

VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

REF 790-4794

06679072001

IVD  50

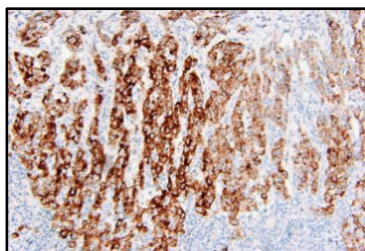


Fig. 1. VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyseekspression på ikke-småcellet lungekarinom.

TILSIGTET ANVENDELSE

VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody er beregnet til anvendelse i laboratoriet til kvalitativ detektion af anaplastisk lymfomkinase (ALK)-protein i formalinfikseret og paraffinindstøbt ikke-småcellet lungekarinom (NSCLC)-væv farvet på et BenchMark IHC/ISH-instrument. Det er indiceret som hjælp til at identificere patienter, som er egnede til behandling med XALKORI® (crizotinib), ZYKADIA® (ceritinib), ALECENSA® (alectinib) eller lorlatinib.

Dette produkt skal fortolkes af en kvalificeret patolog og sammenholdes med histologisk undersøgelse, relevante kliniske oplysninger og egnede kontroller.

Dette antistof er beregnet til in vitro diagnostisk (IVD) brug.

RESUMÉ OG FORKLARING

Anaplastisk lymfomkinase (ALK)-proteinet er medlem af insulinreceptor-superfamilien af receptortyrosinkinaser.¹ ALK er et type I-membran glykoprotein med normal ekspression i nervesystemet.² ALK-genet findes ved kromosomet 2p23 og er opbygget af 2 store introner og 26 exoner.¹ Molekylær patogene, der omfatter ALK, begynder med kromosomale omlejninger, som ledsager 3'-kodningssekvenserne for det intracellulære ALK-signalområde med 5'-promotorelementer og kodningssekvenser fra andre gener. 5'-promotorelementerne og kodningssekvenser frembringer overekspression og ligand-uafhængig oligomerisering af de kimære proteiner, hvilket er kendetegn, der er almindelige i humane proteintyrosinkinase-neoplasmer af fusionstypen.

En inversion i kromosomet 2p, der resulterer i dannelse af et fusionsgenprodukt bestående af dele af echinoderm mikrotubul associeret protein-lignende 4 (EML4)-genet og ALK-genet, blev fundet i 2007 i NSCLC-cellelinjer og arkiverede kliniske prøver.³ En efterfølgende række af udgivne undersøgelser fandt, at EML4-ALK-inversionshændelser producerede mindst 9 katalytisk aktive kinasefusionsproteinerinvarianter, hver med indhold af samme portion af ALK C-terminal-kinasedomænet.⁴⁻⁸ På samme måde som med ALK-genfusioner, der først blev identificeret i anaplastisk storcellet lymfom (ALCL), blev det påvist, at EML4-ALK-fusionsproteinet har transformativ aktivitet. På samme måde er EML4-ALK-ekspression i lungealveolære epitelceller hos transgene mus blevet påvist at være en potent onkogen faktor.⁹

KLINISK BETYDNING

NSCLC er den mest almindelige type lungekræft. ALK anses i dag for at være en vigtig onkogen årsag til NSCLC, og selv om EML4 er den hyppigst forekommende fusionspartner, så er der identificeret andre fusionspartnere.^{10,11} Incidensen af ALK-genomlejninger synes at udgøre fra 2-7 %, hvilket svarer til cirka 6000 ALK-positive patienter/årligt i USA og 40000 patienter/årligt på globalt plan.^{3,4,7}

Langt størstedelen af ALK-genomlejninger ved lungecancer har været i adenokarcinompræparater og ikke præparater med pladecelle- eller småcellehistologi.³⁻⁸ En vis evidens peger på en sammenhæng mellem ALK-genomlejninger og NSCLC hos patienter med status "ikke-ryger eller lejlighedsryger", selv om dette nødvendigvis er en statistisk signifikant medfaktor.^{3,4,7,9} Det er vigtigt at anføre, at ALK-genomlejninger sjældent falder sammen med mutationer af EGFR, HER2 eller KRAS, hvilket viser, at ALK-positivitet er en distinkt undertype af sygdommen.⁹

XALKORI® er en selektiv, ATP-kompetitiv småmolekyleinhibitor af ALK, ROS1 og c-Met/Hepatocyte Growth Factor Receptor (HGFR)-tyrosinkinaser og de onkogene varianter heraf (f.eks. ALK- eller ROS1-fusionsproteiner eller c-Met/HGFR-mutationsvarianter). XALKORI® har demonstreret koncentrationsafhængig inhibition af ALK- og c-Met-fosforylering i cellebaserede analyser med brug af tumorcellelinjer. Det har også demonstreret antitumoraktivitet i mus med tumorxenografts med ekspression af EML4- eller NPM-ALK-fusionsproteiner eller Met.^{12,13,14}

ZYKADIA® er en kinaseinhibitor. Mål for ZYKADIA®-inhibition, der er identificeret i enten biokemiske eller cellulære analyser i klinisk relevante koncentrationer, inkluderer ALK, insulinlignende vækstoffaktor 1-receptor (IGF-1R), insulinreceptor (InsR) og ROS1. Blandt disse er ZYKADIA® mest aktiv mod ALK. ZYKADIA®-inhiberet autofosforylering af ALK viste inhibering af ALK-medieret fosforylering af det nedstrøm signalprotein STAT3 og proliferation af ALK-afhængige cancerceller i in vitro- og in vivo-analyser.

ZYKADIA® inhiberede in vitro-proliferation af cellelinjer med ekspression af EML4-ALK- og NPM-ALK-fusionsproteiner og demonstrerede dosisafhængig inhibition af EML4-ALK-positiv NSCLC-xenograftvækst i mus og rotter.¹⁵

Den kliniske betydning af ALK-genomlejninger er blevet påvist i randomiserede, aktivt kontrollerede, kliniske forsøg med XALKORI®, udført af Pfizer, og med ZYKADIA®, udført af Novartis.^{14,15}

ALECENSA® er en meget selektiv og potent ALK- og RET-tyrosinkinaseinhibitor, som inhiberer intracellulære signalveje, der er involveret i proliferation af tumorceller og overlevelse, og som derfor fremmer dødeligheden af cancerceller og inhiberer vækst og proliferation af tumorceller.¹⁶ Baseret på prækliniske data er ALECENSA® ikke et substrat af efflux-transporterne (PGP eller BCRP) i blod-hjerne-barrieren og kan således distribueres til og fastholdes i centralnervesystemet. ALECENSA® inducerede tumorregression i prækliniske musxenograftmodeller, inklusive antitumoraktivitet i hjernen, og forlængede overlevelse i intrakranielle dyremodeller.¹⁷ ALECENSA® er veltolereret og giver en håndterbar sikkerhedsprofil.¹⁸⁻²⁰

Lorlatinib er en tredje generations, selektiv, adenosintriphosphat (ATP)-kompetitiv, hjernepenerende, lille molekylehæmmer i ALK-tyrosinkinase. Det er designet til at overvinde eller forhindre vigtige resistensmekanismer, der udvikler sig efter tidligere behandling med ALK-hæmmere, og til at trænge ind i blod-hjerne-barrieren. Lorlatinib er også en potent ROS1-tyrosinkinasehæmmer.²¹ In vitro hæmmer lorlatinib kraftigt den katalytiske aktivitet af ikke-muteret ALK og en bred vifte af klinisk relevante mutante ALK-kinaser, herunder dem, der giver resistens over for første- og andengenerations-ALK-tyrosinkinasehæmmere.²² Lorlatinib udviste markant antitumoraktivitet ved lave nanomolære frie plasmakoncentrationer i dyremodeller, der huser ALK-mutationer, inklusive dem, der giver resistens over for første- og andengenerations-ALK-hæmmere. Lorlatinib resulterede i tumorsvind og forlængede overlevelse ved at trænge ind i blod-hjerne-barrieren og opnå effektiv hjerneeksponering i ortotopiske dyremodeller.^{23,24}

VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysen) viste konkordans med (Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit ALK FISH) ved bestemmelse af ALK-status for NSCLC hos en patient. ALK FISH kan give tekniske udfordringer ved vurdering af fnrningsresultaterne. Intracellulære omlejninger kan give subtil signalopdeling, hvilket fører til potentielle falske negative resultater.²⁵ Nylige studier indikerer, at IHC er sensitiv og specifik til bestemmelse af ALK-status og et brugbart alternativ til ALK FISH.^{10,11,25,26,27} VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysen med tilhørende scoringsalgoritme blev udviklet til at bestemme ALK-status i NSCLC-præparater.

Små vævsprøver kan nemt anvendes til rutinemæssig immunhistokemi (IHC), hvilket gør denne teknik, sammen med antistoffer til detektion af vigtige antigener til karcinomfortolkning, til et effektivt værktøj for patologen ved diagnose og prognose af sygdommen. En af de vigtigste markører for NSCLC er ALK.

Fortolkning af resultaterne af VENTANA anti-ALK (D5F3)-analytisk farvning af vævsprøve skal foretages med den anbefalede scoringsalgoritme. Histologiske vævsforberedelser har fordel af intakt vævsmorfologi som hjælp ved fortolkning af prøvens ALK-positivitet. Alle histologiske tests skal fortolkes af en patolog, og resultaterne skal suppleres med morfologiske undersøgelser og behørig kontrol samt benyttes i kombination med andre kliniske og laboratoriebaserede forsøg. Måltagere for IHC-analyser påvirkes af fikseringstid, type af fiksativ og alderen af vævssnit, hvorfor der skal sikres kompatibilitet med prøveforberedelsen inden farvning (se fortolkningsvejledningen til VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody for ikke-småcellet lungekarinom (NSCLC) (P/N 1011879) og afsnittet Specifikke begrænsninger nedenfor).

PROCEDURENS PRINCIP

VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse er et monoklonalt primært kanin-antistof, der binder sig til ALK i paraffinindstøbte vævssnit. Dette specifikke antistof kan lokaliseres med et OptiView DAB IHC Detection Kit (kat.nr. 760-700 / 06396500001) efterfulgt af et OptiView Amplification Kit (kat.nr. 760-099 / 06396518001 (50 tests) eller 860-099 / 06718663001 (250 tests)). Se de pågældende metodeark til OptiView DAB IHC Detection Kit og OptiView Amplification Kit for yderligere oplysninger.

LEVERET MATERIALE

VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse indeholder tilstrækkeligt med reagens til 50 tests.

En 5-mL-dispenser med VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse indeholder cirka 70 µg af et monoklonalt (D5F3) kanin-antistof.

Antistoffet er fortyndet i PBS med bærerprotein og 0.05 % ProClin 300, som er et konserveringsmiddel.

Specifik antistofkoncentration er cirka 14 µg/mL.

VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse er et rekombinant monoklonalt kanin-antistof fremstillet som oprenset cellekultursupernatant.

Fortolkningsvejledning til VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody for ikke-småcellet lungecarcinom (NSCLC) (P/N 1011879).

Der henvises til metodearket til det relevante VENTANA detektionskit for detaljerede beskrivelser af: Procedurens princip, Materiale og metoder, Prøvetagning og forberedelse til analyse, Metoder til kvalitetskontrol, Fejlfinding, Fortolkning af resultater og Begrænsninger.

NØDVENDIGE MATERIALER, SOM IKKE MEDFØLGER

Farvningsreagenser såsom VENTANA-detektionskits og hjælpekomponenter, herunder objektglas til negative og positive vævskontroller, medfølger ikke.

Det er ikke alle produkter, der er nævnt i metodearket, som kan fås i alle geografiske områder. Indhent oplysninger hos den lokale supportrepræsentant.

Nedenstående reagenser og materialer kan være påkrævet ved farvning, men medfølger ikke:

- Human blindtarm eller ALK-positive og ALK-negative præparater af ikke-småcellet lungecarcinom til brug som kontrolvæv
- Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (kat.nr. 790-4795 / 06683380001)
- Objektglas, positivt ladede
- OptiView DAB IHC Detection Kit (kat.nr. 760-700 / 06396500001)
- OptiView Amplification Kit (kat.nr. 760-099 / 06396518001 (50 tests) eller 860-099 / 06718663001 (250 tests))
- EZ Prep Concentrate (10X) (kat.nr. 950-102 / 05279771001)
- Reaction Buffer Concentrate (10X) (kat.nr. 950-300 / 05353955001)
- LCS (Predilute) (kat.nr. 650-010 / 05264839001)
- ULTRA LCS (Predilute) (kat.nr. 650-210 / 05424534001)
- Cell Conditioning Solution (CC1) (kat.nr. 950-124 / 05279801001)
- ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (kat.nr. 950-224 / 05424569001)
- Hematoxylin II (kat.nr. 790-2208 / 05277965001)
- Bliuing Reagent (kat.nr. 760-2037 / 05266769001)
- Permanent monteringsmateriale
- Dækglass
- Automatiseret dækglass instrument
- Generelt laboratorieudstyr
- BenchMark IHC/ISH-instrument

OPBEVARING OG STABILITET

Opbevares ved 2–8 °C efter modtagelsen, og når de ikke anvendes. Må ikke nedfryses.

For at sikre korrekt reagenstilførsel og antistoffets stabilitet skal kapslen sættes på dispenseren igen efter hver brug, og dispenseren skal omgående anbringes i køleskab i opret position.

Alle antistofdispensere er mærket med udløbsdato. Ved korrekt opbevaring er reagenset stabilt indtil den dato, der er angivet på mærkaten. Brug ikke reagenset efter udløbsdatoen.

PRØVEFORBEREDELSE

Rutinemæssigt behandlede, formalinfikserede og paraffinindstøbte væv (FFPE) er egnede til brug med dette primære antistof, når det anvendes med VENTANA-detektionskits og BenchMark IHC/ISH-instrumenter.

Med afsæt i xenograftmodeller genereret fra den NCI-H2228 humane NSCLC-cellelinje, som er ALK-positiv, er det anbefalede vævsfiksering er 10 % neutral buffer-formalin (NBF) i mindst 6 timer. Fikseringstider under 6 timer resulterer i et markant tab af farvningsintensitet for ALK. Zinkformalinfixativ er også acceptabelt i en fikseringsperiode på mindst 6 timer. Den anvendte mængde skal være 15 til 20 gange vævsmængden. I løbet af 24 timer trænger intet fixativ trænger ind i mere end 2 til 3 mm fast væv eller 5 mm porøst væv. Fikseringen kan udføres ved stuetemperatur (15–25 °C).^{28,29}

Fiksativet såsom alkoholformalinedikesyre (AFA), PREFER-fiksativ B5, og andre syre- og/eller alkoholholdige fiksativer har demonstreret et tab af farvningsintensitet for ALK ved alle testede fikseringstider (1 til 72 timer). Disse fiksativer anbefales ikke til brug sammen med denne analyse. Undersøgelser af fikseringsforsinkelser viste også et tab af farvningsintensitet for ALK, hvis xenograft-præparater ikke fikseres inden for 6 timer fra udskæring. Se fortolkningsvejledningen for yderligere gennemgang af effekten af prøveforberedelse på farvningsintensiteten med ALK.

Der skal skæres snit på cirka 4 µm tykkelse, som monteres på positivt ladede objektglas. Objektglassene skal farves øjeblikkeligt, da antigeniciteten i udskårne vævssnit kan formindskes over tid og muligvis kompromitteres 3 måneder efter udskæring fra paraffinblokke (se fortolkningsvejledningen og afsnittet Præstationskarakteristika nedenfor).

ADVARSLER OG FORSİGTİGHEDSREGLER

- Til in vitro diagnostisk (IVD) brug.
- Kun til faglig anvendelse.
- Brug ikke efter det angivne antal tests.
- FORSİGTİG:** Ifølge amerikansk føderal lovgivning må dette udstyr kun sælges til en læge eller efter lægeordination. (Rx Only)
- ProClin 300 er brugt som konserveringsmiddel i dette reagens. Det er klassificeret som lokalirriterende og kan forårsage overfølsomhed ved hudkontakt. Der skal tages rimelige forholdsregler ved håndtering. Undgå, at reagenser kommer i berøring med øjne, hud og slimhinder. Bær beskyttelsestøj og handsker.
- Positivt ladede objektglas kan være modtagelige over for stressfaktorer i det omgivende miljø, hvilket kan medføre u hensigtsmæssig farvning. Bed din Roche-repræsentant om yderligere oplysninger om, hvordan denne type objektglas skal anvendes.
- Materialer af human eller animalsk oprindelse skal håndteres som biologisk farligt materiale og bortskaffes i henhold til gældende forholdsregler. I tilfælde af eksponering skal de ansvarlige myndigheders sundhedsdirektiver følges.^{30,31}
- Undgå, at reagenser kommer i kontakt med øjne og slimhinder. Vask med rigelige mængder vand, hvis reagenserne kommer i kontakt med følsomme områder.
- Undgå mikrobiel kontamination af reagenserne, da det kan forårsage fejlbehæftede resultater.
- For yderligere information om brugen af denne enhed henvises til BenchMark IHC/ISH-instrumentets brugervejledning og brugsanvisningerne til alle nødvendige komponenter, som findes på dialog.roche.com.
- Indhent oplysninger hos lokale og/eller statslige myndigheder vedrørende anbefalede metoder til bortskaffelse.
- Mærkning af produktsikkerhed følger primært EU's GHS-vejledning. Sikkerhedsdatablade er tilgængelige efter anmodning for faglige brugere.
- For at rapportere mistanke om alvorlige hændelser i forbindelse med denne enhed, skal du kontakte den lokale Roche-repræsentant og den kompetente myndighed i den medlemsstat eller det land, hvor brugeren har etableret sig.

Dette produkt indeholder komponenter klassificeret som følger i henhold til Forordning (EF) nr. 1272/2008:

Tab. 1. Fareoplysninger.

Fare	Kode	Sætning
Advarsel	H317	Kan forårsage allergisk hudreaktion.
	P261	Undgå at indånde tåge eller dampe.
	P272	Tilsmudset arbejdstøj bør ikke fjernes fra arbejdspladsen.

Fare	Kode	Sætning
	P280	Bær beskyttelseshandsker.
	P333 + P313	Ved hudirritation eller udslæt: Søg lægehjælp.
	P362 + P364	Alt tilsmudset tøj tages af og vaskes inden genanvendelse.
	P501	Indholdet/beholderen bortskaffes i et godkendt affaldsbehandlingsanlæg.

Dette produkt indeholder CAS-nr. 55965-84-9, som er en reaktionsmasse af: 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one og 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1).

FARVNINGSPROCEDURE

VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse er blevet udviklet til brug på BenchMark IHC/ISH-instrumenter i kombination med Rabbit Monoclonal Negative Control Ig, OptiView DAB IHC Detection Kit, OptiView Amplification Kit og hjælpepæreager. Se nedenstående tabeller vedrørende anbefalede farvningsprotokoller.

Dette antistof er optimeret til specifikke inkubationstider, men brugeren skal validere resultater, der opnås med dette reagens. Afvigelse fra farvningsprotokollen i Tab. 2, Tab. 3 eller Tab. 4 kan resultere i falsk positive eller falsk negative resultater. Der er blevet udviklet en ALK-specifik farvningsprocedure til BenchMark ULTRA-instrumentet, **U VENTANA ALK (D5F3)**. Inden der vælges protokolforhold fra den ALK-specifikke farvningsprocedure, skal BenchMark ULTRA-instrumentet have VSS 12.3-software med farvningsproceduren OptiView v5 eller nyere.

Parametrene for de automatiserede procedurer kan vises, udskrives og redigeres i henhold til den procedure, der er beskrevet i instrumentets brugervejledning. Se det relevante metodeark til VENTANA-detektionskits for at få yderligere oplysninger om immunhistokemiske farvningsprocedurer.

For yderligere oplysninger om korrekt brug af denne enhed henvises til inline-dispenserens metodeark, som hører til P/N 790-4794.

Tab. 2. Anbefalet farvningsprotokol for VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse og Rabbit Monoclonal Negative Control Ig med OptiView DAB IHC Detection Kit og OptiView Amplification Kit på et BenchMark ULTRA- eller BenchMark ULTRA PLUS-instrument.

Farvningsprocedure	U VENTANA ALK (D5F3)
Protokoltrin	Parameterinput
Antistof (primært)	VENTANA ALK AB – 16 min. (Hvis der ikke er valgt noget reagens, vil standarden være 4794)
	-4794
	-4796
	-7155
	-7157 (Vælg reagens ovenfor baseret på distributionsområde.)
	Eller Negative kontrol
Kontrastfarve	Hematoxylin II, 4 minutter
Efterfølgende kontrastfarvet	Bluing, 4 minutter

Tab. 3. Anbefalet farvningsprotokol for VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse og Rabbit Monoclonal Negative Control Ig med OptiView DAB IHC Detection Kit og OptiView Amplification Kit på et BenchMark XT instrument.

Proceduretype	Metode
IHC-synkroniseringsmulighed	Valgt ^a
Afparaffinerings	Valgt
Celleforbehandling (Antigenafmaskning)	CC1, 92 minutter, 100 °C
Præ-primær peroxidaseinhibitor	Valgt
Antistof (primært)	Ventana anti-ALK (D5F3) [-4794] eller Rabbit Mono Neg [-4795] 16 minutter, 37 °C
OptiView HQ Univ Linker	12 minutter
OptiView HRP Multimer	12 minutter
OptiView Amplification	Valgt
OV AMP H2O2, OV Amplifier	8 minutter
OV AMP Multimer	8 minutter
Kontrastfarve	Hematoxylin II, 4 minutter
Efterfølgende kontrastfarvet	Bluing, 4 minutter

^a Dette valgbare trin er kun relevant ved kørsel af XT OptiView DAB v4 og er ikke tilgængeligt i tidligere udgaver af softwaren.

Tab. 4. Anbefalet farvningsprotokol for VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse og Rabbit Monoclonal Negative Control Ig med OptiView DAB IHC Detection Kit og OptiView Amplification Kit på et BenchMark GX-instrument.

Proceduretype	Metode
Afparaffinerings	Valgt
Celleforbehandling (Antigenafmaskning)	CC1, 92 minutter, 100 °C
Præ-primær peroxidaseinhibitor	Valgt
Antistof (primært)	Ventana anti-ALK (D5F3) [-4794] eller Rabbit Mono Neg [-4795] 16 minutter, 37 °C
OptiView HQ Univ Linker	12 minutter
OptiView HRP Multimer	12 minutter
OptiView Amplification	Valgt
OV AMP H2O2, OV Amplifier	8 minutter
OV AMP Multimer	8 minutter
Kontrastfarve	Hematoxylin II, 4 minutter
Efterfølgende kontrastfarvet	Bluing, 4 minutter

På grund af variationer i vævsfiksering og -behandling samt generelle forhold vedrørende laboratorieinstrumenter og -miljø kan det være nødvendigt at øge eller mindske inkubationstiden for det primære antistof, celleforbehandlingen eller proteaseforbehandlingen baseret på individuelle præparater, den anvendte detektion og læserpræferencer. Der henvises til "Immunohistochemistry Principles and Advances" for yderligere information om fikseringsvariabler.³²

METODER TIL KVALITETSKONTROL

Rabbit Monoclonal Negative Control Ig

Der skal køres et objektglas med en matchet negativ reagenskontrol for hver præparat som en hjælp til fortolkning af resultaterne. Det negative reagenskontrollantistof Rabbit Monoclonal Negative Control Ig er specifikt matchet til denne analyse og anvendes i stedet for det primære antistof til at evaluere uspecifik farvning. Farvningsproceduren for den negative reagenskontrol skal være den samme som inkubationstid for primært antistof. Brug af et andet negativ kontrolreagens eller manglende brug af det anbefalede negative kontrolreagens, kan resultere i falske resultater.

Kontroller på systemniveau

Kontroller på systemniveau skal køres med patientprøver. De kan være enten human blindtarm³³ eller kendte ALK-positive/negative NSCLC-vævsprøver.

Kontrolvæv skal være en obduktionsprøve, en biopsiprøve eller et kirurgisk præparat, der er klargjort eller fikseret så hurtigt som muligt på en måde, der er identisk med testsnit. Dette væv kan overvåge alle trin i analysen fra vævsforberedelse til farvning. Brug af et vævssnit, der er fikseret eller behandlet på en anden måde end testpræparatet, kan bruges som kontrol for alle reagenser og metodetrin undtagen fiksering og forberedelse af væv.

Blindtarm eller ALK-positive / negative NSCLC-vævskontroller

Der skal køres ALK-positivt og ALK-negativt kontrolvæv med hver udført VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysefarvningsprocedure.

NSCLC-tilfælde med farvning, der repræsenterer klinisk ALK-positive og klinisk ALK-negative resultater, er egnede til optimal kvalitetskontrol, inklusive detektion af mindre niveauer af reagensdegradering eller problemer med instrumentspecifikation.

Humant blindtarmsvæv indeholder positive og negative farvningsselementer til ALK-proteinet og er derfor egnet til anvendelse som kontrol på systemniveau. Vævskomponenterne i positiv farvning bruges til at bekræfte, at antistoffet blev påført, og at instrumentet fungerede korrekt. Vævskomponenterne i negativ farvning bruges til detektion af mindre niveauer af reagensdegradering eller problemer med instrumentspecifikation.

Relevant farvning af ALK-positive negative NSCLC- og blindtarmsvævskomponenter er beskrevet i Tab. 5 og Tab. 6 og i fortolkningsvejledningen.

Kendt positive og kendt negative vævskontroller til overvågning af ydelsen af ALK-analysen på patientpræparat skal fikseres og behandles på samme måde som patientpræparatet. Ellers kan vævskontrollerne kun bruges til at overvåge testreagensernes korrekte ydelse. Vævskontrollerne må ikke bruges som hjælp til diagnose af patientprøver.

Analyseverifikation

Før den første anvendelse af et antistof eller farvningssystem i en diagnostisk procedure bør antistoffets specificitet verificeres ved at teste det på en række væv med kendte IHC-præstationskarakteristika, der repræsenterer positive og negative ALK-væv (se de Metoder til kvalitetskontrol, der blev beskrevet tidligere i dette afsnit indlæggssedlen, og kvalitetskontrolanbefalingerne fra College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist³⁴ eller CLSI Approved Guideline³⁵). Disse metoder til kvalitetskontrol skal gentages for hvert nyt antistof-lot, eller når der sker ændringer i analyseparametre. NSCLC-væv med kendt ALK-status eller humane blindtarmsprøver er egnede til analyseverifikation.

FORTOLKNING AF FARVNINGEN / FORVENTEDE RESULTATER

Den automatiserede VENTANA-immunfarvningsprocedure får et brunt DAB-reaktionsprodukt til at udfældes på antigenstederne, der er lokaliseret af VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse. En kvalificeret patolog med erfaring i IHC-procedurer skal evaluere negative reagenskontroller, kontroller på systemniveau og kvalificere det farvede produkt, før resultaterne fortolkes.

Positive / negative vævskontroller på systemniveau

De farvede positive og negative vævskontroller skal undersøges for at sikre, at alle reagenser fungerer korrekt. Tilstedeværelsen af et relevant farvet reaktionsprodukt på det positive kontrolvæv i målcellernes cytoplasma er tegn på positiv reaktivitet.

Hvis de positive eller negative vævskontroller ikke fremviser passende farvning eller fremviser en ændring ved klinisk diagnostiske fortolkning, skal alle resultater med testpræparaterne anses for ugyldige.

Tab. 5. Evalueringskriterier for blindtarmsvævskontrol. Fortolkningsvejledningen indeholder repræsentative billeder.

Acceptabel	Uacceptabel
Kraftig granulær cytoplasmisk farvning i ganglieceller. (Se bemærkning)	Fravær af kraftig granulær cytoplasmisk farvning i ganglieceller.
Fravær af kraftig granulær cytoplasmisk farvning i kirtlepitelceller, muskelvæv og lymfoidt væv (ingen eller meget få lymforetikulære celler fremviser farvning i lymfoide samlinger).	For kraftig uspecifik baggrundsfarvning af kirtlepitelceller, muskel eller lymfoidt væv, der interfererer med scoringen.

Bemærk: Nerven i muskulære blindtarmslag viser positiv farvning.

Negativ reagenskontrol

Uspecifik farvning vil, hvis den forekommer, have et diffust udseende og kan evalueres ved brug af objektglasset til negativ reagenskontrol, som er farvet med Rabbit Monoclonal Negative Control Ig. Intakte celler bør anvendes til fortolkning af farvningsresultater, da nekrotiske eller degenererede celler ofte farves uspecifikt. Hvis baggrundsfarvningen er for stor, skal resultaterne fra testpræparatet betragtes som ugyldige. Se eksempler på acceptable niveauer af baggrundsfarvning med denne analyse i fortolkningsvejledningen.

Patientvæv

Patientvæv skal evalueres i overensstemmelse med VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysealgoritmen i Tab. 6. Læs i fortolkningsvejledningen.

Tab. 6. Scoringsalgoritme for VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse. Fortolkningsvejledningen indeholder repræsentative billeder.

Klinisk fortolkning	Farvningsbeskrivelse
ALK-positiv	Kraftig granulær cytoplasmisk farvning i tumorceller (enhver procentdel af positive tumorceller). Visse farvningsselementer skal ekskluderes, herunder: • Let cytoplasmisk stipling i alveolare makrofager • Celler med nerveoprindelse (nerve- og ganglieceller) • Kirtlepitelfarvning • Spredte lymforetikulære celler med lymfocytinfiltrat Der kan observeres nogen baggrundsfarvning i normale slimhinder i NSCLC- (inklusive mucin) og nekrotiske tumorområder, som skal ekskluderes fra klinisk evaluering.
ALK-negativ	Fravær af kraftig granulær cytoplasmisk farvning i tumorceller.

SPECIFIKKE BEGRÆNSNINGER

1. Denne analyse er ikke valideret til brug med cytologudstrygninger eller afkalkede præparater.
2. Patientvæv skal farves inden for 3 måneder efter, at vævssnittene er udskåret fra vævsblokken. Der er observeret tab af farvningssevne med VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse på vævssnit, der har været opbevaret ved stuetemperatur i længere end 3 måneder.
3. Der er bemærket nogen farvningsartefakter med VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse. Let granulær cytoplasmisk stipling i alveolare makrofager kan muligvis være til stede på farvede objektglas med såvel anti-ALK som negativ reagenskontrol, hvilket indikerer, at det er en artefakt fra detektionssystemet, som ikke skal evalueres som anti-ALK-positiv farvning. Der er endvidere observeret prikket farvning på nekrotiske tumorområder. Der skal også ses bort fra en sådan farvning under evaluering af patientprøver. Der er observeret farvning af nervevæv, inklusive nerven, og lejlighedsvis af lymforetikulære celler i lymfocytinfiltrat med VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysen. Læs mere i fortolkningsvejledningen.
4. Der kan muligvis observeres en svag variabilitet i den samlede farvningsintensitet på vævskontroller, som skyldes OptiView Amplification Kit. Læs i fortolkningsvejledningen for at se eksempler på acceptabel farvningspræstation.

PRÆSTATIONSCHARAKTERISTIKA

ANALYTISK YDEEVNE

Farvningsprøver for sensitivitet, specificitet, præcision og metodesammenligning blev udført, og resultaterne er anført nedenfor.

Sensitivitet og specificitet

Tab. 7. Specificitet/sensitivitet for VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse blev bestemt ved testning af normale FFPE-væv.

Væv	Antal positive/samlede tilfælde	Væv	Antal positive/samlede tilfælde
Cerebrum ^a	0/3	Thymus	0/3
Cerebellum	0/3	Myeloid (knoglemarv)	0/3
Binyre	0/3	Lunge	0/3
Ovarie	0/3	Hjerte	0/3
Pancreas	0/3	Øsofagus	0/3
Glandula parathyroidea	0/3	Mavesæk	0/3
Glandula pituitaria ^b	0/3	Tyndtarm ^c	0/3
Testis	0/3	Colon ^c	0/3
Thyroidea	0/3	Lever	0/3
Bryst	0/3	Spytkirtel	0/3
Milt	0/3	Nyre	0/3
Tonsil	0/3	Prostata	0/3
Endometrium	0/3	Cervix	0/3
Skeletmuskulatur	0/4	Hud	0/3
Nerve (spredt)	0/3	Mesothelium	0/3

^a 2/3 Få glialceller i cerebrum viste svag til moderat positivitet.

^b 3/3 Svag farvning af glandula pituitaria.

^c Ganglieceller i 4/6 intestinale væv farvede positive for ALK med varierende intensitet.

Tab. 8. Specificitet/sensitivitet for VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse blev bestemt ved at undersøge forskellige FFPE-væv.

Patologi	Antal positive/samlede tilfælde
Glioblastom (cerebrum)	0/1
Meningiom (cerebrum)	0/1
Ependymom (cerebrum)	0/1
Oligodendrogliom (cerebrum)	0/1
Serøst adenokarcinom (ovarie)	1/1
Adenokarcinom (ovarie)	0/1
Neuroendokrint neoplasme (pancreas)	0/1
Adenokarcinom (pancreas)	0/1

Patologi	Antal positive/samlede tilfælde
Seminom (testis)	0/1
Embryonalt karcinom (testis)	0/1
Medullært karcinom (thyroidea)	0/1
Papillært karcinom (thyroidea)	0/1
Duktalt karcinom in situ (bryst)	0/1
Invasivt duktalt karcinom (bryst)	0/2
B-cellelymfom, ikke specificeret yderligere (milt)	0/3
Småcellet karcinom (lunge)	0/1
Pladecellekarcinom (lunge)	0/1
Adenokarcinom (lunge)	0/1
Pladecellekarcinom (øsofagus)	0/1
Adenokarcinom (øsofagus)	0/1
Mucinøst adenokarcinom (mavesæk)	0/1
Adenokarcinom (gastrointestinalt)	0/1
Gastrointestinal stromal tumor (GIST) (colon)	0/1
Adenokarcinom (rektum)	0/1
Gastrointestinal stromal tumor (GIST) (rektum)	0/1
Hepatocellulært karcinom (lever)	0/1
Hepatoblastom (lever)	1/1
Clear cell-karcinom (nyre)	0/1
Adenokarcinom (prostata)	0/2
Leiomyom (uterus)	0/1
Adenokarcinom (uterus)	0/1
Clear cell-karcinom (uterus)	0/1
Pladecellekarcinom (uterus)	0/2
Embryonalt rhabdomyosarkom	0/1
Melanom (anus)	0/1
Basalcellekarcinom (hud)	0/1
Pladecellekarcinom (hud)	0/1
Neurofibrom (lumbalt)	0/1
Neuroblastom (retroperitoneum)	1/1
Mesothelium	0/1
Hodgkin lymfom (lymfeknude)	0/1
Anaplastisk storcellet lymfom (lymfeknude)	0/1
Urotelkarcinom (blære)	0/1
Leiomyosarkom	0/2

Patologi	Antal positive/samlede tilfælde
Osteosarkom	0/1
Tencellehabdomyosarkom	0/1

Platformskonkordans (overgangsundersøgelse)

VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysen blev første gang frigivet til BenchMark XT- og GX-instrumenter. For at demonstrere tilsvarende ydeevne af analysen på BenchMark ULTRA- og BenchMark XT-instrumenter blev der foretaget en overgangsundersøgelse. Denne undersøgelse evaluerede den kliniske status for ALK (baseret på ALK-scoringalgoritmen i Tab. 6) i 184 unikke NSCLC-præparater farvet med VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse på begge platforme. De resulterende farvede objektglas blev blindet og randomiseret og derefter evalueret af tre patologer. Resultaterne af platformskonkordans for denne undersøgelse kan ses i Tab. 9 og Tab. 10.

Tab. 9. Konkordansresultater mellem BenchMark XT- og BenchMark ULTRA-instrumenter.

VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysekonkordans mellem BenchMark ULTRA- og BenchMark XT-instrumenter			
BenchMark ULTRA	BenchMark XT		I alt
	Positiv	Negativ	
Positiv	85	1	86
Negativ	1	97	98
I alt	86	98	184

Tab. 10. Konkordans for ALK-status mellem BenchMark XT- og BenchMark ULTRA-instrumenter.

Platform Concordance Agreement Rates	Positiv procentoverensstemmelse (95 % CI)	Negativ procentoverensstemmelse (95 % CI)	Samlet procentvis overensstemmelse (95 % CI)
Konkordans mellem BenchMark XT-instrument og BenchMark ULTRA-instrument	98.8 % (93.7–99.8 %)	99.0 % (94.4–99.8 %)	98.9 % (96.1–99.7 %)

Vævstykkelse

Vævstykkelsen blev evalueret med 4 unikke tilfælde af human NSCLC (3 ALK-positive og 1 ALK negativ) og 4 unikke tilfælde af human blindtarm. Vævet blev udskåret og testet i duplikat ved 3, 4, 5, 6 og 7 mikroner. Alle vævstykker udviste passende specifik ALK-farvning og passende baggrunds niveauer med VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse. Ingen vævssnit udviste en ændring i klinisk ALK-status inden for dette tykkelsesinterval. Præparaterne skal skæres ved 4–6 mikroner til brug i analysen.

Gentagelighed og umiddelbar mellemprecision

Gentageligheden og mellemprecisionen af VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse blev vurderet på BenchMark ULTRA-, XT- og GX-instrumenter i kombination med OptiView DAB IHC Detection- og OptiView Amplification-kits.

Ti unikke NSCLC-vævspræparater (5 ALK-positive og 5 ALK-negative) blev evalueret på både BenchMark XT- og BenchMark ULTRA-instrumenter. Med hensyn til præcision inden for samme dag blev 5 ens objektglas fra hvert af NSCLC-præparaterne farvet på et enkelt BenchMark XT- eller et enkelt BenchMark ULTRA-instrument. Med hensyn til præcision inden for samme instrument blev 3 replikatobjektglas fra hvert NSCLC-præparat farvet med VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse på tre BenchMark XT-instrumenter, mens 2 ens

objektglas fra hvert NSCLC-præparat blev farvet på tre BenchMark ULTRA-instrumenter. Med hensyn til præcision mellem dage blev 2 ens objektglas fra hvert af NSCLC-præparaterne farvet med VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse på et enkelt BenchMark XT- eller BenchMark ULTRA-instrument på 5 ikke-fortløbende dage. Alle objektglas blev blindet og randomiseret inden for hver instruments vævskohorte. Hver kohorte blev evalueret individuelt af en patolog med VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse scoringalgoritmen (i Tab. 6). Hvert replikat af NSCLC-præparatet gav ækvivalente ALK IHC-farvningsresultater. En opsummering af resultaterne for gentagelighed og mellemprecision for BenchMark XT- og BenchMark ULTRA-instrumenterne kan ses i hhv. Tab. 11 og Tab. 12.

Der blev foretaget en undersøgelse mellem platforme med sammenligning af ydeevnen af VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysen på BenchMark XT- og BenchMark GX-instrumenter. I denne undersøgelse blev to multivævsblokke med hver 8 NSCLC-præparater (3 ALK-positive, 1 ALK-negativ pr. blok) evalueret. Til denne sammenligning blev 5 ens objektglas farvet på tre BenchMark XT-instrumenter og tre BenchMark GX-instrumenter. Disse objektglas blev evalueret for passende farvning med udgangspunkt i VENTANA anti-ALK (D5F3) IHC-scoringalgoritmen i Tab. 6. Hvert replikat af NSCLC-præparatet gav ækvivalente ALK IHC-farvningsresultater mellem de to platforme. Der findes et sammendrag af resultaterne i Tab. 13.

Derudover blev også gentageligheden af VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysefarvning på human blindtarm (kontrol på systemniveau) evalueret. Der blev brugt otte unikke humane blindtarmsvæv til denne undersøgelse. Med hensyn til præcision mellem dage blev 13 ens objektglas fra to multivævsblokke med 4 blindtarmspræparater farvet på et enkelt BenchMark XT-instrument. Med hensyn til præcision mellem instrumenter blev 5 ens objektglas fra to multivævsblokke med 4 blindtarmspræparater hver især farvet med VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse på tre BenchMark XT-instrumenter. Med hensyn til præcision mellem dage blev 5 ens objektglas fra to multivævsblokke med 4 blindtarmspræparater farvet med VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse på et enkelt BenchMark XT-instrument på 5 ikke-fortløbende dage. Alle objektglas blev evalueret af en patolog ved brug af scoringsvejledningen for blindtarmskontrolvæv for VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysen (findes i Tab. 5). Hvert replikat af blindtarmspræparatet gav ækvivalente ALK IHC-farvningsresultater. Den samlede procentvis overensstemmelse for gentagelighed på samme dag og mellem instrumenter (på 3 forskellige instrumenter) var 100 %, mens gentageligheden mellem dage (på 5 ikke-fortløbende dage) var 98 %.

Tab. 11. Gentagelighed og mellemprecision for VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse på individuelle NSCLC-præparater farvet på BenchMark XT-instrumentet.

Gentagelighed/præcision af NSCLC-væv	N = antal evaluerede objektglas i kohorten	Samlet procentvis overensstemmelse for ALK-status (95 % CI)
Gentagelighed samme dag	50	100 % (97.5–100 %)
Præcision inden for samme platform (på 3 forskellige BenchMark XT-instrumenter)	60	100 % (97.9–100 %)
Præcision mellem dage (5 ikke-fortløbende dage)	100	100 % (98.7–100 %)

Tab. 12. Gentagelighed og mellemprecision for VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse på individuelle NSCLC-præparater på BenchMark ULTRA-instrumentet.

Gentagelighed/præcision af NSCLC-væv	N = antal evaluerede objektglas i kohorten	Samlet procentvis overensstemmelse for ALK-status (95 % CI)
Gentagelighed samme dag	50	100 % (92.9–100.0 %)
Præcision inden for samme platform (på 3 forskellige BenchMark ULTRA-instrumenter)	60	100 % (94.0–100.0 %)
Præcision mellem dage	100	100 % (96.3–100.0 %)

Gentagelighed/præcision af NSCLC-væv	N = antal evaluerede objektglas i kohorten	Samlet procentvis overensstemmelse for ALK-status (95 % CI)
(5 ikke-fortløbende dage)		

Tab. 13. Præcision mellem platforme for VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse på NSCLC-præparater med flervævsblok ved hjælp af BenchMark XT- og BenchMark GX-instrumentet.

Præcision af NSCLC-væv	N = antal evaluerede objektglas i kohorten	Samlet procentvis overensstemmelse for ALK-status
Præcision mellem platforme på BenchMark XT- og BenchMark GX-instrument (på 3 forskellige instrumenter)	30	100 %

Reproducerbarhed fra lot til lot

Reproducerbarhed fra lot til lot for VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse blev bestemt ved at teste tre lots af VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse på 38 unikke NSCLC-tilfælde (21 ALK-positive præparater (fra 18 unikke tilfælde) og 20 ALK-negative NSCLC-vævspræparater) på BenchMark XT-instrumentet med brug af OptiView DAB IHC Detection- og OptiView Amplification-kits. Alle tilfælde blev farvet på to ens objektglas med hver af de tre lot af primært antistof. Objektglassene blev blindet og randomiseret inden evaluering for klinisk status bestemt med VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysens scoringsalgoritme (findes i Tab. 6). Alle tre antistof-lots viste over 90 % konkordante farvningsresultater for ALK-status på de evaluerede 41 NSCLC-vævspræparater. Resultaterne angives som værdi for samlet procentvis overensstemmelse, gennemsnitlig positiv overensstemmelse og gennemsnitlig negativ overensstemmelse. Værdien for samlet procentvis overensstemmelse mellem lots var 99,2 %. VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse er således reproducerbar for farvningsresultater på forskellige antistof-lots. Resultaterne kan ses i Tab. 14.

Reproducerbarhed fra lot til lot for VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse med BenchMark ULTRA-instrumentet blev bestemt ved at teste tre lots af VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse på 30 unikke NSCLC-tilfælde (15 ALK-positive præparater og 15 ALK-negative NSCLC-vævspræparater) med brug af OptiView DAB IHC Detection Kit og OptiView Amplification Kit. Alle tilfælde blev farvet på to ens objektglas med hver af de tre lot af primært antistof. Objektglassene blev blindet og randomiseret inden evaluering for klinisk status bestemt med VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysens scoringsalgoritme (findes i Tab. 6) af en patolog. Alle tre antistof-lots viste over 90 % konkordante farvningsresultater for ALK-status på de evaluerede 30 NSCLC-vævspræparater. Resultaterne angives som værdi for samlet procentvis overensstemmelse, gennemsnitlig positiv overensstemmelse og gennemsnitlig negativ overensstemmelse. Værdien for samlet procentvis overensstemmelse mellem lots var 99,1 %. VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse er således reproducerbar for farvningsresultater på forskellige antistof-lots. Resultaterne kan ses i Tab. 15.

Reproducerbarhed fra lot til lot af VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse blev også evalueret med brug af 12 unikke vævspræparater fra human blindtarm. Reproducerbarhed blev bestemt ved at teste tre antistof-lots kombineret med tre lots af OptiView DAB IHC Detection-kit og OptiView Amplification-kit på tre BenchMark XT-instrumenter. Den samlede overensstemmelsesrate for passende positive og negative farvningsselementer i blindtarmen ved hjælp af VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysen var 100 %.

Tab. 14. Overensstemmelsesrater for reproducerbarhed fra lot til lot på 41 NSCLC-vævspræparater på BenchMark XT-instrumentet. Enogtyve ALK-positive præparater (fra 18 unikke tilfælde) og 20 ALK-negative præparater blev testet.

Overensstemmelsesrater for reproducerbarhed fra lot til lot	Gennemsnitlig positiv overensstemmelse (95 % CI)	Gennemsnitlig negativ overensstemmelse (95 % CI)	Samlet procentvis overensstemmelse (95 % CI)
Gennemsnit af alle tre lot til lot-sammenligninger	99,2 % (97,4–100 %)	99,1 % (96,8–100,0 %)	99,2 % (97,5–100 %)

Tab. 15. Overensstemmelsesrater for reproducerbarhed fra lot til lot på 30 NSCLC-vævspræparater på BenchMark ULTRA-instrumentet. Femten ALK-positive præparater og 15 ALK-negative præparater blev testet.

Overensstemmelsesrater for reproducerbarhed fra lot til lot	Positiv procentoverensstemmelse (95 % CI)	Negativ procentoverensstemmelse (95 % CI)	Samlet procentvis overensstemmelse (95 % CI)
Gennemsnit af alle tre lot til lot-sammenligninger	98,9 % (96,8–99,6 %)	99,3 % (97,3–99,8 %)	99,1 % (97,9–99,6 %)

Undersøgelser af præcision mellem læsere

Der blev foretaget flere undersøgelser af præcision mellem læsere: To undersøgelser på BenchMark XT-instrumentet og én på BenchMark ULTRA-instrumentet.

Ved undersøgelse af præcisionen mellem læsere på BenchMark XT evaluerede tre patologer i alt 185 unikke tilfælde. De 185 tilfælde korrelerede med 100 ALK-positive og 100 ALK-negative blokke farvet med VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse. Tilfældene blev blindet og randomiseret inden evaluering for ALK IHC-farvningsresultater ved brug af scoringsalgoritmen for VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse i Tab. 6. Resultaterne, der fremgår af Tab. 16 nedenfor, afspejler præcisionsraterne mellem læsere for unikke tilfælde fra undersøgelseskohorten.

Tab. 16. Undersøgelse 1 af præcision mellem læsere på BenchMark XT-instrumentet

Præcision mellem læsere	Gennemsnitlig positiv overensstemmelse (95 % CI)	Gennemsnitlig negativ overensstemmelse (95 % CI)	Samlet procentvis overensstemmelse (95 % CI)
Gennemsnit af alle tre læsersammenligninger	98,8 % (97,3–100 %)	99,0 % (97,7–100 %)	98,9 % (97,4–100 %)

Undersøgelse 2 af præcision mellem læsere på BenchMark XT blev foretaget på en kohorte af tilfælde fra en randomiseret klinisk undersøgelse af ALK-positive NSCLC-patientpræparater med brug af Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit. Cirka 300 tilfælde blev farvet med VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse på BenchMark XT-instrumentet. Tilfældene blev blindet for ALK FISH-status, randomiseret og videregivet til tre læsere, som evaluerede ALK IHC-farvningsresultaterne ved brug af scoringsalgoritmen for VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse i Tab. 6. Resultaterne, der fremgår af Tab. 17, afspejler præcisionsraterne mellem læsere for denne kohorte af det kliniske forsøg.

Undersøgelsen af præcision mellem læsere på BenchMark ULTRA-instrumentet evaluerede en kohorte af 184 unikke NSCLC-tilfælde. Kohorten bestod af 90 ALK-positive og 94 ALK-negative tilfælde, der var farvet med VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse på BenchMark ULTRA-instrumentet. Tilfældene blev blindet, randomiseret og videregivet til tre læsere, som evaluerede ALK IHC-farvningsresultaterne ved brug af scoringsalgoritmen for VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse i Tab. 6. Tab. 18 afspejler præcisionsraterne mellem læsere fra denne undersøgelse.

Tab. 17. Undersøgelse 2 af præcision mellem læsere for ALK-status i NSCLC-præparater opnået fra klinisk metodesammenligning af kohorte 1 farvet med VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse på BenchMark XT-instrumentet.

Præcision mellem læsere	Gennemsnitlig positiv overensstemmelse (95 % CI)	Gennemsnitlig negativ overensstemmelse (95 % CI)	Samlet procentvis overensstemmelse (95 % CI)
Gennemsnit af alle tre læsersammenligninger	97.6 % (95.0–99.5 %)	99.5 % (98.9–99.9 %)	99.1 % (98.2–99.8 %)
Læser 1 sammenlignet med Læser 2	99.1 % (97.1–100 %)	99.8 % (99.4–100 %)	99.7 % (98.2–99.9 %)
Læser 1 sammenlignet med Læser 3	96.3 % (92.3–99.2 %)	99.2 % (98.3–99.8 %)	98.6 % (96.6–99.5 %)
Læser 2 sammenlignet med Læser 3	97.2 % (93.5–100 %)	99.4 % (98.6–100 %)	99.0 % (97.1–99.7 %)

Tab. 18. Præcision mellem læsere for ALK-status i NSCLC-præparater farvet med VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse på BenchMark ULTRA -instrumentet.

Præcision mellem læsere	Gennemsnitlig positiv overensstemmelse (95 % CI)	Gennemsnitlig negativ overensstemmelse (95 % CI)	Samlet procentvis overensstemmelse (95 % CI)
Gennemsnit af alle tre læsersammenligninger	98.4 % (96.5–99.6 %)	98.6 % (96.9–99.7 %)	98.5 % (96.7–99.6 %)
Læser 1 sammenlignet med Læser 2	98.9 % (96.8–100 %)	98.9 % (97.0–100 %)	98.9 % (96.0–99.7 %)
Læser 1 sammenlignet med Læser 3	98.8 % (96.7–100 %)	99.0 % (97.2–100 %)	98.9 % (96.0–99.7 %)
Læser 2 sammenlignet med Læser 3	97.6 % (94.7–99.4 %)	97.9 % (95.4–99.5 %)	97.8 % (94.4–99.1 %)

Konkordans med ALK FISH

Tre kohorter blev brugt til at sammenligne farvningsresultaterne fra VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse med ALK FISH for så vidt angår klinisk ALK-status. Kohorterne omfattede en række humane NSCLC-vævsprøver fra primære og metastatiske tumorer, inklusive tilbageskæringer, nålebiopsier, bronkiale biopsier og FFPE-celleblokke fra FNA'er. Alle undersøgelser blev scoret med brug af scoringsalgoritmen (beskrevet i Tab. 6).

Overensstemmelsesundersøgelse 1

En undersøgelse blev foretaget i et eksternt laboratorium ved at sammenligne VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse med retrospektive Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit-data. Det eksterne laboratorium farvede cirka 100 NSCLC-tilfælde ved brug af VENTANA anti-ALK (D5F3) på et BenchMark XT-instrument. VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysen viste > 98 % samlet procentvis overensstemmelse med de retrospektive Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit-data på denne NSCLC-prøvekohorte. Resultaterne er anført i Tab. 19 og Tab. 20. Bemærk, at 86 af de 100 tilfælde havde tilgængelige FISH-data og tilstrækkelig tumortilstedeværelse til at foretage sammenligning med ALK IHC-resultatet.

Tab. 19. VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse sammenlignet med Abbotts Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.

VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysesammenligning med Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit			
VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse	Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		I alt
	Positiv	Negativ	
Positiv	10	0	10
Negativ	1	75	76
I alt	11	75	86

Tab. 20. Samlede procentvise, positive og negative overensstemmelsesrater for VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse sammenlignet med Abbott Vysis Break Apart FISH Probe Kit.

Samlede procentvise, positive og negative overensstemmelsesrater			
Procent	n/n	%	95 % CI ^a
Samlet procentvis overensstemmelse	85/86	98.8	93.7, 99.8
Positiv procentoverensstemmelse	10/11	90.9	62.3, 98.4
Negativ procentoverensstemmelse	75/75	100.0	95.1, 100.0

^a Tosidet 95 %-konfidensinterval blev beregnet ud fra scoringsmetoden.

Bemærk, at forberedelsen af vævspræparater fra denne undersøgelse ikke blev verificeret til at have fulgt de anbefalede procedurer for præparatforberedelse for denne analyse.

Overensstemmelsesundersøgelse 2

En undersøgelse blev foretaget i et andet eksternt laboratorium ved at sammenligne VENTANA anti-ALK (D5F3) med Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit-data for 73 NSCLC-tilfælde (udtaget inden for en uge efter farvning). Det eksterne laboratorium farvede tilfældene ved brug af VENTANA anti-ALK (D5F3) på et BenchMark XT-instrument. VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysen viste > 93 % samlet procentvis overensstemmelse med de retrospektive Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit-data på denne NSCLC-prøvekohorte. Resultaterne er anført i Tab. 21 og Tab. 22.

Tab. 21. VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse sammenlignet med Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.

VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysesammenligning med Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit			
VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse	Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		I alt
	Positiv	Negativ	
Positiv	2	4	6
Negativ	0	56	56
I alt	2	60	62

Tab. 22. Samlede procentvis, positive og negative overensstemmelsesrater for VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse sammenlignet med Abbott Vysis Break Apart FISH Probe Kit.

Samlede procentvis, positive og negative overensstemmelsesrater			
Procent	n/n	%	95 % CI ^a
Samlet procentvis overensstemmelse	58/62	93.5 %	84.6-97.5
Positiv procentoverensstemmelse	2/2	100 %	34.2-100.0
Negativ procentoverensstemmelse	56/60	93 %	84.1-97.4

^a Tosidet 95 %-konfidensinterval blev beregnet ud fra scoringsmetoden.

Af de fire uoverensstemmende (FISH-negative, ALK IHC-positive) tilfælde blev yderligere ufarvede objektglas testet med et andet ALK (andet klonings- og detektionssystem). Tre af de fire tilfælde stemte overens med VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysen med hensyn til detektion af ALK IHC-farvning.

Der var også 10 tilfælde, hvor FISH-resultaterne var ubestemmelige eller ikke blev genereret. Fire af disse tilfælde var positive ifølge VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse og den anden ALK-klon, og seks var negative ifølge ALK IHC. Et tilfælde var positivt ifølge FISH, men der var ikke nok tilgængelig prøve til at farve med IHC.

Overensstemmelsesundersøgelse 3

I denne undersøgelse blev cirka 300 tilfælde fra en igangværende global klinisk undersøgelse af indskrevne NSCLC-patienter, der var ALK-positive med Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit, farvet med VENTANA anti-ALK (D5F3). Dette er den samme kohorte, som tidligere blev drøftet i forbindelse med undersøgelsen af præcision mellem læsere. Af de cirka 300 tilfælde blev nogle kategoriseret som "ikke-informative" med FISH eller "FISH-analyse ikke foretaget" og derpå farvet og evalueret udelukkende med oplysningsformål for øje.

Tilfældene blev blindet for FISH-status, randomiseret og videregivet til to læsere, som evaluerede farvningsresultaterne. Resultater blev sammenlignet med den FISH-status, som blev opnået i den globale kliniske undersøgelse.

Resultaterne af sammenligningen af ALK IHC og ALK FISH vises i Tab. 23.

Tab. 23. Overensstemmelse mellem VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse og Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit efter evaluering ved 2 patologer.

VENTANA anti-ALK (D5F3)- analysesammenligning med Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit				
VENTANA anti-ALK (D5F3)- analyse		Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		I alt
Læser		Positiv	Negativ	
Læser 1	Positiv	37	13	50
	Negativ	11	223	234
	I alt	48	236	284
Læser 2	Positiv	37	12	49
	Negativ	11	225	236
	I alt	48	237	285

Bemærk, at forberedelsen af vævspræparater fra denne undersøgelse ikke blev verificeret til at have fulgt de anbefalede procedurer for præparatforberedelse for denne analyse. Uoverensstemmende tilfælde, som var ALK-positive, men ALK FISH-negative med VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysen:

- Der var 4 tilfælde, som blev evalueret af mindst én læser som ALK IHC-positive, FISH-negative. Efter samstemmende gennemgang blev det fundet, at de skulle evalueres som IHC-negative. Disse tilfælde havde fokal cytoplasmisk farvning/membranfarvning og er forklaret i fortolkningsvejledningen.

- Der var 9 ALK IHC-positive, ALK FISH-negative tilfælde, som blev fundet at være ægte uoverensstemmende tilfælde.

Af de 9 uoverensstemmende tilfælde havde 7 ufarvede objektglas, der var tilgængelige til yderligere diagnostisk ALK-testning (molekylær testning og IHC-test ved brug af et andet klonings- og detektionssystem). Disse yderligere testresultater indikerede, at størstedelen af uoverensstemmende tilfælde favoriserede den positive IHC-evaluering for ALK-status, når ALK FISH var negativ. (Bemærk, at objektglas med udskæringer fra disse tilfælde overskred de anbefalede 3 måneder).

Uoverensstemmende tilfælde, som var negative med VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysen, men ALK FISH-positive:

- Der var 11 tilfælde, som var positive med FISH- men negative med VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysen. 10 tilfælde havde ufarvede objektglas, der var tilgængelige til yderligere diagnostisk ALK-testning med molekulære teknikker og IHC. Disse yderligere testresultater indikerede, at størstedelen af de tilfælde, der var negative ifølge VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse, også var negative ifølge et andet ALK IHC-system, men positive ifølge en eller flere molekulære analyser. Bemærk, at objektglas med udskæringer fra disse tilfælde overskred de anbefalede 3 måneder for ALK IHC.
- Endelig var der 14 tilfælde i kohorten, som var ikke-informative ifølge FISH (intet resultat opnået). Af disse blev 3 evalueret som positive af begge læsere ifølge VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse. Derudover var der 19 tilfælde, hvor FISH-analysen ikke kunne udføres med afsæt i H&E-objektglasset (normalt pga. utilstrækkeligt tumorindhold). Af disse evaluerede begge læsere ALK IHC-farvningsresultaterne som positive i 4 tilfælde. Derfor havde i gennemsnit 21 % af de tilfælde, hvor FISH-resultaterne ikke blev opnået, positiv ALK-status ifølge VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse.

Undersøgelse af reproducerbarhed mellem laboratorier på BenchMark XT-instrumentet

En undersøgelse af reproducerbarheden mellem laboratorier for VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse blev udført for at vise analysens reproducerbarhed ved bestemmelse af klinisk status for ALK på BenchMark XT-instrumentet ved brug af NSCLC-vævspræparater (6 ALK-positive og 6 ALK-negative) kørt på 1 reagenslot, 3 instrumenter og 5 ikke-forløbende dage på 3 eksterne laboratorier. Præparaterne blev randomiseret og evalueret af i alt 6 læsere (2 læsere pr. laboratorie), der var blindet for kohortens kliniske status for ALK. Denne kohorte indeholdt 180 objektglas genereret fra 12 NSCLC-tilfælde, der var positive og negative for ALK-ekspression ifølge IHC og FISH. Disse tilfælde blev farvet i replika over 21 dage på de 3 laboratorier. Resultaterne kan ses i Tab. 24.

Acceptkriteriefrekvensen for morfologi og baggrund i disse undersøgelser var 100 %. Undersøgelsen af reproducerbarhed mellem laboratorier (ILR) for VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse på BenchMark XT-instrumentet gav en gennemsnitlig positiv overensstemmelse (APA) og en gennemsnitlig negativ overensstemmelse (ANA) for sammenligninger mellem laboratorier, mellem læsere og mellem kørsler (dage), der blev foretaget parvist ved brug af evaluerbare observationer.

Tab. 24. ILR: Overensstemmelsesrater for VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse på BenchMark XT-instrumentet (n = 180 evaluerede objektglas).

Overensstemmelses- rater for reproducerbarhed mellem laboratorier (klinisk status for ALK)	Gennemsnitlig positiv overensstem- melse (95 % CI)	Gennemsnitlig negativ overensstem- melse (95 % CI)	Samlet procentvis overensstem- melse (95 % CI)
Mellem laboratorier (3 laboratorier)	93.8 % (76.2–100 %)	94.9 % (79.2–100 %)	94.4 % (83.3–100 %)
Mellem dage (5 ikke-fortløbende dage)	99.1 % (96.4–100 %)	99.2 % (96.9–100 %)	99.2 % (97.5–100 %)
Mellem læsere (2 læsere/laboratorie)	98.8 % (95.2–100 %)	99.0 % (95.8–100 %)	98.9 % (96.7–100 %)

Undersøgelse af reproducerbarhed mellem laboratorier på BenchMark ULTRA -instrumentet

En yderligere undersøgelse af reproducerbarheden mellem laboratorier for VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse blev udført for at vise analysens reproducerbarhed ved bestemmelse af klinisk status for ALK på BenchMark ULTRA -instrumentet ved brug af NSCLC-vævspræparater (7 ALK-positive og 7 ALK-negative) kørt på 1 reagenslot, 3 instrumenter og 5 ikke-forløbende dage på tre eksterne laboratorier på BenchMark ULTRA-instrumentet. Præparaterne blev randomiseret og evalueret af i alt 6 læsere (2 læsere pr. laboratorie), der var blindet for kohortens kliniske status for ALK. Denne kohorte indeholdt 210 objektglas genereret fra 14 NSCLC-tilfælde, der var positive og negative for ALK-ekspression ifølge IHC og FISH. Disse tilfælde blev farvet i replika over 21 dage på de 3 laboratorier. Resultaterne kan ses i Tab. 25. Den samlede endelige farvningsacceptgrad for alle poolede data var 99 %. Acceptkriteriefrekvensen for morfologi og baggrund i disse undersøgelser var 100 %. Resultaterne kan ses i Tab. 26.

ILR-undersøgelsen for VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse på BenchMark ULTRA-instrumentet gav positiv procentoverensstemmelse (PPA) og negativ procentoverensstemmelse (NPA) på alle evaluerbare observationer fra undersøgelsen ved at poole alle laboratorier, læsere og dage ved brug af konsensuscoren som referencestandard.

Tab. 25. ILR: Overensstemmelsesrater for VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse på BenchMark ULTRA-instrumentet (n = 210 evaluerede objektglas).

Overensstemmelsesrater for reproducerbarhed mellem laboratorier (klinisk status for ALK)	Positiv procentoverensstemmelse (95 % CI)	Negativ procentoverensstemmelse (95 % CI)	Samlet procentvis overensstemmelse (95 % CI)
På alle evaluerbare observationer	92.8 % (88.4, 95.6 %)	100.0 % (98.2, 100.0 %)	96.4 % (94.1, 97.8 %)

Tab. 26. Reproducerbarhed mellem laboratorier: Overensstemmelsesrater mellem læsere for VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse på BenchMark ULTRA-instrumentet (n = 210 objektglas evalueret).

Overensstemmelsesrater for reproducerbarhed mellem laboratorier (klinisk status for ALK) overensstemmelsesrater mellem læsere	Gennemsnitlig positiv overensstemmelse (95 % CI)	Gennemsnitlig negativ overensstemmelse (95 % CI)	Samlet procentvis overensstemmelse (95 % CI)
Læser A1 i forhold til A2	97.0 % (87.5–100 %)	97.3 % (89.5–100 %)	97.1 % (90.2–99.2 %)
Læser B1 i forhold til B2	93.5 % (71.4–100 %)	94.7 % (81.0–100 %)	94.2 % (86.0–97.7 %)
Læser C1 i forhold til C2	92.3 % (66.7–100 %)	93.2 % (74.7–100 %)	92.8 % (84.1–96.9 %)
Samlet	94.3 % (75.6–100 %)	95.1 % (81.6–100 %)	94.7 % (84.1–100 %)

Undersøgelsen af reproducerbarhed mellem laboratorier og mellem læsere på BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet ved brug af OptiView DAB IHC Detection- og OptiView Amplification-kits.

Undersøgelsen af reproducerbarheden mellem laboratorier af BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet for VENTANA anti-ALK (D5F3) Assay blev udført for at vise analysens reproducerbarhed ved bestemmelse af klinisk status for ALK på BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet ved brug af NSCLC-vævspræparater (14 ALK-positive og 14 ALK-negative) kørt på et reagenslot og instrument på hvert af tre eksterne laboratorier i 5 ikke-forløbende dage. Prøverne blev randomiserede og vurderet af i alt 6 læsere (2 læsere pr.

center). For hvert tilfælde blev alle evaluerbare observationer sammenlignet med den modale status for hvert tilfælde. Acceptkriterierne for objektglas med negativ reagenskontrol og ALK-farvede objektglas var 100 % for alle 420 evaluerede objektglas (140 pr. laboratorie). Se Tab. 27, Tab. 28 og Tab. 29 for resultater

ILR-analysen på VENTANA anti-ALK (D5F3) BenchMark ULTRA PLUS gav positiv procentoverensstemmelse (PPA) og negativ procentoverensstemmelse (NPA) på alle evaluerbare observationer fra undersøgelsen ved at poole alle laboratorier, læsere og dage ved brug af modal ALK-status på sagsniveau som referencestandard.

Tab. 27. Overensstemmelsesrater for reproducerbarhed mellem laboratorier for VENTANA anti-ALK (D5F3) Assay på BenchMark ULTRA PLUS-instrument (n = 420 objektglas evalueret).

Reproducerbarhed mellem laboratorier med hensyn til klinisk ALK-status	Positiv procentoverensstemmelse (95 % CI)	Negativ procentoverensstemmelse (95 % CI)	Samlet procentvis overensstemmelse (95 % CI)
På alle evaluerbare observationer	98.6 % (97.3, 99.7)	99.5 % (98.7–100 %)	99.0 % (98.3–99.7 %)

Ud over analysen med tilgangen med modal status på sagsniveau blev der også udført analyser med parvis tilgang, og resultaterne for gennemsnitlig positiv overensstemmelse (APA) og gennemsnitlig negativ overensstemmelse (ANA) er vist nedenfor.

Tab. 28. Overensstemmelsesrater for reproducerbarhed mellem laboratorier for VENTANA anti-ALK (D5F3) Assay på BenchMark ULTRA PLUS-instrument (n = 420 objektglas evalueret).

Overensstemmelsesrater for reproducerbarhed mellem laboratorier (klinisk status for ALK)	Gennemsnitlig positiv overensstemmelse (95 % CI)	Gennemsnitlig negativ overensstemmelse (95 % CI)	Samlet procentvis overensstemmelse (95 % CI)
Mellem laboratorier (3 laboratorier)	98.1 % (96.6–99.4 %)	98.1 % (96.8–99.4 %)	98.1 % (96.7–99.4 %)
Mellem dage (5 ikke-forløbende dage)	98.3 % (96.9–99.4 %)	98.3 % (97.2–99.5 %)	98.3 % (97.1–99.5 %)

Tab. 29. Reproducerbarhed mellem laboratorier: Overensstemmelsesrater mellem læsere for VENTANA anti-ALK (D5F3) Assay på BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet (n = 420 objektglas evalueret).

Reproducerbarhed mellem laboratorier med hensyn til klinisk ALK-status mellem læsere	Gennemsnitlig positiv overensstemmelse (95 % CI)	Gennemsnitlig negativ overensstemmelse (95 % CI)	Samlet procentvis overensstemmelse (95 % CI)
Læser A1 i forhold til A2	99.3 % (97.7–100 %)	99.3 % (98.0–100 %)	99.3 % (97.9–100 %)
Læser B1 i forhold til B2	94.8 % (90.5–98.6 %)	95.2 % (91.4–98.6 %)	95.0 % (91.1–98.6 %)
Læser C1 i forhold til C2	100.0 % (97.3–100 %)	100.0 % (97.3–100 %)	100.0 % (97.3–100 %)
Samlet	98.1 % (96.6–99.4 %)	98.1 % (96.7–99.4 %)	98.1 % (96.7–99.4 %)

Konkordans mellem BenchMark ULTRA PLUS- og BenchMark ULTRA-instrumenterne

Tre laboratorier i forskellige institutioner i USA deltog i undersøgelsen af konkordans mellem BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet og BenchMark ULTRA-instrumentet.

Ethundredeogfireogfyre tilfælde, der repræsenterede farvningsområdet for populationen for tilsigtet anvendelse af VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysen, blev valgt til brug i denne undersøgelse. Alle 144 tilfælde blev farvet hos Ventana på et BenchMark ULTRA ved brug af OptiView DAB IHC Detection Kit kombineret med OptiView Amplification Kit. Objektglas med udskræninger fra de samme tilfælde blev randomiseret og ligeligt fordelt (48 tilfælde pr. laboratorie) på forsøgslaboratorierne med henblik på farvning på et BenchMark ULTRA PLUS-instrument ved brug af den anbefalede farvningsprotokol med ét lot af OptiView DAB IHC Detection- og OptiView Amplification-kit. To patologer pr. laboratorie, blindet for sagsstatus, evaluerede objektglassene, som var farvet på det modsvarende BenchMark ULTRA PLUS-instrument, og kom frem til en klinisk status. Efter en to-ugers udvaskningsperiode blev modsvarende sagsobjektglas, der tidligere var farvet hos Ventana på BenchMark ULTRA-instrumentet, distribueret til de relevante laboratorier med henblik på klinisk evaluering. Derudover gennemgik en intern patolog alle objektglas i undersøgelsen og blev inkluderet som en tredje patolog for hvert af laboratorierne. Resultaterne blev analyseret af Ventana for en ALK-positiv eller -negativ klinisk status. OPA-, PPA- og NPA-raterne var henholdsvis 95,4 % (412/432), 93,5 % (202/216) og 97,2 % (210/216). De tosidede 95 % CI'er blev beregnet under anvendelse af percentil-bootstrap-metoden. Raterne for baggrundsacceptabilitet og morfologisk acceptabilitet for alle tilfælde var 100 % for begge instrumenter. Resultaterne kan ses i Tab. 30.

Tab. 30. Poolede overensstemmelsesrater mellem ALK NSCLC-tilfælde farvet med VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse på hhv. BenchMark ULTRA PLUS- og BenchMark ULTRA-instrumenter.

BenchMark ULTRA PLUS ALK-status	BenchMark ULTRA ALK-status		I alt
	Positiv	Negativ	
Positiv	202	6	208
Negativ	14	210	224
I alt	216	216	432
	n/n		% (95% CI[a])
Positiv procentoverensstemmelse	202/216		93.5 (89.5, 97.2)
Negativ procentoverensstemmelse	210/216		97.2 (94.5, 99.5)
Samlet procentvis overensstemmelse	412/432		95.4 (92.8, 97.5)

[a] Tosidede 95 % CI'er blev beregnet under anvendelse af percentil-bootstrap-metoden med 2000 replikater, der var valgt med stratificering efter kvalifikationspulje (ALK-positive, ALK-negative, vanskelige ALK-positive, vanskelige ALK-negative).

KLINISK PRÆSTATION

Metodesammenligningsundersøgelse på BenchMark XT-instrumentet

Metodesammenligningsundersøgelsens kohorter blev genereret fra to uafhængige, randomiserede kliniske forsøg med crizotinib (betegnet Forsøg 1 og Forsøg 2), der indskrev patienter med ALK-positiv NSCLC. ALK-status for disse patienter blev bestemt ved brug af Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit-analysen i det kliniske forsøg på flere centrale laboratorier. Der blev opnået gyldige Vysis ALK FISH-resultater for i alt 1644 NSCLC-vævspræparater (1018 og 626 præparater for henholdsvis Forsøg 1 og 2).

I metodesammenligningsundersøgelsen for VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse blev præparater fra patienter, som var screenet til Forsøg 1 og 2, sendt til et centrallaboratorie med henblik på farvning med VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse og evaluering af ALK IHC-status med afsæt i scoringsalgoritmen for VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysen (Tab. 6). Af de præparater, der gav valide Vysis ALK FISH-resultater i klinisk forsøgsscreening, gav 933 præparater fra Forsøg 1 (Tab. 31) og 598 præparater fra Forsøg 2 (Tab. 33) også valide resultater for VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysen.

Antallet af præparater, der gav ALK-positive og ALK-negative resultater for hver analyse, er vist i tabel 31 og 33 for hhv. kohorterne for Forsøg 1 og 2. Overensstemmelsesraterne mellem de to analyser er vist i tabel 32 og 34 for hhv. kohorterne for Forsøg 1 og 2. De rapporterede positive og negative procentoverensstemmelsesrater var hhv. 86,0 % og 96,3 % for Forsøg 1 (Tab. 32) og hhv. 92,7 % og 94,8 % for Forsøg 2 (Tab. 34).

Tab. 31. Sammenligning af ALK-status i NSCLC-præparater (kohorte fra Forsøg 1) bestemt med brug af VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse versus Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.

ALK-status		Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		
		Positiv	Negativ	I alt
VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse	Positiv	154	28	182
	Negativ	25	726	751
	I alt	179	754	933

Tab. 32. Overensstemmelsesrater mellem VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse og Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit i Forsøg 1.

Overensstemmelsesrater mellem ALK-analyser	Positiv procentoverensstemmelse (95 % CI)	Negativ procentoverensstemmelse (95 % CI)	Samlet procentvis overensstemmelse (95 % CI)
VENTANA anti-ALK (D5F3)-antistof og Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit	86.0 % (80.2–90.4 %)	96.3 % (94.7–97.4 %)	94.3 % (92.6–95.6 %)

Tab. 33. Sammenligning af ALK-status i NSCLC-præparater (kohorte fra Forsøg 2) bestemt med brug af VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse versus Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.

ALK-status		Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		
		Positiv	Negativ	I alt
VENTANA anti-ALK (D5F3)-antistof	Positiv	179	21	200
	Negativ	14	384	398
	I alt	193	405	598

Tab. 34. Overensstemmelsesrater mellem VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse og Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit i Forsøg 2.

Overensstemmelsesrater mellem ALK-analyser	Positiv procentoverensstemmelse (95 % CI)	Negativ procentoverensstemmelse (95 % CI)	Samlet procentvis overensstemmelse (95 % CI)
VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse og 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 %)

Bemærk, at vævsprøverne i Forsøg 1 og Forsøg 2 ikke blev verificeret til at være blevet forberedt i overensstemmelse med de anbefalede procedurer for prøveforberedelse til VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse.

Undersøgelse af klinisk udfald med crizotinib

Analysen af den kliniske effektivitet af VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysen som et diagnostisk udstyr til udvælgelse af patienter, der kunne have gavn af behandling med crizotinib, et ALK-måltret stof, var baseret på Forsøg 1. Disse patienter blev testet med

VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse i metodesammenligningsundersøgelsen og i en yderligere undersøgelse. Forsøg 1 var en multinationel, randomiseret, åben fase 3-undersøgelse med flere forsøgscentre til vurdering af effektivitet og sikkerhed af crizotinib sammenlignet med førstvalgschemoterapi (pemetrexed/cisplatin eller pemetrexed/carboplatin) hos tidligere ubehandlede patienter med ALK-positiv fremskredt ikke-pladeepitel-NSCLC. Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit (ALK FISH) blev anvendt til at bestemme ALK-positivitet og egnethed til deltagelse i Forsøg 1. Baseret på resultaterne af Vysis ALK FISH-analysen var der 343 patienter i det randomiserede sæt (172 i forsøgsarmen med crizotinib og 171 i forsøgsarmen med kemoterapi). I undersøgelsen af klinisk udfald af VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysen blev vævspræparater fra Forsøg 1 testet retrospektivt med VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysen. Af de 343 patienter, der var indskrevet i Forsøg 1, var 133 blevet testet med VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse under protokollen fra metodesammenligningsundersøgelsen, og yderligere 39 patienter var blevet testet under en separat undersøgelsesprotokol, hvilket betød, at i alt 172 patienter var blevet testet med VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysen. Af disse patienter blev 166 diagnosticeret som ALK-positiv eller ALK-negativ ifølge ALK (D5F3) IHC. De overordnede resultater for effektivitet for disse patienter er opsummeret i VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyseresultater i Tab. 35.

Tab. 35. Klinisk fordel ved crizotinib (progressionsfri overlevelse) for patienter, der var indskrevet i Forsøg 1.

ALK-status		HR ^a	SE ^a	95 % CI ^a	Antal deltagere	
					Forsøgsarm med kemoterapi	Forsøgsarm med crizotinib
Antal deltagere i alt	FISH+	0.454	0.139	(0.346, 0.596)	171	172
	FISH+ ^b	0.407	0.214	(0.267, 0.618)	82	90
	FISH+/IHC+	0.401	0.237	(0.252, 0.639)	63	78
Testet ALK-IHC	FISH+/IHC-	1.711	0.703	(0.431, 6.789)	17	8

^a Observeret hazard ratio (HR) for progressionsfri overlevelse (PFS) af crizotinib versus kemoterapi; standardfejl (SE); og 2-sidet 95 % konfidensinterval (CI). Resultaterne blev estimeret ved hjælp af en stratificeret Cox-model med følgende strata: race, hjernemetastase og ECOG-score.

^b For to ALK FISH+ patienter i forsøgsarmen med kemoterapi og 4 patienter i forsøgsarmen med crizotinib blev der ikke opnået noget positivt eller negativt ALK IHC-resultat.

Yderligere beregningsanalyser blev udført for at inkludere patienter med manglende eller ugyldige testresultater med VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse og for at evaluere robustheden af undersøgelsens konklusioner. Statistisk analyse af uoverensstemmende patienter, der ikke var tilmeldt Forsøg 1, omfattede simulering af en række mulige udfald for disse patienter. Resultaterne fra alle de hypotetiske analyser svarede generelt til resultaterne fra den primære effektivitetsanalyse.

Uoverensstemmende tilfælde med FISH+/IHC- fra Forsøg 1:

Metodesammenligningsundersøgelse

I metodesammenligningsundersøgelsen (Tab. 35) blev 25 patienter fra Forsøg 1 evalueret som FISH+/IHC-. Medianscoren for Vysis ALK FISH (% af tumorceller, der er positive for ALK-genomlejring) for disse tilfælde var 20 % (gennemsnit 31.6 %, SD 21.58 %), og i 14 af disse tilfælde var FISH-scoren 25 % eller lavere. Alle disse tilfælde havde Vysis ALK FISH-scoring, der lå over grænsen på 15 % for ALK-positivitet, og dermed lå disse scorer i det tvetydige område for FISH (10 %–50 %). Som kontrast var medianscoren for FISH hos alle indskrevne patienter, der var testet med IHC, 58 % (gennemsnit 56.9 %, SD 21.97 %).

Undersøgelse af klinisk udfald

I undersøgelsen af klinisk udfald blev de 25 patienter, der var indskrevet i Forsøg 1, evalueret som FISH+/IHC- (se sidste række i Tab. 35). Otte af disse tilfælde blev randomiseret til crizotinib-armen i det kliniske forsøg. Af disse patienter havde fem FISH-scoring, som var meget tæt på FISH- grænsen (15 %–18 % af tumorceller positive for ALK-

genomlejring) og viste også objektiv progression eller stabil sygdom/ingen respons. To af de 8 patienter havde FISH-scoring, der lå uden for det tvetydige område for FISH (66 % og 72 % af tumorceller positive for ALK-genomlejring), og delvis objektiv tumorrespons. Den ottende IHC-patient var FISH- og blev fejlagtigt indskrevet. Denne patient viste ubestemmelig respons.

Uoverensstemmende tilfælde med FISH-/IHC+ fra Forsøg 1

I metodesammenligningsundersøgelsen for VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysen blev 28 tilfælde, der var screenet til Forsøg 1, evalueret som FISH-/IHC+. FISH var analysen til det kliniske forsøg, og kun tilfælde med FISH+ blev indskrevet i Forsøg 1, hvorfor der ikke er tilgængelige data for uoverensstemmende tilfælde med FISH-/IHC+.

Undersøgelse af klinisk udfald med ceritinib

Analysen af den kliniske effektivitet af VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysen som et diagnostisk udstyr til udvælgelse af patienter, der kunne have gavn af behandling med ceritinib, var baseret på en åben, randomiseret fase 3-undersøgelse med aktiv kontrol og flere forsøgscentre (Forsøg 3) af oral ceritinib. Denne undersøgelse sammenlignede den kliniske effektivitet og sikkerhed af ceritinib-behandling med kemoterapi (platinbaseret dublet med pemetrexed efterfulgt af pemetrexed-vedligeholdelse hos patienter uden progressiv sygdom efter 4 cyklusser) hos tidligere ubehandlede voksne patienter med ALK-positiv, lokalt fremskredne eller metastatiske ikke-pladeepitel-NSCLC. VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse blev anvendt på BenchMark XT-instrumentet til test af i alt 1778 patienter for egnethed til deltagelse i Forsøg 3, som krævede en positiv ALK-status. I alt 376 patienter, hvis tumorer gav ALK-positive resultater fra analysen, var i det randomiserede sæt (189 i ceritinib-armen og 187 i kemoterapi-armen). De overordnede resultater for effektivitet for de ceritinib-behandlede patienter er opsummeret i Tab. 36. Ceritinib udviste en statistisk signifikant og klinisk betydende fordel i forhold til kemoterapi med en 45 % risikoreduktion i PFS pr. BIRC (HR = 0.55; 95 % CI: 0.42, 0.73; $p < .001$) for patienter, der var udvalgt ved hjælp af VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysen. Median-PFS pr. BIRC-vurdering var 16.6 måneder (95 % CI: 12.6, 27.2) og 8.1 måneder (95 % CI: 5.8, 11.1) for forsøgsarmene med henholdsvis ceritinib og kemoterapi.

Tab. 36. Klinisk fordel ved ceritinib (progressionsfri overlevelse), der var indskrevet i Forsøg 3.

Progressionsfri overlevelse	Ceritinib (N = 189)	Kemoterapi (N = 187)
Median, måneder (95 % CI) ^a	16.6 (12.6, 27.2)	8.1 (5.8, 11.1)
HR (95 % CI) ^b	0.55 (0.42, 0.73)	
p-vægtet ^c	< 0.001	

HR = hazard ratio; CI = konfidensinterval; BIRC = Blinded Independent Review Committee; NR = ikke nået; NE = ikke evaluerbar

^a Estimeret ved hjælp af Kaplan-Meier-metoden.

^b En Cox-regressionsmodel stratificeret efter faktorer til randomiseret stratifikation (WHO-ydeevnestatus: 0 versus 1–2; med eller uden BM, med eller uden forudgående neo-/adjuverende kemoterapi) blev brugt til at estimere fareforholdet for PFS sammen med 95 % CI baseret på Wald-testen.

^c Baseret på den stratificerede log-rank-test (samme stratifikation som bemærkning b).

Farvningsacceptabilitetsrater for VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse i beregnet til at diagnosticere-population (de 1778 patienter, der blev testet med analysen) er angivet i Tab. 37. Raterne for godkendt morfologi og godkendt baggrund for VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysefarvede objektglas fremgår også. Den første VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysefarvning mislykkedes for 122 præparater, og der blev gjort endnu et forsøg på farvning. Ved det sidste farvningsforsøg forblev 48 af de 122 prøver uacceptable (1 på grund af ugyldig kørselskontrol, 30 på grund af uacceptabel H&E og 12 på grund af uacceptabel negativ reagenskontrol, 1 på grund af uacceptabel baggrund, 2 på grund af uacceptabel baggrund og morfologi, og 2 på grund af uevaluerbart IHC-objektglas). VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysen viste høje indledende og samlede endelige farvningsacceptgrader; henholdsvis 93.1 % og 97.3 %. De endelige frekvenser af morfologisk acceptabilitet og baggrundsacceptabilitet var 99 % eller større.

Tab. 37. Præstationskarakteristika for den første og sidste VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysefarvning af præparater i NSCLC-undersøgelsen screenet for indskrivning i Forsøg 3.

Evaluerede farvningssegenskaber	Acceptkriteriefrekvens % (n/N) (95 % CI)	
	Første farvningsforsøg	Sidste farvningsforsøg
Samlet rate for ALK-IHC-farvningsacceptabilitet	93.1 % (1656/1778) (91.9–94.2 %)	97.3 % (1730/1778) (96.4–98.0 %)
Baggrundsfarvning	99.0 % (1655/1672) (98.4–99.4 %)	99.8 % (1727/1730) (99.5–99.9 %)
Morfologi	99.0 % (1657/1674) (98.4–99.4 %)	99.9 % (1728/1730) (99.6–100 %)

Undersøgelse af klinisk udfald med alectinib

Analysen af den kliniske effektivitet af VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysen som et diagnostisk udstyr til udvælgelse af patienter, der kunne have gavn af behandling med alectinib, var baseret på en åben, randomiseret fase 3-undersøgelse med aktiv kontrol og flere forsøgscentre (forsøg BO28984) af oral alectinib. Denne undersøgelse sammenlignede den kliniske effektivitet og sikkerhed af ceritinib-behandling med crizotinib hos tidligere ubehandlede voksne patienter med ALK-positive, lokalt fremskredne eller metastatiske NSCLC. VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse blev anvendt på BenchMark XT-instrumentet til test af i alt 1239 patienter for egnethed til deltagelse i forsøg BO28984, som krævede en positiv ALK-status ved central testning. I alt 303 patienter, hvis tumorer gav ALK-positive resultater fra analysen, blev randomiseret og analyseret for effektivitet (152 i alectinib-armen og 151 i crizotinib-armen). Resultaterne for samlet effektivitet er opsummeret i Tab. 38. Alectinib viste en statistisk signifikant og klinisk meningsfuld fordel i forhold til crizotinib med en 53 % risikoreduktion i PFS pr. investigators vurdering (HR = 0.47, 95 % CI: 0.34, 0.65; $p < 0.0001$) og en 50 % risikoreduktion i PFS pr. IRC (HR = 0.50, 95 % CI: 0.36, 0.7; $p < 0.0001$), for patienter, der var udvalgt ved hjælp af VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysen. Median-PFS pr. investigators vurdering er ikke opnået i alectinib-armen og var pr. IRC-vurdering 25.7 måneder (95 % CI: 19.9, NE) og 10.4 måneder (95 % CI: 7.7, 14.6) for henholdsvis alectinib- og crizotinib-armene.

Tab. 38. Klinisk fordel ved alectinib eller crizotinib (progressionsfri overlevelse) for patienter, der var indskrevet i forsøg BO28984.

Forskervurderet progressionsfri overlevelse	Alectinib (N = 152)	Crizotinib (N = 151)
Median, måneder (95 % CI) ^a	NE (17.7, NE %)	11.1 (9.1, 13.1 %)
HR (95 % CI) ^b	0.47 (0.34, 0.65 %)	
p-vægtet ^c	< 0.0001	
IRC-vurderet progressionsfri overlevelse	Alectinib (N = 152)	Crizotinib (N = 151)
Median, måneder (95 % CI) ^a	25.7 (19.9, NE %)	10.4 (7.7, 14.6 %)
HR (95 % CI) ^b	0.50 (0.36, 0.70 %)	
p-vægtet ^c	< 0.0001	

HR = hazard ratio; CI = konfidensinterval; IRC = Independent Review Committee; NE = ikke evaluerbar

^a Estimeret ved hjælp af Kaplan-Meier-metoden.

^b Hazard ratio blev evalueret ud fra Cox-regression, stratificeret for kovariaterne Race (asiatisk versus ikke-asiatisk) og CNS-metastaser ved baseline (tilstedeværelse/fravær) ved IRC

^c Baseret på den stratificerede log-rank-test (samme stratifikation som [b]).

Farvningsacceptabilitetsrater for VENTANA anti-ALK (D5F3)-analyse i beregnet til at diagnosticere-population (de 1239 patienter, der blev testet med analysen) var sammenlignelige med resultaterne i forsøg A2301.

Undersøgelse af klinisk udfald med lorlatinib

Effektiviteten af lorlatinib til behandling af patienter med ALK-positiv NSCLC, som ikke havde modtaget tidligere systemisk behandling for metastatisk sygdom, blev fastslået i en åben, randomiseret, aktivt kontrolleret multicenterundersøgelse (undersøgelse B7461006; NCT03052608; CROWN). Patienterne skulle have en ECOG-præstationsstatus på 0–2 og ALK-positiv NSCLC som identificeret af VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysen. Neurologisk stabile patienter med behandlede eller ubehandlede asymptomatiske metastaser i centralnervesystemet (CNS), inklusive leptomeningeale metastaser, var kvalificerede.

I alt 296 patienter blev randomiseret 1:1 til at modtage lorlatinib 100 mg oralt én gang dagligt (n = 149) eller crizotinib 250 mg oralt to gange dagligt (n = 147). Randomisering blev stratificeret efter etnisk oprindelse (asiatisk versus ikke-asiatisk) og tilstedeværelse eller fravær af CNS-metastaser ved baseline. I begge forsøgsarme blev behandlingen fortsat frem til sygdomsprogression eller uacceptabel toksicitet. Den primære måling af effektivitetsresultat var progressionsfri overlevelse (PFS) som bestemt på baggrund af Blinded Independent Central Review (BICR) i henhold til en version 1.1 (RECIST v1.1). Resultaterne af undersøgelsen viste en væsentlig og statistisk signifikant forbedring af PFS for lorlatinib-armen i forhold til crizotinib-armen med en 72 % reduktion i risikoen for sygdomsprogression eller død pr. BICR (HR = 0.28; 95 % CI: 0.19, 0.41; $p < 0.0001$; Tab. 39). OS-data var umodne på tidspunktet for de kliniske datas cut-off.

Undergruppeanalyser hos deltagere med eller uden hjernemetastase ved baseline gav resultater i overensstemmelse med det primære PFS-resultat. Sandsynligheden for, at CNS ville være det første sted med sygdomsprogression, alene eller med samtidig systemisk progression, var markant lavere i lorlatinib-armen (2.7 %) end i crizotinib-armen (23.8 %), med en årsagsspecifik stratificeret HR på 0.06 (95 % CI: 0.02, 0.18).³⁶

Tab. 39. Overordnede resultater for effektivitet i undersøgelse B7461006 (CROWN).

Progressionsfri overlevelse (BICR-vurderet)	Lorlatinib (N = 149)	Crizotinib (N = 147)
Antal hændelser, n (%)	41 (27.5 %)	86 (58.5 %)
Progressiv sygdom, n (%)	32 (21.5 %)	82 (55.8 %)
Dødsfald, n (%)	9 (6.0 %)	4 (2.7 %)
Sandsynlighed for PFS efter 12 måneder (95 % CI) ^a	0.78 (0.70, 0.84)	0.39 (0.30, 0.48)
Fareforhold (95 % CI) ^b	0.28 (0.19, 0.41)	
p-værdi ^c	< 0.0001	

Forkortelser: CI = konfidensinterval; NE = ikke evaluerbar; PFS = progressionsfri overlevelse.

^a CI'er blev udledt ved hjælp af log-log-transformationen med tilbagetransformation til oprindelig skala.

^b Stratificeret fareforhold baseret på Cox proportional fare-model.

^c Enkelt-sided p-værdi baseret på stratificeret log-rank-test.

Test med VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysen af 232 screeningsprøver i undersøgelse B7461006 på centrale laboratorier gav farvningsacceptabilitetsrater, der var næsten identiske med dem, der blev observeret i forsøg A2301.

KONKLUSION

VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysen er reproducerbar med hensyn til den farvningsresultater for klinisk ALK-status på BenchMark IHC/ISH-instrumenterne. Den binære scoringsalgoritme er meget reproducerbar mellem forskellige læsere. Analysen er konkordant med Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit for ALK-status. VENTANA anti-ALK (D5F3)-analysen kan bruges til at identificere patienter, der er egnede til behandling med XALKORI® (crizotinib), ZYKADIA® (ceritinib) eller ALECENSA® (alectinib) eller lorlatinib.

FEJLFINDING

Hvis der observeres fejlbehæftet farvning på kontroller af enten humant NSCLC- eller blindtarmsvæv på systemniveau, eller patientpræparater, skal du kontrollere, at instrumentvedligeholdelsen er blevet fulgt korrekt for BenchMark IHC/ISH-instrumentet. Hvis der ikke er nogen tekniske problemer eller afvigelser, skal du kontakte din lokale supportrepræsentant, inden du udfører en gentagelse af en kørsel.

REFERENCER

- Kutok JL, Aster JC, et al. Molecular biology of anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large-cell lymphoma. *J Clin Onc.* 2002;20(17):3691-3702.
- Iwahara T, et al. Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene.* 1997;14:439-49.
- Soda M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature.* 2007;448(7153):561-66.
- Inamura K, et al. EML4-ALK fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers. *J Thorac Oncol.* 2008;3(1):13-17.
- Choi YL, et al. Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2008;68(13):4971-6.
- Koivunen JP, et al. EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(13):4275-83.
- Shimura K, et al. EML4-ALK fusion transcripts, but not NPM-, TPM3-, CLTC-, ATIC-, or TFG-ALK fusion transcripts, in non-small cell lung carcinomas. *Lung Cancer.* 2008;61:163-9.
- Takeuchi K, et al. Multiplex reverse transcription-PCR screening for EML4-ALK fusion transcripts. *Clin Cancer Res.* 2008;14(20):6618-24.
- Shaw AT, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol.* 2009;27(26):4247-53.
- Yi ES, et al. Correlation of IHC and FISH for ALK gene rearrangement in non-small cell lung carcinoma: IHC score algorithm for FISH. *J Thorac Oncol.* 2011;6(3):459-65.
- McLeer-Florin A, et al. Dual IHC and FISH testing for ALK gene rearrangement in lung adenocarcinomas in a routine practice: a French study. *J of Thorac Oncol.* 2012;7(2):348-54.
- Christensen JG, et al. Cytoreductive antitumor activity of PF-2341066, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experimental models of anaplastic large-cell lymphoma. *Mol Cancer Ther.* 2007;6(12 Pt 1):3314-22.
- Yamazaki S, et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of crizotinib for anaplastic lymphoma kinase inhibition and antitumor efficacy in human tumor xenograft mouse models. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;340(3):549-57.
- XALKORI method sheet. Pfizer. Document ID:6427427a-821b-48b4-8f06-0477f0ae4e36. LAB-0441-6.0 June 2014
- ZYKADIA method sheet. Novartis. Document ID:T2015-114/T2015-115. July 2015.
- H Sakamoto, et al. CH5424802, a selective ALK inhibitor capable of blocking the resistant gatekeeper mutant. *Cancer Cell.* 2011;19(5):679-90.
- Kodama T, et al. Antitumor activity of the selective ALK inhibitor alectinib in models of intracranial metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014;75(5):1023-28.
- Gadgeel S, et al. Safety and activity of alectinib against systemic disease and brain metastases in patients with crizotinib-resistant ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (AF-002JG): results from the dose finding portion of a phase 1/2 study. *Lancet Oncol.* 2014;15(10):1119-28.
- Shaw A, et al. Alectinib in ALK-positive, crizotinib-resistant, non-small-cell lung cancer: a single-group, multicenter, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(2):234-42.
- ALECENSA method sheet. https://www.gene.com/download/pdf/alecensa_prescribing.pdf
- Alunbrig: EPAR- Product Information. <http://www.ema.europa.eu/>
- Johnson T, Richardson P, et al. Discovery of (10R)-7-amino-12-fluoro-2,10,16-trimethyl-15-oxo-10,15,16,17-tetrahydro-2H-8,4- (m etheno)pyrazolo[4,3-h] [2,5,11]-benzoxadiazacyclotetradecine-3-carbonitrile (PF-06463922), a macrocyclic inhibitor of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and c-ros oncogene 1 (ROS1) with preclinical brain exposure and broadspectrum potency against ALK-resistant mutations. *J Med Chem* 2014;57:4720-44.
- Gainor J, Dardaei L, et al. Molecular mechanisms of resistance to first and second generation ALK inhibitors in ALK-rearranged lung cancer. *Cancer Discov* 2016;6:1118-33.
- Zou H, Qiuhua L. et al. PF-06463922 is a potent and selective next-generation ROS1/ALK inhibitor capable of blocking crizotinib-resistant ROS1 mutations. *Proc Natl Acad Sci.* 2015;112(11):3493-3498.
- Galetta D, et al. The emerging role of ALK inhibitors in the treatment of advanced non-small cell lung cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2012 Suppl 2:S545-54.
- Jokoji R, et al. Combination of morphological feature analysis and immunohistochemistry is useful for screening of EML4-ALK-positive lung adenocarcinoma. *J Clin Pathol.* 2010;63(12):1066-70.
- Mino-Kenudson M, et al. A novel, highly sensitive antibody allows for the routine detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas by standard immunohistochemistry. *Clin Cancer Res.* 2010;16(5):1561-71.
- Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and practice of Histotechnology, 2nd edition. St. Louis: The C.V. Mosby Company; 1980.
- Carson F, Hladik C. Histotechnology: A Self Instructional Text, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
- Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
- Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
- Roche PC, Hsi ED. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. In: NR Rose, ed. ASM Press; 2002.
- NordicQC: Nordic Immunohistochemical Quality Control Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) (lung protocol). Assessment Run 39 2013. http://www.nordicqc.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.
- 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.
- LORBRENA package insert (method sheet).

BEMÆRK: Der anvendes altid et punktum i dette dokument som decimaltegn til markering af grænsen mellem det hele tal og de efterfølgende decimaler. Der anvendes ikke tusindtalsseparatorer.

Sammenfatningen af sikkerhed og ydeevne kan findes her: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>

Symboler

Ventana bruger følgende symboler og tegn ud over dem, der er anført i ISO 15223-1-standard (for USA: se dialog.roche.com for definition af anvendte symboler):



Globalt vareidentifikationsnummer



Unik enhedsidentifikation



Angiver den enhed, der importerer det medicinske udstyr i EU

REVISIONSHISTORIK

Rev	Opdateringer
B	Opdateringer i afsnittene Klinisk betydning, Advarsler og forsigtighedsregler, Farvningsprocedure, Fortolkning af farvningen/forventede resultater, Analytisk ydeevne, Referencer og Ophavsret. BenchMark ULTRA PLUS-instrument er blevet tilføjet.

OPHAVSRET

VENTANA, BENCHMARK, OPTIVIEW og VENTANA-logoet er varemærker tilhørende Roche.

Alle andre varemærker tilhører deres respektive ejere.

© 2022 Ventana Medical Systems, Inc.

Sælges med licens fra



KONTAKTOPLYSNINGER



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

www.roche.com

