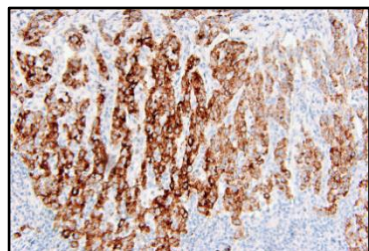


VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

REF 790-4794

06679072001

IVD  50



Rysunek 1. Test ekspresji przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) w niedrobnokomórkowym raku płuca (non-small cell lung carcinoma).

IHC/ISH. Stosowanie tego produktu jest wskazane w celu ułatwienia identyfikacji pacjentów kwalifikujących się do leczenia preparatami XALKORI® (crizotinib), ZYKADIA® (ceritinib) lub ALECENSA® (alectinib).

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

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

PODSUMOWANIE I OBJAŚNIENIA

Kinaza chłoniaka anaplastycznego (białko ALK) należy do nadrodziny receptorów insuliny o aktywności receptorowej kinazy tyrozynowej.¹ ALK jest glikoproteiną błonową I typu, która w prawidłowych warunkach ulega ekspresji w układzie nerwowym.² Gen ALK zlokalizowany jest w regionie chromosomowym 2p23. Jest on zbudowany z dwóch dużych intronów i 26 egzonów.¹ Patogenezę molekularną ALK rozpoczyna rearanżacja chromosomalna, wskutek której sekwencje kodujące wewnątrzkomórkową domenę sygnalizacyjną na końcu 3' łączą się z elementami promotorowymi i sekwencjami kodującymi innych genów na końcu 5'. Elementy promotorowe i sekwencje kodujące na końcu 5' powodują nadekspresję powstałych białek chimerycznych oraz oligomeryzację niezależną od ligandów, co jest często spotykaną cechą ludzkich nowotworów związanych z białkami fuzyjnymi o aktywności kinazy tyrozynowej.

W roku 2007 w liniach komórkowych NSCLC i zarchiwizowanych próbkach klinicznych odkryto inwersję w obrębie ramienia krótkiego chromosomu 2 (2p), skutkującą powstaniem genu fuzyjnego zawierającego fragmenty genów EML4 [echinoderm microtubule associated protein-like 4 (EML4) gene] i ALK.³ Wyniki opublikowanych potem badań wskazują na to, że inwersja EML4-ALK prowadzi do powstania co najmniej dziewięciu aktywnych katalitycznie wariantów fuzyjnych kinazy, z których każdy zawiera ten sam fragment C-końcowej domeny kinazy ALK.⁴⁻⁸ Podobnie jak w przypadku fuzyji obejmujących gen ALK, odkrytych po raz pierwszy w chłoniaku anaplastycznym z dużych limfocytów (anaplastic large-cell lymphoma, ALCL), także białko fuzyjne EML4-ALK wykazuje aktywność transformującą. Również ekspresja EML4-ALK w komórkach nabłonka pęcherzyków płucnych u myszy transgenicznym okazuje się być silnym czynnikiem onkogennym.⁹

ISTOTNOŚĆ KLINICZNA

NSCLC to najczęściej występujący rodzaj raka płuca. Wyróżnia się trzy często występujące typy NSCLC: gruczolakoraka, raka płaskonabłonkowego i raka wielkokomórkowego.

ALK obecnie uznaje się za kluczowy czynnik onkogenny w NSCLC. EML4 jest przeważającym partnerem fuzyji, zidentyfikowano jednak również inne geny pełniące tę rolę.^{10,11} Częstość występowania rearanżacji w genie ALK wydaje się mieścić w zakresie 2-7%, co przekłada się na około 6 000 pacjentów z pozytywnym wynikiem badania pod kątem ALK na rok w Stanach Zjednoczonych (USA) i 40 000 pacjentów rocznie na świecie.^{3,4,7}

W rutynowym badaniu immunohistochemicznym (IHC) można używać niewielkich skrawków tkanek, co - w połączeniu z przeciwciałami wykrywającymi antygeny ważne w oznaczaniu nowotworów - czyni tę technikę skutecznym narzędziem, ułatwiającym histopatologom postawienie rozpoznania i określenie rokowania. Jednym z ważnych dla NSCLC markerów jest ALK.

Przeważającą większość rearanżacji w genie ALK obserwowano w próbkach histopatologicznych gruczolakoraka płuca w porównaniu z próbkami raka płaskonabłonkowego lub drobnokomórkowego.³⁻⁸ Istnieją dowody sugerujące korelację pomiędzy rearanżacją w genie ALK a NSCLC u pacjentów, którzy nigdy nie palili lub palili niewiele, jednak ten czynnik towarzyszący może nie być istotny statystycznie.^{3,4,7,9} Co ważne, rearanżacja w genie ALK rzadko współwystępuje z mutacjami w genach EGFR, HER2 lub KRAS, co świadczy o tym, że pozytywny wynik badania statusu ALK charakteryzuje odmienny podtyp choroby.⁹ XALKORI® to selektywny, kompetycyjny względem ATP, drobnocząsteczkowy inhibitor kinaz tyrozynowych ALK, ROS1 i c-Met/Hepatocyte Growth Factor Receptor (HGFR) oraz ich wariantów onkogennych (np. białek fuzyjnych ALK lub ROS1 lub wariantów zmutowanych c-Met/HGFR). Dla preparatu XALKORI® wykazano zależną od stężenia inhibicję fosforylacji ALK i c-Met w testach komórkowych z wykorzystaniem linii komórek nowotworowych. Wykazano również aktywność przeciwnowotworową u myszy z przeszczepami obcogatunkowymi nowotworu, u których zachodzi ekspresja białek fuzyjnych EML4- lub NPM-ALK albo Met.^{12,13,14}

ZYKADIA® jest inhibitorem kinazy. Inhibicja preparatem ZYKADIA® ukierunkowana jest m.in. na zidentyfikowane w testach biochemicznych lub komórkowych w klinicznie znaczących stężeniach białka: ALK, receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (IGF-1R), receptor insulinowy (InsR) oraz ROS1. Spośród tych białek największą aktywność preparat ZYKADIA® wykazuje wobec ALK. ZYKADIA® hamuje autofosforylację ALK, zależną od ALK fosforylację białka sygnałowego działającego w dół szlaku STAT3 oraz proliferację zależnych od ALK komórek nowotworowych w testach *in vitro* i *in vivo*. ZYKADIA® hamuje proliferację *in vitro* linii komórkowych, w których zachodzi ekspresja białek fuzyjnych EML4-ALK i NPM-ALK, oraz wykazuje zależną od dawki inhibicję wzrostu guza przeszczepu obcogatunkowego NSCLC z pozytywnym wynikiem badania pod kątem EML4-ALK u myszy i szczurów.¹⁵

Istotność kliniczną rearanżacji w genie ALK wykazano w randomizowanych badaniach klinicznych z grupą kontrolną otrzymującą substancję czynną dotyczącą preparatu XALKORI®, prowadzonych przez firmę Pfizer, oraz preparatu ZYKADIA®, prowadzonych przez firmę Novartis.^{14,15}

Preparat ALECENSA® jest wysoce selektywnym i silnym inhibitorem kinazy tyrozynowej ALK i RET, który powoduje inhibicję wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału biorących udział w proliferacji i przeżyciu guza i dlatego sprzyja śmierci komórek raka oraz powoduje inhibicję wzrostu i proliferacji komórek guza.¹⁶ Z danych przedklinicznych wynika, że preparat ALECENSA® nie jest substratem transporterów wyrzucających (PGP lub BCRP) w barierze krew-mózg i dlatego może ulegać dystrybucji oraz pozostawać w ośrodkowym układzie nerwowym. Preparat ALECENSA® indukował regresję guza w przedklinicznych modelach przeszczepów obcogatunkowych u myszy, w tym aktywność przeciwnowotworową w mózgu i przedłużone przeżycie w zwierzęcych modelach guza śródczaszkowego.¹⁷ Preparat ALECENSA® jest dobrze tolerowany i zapewnia dający się kontrolować profil bezpieczeństwa.¹⁸⁻²⁰

Firma Ventana wykazała zgodność testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) z testem Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit (ALK FISH) pod względem możliwości określenia statusu ALK u pacjentów z NSCLC. W przypadku testu ALK FISH mogą pojawiać się trudności techniczne w zakresie oceny wyników barwienia. Rearanżacje wewnątrzchromosomowe mogą powodować nieznaczne rozdzielanie sygnału, prowadząc do potencjalnie fałszywie negatywnych wyników testu.²¹ Najnowsze badania wskazują na to, że analiza immunohistochemiczna (IHC) jest czułą i swoistą metodą określania statusu ALK i stanowi realną alternatywę dla testu ALK FISH.^{10,11,21-23} Firma Ventana opracowała test z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) i związany z nim algorytm oceny mający na celu określenie statusu ALK w próbkach NSCLC.

Dokonując interpretacji wyników barwienia próbek tkanek w teście z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) należy przestrzegać zalecanego algorytmu oceny. Zaletą histologicznych preparatów tkankowych jest nienaruszona morfologia tkanek, pomocna w interpretacji dodatniego wyniku badania próbki w kierunku ALK. Wszystkie badania histopatologiczne powinny być interpretowane przez histopatologa, a wyniki powinny zostać uzupełnione badaniami morfologicznymi oraz odpowiednimi kontrolami i wykorzystane wspólnie z innymi danymi klinicznymi oraz laboratoryjnymi. Na docelowe antygeny testów IHC wpływa czas utwalania, rodzaj utwalacza i wiek wyciętych skrawków, należy zatem dochować ostrożności, aby zapewnić zgodność sposobu

przygotowania próbek przed wybarwianiem (patrz wytyczne dotyczące interpretacji Interpretation Guide for VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody w przypadku niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC) P/N 1011879 oraz rozdział „Ograniczenia szczególne” poniżej).

ZASADY PRZEPROWADZANIA PROCEDURY

VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody jest króliczym pierwotnym przeciwciałem monoklonalnym, które wiąże się z ALK w skrawkach tkankowych zatopionych w parafinie. To swoiste przeciwciało można wykryć za pomocą zestawu detekcyjnego 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.

DOSTARCZANY ODCZYNNIK

Preparat przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) to preparat rekombinowanego monoklonalnego przeciwciała króliczego, który zawiera odczynnik w ilości wystarczającej do wybarwienia 50 skrawków.

Jeden dozownik preparatu przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) o pojemności 5 ml zawiera około 70 µg monoklonalnego przeciwciała króliczego (D5F3).

Przeciwciało to jest rozcieńczone w 0,08 M roztworze PBS z dodatkiem 3% białka nośnikowego oraz 0,05% ProClin 300 jako konserwantu.

Całkowite stężenie białka w odczynniku wynosi około 10 mg/ml. Stężenie swoistego przeciwciała wynosi około 14 µg/ml.

MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZANE

1. próbki ludzkiego wyrostka robaczkowego lub ALK-pozytywne i ALK-negatywne niedrobnokomórkowego raka płuc do stosowania jako tkanka kontrolna;
2. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (nr kat. 790-4795 / 06683380001);
3. szkiełka mikroskopowe (dodatnio naładowane);
4. suszarka umożliwiająca utrzymanie temperatury 60°C ± 5°C;
5. etykiety z kodem kreskowym;
6. ksylene (klasy histologiczne);
7. alkohol do odczynników lub etanol (klasy histologiczne);
 - roztwór 100%: nierozcieńczony etanol lub alkohol do odczynników;
 - roztwór 95%: wymieszać 95 części etanolu lub alkoholu do odczynników i 5 części wody dejonizowanej;
 - roztwór 80%: wymieszać 80 części etanolu lub alkoholu do odczynników i 20 części wody dejonizowanej;
8. woda dejonizowana lub destylowana;
9. OptiView DAB IHC Detection Kit (nr kat. 760-700 / 06396500001);
10. OptiView Amplification Kit (nr kat. 760-099 / 06396518001 (50 testów) lub 860-099 / 06718663001 (250 testów));
11. EZ Prep Concentrate (10X) (nr kat. 950-102 / 05279771001);
12. Reaction Buffer Concentrate (10X) (nr kat. 950-300 / 05353955001);
13. LCS (Predilute) (nr kat. 650-010 / 05264839001);
14. ULTRA LCS (Predilute) (nr kat. 650-210 / 05424534001);
15. Cell Conditioning 1 (CC1) (nr kat. 950-124 / 05279801001);
16. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (nr kat. 950-224 / 05424569001);
17. Hematoxylin II (nr kat. 790-2208 / 05277965001);
18. Bluing Reagent (nr kat. 760-2037 / 05266769001);
19. środek do trwałego nakrywania preparatów (Permout Fisher nr kat. SP15-500 lub odpowiednik);
20. szkiełka nakrywkowe (o wielkości wystarczającej do pokrycia tkanki, jak np. VWR nr kat. 48393-060);
21. aparat do nakrywania szkiełkami nakrywkowymi (taki jak Tissue-Tek SCA Automated Coverslipper);
22. mikroskop świetlny;
23. ściereczki wchłaniające.

Nie dołączono odczynników do barwienia, takich jak zestawy do detekcji firmy VENTANA, ani elementów pomocniczych, takich jak pozytywne i negatywne kontrolne preparaty tkankowe.

Nie wszystkie produkty przedstawione w ulotce dołączonej do opakowania są dostępne we wszystkich rejonach geograficznych. Należy skonsultować się z lokalnym przedstawicielem odpowiedzialnym za wsparcie techniczne.

PRZECHOWYWANIE

Po otrzymaniu preparat nieużywany przechowywać w temperaturze 2-8°C. Nie zamrażać.

W celu zapewnienia właściwego dostarczenia odczynnika i stabilności przeciwciała po każdym użyciu, należy złożyć zatyczkę i niezwłocznie umieścić dozownik w lodówce w pozycji pionowej.

Na każdym dozowniku przeciwciała podana jest data ważności. Prawdopodobnie przechowywany odczynnik zachowuje trwałość do daty określonej na etykiecie. Nie należy stosować odczynnika po upływie terminu ważności.

PRZYGOTOWANIE PRÓBK

Do stosowania z tym pierwotnym przeciwciałem nadają się rutynowo przygotowane tkanki utralone w formalinie i zatopione w parafinie, pod warunkiem stosowania zestawów detekcyjnych firmy VENTANA i automatów BenchMark IHC/ISH.

Na podstawie modeli przeszczepów obcogatunkowych z linii komórkowej ludzkiego NSCLC NCI-H2228, wykazujących pozytywny wynik badania pod kątem ALK, firma Ventana zaleca utralanie tkanek 10% obojętną zbuforowaną formaliną (NBF) przez co najmniej 6 godzin.²⁴ Czas utralania krótszy niż sześć godzin skutkuje znacznym zmniejszeniem intensywności barwienia ALK. Akceptowalne jest także utralanie w formalinie z dodatkiem cynku, przez co najmniej sześć godzin. Środek utralający należy stosować w ilości wynoszącej 15- do 20-krotności objętości tkanek. Żaden utralacz nie jest w stanie w ciągu 24 godzin penetrować głębiej niż na 2-3 mm tkanki litej lub 5 mm tkanki porowatej. Utalanie można przeprowadzać w temperaturze pokojowej (15-25°C).²⁵

Wykazano, że utralacze takie jak alkohol-formalina-kwas octowy (AFA), PREFER, B5 i inne utralacze na bazie kwasu lub alkoholu prowadzą do utraty intensywności barwienia ALK w przypadku wszystkich testowanych czasów utralania (od jednej do 72 godzin). Nie zaleca się ich stosowania z przedmiotowym testem. Badania opóźnienia utralania również wykazały utratę intensywności barwienia ALK w przypadku, gdy próbki przeszczepu obcogatunkowego nie zostały utralone w ciągu sześciu godzin od wycięcia. Więcej informacji na temat wpływu sposobu przygotowania próbki na intensywność barwienia ALK znajduje się w wytycznych dotyczących interpretacji Interpretation Guide for VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody w przypadku niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC) P/N 1011879.

Tkanki należy pociąć na skrawki o grubości około 4 µm i umieścić je na dodatnio naładowanych szkiełkach mikroskopowych. Szkiełka należy niezwłocznie wybarwić, ponieważ antygenowość ciętych skrawków tkanek może zmniejszać się z czasem i ulega osłabieniu w ciągu trzech miesięcy od wycięcia z bloczka parafinowego (patrz wytyczne dotyczące interpretacji Interpretation Guide for VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody w przypadku niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC) P/N 1011879 oraz rozdział „Charakterystyka wyników” poniżej).

OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

1. Do stosowania w diagnostyce *in vitro* (IVD).
2. Wyłącznie do zastosowania profesjonalnego.
3. Należy pamiętać, że dodatnio naładowane szkiełka mogą być podatne na czynniki środowiskowe, co może spowodować nieodpowiednie wybarwienie testów IHC (na przykład brak w tkance przeciwciała pierwotnego lub barwienia kontrastowego). Omówienie niekorzystnego wpływu czynników środowiskowych na dodatnio naładowane szkiełka do badań IHC znajduje się w publikacji N4629_0313B - Impact of environmental stress on various histology slide types (Niekorzystny wpływ czynników środowiskowych na różnego rodzaju wycinki histopatologiczne).
4. W tym preparacie jako konserwant zastosowano roztwór ProClin 300. Uznano go za środek drażniący i jego kontakt ze skórą może powodować uczulenie. Podczas pracy z produktem należy w uzasadnionym stopniu stosować środki ostrożności. Unikać kontaktu odczynników z oczami, skórą i błonami śluzowymi. Stosować odzież i rękawice ochronne.
5. Materiały pochodzenia ludzkiego lub zwierzęcego należy traktować jak materiały niebezpieczne biologicznie i utylizować z zachowaniem właściwych środków ostrożności.
6. Unikać kontaktu odczynników z oczami i błonami śluzowymi. W przypadku kontaktu odczynników z wrażliwymi miejscami splukiwać obfitą ilością wody.
7. Unikać skażenia mikrobiologicznego odczynników, gdyż może ono skutkować otrzymaniem nieprawidłowych wyników.

- W celu uzyskania informacji na temat zalecanej metody użycia produktu należy skontaktować się z władzami lokalnymi i/lub krajowymi.
- Dodatkowe informacje na temat bezpieczeństwa można znaleźć w Karcie charakterystyki produktu oraz w Przewodniku po symbolach i zwrotach dotyczących zagrożeń, dostępnych w witrynie www.ventana.com.

PROCEDURA BARWIENIA

Test z zastosowaniem przeciwciała VENTANA anti-ALK (D5F3) jest przeznaczony do stosowania w automatach BenchMark IHC/ISH wraz z odczynnikiem Rabbit Monoclonal Negative Control Ig, zestawem OptiView DAB IHC Detection Kit, zestawem OptiView Amplification Kit oraz odczynnikami pomocniczymi. Opis zalecanego protokołu barwienia dla każdego z automatów zawierają Tabela 1, Tabela 2 i Tabela 3.

Te przeciwciała zoptymalizowano do określonego czasu inkubacji, jednak użytkownik jest obowiązany dokonać walidacji wyników uzyskanych z zastosowaniem tego odczynnika. Nieprzestrzeganie protokołu barwienia (Tabela 1, Tabela 2 lub Tabela 3) może prowadzić do wyników fałszywie pozytywnych lub fałszywie negatywnych. Dla automatu BenchMark ULTRA opracowano procedurę barwienia swoistego dla ALK, **U VENTANA ALK (D5F3)**. Przed wyborem warunków protokołu dla procedury barwienia swoistego dla ALK należy zaktualizować oprogramowanie automatu BenchMark ULTRA do wersji VSS 12.3 z procedurą barwienia OptiView w wersji 5 lub nowszej.

Parametry procesów zautomatyzowanych mogą być wyświetlane, drukowane i edytowane zgodnie z procedurą opisaną w Instrukcji obsługi urządzenia. Więcej informacji na temat procedur barwienia immunohistochemicznego znajduje się w ulotce dołączonej do opakowania odpowiedniego zestawu detekcyjnego firmy VENTANA.

Tabela 1. Zalecany protokół barwienia dla testu z zastosowaniem przeciwciała VENTANA anti-ALK (D5F3) i Rabbit Monoclonal Negative Control Ig z zestawami OptiView DAB IHC Detection Kit i OptiView Amplification Kit w automacie BenchMark ULTRA.

Procedura barwienia: U VENTANA ALK (D5F3)	
Krok protokołu	Wprowadzany parametr
Przeciwciało (pierwotne)	VENTANA ALK AB - 16 min (następnie wybrać US lub EU/Other) lub kontrola negatywna
Barwienie kontrastowe	Hematoxylin II, 4 minuty
Po barwieniu kontrastowym	Bluing, 4 minuty

Tabela 2. Zalecany protokół barwienia dla testu z zastosowaniem przeciwciała VENTANA anti-ALK (D5F3) i Rabbit Monoclonal Negative Control Ig z zestawami OptiView DAB IHC Detection Kit i OptiView Amplification Kit w automacie BenchMark XT

Rodzaj procedury	Metoda
Opcja synchronizacji IHC	Wybrana*
Odfarbinowanie	Wybrana
Kondycjonowanie komórek (odslanianie antygenu)	Cell Conditioning 1, 92 minuty, 100°C
Inhibitor peroksydazy przed przeciwciałem pierwszorzędowym	Wybrana
Przeciwciało (pierwotne)	Ventana anti-ALK (D5F3) lub Rabbit Mono Neg 16 minut, 37°C
OptiView HQ Univ Linker	12 minut
OptiView HRP Multimer	12 minut
OptiView Amplification	Wybrana
OV AMP H2O2, OV Amplifier	8 minut
OV AMP Multimer	8 minut
Barwienie kontrastowe	Hematoxylin II, 4 minuty
Po barwieniu kontrastowym	Bluing, 4 minuty

* Ten etap (z metodą do wyboru) można stosować tylko wówczas, gdy używa się oprogramowania XT OptiView DAB ver. 4. Nie jest on dostępny w poprzednich wersjach oprogramowania.

Tabela 3. Zalecany protokół barwienia dla testu z zastosowaniem przeciwciała VENTANA anti-ALK (D5F3) i Rabbit Monoclonal Negative Control Ig z zestawami OptiView DAB IHC Detection Kit i OptiView Amplification Kit w automacie BenchMark GX.

Rodzaj procedury	Metoda
Odfarbinowanie	Wybrana
Kondycjonowanie komórek (odslanianie antygenu)	Cell Conditioning 1, 92 minuty, 100°C
Inhibitor peroksydazy przed przeciwciałem pierwszorzędowym	Wybrana
Przeciwciało (pierwotne)	Ventana anti-ALK (D5F3) lub Rabbit Mono Neg, 16 minut, 37°C
OptiView HQ Univ Linker	12 minut
OptiView HRP Multimer	12 minut
OptiView Amplification	Wybrana
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 utrwalań i obróbki tkanek, jak również zmienność między poszczególnymi urządzeniami i warunkami środowiska laboratoryjnego, konieczne może być wydłużenie lub skrócenie czasu inkubacji przeciwciała pierwotnego i kondycjonowania komórek (cell conditioning) lub ich wstępnej obróbki proteazą, zależnie od próbki, zastosowanej metody detekcji i preferencji użytkownika. Więcej informacji na temat zmiennych związanych z utrwalaaniem można znaleźć w pracy „Immunohistochemistry Principles and Advances” (Podstawy i postępy immunohistochemii).²⁶

KONTROLA

PROCEDURY KONTROLI JAKOŚCI

Rabbit Monoclonal Negative Control Ig

Z każdą próbką należy stosować odpowiedni preparat do kontroli negatywnej, co pozwala uzupełnić interpretację wyników. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (nr kat 790-4795 / 06683380001), odczynnik do kontroli negatywnej z użyciem przeciwciała, jest specjalnie dostosowany do przedmiotowego testu i stosowany zamiast przeciwciała pierwotnego, co umożliwi ocenę barwienia nieswoistego. Procedura wybarwienia z użyciem odczynnika do kontroli negatywnej powinna trwać tyle, ile wynosi czas inkubacji z przeciwciałem pierwotnym. Użycie innego odczynnika do kontroli negatywnej lub posłuszenie się niezalecanym odczynnikiem do kontroli negatywnej może dać fałszywe wyniki.

Kontrole na poziomie systemowym

Równocześnie z próbkami pochodzącymi od pacjentów należy oznaczać kontrole na poziomie systemowym. Można w tym celu stosować preparaty ludzkiego wyrostka robaczkowego²⁶ lub znane próbki tkanek NSCLC z pozytywnym/negatywnym statusem ALK. Tkanki kontrolne powinny być pobrane podczas sekcji/biopsji/zabiegów chirurgicznych. Należy je jak najszybciej poddać obróbce i utwalić w identyczny sposób, jak skrawki badane. Tkanki takie pozwalają na monitorowanie wszystkich etapów analizy, od momentu przygotowania tkanki aż do barwienia. Zastosowanie skrawków tkankowych utwalonych lub przygotowanych w inny sposób niż preparaty badane zapewnia kontrolę działania wszystkich odczynników i etapów postępowania, z wyjątkiem utrwalań i przygotowania tkanek.

Kontrole tkankowe z tkanek wyrostka robaczkowego lub tkanek NSCLC o pozytywnym/negatywnym statusie ALK

W każdej procedurze barwienia testu VENTANA anti-ALK (D5F3) musi być oznaczana ALK-pozytywna i ALK-negatywna tkanka kontrolna.

Przypadki NSCLC wykazujące barwienie reprezentatywne dla wyników klinicznie pozytywnych i klinicznie negatywnych pod względem statusu ALK nadają się do stosowania w celu optymalnej kontroli jakości, w tym wykrywania nieznacznego stopnia degradacji odczynnika, a także przypadków odbiegania automatu od specyfikacji.

Tkanka ludzkiego wyrostka robaczkowego zawiera elementy wybarwiane pozytywnie i negatywnie na obecność białka ALK i może być również stosowana jako kontrola

na poziomie systemowym. Tkanki barwiące się pozytywnie używane są do potwierdzenia, że przeciwciało zostało zastosowane, a automat działa prawidłowo; tkanki wybarwiane negatywnie służą do wykrywania nieznacznego stopnia degradacji odczynnika lub przypadków odbiegania automatu od specyfikacji.

Odpowiednie barwienie elementów tkanki NSCLC pozytywnej i negatywnej pod względem statusu ALK oraz tkanki wyrostka robaczkowego opisują Tabela 4 i Tabela 5 oraz wytyczne dotyczące interpretacji Interpretation Guide for VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody w przypadku niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC) P/N 1011879.

Znane kontrole tkanek pozytywnych i negatywnych wykorzystywane do monitorowania wydajności testu ALK na próbkach pacjenta muszą być utwalane i przetwarzane w podobny sposób jak próbki pacjenta. W innym przypadku kontrole tkankowe mogą być stosowane wyłącznie do monitorowania prawidłowego działania odczynników testu. Kontrole tkankowe nie powinny być stosowane jako uzupełnienie w diagnostyce próbek pacjenta.

Weryfikacja oznaczenia

Przed pierwszym użyciem przeciwciał lub systemu barwienia w procedurze diagnostycznej należy zweryfikować swoistość przeciwciał w drodze testów na szeregu tkanek o znanej charakterystyce IHC stanowiących pozytywną i negatywną kontrolę ALK (zob. Procedury kontroli jakości opisane wcześniej w tej sekcji ulotki oraz zalecenia College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program w zakresie kontroli jakości, dokument Anatomic Pathology Checklist²⁷ (Lista kontrolna anatomopatologii) lub CLSI Approved Guideline²⁸). Te procedury kontroli jakości należy powtarzać dla każdej nowej partii przeciwciała lub za każdym razem, gdy następuje zmiana parametrów testu. Do weryfikacji testu odpowiednie są tkanki NSCLC o znanym statusie ALK lub tkanki ludzkiego wyrostka robaczkowego.

INTERPRETACJA WYNIKÓW

Zautomatyzowana procedura barwienia immunologicznego firmy VENTANA prowadzi do wytrącenia się brązowego (DAB) produktu reakcji w miejscach występowania antygenów zlokalizowanych przez przeciwciało VENTANA anti-ALK (D5F3). Przed przystąpieniem do interpretacji wyników wykwalifikowany histopatolog z doświadczeniem w procedurach IHC musi dokonać oceny odczynników do kontroli negatywnej oraz odczynników do kontroli na poziomie systemowym i zatwierdzić wybarwiony preparat do badania.

Kontrole pozytywne/negatywne tkanek na poziomie systemowym

Należy ocenić wybarwione pozytywne i negatywne kontrole tkankowe w celu upewnienia się, że wszystkie odczynniki działają prawidłowo. Obecność odpowiednio zabarwionego produktu reakcji w pozytywnej kontroli tkankowej w obrębie cytoplazmy docelowych komórek wskazuje na reaktywność pozytywną.

Jeżeli nie udaje się potwierdzić poprawnego wybarwienia w preparatach pozytywnych lub negatywnych kontroli tkankowych albo ich kliniczna interpretacja diagnostyczna będzie odmienna, wszystkie wyniki oceny badanych próbek należy uznać za nieważne.

Tabela 4. Kryteria oceny tkanki kontrolnej wyrostka robaczkowego. Reprezentatywne obrazy przedstawiono w wytycznych dotyczących interpretacji Interpretation Guide for VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody w przypadku niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC) P/N 1011879.

Dopuszczalne	Niedopuszczalne
Silny ziarnisty odczyn cytoplazmatyczny w komórkach zwojowych (patrz uwaga)	Brak silnego ziarnistego odczynu cytoplazmatycznego w komórkach zwojowych
Brak silnego ziarnistego odczynu cytoplazmatycznego w komórkach nabłonka gruczołowego, w tkance mięśniowej i limfatycznej (w skupiskach komórek limfoidalnych można obserwować słabo wybarwione lub nieliczne wybarwione komórki układu limforetikularnego)	Nadmierne, nieswoiste wybarwienie tła komórek nabłonka gruczołowego, tkanki mięśniowej lub limfatycznej przeszkadzające w ocenie wyników

Uwaga: Nenny w warstwie mięśniowej wyrostka robaczkowego wykazują barwienie pozytywne.

Odczynnik do kontroli ujemnej

Barwienie nieswoiste, jeżeli występuje, ma wygląd rozproszony i można je ocenić przy użyciu preparatu do kontroli negatywnej barwionego odczynnikiem Rabbit Monoclonal

Negative Control Ig. W celu interpretacji wyników barwienia należy posłużyć się nienaruszonymi komórkami; komórki nekrotyczne lub zdegenerowane często barwią się nieswoiście. Jeśli barwienie tła jest nadmierne, wyniki oceny preparatów testowych należy uznać za nieważne. Przykłady barwienia tła na akceptowalnym poziomie dla tego testu podano w wytycznych dotyczących interpretacji oceny VENTANA ALK Scoring Interpretation Guide w przypadku niedrobnokomórkowego raka płuc P/N 1011879.

Tkanka pobrana od pacjenta

Tkanka pacjenta musi być oceniona według algorytmu oceny testu VENTANA anti-ALK (D5F3), który zawiera Tabela 5. Patrz wytyczne dotyczące interpretacji Interpretation Guide for VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody w przypadku niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC) P/N 1011879.

Tabela 5. Algorytm oceny dla testu VENTANA anti-ALK (D5F3). Reprezentatywne obrazy przedstawiono w wytycznych dotyczących interpretacji Interpretation Guide for VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody w przypadku niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC) P/N 1011879.

Interpretacja kliniczna	Opis barwienia
Wynik ALK- pozytywny	Silny ziarnisty odczyn cytoplazmatyczny w komórkach nowotworowych (dowolny odsetek pozytywnych komórek nowotworowych). Należy wykluczyć pewne elementy barwienia, takie jak: <ul style="list-style-type: none"> jasne kropki w cytoplazmie makrofagów pęcherzyków płucnych, komórki pochodzenia nerwowego (komórki nerwowe i zwojowe), barwienie nabłonka gruczołowego roziane komórki tkanki limforetikularnej z naciekami limfocytarnymi. Pewien stopień barwienia tła można zaobserwować także w obrębie prawidłowej błony śluzowej (także mucyny) w wycinkach NSCLC oraz w martwiczych obszarach nowotworu, które także należy wykluczyć z oceny klinicznej.
Wynik ALK- negatywny	Brak silnego ziarnistego odczynu cytoplazmatycznego w komórkach nowotworowych.

OGRANICZENIA OGÓLNE

- Analiza immunohistochemiczna jest wieloetapowym procesem diagnostycznym, wymagającym specjalistycznego przeszkolenia w doborze odpowiednich odczynników, wyborze tkanek, sposobach utwalania i obróbki tkanek, przygotowaniu preparatu IHC i interpretacji wyników barwienia.
- Wybarwienie tkanek zależy od traktowania i przygotowania tkanek przed barwieniem. Nieprawidłowe utwalanie, zamrażanie, rozmrażanie, przemywanie, suszenie, ogrzewanie, skrawanie lub zanieczyszczenie domieszką innych tkanek albo płynów może powodować artefakty, przechwytywanie przeciwciała lub wyniki fałszywie ujemne. Niespójne wyniki mogą być konsekwencją zmian w metodach utwalania i zatapiania albo wynikać z nieprawidłowości samej tkanki.
- Nadmierne lub niecałkowite barwienie kontrastowe może utrudniać prawidłową interpretację wyników.
- Interpretację kliniczną dodatniego lub ujemnego wyniku trzeba prowadzić w kontekście historii klinicznej, morfologii i innych kryteriów histopatologicznych. Interpretacja kliniczna każdego barwienia pozytywnego lub jego braku musi być uzupełniona badaniami morfologicznymi, oznaczeniem odpowiednich kontroli na poziomie systemowym i innymi badaniami diagnostycznymi. Do obowiązków wykwalifikowanego histopatologa należy zapoznanie się z rodzajami przeciwciał, odczynników i metodami interpretacji wybarwionych preparatów. Barwienie należy wykonać w akredytowanej pracowni histopatologicznej, pod nadzorem histopatologa odpowiedzialnego za przeglądanie i ocenę wybarwionych preparatów oraz właściwe wykonanie pozytywnych i negatywnych prób kontrolnych.
- Firma Ventana Medical Systems, Inc. udostępnia przeciwciała i odczynniki w rozcieńczeniu optymalnym, pod warunkiem przestrzegania dostarczonej instrukcji. Wszelkie odstępstwa od zalecanych procedur wykonywania testów mogą spowodować unieważnienie oczekiwanych wyników. Należy oznaczyć i udokumentować odpowiednie kontrole. Użytkownicy stosujący procedury

odbiągające od zalecanych odpowiadają za interpretację wyników badania próbek pochodzących od pacjenta.

- Niniejszy produkt nie jest przeznaczony do użycia w cytometrii przepływowej; jego charakterystyka działania w takim zastosowaniu nie została określona.
- W tkankach, których uprzednio nie przetestowano, odczynniki mogą wykazywać nieoczekiwane reakcje. Nie można wykluczyć wystąpienia nieoczekiwanych reakcji w przetestowanych grupach tkanek z uwagi na zmienność biologiczną ekspresji antygenów w tkankach nowotworów i innych tkankach zmienionych chorobowo.²⁹
- Tkanki pochodzące od osób z zakażeniem wirusem zapalenia wątroby typu B i zawierające antygen powierzchniowy wirusa zapalenia wątroby typu B (HBsAg) mogą wykazywać nieswoiste barwienie w reakcji z peroksydazą chrzanową.³⁰
- Wiązanie białek lub produktów reakcji na drodze mechanizmów innych niż immunologiczne, może być przyczyną wyników fałszywie pozytywnych. Wyniki fałszywie pozytywne mogą również wystąpić na skutek aktywności podobnej do peroksydazy (erytrocyty) i aktywności endogennej peroksydazy (cytochrom C) lub endogennej biotyny (np. wątroba, mózg, sutek, nerka) - w zależności od typu zastosowanego barwnika immunologicznego.³¹
- Tak jak we wszystkich testach IHC, wynik negatywny oznacza, że nie wykryto antygeny, nie zaś jego brak w badanych komórkach lub tkankach.

OGRANICZENIA SZCZEGÓLNE

- Test z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) zoptymalizowano do stosowania w automatach BenchMark IHC/ISH wraz z zestawem OptiView DAB IHC Detection Kit dla 16-minutowego czasu inkubacji z przeciwciałem pierwotnym przy wyborze opcji protokołu OptiView Amplification.
- Do barwienia próbki tkanek pacjenta należy użyć odczynnika Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (nr kat. 790-4795 / 06683380001). Inne odczynniki do kontroli negatywnej nie nadają się do tego testu.
- Test nie został zatwierdzony do stosowania z wymazami cytologicznymi ani próbkami odwapnionymi.
- Barwienie tkanek pochodzących od pacjenta należy przeprowadzić w ciągu trzech miesięcy od wycięcia skrawków z bloku tkankowego. Obserwowano utratę skuteczności barwienia dla testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) w przypadku użycia skrawków, które przechowywano w temperaturze pokojowej przez ponad trzy miesiące.
- Firma Ventana zaleca utrwalanie próbek przez co najmniej sześć godzin w 10% NBF lub w formalinie z dodatkiem cynku. Zastosowanie innego niż zalecany czasu utrwalania lub rodzaju utwalacza może prowadzić do wyników fałszywie negatywnych. Wykazano, że utwalacze takie jak AFA, PREFER, B5 i inne utwalacze na bazie kwasu lub alkoholu prowadzą do utraty swoistego barwienia białka ALK. Więcej informacji podano w wytycznych dotyczących interpretacji Interpretation Guide for VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody w przypadku niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC) P/N 1011879.
- Obserwowano pewne artefakty barwienia podczas badania z użyciem testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3). Zarówno w preparatach poddawanych działaniu przeciwciał anti-ALK, jak i działaniu odczynnika do kontroli negatywnej obserwowano w makrofagach pęcherzyków płucnych słabe ziarniste wybarwienie w cytoplazmie, co wskazuje, że jest to artefakt systemu detekcyjnego, którego nie należy interpretować jako pozytywnego barwienia przeciwciałami anti-ALK. Obserwowano ponadto punktowe barwienie w martwiczych rejonach guza, które również należy ignorować podczas oceny próbek pochodzących od pacjenta. Przy użyciu testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) obserwowano barwienie tkanki nerwowej, w tym nerwów, i obecność nielicznych komórek tkanki limforetikularnej w nacieku limfocytarnym. Więcej informacji podano w wytycznych dotyczących interpretacji Interpretation Guide for VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody w przypadku niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC) P/N 1011879.
- W tkankach kontrolnych można obserwować pewną zmienność intensywności barwienia związaną z zastosowaniem zestawu OptiView Amplification Kit. Przykłady zadowalającego wyniku barwienia zawiera instrukcja Interpretation Guide.

ROZWIĄZYWANIE PROBLEMÓW

W przypadku stwierdzenia nieprawidłowego wybarwienia preparatów zawierających tkanki ludzkiego NSCLC lub wyrostka robaczkowego do kontroli na poziomie systemowym albo próbki pochodzące od pacjenta należy sprawdzić, czy przestrzegano odpowiednich procedur konserwacji automatu BenchMark ULTRA, BenchMark XT lub BenchMark GX. Jeśli

użytkownik nie zauważy żadnych odchyżeń ani problemów technicznych, przed ponownym oznaczeniem należy skontaktować się z miejscowym przedstawicielem serwisu.

CHARAKTERYSTYKA WYNIKÓW

Swoistość i czułość analityczną oznaczono w drodze barwienia wielu próbek zdrowej i nowotworowej tkanki ludzkiej w teście z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3). Wyniki wymieniono w Tabeli 6 i Tabeli 7.

Swoistość

Tabela 6. Swoistość/czułość testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) w zdrowych tkankach. Badanie utwralonych w formalinie i zatopionych w parafinie próbek zdrowych tkanek.

Tkanka	Liczba pozytywnych/wszystkich przypadków	Tkanka	Liczba pozytywnych/wszystkich przypadków
Mózg	0/3*	Grasica	0/3
Mózdzek	0/3	Szpik kostny	0/3
Nadnercze	0/3	Płuco	0/3
Jajnik	0/3	Serce	0/3
Trzustka	0/3	Przełyk	0/3
Przytarczycy	0/3	Żołądek	0/3
Przysadka	0/3**	Jelito cienkie	0/3***
Jądra	0/3	Okreźnica	0/3***
Tarczycyca	0/3	Wątroba	0/3
Sutek	0/3	Ślinianka	0/3
Śledziona	0/3	Nerka	0/3
Migdalek	0/3	Gruczoł krokowy	0/3
Endometrium	0/3	Szyjka macicy	0/3
Mięśnie szkieletowe	0/4	Skóra	0/3
Nerwy (nieliczne)	0/3	Mezotelium i płuco	0/3

* 2/3 Dla niewielkiej liczby komórek glejowych w mózdzku zaobserwowano odczyn pozytywny o intensywności słabej do średniej.

** 3/3 Przysadka wybarwiała się słabo.

*** Komórki zwojowe w 4/6 przypadków tkanek jelita wybarwiała się pozytywnie w teście statusu ALK z różną intensywnością.

Czułość

Tabela 7. Swoistość/czułość testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) w tkankach nowotworowych. Badanie utwralonych w formalinie i zatopionych w parafinie próbek różnych tkanek nowotworowych.

Nowotwór	Liczba pozytywnych/wszystkich przypadków
Glejak	0/1
Oponiak atypowy	0/1
Wyściółczak złośliwy	0/1
Skąpodrzewiak złośliwy	0/1
Surowiczny gruczolakorak jajnika	1/1

Nowotwór	Liczba pozytywnych/wszystkich przypadków
Gruzołakorak jajnika	0/1
Rak z komórek wysp trzustki (wyspiak)	0/1
Gruzołakorak trzustki	0/1
Nasieniak	0/1
Rak zarodkowy	0/1
Rak rdzeniasty tarczycy	0/1
Rak brodawkowy	0/1
Rak wewnątrzprzewodowy sutka	0/1
Inwazyjny rak przewodowy sutka	0/2
Chłoniak rozlany z limfocytów B	0/3
Niskozróżnicowany rak drobnokomórkowy płuca	0/1
Rak płaskonabłonkowy płuca	0/1
Gruzołakorak płuca	0/1
Rak płaskonabłonkowy przełyku	0/1
Gruzołakorak przełyku	0/1
Gruzołakorak śluzowy żołądka	0/1
Gruzołakorak przewodu pokarmowego	0/1
Nowotwór złośliwy z komórek śródmiażdżowych (guz podścieliskowy)	0/1
Gruzołakorak odbytnicy	0/1
Złośliwy guz podścieliskowy odbytnicy	0/1
Rak wątrobowokomórkowy	0/1
Wątrobiak zarodkowy	1/1
Rak jasnokomórkowy nerek	0/1
Gruzołakorak gruczołu krokowego	0/2
Mięśniak gładkokomórkowy	0/1
Rak gruczołowy endometrium	0/1
Rak jasnokomórkowy endometrium	0/1
Rak płaskonabłonkowy macicy	0/2
Mięśniakomięsak prążkowany zarodkowy	0/1
Czerniak złośliwy odbytu	0/1
Rak podstawnokomórkowy	0/1
Rak płaskonabłonkowy	0/1
Nerwiakówłókniak	0/1
Nerwiak zarodkowy przestrzeni zaotrzewnowej	1/1
Międzybłoniak złośliwy	0/1
Chłoniak Hodgkina (ziarnica złośliwa)	0/1

Nowotwór	Liczba pozytywnych/wszystkich przypadków
Chłoniak anaplastyczny wielkokomórkowy	0/1
Rak przejściowokomórkowy pęcherza moczowego	0/1
Mięsak gładkokomórkowy o niskim stopniu złośliwości	0/1
Kostniakomięsak	0/1
Mięśniakomięsak z komórek wrzecionowatych	0/1
Mięsak gładkokomórkowy o umiarkowanym stopniu złośliwości	0/1

Zgodność międzyplatformowa (badanie pomostowe)

Test z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) był początkowo przeznaczony do automatów BenchMark XT i GX. Aby wykazać równoważność działania testu pomiędzy automatami BenchMark ULTRA i BenchMark XT, przeprowadzono badanie pomostowe. W badaniu oceniano status kliniczny ALK (na podstawie algorytmu oceniania statusu ALK podanego w Tabeli 5) w 184 różnych próbkach tkanek NSCLC wybarwionych przy użyciu testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) na obu platformach. Powstałe wybarwione preparaty zostały przebadane przez trzech histopatologów metodą ślepej próby i po randomizacji. Wyniki dotyczące zgodności międzyplatformowej w tym badaniu zawiera Tabela 8 i Tabela 9.

Tabela 8. Wyniki dotyczące zgodności między automatami BenchMark XT i BenchMark ULTRA.

Zgodność wyników testu VENTANA anti-ALK (D5F3) pomiędzy automatami BenchMark ULTRA i BenchMark XT			
BenchMark ULTRA	BenchMark XT		Ogółem
	Wynik pozytywny	Wynik negatywny	
Wynik pozytywny	85	1	86
Wynik negatywny	1	97	98
Ogółem	86	98	184

Tabela 9. Zgodność stwierdzonego statusu ALK między automatami BenchMark XT i BenchMark ULTRA.

Stopnie zgodności międzyplatformowej	Procentowa zgodność wyników pozytywnych (95% CI)	Procentowa zgodność wyników negatywnych (95% CI)	Całkowita zgodność procentowa (95% CI)
Zgodność wyników pomiędzy automatami 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 oceniono przy użyciu tkanek z czterech różnych przypadków ludzkiego NSCLC (trzy o pozytywnym statusie ALK i jeden o negatywnym statusie ALK) oraz czterech różnych tkanek ludzkiego wyrostka robaczkowego. Tkanki cięto i badano w powtórzeniu przy 3, 4, 5, 6 i 7 mikronach. Dla wszystkich grubości tkanki wykazano odpowiednie swoiste barwienie dla ALK i odpowiednie poziomy tła przy użyciu testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3). W żadnym ze skrawków w tym zakresie grubości nie wykazano zmiany statusu klinicznego ALK. Firma Ventana zaleca, aby próbki cięte do testu miały grubość 4-6 mikronów.

Badania powtarzalności i precyzji pośredniej

Powtarzalność i precyzję pośrednią testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) oceniono na automatach BenchMark ULTRA, XT i GX wraz z zestawem do wykrywania OptiView DAB IHC Detection oraz zestawem OptiView Amplification Kit.

Dziesięć różnych próbek tkanki NSCLC (pięć o pozytywnym statusie ALK i pięć o negatywnym statusie ALK) oceniono na automatach BenchMark XT i BenchMark ULTRA. Aby zbadać precyzję w ciągu dnia, pięć powtórzeń preparatów z każdej próbki NSCLC barwiono na jednym automacie BenchMark XT lub jednym automacie BenchMark ULTRA. Aby zbadać precyzję w ramach tego samego automatu, przeprowadzono barwienie trzech powtórzeń preparatów pochodzących z każdej z próbek NSCLC przy użyciu testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) na trzech automatach BenchMark XT, oraz barwienie dwóch powtórzeń preparatów pochodzących z każdej z próbek NSCLC na trzech automatach BenchMark ULTRA. Aby zbadać precyzję między dniami, dwa powtórzenia preparatów z każdej próbki NSCLC barwiono za pomocą testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) na jednym automacie BenchMark XT lub BenchMark ULTRA przez pięć nienastępujących po sobie dni.

W każdej kohorcie tkanek dla danego automatu preparaty zostały zrandomizowane, a badacze nie znali ich statusu. Każdą kohortę oceniał oddzielnie histopatolog, stosując algorytm oceny dla testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) (zawiera go Tabela 5). Dla każdej repliki wycinka NSCLC uzyskano równoważne wyniki barwienia w teście IHC statusu ALK. Podsumowanie wyników dotyczących powtarzalności i precyzji pośredniej dla automatów BenchMark XT i BenchMark ULTRA zawierają odpowiednio Tabela 10 i Tabela 11.

Badanie międzyplatformowe przeprowadzono poprzez porównanie wyników uzyskanych z użyciem testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) na automatach BenchMark XT i BenchMark GX. W tym badaniu oceniano dwa zestawy wielotkankowe zawierające po osiem próbek NSCLC (trzy o pozytywnym statusie ALK i jedna o negatywnym statusie ALK w każdym bloku). Do celów tego porównania 5 powtórzeń preparatów wybarwiono na trzech automatach BenchMark XT i trzech automatach BenchMark GX. Preparaty te oceniono pod kątem odpowiedniego wybarwienia na podstawie algorytmu oceny immunohistochemicznej VENTANA anti-ALK (D5F3), który przedstawia Tabela 5. Dla każdej repliki wycinka NSCLC uzyskano równoważne pomiędzy obiema platformami wyniki barwienia w teście IHC statusu ALK. Podsumowanie wyników zawiera Tabela 12.

Dodatkowo oceniono również powtarzalność barwienia w teście z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) na komórkach ludzkiego wyrostka robaczkowego (kontrola na poziomie systemowym). Do tego badania zastosowano osiem różnych tkanek ludzkiego wyrostka robaczkowego. Aby zbadać precyzję w ciągu dnia, 13 powtórzeń preparatów z dwóch zestawów wielotkankowych zawierających po cztery próbki tkanek wyrostka robaczkowego barwiono na jednym automacie BenchMark XT. Aby zbadać precyzję między automatami, pięć powtórzeń preparatów z dwóch zestawów wielotkankowych zawierających po cztery próbki tkanek wyrostka robaczkowego barwiono przy użyciu testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) na trzech automatach do barwienia BenchMark XT. Aby zbadać precyzję między dniami, pięć powtórzeń preparatów z każdego z dwóch zestawów wielotkankowych zawierających po cztery próbki tkanek wyrostka robaczkowego barwiono za pomocą testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) na jednym automacie BenchMark XT przez pięć nienastępujących po sobie dni. Wszystkie preparaty oceniał histopatolog przy użyciu wytycznych dotyczących punktacji dla testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) (podanych w Tabeli 4). Dla każdej repliki próbki wyrostka robaczkowego uzyskano równoważne wyniki barwienia w teście IHC statusu ALK. Całkowita zgodność procentowa dla powtarzalności w ciągu dnia i między automatami (dla trzech automatów) wynosiła 100%, zaś dla powtarzalności między dniami (przez pięć nienastępujących po sobie dni) wynosiła 98%.

Tabela 10. Badanie powtarzalności i precyzji pośredniej testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) na poszczególnych próbkach NSCLC barwionych w automacie BenchMark XT.

Powtarzalność/precyzja dla tkanki NSCLC	N = Całkowita liczba preparatów ocenionych w kohorcie	Całkowita zgodność procentowa dla statusu ALK (przedział ufności 95%)
Powtarzalność w ciągu dnia	50	100% (97,5-100%)
Precyzja w ramach platformy (na trzech automatach BenchMark XT)	60	100% (97,9-100%)
Precyzja między dniami (pięć nienastępujących po sobie dni)	100	100% (98,7-100%)

Tabela 11. Badanie powtarzalności i precyzji pośredniej testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) na poszczególnych próbkach NSCLC w automacie BenchMark ULTRA.

Powtarzalność/precyzja dla tkanki NSCLC	N = Całkowita liczba preparatów ocenionych w kohorcie	Całkowita zgodność procentowa dla statusu ALK (przedział ufności 95%)
Powtarzalność w ciągu dnia	50	100% (92,9-100,0%)
Precyzja w ramach platformy (na trzech automatach BenchMark ULTRA)	60	100% (94,0-100,0%)
Precyzja między dniami (pięć nienastępujących po sobie dni)	100	100% (96,3-100,0%)

Tabela 12. Badanie precyzji międzyplatformowej testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) na próbkach NSCLC z zestawu wielotkankowego w automatach BenchMark XT i BenchMark GX.

Precyzja dla tkanki NSCLC	N = Całkowita liczba preparatów ocenionych w kohorcie	Całkowita zgodność procentowa dla statusu ALK
Precyzja międzyplatformowa - porównanie automatu BenchMark XT z BenchMark GX (dla trzech automatów)	30	100%

Odtwarzalność między partiami produktu

Odtwarzalność między partiami testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) określono przez badanie trzech partii testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) na 38 różnych przypadkach NSCLC (21 próbek tkanek NSCLC z pozytywnym statusem ALK (spośród 18 różnych przypadków) i 20 z negatywnym statusem ALK) na automacie BenchMark XT, z wykorzystaniem zestawu do wykrywania OptiView DAB IHC Detection i zestawu OptiView Amplification Kit. Wszystkie przypadki barwiono w powtórzeniu za pomocą każdej z trzech partii przeciwciała pierwotnego. Status kliniczny preparatów oceniło trzech histopatologów metodą ślepej próby i po randomizacji, przy użyciu algorytmu oceny testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) (który zawiera Tabela 5). Dla wszystkich trzech partii przeciwciała wykazano ponad 90% zgodność wyników barwienia pod względem statusu ALK dla 41 ocenianych próbek tkanek NSCLC. Wyniki przedstawiono jako współczynniki całkowitej zgodności procentowej, średniej zgodności wyników pozytywnych i średniej zgodności wyników negatywnych. Współczynnik całkowitej zgodności procentowej pomiędzy partiami wynosił 99,2%, zatem wyniki uzyskane

w teście z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) są odtwarzalne, jeśli chodzi o wyniki barwienia dla poszczególnych partii przeciwciał. Wyniki zawiera Tabela 13. Odtwarzalność między partiami testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) określono przez badanie trzech partii testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) na 30 różnych przypadkach NSCLC (15 próbek tkanek NSCLC z pozytywnym statusem ALK i 15 z negatywnym statusem ALK) na automacie BenchMark ULTRA z wykorzystaniem zestawu do wykrywania OptiView DAB IHC Detection i zestawu OptiView Amplification Kit. Wszystkie przypadki barwiono w powtórzeniu za pomocą każdej z trzech partii przeciwciała pierwotnego. Status kliniczny preparatów oceniał histopatolog metodą ślepej próby i po randomizacji, przy użyciu algorytmu oceny testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) (który zawiera Tabela 5). Dla wszystkich trzech partii przeciwciała wykazano ponad 90% zgodność wyników barwienia pod względem statusu ALK dla 30 ocenianych próbek tkanek NSCLC. Wyniki przedstawiono jako współczynniki całkowitej zgodności procentowej, średniej zgodności wyników pozytywnych i średniej zgodności wyników negatywnych. Współczynnik całkowitej zgodności procentowej pomiędzy partiami wynosił 99,1%, zatem wyniki uzyskane w teście z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) są odtwarzalne, jeśli chodzi o wyniki barwienia dla poszczególnych partii przeciwciał. Wyniki zawiera Tabela 14.

Odtwarzalność między partiami testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) oceniono również przy użyciu 12 różnych próbek tkanki ludzkiego wyrostka robaczkowego. Odtwarzalność określono, badając trzy serie przeciwciała w skojarzeniu z trzema partiami zestawu do wykrywania OptiView DAB IHC Detection Kit i zestawu do amplifikacji OptiView Amplification Kit na trzech automatach do barwienia BenchMark XT. Współczynnik zgodności całkowitej dla odpowiednich elementów barwienia pozytywnego i negatywnego wyrostka robaczkowego przy użyciu testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) wynosił 100%.

Tabela 13. Współczynniki zgodności odtwarzalności między partiami produktu na 41 próbkach tkanek NSCLC badanych w automacie BenchMark XT. Przebadano 21 próbek o pozytywnym statusie ALK (z 18 różnych przypadków) i 20 próbek o negatywnym statusie ALK.

Współczynniki zgodności odtwarzalności między partiami produktu	Średnia zgodność wyników pozytywnych (95% CI)	Średnia zgodność wyników negatywnych (95% CI)	Całkowita zgodność procentowa (95% CI)
Średnia porównania wszystkich trzech serii	99,2% (97,4-100%)	99,1% (96,8-100,0%)	99,2% (97,5-100%)

Tabela 14. Współczynniki zgodności odtwarzalności między partiami produktu na 30 próbkach tkanek NSCLC badanych w automacie BenchMark ULTRA. Przebadano 15 próbek o pozytywnym statusie ALK i 15 próbek o negatywnym statusie ALK.

Współczynniki zgodności odtwarzalności między partiami produktu	Procentowa zgodność wyników pozytywnych (95% CI)	Procentowa zgodność wyników negatywnych (95% CI)	Całkowita zgodność procentowa (95% CI)
Średnia porównania wszystkich trzech serii	98,9% (96,8-99,6%)	99,3% (97,3-99,8%)	99,1% (97,9-99,6%)

Wyniki oceny precyzji pomiędzy diagnostami

Przeprowadzono kilka badań precyzji pomiędzy diagnostami: dwa na automacie BenchMark XT i jedno na automacie BenchMark ULTRA.

W badaniu precyzji pomiędzy diagnostami na automacie BenchMark XT trzech histopatologów oceniali łącznie 185 różnych przypadków. Badanym 185 przypadkom odpowiadało 100 bloków o pozytywnym statusie ALK i 100 bloków o negatywnym statusie ALK barwionych za pomocą testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3). Przypadki oceniono metodą ślepej próby i po randomizacji pod kątem barwienia w teście IHC statusu ALK za pomocą algorytmu oceny testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3), który zawiera Tabela 5. Wyniki, które zawiera Tabela 5 poniżej, odzwierciedlają współczynniki precyzji pomiędzy diagnostami dla różnych przypadków z kohorty badania.

Tabela 15. Badanie precyzji pomiędzy diagnostami 1 na automacie BenchMark XT.

Precyzja pomiędzy diagnostami	Średnia zgodność wyników pozytywnych (95% CI)	Średnia zgodność wyników negatywnych (95% CI)	Całkowita zgodność procentowa (95% CI)
Średnia dla porównań dla wszystkich trzech diagnostów	98,8% (97,3-100%)	99,0% (97,7-100%)	98,9% (97,4-100%)

Badanie precyzji pomiędzy diagnostami 2 na automacie BenchMark XT wykonano dla kohorty przypadków pochodzących z randomizowanego badania klinicznego próbek NSCLC o pozytywnym statusie ALK pochodzących od pacjentów, zbadanych przy użyciu zestawu Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit. Próbkę z około 300 przypadków wybarwiono za pomocą testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) w automacie BenchMark XT. Zrandomizowane wycinki zostały udostępnione trzem diagnostom, którzy oceniali wyniki wybarwienia ALK IHC za pomocą algorytmu oceny testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) (Tabela 5), nie znając wcześniejszych rezultatów badań statusu ALK FISH. Wyniki, które zawiera Tabela 16, odzwierciedlają współczynniki precyzji pomiędzy diagnostami z tej kohorty badania klinicznego.

Do celów badania precyzji pomiędzy diagnostami na automacie BenchMark ULTRA ocenie poddano kohortę 184 różnych przypadków NSCLC. Kohorta składała się z 90 przypadków o pozytywnym statusie ALK i 94 przypadków o negatywnym statusie ALK, które wybarwiono za pomocą testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) w automacie BenchMark ULTRA. Zrandomizowane wycinki zostały udostępnione trzem diagnostom, którzy oceniali wyniki wybarwienia ALK IHC za pomocą algorytmu oceny testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) (Tabela 5), nie znając wcześniejszych rezultatów badań. Tabela 16 odzwierciedla współczynniki precyzji pomiędzy diagnostami z tego badania.

Tabela 16. Badanie precyzji pomiędzy diagnostami 2 pod kątem statusu ALK w próbkach NSCLC otrzymanych z porównania metod klinicznych; Kohorta 1 wybarwiana za pomocą testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) w automacie BenchMark XT.

Precyzja pomiędzy diagnostami	Średnia zgodność wyników pozytywnych (95% CI)	Średnia zgodność wyników negatywnych (95% CI)	Całkowita zgodność procentowa (95% CI)
Średnia dla porównań dla wszystkich trzech diagnostów	97,6% (95,0-99,5%)	99,5% (98,9-99,9%)	99,1% (98,2-99,8%)
Diagnosta 1 vs Diagnosta 2	99,1% (97,1-100%)	99,8% (99,4-100%)	99,7% (98,2-99,9%)
Diagnosta 1 vs Diagnosta 3	96,3% (92,3-99,2%)	99,2% (98,3-99,8%)	98,6% (96,6-99,5%)
Diagnosta 2 vs Diagnosta 3	97,2% (93,5-100%)	99,4% (98,6-100%)	99,0% (97,1-99,7%)

Tabela 17. Badanie precyzji pomiędzy diagnostami pod kątem statusu ALK w próbkach NSCLC wybarwianych za pomocą testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) w automacie BenchMark ULTRA.

Precyzja pomiędzy diagnostami	Średnia zgodność wyników pozytywnych (95% CI)	Średnia zgodność wyników negatywnych (95% CI)	Całkowita zgodność procentowa (95% CI)
Średnia dla wszystkich trzech diagnostów	98,4% (96,5-99,6%)	98,6% (96,9-99,7%)	98,5% (96,7-99,6%)
Diagnosta 1 vs Diagnosta 2	98,9% (96,8-100%)	98,9% (97,0-100%)	98,9% (96,0-99,7%)
Diagnosta 1 vs Diagnosta 3	98,8% (96,7-100%)	99,0% (97,2-100%)	98,9% (96,0-99,7%)
Diagnosta 2 vs Diagnosta 3	97,6% (94,7-99,4%)	97,9% (95,4-99,5%)	97,8% (94,4-99,1%)

Zgodność z testem FISH statusu ALK

Porównano wyniki barwienia preparatem VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody z wynikami testu FISH pod względem statusu klinicznego ALK w trzech kohortach. Kohorty obejmowały szereg preparatów tkankowych ludzkiego NSCLC z guzów pierwotnych i przerzutowych, w tym wycinki usunięte chirurgicznie, biopłaty igłowe, biopłaty z oskrzeli, a także utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie (FFPE) błoczki cytologiczne (pobrane metodą cienkoigłową). Wszystkie badania oceniano, korzystając z algorytmu oceny (opisanego w Tabeli 5).

Badanie zgodności 1

W zewnętrznym laboratorium przeprowadzono badanie, w którym porównano działanie testu VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody z danymi retrospektywnymi dotyczącymi zestawu Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit. W tym ośrodku zewnętrznym wykonano barwienie próbek z około 100 przypadków NSCLC przy użyciu testu VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody w automacie BenchMark XT. Przy użyciu w tej kohorcie próbek NSCLC testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) wykazano >98% całkowitą zgodność procentową z danymi retrospektywnymi dotyczącymi badań prowadzonych z użyciem zestawu Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit. Szczegółowe wyniki zawiera Tabela 18 i Tabela 19. W 86 ze 100 przypadków dostępne były wyniki badań metodą FISH, a ilość tkanki nowotworowej wystarczała do przeprowadzenia porównania z wynikami testu IHC statusu ALK.

Tabela 18. Porównanie wyników badań wykonanych za pomocą testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) i zestawu Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.

Porównanie wyników badań wykonanych za pomocą testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) i zestawu Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit			
Przeciwciało VENTANA anti-ALK (D5F3)	Zestaw Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		Ogółem
	Wynik pozytywny	Wynik negatywny	
Wynik pozytywny	10	0	10
Wynik negatywny	1	75	76
Ogółem	11	75	86

Tabela 19. Procentowe współczynniki zgodności wyników pozytywnych, wyników negatywnych i wszystkich wyników ogółem w testach z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) w porównaniu z testami wykonanymi z zastosowaniem zestawu Abbott Vysis Break Apart FISH Probe Kit.

Procentowe współczynniki zgodności wyników pozytywnych, negatywnych i wszystkich wyników ogółem			
Współczynnik	n/N	%	95% CI [a]
Całkowita zgodność procentowa	85/86	98,8	93,7; 99,8
Procentowa zgodność wyników pozytywnych	10/11	90,9	62,3; 98,4
Procentowa zgodność wyników negatywnych	75/75	100,0	95,1; 100,0

[a] Dwustronny 95% przedział ufności obliczony przy użyciu metody oceny.

Sposób przygotowania preparatów tkankowych do tego badania nie został zweryfikowany jako zgodny z procedurami przygotowania zalecanymi dla tego testu.

Badanie zgodności 2

W drugim laboratorium zewnętrznym przeprowadzono badanie, w którym porównano działanie testu VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody z danymi dotyczącymi analizy 73 przypadków NSCLC (wyciętych w ciągu tygodnia od barwienia) przeprowadzonej za pomocą zestawu Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit. W tym ośrodku zewnętrznym wykonano barwienie preparatów przy użyciu testu VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody w automacie BenchMark XT. Przy użyciu w tej kohorcie próbek NSCLC testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) wykazano >93% całkowitą zgodność procentową z danymi retrospektywnymi dotyczącymi badań prowadzonych z użyciem zestawu Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit. Szczegółowe wyniki zawiera Tabela 20 i Tabela 21.

Tabela 20. Porównanie wyników badań wykonanych za pomocą testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) i zestawu Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.

Porównanie wyników badań wykonanych za pomocą testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) i zestawu Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit			
Przeciwciało VENTANA anti-ALK (D5F3)	Zestaw Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		Ogółem
	Wynik pozytywny	Wynik negatywny	
Wynik pozytywny	2	4	6
Wynik negatywny	0	56	56
Ogółem	2	60	62

Tabela 21. Procentowe współczynniki zgodności wyników pozytywnych, wyników negatywnych i wszystkich wyników ogółem w testach z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) w porównaniu z testami wykonanymi z zastosowaniem zestawu Abbott Vysis Break Apart FISH Probe Kit.

Procentowe współczynniki zgodności wyników pozytywnych, negatywnych i wszystkich wyników ogółem			
Współczynnik	n/N	%	95% CI [a]
Całkowita zgodność procentowa	58/62	93,5%	84,6-97,5
Procentowa zgodność wyników pozytywnych	2/2	100%	34,2-100,0
Procentowa zgodność wyników negatywnych	56/60	93%	84,1-97,4

[a] Dwustronny 95% przedział ufności obliczony przy użyciu metody oceny.

W przypadku czterech przypadków, dla których wyniki były rozbieżne (negatywne w teście FISH, pozytywne w teście IHC statusu ALK), przeprowadzono dodatkowe testy niebarwionych preparatów z zastosowaniem innego testu ALK (inny klon i system wykrywania). W trzech z czterech przypadków uzyskano zgodność z wynikami testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) pod względem wykrytego barwienia w teście IHC statusu ALK.

W 10 innych przypadkach wyniki testu FISH nie zostały ustalone lub test nie został przeprowadzony. W czterech z tych przypadków uzyskano pozytywny wynik barwienia w teście z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) z innym klonem ALK, a w sześciu negatywny wynik barwienia w teście IHC statusu ALK. W jednym przypadku stwierdzono pozytywne barwienie metodą FISH, ale ilość próbki była niewystarczająca do przeprowadzenia barwienia metodą immunohistochemiczną (IHC).

Badanie zgodności 3

W tym badaniu próbki z około 300 przypadków pochodzących z trwającego badania klinicznego o zasięgu globalnym prowadzonego z udziałem pacjentów z NSCLC i pozytywnym wynikiem badania pod kątem ALK, których rekrutowano na podstawie wyników testu z użyciem zestawu Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit, zostały poddane barwieniu w teście VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Antibody. Jest to ta sama kohorta, którą omawiano poprzednio w kontekście badania precyzji pomiędzy diagnostami na stronie 8 niniejszej ulotki dołączonej do opakowania. Niektóre spośród około 300 przypadków sklasyfikowano jako przypadki o niewielkiej wartości informacyjnej na podstawie wyników testu FISH albo jako przypadki, w których próby FISH nie wykonano. Te preparaty zostały wybarwione i ocenione wyłącznie w celach informacyjnych.

Wybarwione preparaty udostępnił metodą randomizacji dwóm badaczom, którzy oceniali wyniki barwienia, ale nie znali wcześniejszych rezultatów badań statusu metodą FISH. Uzyskane wyniki porównano ze statusem FISH oznaczonym w ramach wspomnianego badania klinicznego o zasięgu globalnym.

Wyniki porównania testu IHC z testem FISH statusu ALK zawiera Tabela 22 niżej.

Tabela 22. Zgodność wyników badań wykonanych przy użyciu testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) i zestawu Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit według oceny przeprowadzonej przez dwóch histopatologów.

Porównanie wyników badań wykonanych za pomocą testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) i zestawu Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit				
Przeciwciało VENTANA anti-ALK (D5F3)		Zestaw Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		Ogółem
Diagnosta		Wynik pozytywny	Wynik negatywny	
Diagnosta 1	Wynik pozytywny	37	13	50
	Wynik negatywny	11	223	234
	Ogółem	48	236	284
Diagnosta 2	Wynik pozytywny	37	12	49
	Wynik negatywny	11	225	236
	Ogółem	48	237	285

Sposób przygotowania preparatów tkankowych do tego badania nie został zweryfikowany jako zgodny z procedurami przygotowania zalecanymi dla niniejszego testu.

Przypadki rozbieżności wyników, które były pozytywne w teście z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) i negatywne w teście FISH statusu ALK:

- Cztery przypadki zostały ocenione przez co najmniej jednego diagnostę jako pozytywne w teście IHC statusu ALK, a negatywne w teście FISH. Uzgodniono, że należy je uznać za IHC-negatywne. W tych przypadkach odnotowano punktowe wybarwienie cytoplazmatyczne/blonowe i zostały one objaśnione w wytycznych dotyczących interpretacji Interpretation Guide for VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody w przypadku niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC) P/N 1011879.
- Stwierdzono dziewięć przypadków o statusie pozytywnym w teście IHC statusu ALK i statusie negatywnym w teście FISH statusu ALK, które potraktowano jako rzeczywiście rozbieżne.

Dla siedmiu z dziewięciu rozbieżnych przypadków dostępne były niebarwione preparaty, które wykorzystano w dodatkowych testach diagnostycznych ALK (testy molekularne i testy IHC z użyciem innego klonu i systemu detekcji). Podczas testów dodatkowych ujawniono, że w większości przypadków rozbieżnych lepszą metodą oceny statusu ALK było zastosowanie pozytywnej kontroli IHC, jeśli wynik testu ALK FISH był ujemny. (Należy zaznaczyć, że w tych przypadkach skrawki przygotowano po okresie dłuższym niż zalecane trzy miesiące.)

Przypadki rozbieżności wyników, które były negatywne w teście z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) i pozytywne w teście FISH statusu ALK:

- W 11 przypadkach stwierdzono wynik pozytywny w teście FISH, ale negatywny w teście z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3). Dla 10 przypadków dostępne były niebarwione preparaty, które wykorzystano w dodatkowych testach diagnostycznych statusu ALK technikami molekularnymi i metodą immunohistochemiczną. Podczas tych testów dodatkowych wykazano, że większość przypadków negatywnych dla testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) była również negatywna w innym systemie oznaczeń IHC statusu ALK, ale uzyskano wyniki pozytywne w jednym lub większej liczbie testów molekularnych. Należy zaznaczyć, że w tych przypadkach skrawki przygotowano po okresie dłuższym niż trzy miesiące, zalecanym dla testów IHC statusu ALK.

- W kohorcie stwierdzono 14 przypadków, w których test metodą FISH miał niewielką wartość informacyjną (nie udało się uzyskać żadnego wyniku). Spośród tych przypadków trzy zostały ocenione przez obydwu diagnostów jako pozytywne w teście z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3). W kolejnych 19 przypadkach wykonanie badania preparatów barwionych H&E metodą FISH było niemożliwe (zwykle ze względu na zbyt małą zawartość tkanki nowotworowej). Obydwaj badacze ocenili wyniki barwienia w teście IHC statusu ALK jako pozytywne w czterech przypadkach. Dlatego średnio w 21% przypadków, w których nie uzyskano wyników testu FISH, stwierdzono pozytywny status ALK na podstawie barwienia w teście z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3).

Badanie odtwarzalności międzylaboratoryjnej na automacie BenchMark XT

Badanie odtwarzalności międzylaboratoryjnej dla testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) przeprowadzono w celu wykazania odtwarzalności testu w określaniu statusu klinicznego ALK w automacie BenchMark XT przy użyciu próbek tkanki NSCLC (sześć o pozytywnym statusie ALK i sześć o negatywnym statusie ALK) badanych z wykorzystaniem trzech partii odczynnika i trzech automatów przez pięć nienastępujących po sobie dni w trzech laboratoriach zewnętrznych. Próbki były randomizowane i oceniane łącznie przez 6 diagnostów (2 diagnostów na ośrodek), którzy nie znali statusu klinicznego ALK próbek w kohorcie. Kohorta ta obejmowała 180 preparatów sporządzonych z tkanek 12 przypadków NSCLC o pozytywnym i negatywnym statusie ekspresji ALK w testach IHC i FISH. Preparaty te były barwione w powtórzeniach przez 21 dni w trzech laboratoriach. Wyniki zawiera Tabela 23. Współczynnik akceptowalności dla morfologii i barwienia tła w tych badaniach wynosił 100%. Badanie odtwarzalności międzylaboratoryjnej (Inter-Laboratory Reproducibility, ILR) dla testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) w automacie BenchMark XT wykazało średnią zgodność wyników pozytywnych (average positive agreement, APA) i średnią zgodność wyników negatywnych (average negative agreement, ANA) dla porównań pomiędzy ośrodkami, pomiędzy diagnostami i pomiędzy cyklami (w ciągu dnia) wykonywanych w parach z użyciem obserwacji nadających się do oceny.

Tabela 23. ILR: Współczynniki zgodności dla testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) w automacie BenchMark XT (n=180 ocenionych preparatów).

Współczynniki zgodności dla odtwarzalności międzylaboratoryjnej (status kliniczny ALK)	Średnia zgodność wyników pozytywnych (95% CI)	Średnia zgodność wyników negatywnych (95% CI)	Całkowita zgodność procentowa (95% CI)
Pomiędzy ośrodkami (trzy ośrodki)	93,8% (76,2-100%)	94,9% (79,2-100%)	94,4% (83,3-100%)
Pomiędzy dniami (pięć nienastępujących po sobie dni)	99,1% (96,4-100%)	99,2% (96,9-100%)	99,2% (97,5-100%)
Pomiędzy diagnostami (2 diagnostów/ośrodek)	98,8% (95,2-100%)	99,0% (95,8-100%)	98,9% (96,7-100%)

Badanie odtwarzalności międzylaboratoryjnej na automacie BenchMark ULTRA

Dodatkowe badanie odtwarzalności międzylaboratoryjnej dla testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) przeprowadzono w celu wykazania odtwarzalności testu w określaniu statusu klinicznego ALK na automacie BenchMark ULTRA przy użyciu próbek tkanki NSCLC (siedmiu o pozytywnym statusie ALK i siedmiu o negatywnym statusie ALK) badanych z wykorzystaniem trzech partii odczynnika i trzech automatów przez pięć nienastępujących po sobie dni w trzech laboratoriach zewnętrznych. Próbki były randomizowane i oceniane łącznie przez 6 diagnostów (2 diagnostów na ośrodek), którzy nie znali statusu klinicznego ALK próbek w kohorcie. Kohorta ta obejmowała 210 preparatów sporządzonych z tkanek 14 przypadków NSCLC o pozytywnym i negatywnym statusie ekspresji ALK w testach IHC i FISH. Preparaty te były barwione w powtórzeniach przez 21 dni w trzech laboratoriach. Wyniki zawiera Tabela 24. Współczynnik końcowej akceptowalności barwienia dla wszystkich danych łącznie wynosił 99%. Współczynniki akceptowalności dla morfologii i barwienia tła w tych badaniach wynosił 100%. Wyniki zawiera Tabela 25.

Badanie ILR testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) na automacie BenchMark ULTRA wykazało procentową zgodność wyników pozytywnych (positive percent agreement, PPA) i procentową zgodność wyników negatywnych (negative percent agreement, NPA) dla wszystkich nadających się do oceny obserwacji uzyskanych w badaniu poprzez połączenie danych ze wszystkich ośrodków, od wszystkich diagnostów i ze wszystkich dni, przy czym standardem odniesienia był wynik uzgodniony.

Tabela 24. ILR: Współczynniki zgodności dla testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) w automacie BenchMark ULTRA (n=210 ocenionych preparatów).

Współczynniki zgodności dla odtwarzalności międzylaboratoryjnej (status kliniczny ALK)	Procentowa zgodność wyników pozytywnych (95% CI)	Procentowa zgodność wyników negatywnych (95% CI)	Całkowita zgodność procentowa (95% CI)
Dla wszystkich obserwacji nadających się do oceny	92,8% (88,4; 95,6%)	100,0% (98,2; 100,0%)	96,4% (94,1; 97,8%)

Tabela 25. Odtwarzalność międzylaboratoryjna: współczynniki zgodności pomiędzy diagnostami dla testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) w automacie BenchMark ULTRA (n=210 ocenionych preparatów).

Współczynniki zgodności dla odtwarzalności międzylaboratoryjnej (status kliniczny ALK) - współczynniki zgodności pomiędzy diagnostami	Średnia zgodność wyników pozytywnych (95% CI)	Średnia zgodność wyników negatywnych (95% CI)	Całkowita zgodność procentowa (95% CI)
Diagnosta A1 vs A2	97,0% (87,5-100%)	97,3% (89,5-100%)	97,1% (90,2-99,2%)
Diagnosta B1 vs B2	93,5% (71,4-100%)	94,7% (81,0-100%)	94,2% (86,0-97,7%)
Diagnosta C1 vs 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 porównania metod na automacie BenchMark XT

Kohorty do badania porównania metod dobrano z dwóch niezależnych, randomizowanych badań klinicznych dotyczących stosowania leku crizotinib (oznaczonych Badanie 1 i Badanie 2), do których włączano pacjentów z NSCLC o pozytywnym statusie ALK. Status ALK dla tych pacjentów określono przy pomocy testu do badań klinicznych Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit w wielu laboratoriach na szczeblu centralnym. Ważne wyniki testu Vysis ALK FISH otrzymano łącznie dla 1644 próbek tkanki NSCLC (1018 i 626 próbek odpowiednio dla Badań 1 i 2).

W badaniu porównania metod dla testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) próbki pobrane od pacjentów poddanych badaniom przesiewowym w Badaniach 1 i 2 przesłano do laboratorium centralnego w celu wykonania barwienia w teście z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) i oceny IHC statusu ALK na podstawie kryteriów algorytmu oceny testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) (Tabela 5). Spośród próbek, dla których uzyskano ważne wyniki testu Vysis ALK FISH w badaniach przesiewowych do badania klinicznego, dla 933 próbek z Badania 1 (Tabela 26) i 598 próbek z Badania 2 (Tabela 28) również uzyskano ważne wyniki w teście z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3).

Liczbę próbek, dla których uzyskano wynik pozytywnego i negatywnego statusu ALK dla każdego testu, przedstawiono odpowiednio w Tabelach 26 i 28 dla kohort Badania 1 i 2. Współczynniki zgodności między dwoma testami przedstawiono odpowiednio w Tabelach 27 i 29 dla kohort Badania 1 i 2. Uzyskane procentowe zgodności wyników pozytywnych i negatywnych wyniosły odpowiednio 86,0% i 96,3% dla Badania 1 (Tabela 27) oraz 92,7% i 94,8% dla Badania 2 (Tabela 29).

Tabela 26. Porównanie wyników badań statusu ALK w próbkach NSCLC (kohorta z Badania 1) wykonanych za pomocą testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) i zestawu Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.

Status ALK		Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		
		Wynik pozytywny	Wynik negatywny	Ogółem
Przeciwciała VENTANA anti-ALK (D5F3)	Wynik pozytywny	154	28	182
	Wynik negatywny	25	726	751
	Ogółem	179	754	933

Tabela 27. Współczynniki zgodności wyników badań wykonanych za pomocą testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) i zestawu Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit w Badaniu 1.

Współczynniki zgodności pomiędzy testami ALK	Procentowa zgodność wyników pozytywnych (95% CI)	Procentowa zgodność wyników negatywnych (95% CI)	Całkowita zgodność procentowa (95% CI)
Przeciwciała VENTANA anti-ALK (D5F3) oraz Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit	86,0% (80,2-90,4%)	96,3% (94,7-97,4%)	94,3% (92,6-95,6%)

Tabela 28. Porównanie wyników badań statusu ALK w próbkach NSCLC (kohorta z Badania 2) wykonanych za pomocą testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) i zestawu Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.

Status ALK		Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		
		Wynik pozytywny	Wynik negatywny	Ogółem
Przeciwciała VENTANA anti-ALK (D5F3)	Wynik pozytywny	179	21	200
	Wynik negatywny	14	384	398
	Ogółem	193	405	598

Tabela 29. Współczynniki zgodności wyników badań wykonanych za pomocą testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) i zestawu Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit w Badaniu 2.

Współczynniki zgodności pomiędzy testami ALK	Procentowa zgodność wyników pozytywnych (95% CI)	Procentowa zgodność wyników negatywnych (95% CI)	Całkowita zgodność procentowa (95% CI)
Przeciwciała VENTANA anti-ALK (D5F3) oraz 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%)

Należy pamiętać, że sposób przygotowania preparatów tkankowych w Badaniu 1 i Badaniu 2 nie został zweryfikowany jako zgodny z procedurami przygotowania zalecanymi dla testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3).

Badanie rezultatu klinicznego stosowania leku crizotinib

Analizę skuteczności klinicznej używania testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) jako urządzenia diagnostycznego do selekcji pacjentów, którzy mogliby odnieść korzyści z leczenia crizotinibem, środkiem działającym na ALK, oparto na wynikach Badania 1. Pacjentów tych przebadano przy użyciu testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) w ramach badania porównania metod, jak również w ramach badania dodatkowego. Badanie 1 było wielośrodkowym, międzynarodowym, randomizowanym badaniem fazy III prowadzonym metodą otwartej próby, mającym na celu ocenę skuteczności i bezpieczeństwa stosowania crizotinibu w porównaniu z chemoterapeutykami pierwszej linii (pemetreksed/cisplatyna lub pemetreksed/karboplatyna) u nieleczonych wcześniej pacjentów z zaawansowanym, nieplaskonablonkowym NSCLC o pozytywnym statusie ALK. Do określenia pozytywnego statusu ALK i spełniania kryteriów kwalifikacyjnych do Badania 1 wykorzystano zestaw Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit (test ALK FISH). Na podstawie wyników testu Vysis ALK FISH do zbioru pacjentów zrandomizowanych włączono 343 osoby (172 do grupy przyjmującej crizotinib i 171 do grupy przyjmującej chemoterapeutyki). W badaniu rezultatów klinicznych dla testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) próbki tkanek pobrane od pacjentów w Badaniu 1 przebadano retrospektywnie przy użyciu testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3). Spośród 343 pacjentów włączonych do Badania 1 dla 133 przeprowadzono badanie przy użyciu testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) w ramach protokołu badania porównania metod, a dla dodatkowych 39 wykonano takie badanie w ramach oddzielnego protokołu badania; łącznie dla 172 pacjentów wykonano test z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3). Spośród tych pacjentów u 166 zdiagnozowano pozytywny lub negatywny status ALK w badaniu IHC z zastosowaniem przeciwciała anti-ALK (D5F3). Wyniki ogólnej oceny skuteczności dla tych pacjentów w podziale na wyniki testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) zawiera Tabela 30.

Tabela 30. Korzyści kliniczne ze stosowania crizotinibu (czas przeżycia bez progresji choroby) dla pacjentów włączonych do Badania 1.

Status ALK	HR [a]	SE [a]	95% CI [a]	Liczebność próby		
				Grupa przyjmująca chemoterapeutyki	Grupa przyjmująca crizotinib	
Włączeni do badania razem	FISH+	0,454	0,139	(0,346, 0,596)	171	172
Przebadani testem IHC statusu 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] Obserwowany współczynnik hazardu (hazard ratio, HR) dla czasu przeżycia bez progresji choroby (progression-free survival, PFS) przy stosowaniu crizotinibu w porównaniu z chemoterapeutykami; błąd standardowy (standard error, SE); dwustronny 95% przedział ufności (confidence interval, CI). Wyniki oszacowano przy użyciu modelu Coxa ze stratyfikacją względem następujących kategorii: pochodzenie rasowe, obecność przerzutów do mózgu i punktacja w skali ECOG.

[b] W przypadku dwojga pacjentów z pozytywnym wynikiem w teście FISH statusu ALK w grupie przyjmującej chemoterapeutyki i czworga pacjentów w grupie przyjmującej crizotinib nie uzyskano pozytywnego ani negatywnego wyniku w teście IHC statusu ALK.

Przeprowadzono dodatkowe analizy imputacji, aby uwzględnić pacjentów, dla których brakowało wyników testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) lub były one nieważne, oraz aby ocenić rzetelność wniosków z badania. Analiza statystyczna dla pacjentów z niezgodnymi wynikami niewłączonych do Badania 1 obejmowała symulację zakresu możliwych wyników leczenia dla tych pacjentów. Wyniki wszystkich hipotetycznych analiz były zasadniczo podobne do wyników głównej analizy skuteczności.

Przypadki niezgodności FISH+/IHC- z Badania 1:

Badanie porównania metod

W badaniu porównania metod (Tabele 26 i 27) oceniono 25 pacjentów z Badania 1 jako FISH+/IHC-. Mediana wyniku w teście Vysis ALK FISH (% komórek nowotworowych z wynikiem pozytywnym pod kątem rearanżacji genu ALK) dla tych przypadków wynosiła 20% (średnia 31,6%, odchylenie standardowe 21,58%), a dla 14 z tych przypadków wynik w teście FISH wynosił 25% lub mniej. We wszystkich tych przypadkach wyniki w teście Vysis ALK FISH były powyżej 15% prognozy dla pozytywnego wyniku badania statusu ALK, jednak mieściły się w zakresie niejednoznaczności testu FISH (10%-50%). Z drugiej strony mediana wyniku w teście FISH odnotowana dla wszystkich włączonych do badania pacjentów przebadanych testem IHC wynosiła 58% (średnia 56,9%, odchylenie standardowe 21,97%).

Badanie rezultatu klinicznego

W badaniu rezultatu klinicznego 25 pacjentów włączonych do Badania 1 oceniono jako FISH+/IHC- (patrz ostatni wiersz Tabeli 30). Spośród nich ośmiu zostało zrandomizowanych do grupy przyjmującej crizotinib w badaniu klinicznym. Spośród tych pacjentów dla pięciorga wynik w teście FISH był bardzo zbliżony do prognozy FISH (15%-18% komórek nowotworowych z wynikiem pozytywnym pod kątem rearanżacji genu ALK), wykazywali oni również obiektywną progresję choroby lub chorobę stabilną/brak odpowiedzi. Dla dwójki spośród ośmiorga pacjentów wyniki w teście FISH nie mieściły się w zakresie niejednoznaczności testu (66% i 72% komórek nowotworowych z wynikiem pozytywnym pod kątem rearanżacji genu ALK) i wystąpiła u nich częściowa odpowiedź obiektywna nowotworu. Ósmy pacjent ze statusem IHC- miał również status FISH- i został do badania włączony przez pomyłkę; wystąpiła u niego odpowiedź nieokreślona.

Przypadki niezgodności FISH-/IHC+ z Badania 1

W badaniu porównania metod z użyciem testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) w 28 przypadkach pacjentów poddanych badaniom przesiewowym do Badania 1 stwierdzono status FISH-/IHC+. Ponieważ testem stosowanym w badaniu klinicznym był FISH i tylko pacjenci o statusie FISH+ byli włączani do Badania 1, nie ma dostępnych danych dotyczących rezultatów dla przypadków niezgodności FISH-/IHC+.

Badanie rezultatu klinicznego stosowania leku ceritinib

Analizę skuteczności klinicznej używania testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) jako urządzenia diagnostycznego do selekcji pacjentów, którzy mogliby odnieść korzyści z leczenia ceritinibem, oparto na wynikach prowadzonego metodą otwartej próby, randomizowanego, wielośrodkowego badania fazy III z grupą kontrolną otrzymującą substancję czynną dotyczącego stosowania ceritinibu podawanego doustnie (Badanie 3). Badanie miało na celu porównanie skuteczności klinicznej i bezpieczeństwa leczenia ceritinibem w porównaniu z chemoterapeutykami (dublet oparty na związkach platyny i pemetreksedzie, a następnie leczenie podtrzymujące pemetreksedem u pacjentów, u których po czterech cyklach nie nastąpiła progresja choroby) u nieleczonych wcześniej pacjentów dorosłych z miejscowo zaawansowaną lub przerzutową postacią nieplaskonabłonkowego NSCLC o pozytywnym statusie ALK. Test z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) wykorzystano w automacie BenchMark XT do przetestowania łącznie 1778 pacjentów pod kątem kwalifikacji do Badania 3, która wymagała pozytywnego statusu ALK. Łącznie 376 pacjentów, których nowotwory wykazały w teście pozytywny status ALK, włączono do zbioru zrandomizowanego (189 do grupy przyjmującej ceritinib i 187 do grupy przyjmującej chemoterapeutyki). Wyniki dotyczące skuteczności ogólnej dla pacjentów leczonych ceritinibem przedstawia Tabela 31. Wykazano, że stosowanie ceritinibu przyniosło istotne statystycznie i znaczące klinicznie korzyści w porównaniu z chemoterapeutykami, przy 45% zmniejszeniu ryzyka pod względem PFS według oceny BIRC (HR=0,55; 95% CI: 0,42, 0,73; p < 0,001), dla pacjentów wybranych przy użyciu testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3). Mediana PFS według oceny BIRC wyniosła 16,6 miesiąca (95% CI: 12,6; 27,2) i 8,1 miesiąca (95% CI: 5,8; 11,1) odpowiednio w grupie przyjmującej ceritinib i chemoterapeutyki.

Tabela 31. Korzyści kliniczne ze stosowania ceritinibu (czas przeżycia bez progresji choroby) dla pacjentów włączonych do Badania 3.

Współczynnik	ZYKADIA (N=189)	Chemoterapia (N=187)
Mediana, w miesiącach (95% CI) [a]	16,6 (12,6; 27,2)	8,1 (5,8; 11,1)
HR (95% CI) [b]	0,55 (0,42; 0,73)	
Wartość p [c]	<0,0001	

HR= współczynnik hazardu (hazard ratio); CI=przedział ufności (confidence interval); BIRC=niezależna komisja weryfikacyjna, nieznająca szczegółów leczenia (Blinded Independent Review Committee); NR=nie osiągnięto (not reached); NE=niemożliwe do oszacowania (not estimable)

[a] Oszacowano metodą Kaplana-Meiera.

[b] Model regresji Coxa ze stratyfikacją ze względu na czynniki stratyfikacyjne randomizacji (stan sprawności pacjenta wg skali WHO: 0 vs 1-2; obecność lub brak przerzutów do mózgu, wcześniejsze stosowanie lub niestosowanie chemoterapeutyków adiuwantowych/neadiuwantowych)) został użyty do oceny współczynnika hazardu PFS wraz z 95% przedziałem ufności na podstawie testu Walda.

[c] W oparciu o logarytmiczny test rang ze stratyfikacją (taką samą jak w punkcie [b]).

Wskaźniki akceptowalnej jakości barwienia dla testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) w populacji zgodnej z intencją rozpoznania (1778 pacjentów przebadanych przy użyciu testu) przedstawia Tabela 32. Podano również odsetek przypadków akceptowalnej morfologii i akceptowalnego tła preparatów barwionych w teście z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3). Dla 122 próbek pierwsze barwienie przy użyciu testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) było nieudane i przeprowadzono kolejne barwienie. Po ostatecznej próbie barwienia jakość 48 z 122 preparatów okazała się niemożliwa do zaakceptowania (jednego ze względu na nieprawidłową kontrolę cyklu, 30 ze względu na nieakceptowalne barwienie H&E (hematoksyliną i eozyną) i 12 z powodu nieakceptowalnego odczynnika do kontroli negatywnej, jednego z powodu nieakceptowalnego tła, dwóch z powodu nieakceptowalnego tła i morfologii oraz dwóch ze względu na nienadający się do oceny preparat IHC). Dla testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3) wykazano wysoki łączny odsetek przypadków barwienia wstępnego i ostatecznego o akceptowalnej jakości wynoszący odpowiednio 93,1% oraz 97,3%. Ostateczny odsetek przypadków akceptowalnej morfologii i tła wynosił ponad 99%.

Tabela 32. Charakterystyka wyników wstępnego i ostatecznego barwienia próbek NSCLC z badań przesiewowych przy rekrutacji do Badania 3, wykonanego przy użyciu testu z zastosowaniem przeciwciał VENTANA anti-ALK (D5F3).

Oceniane cechy barwienia	Współczynnik akceptowalności % (n/N) (95% CI)	
	Barwienie wstępne*	Barwienie ostateczne**
Ogólny wskaźnik akceptowalnej jakości barwienia w teście IHC statusu ALK	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%)

* Wstępna próba barwienia

** Ostateczna próba barwienia

Badanie rezultatu klinicznego stosowania leku alectinib

Analizę skuteczności klinicznej VENTANA ALK (D5F3) jako wyrobu diagnostycznego do selekcji pacjentów, którzy mogliby odnieść korzyści z leczenia alectinibem, oparto na wynikach prowadzonego metodą otwartej próby, randomizowanego, wielośrodkowego badania fazy III z grupą kontrolną otrzymującą substancję czynną dotyczącego stosowania alectinibu podawanego doustnie (Badanie BO28984). Badanie to

porównywało skuteczność kliniczną i bezpieczeństwo leczenia alectinibem oraz crizotinibem u wcześniej nieleczonych pacjentów dorosłych z ALK-pozytywnym, miejscowo zaawansowanym lub przerzutowym NSCLC. Przeciwciała VENTANA ALK (D5F3) stosowano na automacie BenchMark XT w celu zbadania łącznie 1239 pacjentów pod kątem kwalifikowalności do badania BO28984, co wymagało pozytywnego statusu ALK w badaniu centralnym. Łącznie 303 pacjentów, których guzy dawały wyniki ALK-pozytywne w badaniu randomizowanym i analizowano pod kątem skuteczności (152 w grupie alectinibu i 151 w grupie crizotinibu). Wyniki dotyczące skuteczności ogólnej przedstawia Tabela 33. Wykazano, że stosowanie alectinibu przyniosło istotne statystycznie i znaczące klinicznie korzyści w porównaniu z crizotinibem, przy 53% zmniejszeniu ryzyka pod względem PFS według badacza (HR=0,47; 95% CI: 0,34, 0,65; $p < 0,0001$) i 50% zmniejszeniu ryzyka pod względem PFS wg IRC (HR= 0,50, 95% CI: 0,36, 0,7; $p < 0,0001$) w przypadku pacjentów wybranych przy użyciu testu z zastosowaniem przeciwciała VENTANA ALK (D5F3). Mediana PFS wg oceny badacza nie została osiągnięta w grupie alectinibu i wg oceny IRC wynosiła 25,7 miesiąca (95% CI: 19,9, NE) i 10,4 miesiąca (95% CI: 7,7, 14,6) odpowiednio dla grup alectinibu i crizotinibu.

Tabela 33. Korzyści kliniczne ze stosowania alectinibu lub crizotinibu (czas przeżycia bez progresji choroby) dla pacjentów włączonych do Badania BO28984.

Ocenił przez badacza przeżycie bez progresji	Alectinib (N=152)	Crizotinib (N=151)
Mediana, w miesiącach (95% CI) [a]	NE (17,7, NE%)	11,1 (9,1,13,1%)
HR (95% CI) [b]	0,47 (0,34, 0,65%)	
Wartość p [c]	<0,0001	
Przeżycie bez progresji wg IRC	Alectinib (N=152)	Crizotinib (N=151)
Mediana, w miesiącach (95% CI) [a]	25,7 (19,9, NE%)	10,4 (7,7, 14,6%)
HR (95% CI) [b]	0,50 (0,36, 0,70%)	
Wartość p [c]	<0,0001	

HR=wszpółczynnik hazardu (hazard ratio); CI=przedział ufności (confidence interval); IRC=niezależna komisja weryfikacyjna (Independent Review Committee); NE=niemożliwe do oszacowania (not estimable)

[a] Oszacowano metodą Kaplana-Meiera.

[b] Współczynnik hazardu oszacowano przy użyciu regresji Coxa, stratyfikowanego pod względem zmiennych towarzyszących rasy (Azjaci wobec nie-Azjatów) oraz wyjściowych przerzutów do OUN (obecność/brak) wg IRC.

[c] W oparciu o logarytmiczny test rang ze stratyfikacją (taką samą jak w punkcie [b]).

Wskaźniki akceptowalnej jakości barwienia VENTANA ALK (D5F3) w populacji zgodnej z intencją rozpoznania (1239 pacjentów przebadanych przy użyciu testu) były porównywalne do badania A2301.

Wniosek

Wyniki oceny statusu klinicznego ALK na podstawie barwienia w teście z zastosowaniem przeciwciała VENTANA anti-ALK (D5F3) na automatach BenchMark ULTRA, BenchMark XT i BenchMark GX są odtwarzalne. Binarny algorytm oceny zapewnia wysoką odtwarzalność wyników między diagnostami. Wyniki dotyczące statusu ALK uzyskane w tym teście są zgodne z wynikami testów przeprowadzonych za pomocą zestawu Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit. Test z zastosowaniem przeciwciała VENTANA anti-ALK (D5F3) może być wykorzystywany do identyfikacji pacjentów kwalifikujących się do leczenia preparatem XALKOR® (crizotinib), ZYKADIA® (ceritinib), lub ALECENSA® (alectinib).

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

29. CLSI. Quality Assurance for Design Control and Implementation of Immunohistochemistry Assays: Approved Guideline-Second Edition. CLSI document I/LA28-A2 (ISBN 1-56238-745-6). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 2011.
30. Herman GE, et al. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech Histochem.* 1991;66(4):194-9.
31. Omata M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen. A possible source of error in immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol.* 1980;73(5):626-32.
32. Nadji M, et al. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. *Lab Med.* 1983;14:767.

WŁASNOŚĆ INTELEKTUALNA

VENTANA, BENCHMARK, OPTIVIEW oraz logo VENTANA są znakami towarowymi grupy Roche.

Wszystkie pozostałe znaki towarowe stanowią własność odpowiednich właścicieli.

© 2017 Ventana Medical Systems, Inc.

Produkt sprzedawany na licencji



DANE KONTAKTOWE



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany



www.ventana.com