narzędziem diagnostycznym i prognostycznym. Obecnie jednym z ważniejszych markerów raka NSCLC jest białko ALK.

Interpretacja wyników barwienia próbek tkanki z użyciem testu VENTANA anti-ALK (D5F3) powinna być wykonywana za pomocą rekomendowanego algorytmu oceniania. Zaletą histologicznych preparatów tkankowych jest zachowanie morfologii tkanki, co ułatwia interpretację dodatniego odczynu w teście na obecność ALK. Wyniki wszystkich testów histologicznych powinny być interpretowane przez patomorfologa. Wyniki te należy uzupełnić badaniami morfologicznymi i właściwymi kontrolami oraz używać ich w połączeniu z innymi danymi klinicznymi i laboratoryjnymi. Na antygeny docelowe w testach IHC wpływa czas utrwalania, rodzaj środka utrwalającego oraz wiek przygotowanych skrawków tkanek, dlatego należy zadbać o to, by sposób przygotowania próbek przed rozpoczęciem barwienia był zgodny z metodą testową (patrz podręcznik interpretacji wyników barwienia przeciwciałem VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody w kierunku niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC) (P/N 1011879) oraz sekcja „Szczególne ograniczenia” poniżej).

ZASADA DZIAŁANIA

W teście VENTANA anti-ALK (D5F3) wykorzystywane jest monoklonalne królicze przeciwciało pierwszorzędowe, które przyłącza się do białka ALK w skrawkach tkanek zatopionych w parafinie. To swoiste przeciwciało można uwidocznić, używając najpierw zestawu OptiView DAB IHC Detection Kit (nr kat. 760-700 / 06396500001), a następnie zestawu OptiView Amplification Kit (nr kat. 760-099 / 06396518001 (50 testów) lub 860-099 / 06718663001 (250 testów)). Więcej informacji można znaleźć w ulotkach dołączonych do opakowań zestawów OptiView DAB IHC Detection Kit i OptiView Amplification Kit.

DOSTARCZONE MATERIAŁY

Odczynnik VENTANA anti-ALK (D5F3) dostarczany jest w ilości wystarczającej do przeprowadzenia 50 testów.

Jeden dozownik 5 mL odczynnika VENTANA anti-ALK (D5F3) zawiera około 70 µg króliczego przeciwciała monoklonalnego (D5F3).

Przeciwciało jest rozcieńczone w buforze PBS z dodatkiem białka nośnikowego i środka ProClin 300 w stężeniu 0.05%, będącego konserwantem.

Stężenie swoistego przeciwciała wynosi około 14 µg/mL.

Odczynnik VENTANA anti-ALK (D5F3) to rekombinowane królicze przeciwciało monoklonalne otrzymywane jako oczyszczony supernatant z hodowli komórkowej.

Podręcznik interpretacji wyników barwienia przeciwciałem VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody w kierunku niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC) (P/N 1011879).

W arkuszu metody odpowiedniego zestawu detekcyjnego firmy VENTANA podano więcej informacji na następujące tematy: zasada działania, materiały i metody, pobieranie próbek i przygotowanie ich do analizy, procedury kontroli jakości, rozwiązywanie problemów, interpretacja wyników i ograniczenia metody.

MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZANE

W skład dostarczonego zestawu nie wchodzi odczynnik do barwienia, takie jak zestawy detekcyjne firmy VENTANA, ani elementy pomocnicze, takie jak dodatnie i ujemne kontrolne preparaty tkankowe.

Nie wszystkie produkty przedstawione w arkuszu metody są dostępne we wszystkich regionach geograficznych. Odpowiednich informacji udzieli lokalny przedstawiciel działu pomocy technicznej.

Wymienione niżej odczynniki i materiały mogą być potrzebne do przeprowadzenia barwienia, ale nie są dostarczane:

1. Tkanka ludzkiego wyrostka robaczkowego lub niedrobnokomórkowego raka płuc ALK-dodatniego i ALK-ujemnego do stosowania jako tkanka kontrolna
2. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (nr kat. 790-4795 / 06683380001)

3. Szkiełka mikroskopowe, naładowane dodatnio
4. OptiView DAB IHC Detection Kit (nr kat. 760-700 / 06396500001)
5. OptiView Amplification Kit (nr kat. 760-099 / 06396518001 (50 testów) lub nr kat. 860-099 / 06718663001 (250 testów))
6. EZ Prep Concentrate (10X) (nr kat. 950-102 / 05279771001)
7. Reaction Buffer Concentrate (10X) (nr kat. 950-300 / 05353955001)
8. LCS (Predilute) (nr kat. 650-010 / 05264839001)
9. ULTRA LCS (Predilute) (nr kat. 650-210 / 05424534001)
10. Cell Conditioning Solution (CC1) (nr kat. 950-124 / 05279801001)
11. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (nr kat. 950-224 / 05424569001)
12. Hematoxylin II (nr kat. 790-2208 / 05277965001)
13. Bluing Reagent (nr kat. 760-2037 / 05266769001)
14. Środek do ostatecznego zatapiania
15. Szkiełko nakrywkowe
16. Zautomatyzowany aparat do naklejania szkiełek nakrywkowych
17. Sprzęt laboratoryjny do ogólnego użytku
18. Aparat BenchMark IHC/ISH

PRZECHOWYWANIE I STABILNOŚĆ

Produkt, bezpośrednio po odebraniu i zawsze, gdy nie jest używany, należy przechowywać w temperaturze 2–8°C. Nie zamrażać.

W celu zapewnienia właściwego dozowania odczynnika i stabilności przeciwciała po każdym użyciu na dozownik należy założyć zatyczkę i niezwłocznie umieścić go w lodówce w pozycji pionowej.

Na każdym dozowniku przeciwciała podana jest data ważności. Prawdopodobnie przechowywany odczynnik zachowuje stabilność do daty podanej na etykiecie. Nie należy używać odczynnika po upływie daty ważności.

PRZYGOTOWANIE PRÓBEK

Do stosowania z tym pierwszorzędowym przeciwciałem nadają się rutynowo przygotowane tkanki utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie (formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE) pod warunkiem stosowania zestawów detekcyjnych firmy VENTANA i aparatów BenchMark IHC/ISH.

Na podstawie modeli ksenograftowych utworzonych z ludzkiej linii komórkowej NCI-H2228 raka NSCLC, która jest dodatnia względem ALK, ustalono, że zalecany środkiem do utrwalania tkanek jest obojętna zbuforowana formalina (neutral buffered formalin, NBF) w stężeniu 10%, przy czasie utrwalania wynoszącym co najmniej 6 godzin. Utrwalanie trwające krócej niż 6 godzin powoduje znaczne obniżenie intensywności wybarwienia ALK. W przypadku utrwalania przez co najmniej 6 godzin jako środka utrwalającego można również użyć formaliny cynkowej. Stosowana objętość środka powinna być od 15 do 20 razy większa niż objętość tkanki. Środek utrwalający w ciągu 24 godzin może przeniknąć maksymalnie 2–3 mm w głąb tkanki litej lub 5 mm w głąb tkanki porowatej. Utrwalanie może odbywać się w temperaturze pokojowej (15–25°C).^{28,29}

Środki utrwalające takie jak AFA (ang. alcohol-formalin-acetic acid), PREFER, B5 i inne środki utrwalające zawierające kwas i/lub alkohol powodują utratę intensywności wybarwienia ALK w przypadku wszystkich testowanych czasów utrwalania (od 1 do 72 godzin). Nie zaleca się stosowania tych środków utrwalających z tym testem. Badania opóźnienia rozpoczęcia utrwalania wykazały również utratę intensywności wybarwienia ALK, gdy próbki ksenograftowe nie zostały utrwalone w ciągu 6 godzin od wycięcia. Więcej informacji dotyczących wpływu zastosowanej metody przygotowania próbki na intensywność barwienia białka ALK można znaleźć w podręczniku interpretacji.

Tkanki należy pociąć na skrawki o grubości około 4 µm i umieścić je na dodatnio naładowanych szkiełkach podstawowych. Preparaty należy wybarwić niezwłocznie, ponieważ antygenowość ciętych skrawków tkanek może z czasem ulegać osłabieniu, a po upływie 3 miesięcy od wycięcia z bloczka parafinowego może nie pozwalać na skuteczne przeprowadzenie barwienia (informacje na ten temat znajdują się w podręczniku interpretacji oraz w sekcji „Charakterystyka wyników” zamieszczonej poniżej).

OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

1. Do stosowania w diagnostyce in vitro (IVD).
2. Wyłącznie do użytku profesjonalnego.
3. Nie wykonywać większej liczby testów niż liczba określona na etykiecie.
4. **PRZESTROGA:** W Stanach Zjednoczonych prawo federalne zezwala na sprzedaż tego wyrobu wyłącznie lekarzowi lub na zlecenie lekarza. (Rx Only)

5. W tym odczynniku jako środek konserwujący zastosowano roztwór ProClin 300. Uznano go za środek drażniący, a jego kontakt ze skórą może powodować uczulenie. Podczas pracy z produktem należy stosować uzasadnione środki ostrożności. Unikać kontaktu odczynników z oczami, skórą i błonami śluzowymi. Stosować odpowiednią odzież i rękawice ochronne.
6. Naładowane dodatnio szkiełka podstawowe mogą być podatne na czynniki środowiskowe powodujące niewłaściwe barwienie. Aby uzyskać więcej informacji na temat postępowania ze szkiełkami tego typu, należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem firmy Roche.
7. Materiały pochodzenia ludzkiego lub zwierzęcego należy traktować jako materiały stanowiące zagrożenie biologiczne i usuwać je z zachowaniem właściwych środków ostrożności. W przypadku narażenia należy przestrzegać wytycznych określonych w dyrektywach wydanych przez właściwe organy.^{30,31}
8. Unikać kontaktu odczynników z oczami i błonami śluzowymi. W przypadku kontaktu odczynników z wrażliwymi miejscami splukiwać obficie dużą ilością wody.
9. Unikać skażenia mikrobiologicznego odczynników ze względu na możliwość otrzymania nieprawidłowych wyników.
10. Aby uzyskać więcej informacji dotyczących stosowania tego wyrobu, należy zapoznać się z przewodnikiem użytkownika aparatu BenchMark IHC/ISH oraz instrukcjami obsługi wszystkich wymaganych elementów. Instrukcje te można znaleźć pod adresem dialog.rocke.com.
11. W celu uzyskania informacji na temat zalecanej metody utylizacji produktu należy skontaktować się z władzami lokalnymi i/lub krajowymi.
12. Oznakowanie dotyczące bezpieczeństwa produktu jest przede wszystkim zgodne z wytycznymi GHS UE. Karta charakterystyki jest dostępna na życzenie profesjonalnego użytkownika.
13. W celu zgłoszenia podejrzenia wystąpienia poważnych incydentów związanych z tym wyrobem należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem firmy Roche i właściwym organem państwa członkowskiego lub kraju, którego rezydentem jest użytkownik.

Ten produkt zawiera elementy sklasyfikowane w określony poniżej sposób zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 1272/2008:

Tab. 1. Informacje o zagrożeniach.

Zagrożenie	Kod	Zwrot
	H317	Może powodować reakcję alergiczną skóry.
	P261	Unikać wdychania mgły lub par.
	P272	Zanieczyszczonej odzieży ochronnej nie wynosić poza miejsce pracy.
	P280	Stosować rękawice ochronne.
	P333 + P313	W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.
	P362 + P364	Zdjąć zanieczyszczoną odzież i wyprać przed ponownym użyciem.
	P501	Zawartość/pojemnik usuwać, przekazując je do zatwierdzonej placówki utylizacji odpadów.

Ten produkt zawiera substancję o numerze CAS 55965-84-9, masę reakcyjną: 5-chloro-2-metylo-2H-izotiazol-3-onu i 2-metylo-2H-izotiazol-3-onu (3:1).

PROCEDURA BARWIENIA

Test VENTANA anti-ALK (D5F3) opracowano do stosowania w aparatach BenchMark IHC/ISH w połączeniu z produktami Rabbit Monoclonal Negative Control Ig, OptiView DAB IHC Detection Kit, OptiView Amplification Kit i odczynnikami pomocniczymi. Zalecane protokoły barwienia przedstawiono w poniższych tabelach.

Niniejsze przeciwciało zostało zoptymalizowane pod kątem określonego czasu inkubacji, jednak użytkownik jest zobowiązany do walidacji wyników uzyskanych z zastosowaniem tego odczynnika. Postępowanie niezgodne z protokołami barwienia przedstawionymi w tabelach (Tab. 2, Tab. 3 i Tab. 4) może spowodować uzyskanie wyników fałszywie dodatnich lub fałszywie ujemnych. Opracowano procedurę barwienia właściwą dla ALK, o nazwie **U VENTANA ALK (D5F3)**, przeznaczoną do stosowania w aparacie BenchMark ULTRA. Aparat BenchMark ULTRA, w którym wybierane będą warunki protokołu na

potrzeby procedury barwienia właściwej dla ALK, musi być wyposażony w oprogramowanie VSS 12.3 z procedurą barwienia OptiView v5 lub nowszą.

Parametry procedur zautomatyzowanych mogą być wyświetlane, drukowane i edytowane zgodnie z procedurą opisaną w przewodniku użytkownika aparatu. Więcej informacji na temat procedur barwienia immunohistochemicznego podano w arkuszu metody odpowiedniego zestawu detekcyjnego firmy VENTANA.

Aby uzyskać więcej informacji dotyczących prawidłowego użytkowania tego wyrobu, należy zapoznać się z arkuszem metody dozownika wbudowanego powiązanym z P/N 790-4794.

Tab. 2. Zalecany protokół barwienia dla testu VENTANA anti-ALK (D5F3) i odczynnika Rabbit Monoclonal Negative Control Ig w połączeniu z zestawami detekcyjnymi OptiView DAB IHC Detection Kit i OptiView Amplification Kit w aparatach BenchMark ULTRA i BenchMark ULTRA PLUS.

Procedura barwienia	U VENTANA ALK (D5F3)
Etap protokołu	Wprowadzany parametr
Przeciwciało (pierwszorzędowe)	VENTANA ALK AB — 16 minut (jeśli nie wybrano odczynnika, ustawieniem domyślnym jest 4794)
	-4794
	-4796
	-7155
	-7157 (wybrać jeden z powyższych odczynników w zależności od miejsca dystrybucji)
	lub Negative Control
Barwienie kontrastowe	Hematoxylin II, 4 minuty
Po barwieniu kontrastowym	Bluing, 4 minuty

Tab. 3. Zalecany protokół barwienia dla testu VENTANA anti-ALK (D5F3) i odczynnika Rabbit Monoclonal Negative Control Ig w połączeniu z zestawami detekcyjnymi OptiView DAB IHC Detection Kit i OptiView Amplification Kit w aparacie BenchMark XT.

Rodzaj procedury	Metoda
Opcja synchronizacji IHC	Wybrane ^a
Odparafinowanie	Wybrane
Kondycjonowanie komórek (odsłonięcie antygenu)	CC1, 92 minuty, 100°C
Inhibitor peroksydazy przed przeciwciałem pierwszorzędowym	Wybrane
Przeciwciało (pierwszorzędowe)	Ventana anti-ALK (D5F3) [-4794] lub Rabbit Mono Neg [-4795] 16 minut, 37°C
OptiView HQ Univ Linker	12 minut
OptiView HRP Multimer	12 minut
OptiView Amplification	Wybrane
OV AMP H2O2, OV Amplifier	8 minut
OV AMP Multimer	8 minut
Barwienie kontrastowe	Hematoxylin II, 4 minuty

Rodzaj procedury	Metoda
Po barwieniu kontrastowym	Bluing, 4 minuty

^a Ten etap ma zastosowanie tylko w przypadku oprogramowania XT OptiView DAB v4 i jest niedostępny w wcześniejszych wersjach oprogramowania.

Tab. 4. Zalecany protokół barwienia dla testu VENTANA anti-ALK (D5F3) i odczynnika Rabbit Monoclonal Negative Control Ig w połączeniu z zestawami detekcyjnymi OptiView DAB IHC Detection Kit i OptiView Amplification Kit w aparacie BenchMark GX.

Rodzaj procedury	Metoda
Odparafinowanie	Wybrane
Kondycjonowanie komórek (odsłonięcie antygenu)	CC1, 92 minuty, 100°C
Inhibitor peroksydazy przed przeciwciałem pierwszorzędowym	Wybrane
Przeciwciało (pierwszorzędowe)	Ventana anti-ALK (D5F3) [-4794] lub Rabbit Mono Neg [-4795] 16 minut, 37°C
OptiView HQ Univ Linker	12 minut
OptiView HRP Multimer	12 minut
OptiView Amplification	Wybrane
OV AMP H2O2, OV Amplifier	8 minut
OV AMP Multimer	8 minut
Barwienie kontrastowe	Hematoxylin II, 4 minuty
Po barwieniu kontrastowym	Bluing, 4 minuty

Ze względu na zmienność utrwalania i obróbki tkanek, a także różne ogólne warunki środowiskowe i w zakresie wyposażenia laboratoryjnego konieczne może być wydłużenie lub skrócenie inkubacji z przeciwciałem pierwszorzędowym, kondycjonowania komórek albo wstępnej obróbki proteazą dla poszczególnych próbek, w zależności od zastosowanej metody detekcji i preferencji badacza. Więcej informacji na temat zmiennych związanych z utrwalaniem można znaleźć w dokumencie „Immunohistochemistry Principles and Advances”.³²

PROCEDURY KONTROLI JAKOŚCI

Rabbit Monoclonal Negative Control Ig

Z każdą próbką należy stosować odpowiedni preparat do kontroli ujemnej ułatwiający interpretację wyników. Odczynnik do kontroli ujemnej Rabbit Monoclonal Negative Control Ig w postaci przeciwciała został dopasowany konkretnie do tego testu i należy go używać zamiast przeciwciała pierwszorzędowego w celu oceny nieswoistego barwienia. Czas procedury barwienia z odczynnikiem do kontroli ujemnej powinien być równy czasowi inkubacji z przeciwciałem pierwszorzędowym. Użycie innego odczynnika do kontroli ujemnej lub posłużenie się niezalecanym odczynnikiem do kontroli ujemnej może doprowadzić do otrzymania zafałszowanych wyników.

Kontrole systemowe

Wraz z próbkami pacjentów należy poddawać analizie również kontrole systemowe. Mogą to być próbki tkanki ludzkiego wyrostka robaczkowego³³ lub próbki NSCLC, o których wiadomo, że są dodatnie/ujemne względem ALK.

Tkanki kontrolne powinny być próbkami pobranymi z autopsji, biopsji lub chirurgicznie i powinny zostać przygotowane lub utrwalone jak najszybciej, w identyczny sposób jak skrawki badane. Takie tkanki mogą być wykorzystywane do monitorowania wszystkich kroków procedury, od przygotowania tkanki po jej barwienie. Użycie skrawka tkanki utrwalonego lub poddanego obróbce w sposób inny niż próbka badana umożliwia kontrolę wszystkich odczynników oraz kroków metody z wyjątkiem utrwalania i obróbki tkanki.

Tkanka kontrolna wyrostka robaczkowego lub raka NSCLC dodatniego/ujemnego względem ALK

W ramach każdej procedury barwienia wykonywanej przy użyciu testu VENTANA anti-ALK (D5F3) należy uwzględnić tkanki kontrolne: ALK-dodatnią i ALK-ujemną.

Przypadki raka NSCLC reprezentujące wyniki kliniczne ALK-dodatnie i wyniki kliniczne ALK-ujemne są odpowiednie do optymalnej kontroli jakości, w tym do detekcji nawet nieznacznego rozkładu odczynnika lub problemów dotyczących nietypowego działania aparatu.

Tkanka ludzkiego wyrostka robaczkowego zawiera zarówno składniki wykazujące barwienie dodatnie, jak i składniki wykazujące barwienie ujemne względem białka ALK, zatem może również być stosowana jako kontrola systemowa. Składników tkankowych dających odczyn dodatni używa się w celu potwierdzenia naniesienia przeciwciała na preparat oraz prawidłowego działania aparatu; składniki dające odczyn ujemny są używane do wykrycia nawet nieznacznego rozkładu odczynnika lub problemów dotyczących nietypowego działania aparatu.

Opisy odpowiedniego barwienia tkanki raka NSCLC ALK-dodatniego i ALK-ujemnego oraz składników tkankowych wyrostka robaczkowego zawierają Tab. 5 i Tab. 6 oraz podręcznik interpretacji.

Tkanki kontrolne, o których wiadomo, że są dodatnie/ujemne, używane do monitorowania działania testu ALK względem próbek pacjentów, muszą zostać utrwalone i poddane obróbce w taki sam sposób jak próbki pacjentów. W przeciwnym wypadku tkanki kontrolne mogą być używane tylko do monitorowania poprawności działania odczynników testowych. Tkanki kontrolne nie powinny być stosowane jako pomoc w określaniu diagnozy dotyczącej próbek pacjentów.

Weryfikacja badania

Przed pierwszym użyciem przeciwciała lub systemu do barwienia w procedurze diagnostycznej należy zweryfikować swoistość przeciwciała poprzez wybarwienie serii tkanek dodatnich i tkanek ujemnych względem białka ALK, dla których znana jest charakterystyka wyników badań metodą IHC (patrz „Procedury kontroli jakości” wyszczególnione wcześniej w tej części ulotki dołączonej do produktu, zalecenia dotyczące kontroli jakości opracowane w ramach programu College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program i zawarte w dokumencie Anatomic Pathology Checklist³⁴ lub wytyczne CLSI Approved Guideline³⁵). Te procedury kontroli jakości należy powtarzać dla każdej nowej partii przeciwciała oraz każdorazowo w przypadku zmiany parametrów testu. Tkanki raka NSCLC ze znanym statusem ekspresji białka ALK lub próbki ludzkiego wyrostka robaczkowego są odpowiednie do weryfikacji badania.

INTERPRETACJA WYBARWIENIA / OCZEKIWANE WYNIKI

Zautomatyzowana procedura barwienia immunohistochemicznego opracowana przez firmę VENTANA prowadzi do wytrącania brązowego produktu reakcji (DAB) w miejscach występowania antygenów zlokalizowanych przez test VENTANA anti-ALK (D5F3). Przed przystąpieniem do interpretacji wyników wykwalifikowany patomorfolog z doświadczeniem w procedurach IHC musi dokonać oceny wyników barwienia przy użyciu odczynnika do kontroli ujemnej i kontroli systemowych oraz zakwalifikować wybarwiony preparat do badania.

Tkanki kontrolne do systemowej kontroli dodatniej/ujemnej

Wybarwione tkanki do kontroli dodatniej i ujemnej należy ocenić, aby upewnić się, że wszystkie odczynniki działają prawidłowo. Obecność produktu reakcji o odpowiedniej barwie i wybarwieniu cytoplazmatycznym w komórkach docelowych w dodatniej kontroli tkankowej wskazuje dodatnią reaktywność tkanki.

Jeśli nie udaje się potwierdzić odpowiedniego wybarwienia w tkance do kontroli dodatniej lub ujemnej bądź taka tkanka wykazuje zmianę klinicznej interpretacji diagnostycznej, należy uznać, że wyniki próbek badanych są nieważne.

Tab. 5. Kryteria oceny barwienia tkanki kontrolnej wyrostka robaczkowego. Przykładowe obrazy można znaleźć w podręczniku interpretacji.

Dopuszczalne	Niedopuszczalne
Obecność silnego ziarnistego barwienia cytoplazmatycznego komórek zwojowych. (Patrz uwaga)	Brak silnego ziarnistego barwienia cytoplazmatycznego komórek zwojowych.
Brak silnego ziarnistego barwienia cytoplazmatycznego w komórkach nabłonka gruczołowego, mięśniach i tkance limfoidalnej (znikome wybarwienie lub wybarwienie rzadkich komórek układu limfatyczno-sięciakowego może być obserwowane w agregatach limfoidalnych).	Nadmierne nieswoiste barwienie tła komórek nabłonka gruczołowego, mięśni i tkanki limfoidalnej, które utrudnia ocenę.

Uwaga: nerwy w warstwach mięśniowych wyrostka robaczkowego wykazują barwienie dodatnie.

Odczynnik do kontroli ujemnej

Barwienie nieswoiste, jeżeli występuje, może mieć wygląd rozproszony i można je ocenić przy użyciu preparatu wybarwionego odczynnikiem Rabbit Monoclonal Negative Control Ig służącym do kontroli ujemnej. W celu interpretacji wyników barwienia należy się posłużyć nienaruszonymi komórkami; komórki nekrotyczne lub zdegenerowane często barwią się nieswoiście. Jeśli barwienie tła jest nadmierne, wyniki oceny próbek testowych należy uznać za nieważne. Przykłady dopuszczalnych poziomów barwienia tła uzyskane przy użyciu tego testu przedstawiono w podręczniku interpretacji.

Tkanka pobrana od pacjenta

Tkanka pobrana od pacjenta musi zostać oceniona zgodnie z algorytmem oceniania wyników testu VENTANA anti-ALK (D5F3), który przedstawia Tab. 6. Więcej informacji zawiera podręcznik interpretacji.

Tab. 6. Algorytm oceniania wyników testu VENTANA anti-ALK (D5F3). Przykładowe obrazy można znaleźć w podręczniku interpretacji.

Interpretacja kliniczna	Opis barwienia
Dodatni wynik testu na obecność ALK	Obecność silnego ziarnistego barwienia cytoplazmatycznego w komórkach nowotworowych (jakiegokolwiek procent dodatnich komórek nowotworowych). Niektóre składniki wykazujące barwienie należy wykluczyć. Należą do nich między innymi: - jasny nakrapiany odczyn cytoplazmatyczny w makrofagach pęcherzykowych, - komórki pochodzenia nerwowego (nerwy i komórki zwojowe), - barwienie nabłonka gruczołowego oraz - rozproszone komórki układu limfatyczno-sięciakowego w naciekach limfocytowych. Pewne barwienie tła może być również obserwowane w prawidłowej błonie śluzowej w obszarach objętych rakiem NSCLC (dotyczy to również mucyny) i martwiczych obszarach nowotworu — barwienie to należy wykluczyć z oceny klinicznej.
Ujemny wynik testu na obecność ALK	Brak silnego ziarnistego barwienia cytoplazmatycznego w komórkach nowotworowych.

SZCZEGÓLNE OGRANICZENIA

- Działanie tego testu nie zostało zwalidowane dla wymazów cytologicznych ani próbek odpawionych.
- Skrawek tkanki pacjenta musi zostać wybarwiony w ciągu 3 miesięcy od wycięcia z bloku tkankowego. Zaobserwowano spadek wydajności barwienia przy użyciu testu VENTANA anti-ALK (D5F3) w skrawkach tkanek przechowywanych w temperaturze pokojowej przez okres dłuższy niż 3 miesiące.

- W przypadku testu VENTANA anti-ALK (D5F3) zaobserwowano pewne artefakty barwienia. Jasne, nakrapiane, ziarniste barwienie cytoplazmatyczne w makrofagach pęcherzykowych może być obecne zarówno na preparatach barwionych przeciwciałem anti-ALK, jak i preparatach barwionych odczynnikami do kontroli ujemnej, co oznacza, że jest to artefakt systemu detekcji, który nie powinien być oceniany jako dodatnie barwienie przeciwciałem anti-ALK. Oprócz tego obserwowano barwienie punktowe w martwiczych obszarach nowotworu; takie barwienie również należy zignorować podczas oceny próbek pacjentów. W przypadku testu VENTANA anti-ALK (D5F3) obserwowano barwienie tkanki nerwowej, w tym nerwów, oraz sporadycznie komórek układu limfatyczno-sięciakowego w naciekach limfocytowych. Więcej informacji na ten temat można znaleźć w podręczniku interpretacji.
- W związku z zastosowaniem zestawu OptiView Amplification Kit można zaobserwować niewielką zmienność ogólnej intensywności wybarwienia na tkankach kontrolnych. Przykłady dopuszczalnego barwienia zawiera podręcznik interpretacji.

CHARAKTERYSTYKA WYNIKÓW

SKUTECZNOŚĆ ANALITYCZNA

Przeprowadzono badania barwienia pod kątem jego czułości, swoistości i precyzji oraz badania porównania metod. Wyniki tych badań zamieszczono poniżej.

Czułość i swoistość

Tab. 7. Czułość/swoistość testu VENTANA anti-ALK (D5F3) wyznaczono, wykonując badania na próbkach prawidłowych tkanek FFPE.

Tkanka	Liczba dodatnich/ wszystkich przypadków	Tkanka	Liczba dodatnich/ wszystkich przypadków
Mózg ^a	0/3	Grasica	0/3
Mózdzek	0/3	Szypik kostny	0/3
Nadnercze	0/3	Płuco	0/3
Jajnik	0/3	Serce	0/3
Trzustka	0/3	Przelyk	0/3
Gruczoł przytarczowy	0/3	Żołądek	0/3
Przysadka mózgowa ^b	0/3	Jelito cienkie ^c	0/3
Jądro	0/3	Okrężnica ^c	0/3
Tarczycza	0/3	Wątroba	0/3
Sutek	0/3	Gruczoł ślinowy	0/3
Śledziona	0/3	Nerka	0/3
Migdałek	0/3	Gruczoł krokowy	0/3
Endometrium	0/3	Szyjka macicy	0/3
Mięsień szkieletowy	0/4	Skóra	0/3
Nerwy (nieliczne)	0/3	Mezotelium	0/3

^a W 2 z 3 przypadków Nieliczne komórki glejowe w mózgu wykazywały barwienie dodatnie o intensywności od słabej do umiarkowanej.

^b W 3 z 3 przypadków przysadka mózgowa wykazywała słabe barwienie.

^c Komórki zwojowe w 4 z 6 tkanek jelita wykazywały dodatnie względem ALK barwienie o różnych intensywnościach.

Tab. 8. Czulość/swoistość testu VENTANA anti-ALK (D5F3) wyznaczono, wykonując badania na próbkach różnych tkanek FFPE.

Nowotwór	Liczba dodatnich/wszystkich przypadków
Glejak (mózgu)	0/1
Oponiak (mózgu)	0/1
Wyściółczak (mózgu)	0/1
Skąpodrzewiak (mózgu)	0/1
Gruzołakorak surowicy (jajnika)	1/1
Gruzołakorak (jajnika)	0/1
Nowotwór neuroendokrynnny (trzustki)	0/1
Gruzołakorak (trzustki)	0/1
Nasieniak (jąder)	0/1
Rak zarodkowy (jąder)	0/1
Rak rdzeniasty (tarczycy)	0/1
Rak brodawkowy (tarczycy)	0/1
Rak przewodowy in situ (sutka)	0/1
Inwazyjny rak przewodowy (sutka)	0/2
Chłoniak z komórek B; BNO (śledziony)	0/3
Rak drobnokomórkowy (płuca)	0/1
Rak płaskonabłonkowy (płuca)	0/1
Gruzołakorak (płuca)	0/1
Rak płaskonabłonkowy (przelyku)	0/1
Gruzołakorak (przelyku)	0/1
Gruzołakorak śluzowy (żołądka)	0/1
Gruzołakorak (przewodu pokarmowego)	0/1
Guz podścieliska przewodu pokarmowego (GIST) (okrężnicy)	0/1
Gruzołakorak (odbytnicy)	0/1
Guz podścieliska przewodu pokarmowego (GIST) (odbytnicy)	0/1
Rak wątrobowokomórkowy (wątroby)	0/1
Wątrobiak płodowy (wątroby)	1/1
Rak jasnokomórkowy (nerki)	0/1
Gruzołakorak (gruczołu krokowego)	0/2
Mięśniak gładkokomórkowy (macicy)	0/1
Gruzołakorak (macicy)	0/1
Rak jasnokomórkowy (macicy)	0/1
Rak płaskonabłonkowy (macicy)	0/2
Mięśniakomięsak prążkowanokomórkowy zarodkowy	0/1

Nowotwór	Liczba dodatnich/wszystkich przypadków
Czerniak (odbytu)	0/1
Rak podstawnokomórkowy (skóry)	0/1
Rak płaskonabłonkowy (skóry)	0/1
Nerwiakowłóknik (łędźwiowy)	0/1
Nerwiak zarodkowy (przestrzeni zaotrzewnowej)	1/1
Międzybłoniak	0/1
Chłoniak Hodgkina (węzła chłonnego)	0/1
Chłoniak anaplastyczny z dużych komórek (węzła chłonnego)	0/1
Rak nabłonka dróg moczowych (pęcherza moczowego)	0/1
Mięśniakomięsak gładkokomórkowy	0/2
Kostniakomięsak	0/1
Mięśniakomięsak prążkowanokomórkowy wrzecionowatokomórkowy	0/1

Zgodność między platformami (badanie z analizą pomostową)

Test VENTANA anti-ALK (D5F3) został początkowo udostępniony z przeznaczeniem dla aparatów BenchMark XT i GX. W celu wykazania równoważnej skuteczności tego testu w aparatach BenchMark ULTRA i BenchMark XT przeprowadzono badanie z analizą pomostową. To badanie oceniało status kliniczny ekspresji białka ALK (na podstawie algorytmu oceniania ALK, który przedstawia Tab. 6) w 184 odrębnych próbkach raka NSCLC barwionych przy użyciu testu VENTANA anti-ALK (D5F3) na obu platformach. Wynikowe wybarwione preparaty zostały zaślepione i poddane randomizacji, a następnie były oceniane przez trzech patomorfologów. Wyniki oceny zgodności między platformami w tym badaniu przedstawiają Tab. 9 i Tab. 10.

Tab. 9. Wyniki oceny zgodności między aparatami BenchMark XT i BenchMark ULTRA.

Zgodność wyników testu VENTANA anti-ALK (D5F3) między aparatami BenchMark ULTRA i BenchMark XT			
BenchMark ULTRA	BenchMark XT		Łącznie
	Dodatni	Ujemny	
Dodatni	85	1	86
Ujemny	1	97	98
Łącznie	86	98	184

Tab. 10. Zgodność statusu ekspresji białka ALK między aparatami BenchMark XT i BenchMark ULTRA.

Współczynniki zgodności między platformami	Procentowa zgodność wyników dodatnich (95-procentowy CI)	Procentowa zgodność wyników ujemnych (95-procentowy CI)	Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem (95-procentowy CI)
Zgodność między aparatami BenchMark XT i BenchMark ULTRA	98.8% (93.7–99.8%)	99.0% (94.4–99.8%)	98.9% (96.1–99.7%)

Grubość tkanki

Grubość tkanki oceniano przy użyciu 4 odrębnych przypadków ludzkiego raka NSCLC (3 ALK-dodatnie i 1 ALK-ujemny) oraz 4 odrębnych przypadków ludzkiego wyrostka robaczkowego. Tkanki pocięto na skrawki o grubościach 3, 4, 5, 6 i 7 mikronów i zbadano każdą z tych grubości w dwóch powtórzeniach. Tkanki o wszystkich grubościach barwione przy użyciu testu VENTANA anti-ALK (D5F3) wykazywały odpowiednie swoiste barwienie białka ALK oraz barwienie tła na odpowiednim poziomie. Nie odnotowano zmian w klinicznym statusie ekspresji białka ALK w badanym zakresie grubości skrawków. W celu wykonania testu próbki powinny być cięte na skrawki o grubości 4–6 mikronów.

Badania powtarzalności i precyzji pośredniej

Powtarzalność i precyzję pośrednią wyników otrzymywanych przy użyciu testu VENTANA anti-ALK (D5F3) oceniono w aparatach BenchMark ULTRA, XT i GX w połączeniu z zestawami OptiView DAB IHC Detection i OptiView Amplification.

Dziesięć odrębnych próbek raka NSCLC (5 ALK-dodatnich i 5 ALK-ujemnych) oceniono w aparatach BenchMark XT i BenchMark ULTRA. W celu określenia precyzji w ramach dnia 5 powtórzeń preparatu z każdej z próbek raka NSCLC wybarwiono w jednym aparacie BenchMark XT lub jednym aparacie BenchMark ULTRA. W celu określenia precyzji w ramach aparatu 3 powtórzenia preparatu z każdej z próbek raka NSCLC barwiono z użyciem testu VENTANA anti-ALK (D5F3) w trzech aparatach BenchMark XT, a 2 powtórzenia preparatu z każdej z próbek raka NSCLC barwiono w trzech aparatach BenchMark ULTRA. W celu określenia precyzji między dniami 2 powtórzenia preparatu z każdej z próbek raka NSCLC barwiono z użyciem testu VENTANA anti-ALK (D5F3) w jednym aparacie BenchMark XT lub aparacie BenchMark ULTRA w 5 nienastępujących bezpośrednio po sobie dniach. Wszystkie preparaty zostały zaślepienie i poddane randomizacji w ramach kohorty próbek dla każdego aparatu. Każda kohorta była oceniana osobno przez patomorfologa przy użyciu algorytmu oceniania wyników testu VENTANA anti-ALK (D5F3) (przedstawia go Tab. 6). Każda powtórzona próbka raka NSCLC zwracała równoważne wyniki barwienia IHC na obecność ALK. Podsumowanie wyników oceny powtarzalności i precyzji pośredniej dla aparatów BenchMark XT i BenchMark ULTRA zawierają (odpowiednio) Tab. 11 i Tab. 12.

Badanie porównujące platformy przeprowadzono, porównując działanie testu VENTANA anti-ALK (D5F3) w aparatach BenchMark XT i aparatach BenchMark GX. W tym badaniu oceniono dwa bloczki wielotkankowe, z których każdy zawierał 8 próbek raka NSCLC (3 ALK-dodatnie, 1 ALK-ujemna na bloczek). Na potrzeby tego porównania 5 powtórzeń preparatu wybarwiono w trzech aparatach BenchMark XT i trzech aparatach BenchMark GX. Akceptowalność barwienia tych preparatów oceniano na podstawie algorytmu oceniania IHC dla testu VENTANA anti-ALK (D5F3), który przedstawia Tab. 6. Każda powtórzona próbka raka NSCLC zwracała równoważne wyniki barwienia białka ALK metodą IHC na obu platformach. Podsumowanie wyników zawiera Tab. 13.

Dodatkowo oceniono powtarzalność barwienia z użyciem testu VENTANA anti-ALK (D5F3) w przypadku ludzkiego wyrostka robaczkowego (kontrola systemowa). Do tego badania użyto ośmiu odrębnych tkanek ludzkiego wyrostka robaczkowego. W celu określenia precyzji w ramach dnia 13 powtórzeń preparatu z dwóch bloczków wielotkankowych zawierających 4 próbki wyrostka robaczkowego barwiono w jednym aparacie BenchMark XT. W celu określenia precyzji między aparatami 5 powtórzeń preparatu z dwóch bloczków wielotkankowych, z których każdy zawierał 4 próbki wyrostka robaczkowego, barwiono z użyciem testu VENTANA anti-ALK (D5F3) w trzech aparatach BenchMark XT. W celu określenia precyzji między dniami 5 powtórzeń preparatu z każdego z dwóch bloczków wielotkankowych zawierających 4 próbki wyrostka robaczkowego barwiono z użyciem testu VENTANA anti-ALK (D5F3) w jednym aparacie BenchMark XT w 5 nienastępujących bezpośrednio po sobie dniach. Wszystkie preparaty były oceniane przez patomorfologa za pomocą wytycznych dotyczących oceny barwienia tkanki kontrolnej wyrostka robaczkowego przy użyciu testu VENTANA anti-ALK (D5F3) (wytyczne te zawarto w Tab. 5). Każda powtórzona próbka wyrostka robaczkowego zwracała równoważne wyniki barwienia białka ALK metodą IHC. Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem w badaniu powtarzalności w ramach dnia i między aparatami (w 3 aparatach) wynosiła 100%, a powtarzalność między dniami (w 5 nienastępujących bezpośrednio po sobie dniach) wynosiła 98%.

Tab. 11. Powtarzalność i precyzja pośrednia testu VENTANA anti-ALK (D5F3) dla odrębnych próbek raka NSCLC barwionych w aparacie BenchMark XT.

Powtarzalność/precyzja dla tkanek raka NSCLC	N = łączna liczba preparatów ocenionych w kohorcie	Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem w odniesieniu do statusu ekspresji białka ALK (95-procentowy CI)
Powtarzalność w ramach dnia	50	100% (97.5–100%)
Precyzja w ramach platformy (dla 3 aparatów BenchMark XT)	60	100% (97.9–100%)
Precyzja pomiędzy dniami (5 nienastępujących bezpośrednio po sobie dni)	100	100% (98.7–100%)

Tab. 12. Powtarzalność i precyzja pośrednia testu VENTANA anti-ALK (D5F3) dla odrębnych próbek raka NSCLC w aparacie BenchMark ULTRA.

Powtarzalność/precyzja dla tkanek raka NSCLC	N = łączna liczba preparatów ocenionych w kohorcie	Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem w odniesieniu do statusu ekspresji białka ALK (95-procentowy CI)
Powtarzalność w ramach dnia	50	100% (92.9–100.0%)
Precyzja w ramach platformy (dla 3 aparatów BenchMark ULTRA)	60	100% (94.0–100.0%)
Precyzja pomiędzy dniami (5 nienastępujących bezpośrednio po sobie dni)	100	100% (96.3–100.0%)

Tab. 13. Precyzja między platformami w przypadku testu VENTANA anti-ALK (D5F3) na próbkach raka NSCLC w wielotkankowym bloczku z użyciem aparatów BenchMark XT i BenchMark GX.

Precyzja dla tkanek raka NSCLC	N = łączna liczba preparatów ocenionych w kohorcie	Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem w odniesieniu do statusu ekspresji białka ALK
Precyzja między platformami z użyciem aparatów BenchMark XT i BenchMark GX (dla 3 aparatów)	30	100%

Odtwarzalność między partiami

Odtwarzalność wyników testu VENTANA anti-ALK (D5F3) między partiami oceniono, badając trzy partie testu VENTANA anti-ALK (D5F3) na 38 odrębnych przypadkach raka NSCLC (21 próbek ALK-dodatnich (z 18 odrębnych przypadków) i 20 próbek raka NSCLC ALK-ujemnych) w aparacie BenchMark XT przy użyciu zestawów OptiView DAB IHC Detection i OptiView Amplification. Wszystkie przypadki barwiono w dwóch powtórzeniach przy użyciu każdej z trzech partii przeciwciała pierwszorzędowego. Preparaty zostały zaślepienie, poddane randomizacji, a następnie ocenione pod kątem statusu klinicznego przy użyciu algorytmu oceniania wyników testu VENTANA anti-ALK (D5F3) (patrz Tab. 6).

Zgodność wyników barwienia 41 próbek tkanki raka NSCLC pod kątem statusu białka ALK dla wszystkich trzech partii przeciwciała była wyższa niż 90%. Wyniki zostały podane jako procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem, średnia zgodność wyników dodatnich oraz średnia zgodność wyników ujemnych. Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem między partiami wyniosła 99.2%; oznacza to, że test VENTANA anti-ALK (D5F3) jest odtwarzalny pod względem wyników barwienia między różnymi partiami przeciwciała. Wyniki przedstawia Tab. 14.

Odtwarzalność wyników testu VENTANA anti-ALK (D5F3) między partiami w aparacie BenchMark ULTRA oceniono, badając trzy partie testu VENTANA anti-ALK (D5F3) na 30 odrębnych przypadkach raka NSCLC (15 próbek ALK-dodatnich i 15 próbek raka NSCLC ALK-ujemnych) przy użyciu zestawów OptiView DAB IHC Detection i OptiView Amplification. Wszystkie przypadki barwiono w dwóch powtórzeniach przy użyciu każdej z trzech partii przeciwciała pierwszorzędowego. Preparaty zostały zaślepione, poddane randomizacji, a następnie ocenione pod kątem statusu klinicznego przy użyciu algorytmu oceniania wyników testu VENTANA anti-ALK (D5F3) (patrz Tab. 6). Oceny dokonywał patomorfolog. Zgodność wyników barwienia 30 próbek tkanki raka NSCLC pod kątem statusu białka ALK dla wszystkich trzech partii przeciwciała była wyższa niż 90%. Wyniki zostały podane jako procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem, średnia zgodność wyników dodatnich oraz średnia zgodność wyników ujemnych. Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem między partiami wyniosła 99.1%; oznacza to, że test VENTANA anti-ALK (D5F3) jest odtwarzalny pod względem wyników barwienia między różnymi partiami przeciwciała. Wyniki przedstawia Tab. 15.

Odtwarzalność wyników testu VENTANA anti-ALK (D5F3) między partiami oceniono także z użyciem 12 odrębnych próbek tkanki ludzkiego wyrostka robaczkowego. Odtwarzalność została wyznaczona poprzez zbadanie trzech partii przeciwciała w połączeniu z trzema partiami zestawów OptiView DAB IHC Detection i OptiView Amplification w trzech aparatach BenchMark XT. Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem dla składników wykazujących odpowiednie barwienie dodatnie i składników wykazujących odpowiednie barwienie ujemne w przypadku wyrostka robaczkowego po barwieniu z użyciem testu VENTANA anti-ALK (D5F3) wyniosła 100%.

Tab. 14. Współczynniki zgodności dla odtwarzalności między partiami na 41 próbkach tkanek raka NSCLC w aparacie BenchMark XT. Przebadano dwadzieścia jeden próbek ALK-dodatnich (z 18 odrębnych przypadków) i 20 próbek ALK-ujemnych.

Współczynniki zgodności dla odtwarzalności między partiami	Średnia zgodność wyników dodatnich (95-procentowy CI)	Średnia zgodność wyników ujemnych (95-procentowy CI)	Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem (95-procentowy CI)
Średnia ze wszystkich trzech porównań między partiami	99.2% (97.4–100%)	99.1% (96.8–100.0%)	99.2% (97.5–100%)

Tab. 15. Współczynniki zgodności dla odtwarzalności między partiami na 30 próbkach tkanek raka NSCLC w aparacie BenchMark ULTRA. Przebadano piętnaście próbek ALK-dodatnich i 15 próbek ALK-ujemnych.

Współczynniki zgodności dla odtwarzalności między partiami	Procentowa zgodność wyników dodatnich (95-procentowy CI)	Procentowa zgodność wyników ujemnych (95-procentowy CI)	Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem (95-procentowy CI)
Średnia ze wszystkich trzech porównań między partiami	98.9% (96.8–99.6%)	99.3% (97.3–99.8%)	99.1% (97.9–99.6%)

Badania precyzji między badaczami

Wykonano kilka badań precyzji między badaczami: dwa badania w aparacie BenchMark XT i jedno w aparacie BenchMark ULTRA.

W badaniu precyzji między badaczami w aparacie BenchMark XT trzech patomorfologów oceniali łącznie 185 odrębnych przypadków. Te 185 przypadków korelowało ze 100 bločkami ALK-dodatnimi i 100 bločkami ALK-ujemnymi, które zostały wybarwione z użyciem testu VENTANA anti-ALK (D5F3). Preparaty zostały zaślepione, poddane randomizacji, a następnie ocenione pod kątem wybarwienia immunohistochemicznego na obecność ALK za pomocą algorytmu oceniania wyników testu VENTANA anti-ALK (D5F3) (Tab. 6). Wyniki, które przedstawia Tab. 16 poniżej, odzwierciedlają współczynniki precyzji między badaczami dla odrębnych przypadków z kohorty badania.

Tab. 16. Badanie 1 precyzji między badaczami w aparacie BenchMark XT

Precyzja między badaczami	Średnia zgodność wyników dodatnich (95-procentowy CI)	Średnia zgodność wyników ujemnych (95-procentowy CI)	Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem (95-procentowy CI)
Średnia ze wszystkich trzech porównań między badaczami	98.8% (97.3–100%)	99.0% (97.7–100%)	98.9% (97.4–100%)

Badanie 2 precyzji między badaczami w aparacie BenchMark XT wykonano z użyciem kohorty przypadków z randomizowanego badania klinicznego próbek raka NSCLC ALK-dodatnich od pacjentów, którzy zostali włączeni do tego badania na podstawie wyników uzyskanych przy użyciu zestawu Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit. Około 300 przypadków wybarwiono z użyciem testu VENTANA anti-ALK (D5F3) w aparacie BenchMark XT. Przypadki te zostały zaślepione pod względem statusu ALK FISH, poddane randomizacji, a następnie przekazane trzem badaczom, którzy oceniali wyniki barwienia IHC na obecność ALK zgodnie z algorytmem oceniania wyników testu VENTANA anti-ALK (D5F3), który przedstawia Tab. 6. Wyniki, które przedstawia Tab. 17, odzwierciedlają współczynniki precyzji między badaczami dla kohorty tego badania klinicznego.

Celem oceny precyzji między badaczami w aparacie BenchMark ULTRA oceniono kohortę 184 odrębnych przypadków raka NSCLC. Kohorta obejmowała 90 przypadków ALK-dodatnich i 94 przypadki ALK-ujemne, które wybarwiono z użyciem testu VENTANA anti-ALK (D5F3) w aparacie BenchMark ULTRA. Przypadki te zostały zaślepione, poddane randomizacji, a następnie przekazane trzem badaczom, którzy oceniali wyniki barwienia IHC na obecność ALK zgodnie z algorytmem oceniania wyników testu VENTANA anti-ALK (D5F3), który przedstawia Tab. 6. Wyniki, które przedstawia Tab. 17, odzwierciedlają współczynniki precyzji między badaczami uzyskane w tym badaniu.

Tab. 17. Badanie 2 precyzji między badaczami pod kątem statusu ALK w próbkach raka NSCLC z przeznaczonej do porównania metod kohorty nr 1, które zostały wybarwione z użyciem testu VENTANA anti-ALK (D5F3) w aparacie BenchMark XT.

Precyzja między badaczami	Średnia zgodność wyników dodatnich (95-procentowy CI)	Średnia zgodność wyników ujemnych (95-procentowy CI)	Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem (95-procentowy CI)
Średnia ze wszystkich trzech porównań między badaczami	97.6% (95.0–99.5%)	99.5% (98.9–99.9%)	99.1% (98.2–99.8%)
Porównanie między badaczem 1 a badaczem 2	99.1% (97.1–100%)	99.8% (99.4–100%)	99.7% (98.2–99.9%)
Porównanie między badaczem 1 a badaczem 3	96.3% (92.3–99.2%)	99.2% (98.3–99.8%)	98.6% (96.6–99.5%)
Porównanie między badaczem 2 a badaczem 3	97.2% (93.5–100%)	99.4% (98.6–100%)	99.0% (97.1–99.7%)

Tab. 18. Precyzja między badaczami pod kątem statusu ALK w próbkach raka NSCLC wybarwionych z użyciem testu VENTANA anti-ALK (D5F3) w aparacie BenchMark ULTRA.

Precyzja między badaczami	Średnia zgodność wyników dodatnich (95-procentowy CI)	Średnia zgodność wyników ujemnych (95-procentowy CI)	Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem (95-procentowy CI)
Średnia ze wszystkich trzech porównań między badaczami	98.4% (96.5–99.6%)	98.6% (96.9–99.7%)	98.5% (96.7–99.6%)
Porównanie między badaczem 1 a badaczem 2	98.9% (96.8–100%)	98.9% (97.0–100%)	98.9% (96.0–99.7%)
Porównanie między badaczem 1 a badaczem 3	98.8% (96.7–100%)	99.0% (97.2–100%)	98.9% (96.0–99.7%)
Porównanie między badaczem 2 a badaczem 3	97.6% (94.7–99.4%)	97.9% (95.4–99.5%)	97.8% (94.4–99.1%)

Zgodność z wynikami badania ALK FISH

W celu porównania wyników barwienia z użyciem testu VENTANA anti-ALK (D5F3) z wynikami badania ALK FISH pod względem klinicznego statusu ekspresji białka ALK użyto trzech kohort. Kohorty obejmowały różne próbki ludzkiej tkanki raka NSCLC z guzów pierwotnych i przerzutowych, w tym próbki uzyskane za pomocą resekcji, biopsji igłowej i biopsji oskrzeli, a także białki komórek FFPE z materiału FNA. W każdym badaniu na potrzeby oceny wykorzystano z algorytmu oceniania (patrz Tab. 6).

Badanie zgodności 1

W laboratorium zewnętrznym przeprowadzono badanie mające na celu porównanie wyników testu VENTANA anti-ALK (D5F3) z retrospektywnymi danymi uzyskanymi w teście wykonanym za pomocą zestawu Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit. W ośrodku zewnętrznym wybarwiono około 100 przypadków raka NSCLC z użyciem testu VENTANA anti-ALK (D5F3) w aparacie BenchMark XT. W przypadku tej kohorty próbek raka NSCLC test VENTANA anti-ALK (D5F3) wykazał > 98-procentową zgodność wszystkich wyników ogółem z retrospektywnymi danymi uzyskanymi w teście wykonanym za pomocą zestawu Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit. Szczegóły wyników przedstawiają Tab. 19 i Tab. 20. Dla 86 z tych 100 przypadków dostępne były dane dotyczące metody FISH, a ilość tkanki guza była wystarczająca do porównania z wynikiem uzyskanym względem białka ALK przy użyciu metody IHC.

Tab. 19. Porównanie pomiędzy testem VENTANA anti-ALK (D5F3) a zestawem Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.

Porównanie pomiędzy testem VENTANA anti-ALK (D5F3) a zestawem Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit			
Test VENTANA anti-ALK (D5F3)	Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		Łącznie
	Dodatni	Ujemny	
Dodatni	10	0	10
Ujemny	1	75	76
Łącznie	11	75	86

Tab. 20. Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem, wyników dodatnich i wyników ujemnych dla testu VENTANA anti-ALK (D5F3) w porównaniu do zestawu Abbott Vysis Break Apart FISH Probe Kit.

Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem, wyników dodatnich i wyników ujemnych			
Współczynnik	n/N	%	95-procentowy CI ^a
Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem	85/86	98.8	93.7, 99.8
Procentowa zgodność wyników dodatnich	10/11	90.9	62.3, 98.4
Procentowa zgodność wyników ujemnych	75/75	100.0	95.1, 100.0

^a Dwustronny 95-procentowy przedział ufności obliczono przy użyciu metody oceny.

Uwaga: nie sprawdzano, czy próbki z tego badania zostały przygotowane zgodnie z procedurami przygotowania zalecanymi dla tego testu.

Badanie zgodności 2

W drugim laboratorium zewnętrznym przeprowadzono badanie mające na celu porównanie wyników testu VENTANA anti-ALK (D5F3) z danymi z testu wykonanego za pomocą zestawu Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit względem 73 przypadków raka NSCLC (skrawki zostały wycięte w ciągu jednego tygodnia przed barwieniem). W ośrodku zewnętrznym wybarwiono te przypadki z użyciem testu VENTANA anti-ALK (D5F3) w aparacie BenchMark XT. W przypadku tej kohorty próbek raka NSCLC test VENTANA anti-ALK (D5F3) wykazał > 93-procentową zgodność wszystkich wyników ogółem z retrospektywnymi danymi uzyskanymi w teście wykonanym za pomocą zestawu Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit. Szczegóły wyników przedstawiają Tab. 21 i Tab. 22.

Tab. 21. Porównanie pomiędzy testem VENTANA anti-ALK (D5F3) a zestawem Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.

Porównanie pomiędzy testem VENTANA anti-ALK (D5F3) a zestawem Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit			
Test VENTANA anti-ALK (D5F3)	Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		Łącznie
	Dodatni	Ujemny	
Dodatni	2	4	6
Ujemny	0	56	56
Łącznie	2	60	62

Tab. 22. Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem, wyników dodatnich i wyników ujemnych dla testu VENTANA anti-ALK (D5F3) w porównaniu do zestawu Abbott Vysis Break Apart FISH Probe Kit.

Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem, wyników dodatnich i wyników ujemnych			
Współczynnik	n/N	%	95-procentowy CI ^a
Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem	58/62	93.5%	84.6-97.5
Procentowa zgodność wyników dodatnich	2/2	100%	34.2-100.0
Procentowa zgodność wyników ujemnych	56/60	93%	84.1-97.4

^a Dwustronny 95-procentowy przedział ufności obliczono przy użyciu metody oceny.

Dla czterech przypadków niezgodnych (w których metoda FISH dała wynik ujemny, a barwienie IHC na obecność ALK dało wynik dodatni) dodatkowe niebarwione preparaty przebadano z użyciem innego przeciwciała przeciwko ALK (inny klon i system detekcji). W trzech z tych czterech przypadków uzyskano wyniki zgodne z barwieniem z użyciem testu VENTANA anti-ALK (D5F3) pod kątem wykrytego barwienia IHC na obecność ALK.

Było również 10 przypadków, dla których wyniki uzyskane za pomocą metody FISH były nieokreślone lub ta metoda nie była używana. Cztery z tych przypadków dały wynik dodatni w teście VENTANA anti-ALK (D5F3) i z użyciem innego klonu przeciwciała przeciwko ALK, a sześć dało wynik ujemny w teście metodą IHC na obecność ALK. Był jeden przypadek, który dał wynik dodatni w teście metodą FISH, ale ilość próbki była zbyt mała, aby przeprowadzić barwienie metodą IHC.

Badanie zgodności 3

W tym badaniu około 300 przypadków z trwającego, globalnego badania klinicznego z udziałem pacjentów z rakiem NSCLC dodatnim względem białka ALK, którzy zostali włączeni do tego badania na podstawie wyników uzyskanych za pomocą zestawu Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit, wybarwiono z użyciem testu VENTANA anti-ALK (D5F3). Jest to ta sama kohorta, która była wcześniej omawiana w części dotyczącej badań precyzji między badaczami. Niektóre spośród około 300 przypadków sklasyfikowano jako „brak jednoznacznych informacji” uzyskanych na podstawie testu metodą FISH albo jako „nie wykonano testu metodą FISH” — te przypadki były barwione i oceniane tylko w celach informacyjnych.

Badane przypadki zostały zaślepione pod względem statusu z badania metodą FISH, poddane randomizacji i przekazane dwóm badaczom, którzy oceniali wyniki barwienia. Wyniki porównano ze statusem uzyskanym metodą FISH w ramach globalnego badania klinicznego.

Wyniki porównania badania metodą IHC pod kątem obecności ALK z wynikami ALK FISH przedstawia Tab. 23.

Tab. 23. Zgodność wyników testu VENTANA anti-ALK (D5F3) z wynikami uzyskanymi przy użyciu zestawu Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit na podstawie oceny 2 patomorfologów.

Porównanie pomiędzy testem VENTANA anti-ALK (D5F3) a zestawem Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit				
Test VENTANA anti-ALK (D5F3)		Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		Łącznie
Badacz		Dodatni	Ujemny	
Badacz 1	Dodatni	37	13	50
	Ujemny	11	223	234
	Łącznie	48	236	284
Badacz 2	Dodatni	37	12	49
	Ujemny	11	225	236
	Łącznie	48	237	285

Uwaga: nie sprawdzano, czy próbki z tego badania zostały przygotowane zgodnie z procedurami przygotowania zalecanymi dla tego testu.

Przypadki niezgodne, które dały wyniki dodatnie na obecność ALK w teście z wykorzystaniem przeciwciała VENTANA anti-ALK (D5F3) i wyniki ujemne w teście ALK FISH:

- 4 przypadki zostały ocenione przez co najmniej jednego badacza jako dodatnie w badaniu IHC na obecność ALK i ujemne w badaniu metodą FISH. Po ocenie uzgadniającej ustalono, że powinny być zostać ocenione jako ujemne w badaniu metodą IHC. W tych przypadkach wystąpiło ogniskowe barwienie cytoplazmatyczne/błonowe — kwestię jego interpretacji objaśniono w podręczniku interpretacji.
- Było 9 przypadków dodatnich w badaniu metodą IHC na obecność ALK i ujemnych w teście ALK FISH, które uznano za przypadki rzeczywiście niezgodne.

Spośród tych 9 niezgodnych przypadków w 7 dostępne były niebarwione preparaty, które można było wykorzystać na potrzeby dodatkowych testów diagnostycznych na obecność ALK (testy molekularne i testy IHC z użyciem innego klonu i systemu detekcji). Wyniki tych dodatkowych badań w większości niezgodnych przypadków, dla których w badaniu ALK FISH otrzymano wynik ujemny, potwierdzały dodatni wynik pod kątem statusu ALK otrzymany w badaniu IHC. (Uwaga: wiek preparatów przygotowanych z tych przypadków przekraczał zalecane 3 miesiące).

Przypadki niezgodne, które dały wyniki ujemne w teście VENTANA anti-ALK (D5F3) i wyniki dodatnie w teście ALK FISH:

- Było 11 przypadków dodatnich w ocenie metodą FISH, ale ujemnych w ocenie z użyciem testu VENTANA anti-ALK (D5F3). W 10 przypadkach dostępne były niebarwione preparaty, które można było wykorzystać na potrzeby dodatkowych testów diagnostycznych na obecność ALK przy użyciu metod molekularnych i IHC. Wyniki tych dodatkowych testów wskazywały, że większość przypadków ujemnych w teście VENTANA anti-ALK (D5F3) była także ujemna w innym systemie IHC do badania na obecność ALK, ale co najmniej jeden test molekularny zwrócił dla nich wynik dodatni. Uwaga: wiek preparatów przygotowanych z tych przypadków przekraczał zalecane 3 miesiące dla badania metodą IHC na obecność ALK.
- W kohorcie było też 14 przypadków, dla których nie uzyskano jednoznacznych informacji metodą FISH (brak dostępnego wyniku). Spośród nich 3 zostały ocenione jako dodatnie przez obu badaczy po barwieniu z użyciem testu VENTANA anti-ALK (D5F3). Dodatkowo było 19 przypadków, dla których wykonanie testu FISH było niemożliwe na podstawie preparatu wybarwionego H&E (zwykle z powodu niewystarczającej ilości tkanki guza). Obaj badacze ocenili 4 z tych przypadków jako dodatnie na podstawie barwienia IHC na obecność ALK. Wynika z tego, że średnio 21% przypadków, dla których nie uzyskano wyników metodą FISH, wykazało dodatni status ekspresji białka ALK w teście VENTANA anti-ALK (D5F3).

Badanie odtwarzalności międzylaboratoryjnej w aparacie BenchMark XT

Aby wykazać odtwarzalność wyników testu VENTANA anti-ALK (D5F3) w zakresie ustalania statusu klinicznego ekspresji białka ALK w aparacie BenchMark XT,

przeprowadzono badanie międzylaboratoryjnej odtwarzalności wyników tego testu. W badaniu wykorzystano próbki tkanki raka NSCLC (6 ALK-dodatnich i 6 ALK-ujemnych), które analizowano z użyciem odczynników z 1 partii, w 3 aparatach, w 5 nienastępujących bezpośrednio po sobie dniach, w trzech laboratoriach zewnętrznych. Wszystkie próbki zostały poddane randomizacji, a następnie ocenione przez łącznie 6 badaczy (2 badaczy/ośrodek) niezwiązanych ze statusem klinicznym ekspresji białka ALK dla tej kohorty. Kohorta obejmowała 180 preparatów wykonanych z 12 przypadków raka NSCLC dodatnich i ujemnych względem ekspresji ALK w testach metodą IHC i metodą FISH. Przypadki te były barwione w powtórzeniach w okresie 21 dni w 3 laboratoriach. Wyniki przedstawia Tab. 24. Współczynnik akceptowalności dla morfologii i tła w tych badaniach wynosił 100%. Badanie odtwarzalności międzylaboratoryjnej (inter-laboratory reproducibility, ILR) wyników testu VENTANA anti-ALK (D5F3) w aparacie BenchMark XT dostarczyło wartości średniej zgodności wyników dodatnich (APA) i średniej zgodności wyników ujemnych (ANA) dla porównań między ośrodkami, badaczami i cyklami (w ramach dnia); porównania wykonywano parami, wykorzystując obserwacje odpowiednie do oceny.

Tab. 24. ILR: współczynniki zgodności wyników testu VENTANA anti-ALK (D5F3) w aparacie BenchMark XT (n = 180 ocenionych preparatów).

Współczynniki zgodności dla odtwarzalności międzylaboratoryjnej (status kliniczny ekspresji białka ALK)	Średnia zgodność wyników dodatnich (95-procentowy CI)	Średnia zgodność wyników ujemnych (95-procentowy CI)	Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem (95-procentowy CI)
Między ośrodkami (3 ośrodki)	93.8% (76.2–100%)	94.9% (79.2–100%)	94.4% (83.3–100%)
Między dniami (5 nienastępujących bezpośrednio po sobie dni)	99.1% (96.4–100%)	99.2% (96.9–100%)	99.2% (97.5–100%)
Między badaczami (2 badaczy/ośrodek)	98.8% (95.2–100%)	99.0% (95.8–100%)	98.9% (96.7–100%)

Badanie odtwarzalności międzylaboratoryjnej w aparacie BenchMark ULTRA

Aby wykazać odtwarzalność wyników testu VENTANA anti-ALK (D5F3) w zakresie ustalania statusu klinicznego ekspresji białka ALK w aparacie BenchMark ULTRA, przeprowadzono dodatkowe badanie międzylaboratoryjnej odtwarzalności wyników tego testu. W badaniu wykorzystano próbki tkanki raka NSCLC (7 ALK-dodatnich i 7 ALK-ujemnych), które analizowano z użyciem odczynników z 1 partii, w 3 aparatach BenchMark ULTRA, w 5 nienastępujących bezpośrednio po sobie dniach, w trzech laboratoriach zewnętrznych. Wszystkie próbki zostały poddane randomizacji, a następnie ocenione przez łącznie 6 badaczy (2 badaczy/ośrodek) niezwiązanych ze statusem klinicznym ekspresji białka ALK dla tej kohorty. Kohorta obejmowała 210 preparatów wykonanych z 14 przypadków raka NSCLC dodatnich i ujemnych względem ekspresji ALK w testach metodą IHC i metodą FISH. Przypadki te były barwione w powtórzeniach w okresie 21 dni w 3 laboratoriach. Wyniki przedstawia Tab. 25. Ogólna ostateczna akceptowalność barwienia dla wszystkich zebranych danych wynosiła 99%. Współczynnik akceptowalności dla morfologii i tła w tych badaniach wynosił 100%. Wyniki przedstawia Tab. 26.

Na podstawie badania ILR dotyczącego testu VENTANA anti-ALK (D5F3) w aparacie BenchMark ULTRA otrzymano wartości procentowej zgodności wyników dodatnich (PPA) i procentowej zgodności wyników ujemnych (NPA) ze wszystkich uzyskanych podczas tego badania i odpowiednich do oceny obserwacji poprzez połączenie wyników ze wszystkich ośrodków i dni oraz od wszystkich badaczy. Jako standardu referencyjnego użyto oceny konsensusowej.

Tab. 25. ILR: współczynniki zgodności wyników testu VENTANA anti-ALK (D5F3) w aparacie BenchMark ULTRA (n = 210 ocenionych preparatów).

Współczynniki zgodności dla odtwarzalności międzylaboratoryjnej (status kliniczny ekspresji białka ALK)	Procentowa zgodność wyników dodatnich (95-procentowy CI)	Procentowa zgodność wyników ujemnych (95-procentowy CI)	Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem (95-procentowy CI)
Ze wszystkich obserwacji odpowiednich do oceny	92.8% (88.4, 95.6%)	100.0% (98.2, 100.0%)	96.4% (94.1, 97.8%)

Tab. 26. Odtwarzalność międzylaboratoryjna: współczynniki zgodności wyników testu VENTANA anti-ALK (D5F3) między badaczami w aparacie BenchMark ULTRA (n = 210 ocenionych preparatów).

Współczynniki zgodności dla odtwarzalności międzylaboratoryjnej (status kliniczny ekspresji białka ALK) między badaczami	Średnia zgodność wyników dodatnich (95-procentowy CI)	Średnia zgodność wyników ujemnych (95-procentowy CI)	Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem (95-procentowy CI)
Porównanie między badaczem A1 a badaczem A2	97.0% (87.5–100%)	97.3% (89.5–100%)	97.1% (90.2–99.2%)
Porównanie między badaczem B1 a badaczem B2	93.5% (71.4–100%)	94.7% (81.0–100%)	94.2% (86.0–97.7%)
Porównanie między badaczem C1 a badaczem C2	92.3% (66.7–100%)	93.2% (74.7–100%)	92.8% (84.1–96.9%)
Ogółem	94.3% (75.6–100%)	95.1% (81.6–100%)	94.7% (84.1–100%)

Badanie odtwarzalności międzylaboratoryjnej i między badaczami w przypadku aparatu BenchMark ULTRA PLUS, przeprowadzone przy użyciu zestawów OptiView DAB IHC Detection i OptiView Amplification.

Aby wykazać odtwarzalność wyników testu VENTANA anti-ALK (D5F3) Assay w zakresie ustalania statusu klinicznego ekspresji białka ALK w aparacie BenchMark ULTRA PLUS, przeprowadzono badanie międzylaboratoryjnej odtwarzalności wyników tego testu wykonywanego w aparacie BenchMark ULTRA PLUS. W badaniu wykorzystano próbki tkanki raka NSCLC (14 ALK-dodatnich i 14 ALK-ujemnych), które analizowano z użyciem odczynników z jednej partii w aparacie w każdym z trzech laboratoriów zewnętrznych, w 5 nienastępujących bezpośrednio po sobie dniach. Próbki zostały poddane randomizacji i ocenione przez łącznie 6 badaczy (2 badaczy/ośrodek). Wszystkie obserwacje dostępne dla każdego przypadku porównano względem statusu modalnego danego przypadku. Akceptowalność wybarwienia wszystkich 420 preparatów (140 preparatów na ośrodek) przy użyciu odczynnika do kontroli ujemnej oraz przeciwciała do barwienia ALK miała wartość 100%. Wyniki zawierają Tab. 27, Tab. 28 i Tab. 29.

Na podstawie analizy ILR dotyczącej testu VENTANA anti-ALK (D5F3) w aparacie BenchMark ULTRA PLUS otrzymano wartości procentowej zgodności wyników dodatnich (PPA) i procentowej zgodności wyników ujemnych (NPA) ze wszystkich uzyskanych podczas tego badania i odpowiednich do oceny obserwacji poprzez połączenie wyników ze wszystkich ośrodków i dni oraz od wszystkich badaczy. Jako standardu referencyjnego użyto statusu modalnego ekspresji ALK na poziomie przypadku.

Tab. 27. Odtwarzalność międzylaboratoryjna: współczynniki zgodności wyników testu VENTANA anti-ALK (D5F3) Assay w aparacie BenchMark ULTRA PLUS (n = 420 ocenionych preparatów).

Odtwarzalność międzylaboratoryjna statusu klinicznego ekspresji białka ALK	Procentowa zgodność wyników dodatnich (95-procentowy CI)	Procentowa zgodność wyników ujemnych (95-procentowy CI)	Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem (95-procentowy CI)
Ze wszystkich obserwacji odpowiednich do oceny	98.6% (97.3–99.7)	99.5% (98.7–100%)	99.0% (98.3–99.7%)

Oprócz analizy z wykorzystaniem statusu modalnego na poziomie każdego przypadku uzyskane wyniki porównywano również parami. Wartości średniej zgodności wyników dodatnich (APA) i średniej zgodności wyników ujemnych (ANA) przedstawiono poniżej.

Tab. 28. Odtwarzalność międzylaboratoryjna: współczynniki zgodności wyników testu VENTANA anti-ALK (D5F3) Assay w aparacie BenchMark ULTRA PLUS (n = 420 ocenionych preparatów).

Współczynniki zgodności dla odtwarzalności międzylaboratoryjnej (status kliniczny ekspresji białka ALK)	Średnia zgodność wyników dodatnich (95-procentowy CI)	Średnia zgodność wyników ujemnych (95-procentowy CI)	Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem (95-procentowy CI)
Między ośrodkami (3 ośrodki)	98.1% (96.6–99.4%)	98.1% (96.8–99.4%)	98.1% (96.7–99.4%)
Między dniami (5 nienastępujących bezpośrednio po sobie dni)	98.3% (96.9–99.4%)	98.3% (97.2–99.5%)	98.3% (97.1–99.5%)

Tab. 29. Odtwarzalność międzylaboratoryjna: współczynniki zgodności wyników testu VENTANA anti-ALK (D5F3) Assay między badaczami w aparacie BenchMark ULTRA PLUS (n = 420 ocenionych preparatów).

Odtwarzalność międzylaboratoryjna między badaczami podczas określania statusu klinicznego ekspresji białka ALK	Średnia zgodność wyników dodatnich (95-procentowy CI)	Średnia zgodność wyników ujemnych (95-procentowy CI)	Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem (95-procentowy CI)
Porównanie między badaczem A1 a badaczem A2	99.3% (97.7–100%)	99.3% (98.0–100%)	99.3% (97.9–100%)
Porównanie między badaczem B1 a badaczem B2	94.8% (90.5–98.6%)	95.2% (91.4–98.6%)	95.0% (91.1–98.6%)
Porównanie między badaczem C1 a badaczem C2	100.0% (97.3–100%)	100.0% (97.3–100%)	100.0% (97.3–100%)
Ogółem	98.1% (96.6–99.4%)	98.1% (96.7–99.4%)	98.1% (96.7–99.4%)

Zgodność między aparatami BenchMark ULTRA PLUS i BenchMark ULTRA

W badaniu zgodności między aparatami BenchMark ULTRA PLUS i BenchMark ULTRA wzięły udział trzy laboratoria z różnych instytucji na terenie Stanów Zjednoczonych. Do użytku w tym badaniu wybrano sto czterdzieści cztery przypadki reprezentujące zakres barwienia próbek z populacji zgodnej z zamiarem zastosowania testu VENTANA anti-ALK (D5F3). Wszystkie 144 przypadki zostały wybarwione w firmie Ventana przy użyciu zestawu detekcyjnego OptiView DAB IHC Detection Kit stosowanego razem z zestawem OptiView Amplification Kit w aparacie BenchMark ULTRA. Preparaty ciętych skrawków z tych samych przypadków zostały poddane randomizacji i równo rozdzielone (48 przypadków na ośrodek) między ośrodkami biorącymi udział w badaniu w celu wybarwienia ich w aparacie BenchMark ULTRA PLUS przy użyciu zalecanego protokołu barwienia i zestawów OptiView DAB IHC Detection i OptiView Amplification pochodzących z tej samej partii. W każdym z ośrodków po dwóch patomorfologów, którzy nie znali statusów przypadków, oceniali preparaty wybarwione w aparacie BenchMark ULTRA PLUS i przypisało każdemu z nich status kliniczny. Po 2-tygodniowej przerwie wybarwione wcześniej przy użyciu aparatu BenchMark ULTRA w firmie Ventana preparaty z przypadków zostały dostarczone do odpowiednich ośrodków w celu ich oceny klinicznej. Dodatkowo jeden patomorfolog wewnętrzny przejrzał wszystkie badane preparaty, a jego ocena została dołączona do ocen pozostałych patomorfologów z poszczególnych ośrodków jako ocena „trzeciego patomorfologa”. Wyniki przeanalizowano w firmie Ventana pod kątem ALK-dodatnich i ALK-ujemnych statusów klinicznych. Wartości OPA, PPA i NPA wyniosły odpowiednio 95.4% (412/432), 93.5% (202/216) i 97.2% (210/216). Dwustronne 95-procentowe przedziały ufności (CI) obliczono przy użyciu metody percyntylowej bootstrap. Wskaźniki akceptowalności morfologii oraz tła wynosiły 100% dla wszystkich przypadków i obu aparatów. Wyniki przedstawia Tab. 30.

Tab. 30. Zgodność między aparatami BenchMark ULTRA PLUS i BenchMark ULTRA pod kątem statusów ALK uzyskanych w ramach barwienia przypadków NSCLC przy użyciu testu VENTANA anti-ALK (D5F3) Assay. Uzyskane dane rozpatrywano łącznie.

Status ALK w aparacie BenchMark ULTRA PLUS	Status BenchMark ULTRA ALK		Łącznie
	Dodatni	Ujemny	
Dodatni	202	6	208
Ujemny	14	210	224
Łącznie	216	216	432
	n/N	% (95-procentowy CI ^[a])	
Procentowa zgodność wyników dodatnich	202/216	93.5 (89.5, 97.2)	
Procentowa zgodność wyników ujemnych	210/216	97.2 (94.5, 99.5)	
Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem	412/432	95.4 (92.8, 97.5)	

[a] Dwustronne 95-procentowe przedziały ufności (CI) obliczono przy użyciu metody percyntylowej bootstrap, korzystając z 2000 powtórzeń wybranych ze stratyfikacją według przedziału kwalifikującego [ALK-dodatni, ALK-ujemny, ALK-dodatni, trudny do oznaczenia; ALK-ujemny, trudny do oznaczenia].

SKUTECZNOŚĆ KLINICZNA

Badanie porównania metod w aparacie BenchMark XT

Kohorty na potrzeby badania porównania metod zostały wygenerowane z dwóch niezależnych, randomizowanych badań klinicznych kryzotybnu (oznaczonych jako badanie kliniczne nr 1 i badanie kliniczne nr 2), do których zostali włączeni pacjenci z ALK-dodatnim rakiem NSCLC. Status ALK dla tych pacjentów został określony za pomocą testu Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit, będącego testem stosowanym w badaniu klinicznym, wykonywanego w wielu laboratoriach centralnych. Ważne wyniki testu Vysis ALK FISH uzyskano łącznie dla 1644 preparatów tkankowych raka NSCLC (odpowiednio 1018 i 626 próbek w badaniu klinicznym nr 1 i w badaniu klinicznym nr 2).

W badaniu porównania metod dotyczącym testu VENTANA anti-ALK (D5F3) próbki od pacjentów poddawane badaniom przesiewowym w ramach badania klinicznego nr 1 i nr 2 zostały wysłane do laboratorium centralnego w celu wybarwienia ich przy użyciu testu VENTANA anti-ALK (D5F3) i oceny metodą IHC pod względem statusu ekspresji białka

ALK w oparciu o kryteria algorytmu oceny testu VENTANA anti-ALK (D5F3) (Tab. 6). Spośród próbek, dla których uzyskano ważne wyniki testu Vysis ALK FISH podczas badań przesiewowych w ramach badania klinicznego, 933 próbki z badania klinicznego nr 1 (Tab. 31) i 598 próbek z badania klinicznego nr 2 (Tab. 33) zwróciło również ważne wyniki z użyciem testu VENTANA anti-ALK (D5F3).

Liczby próbek zwracających wyniki ALK-dodatnie i ALK-ujemne w przypadku każdego testu przedstawiono w Tabelach 31 i 33 — odpowiednio dla kohort z badania klinicznego nr 1 i badania klinicznego nr 2. Współczynniki zgodności między tymi dwoma testami pokazano w Tabelach 32 i 34 odpowiednio dla kohort z badania klinicznego nr 1 i badania klinicznego nr 2. Odnotowana procentowa zgodność wyników dodatnich i wyników ujemnych wynosiła odpowiednio 86.0% i 96.3% dla badania klinicznego nr 1 (Tab. 32) oraz odpowiednio 92.7% i 94.8% dla badania klinicznego nr 2 (Tab. 34).

Tab. 31. Porównanie statusu ekspresji białka ALK w próbkach raka NSCLC (kohorta z badania klinicznego nr 1) uzyskanego za pomocą testu VENTANA anti-ALK (D5F3) i za pomocą zestawu Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.

Status ekspresji białka ALK		Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		
		Dodatni	Ujemny	Łącznie
Test VENTANA anti-ALK (D5F3)	Dodatni	154	28	182
	Ujemny	25	726	751
	Łącznie	179	754	933

Tab. 32. Współczynniki zgodności między wynikami testu VENTANA anti-ALK (D5F3) a wynikami testu Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit w badaniu klinicznym nr 1.

Współczynniki zgodności między wynikami testów ALK	Procentowa zgodność wyników dodatnich (95-procentowy CI)	Procentowa zgodność wyników ujemnych (95-procentowy CI)	Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem (95-procentowy CI)
Przeciwiało VENTANA anti-ALK (D5F3) i 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%)

Tab. 33. Porównanie statusu ekspresji białka ALK w próbkach raka NSCLC (kohorta z badania klinicznego nr 2) uzyskanego za pomocą testu VENTANA anti-ALK (D5F3) i za pomocą zestawu Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.

Status ekspresji białka ALK		Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		
		Dodatni	Ujemny	Łącznie
Przeciwiało VENTANA anti-ALK (D5F3)	Dodatni	179	21	200
	Ujemny	14	384	398
	Łącznie	193	405	598

Tab. 34. Współczynniki zgodności między wynikami testu VENTANA anti-ALK (D5F3) a wynikami testu Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit w badaniu klinicznym nr 2.

Współczynniki zgodności między wynikami testów ALK	Procentowa zgodność wyników dodatnich (95-procentowy CI)	Procentowa zgodność wyników ujemnych (95-procentowy CI)	Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem (95-procentowy CI)
Test VENTANA anti-ALK (D5F3) i 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%)

Uwaga: nie sprawdzono, czy preparaty tkankowe użyte w badaniu klinicznym nr 1 i badaniu klinicznym nr 2 zostały przygotowane zgodnie z procedurami przygotowania próbek zalecanymi dla testu VENTANA anti-ALK (D5F3).

Badanie rezultatu klinicznego — kryzotynib

Analiza skuteczności klinicznej testu VENTANA anti-ALK (D5F3) jako wyrobu diagnostycznego służącego do wyboru pacjentów, którzy mogliby odnieść korzyści z leczenia kryzotynibem, czyli preparatem skierowanym przeciwko białku ALK, była oparta na badaniu klinicznym nr 1. Pacjentów przebadano przy użyciu testu VENTANA anti-ALK (D5F3) w ramach badania porównania metod oraz badania dodatkowego. Badanie kliniczne nr 1 było wielośrodkowym, randomizowanym, prowadzonym metodą otwartej próby i w wielu krajach badaniem fazy III, które miało na celu ocenę skuteczności i bezpieczeństwa stosowania kryzotynibu w porównaniu do chemioterapii pierwszego rzutu (pemetreksed/cisplatyna lub pemetreksed/karboplatyna) u wcześniej nieleczonych pacjentów z ALK-dodatnim, zaawansowanym, niepłaskonabłonkowym rakiem NSCLC. Aby ustalić status ALK i określić kwalifikację do badania klinicznego nr 1, użyto zestawu Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit (ALK FISH). Na podstawie wyników testu Vysis ALK FISH 343 pacjentów znalazło się w zbiorze poddanym randomizacji (172 osoby przydzielono do grupy otrzymującej kryzotynib, a 171 osób — do grupy otrzymującej chemioterapię). W badaniu rezultatu klinicznego z użyciem testu VENTANA anti-ALK (D5F3) próbki tkanek z badania klinicznego nr 1 były retrospektywnie badane z użyciem testu VENTANA anti-ALK (D5F3). Spośród 343 pacjentów włączonych do badania klinicznego nr 1 próbki od 133 pacjentów przebadano z użyciem testu VENTANA anti-ALK (D5F3) zgodnie z protokołem badania porównania metod, a próbki od 39 dodatkowych pacjentów przebadano w ramach osobnego protokołu badania, co dało łącznie 172 pacjentów, których próbki przebadano z użyciem testu VENTANA anti-ALK (D5F3). Spośród tych przypadków 166 rozpoznano jako ALK-dodatnie lub ALK-ujemne metodą IHC ALK (D5F3). Podsumowanie ogólnych wyników skuteczności w przypadku tych pacjentów określone na podstawie wyników testu VENTANA anti-ALK (D5F3) zawiera Tab. 35.

Tab. 35. Korzyści kliniczne stosowania kryzotybinu (przeżycie bez progresji choroby) u pacjentów włączonych do badania klinicznego nr 1.

Status ekspresji białka ALK		HR ^a	SE ^a	95-procentowy CI ^a	Rozmiar próby	
					Grupa otrzymująca chemioterapię	Grupa otrzymująca kryzotybin
Ogółem pacjenci włączeni	FISH+	0.454	0.139	(0.346, 0.596)	171	172
Badani z użyciem testu IHC ALK	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 Zaobserwowany współczynnik hazardu (HR) dla przeżycia bez progresji choroby (PFS) w przypadku otrzymywania kryzotybinu w porównaniu do otrzymywania chemioterapii; błąd standardowy (SE); i dwustronny 95-procentowy przedział ufności (CI). Wyniki zostały oszacowane przy użyciu modelu Coxa stratyfikowanego według rasy, przerzutów do mózgu i wyniku w skali ECOG.

^b W przypadku dwóch pacjentów ALK FISH+ z grupy otrzymującej chemioterapię i 4 pacjentów z grupy otrzymującej kryzotybin nie uzyskano dodatniego ani ujemnego wyniku dotyczącego statusu ALK przy użyciu metody IHC.

Przeprowadzono dodatkowe analizy z zastosowaniem metod imputacji, aby uwzględnić pacjentów z brakującymi lub nieważnymi wynikami testu VENTANA anti-ALK (D5F3) oraz aby ocenić wiarygodność wniosków z badania. Analiza statystyczna dotycząca pacjentów z niezgodnymi wynikami, którzy nie zostali włączeni do badania klinicznego nr 1, obejmowała symulację możliwych wyników dla tych pacjentów. Wyniki wszystkich analiz hipotetycznych były na ogół podobne do tych z analizy dotyczącej pierwszorzędných punktów w zakresie skuteczności.

Przypadki z niezgodnymi wynikami testów FISH+ / IHC- z badania klinicznego nr 1:

badanie porównania metod

W badaniu porównania metod (Tab. 35) 25 pacjentów z badania klinicznego nr 1 zostało ocenionych jako FISH+/IHC-. Mediana wyników testu Vysis ALK FISH (% komórek nowotworowych dodatnich względem przegrupowań genu ALK) dla tych przypadków wynosiła 20% (średnia 31.6%, SD 21.58%), a dla 14 z tych przypadków wynik testu FISH wynosił 25% lub mniej. Wszystkie z tych przypadków miały wyniki testu Vysis ALK FISH powyżej progu odcięcia na poziomie 15% określającego dodatni status ekspresji białka ALK, ale ich wyniki znajdowały się w strefie niejednoznacznych wyników FISH (10–50%). Z kolei mediana wyników testu FISH zaobserwowana dla wszystkich włączonych pacjentów, dla których dostępne były wyniki testu metodą IHC, wynosiła 58% (średnia 56.9%, SD 21.97%).

Badanie rezultatu klinicznego

W badaniu rezultatu klinicznego 25 pacjentów włączonych do badania klinicznego nr 1 zostało ocenionych jako FISH+/IHC- (patrz ostatni wiersz w Tab. 35). Ośmiu z tych pacjentów w wyniku randomizacji trafiło do grupy badania klinicznego otrzymującej kryzotybin. Spośród tych pacjentów pięciu miało wyniki FISH bardzo zbliżone do progu odcięcia w metodzie FISH (15–18% komórek nowotworowych dodatnich względem przegrupowań genu ALK) i wykazywało obiektywną progresję albo chorobę stabilną/brak odpowiedzi. Dwóch z tych 8 pacjentów miało wyniki FISH poza strefą niejednoznacznych wyników FISH (66% i 72% komórek nowotworowych dodatnich względem przegrupowań genu ALK) i wykazywało częściową obiektywną odpowiedź nowotworu. Ósmy pacjent z wynikiem IHC- miał wynik FISH- i został włączony do badania błędnie; u tego pacjenta występowała odpowiedź nieokreślona.

Przypadki z niezgodnymi wynikami testów FISH- / IHC+ z badania klinicznego nr 1

W badaniu porównania metod z użyciem testu VENTANA anti-ALK (D5F3) 28 przypadków poddanych badaniom przesiewowym w ramach badania klinicznego nr 1 zostało ocenionych jako FISH-/IHC+. Ponieważ testem stosowanym w badaniu klinicznym był FISH, a do badania klinicznego nr 1 włączano tylko przypadki FISH+, nie są dostępne dane dotyczące rezultatu w odniesieniu do przypadków niezgodnych, dla których otrzymano wyniki FISH-/IHC+.

Badanie rezultatu klinicznego — certynib

Analiza skuteczności klinicznej testu VENTANA anti-ALK (D5F3) jako wyrobu diagnostycznego służącego do wyboru pacjentów, którzy mogliby odnieść korzyść z leczenia certynibem, była oparta na wielośrodkowym, randomizowanym, prowadzonym metodą otwartej próby i z grupą kontrolną otrzymującą aktywne leczenie badaniu klinicznym fazy III (badanie kliniczne nr 3) certynibu podawanego doustnie. To badanie porównywało leczenie certynibem z chemioterapią (dublet platyny z pemetreksesem, a następnie leczenie podtrzymujące pemetreksesem u pacjentów bez progresji choroby po 4 cyklach) pod względem skuteczności klinicznej i bezpieczeństwa u wcześniej nieleczonych pacjentów dorosłych z miejscowo zaawansowanym lub przerzutowym, ALK-dodatnim, niepląskonabłonkowym rakiem NSCLC. Test VENTANA anti-ALK (D5F3) był używany w aparacie BenchMark XT w celu przetestowania próbek od łącznie 1778 pacjentów, aby sprawdzić, czy kwalifikują się oni do badania klinicznego nr 3 — na potrzeby kwalifikacji wymagany był dodatni status ekspresji białka ALK. Łącznie 376 pacjentów, w przypadku których na podstawie tego testu stwierdzono ALK-dodatni status nowotworu, trafiło do zbioru poddanego randomizacji (189 osób przydzielono do grupy otrzymującej certynib, a 187 osób — do grupy otrzymującej chemioterapię). Podsumowanie ogólnych wyników dotyczących skuteczności w przypadku pacjentów leczonych certynibem przedstawia Tab. 36. W porównaniu do chemioterapii certynib wykazywał statystycznie istotną i klinicznie znaczącą korzyść — na podstawie analizy zaślepionej niezależnej komisji oceniającej (BIRC) odnotowano 45-procentowe zmniejszenie ryzyka dotyczącego przeżycia bez progresji choroby (PFS) (HR = 0.55; 95-procentowy CI: 0.42, 0.73; $p < .001$) w przypadku pacjentów wybranych za pomocą testu VENTANA anti-ALK (D5F3). Mediana PFS zgodnie z analizą BIRC wynosiła 16.6 miesiąca (95-procentowy CI: 12.6, 27.2) oraz 8.1 miesiąca (95-procentowy CI: 5.8, 11.1) odpowiednio dla grupy otrzymującej certynib i grupy otrzymującej chemioterapię.

Tab. 36. Korzyści kliniczne stosowania certynibu (przeżycie bez progresji choroby) u pacjentów włączonych do badania klinicznego nr 3.

Przeżycie bez progresji choroby	Certynib (N = 189)	Chemioterapia (N = 187)
Mediana, w miesiącach (95-procentowy CI) ^a	16.6 (12.6, 27.2)	8.1 (5.8, 11.1)
HR (95-procentowy CI) ^b	0.55 (0.42, 0.73)	
Wartość p ^c	< 0.001	

HR = współczynnik hazardu; CI = przedział ufności; BIRC = zaślepiona niezależna komisja oceniająca; NR = nie osiągnięto; NE = nie do oszacowania

^a Oszacowano za pomocą metody Kaplana-Meiera.

^b W celu oszacowania współczynnika hazardu PFS wraz z 95-procentowym CI na podstawie testu Walda zastosowano model regresji Coxa z uwzględnieniem czynników stratyfikacji z randomizacji (stan sprawności wg WHO: 0 lub 1–2; obecność lub brak przerzutów do mózgu, obecność lub brak wcześniejszej chemioterapii neoadiuwantowej/adjuwantowej).

^c Na podstawie stratyfikowanego logarytmicznego testu rang (stratyfikacja taka sama, jak w Uwadze b).

Współczynniki akceptowalności barwienia z użyciem testu VENTANA anti-ALK (D5F3) w populacji z zamiarem rozpoznania (1778 pacjentów przebadanych przy użyciu tego testu) przedstawia Tab. 37. Podano również współczynniki dopuszczalności morfologii i dopuszczalnego barwienia dla preparatów barwionych z użyciem testu VENTANA anti-ALK (D5F3). W przypadku 122 próbek pierwsza próba barwienia z użyciem testu VENTANA anti-ALK (D5F3) nie powiodła się i wykonano kolejną próbę barwienia. Po ostatecznej próbie barwienia 48 ze 122 próbek pozostało niedopuszczalnych (1 z powodu nieważnej kontroli cyklu, 30 z powodu nieakceptowalnego barwienia H&E, 12 z powodu

nieakceptowalnego barwienia odczynnikiem do kontroli ujemnej, 1 z powodu niedopuszczalnego tła, 2 z powodu niedopuszczalnej morfologii, a 2 z powodu niemożności oceny preparatu IHC). Test VENTANA anti-ALK (D5F3) charakteryzował się wysokim ogólnym współczynnikiem akceptowalności pierwszego i ostatecznego barwienia — odpowiednio 93.1% i 97.3%. Ostateczne współczynniki akceptowalności morfologii i tła wyniosły 99% lub więcej.

Tab. 37. Charakterystyka pierwszego i ostatecznego barwienia z użyciem testu VENTANA anti-ALK (D5F3) w przypadku próbek raka NSCLC poddawanych badaniom przesiewowym na potrzeby włączenia do badania klinicznego nr 3.

Ocenione atrybuty barwienia	Procentowy współczynnik akceptowalności (n/N) (95-procentowy CI)	
	Pierwsza próba barwienia	Ostateczna próba barwienia
Ogólny współczynnik akceptowalności barwienia ALK metodą IHC	93.1% (1656/1778) (91.9–94.2%)	97.3% (1730/1778) (96.4–98.0%)
Barwienie tła	99.0% (1655/1672) (98.4–99.4%)	99.8% (1727/1730) (99.5–99.9%)
Morfologia	99.0% (1657/1674) (98.4–99.4%)	99.9% (1728/1730) (99.6–100%)

Badanie rezultatu klinicznego — alektynib

Analiza skuteczności klinicznej testu VENTANA anti-ALK (D5F3) jako wyrobu diagnostycznego służącego do wyboru pacjentów, którzy mogliby odnieść korzyść z leczenia alektynibem, była oparta na wielośrodkowym, randomizowanym, prowadzonym metodą otwartej próby i z grupą kontrolną otrzymującą aktywne leczenie badaniu klinicznym fazy III (badanie kliniczne nr BO28984) alektynibu podawanego doustnie. To badanie porównywało leczenie alektynibem z leczeniem kryzotynibem pod względem skuteczności klinicznej i bezpieczeństwa u wcześniej nieleczonych pacjentów dorosłych z miejscowo zaawansowanym lub przerzutowym, ALK-dodatnim rakiem NSCLC. Test VENTANA anti-ALK (D5F3) był używany w aparacie BenchMark XT w celu przetestowania próbek od łącznie 1239 pacjentów, aby sprawdzić, czy kwalifikują się oni do badania klinicznego nr BO28984 — na potrzeby kwalifikacji wymagany był dodatni status ekspresji białka ALK potwierdzony testami wykonanymi centralnie. Łącznie 303 pacjentów, w przypadku których na podstawie tego testu stwierdzono ALK-dodatni status nowotworu, zostało poddanych randomizacji i analizie pod względem skuteczności (152 osoby przydzielono do grupy otrzymującej alektynib, a 151 osób — do grupy otrzymującej kryzotynib). Podsumowanie ogólnych wyników dotyczących skuteczności przedstawia Tab. 38. Alektynib — w porównaniu do kryzotynibu — wykazywał statystycznie istotną i klinicznie znaczącą korzyść; na podstawie oceny badacza odnotowano 53-procentowe zmniejszenie ryzyka dotyczącego przeżycia bez progresji choroby (PFS) (HR = 0.47, 95-procentowy CI: 0.34, 0.65; $p < 0.0001$), a na podstawie oceny komisji bioetycznej (IRC) odnotowano 50-procentowe zmniejszenie ryzyka dotyczącego PFS (HR = 0.50, 95-procentowy CI: 0.36, 0.7; $p < 0.0001$) w przypadku pacjentów wybranych za pomocą testu VENTANA anti-ALK (D5F3). Mediana PFS zgodnie z oceną badacza nie została osiągnięta w grupie otrzymującej alektynib, a w ocenie IRC wynosiła 25.7 miesiąca (95-procentowy CI: 19.9, NE) i 10.4 miesiąca (95-procentowy CI: 7.7, 14.6) — odpowiednio dla grupy otrzymującej alektynib i grupy otrzymującej kryzotynib.

Tab. 38. Korzyści kliniczne stosowania alektynibu lub kryzotynibu (przeżycie bez progresji choroby) u pacjentów włączonych do badania klinicznego nr BO28984.

Przeżycie bez progresji choroby w ocenie badacza	Alektynib (N = 152)	Kryzotynib (N = 151)
Mediana, w miesiącach (95-procentowy CI) ^a	NE (17.7, NE%)	11.1 (9.1, 13.1%)
HR (95-procentowy CI) ^b	0.47 (0.34, 0.65%)	
Wartość p ^c	< 0.0001	
Przeżycie bez progresji choroby w ocenie IRC	Alektynib (N = 152)	Kryzotynib (N = 151)
Mediana, w miesiącach (95-procentowy CI) ^a	25.7 (19.9, NE%)	10.4 (7.7, 14.6%)
HR (95-procentowy CI) ^b	0.50 (0.36, 0.70%)	
Wartość p ^c	< 0.0001	

HR = współczynnik hazardu; CI = przedział ufności; IRC = komisja bioetyczna; NE = nie do oszacowania

^a Oszacowano za pomocą metody Kaplana-Meiera.

^b Współczynnik hazardu oszacowano za pomocą regresji Coxa, przy uwzględnieniu stratyfikacji pod względem współmiennych rasy (rasa żółta lub inna) oraz przerzutów do OUN w punkcie wyjściowym (obecność/brak), ocenianych przez IRC.

^c Na podstawie stratyfikowanego logarytmicznego testu rang (stratyfikacja taka sama, jak w [b]).

Współczynniki akceptowalności barwienia z użyciem testu VENTANA anti-ALK (D5F3) w populacji z zamiarem rozpoznania (1239 pacjentów przebadanych przy użyciu tego testu) były porównywalne do wyników w badaniu klinicznym A2301.

Wynik badania klinicznego lorlatynibu

Skuteczność lorlatynibu wśród pacjentów z rakiem NSCLC ALK-dodatnim, którzy wcześniej nie otrzymywali leczenia ogólnoustrojowego w kierunku choroby przerzutowej, została określona w randomizowanym, wielośrodkowym badaniu prowadzonym metodą otwartej próby z grupą kontrolną otrzymującą aktywne leczenie (badanie B7461006; NCT03052608; CROWN). Wymogami do włączenia do badania były stan sprawności w skali ECOG równy 0–2 oraz rak NSCLC ALK-dodatni zidentyfikowany przy użyciu testu VENTANA anti-ALK (D5F3). Do badania kwalifikowali się pacjenci stabilni neurologicznie z leczonymi lub nieleczonymi bezobjawowymi przerzutami do ośrodkowego układu nerwowego (OUN), w tym przerzutami do opon miękkich.

Łącznie 296 pacjentów przydzielono losowo w stosunku 1:1 do grupy otrzymującej lorlatynib: 100 mg doustnie raz na dobę ($n = 149$) lub kryzotynib: 250 mg doustnie dwa razy na dobę ($n = 147$). Randomizacja była stratyfikowana według pochodzenia etnicznego (rasa żółta lub inna) oraz przerzutów do OUN w punkcie wyjściowym (obecność/brak). W obu grupach lek był podawany do wystąpienia progresji choroby lub niedopuszczalnej toksyczności. Główną miarą wyniku badania skuteczności było przeżycie bez progresji choroby (PFS) określane na podstawie niezależnej analizy centralnej przeprowadzanej w warunkach zaślepienia (BICR) przy użyciu kryteriów oceny odpowiedzi na podstawie guzów litych, wersja 1.1 (RECIST v1.1).

W badaniu wykazano, że — w porównaniu z grupą przyjmującą kryzotynib — w grupie przyjmującej lorlatynib nastąpił istotny statystycznie i znaczący wzrost wartości PFS przy 72-procentowym obniżeniu ryzyka progresji choroby lub śmierci wg BICR (HR = 0.28; 95-procentowy CI: 0.19, 0.41; $p < 0.0001$; Tab. 39). W momencie odcięcia danych klinicznych dane dotyczące OS nie były wystarczające.

Dodatkowe analizy podgrup uczestników z przerzutami do mózgu lub bez przerzutów w fazie wyjściowej badania dały wyniki zgodne z pierwotnym wynikiem PFS. Prawdopodobieństwo, że OUN będzie pierwszym miejscem progresji choroby, samodzielnie lub z jednoczesną progresją ogólnoustrojową, było znacznie niższe w grupie przyjmującej lorlatynib (2.7%) niż w grupie przyjmującej kryzotynib (23.8%), z HR stratyfikowanym wg przyczyny wynoszącym 0.06 (95-procentowy CI: 0.02, 0.18).³⁶

Tab. 39. Ogólne wyniki dotyczące skuteczności w badaniu B7461006 (CROWN).

Przeżycie bez progresji choroby (wg oceny BICR)	Lorlatinib (N = 149)	Kryzotynib (N = 147)
Liczba zdarzeń, n (%)	41 (27.5%)	86 (58.5%)
Progresja choroby, n (%)	32 (21.5%)	82 (55.8%)
Zgony, n (%)	9 (6.0%)	4 (2.7%)
Prawdopodobieństwo PFS w ciągu 12 miesięcy (95-procentowy CI) ^a	0.78 (0.70, 0.84)	0.39 (0.30, 0.48)
Współczynnik hazardu (95-procentowy CI) ^b	0.28 (0.19, 0.41)	
Wartość p ^c	< 0.0001	

Skróty: CI = przedział ufności; NE = nie do oszacowania; PFS = przeżycie bez progresji choroby.

^a Przedziały ufności (CI) zostały wyprowadzone przy użyciu transformacji podwójnie logarytmicznej z transformacją wsłeczną do oryginalnej skali.

^b Stratyfikowany współczynnik hazardu oparty na modelu proporcjonalnego hazardu Coxa.

^c Jednostronna wartość p oparta na stratyfikowanym logarytmicznym teście rang.

Na podstawie testów wykonywanych przy użyciu przeciwciała VENTANA anti-ALK (D5F3) w laboratoriach centralnych na 232 próbkach przesiewowych z badania B7461006 uzyskano współczynniki akceptowalności barwienia utrzymujące się na niemalże identycznym poziomie jak te z badania klinicznego A2301.

WNIOSEK

Wyniki testu VENTANA anti-ALK (D5F3) są odtwarzalne pod względem rezultatów barwienia pod kątem klinicznego statusu ekspresji białka ALK w aparatach BenchMark IHC/ISH. Wyniki uzyskiwane z wykorzystaniem binarnego algorytmu oceniania są wysoce odtwarzalne między badaczami. Pod względem statusu ekspresji białka ALK wyniki tego testu są zgodne z wynikami testu Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit. Test VENTANA anti-ALK (D5F3) może być używany do identyfikacji pacjentów kwalifikujących się do terapii preparatem XALKORI® (kryzotynib), ZYKADIA® (certynib), ALECENSA® (alektynib) lub lorlatinib.

ROZWIĄZYWANIE PROBLEMÓW

Jeśli w próbkach od pacjenta albo w tkankach do kontroli systemowej pochodzących z ludzkiego raka NSCLC lub ludzkiego wyrostka robaczkowego wystąpi nieprawidłowe wybarwienie, należy upewnić się, czy przeprowadzono właściwe procedury konserwacyjne aparatu BenchMark IHC/ISH. W przypadku stwierdzenia problemów technicznych lub nieprawidłowości przed powtórzeniem cyklu należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem działu pomocy technicznej.

BIBLIOGRAFIA

- Kutok JL, Aster JC, et al. Molecular biology of anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 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 not 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 method sheet. Pfizer. Document ID:6427427a-821b-48b4-8f06-0477f0ae4e36. LAB-0441-6.0. June 2014
- ZYKADIA method sheet. 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 method sheet. https://www.gene.com/download/pdf/alecensa_prescribing.pdf
- Alunbrig: EPAR- Product Information. <http://www.ema.europa.eu/>
- Johnson T, Richardson P, et al. Discovery of (10R)-7-amino-12-fluoro-2,10,16-trimethyl-15-oxo-10,15,16,17-tetrahydro-2H-8,4-(m etheno)pyrazolo[4,3-h] [2,5,11]-benzoxadiazacyclotetradecine-3-carbonitrile (PF-06463922), a macrocyclic inhibitor of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and c-ros oncogene 1 (ROS1) with preclinical brain exposure and broadspectrum potency against ALK-resistant mutations. *J Med Chem* 2014;57:4720-44.
- Gainor J, Dardaei L, et al. Molecular mechanisms of resistance to first and second generation ALK inhibitors in ALK-rearranged lung cancer. *Cancer Discov* 2016;6:1118-33.
- Zou H, Qiu H, et al. PF-06463922 is a potent and selective next-generation ROS1/ALK inhibitor capable of blocking crizotinib-resistant ROS1 mutations. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112(11):3493-3498.
- 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.
- Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and practice of Histotechnology, 2nd edition. St. Louis: The C.V. Mosby Company; 1980.
- Carson F, Hladik C. Histotechnology: A Self Instructional Text, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
- Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
- Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
- Roche PC, Hsi ED. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. In: NR Rose, ed. ASM Press; 2002.
- 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.

34. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2011.
35. 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.
36. LORBRENA package insert (method sheet).

UWAGA: W tym dokumencie jako separator dziesiętny do zaznaczenia granicy między częścią całkowitą a ułamkową liczby dziesiętnej zawsze używana jest kropka. Nie jest używany separator tysięcy.

Podsumowanie dotyczące bezpieczeństwa i skuteczności można znaleźć pod adresem: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>

Symbole

Firma Ventana stosuje określone poniżej symbole i oznaczenia dodatkowo do symboli wymienionych w normie ISO 15223-1 (dotyczy Stanów Zjednoczonych: definicje stosowanych symboli można znaleźć pod adresem dialog.roche.com):



Globalny Numer Jednostki Handlowej



Unikalny identyfikator wyrobu



Wskazuje podmiot odpowiedzialny za import wyrobu medycznego do Unii Europejskiej

HISTORIA ZMIAN

Wer.	Aktualizacje
B	Zaktualizowano informacje zawarte w następujących częściach: Znaczenie kliniczne, Ostrzeżenia i środki ostrożności, Procedura barwienia, Interpretacja wybarwienia / oczekiwane wyniki, Skuteczność analityczna, Bibliografia i Własność intelektualna. Dodano informacje dotyczące aparatu BenchMark ULTRA PLUS.

WŁASNOŚĆ INTELEKTUALNA

VENTANA, BENCHMARK, OPTIVIEW i logo VENTANA są znakami towarowymi firmy Roche.

Wszystkie pozostałe znaki towarowe stanowią własność odpowiednich właścicieli.

© 2022 Ventana Medical Systems, Inc.

Sprzedaż na podstawie licencji



DANE KONTAKTOWE



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

www.roche.com

