

VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

REF 790-4794

06679072001

IVD  50

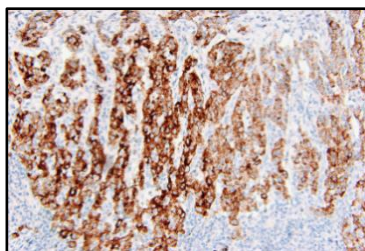


Figura 1. Espressione con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) su carcinoma del polmone non a piccole cellule.

USO PREVISTO

VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody è destinato all'uso in laboratorio per la rilevazione qualitativa della proteina chinasi del linfoma anaplastico (ALK) in tessuto di carcinoma del polmone non a piccole cellule (NSCLC) fissato in formalina e incluso in paraffina a seguito della colorazione su uno strumento BenchMark IHC/ISH. È indicato come ausilio all'identificazione dei pazienti idonei al trattamento con XALKORI® (crizotinib), ZYKADIA®

(ceritinib), ALECENSA® (alectinib) o lorlatinib.

I risultati ottenuti tramite questo prodotto devono essere interpretati da un patologo qualificato in un quadro che consideri anche gli esami istologici, i dati clinici pertinenti e i controlli adeguati.

Questo anticorpo è indicato per uso diagnostico in vitro (IVD).

SOMMARIO E SPIEGAZIONE

La proteina chinasi del linfoma anaplastico (ALK) è un recettore tirosin-chinasi appartenente alla super-famiglia di recettori dell'insulina.¹ L'ALK è una glicoproteina di membrana di tipo I normalmente espressa nel sistema nervoso.² Il gene ALK è localizzato sul cromosoma 2p23 ed è costituito da 2 introni di grandi dimensioni e 26 esoni.¹ La patogenesi molecolare riguardante l'ALK ha inizio con riarrangiamenti cromosomici che accoppiano le sequenze di codifica 3' del dominio di segnalazione intracellulare ALK agli elementi promotori 5' e a sequenze di codifica di altri geni. Gli elementi promotori 5' e le sequenze di codifica stimolano la sovraespressione e l'oligomerizzazione indipendente dal ligando delle proteine chimeriche, caratteristiche comuni nelle neoplasie umane da tirosin-chinasi di fusione.

Nel 2007 è stata scoperta in linee cellulari NSCLC e campioni clinici archiviati un'inversione nel cromosoma 2p che determina la formazione di un prodotto di fusione genica costituito da regioni del gene della proteina 4 associata al microtubulo di echinodermi (EML4) e del gene ALK.³ Una serie di studi pubblicati successivamente ha evidenziato che gli eventi di inversione EML4-ALK producono almeno 9 varianti di proteina-chinasi di fusione cataliticamente attive, ciascuna contenente la medesima regione del dominio chinasi C-terminale di ALK.⁴⁻⁸ Analogamente al caso delle fusioni di geni ALK inizialmente identificate nel linfoma anaplastico a grandi cellule (ALCL), è stato dimostrato che la proteina di fusione EML4-ALK possiede attività trasformante. In accordo con tale risultato, è stato segnalato che l'espressione di EML4-ALK nelle cellule epiteliali degli alveoli polmonari in topi transgenici costituisce un potente fattore oncogeno.⁹

SIGNIFICATIVITÀ CLINICA

L'NSCLC è il tipo più comune di cancro del polmone. Attualmente l'ALK è riconosciuta come un fattore oncogeno chiave nell'NSCLC e, sebbene l'EML4 sia il partner di fusione predominante, sono stati identificati altri geni partner di fusione.^{10,11} L'incidenza dei riarrangiamenti del gene ALK sembra rientrare nell'intervallo 2-7%, il che si traduce in circa 6000 pazienti ALK-positivi/anno negli Stati Uniti (USA) e in 40000 pazienti/anno in tutto il mondo.^{3,4,7}

L'ampia maggioranza dei riarrangiamenti del gene ALK nel cancro del polmone è stata riscontrata in campioni di adenocarcinoma anziché in campioni che presentano istologia a cellule squamose o piccole cellule.³⁻⁸ Alcune evidenze suggeriscono una correlazione tra i riarrangiamenti del gene ALK e l'NSCLC in pazienti "mai fumatori o fumatori leggeri",

sebbene tale co-fattore potrebbe non essere statisticamente significativo.^{3,4,7,9} È importante sottolineare che i riarrangiamenti del gene ALK raramente coincidono con mutazioni EGFR, HER2 o KRAS, a dimostrazione del fatto che la positività ad ALK è un sottotipo distinto di patologia.⁹

XALKORI® è una piccola molecola selettiva ATP-competitiva inibitrice delle tirosin-chinasi ALK, ROS1 e c-Met/Hepatocyte Growth Factor Receptor (HGFR) e delle loro varianti oncogeniche (ad esempio proteine di fusione ALK o ROS1 o varianti mutanti c-Met/HGFR). XALKORI® ha presentato inibizione dipendente dalla concentrazione della fosforilazione di ALK e c-Met in analisi basate su cellule con l'uso di linee cellulari tumorali. Ha inoltre presentato attività antitumorale in topi recanti xenograft tumorali esprimenti proteine di fusione EML4- o NPM-ALK o Met.^{12,13,14}

ZYKADIA® è un inibitore delle chinasi. I target dell'inibizione esercitata da ZYKADIA® identificati in analisi biochimiche o cellulari a concentrazioni clinicamente rilevanti includono l'ALK, il recettore del fattore di crescita 1 insulino-simile (IGF-1R), il recettore dell'insulina (InsR) e ROS1. Tra questi target, ZYKADIA® presenta la massima attività nei confronti di ALK. ZYKADIA® ha evidenziato inibizione dell'autofosforilazione di ALK, inibizione della fosforilazione ALK-mediata della proteina di segnale a valle STAT3 e della proliferazione delle cellule tumorali ALK-dipendenti in analisi in vitro e in vivo.

ZYKADIA® ha evidenziato inibizione della proliferazione in vitro di linee cellulari esprimenti proteine di fusione EML4-ALK e NPM-ALK e inibizione dose-dipendente della crescita di xenograft NSCLC EML4-ALK-positivi in topi e ratti.¹⁵

La significatività clinica dei riarrangiamenti del gene ALK è stata dimostrata in studi clinici randomizzati a controllo attivo di XALKORI®, condotti da Pfizer, e di ZYKADIA®, condotti da Novartis.^{14,15}

ALECENSA® è un inibitore delle tirosin-chinasi ALK e RET ad alta selettività e potenza, che inibisce i pathway di segnalazione intracellulare coinvolti nella proliferazione e sopravvivenza delle cellule tumorali e, pertanto, favorisce la morte delle cellule tumorali e ne inibisce crescita e proliferazione.¹⁶ Sulla base di dati preclinici, ALECENSA® non è un substrato dei trasportatori di efflusso (PGP o BCRP) nella barriera ematoencefalica e può pertanto distribuirsi ed essere trattenuto all'interno del sistema nervoso centrale. ALECENSA® ha indotto la regressione del tumore in modelli xenograft murini preclinici, nonché un'attività antitumorale nel cervello, e ha prolungato la sopravvivenza in modelli animali di tumore intracranico.¹⁷ ALECENSA® è ben tollerato e presenta un profilo di sicurezza gestibile.¹⁸⁻²⁰

Lorlatinib è una piccola molecola di terza generazione, selettiva, adenosina trifosfato (ATP)-competitiva, penetrante nel cervello e inibitrice della tirosin-chinasi ALK. È sviluppata per oltrepassare o prevenire i meccanismi principali di resistenza che si sviluppano in seguito a precedente trattamento a base di inibitori di ALK e per attraversare la barriera ematoencefalica. Lorlatinib inoltre è un potente inibitore della tirosin-chinasi ROS1.²¹ In vitro, lorlatinib inibisce potentemente l'attività catalitica di ALK non mutata e di un'ampia varietà di chinasi ALK mutanti clinicamente rilevanti, incluse quelle che conferiscono resistenza agli inibitori della tirosin-chinasi ALK di prima e seconda generazione.²² Lorlatinib ha evidenziato una marcata attività antitumorale a basse concentrazioni nanomolari plasmatiche libere in modelli animali recanti mutazioni ALK, incluse quelle che conferiscono resistenza agli inibitori di ALK di prima e seconda generazione. Lorlatinib ha provocato riduzione del tumore e prolungato la sopravvivenza grazie all'attraversamento della barriera ematoencefalica e conseguendo un'efficace esposizione del cervello in modelli animali ortotopici.^{23,24}

VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (analisi VENTANA anti-ALK (D5F3)) ha evidenziato concordanza con Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit (ALK FISH) nella determinazione dello stato ALK dell'NSCLC dei pazienti. ALK FISH può presentare complessità di natura tecnica nella valutazione dei risultati della colorazione. I riarrangiamenti intracromosomici possono dare luogo a sottili suddivisioni del segnale, determinando risultati potenzialmente falsi negativi.²⁵ Studi recenti indicano che l'IHC è una tecnica sensibile e specifica per la determinazione dello stato ALK e costituisce un'alternativa plausibile all'ALK FISH.^{10,11,25,26,27} L'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) e il relativo algoritmo di valutazione associato sono stati sviluppati per determinare lo stato ALK in campioni NSCLC.

Piccoli campioni di tessuto possono essere facilmente utilizzati nell'immunohistochimica (IHC) di routine, il che rende questa tecnica, in abbinamento agli anticorpi che rilevano gli antigeni importanti per l'interpretazione del carcinoma, uno strumento efficace per il patologo nella formulazione della diagnosi e della prognosi della malattia. L'ALK è un importante indicatore dell'NSCLC.

L'interpretazione dei risultati della colorazione con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) di campioni di tessuto deve essere effettuata utilizzando l'algoritmo di valutazione

consigliato. La preservazione della morfologia del tessuto, vantaggio tipico dei preparati istologici dei tessuti, è di ausilio nell'interpretazione della positività ad ALK del campione. Tutti gli esami istologici devono essere interpretati da un patologo e i risultati devono essere integrati da studi morfologici e controlli appropriati e utilizzati in combinazione con altri dati clinici e di laboratorio. Tempo di fissazione, tipo di fissativo ed età dei vetrini tagliati esercitano effetti sugli antigeni target delle analisi IHC; pertanto è necessario prestare attenzione a garantire la compatibilità della preparazione dei campioni prima della colorazione (fare riferimento alla guida all'interpretazione di VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody per il carcinoma del polmone non a piccole cellule (NSCLC) (P/N 1011879) e alla successiva sezione Limitazioni specifiche).

PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

L'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) è un anticorpo primario monoclonale di coniglio che si lega all'ALK nelle sezioni di tessuto incluse in paraffina. Lo specifico anticorpo può essere visualizzato utilizzando OptiView DAB IHC Detection Kit (n. di cat. 760-700 / 06396500001) seguito da OptiView Amplification Kit (n. di cat. 760-099 / 06396518001 (50 test) o 860-099 / 06718663001 (250 test)). Per ulteriori informazioni, fare riferimento alle opportune schede metodologiche di OptiView DAB IHC Detection Kit e OptiView Amplification Kit.

MATERIALI FORNITI

L'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) contiene una quantità di reagente sufficiente per 50 test.

Un erogatore da 5 mL dell'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) contiene circa 70 µg dell'anticorpo monoclonale di coniglio (D5F3).

L'anticorpo è diluito in PBS contenente proteina di trasporto e 0.05% di conservante ProClin 300.

La concentrazione dell'anticorpo specifico è di circa 14 µg/mL.

L'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) è un anticorpo monoclonale ricombinante di coniglio prodotto come surtante di coltura cellulare purificato.

Guida all'interpretazione di VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody per il carcinoma del polmone non a piccole cellule (NSCLC) (P/N 1011879).

Fare riferimento all'opportuna scheda metodologica del kit di rilevazione VENTANA per le descrizioni dettagliate di quanto segue: Principio della procedura, Materiali e metodi, Prelievo dei campioni e preparazione per l'analisi, Procedure di controllo qualità, Risoluzione dei problemi, Interpretazione dei risultati e Limitazioni.

MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

I reagenti di colorazione, quali i kit di rilevazione e i componenti ausiliari VENTANA, compresi i vetrini dei tessuti di controllo positivi e negativi, non sono forniti.

È possibile che non tutti i prodotti elencati nella scheda metodologica siano disponibili in tutte le aree geografiche. Rivolgersi al rappresentante dell'assistenza locale.

I reagenti e materiali seguenti possono essere necessari per la colorazione ma non sono forniti:

1. Appendice umana o campioni di carcinoma del polmone non a piccole cellule ALK-positivi e ALK-negativi per l'uso come tessuto di controllo
2. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (n. di cat. 790-4795 / 06683380001)
3. Vetrini per microscopia, caricati positivamente
4. OptiView DAB IHC Detection Kit (n. di cat. 760-700 / 06396500001)
5. OptiView Amplification Kit (n. di cat. 760-099 / 06396518001 (50 test) o 860-099 / 06718663001 (250 test))
6. EZ Prep Concentrate (10X) (n. di cat. 950-102 / 05279771001)
7. Reaction Buffer Concentrate (10X) (n. di cat. 950-300 / 05353955001)
8. LCS (Predilute) (n. di cat. 650-010 / 05264839001)
9. ULTRA LCS (Predilute) (n. di cat. 650-210 / 05424534001)
10. Cell Conditioning Solution (CC1) (n. di cat. 950-124 / 05279801001)
11. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (n. di cat. 950-224 / 05424569001)
12. Hematoxylin II (n. di cat. 790-2208 / 05277965001)
13. Bluing Reagent (n. di cat. 760-2037 / 05266769001)
14. Montante permanente
15. Coprioggetto
16. Montavetrini automatizzato
17. Attrezzatura di laboratorio per uso generico
18. Strumento BenchMark IHC/ISH

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Alla ricezione e quando non è in uso, il prodotto va conservato a 2-8 °C. Non congelare.

Per garantire la corretta erogazione di reagente e la stabilità dell'anticorpo, dopo ogni utilizzo riposizionare il tappo dell'erogatore e riporre immediatamente l'erogatore in frigorifero in posizione verticale.

Su ogni erogatore di anticorpi è riportata la scadenza. Se conservato adeguatamente, il reagente resta stabile fino alla data indicata sull'etichetta. Non utilizzare il reagente oltre la data di scadenza indicata.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

I tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE) trattati normalmente sono idonei all'uso con questo anticorpo primario se usati con i kit di rilevazione VENTANA e gli strumenti BenchMark IHC/ISH.

In base a modelli xenograft generati dalla linea cellulare NSCLC umana NCI-H2228, che è positiva ad ALK, la fissazione dei tessuti consigliata è in formalina neutra tamponata (NBF) al 10% per almeno 6 ore. Tempi di fissazione inferiori a 6 ore provocano una significativa perdita di intensità della colorazione per la proteina ALK. È accettabile anche il fissativo zinco formalina per un tempo di fissazione di almeno 6 ore. La quantità utilizzata deve essere pari a 15-20 volte il volume di tessuto. Nessun fissativo penetrerà per più di 2-3 mm nel tessuto solido o per 5 mm nel tessuto poroso in un periodo di 24 ore. La fissazione può essere eseguita a temperatura ambiente (15-25 °C).^{28,29}

Fissativi quali alcol-formalina-acido acetico (AFA), PREFER, B5 e altri fissativi acidi e/o a base di alcol hanno evidenziato una perdita di intensità della colorazione della proteina ALK a tutti i tempi di fissazione testati (1-72 ore). Tali fissativi non sono consigliati per l'uso con questa analisi. Gli studi sul ritardo nella fissazione hanno riscontrato inoltre una perdita di intensità della colorazione della proteina ALK nei casi in cui i campioni di xenograft non venivano fissati entro 6 ore dall'escissione. Fare riferimento alla guida all'interpretazione per una discussione più approfondita dell'effetto che la preparazione dei campioni esercita sull'intensità della colorazione di ALK.

Le sezioni vanno tagliate a uno spessore di circa 4 µm e montate su vetrini di vetro caricati positivamente. I vetrini devono essere colorati tempestivamente poiché l'antigenicità delle sezioni di tessuto tagliate potrebbe diminuire con il passare del tempo e risulta compromessa entro 3 mesi dopo il taglio dal blocco di paraffina (fare riferimento alla guida all'interpretazione e alla sezione Caratteristiche prestazionali riportata nel seguito).

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Per uso diagnostico in vitro (IVD).
2. Solo per uso professionale.
3. Non usare oltre il numero di test specificato.
4. **ATTENZIONE:** negli Stati Uniti le leggi federali consentono la vendita di questo dispositivo solo da parte di un medico o solo su prescrizione medica. (Rx Only)
5. La soluzione ProClin 300 viene utilizzata come conservante nel reagente. È classificata come irritante e può causare sensibilizzazione tramite contatto cutaneo. Adottare precauzioni ragionevoli durante la manipolazione. Evitare il contatto dei reagenti con occhi, cute e membrane mucose. Indossare guanti e indumenti di protezione adeguati.
6. I vetrini caricati positivamente possono essere suscettibili a sollecitazioni ambientali con conseguente colorazione inadeguata. Per ulteriori informazioni sull'uso di questo tipo di vetrini, contattare il rappresentante Roche.
7. I materiali di origine umana o animale devono essere maneggiati come materiali a rischio biologico e smaltiti adottando precauzioni appropriate. In caso di esposizione, attenersi alle direttive sanitarie delle autorità responsabili.^{30,31}
8. Evitare il contatto dei reagenti con gli occhi e le membrane mucose. Se i reagenti entrano in contatto con aree sensibili, lavare con acqua abbondante.
9. Evitare la contaminazione microbica dei reagenti, poiché può causare risultati non corretti.
10. Per ulteriori informazioni sull'uso di questo dispositivo, fare riferimento alla guida per l'utilizzatore dello strumento BenchMark IHC/ISH e alle istruzioni per l'uso di tutti i componenti necessari disponibili sul sito dialog.roche.com.
11. Consultare le autorità locali e/o statali in relazione al metodo di smaltimento consigliato.
12. Le etichette di sicurezza dei prodotti seguono principalmente le linee guida GHS dell'UE. La scheda dati di sicurezza è disponibile su richiesta per gli utilizzatori professionali.

13. Per segnalare sospetti incidenti gravi correlati a questo dispositivo, contattare il rappresentante locale Roche e l'autorità competente dello Stato membro o del paese in cui risiede l'utilizzatore.

Questo prodotto contiene componenti classificati come segue in conformità con il regolamento (CE) n. 1272/2008:

Tabella 1. Informazioni sui pericoli.

Pericolo	Codice	Indicazione
 Avvertenza	H317	Può provocare una reazione allergica cutanea.
	P261	Evitare di respirare la nebbia/i vapori.
	P272	Gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro.
	P280	Indossare guanti.
	P333 + P313	In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.
	P362 + P364	Togliersi di dosso gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.
	P501	Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto autorizzato per lo smaltimento dei rifiuti.

Questo prodotto contiene una massa reattiva in rapporto 3:1 di 5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3-one e 2-metil-2H-isotiazol-3-one, numero CAS 55965-84-9.

PROCEDURA DI COLORAZIONE

L'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) è stata sviluppata per l'uso sugli strumenti BenchMark IHC/ISH in abbinamento a Rabbit Monoclonal Negative Control Ig, OptiView DAB IHC Detection Kit, OptiView Amplification Kit e ai reagenti ausiliari. Fare riferimento alle tabelle seguenti per i protocolli di colorazione consigliati.

Questo anticorpo è stato ottimizzato per tempi di incubazione specifici; tuttavia, l'utilizzatore deve convalidare i risultati ottenuti con questo reagente. Lo scostamento dal protocollo di colorazione riportato in Tabella 2, Tabella 3 o Tabella 4 può causare risultati falsi negativi o falsi positivi. Per lo strumento BenchMark ULTRA è stata sviluppata una procedura di colorazione ALK-specifica denominata **U VENTANA ALK (D5F3)**. Prima di selezionare le condizioni del protocollo dalla procedura per la colorazione ALK-specifica, lo strumento BenchMark ULTRA deve essere dotato del software VSS 12.3 con la procedura per la colorazione OptiView v5 o versione successiva.

È possibile visualizzare, stampare e modificare i parametri delle procedure automatizzate conformemente alla procedura descritta nella guida per l'utilizzatore dello strumento. Fare riferimento all'opportuna scheda metodologica del kit di rilevazione VENTANA per ulteriori dettagli sulle procedure di colorazione immunostochimica.

Per ulteriori informazioni dettagliate sull'uso corretto di questo dispositivo, fare riferimento alla scheda metodologica dell'erogatore in linea associato al codice 790-4794.

Tabella 2. Protocollo di colorazione consigliato per l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) e Rabbit Monoclonal Negative Control Ig con OptiView DAB IHC Detection Kit e OptiView Amplification Kit su uno strumento BenchMark ULTRA o BenchMark ULTRA PLUS.

Procedura di colorazione	U VENTANA ALK (D5F3)
Fase del protocollo	Input parametro
Anticorpo (primario)	VENTANA ALK AB - 16 min (Se non è selezionato alcun reagente, l'impostazione predefinita è 4794)
	-4794
	-4796
	-7155
	-7157
	(Selezionare il reagente precedente in base alla regione di distribuzione.)
	oppure Negative Control

Procedura di colorazione	U VENTANA ALK (D5F3)
Fase del protocollo	Input parametro
Controcultura	Hematoxylin II, 4 minuti
Post-controcultura	Bluing, 4 minuti

Tabella 3. Protocollo di colorazione consigliato per l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) e Rabbit Monoclonal Negative Control Ig con OptiView DAB IHC Detection Kit e OptiView Amplification Kit su uno strumento BenchMark XT.

Tipo di procedura	Metodo
Opzione di sincronizzazione IHC	Selezionata ^a
Sparaffinatura	Selezionata
Cell conditioning (smascheramento dell'antigene)	CC1, 92 minuti, 100 °C
Inibitore della perossidasi pre-primario	Selezionato
Anticorpo (primario)	Ventana anti-ALK (D5F3) [-4794] oppure Rabbit Mono Neg [-4795] 16 minuti, 37 °C
OptiView HQ Univ Linker	12 minuti
OptiView HRP Multimer	12 minuti
OptiView Amplification	Selezionata
OV AMP H2O2, OV Amplifier	8 minuti
OV AMP Multimer	8 minuti
Controcultura	Hematoxylin II, 4 minuti
Post-controcultura	Bluing, 4 minuti

^a Questa fase selezionabile è pertinente solo quando si esegue XT OptiView DAB v4 e non è disponibile con versioni precedenti del software.

Tabella 4. Protocollo di colorazione consigliato per l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) e Rabbit Monoclonal Negative Control Ig con OptiView DAB IHC Detection Kit e OptiView Amplification Kit su uno strumento BenchMark GX.

Tipo di procedura	Metodo
Sparaffinatura	Selezionata
Cell conditioning (smascheramento dell'antigene)	CC1, 92 minuti, 100 °C
Inibitore della perossidasi pre-primario	Selezionato
Anticorpo (primario)	Ventana anti-ALK (D5F3) [-4794] oppure Rabbit Mono Neg [-4795] 16 minuti, 37 °C
OptiView HQ Univ Linker	12 minuti
OptiView HRP Multimer	12 minuti
OptiView Amplification	Selezionata
OV AMP H2O2, OV Amplifier	8 minuti
OV AMP Multimer	8 minuti
Controcultura	Hematoxylin II, 4 minuti

Tipo di procedura	Metodo
Post-controcolorazione	Bluing, 4 minuti

A causa della variabilità nella fissazione e processazione dei tessuti, così come della variabilità delle condizioni ambientali e degli strumenti di laboratorio, può essere necessario aumentare o diminuire il tempo di incubazione dell'anticorpo primario, lo smascheramento dell'antigene o il pretrattamento con proteasi in base ai singoli campioni, alla rilevazione utilizzata e alla preferenza del patologo. Per ulteriori informazioni sulle variabili di fissazione, fare riferimento a "Immunohistochemistry Principles and Advances".³²

PROCEDURE DI CONTROLLO QUALITÀ

Rabbit Monoclonal Negative Control Ig

Acquisire un vetrino di controllo negativo del reagente corrispondente per ogni campione come ausilio all'interpretazione dei risultati. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig, un anticorpo di controllo negativo del reagente, è specificamente indicato per questa analisi ed è utilizzato al posto dell'anticorpo primario per valutare le colorazioni aspecifiche. La procedura di colorazione del controllo negativo del reagente deve essere uguale al periodo di incubazione dell'anticorpo primario. L'utilizzo di reagenti di controllo negativo diversi o il mancato utilizzo del reagente di controllo negativo consigliato potrebbe causare risultati falsati.

Controlli a livello di sistema

I controlli a livello di sistema devono essere acquisiti congiuntamente ai campioni dei pazienti. Tali controlli possono essere appendice umana³³ o campioni di tessuto NSCLC ALK-positivi/negativi noti.

Il tessuto di controllo deve provenire da campioni autoptici, biotici o chirurgici preparati e fissati il prima possibile in modo identico alle sezioni da testare. Tale tessuto può consentire di controllare tutte le fasi dell'analisi, dalla preparazione del tessuto fino alla colorazione. L'uso di una sezione di tessuto fissata o processata diversamente rispetto al campione sottoposto a test serve come controllo per tutti i reagenti e le fasi del metodo, tranne che per la fissazione e la preparazione del tessuto.

Tessuti di controllo di appendice o NSCLC ALK-positivi/negativi

Acquisire un tessuto di controllo ALK-positivo e uno ALK-negativo per ogni procedura per la colorazione eseguita con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3).

I casi NSCLC con colorazione rappresentativa di risultati clinici ALK-positivi e ALK-negativi sono adatti per un controllo qualità ottimale, inclusa la rilevazione di livelli minori di degradazione dei reagenti o di problemi di non conformità alle specifiche correlati allo strumento.

Il tessuto di appendice umana contiene elementi a colorazione positiva e negativa per la proteina ALK ed è quindi idoneo all'uso come controllo a livello di sistema. I componenti del tessuto a colorazione positiva sono utilizzati per confermare l'applicazione dell'anticorpo e il funzionamento corretto dello strumento; gli elementi a colorazione negativa sono utilizzati per rilevare livelli minori di degradazione dei reagenti o problemi di non conformità alle specifiche correlati allo strumento.

La colorazione adeguata dei componenti di tessuto di appendice ed NSCLC ALK-positivi e negativi è descritta in Tabella 5, Tabella 6 e nella guida all'interpretazione.

I tessuti di controllo positivi e negativi noti utilizzati per il monitoraggio delle prestazioni dell'analisi ALK su campioni del paziente devono essere fissati e processati in modo simile al campione del paziente. In caso contrario, i tessuti di controllo possono essere utilizzati solo per il monitoraggio delle prestazioni corrette dei reagenti del test. I tessuti di controllo non devono essere utilizzati come ausilio nella diagnosi dei campioni del paziente.

Verifica dell'analisi

Prima dell'uso iniziale di un anticorpo o di un sistema di colorazione in una procedura diagnostica, è necessario verificare la specificità dell'anticorpo effettuando l'analisi su una serie di tessuti con caratteristiche prestazionali IHC note che rappresentino tessuti ALK-positivi e negativi (fare riferimento alle Procedure di controllo qualità precedentemente descritte in questa sezione del foglietto illustrativo e alle indicazioni per il controllo qualità del College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist,³⁴ o alle linee guida approvate CLSI Approved Guideline³⁵). Ripetere queste procedure di controllo qualità per ciascun nuovo lotto di anticorpo od ogni volta che si modificano i parametri dell'analisi. I tessuti NSCLC con stato ALK noto, nonché i campioni di appendice umana, sono idonei alla verifica dell'analisi.

INTERPRETAZIONE DELLA COLORAZIONE / RISULTATI PREVISTI

La procedura di immunocolorazione automatizzata VENTANA provoca la precipitazione di un prodotto di reazione DAB di colore marrone in corrispondenza dei siti dell'antigene individuati dall'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3). Un patologo qualificato con esperienza nelle procedure immunostochimiche dovrà valutare i controlli negativi del reagente, i controlli a livello di sistema e qualificare il prodotto colorato prima di interpretare i risultati.

Tessuti di controllo positivo/negativo a livello di sistema

I tessuti di controllo positivo e negativo colorati devono essere esaminati per verificare che tutti i reagenti funzionino correttamente. La presenza di un prodotto di reazione colorato in maniera appropriata nel tessuto di controllo positivo all'interno del citoplasma delle cellule target è indicativa di una reattività positiva.

Se i tessuti di controllo positivo o negativo non si colorano in modo corretto o danno luogo a una modifica dell'interpretazione diagnostica clinica, tutti i risultati ottenuti con i campioni del test devono essere considerati non validi.

Tabella 5. Criteri di valutazione del tessuto di controllo dell'appendice. Immagini rappresentative sono riportate nella guida all'interpretazione.

Accettabile	Non accettabile
Presenza di colorazione citoplasmatica granulare intensa nelle cellule gangliari. (Vedere la nota)	Assenza di colorazione citoplasmatica granulare intensa nelle cellule gangliari.
Assenza di colorazione citoplasmatica granulare intensa in cellule epiteliali ghiandolari, muscolo e tessuto linfoide (negli aggregati linfoidei può essere osservata colorazione esigua o rara delle cellule linforeticolari).	Eccessiva colorazione di fondo non specifica di cellule epiteliali ghiandolari, muscolo o tessuto linfoide che interferisce con l'assegnazione del punteggio.

Nota: il nervo negli strati muscolari dell'appendice presenta colorazione positiva.

Controllo negativo del reagente

Una colorazione non specifica, se presente, avrà un aspetto diffuso e può essere valutata utilizzando il vetrino di controllo negativo del reagente colorato con Rabbit Monoclonal Negative Control Ig. Per l'interpretazione dei risultati della colorazione, prendere in considerazione cellule intatte, poiché spesso le cellule necrotiche o degradate assumono una colorazione non specifica. Se la colorazione di fondo è eccessiva, i risultati del campione sottoposto a test non devono essere considerati validi. Nella guida all'interpretazione è possibile trovare esempi di livelli accettabili di colorazione di fondo per questa analisi.

Tessuto del paziente

Il tessuto del paziente deve essere valutato in base all'algoritmo di valutazione dell'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) riportato in Tabella 6. Fare riferimento alla guida all'interpretazione.

Tabella 6. Algoritmo di valutazione per l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3). Immagini rappresentative sono riportate nella guida all'interpretazione.

Interpretazione clinica	Descrizione della colorazione
Positivo ad ALK	Presenza di colorazione citoplasmatica granulare intensa nelle cellule tumorali (qualsiasi percentuale di cellule tumorali positive). Determinati elementi di colorazione devono essere esclusi, tra cui: - lieve colorazione citoplasmatica puntiforme nei macrofagi alveolari, - cellule di origine neurale (nervo e cellule gangliari), - colorazione delle cellule epiteliali ghiandolari e - cellule linforeticolari sparse negli infiltrati linfocitici. Nell'NSCLC è possibile osservare un certo grado di colorazione di fondo anche nella mucosa normale (mucina inclusa) e nelle aree di necrosi tumorale, che devono essere escluse dalla valutazione clinica.

Interpretazione clinica	Descrizione della colorazione
Negativo ad ALK	Assenza di colorazione citoplasmatica granulare intensa nelle cellule tumorali.

LIMITAZIONI SPECIFICHE

1. Quest'analisi non è stata convalidata per l'uso con strisci citologici o campioni decalcificati.
2. I tessuti del paziente devono essere colorati entro 3 mesi dal sezionamento dal blocco di tessuto. È stata osservata una perdita di prestazioni di colorazione con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) su sezioni conservate a temperatura ambiente per oltre 3 mesi.
3. Con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) sono stati osservati alcuni artefatti di colorazione. Può essere presente una lieve colorazione citoplasmatica granulare puntiforme nei macrofagi alveolari sia sui vetrini anti-ALK sia sui vetrini colorati con il controllo negativo del reagente; tale fenomeno è indice di un artefatto del sistema di rilevazione e non deve essere valutato come colorazione positiva anti-ALK. È stata inoltre osservata colorazione puntiforme nelle aree di necrosi tumorale; anche tale colorazione deve essere ignorata nel corso della valutazione dei campioni dei pazienti. Con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) è stata osservata colorazione del tessuto neurale, nervo incluso, e colorazione occasionale delle cellule linfocitarie nell'infiltrato linfocitico. Fare riferimento alla guida all'interpretazione per una discussione più approfondita.
4. È possibile osservare una lieve variabilità nell'intensità della colorazione complessiva sui tessuti di controllo dovuta a OptiView Amplification Kit. Fare riferimento alla guida all'interpretazione per esempi di prestazioni di colorazione accettabili.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

PRESTAZIONI ANALITICHE

Sono stati condotti test di colorazione per sensibilità, specificità, precisione e confronto tra metodi; i relativi risultati sono elencati di seguito.

Sensibilità e specificità

Tabella 7. La sensibilità/specificità dell'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) è stata determinata testando tessuti normali FFPE.

Tessuto	N. casi positivi/totali	Tessuto	N. casi positivi/totali
Cervello ^a	0/3	Timo	0/3
Cervelletto	0/3	Mieloide (midollo osseo)	0/3
Ghiandola surrenale	0/3	Polmone	0/3
Ovaio	0/3	Cuore	0/3
Pancreas	0/3	Esofago	0/3
Ghiandola paratiroidica	0/3	Stomaco	0/3
Ghiandola pituitaria ^b	0/3	Intestino tenue ^c	0/3
Testicolo	0/3	Colon ^c	0/3
Tiroide	0/3	Fegato	0/3
Mammella	0/3	Ghiandola salivare	0/3
Milza	0/3	Rene	0/3
Tonsille	0/3	Prostata	0/3
Endometrio	0/3	Cervice	0/3

Tessuto	N. casi positivi/totali	Tessuto	N. casi positivi/totali
Muscolo scheletrico	0/4	Cute	0/3
Nervo (sparso)	0/3	Mesotelio	0/3

^a 2/3 Alcune cellule gliali nel cervello presentavano positività da debole a moderata.

^b 3/3 La ghiandola pituitaria presentava una colorazione debole.

^c Le cellule gangliari in 4 tessuti intestinali su 6 presentavano colorazione positiva per ALK a intensità variabili.

Tabella 8. La sensibilità/specificità dell'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) è stata determinata testando una varietà di tessuti FFPE.

Patologia	N. casi positivi/totali
Glioblastoma (cervello)	0/1
Meningioma (cervello)	0/1
Ependimoma (cervello)	0/1
Oligodendroglioma (cervello)	0/1
Adenocarcinoma sieroso (ovaio)	1/1
Adenocarcinoma (ovaio)	0/1
Neoplasia neuroendocrina (pancreas)	0/1
Adenocarcinoma (pancreas)	0/1
Seminoma (testicolo)	0/1
Carcinoma embrionale (testicolo)	0/1
Carcinoma midollare (tiroide)	0/1
Carcinoma papillare (tiroide)	0/1
Carcinoma duttale in situ (mammella)	0/1
Carcinoma duttale invasivo (mammella)	0/2
Linfoma a cellule B; NAS (milza)	0/3
Carcinoma a piccole cellule (polmone)	0/1
Carcinoma a cellule squamose (polmone)	0/1
Adenocarcinoma (polmone)	0/1
Carcinoma a cellule squamose (esofago)	0/1
Adenocarcinoma (esofago)	0/1
Adenocarcinoma mucinoso (stomaco)	0/1
Adenocarcinoma (gastrointestinale)	0/1
Tumore stromale gastrointestinale (GIST) (colon)	0/1
Adenocarcinoma (retto)	0/1
Tumore stromale gastrointestinale (GIST) (retto)	0/1
Carcinoma epatocellulare (fegato)	0/1
Epatoblastoma (fegato)	1/1
Carcinoma a cellule chiare (rene)	0/1
Adenocarcinoma (prostata)	0/2

Patologia	N. casi positivi/totali
Leiomioma (utero)	0/1
Adenocarcinoma (utero)	0/1
Carcinoma a cellule chiare (utero)	0/1
Carcinoma a cellule squamose (utero)	0/2
Rabdomiosarcoma embrionale	0/1
Melanoma (ano)	0/1
Carcinoma a cellule basali (cute)	0/1
Carcinoma a cellule squamose (cute)	0/1
Neurofibroma (lombare)	0/1
Neuroblastoma (retroperitoneo)	1/1
Mesotelioma	0/1
Linfoma di Hodgkin (linfonodo)	0/1
Linfoma anaplastico a grandi cellule (linfonodo)	0/1
Carcinoma uroteliale (vescica)	0/1
Leiomiosarcoma	0/2
Osteosarcoma	0/1
Rabdomiosarcoma a cellule fuse	0/1

Concordanza tra piattaforme (studio di bridging)

L'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) è stata inizialmente resa disponibile sugli strumenti BenchMark XT e GX. È stato condotto uno studio di bridging per dimostrare l'equivalenza delle prestazioni dell'analisi tra gli strumenti BenchMark ULTRA e BenchMark XT. Questo studio ha valutato lo stato clinico ALK (in base all'algoritmo di valutazione di ALK riportato in Tabella 6) in 184 campioni NSCLC unici colorati con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) su entrambe le piattaforme. I vetrini colorati risultanti sono stati messi in cieco e randomizzati e successivamente valutati da tre patologi. I risultati della concordanza tra piattaforme ottenuti da questo studio sono riportati in Tabella 9 e Tabella 10.

Tabella 9. Risultati di concordanza tra strumenti BenchMark XT e BenchMark ULTRA.

Concordanza dell'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) tra gli strumenti BenchMark ULTRA e BenchMark XT			
BenchMark ULTRA	BenchMark XT		Totale
	Positivo	Negativo	
Positivo	85	1	86
Negativo	1	97	98
Totale	86	98	184

Tabella 10. Concordanza dello stato ALK tra strumenti BenchMark XT e BenchMark ULTRA.

Tassi di concordanza tra piattaforme	Concordanza percentuale positiva (CI al 95%)	Concordanza percentuale negativa (CI al 95%)	Concordanza percentuale complessiva (CI al 95%)
Concordanza tra lo strumento BenchMark XT e lo strumento BenchMark ULTRA	98.8% (93.7-99.8%)	99.0% (94.4-99.8%)	98.9% (96.1-99.7%)

Spessore del tessuto

Lo spessore del tessuto è stato valutato utilizzando 4 casi unici di NSCLC umano (3 ALK-positivi e 1 ALK-negativo) e 4 casi unici di appendice umana. I tessuti sono stati sottoposti a sezionamento e testati in duplicato a 3, 4, 5, 6 e 7 micron. Tutti gli spessori di tessuto hanno evidenziato un'adeguata colorazione specifica per ALK e livelli di fondo adeguati con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3). Nessun campione ha presentato una variazione nello stato clinico ALK in questo intervallo di spessore. I campioni da sottoporre ad analisi devono essere tagliati a 4-6 micron.

Studi di ripetibilità e precisione intermedia

Ripetibilità e precisione intermedia dell'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) sono state valutate sugli strumenti BenchMark ULTRA, XT e GX in abbinamento ai kit OptiView DAB IHC Detection e OptiView Amplification.

Dieci campioni di tessuto NSCLC unici (5 ALK-positivi e 5 ALK-negativi) sono stati valutati su entrambi gli strumenti BenchMark XT e BenchMark ULTRA. Per la precisione all'interno dello stesso giorno, 5 vetrini replicati ottenuti da ciascuno dei campioni NSCLC sono stati colorati su un solo strumento BenchMark XT o un solo strumento BenchMark ULTRA. Per i test della precisione all'interno dello stesso strumento, 3 vetrini replicati ottenuti da ciascuno dei campioni NSCLC sono stati colorati con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) su tre strumenti BenchMark XT mentre 2 vetrini replicati ottenuti da ciascuno dei campioni NSCLC sono stati colorati su tre strumenti BenchMark ULTRA. Per la precisione tra un giorno e l'altro, 2 vetrini replicati ottenuti da ciascuno dei campioni NSCLC sono stati colorati con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) su un solo strumento BenchMark XT o BenchMark ULTRA in 5 giorni non consecutivi. Tutti i vetrini erano in cieco e randomizzati entro ciascuna coorte di tessuti degli strumenti. Ciascuna coorte è stata valutata individualmente da un patologo utilizzando l'algoritmo di valutazione dell'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) (riportato in Tabella 6). Ciascun campione NSCLC replicato ha prodotto risultati equivalenti nella colorazione IHC di ALK. Un riepilogo dei risultati di ripetibilità e precisione intermedia per gli strumenti BenchMark XT e BenchMark ULTRA è disponibile rispettivamente in Tabella 11 e Tabella 12.

È stato condotto uno studio tra piattaforme che ha confrontato le prestazioni dell'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) sugli strumenti BenchMark XT e BenchMark GX. In questo studio sono stati valutati due blocchi multi-tessuto contenenti ciascuno 8 campioni NSCLC (3 ALK-positivi, 1 ALK-negativo per blocco). Ai fini del confronto, 5 vetrini replicati sono stati colorati su tre strumenti BenchMark XT e tre strumenti BenchMark GX. I vetrini sono stati valutati relativamente all'adeguatezza della colorazione in base all'algoritmo di valutazione IHC di VENTANA anti-ALK (D5F3) riportato in Tabella 6. Ciascun campione NSCLC replicato ha prodotto risultati di colorazione IHC di ALK equivalenti tra le due piattaforme. Un riepilogo dei risultati è disponibile in Tabella 13.

È stata inoltre valutata anche la ripetibilità della colorazione di appendice umana (controllo a livello di sistema) con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3). Per questo studio sono stati utilizzati otto tessuti di appendice umana unici. Per la precisione all'interno dello stesso giorno, 13 vetrini replicati ottenuti da due blocchi multi-tessuto contenenti 4 campioni di appendice sono stati colorati su un solo strumento BenchMark XT. Per la precisione inter-strumentale, 5 vetrini replicati ottenuti da due blocchi multi-tessuto ciascuno contenente 4 campioni di appendice sono stati colorati con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) su tre strumenti BenchMark XT. Per la precisione tra un giorno e l'altro, 5 vetrini replicati ottenuti da ciascuno dei due blocchi multi-tessuto contenenti 4 campioni di appendice sono stati colorati con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) su un solo strumento BenchMark XT in 5 giorni non consecutivi. Tutti i vetrini sono stati valutati da un patologo in base ai criteri di valutazione di VENTANA anti-ALK (D5F3) per il tessuto di controllo appendicolare (riportati in Tabella 5). Ciascun campione replicato di appendice ha prodotto risultati equivalenti nella colorazione IHC di ALK. La concordanza percentuale complessiva per la ripetibilità all'interno dello stesso giorno e inter-strumentale (su 3 strumenti) è risultata pari

a 100%, mentre la ripetibilità tra un giorno e l'altro (su 5 giorni non consecutivi) è risultata pari a 98%.

Tabella 11. Ripetibilità e precisione intermedia dell'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) su singoli campioni NSCLC colorati sullo strumento BenchMark XT.

Ripetibilità/precisione per tessuti NSCLC	N = totale dei vetrini valutati nella coorte	Concordanza percentuale complessiva per lo stato ALK (CI al 95%)
Ripetibilità all'interno dello stesso giorno	50	100% (97.5-100%)
Precisione all'interno della piattaforma (su 3 strumenti BenchMark XT)	60	100% (97.9-100%)
Precisione tra un giorno e l'altro (5 giorni non consecutivi)	100	100% (98.7-100%)

Tabella 12. Ripetibilità e precisione intermedia dell'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) su singoli campioni NSCLC sullo strumento BenchMark ULTRA.

Ripetibilità/precisione per tessuti NSCLC	N = totale dei vetrini valutati nella coorte	Concordanza percentuale complessiva per lo stato ALK (CI al 95%)
Ripetibilità all'interno dello stesso giorno	50	100% (92.9-100.0%)
Precisione all'interno della piattaforma (su 3 strumenti BenchMark ULTRA)	60	100% (94.0-100.0%)
Precisione tra un giorno e l'altro (5 giorni non consecutivi)	100	100% (96.3-100.0%)

Tabella 13. Precisione tra piattaforme dell'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) su campioni NSCLC da blocchi multi-tessuto utilizzando gli strumenti BenchMark XT e BenchMark GX.

Precisione per tessuti NSCLC	N = totale dei vetrini valutati nella coorte	Concordanza percentuale complessiva per lo stato ALK
Precisione tra piattaforme tra gli strumenti BenchMark XT e BenchMark GX (su 3 strumenti)	30	100%

Riproducibilità da lotto a lotto

La riproducibilità da lotto a lotto dell'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) è stata determinata testando tre lotti dell'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) su 38 casi NSCLC unici (21 campioni ALK-positivi (da 18 casi unici) e 20 campioni di tessuto NSCLC ALK-negativi) sullo strumento BenchMark XT utilizzando i kit OptiView DAB IHC Detection e OptiView Amplification. Tutti i casi sono stati colorati in duplicato con ciascuno dei tre lotti di anticorpo primario. I vetrini erano in cieco e sono stati randomizzati prima della valutazione dello stato clinico determinato in base all'algoritmo di valutazione dell'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) (l'algoritmo è riportato in Tabella 6). Tutti e tre i lotti di anticorpo hanno prodotto risultati di colorazione con una concordanza superiore al 90% relativamente allo stato ALK sui 41 campioni di tessuto NSCLC valutati. I risultati sono riportati come tassi di concordanza percentuale complessiva, concordanza positiva media e concordanza negativa media. Il tasso di concordanza percentuale complessiva tra lotti è risultato pari a 99.2%; l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) è pertanto riproducibile in

termini di risultati di colorazione tra lotti di anticorpo. I risultati sono disponibili in Tabella 14.

La riproducibilità da lotto a lotto dell'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) utilizzando lo strumento BenchMark ULTRA è stata determinata testando tre lotti dell'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) su 30 casi NSCLC unici (15 campioni ALK-positivi e 15 campioni di tessuto NSCLC ALK-negativi) utilizzando i kit OptiView DAB IHC Detection e OptiView Amplification. Tutti i casi sono stati colorati in duplicato con ciascuno dei tre lotti di anticorpo primario. I vetrini erano in cieco e sono stati randomizzati prima della valutazione da parte di un patologo dello stato clinico determinato in base all'algoritmo di valutazione dell'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) (l'algoritmo è riportato in Tabella 6). Tutti e tre i lotti di anticorpo hanno prodotto risultati di colorazione con una concordanza superiore al 90% relativamente allo stato ALK sui 30 campioni di tessuto NSCLC valutati. I risultati sono riportati come tassi di concordanza percentuale complessiva, concordanza positiva media e concordanza negativa media. Il tasso di concordanza percentuale complessiva tra lotti è risultato pari a 99.1%; l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) è pertanto riproducibile in termini di risultati di colorazione tra lotti di anticorpo. I risultati sono disponibili in Tabella 15.

La riproducibilità da lotto a lotto dell'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) è stata valutata anche utilizzando 12 campioni unici di tessuto di appendice umana. La riproducibilità è stata determinata testando tre lotti di anticorpo in abbinamento a tre lotti di kit OptiView DAB IHC Detection e OptiView Amplification su tre strumenti BenchMark XT. Il tasso di concordanza complessiva per gli elementi dell'appendice ad adeguata colorazione positiva e negativa utilizzando l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) è risultato pari a 100%.

Tabella 14. Tassi di concordanza della riproducibilità da lotto a lotto su 41 campioni di tessuto NSCLC sullo strumento BenchMark XT. Sono stati testati 21 campioni ALK-positivi (da 18 casi unici) e 20 campioni ALK-negativi.

Tassi di concordanza della riproducibilità da lotto a lotto	Concordanza positiva media (CI al 95%)	Concordanza negativa media (CI al 95%)	Concordanza percentuale complessiva (CI al 95%)
Media dei tre confronti da lotto a lotto	99.2% (97.4-100%)	99.1% (96.8-100.0%)	99.2% (97.5-100%)

Tabella 15. Tassi di concordanza della riproducibilità da lotto a lotto su 30 campioni di tessuto NSCLC sullo strumento BenchMark ULTRA. Sono stati testati 15 campioni ALK-positivi e 15 campioni ALK-negativi.

Tassi di concordanza della riproducibilità da lotto a lotto	Concordanza percentuale positiva (CI al 95%)	Concordanza percentuale negativa (CI al 95%)	Concordanza percentuale complessiva (CI al 95%)
Media dei tre confronti da lotto a lotto	98.9% (96.8-99.6%)	99.3% (97.3-99.8%)	99.1% (97.9-99.6%)

Studi sulla precisione inter-patologo

Sono stati condotti vari studi sulla precisione inter-patologo: due sullo strumento BenchMark XT e uno sullo strumento BenchMark ULTRA.

Nello studio sulla precisione inter-patologo sullo strumento BenchMark XT, tre patologi hanno esaminato un totale di 185 casi unici. I 185 casi erano correlati a 100 blocchi ALK-positivi e 100 blocchi ALK-negativi che sono stati colorati con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3). I casi erano in cieco e sono stati randomizzati prima della valutazione dei risultati della colorazione IHC di ALK in base all'algoritmo di valutazione dell'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) riportato in Tabella 6. I risultati riportati di seguito in Tabella 16 indicano i tassi di precisione inter-patologo per i casi unici della coorte dello studio.

Tabella 16. Studio 1 sulla precisione inter-patologo sullo strumento BenchMark XT

Precisione inter-patologo	Concordanza positiva media (CI al 95%)	Concordanza negativa media (CI al 95%)	Concordanza percentuale complessiva (CI al 95%)
Media dei confronti dei tre patologi	98.8% (97.3-100%)	99.0% (97.7-100%)	98.9% (97.4-100%)

Lo Studio 2 sulla precisione inter-patologo sullo strumento BenchMark XT è stato condotto su una coorte di casi da uno studio clinico randomizzato di campioni NSCLC di pazienti ALK-positivi arruolati tramite Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit. Circa 300 casi sono stati colorati con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) sullo strumento BenchMark XT. I casi sono stati messi in cieco relativamente allo stato ALK FISH, randomizzati e consegnati a tre patologi che hanno valutato i risultati della colorazione IHC di ALK in base all'algoritmo di valutazione dell'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) riportato in Tabella 6. I risultati riportati in Tabella 17 indicano i tassi di precisione inter-patologo ottenuti da questa coorte dello studio clinico.

Per lo studio sulla precisione inter-patologo sullo strumento BenchMark ULTRA è stata valutata una coorte di 184 casi NSCLC unici. La coorte era costituita da 90 casi ALK-positivi e 94 ALK-negativi che sono stati colorati con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) sullo strumento BenchMark ULTRA. I casi sono stati messi in cieco, randomizzati e consegnati a tre patologi che hanno valutato i risultati della colorazione IHC di ALK in base all'algoritmo di valutazione dell'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) riportato in Tabella 6. Tabella 18 indica i tassi di precisione inter-patologo ottenuti da questo studio.

Tabella 17. Studio 2 sulla precisione inter-patologo relativamente allo stato ALK in campioni NSCLC ottenuti dalla coorte del confronto tra metodi clinici 1 colorati con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) sullo strumento BenchMark XT.

Precisione inter-patologo	Concordanza positiva media (CI al 95%)	Concordanza negativa media (CI al 95%)	Concordanza percentuale complessiva (CI al 95%)
Media dei confronti dei tre patologi	97.6% (95.0-99.5%)	99.5% (98.9-99.9%)	99.1% (98.2-99.8%)
Patologo 1 rispetto a patologo 2	99.1% (97.1-100%)	99.8% (99.4-100%)	99.7% (98.2-99.9%)
Patologo 1 rispetto a patologo 3	96.3% (92.3-99.2%)	99.2% (98.3-99.8%)	98.6% (96.6-99.5%)
Patologo 2 rispetto a patologo 3	97.2% (93.5-100%)	99.4% (98.6-100%)	99.0% (97.1-99.7%)

Tabella 18. Precisione inter-patologo relativamente allo stato ALK in campioni NSCLC colorati con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) sullo strumento BenchMark ULTRA.

Precisione inter-patologo	Concordanza positiva media (CI al 95%)	Concordanza negativa media (CI al 95%)	Concordanza percentuale complessiva (CI al 95%)
Media dei confronti dei tre patologi	98.4% (96.5-99.6%)	98.6% (96.9-99.7%)	98.5% (96.7-99.6%)
Patologo 1 rispetto a patologo 2	98.9% (96.8-100%)	98.9% (97.0-100%)	98.9% (96.0-99.7%)
Patologo 1 rispetto a patologo 3	98.8% (96.7-100%)	99.0% (97.2-100%)	98.9% (96.0-99.7%)
Patologo 2 rispetto a patologo 3	97.6% (94.7-99.4%)	97.9% (95.4-99.5%)	97.8% (94.4-99.1%)

Concordanza con ALK FISH

Sono state utilizzate tre coorti per confrontare i risultati di colorazione dell'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) con ALK FISH in termini di stato clinico ALK. Le coorti includevano un insieme di campioni di tessuto NSCLC umano da tumori primari e metastatici, tra cui resezioni, biopsie con ago, biopsie bronchiali e blocchi di cellule FFPE da FNA. L'assegnazione dei punteggi per tutti gli studi è stata effettuata in base all'algoritmo di valutazione (descritto in Tabella 6).

Studio di concordanza 1

Uno studio condotto presso un laboratorio esterno ha confrontato l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) con dati Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit retrospettivi. Il centro

esterno ha colorato circa 100 casi NSCLC utilizzando l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) su uno strumento BenchMark XT. L'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) ha presentato una concordanza percentuale complessiva > 98% con i dati Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit retrospettivi su questa coorte di campioni NSCLC. I risultati dettagliati sono riportati in Tabella 19 e Tabella 20. Si osservi che 86 dei 100 casi disponevano di dati FISH e tumore sufficiente per il confronto con il risultato della colorazione IHC di ALK.

Tabella 19. Confronto tra l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) e Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit di Abbott.

Confronto tra l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) e Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit			
Analisi VENTANA anti-ALK (D5F3)	Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		Totale
	Positivo	Negativo	
Positivo	10	0	10
Negativo	1	75	76
Totale	11	75	86

Tabella 20. Tassi di concordanza percentuale complessiva, positiva e negativa per l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) confrontata con Abbott Vysis Break Apart FISH Probe Kit.

Tassi di concordanza percentuale complessiva, positiva e negativa			
Tasso	n/N	%	CI al 95% ^a
Concordanza percentuale complessiva	85/86	98.8	93.7, 99.8
Concordanza percentuale positiva	10/11	90.9	62.3, 98.4
Concordanza percentuale negativa	75/75	100.0	95.1, 100.0

^a Intervallo di confidenza bilaterale al 95% calcolato con il metodo del punteggio.

Tenere presente che non è stato verificato se la preparazione dei campioni di tessuto di questo studio rispettasse le procedure di preparazione dei campioni consigliate per questa analisi.

Studio di concordanza 2

Uno studio condotto presso un secondo laboratorio esterno ha confrontato l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) con dati Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit su 73 casi NSCLC (tagliati entro una settimana dalla colorazione). Il centro esterno ha colorato i casi utilizzando l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) su uno strumento BenchMark XT. L'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) ha presentato una concordanza percentuale complessiva > 93% con i dati Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit retrospettivi su questa coorte di campioni NSCLC. I risultati dettagliati sono riportati in Tabella 21 e Tabella 22.

Tabella 21. Confronto tra l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) e Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.

Confronto tra l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) e Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit			
Analisi VENTANA anti-ALK (D5F3)	Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		Totale
	Positivo	Negativo	
Positivo	2	4	6
Negativo	0	56	56
Totale	2	60	62

Tabella 22. Tassi di concordanza percentuale complessiva, positiva e negativa per l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) confrontata con Abbott Vysis Break Apart FISH Probe Kit.

Tassi di concordanza percentuale complessiva, positiva e negativa			
Tasso	n/N	%	CI al 95% ^a
Concordanza percentuale complessiva	58/62	93.5%	84.6-97.5
Concordanza percentuale positiva	2/2	100%	34.2-100.0
Concordanza percentuale negativa	56/60	93%	84.1-97.4

^a Intervallo di confidenza bilaterale al 95% calcolato con il metodo del punteggio.

Per i quattro casi discordanti (FISH-negativi, ALK-positivi tramite IHC) sono stati testati vetrini non colorati aggiuntivi con un'altra ALK (clone e sistema di rilevazione differenti). Tre dei quattro casi sono risultati concordanti con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) in termini di colorazione IHC di ALK rilevata.

In 10 casi i risultati FISH erano indeterminati oppure l'ibridazione in situ fluorescente non era stata effettuata. Quattro di questi casi erano positivi in base all'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) e all'altro clone ALK e sei erano negativi in base alla colorazione IHC di ALK. Un caso era positivo in base a FISH ma la quantità di campione non era sufficiente a consentire la colorazione IHC.

Studio di concordanza 3

In questo studio sono stati colorati con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) circa 300 casi di uno studio clinico globale in corso condotto su pazienti affetti da NSCLC ALK-positivo arruolati tramite Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit. Si tratta della stessa coorte precedentemente discussa nello studio sulla precisione inter-patologo. Dei circa 300 casi, alcuni sono stati classificati come "non informativi" in base a FISH o come "analisi FISH non effettuata" e sono stati colorati e valutati solo a fini informativi.

I casi sono stati messi in cieco relativamente allo stato FISH, randomizzati e consegnati a due patologi che hanno valutato i risultati della colorazione. I risultati sono stati confrontati con lo stato FISH ottenuto dallo studio clinico globale.

I risultati del confronto tra la colorazione IHC di ALK e ALK FISH sono mostrati in Tabella 23.

Tabella 23. Concordanza tra l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) e Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit secondo la valutazione di 2 patologi.

Confronto tra l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) e Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit				
Analisi VENTANA anti-ALK (D5F3)		Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		Totale
Patologo		Positivo	Negativo	
Patologo 1	Positivo	37	13	50
	Negativo	11	223	234
	Totale	48	236	284
Patologo 2	Positivo	37	12	49
	Negativo	11	225	236
	Totale	48	237	285

Tenere presente che non è stato verificato se la preparazione dei campioni di tessuto di questo studio rispettasse le procedure di preparazione dei campioni consigliate per questa analisi.

Casi discordanti che sono risultati ALK-positivi con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) e negativi secondo ALK FISH:

- Sono stati riscontrati 4 casi valutati da almeno un patologo come ALK-positivi tramite IHC e FISH-negativi. In seguito a revisione di consenso, è stato determinato che dovevano essere valutati come IHC-negativi. Tali casi presentavano colorazione focale citoplasmatica/di membrana; la spiegazione corrispondente è disponibile nella guida all'interpretazione.
- Sono stati riscontrati 9 casi ALK-positivi tramite IHC e negativi secondo ALK FISH che sono stati considerati veri casi discordanti.

Dei 9 casi discordanti, 7 possedevano vetrini non colorati disponibili per ulteriori test diagnostici ALK (test molecolari e test IHC utilizzando un clone e un sistema di rilevazione differenti). I risultati di tali test aggiuntivi hanno indicato che la maggioranza dei casi discordanti favoriva la valutazione IHC positiva dello stato ALK quando la valutazione ALK FISH era negativa. (Tenere presente che l'età dei vetrini tagliati da questi casi superava i 3 mesi consigliati).

Casi discordanti che sono risultati negativi con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) e positivi secondo ALK FISH:

- Sono stati riscontrati 11 casi positivi secondo FISH ma negativi all'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3). 10 casi possedevano vetrini non colorati disponibili per ulteriori test diagnostici ALK con tecniche molecolari e IHC. I risultati di tali test aggiuntivi hanno indicato che la maggioranza dei casi negativi con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) era negativa anche secondo un altro sistema IHC ALK, ma positiva in base a una o più analisi molecolari. Tenere presente che l'età dei vetrini tagliati da questi casi superava i 3 mesi consigliati per la colorazione IHC di ALK.
- Infine, sono stati riscontrati 14 casi nella coorte non informativi in base a FISH (non è stato ottenuto alcun risultato). Di questi, 3 sono stati valutati come positivi da entrambi i patologi in base all'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3). Sono stati inoltre riscontrati 19 casi per i quali non era possibile eseguire l'analisi FISH in base al vetrino H&E (in genere a causa della presenza di un contenuto di tumore insufficiente). Di questi, 4 casi sono stati valutati da entrambi i patologi come risultati positivi della colorazione IHC di ALK. Pertanto, in media, il 21% dei casi per i quali non erano stati ottenuti risultati FISH possedeva uno stato ALK positivo in base all'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3).

Studio di riproducibilità inter-laboratorio sullo strumento BenchMark XT

È stato condotto uno studio di riproducibilità inter-laboratorio per l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) per dimostrare la riproducibilità dell'analisi nella determinazione dello stato clinico ALK sullo strumento BenchMark XT; sono stati utilizzati campioni di tessuto NSCLC (6 ALK-positivi e 6 ALK-negativi) analizzati con 1 lotto di reagente, 3 strumenti e in 5 giorni non consecutivi presso tre laboratori esterni. I campioni sono stati randomizzati e valutati da un totale di 6 patologi (2 patologi/centro) in cieco rispetto allo stato clinico ALK della coorte. Questa coorte conteneva 180 vetrini generati da 12 casi NSCLC positivi e negativi per l'espressione di ALK rilevata tramite IHC e FISH. I casi sono stati colorati in replicato in un periodo di 21 giorni presso i 3 laboratori. Consultare la Tabella 24 per i risultati. Il tasso di accettabilità per morfologia e fondo in questi studi è risultato pari a 100%. Lo studio di riproducibilità inter-laboratorio (ILR) per l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) sullo strumento BenchMark XT ha fornito la concordanza positiva media (APA) e la concordanza negativa media (ANA) per i confronti a coppie tra centri, tra patologi e tra corse di colorazione (giorni) eseguiti sulla base delle osservazioni valutabili.

Tabella 24. ILR: tassi di concordanza per l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) sullo strumento BenchMark XT (n = 180 vetrini valutati).

Tassi di concordanza della riproducibilità inter-laboratorio (stato clinico ALK)	Concordanza positiva media (CI al 95%)	Concordanza negativa media (CI al 95%)	Concordanza percentuale complessiva (CI al 95%)
Tra centri (3 centri)	93.8% (76.2-100%)	94.9% (79.2-100%)	94.4% (83.3-100%)
Tra giorni (5 giorni non consecutivi)	99.1% (96.4-100%)	99.2% (96.9-100%)	99.2% (97.5-100%)
Tra patologi (2 patologi/centro)	98.8% (95.2-100%)	99.0% (95.8-100%)	98.9% (96.7-100%)

Studio di riproducibilità inter-laboratorio sullo strumento BenchMark ULTRA

È stato condotto un ulteriore studio di riproducibilità inter-laboratorio per l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) per dimostrare la riproducibilità dell'analisi nella determinazione dello stato clinico ALK sullo strumento BenchMark ULTRA; sono stati utilizzati campioni di tessuto NSCLC (7 ALK-positivi e 7 ALK-negativi) analizzati con 1 lotto di reagente, 3 strumenti e in 5 giorni non consecutivi presso tre laboratori esterni sullo strumento BenchMark ULTRA. I campioni sono stati randomizzati e valutati da un totale di 6 patologi (2 patologi/centro) in cieco rispetto allo stato clinico ALK della coorte. Questa coorte conteneva 210 vetrini generati da 14 casi NSCLC positivi e negativi per l'espressione di ALK rilevata tramite IHC e FISH. I casi sono stati colorati in replicato in un periodo di 21 giorni presso i 3 laboratori. Consultare la Tabella 25 per i risultati. Il tasso finale di accettabilità complessivo della colorazione per tutti i dati riuniti è risultato pari a 99%. Il tasso di accettabilità per morfologia e fondo in questi studi è risultato pari a 100%. Consultare la Tabella 26 per i risultati.

Lo studio ILR per l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) sullo strumento BenchMark ULTRA ha fornito la concordanza percentuale positiva (PPA) e la concordanza percentuale negativa (NPA) su tutte le osservazioni valutabili ottenute dallo studio riunendo tutti i centri, i patologi e i giorni utilizzando il punteggio di consenso come standard di riferimento.

Tabella 25. ILR: tassi di concordanza per l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) sullo strumento BenchMark ULTRA (n = 210 vetrini valutati).

Tassi di concordanza della riproducibilità inter-laboratorio (stato clinico ALK)	Concordanza percentuale positiva (CI al 95%)	Concordanza percentuale negativa (CI al 95%)	Concordanza percentuale complessiva (CI al 95%)
Su tutte le osservazioni valutabili	92.8% (88.4, 95.6%)	100.0% (98.2, 100.0%)	96.4% (94.1, 97.8%)

Tabella 26. Riproducibilità inter-laboratorio: tassi di concordanza inter-patologo per l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) sullo strumento BenchMark ULTRA (n = 210 vetrini valutati).

Tassi di concordanza della riproducibilità inter-laboratorio (stato clinico ALK) - tassi di concordanza tra patologi	Concordanza positiva media (CI al 95%)	Concordanza negativa media (CI al 95%)	Concordanza percentuale complessiva (CI al 95%)
Patologi A1 rispetto ad A2	97.0% (87.5-100%)	97.3% (89.5-100%)	97.1% (90.2-99.2%)
Patologi B1 rispetto a B2	93.5% (71.4-100%)	94.7% (81.0-100%)	94.2% (86.0-97.7%)
Patologi C1 rispetto a C2	92.3% (66.7-100%)	93.2% (74.7-100%)	92.8% (84.1-96.9%)
Complessiva	94.3% (75.6-100%)	95.1% (81.6-100%)	94.7% (84.1-100%)

Studio di riproducibilità inter-laboratorio e inter-patologo sullo strumento BenchMark ULTRA PLUS utilizzando i kit OptiView DAB IHC Detection e OptiView Amplification.

Lo studio di riproducibilità inter-laboratorio sullo strumento BenchMark ULTRA PLUS per l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) Assay è stato condotto per dimostrare la riproducibilità dell'analisi nella determinazione dello stato clinico ALK sullo strumento BenchMark ULTRA PLUS; sono stati utilizzati campioni di tessuto NSCLC (14 ALK-positivi e 14 ALK-negativi) analizzati con un lotto di reagente e uno strumento presso ciascuno di tre laboratori esterni per 5 giorni non consecutivi. I campioni sono stati randomizzati e valutati da un totale di 6 patologi (2 patologi/centro). Per ciascun caso, tutte le osservazioni valutabili dei patologi sono state confrontate con lo stato modale del caso. L'accettabilità dei vetrini dei controlli negativi del reagente e dei vetrini colorati per ALK è risultata pari a 100% per tutti i 420 vetrini (140 per centro) valutati. Consultare Tabella 27, Tabella 28 e Tabella 29 per i risultati.

L'analisi ILR per VENTANA anti-ALK (D5F3) BenchMark ULTRA PLUS ha fornito la concordanza percentuale positiva (PPA) e la concordanza percentuale negativa (NPA) su tutte le osservazioni valutabili ottenute dallo studio riunendo tutti i centri, i patologi e i giorni utilizzando lo stato ALK modale a livello di caso come standard di riferimento.

Tabella 27. Riproducibilità inter-laboratorio: tassi di concordanza per VENTANA anti-ALK (D5F3) Assay sullo strumento BenchMark ULTRA PLUS (n = 420 vetrini valutati).

Riproducibilità inter-laboratorio dello stato clinico ALK	Concordanza percentuale positiva (CI al 95%)	Concordanza percentuale negativa (CI al 95%)	Concordanza percentuale complessiva (CI al 95%)
Su tutte le osservazioni valutabili	98.6% (97.3, 99.7)	99.5% (98.7-100%)	99.0% (98.3-99.7%)

Oltre all'analisi basata sull'approccio dello stato modale a livello di caso, sono state effettuate anche analisi basate sull'approccio a coppie; di seguito sono riportati i risultati relativi a concordanza positiva media (APA) e concordanza negativa media (ANA).

Tabella 28. Riproducibilità inter-laboratorio: tassi di concordanza per VENTANA anti-ALK (D5F3) Assay sullo strumento BenchMark ULTRA PLUS (n = 420 vetrini valutati).

Tassi di concordanza della riproducibilità inter-laboratorio (stato clinico ALK)	Concordanza positiva media (CI al 95%)	Concordanza negativa media (CI al 95%)	Concordanza percentuale complessiva (CI al 95%)
Tra centri (3 centri)	98.1% (96.6-99.4%)	98.1% (96.8-99.4%)	98.1% (96.7-99.4%)
Tra giorni (5 giorni non consecutivi)	98.3% (96.9-99.4%)	98.3% (97.2-99.5%)	98.3% (97.1-99.5%)

Tabella 29. Riproducibilità inter-laboratorio: tassi di concordanza inter-patologo per VENTANA anti-ALK (D5F3) Assay sullo strumento BenchMark ULTRA PLUS (n = 420 vetrini valutati).

Riproducibilità inter-laboratorio dello stato clinico ALK tra patologi	Concordanza positiva media (CI al 95%)	Concordanza negativa media (CI al 95%)	Concordanza percentuale complessiva (CI al 95%)
Patologi A1 rispetto ad A2	99.3% (97.7-100%)	99.3% (98.0-100%)	99.3% (97.9-100%)
Patologi B1 rispetto a B2	94.8% (90.5-98.6%)	95.2% (91.4-98.6%)	95.0% (91.1-98.6%)
Patologi C1 rispetto a C2	100.0% (97.3-100%)	100.0% (97.3-100%)	100.0% (97.3-100%)
Complessiva	98.1% (96.6-99.4%)	98.1% (96.7-99.4%)	98.1% (96.7-99.4%)

Concordanza tra strumenti BenchMark ULTRA PLUS e BenchMark ULTRA

Tre laboratori di istituzioni distinte degli Stati Uniti hanno partecipato a uno studio di concordanza tra lo strumento BenchMark ULTRA PLUS e lo strumento BenchMark ULTRA. Per l'uso nello studio sono stati selezionati 144 casi a rappresentazione dell'intervallo di colorazione della popolazione "intended-use" dell'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3). Tutti i 144 casi sono stati colorati presso Ventana su uno strumento BenchMark ULTRA utilizzando OptiView DAB IHC Detection Kit abbinato a OptiView Amplification Kit. Vetrini tagliati dagli stessi casi sono stati randomizzati e distribuiti in pari misura (48 casi/centro) tra i centri partecipanti allo studio affinché fossero sottoposti a colorazione su uno strumento BenchMark ULTRA PLUS utilizzando il protocollo di colorazione consigliato con un unico lotto di kit OptiView DAB IHC Detection e OptiView Amplification. Due patologi per centro, in cieco rispetto allo stato dei casi, hanno valutato i vetrini colorati sullo strumento BenchMark ULTRA PLUS corrispondente e hanno assegnato uno stato clinico. Trascorso un periodo di 2 settimane per evitare il bias da

rievocazione, i vetrini dei casi corrispondenti, precedentemente colorati presso Ventana sullo strumento BenchMark ULTRA, sono stati distribuiti ai centri pertinenti per la valutazione clinica. Inoltre, un patologo interno ha esaminato tutti i vetrini dello studio ed è stato integrato in qualità di terzo patologo per ciascuno dei centri. I risultati sono stati analizzati da Ventana in termini di uno stato clinico ALK-positivo o negativo. I tassi OPA, PPA e NPA sono risultati pari rispettivamente a 95.4% (412/432), 93.5% (202/216) e 97.2% (210/216). Gli intervalli di confidenza (CI) bilaterali al 95% sono stati calcolati con il metodo bootstrap a percentili. I tassi di accettabilità morfologica e del fondo per tutti i casi sono risultati pari a 100% per entrambi gli strumenti. I risultati sono disponibili in Tabella 30.

Tabella 30. Concordanza riunita dei casi NSCLC ALK colorati con VENTANA anti-ALK (D5F3) Assay su strumenti BenchMark ULTRA PLUS rispetto a strumenti BenchMark ULTRA.

Stato ALK BenchMark ULTRA PLUS	Stato ALK BenchMark ULTRA		Totale
	Positivo	Negativo	
Positivo	202	6	208
Negativo	14	210	224
Totale	216	216	432
	n/N	% (CI al 95% ^[a])	
Concordanza percentuale positiva	202/216	93.5 (89.5, 97.2)	
Concordanza percentuale negativa	210/216	97.2 (94.5, 99.5)	
Concordanza percentuale complessiva	412/432	95.4 (92.8, 97.5)	

[a] Gli intervalli di confidenza (CI) bilaterali al 95% sono stati calcolati con il metodo bootstrap a percentili con 2000 replicati selezionati con stratificazione in base al gruppo di classificazione [ALK-positivo, ALK-negativo, ALK-positivo di difficile interpretazione, ALK-negativo di difficile interpretazione].

PRESTAZIONI CLINICHE

Studio di confronto tra metodi sullo strumento BenchMark XT

Le coorti dello studio di confronto tra metodi sono state create a partire da due studi clinici randomizzati indipendenti di crizotinib (denominati Studio 1 e Studio 2) in cui erano arruolati pazienti affetti da NSCLC ALK-positivo. Lo stato ALK di questi pazienti è stato determinato mediante l'analisi per studio clinico Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit presso diversi laboratori centrali. Sono stati ottenuti risultati Vysis ALK FISH validi per un totale di 1644 campioni di tessuto NSCLC (1018 e 626 campioni rispettivamente per lo Studio 1 e lo Studio 2).

Nello studio di confronto tra metodi con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3), campioni di pazienti sottoposti a screening per lo Studio 1 e lo Studio 2 sono stati inviati a un laboratorio centrale per la colorazione con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) e la valutazione dello stato IHC ALK in base ai criteri dell'algoritmo di valutazione dell'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) (Tabella 6). Tra i campioni che hanno generato risultati Vysis ALK FISH validi nello screening dello studio clinico, 933 campioni dallo Studio 1 (Tabella 31) e 598 campioni dallo Studio 2 (Tabella 33) hanno generato risultati validi anche per l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3).

Il numero di campioni che hanno generato risultati ALK-positivi e ALK-negativi per ciascuna analisi è mostrato in Tabella 31 e Tabella 33 rispettivamente per le coorti dello Studio 1 e dello Studio 2. I tassi di concordanza tra le due analisi sono mostrati in Tabella 32 e Tabella 34 rispettivamente per le coorti dello Studio 1 e dello Studio 2. I tassi di concordanza percentuale positiva e negativa segnalati sono risultati pari rispettivamente a 86.0% e 96.3% per lo Studio 1 (Tabella 32) e rispettivamente a 92.7% e 94.8% per lo Studio 2 (Tabella 34).

Tabella 31. Confronto tra lo stato ALK in campioni NSCLC (coorte dallo Studio 1) determinato mediante l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) rispetto a Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.

Stato ALK		Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		
		Positivo	Negativo	Totale
Analisi VENTANA anti-ALK (D5F3)	Positivo	154	28	182
	Negativo	25	726	751
	Totale	179	754	933

Tabella 32. Tassi di concordanza tra l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) e Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit nello Studio 1.

Tassi di concordanza tra analisi ALK	Concordanza percentuale positiva (CI al 95%)	Concordanza percentuale negativa (CI al 95%)	Concordanza percentuale complessiva (CI al 95%)
Anticorpo VENTANA anti-ALK (D5F3) e 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%)

Tabella 33. Confronto tra lo stato ALK nella coorte dello Studio 2 in campioni NSCLC determinato mediante l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) rispetto a Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.

Stato ALK		Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		
		Positivo	Negativo	Totale
Anticorpo VENTANA anti-ALK (D5F3)	Positivo	179	21	200
	Negativo	14	384	398
	Totale	193	405	598

Tabella 34. Tassi di concordanza tra l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) e Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit nello Studio 2.

Tassi di concordanza tra analisi ALK	Concordanza percentuale positiva (CI al 95%)	Concordanza percentuale negativa (CI al 95%)	Concordanza percentuale complessiva (CI al 95%)
Analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) e 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%)

Tenere presente che non è stato verificato se i campioni di tessuto usati nello Studio 1 e nello Studio 2 fossero stati preparati secondo le procedure di preparazione dei campioni consigliate per l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3).

Studio sull'esito clinico di crizotinib

L'analisi dell'efficacia clinica dell'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) come dispositivo diagnostico per la selezione di pazienti che possono trarre beneficio dal trattamento con crizotinib, un agente diretto contro ALK, si è basata sullo Studio 1. Tali pazienti sono stati testati con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) nel quadro dello Studio di confronto tra metodi così come di un ulteriore studio. Lo Studio 1 era uno studio multicentrico, multinazionale, randomizzato, open-label di fase 3 mirato a valutare efficacia e sicurezza di crizotinib rispetto alla chemioterapia di prima linea (pemetrexed/cisplatino o

pemetrexed/carboplatino) in pazienti precedentemente non trattati affetti da NSCLC non squamoso avanzato ALK-positivo. Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit (ALK FISH) è stato utilizzato per determinare la positività ad ALK e l'idoneità allo studio per lo Studio 1. In base ai risultati dell'analisi Vysis ALK FISH, 343 pazienti sono stati assegnati al gruppo randomizzato (172 nel braccio crizotinib e 171 nel braccio chemioterapia). Nello Studio sull'esito clinico con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3), campioni di tessuto dallo Studio 1 sono stati testati retrospettivamente con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3). Dei 343 pazienti arruolati nello Studio 1, 133 erano stati testati con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) nel quadro del protocollo dello Studio di confronto tra metodi e altri 39 pazienti erano stati testati nel quadro di un protocollo di studio separato, per un totale di 172 pazienti testati con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3). Di questi pazienti, 166 sono stati diagnosticati come ALK-positivi o ALK-negativi tramite IHC di ALK (D5F3). Gli esiti di efficacia complessivi per questi pazienti sono riassunti secondo i risultati dell'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) in Tabella 35.

Tabella 35. Beneficio clinico di crizotinib (sopravvivenza libera da progressione) per i pazienti arruolati nello Studio 1.

Stato ALK		HR ^a	SE ^a	CI al 95% ^a	Dimensione del campione	
					Braccio chemioterapia	Braccio crizotinib
Totale arruolati	FISH+	0.454	0.139	(0.346, 0.596)	171	172
	FISH+ ^b	0.407	0.214	(0.267, 0.618)	82	90
Test IHC di ALK	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 Rapporto di rischio (HR) osservato per la sopravvivenza libera da progressione (PFS) di crizotinib rispetto alla chemioterapia; errore standard (SE); e intervallo di confidenza (CI) bilaterale al 95%. I risultati sono stati stimati utilizzando un modello di Cox stratificato con i seguenti strati: razza, metastasi cerebrali e punteggio ECOG.

^b Per due pazienti ALK FISH+ nel braccio chemioterapia e 4 pazienti nel braccio crizotinib non sono stati ottenuti risultati IHC ALK-positivi o negativi.

Sono state effettuate ulteriori analisi di imputazione per includere pazienti i cui risultati del test con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) erano mancanti o non validi e per valutare la robustezza delle conclusioni dello studio. L'analisi statistica dei pazienti discordanti non arruolati nello Studio 1 ha previsto la simulazione di un insieme di possibili esiti per tali pazienti. I risultati di tutte le analisi ipotetiche si sono dimostrati in genere simili a quelli dell'analisi dell'efficacia primaria.

Casi discordanti FISH+/IHC- dallo Studio 1:

Studio di confronto tra metodi

Nello Studio di confronto tra metodi (Tabella 35), 25 pazienti dallo Studio 1 sono stati valutati come FISH+/IHC-. Il punteggio Vysis ALK FISH mediano (% di cellule tumorali positive al riarrangiamento del gene ALK) per questi casi è risultato pari a 20% (media 31.6%, SD 21.58%) e per 14 di questi casi il punteggio FISH era pari o inferiore a 25%. Sebbene tutti questi casi possedessero punteggi Vysis ALK FISH superiori al cutoff del 15% per la positività ad ALK, tali punteggi rientravano nella zona FISH equivoca (10%-50%). Al contrario, il punteggio FISH mediano osservato per tutti i pazienti arruolati testati mediante IHC era pari a 58% (media 56.9%, SD 21.97%).

Studio sull'esito clinico

Nello Studio sull'esito clinico, 25 pazienti arruolati nello Studio 1 sono stati valutati come FISH+/IHC- (vedere la seconda riga della Tabella 35). Otto di questi casi sono stati randomizzati al braccio crizotinib dello studio clinico. Di questi pazienti, cinque possedevano punteggi FISH molto vicini al cutoff FISH (15%-18% di cellule tumorali positive al riarrangiamento del gene ALK) e presentavano inoltre progressione obiettiva o malattia stabile/nessuna risposta. Due degli 8 pazienti possedevano punteggi FISH esterni alla zona FISH equivoca (66% e 72% di cellule tumorali positive al riarrangiamento del gene ALK) e presentavano risposta tumorale obiettiva parziale. L'ottavo paziente IHC- era FISH- ed era stato arruolato erroneamente; questo paziente presentava una risposta indeterminata.

Casi discordanti FISH-/IHC+ dallo Studio 1

Nello Studio di confronto tra metodi con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3), 28 casi sottoposti a screening per lo Studio 1 sono stati valutati come FISH-/IHC+. Poiché FISH era l'analisi per lo studio clinico e nello Studio 1 sono stati arruolati solo casi FISH+, per i casi discordanti FISH-/IHC+ non sono disponibili dati sull'esito.

Studio sull'esito clinico di ceritinib

L'analisi dell'efficacia clinica dell'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) come dispositivo diagnostico per la selezione di pazienti che possono trarre beneficio dal trattamento con ceritinib si è basata su uno studio open-label, randomizzato, a controllo attivo, multicentrico di fase 3 (Studio 3) di ceritinib per via orale. Questo studio ha confrontato l'efficacia e la sicurezza clinica del trattamento con ceritinib con quelle della chemioterapia (doppietta a base di platino con pemetrexed seguita da terapia di mantenimento con pemetrexed in pazienti senza malattia progressiva dopo 4 cicli) in pazienti adulti precedentemente non trattati affetti da NSCLC non squamoso localmente avanzato o metastatico ALK-positivo. L'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) è stata utilizzata sullo strumento BenchMark XT per testare un totale di 1778 pazienti relativamente all'idoneità allo Studio 3, il cui requisito era uno stato ALK positivo. Un totale di 376 pazienti i cui tumori hanno ottenuto un risultato ALK-positivo con l'analisi è stato assegnato al gruppo randomizzato (189 nel braccio ceritinib e 187 nel braccio chemioterapia). Gli esiti di efficacia complessivi per i pazienti trattati con ceritinib sono riassunti in Tabella 36. Ceritinib ha evidenziato un beneficio statisticamente e clinicamente significativo rispetto alla chemioterapia, con una riduzione del rischio del 45% nella PFS secondo la valutazione del BIRC (HR = 0.55; CI al 95%: 0.42, 0.73; p < 0.001), per i pazienti selezionati tramite l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3). La PFS mediana secondo la valutazione del BIRC è risultata pari a 16.6 mesi (CI al 95%: 12.6, 27.2) e 8.1 mesi (CI al 95%: 5.8, 11.1) rispettivamente per il braccio ceritinib e il braccio chemioterapia.

Tabella 36. Beneficio clinico di ceritinib (sopravvivenza libera da progressione) per i pazienti arruolati nello Studio 3.

Sopravvivenza libera da progressione	Ceritinib (N = 189)	Chemioterapia (N = 187)
Mediana, mesi (CI al 95%) ^a	16.6 (12.6, 27.2)	8.1 (5.8, 11.1)
HR (CI al 95%) ^b	0.55 (0.42, 0.73)	
Valore p ^c	< 0.001	

HR = rapporto di rischio; CI = intervallo di confidenza; BIRC = comitato di revisione indipendente in cieco; NR = non raggiunta; NE = non valutabile

^a Stimata con il metodo di Kaplan-Meier.

^b È stato utilizzato un modello di regressione di Cox stratificato in base ai fattori di stratificazione della randomizzazione (stato di performance WHO: 0 rispetto a 1-2; presenza o assenza di metastasi cerebrali, presenza o assenza di chemioterapia neo-/adiuvante precedente) per stimare il rapporto di rischio della PFS, unitamente al CI al 95% basato sul test di Wald.

^c In base al log-rank test stratificato (stessa stratificazione di cui alla Nota b).

I tassi di accettabilità della colorazione per l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) nella popolazione intent-to-diagnose (i 1778 pazienti testati con l'analisi) sono riportati in Tabella 37. Sono indicati anche i tassi di morfologia e fondo accettabili per i vetrini colorati con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3). Per 122 campioni il tentativo iniziale di colorazione con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) non è riuscito e ne è stato effettuato un secondo. Nel tentativo di colorazione finale, 48 dei 122 campioni sono rimasti non accettabili (1 a causa del controllo della corsa di colorazione non valido, 30 a causa di H&E non accettabile, 12 a causa di controllo negativo del reagente non accettabile, 1 a causa di fondo non accettabile, 2 a causa di morfologia e fondo non accettabili e 2 a causa di vetrino IHC non valutabile). L'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) ha evidenziato elevati tassi di accettabilità complessivi iniziali e finali della colorazione, pari rispettivamente a 93.1% e 97.3%. I tassi di accettabilità finali di morfologia e fondo sono risultati pari o superiori a 99%.

Tabella 37. Caratteristiche prestazionali iniziali e finali della colorazione con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) per campioni dello studio NSCLC sottoposti a screening per l'arruolamento nello Studio 3.

Attributi della colorazione valutati	Tasso di accettabilità % (n/N) (CI al 95%)	
	Tentativo di colorazione iniziale	Tentativo di colorazione finale
Tasso di accettabilità complessivo della colorazione IHC di ALK	93.1% (1656/1778) (91.9-94.2%)	97.3% (1730/1778) (96.4-98.0%)
Colorazione di fondo	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%)

Studio sull'esito clinico di alectinib

L'analisi dell'efficacia clinica dell'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) come dispositivo diagnostico per la selezione di pazienti che possono trarre beneficio dal trattamento con alectinib si è basata su uno studio open-label, randomizzato, a controllo attivo, multicentrico di fase 3 (Studio #BO28984) di alectinib per via orale. Questo studio ha confrontato l'efficacia e la sicurezza clinica del trattamento con alectinib con quelle del trattamento con crizotinib in pazienti adulti precedentemente non trattati affetti da NSCLC localmente avanzato o metastatico ALK-positivo. L'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) è stata utilizzata sullo strumento BenchMark XT per testare un totale di 1239 pazienti relativamente all'idoneità allo Studio #BO28984, il cui requisito era uno stato ALK positivo in base a test eseguiti a livello centrale. Un totale di 303 pazienti i cui tumori hanno ottenuto un risultato ALK-positivo con l'analisi è stato randomizzato e analizzato in termini di efficacia (152 nel braccio alectinib e 151 nel braccio crizotinib). Gli esiti di efficacia complessivi sono riassunti in Tabella 38. Alectinib ha evidenziato un beneficio statisticamente e clinicamente significativo rispetto a crizotinib, con una riduzione del rischio del 53% nella PFS secondo la valutazione del ricercatore (HR = 0.47, CI al 95%: 0.34, 0.65; $p < 0.0001$) e una riduzione del rischio del 50% nella PFS secondo la valutazione dell'IRC (HR = 0.50, CI al 95%: 0.36, 0.7; $p < 0.0001$), per i pazienti selezionati tramite l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3). La PFS mediana secondo la valutazione del ricercatore non è stata raggiunta nel braccio alectinib e secondo la valutazione dell'IRC è risultata pari a 25.7 mesi (CI al 95%: 19.9, NE) e 10.4 mesi (CI al 95%: 7.7, 14.6) rispettivamente per il braccio alectinib e il braccio crizotinib.

Tabella 38. Beneficio clinico di alectinib o crizotinib (sopravvivenza libera da progressione) per i pazienti arruolati nello Studio #BO28984.

Sopravvivenza libera da progressione valutata dal ricercatore	Alectinib (N = 152)	Crizotinib (N = 151)
Mediana, mesi (CI al 95%) ^a	NE (17.7, NE%)	11.1 (9.1, 13.1%)
HR (CI al 95%) ^b	0.47 (0.34, 0.65%)	
Valore p ^c	< 0.0001	
Sopravvivenza libera da progressione secondo la valutazione IRC	Alectinib (N = 152)	Crizotinib (N = 151)
Mediana, mesi (CI al 95%) ^a	25.7 (19.9, NE%)	10.4 (7.7, 14.6%)
HR (CI al 95%) ^b	0.50 (0.36, 0.70%)	
Valore p ^c	< 0.0001	

HR = rapporto di rischio; CI = intervallo di confidenza; IRC = comitato di revisione indipendente; NE = non valutabile

^a Stimata con il metodo di Kaplan-Meier.

^b Il rapporto di rischio è stato stimato mediante regressione di Cox, con stratificazione per le covariate razza (asiatica rispetto a non asiatica) e metastasi al SNC al basale (presenza/assenza) da parte dell'IRC

^c In base al log-rank test stratificato (stessa stratificazione di cui al punto [b]).

I tassi di accettabilità della colorazione per l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) nella popolazione intent-to-diagnose (i 1239 pazienti testati con l'analisi) si sono dimostrati confrontabili con i risultati dello studio A2301.

Studio sull'esito clinico di lorlatinib

L'efficacia di lorlatinib nel trattamento di pazienti affetti da NSCLC ALK-positivo che non avevano ricevuto precedente terapia sistemica per la malattia metastatica è stata determinata in uno studio open-label, randomizzato, a controllo attivo, multicentrico (Studio B7461006; NCT03052608; CROWN). I pazienti dovevano presentare uno stato di performance ECOG di 0-2 ed NSCLC ALK-positivo in base all'identificazione tramite l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3). Erano idonei i pazienti neurologicamente stabili con metastasi al sistema nervoso centrale (SNC) trattate o non trattate asintomatiche, metastasi leptomeningee incluse.

Un totale di 296 pazienti è stato randomizzato in rapporto 1:1 per ricevere lorlatinib 100 mg per via orale una volta al giorno (n = 149) o crizotinib 250 mg per via orale due volte al giorno (n = 147). La randomizzazione è stata stratificata per etnia (asiatica rispetto a non asiatica) e presenza o assenza di metastasi al SNC al basale. Il trattamento in entrambi i bracci è proseguito fino alla progressione della malattia o fino a tossicità inaccettabile. La principale misura dell'efficacia è stata la sopravvivenza libera da progressione (PFS) così come determinata tramite una revisione centrale indipendente in cieco (BICR) secondo la versione 1.1 (RECIST v1.1).

I risultati dello studio hanno evidenziato un miglioramento sostanziale e statisticamente significativo nella PFS per il braccio lorlatinib rispetto al braccio crizotinib, con una riduzione del 72% nel rischio di progressione della malattia o decesso secondo la valutazione BICR (HR = 0.28; CI al 95%: 0.19, 0.41; $p < 0.0001$; Tabella 39). I dati relativi alla sopravvivenza globale non erano ancora completi al momento del cutoff dei dati clinici.

Le analisi dei sottogruppi nei partecipanti con o senza metastasi cerebrali al basale hanno prodotto risultati coerenti con l'esito PFS primario. La probabilità che il SNC divenisse il primo sito di progressione della malattia, da solo o con progressione sistemica concomitante, è risultata marcatamente inferiore nel braccio lorlatinib (2.7%) rispetto al braccio crizotinib (23.8%), con un HR stratificato per causa specifica pari a 0.06 (CI al 95%: 0.02, 0.18).³⁶

Tabella 39. Esiti di efficacia complessivi nello Studio B7461006 (CROWN).

Sopravvivenza libera da progressione (secondo la valutazione BICR)	Lorlatinib (N = 149)	Crizotinib (N = 147)
Numero di eventi, n (%)	41 (27.5%)	86 (58.5%)
Malattia progressiva, n (%)	32 (21.5%)	82 (55.8%)
Decessi, n (%)	9 (6.0%)	4 (2.7%)
Probabilità di PFS a 12 mesi (CI al 95%) ^a	0.78 (0.70, 0.84)	0.39 (0.30, 0.48)
Rapporto di rischio (CI al 95%) ^b	0.28 (0.19, 0.41)	
Valore p ^c	< 0.0001	

Abbreviazioni: CI = intervallo di confidenza; NE = non valutabile; PFS = sopravvivenza libera da progressione.

^a Gli intervalli di confidenza sono stati ottenuti mediante trasformazione log-log con retro-trasformazione alla scala originale.

^b Rapporto di rischio stratificato in base al modello a rischi proporzionali di Cox.

^c Valore p unilaterale in base al log-rank test stratificato.

I test con l'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) di 232 campioni di screening dello Studio B7461006 presso i laboratori centrali hanno prodotto tassi di accettabilità della colorazione pressoché identici a quelli osservati nello Studio A2301.

CONCLUSIONE

L'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) è riproducibile per quanto riguarda i risultati della colorazione per lo stato clinico ALK sugli strumenti BenchMark IHC/ISH. L'algoritmo di valutazione binario è caratterizzato da un'elevata riproducibilità tra patologi. L'analisi genera risultati concordanti con Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit relativamente allo

stato ALK. L'analisi VENTANA anti-ALK (D5F3) può essere utilizzata per l'identificazione dei pazienti idonei al trattamento con XALKORI® (crizotinib), ZYKADIA® (ceritinib), ALECENSA® (alectinib) o lorlatinib.

RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Se si osserva colorazione inadeguata dei tessuti di controllo NSCLC o appendice umani a livello di sistema, oppure dei campioni del paziente, assicurarsi di aver eseguito le procedure di manutenzione dello strumento BenchMark IHC/ISH. Se non si riscontrano problemi tecnici né scostamenti dalle procedure di manutenzione, rivolgersi al rappresentante dell'assistenza locale prima di ripetere una corsa di colorazione.

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. 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 broad-spectrum potency against ALK-resistant mutations. *J Med Chem* 2014;57:4720-44.

- Gainor J, Dardaei L, et al. Molecular mechanisms of resistance to first and second generation ALK inhibitors in ALK-rearranged lung cancer. *Cancer Discov* 2016;6:1118-33.
- Zou H, Qiu H, et al. PF-06463922 is a potent and selective next-generation ROS1/ALK inhibitor capable of blocking crizotinib-resistant ROS1 mutations. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112(11):3493-3498.
- Galetta D, et al. The emerging role of ALK inhibitors in the treatment of advanced non-small cell lung cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2012 Suppl 2:S545-54.
- Jokoji R, et al. Combination of morphological feature analysis and immunohistochemistry is useful for screening of EML4-ALK-positive lung adenocarcinoma. *J Clin Pathol*. 2010;63(12):1066-70.
- Mino-Kenudson M, et al. A novel, highly sensitive antibody allows for the routine detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas by standard immunohistochemistry. *Clin Cancer Res*. 2010;16(5):1561-71.
- Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and practice of Histotechnology, 2nd edition. St. Louis: The C.V. Mosby Company; 1980.
- Carson F, Hladik C. Histotechnology: A Self Instructional Text, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
- Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
- Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
- Roche PC, Hsi ED. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. In: NR Rose, ed. ASM Press; 2002.
- NordQC: Nordic Immunohistochemical Quality Control Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) (lung protocol). Assessment Run 39 2013. http://www.nordqc.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).

NOTA: nel presente documento si utilizza sempre un punto come separatore decimale per separare la parte intera di un numero decimale da quella frazionaria. I separatori per le migliaia non sono utilizzati.

Il riepilogo dei dati su sicurezza e prestazioni è disponibile al seguente indirizzo: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>

Simboli

Ventana usa i seguenti simboli e segni in aggiunta a quelli elencati nello standard ISO 15223-1 (per gli Stati Uniti: visitare il sito dialog.roche.com per le definizioni dei simboli utilizzati):

	Numero prodotto globale
	Identificazione unica del dispositivo
	Indica l'entità che importa il dispositivo medico nell'Unione europea

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Rev.	Aggiornamenti
B	Aggiornamenti alle sezioni: Significatività clinica, Avvertenze e precauzioni, Procedura di colorazione, Interpretazione della colorazione/risultati previsti, Prestazioni analitiche, Bibliografia e Proprietà intellettuale. Aggiunta dello strumento BenchMark ULTRA PLUS.

PROPRIETÀ INTELLETTUALE

VENTANA, BENCHMARK, OPTIVIEW e il logo VENTANA sono marchi commerciali di Roche.



Tutti gli altri marchi commerciali sono di proprietà dei rispettivi titolari.

© 2022 Ventana Medical Systems, Inc.

Venduto su licenza di



INFORMAZIONI DI CONTATTO



Roche Diagnostics GmbH

Sandhofer Strasse 116

D-68305 Mannheim

Germany

+800 5505 6606

www.roche.com

