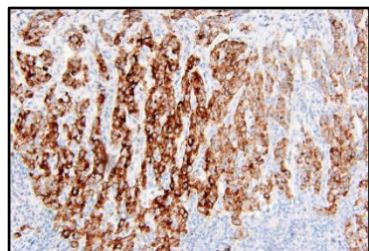


VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

REF 790-4794

06679072001

IVD  50



Obrázek 1. Test exprese protilátky VENTANA anti-ALK (D5F3) na nemalobuněčném karcinomu plic.

XALKORI® (crizotinib), ZYKADIA® (ceritinib) nebo ALECENSA® (alectinib).

Tento produkt musí interpretovat kvalifikovaný patolog v kombinaci s histologickým vyšetřením, relevantními klinickými informacemi a správnými kontrolami.

Tato protilátka je určena k diagnostice *in vitro* (IVD).

SOUHRN A VYSVĚTLENÍ

Protein kinázy anaplastického lymfomu (ALK) je tyrozinkinázový receptor, který je členem super rodiny inzulinového receptoru.¹ ALK je membránový glykoprotein typu I a je běžně exprimován v nervovém systému.² Gen ALK je lokalizován na chromozomu 2p23 a je složen ze 2 velkých intronů a 26 exonů.¹ Molekulární podstata patogeneze ALK začíná chromozomálními přeuspořádáním, které slučuje 3' kódující sekvence pro intracelulární signální doménu ALK s 5' elementy promotoru a kódujícími sekvencemi dalších genů. 5' elementů promotoru a kódující sekvence pohánějí nadměrnou expresi chimér a ligand-independentní oligomerizace chimerických proteinů, vlastnosti obvyklé u tyrozinkinázového proteinu fúzního typu lidských novotvarů.

Inverze uvnitř chromozomu 2p mající za následek tvorbu produktu fúzního genu obsahujícího části protein-like 4 (EML4) genu asociovaného s mikrotubuly echinodermu a genu ALK byla objevena v roce 2007 v buněčných liniích NSCLC a archivovaných klinických vzorcích.³ Další řada publikovaných studií ukázala, že případy inverze EML4-ALK zahrnují minimálně 9 variant katalyticky aktivních kinázových fúzních proteinů, přičemž každá je složena ze stejné části C-terminální domény kinázy.⁴⁻⁸ Podobně jako u fúzních genů ALK poprvé identifikovaných v anaplastickém velkobuněčném lymfomu (ALCL), byla i u fúzního proteinu EML4-ALK prokázána transformační aktivita. V souladu s tím byla exprese EML4-ALK u plicních alveolárních epitelálních buněk transgenních myši hlášena jako potentní onkogenní faktor.⁹

KLINICKÝ VÝZNAM

NSCLC je nejčastějším typem karcinomu plic. Do skupiny NSCLC se řadí tři hlavní typy: adenokarcinomy, dlaždicobuněčné karcinomy a velkobuněčné karcinomy.

ALK je nyní považován za klíčový onkogenní faktor u NSCLC, a i když ELM4 je predominantní fúzní partner, byly identifikovány i jiné partnerské fúzní geny.^{10,11} Incidence změny uspořádání genu ALK se zdá být v rozsahu 2 až 7 %, což vede přibližně k 6 000 ALK pozitivním pacientům / rok v USA a 40 000 pacientům / rok po celém světě.^{3,4,7}

V rutinní imunohistochemii (IHC) lze snadno používat malé vzorky tkání, díky čemuž se z této metody při použití protilátek, jež detekují antigeny významné pro interpretaci karcinomu, stává účinný nástroj pro patology při stanovování diagnózy a prognózy onemocnění. Důležitým markerem pro NSCLC je ALK.

Významná většina změn uspořádání genu ALK byla pozorována u vzorků adenokarcinomu plic na rozdíl od spinocelulárních nebo malobuněčných etiologií.³⁻⁸ Některé důkazy svědčí pro korelaci mezi změnami uspořádání genu ALK a NSCLC u pacientů, kteří předtím nikdy nekouřili nebo kouřili pouze minimálně, i když toto nemusí být statisticky významný kofaktor.^{3,4,7,9} Důležité je, že změny uspořádání genu ALK jsou

pouze zřídka spojené s mutacemi EGFR, HER2 nebo KRAS, což dokládá, že pozitivita ALK je samostatný podtyp onemocnění.⁹ XALKORI® je selektivní ATP-kompetitivní malomolekulový inhibitor tyrozinkináz ALK ROS1 a receptoru pro c-Met / hepatocytární růstový faktor (HGFR) a jejich onkogenních variant (např. fúzní proteiny ALK nebo ROS1 nebo mutantní varianty c-Met/HGFR). XALKORI® prokázal v buněčných testech u tumorózních buněčných linií inhibici fosforylace ALK a c-Met závislou na koncentraci. Prokázal také protinádorovou aktivitu u myši s tumorózními xenografty exprimujícími fúzní proteiny EML4 nebo NPM-ALK nebo Met.^{12,13,14}

ZYKADIA® je kinázový inhibitor. Přípravek ZYKADIA® je dle biochemických nebo buněčných testů schopen v klinicky relevantních koncentracích inhibovat ALK, receptoru insulínu podobného růstového faktoru 1 (IGF-1R), insulínový receptor (InsR) a ROS1. Z uvedených vykazuje přípravek ZYKADIA® nejvyšší aktivitu proti ALK. Autofosforylace ALK inhibovaná přípravkem ZYKADIA®, ALK mediovaná fosforylace downstream signálního proteinu STAT3 a proliferace ALK-dependenčních maligních buněk v testech *in vitro* a *in vivo*.

ZYKADIA® inhiboval *in vitro* proliferaci buněčných linií exprimujících fúzní proteiny EML4-ALK a NPM-ALK a vykazoval inhibici růstu ELM4-ALK-positivního xenograftu NSCLC závislou na dávce u myši a krysu.¹⁵

Klinický význam změn uspořádání genu ALK byl prokázán v randomizovaných klinických hodnoceních s aktivní kontrolou u přípravku XALKORI® prováděných společností Pfizer a přípravku ZYKADIA® prováděných společností Novartis.^{14,15}

Přípravek ALECENSA® je vysoce selektivní a silný inhibitor tyrozinkináz ALK a RET a inhibuje nitro-buněčné signální dráhy zapojené do proliferace a přežívání nádorových buněk, a tím pádem navozuje smrt nádorových buněk a zabraňuje jejich růstu a proliferaci.¹⁶ Z předklinických dat vyplývá, že přípravek ALECENSA® není substrátem efluxních transportérů (PGP či BCRP) v krevně-mozkové bariéře, a tudíž se distribuuje a udržuje v centrálním nervovém systému. Přípravek ALECENSA® indukoval regresí nádoru v preklinických modelech myších xenograftů, včetně protinádorové aktivity v mozku, a vedl k delšímu přežití zvířecích modelů s intrakraniálním nádorem.¹⁷ Přípravek ALECENSA® je dobře snášený a jeho bezpečnostní profil je snadno říditelný.¹⁸⁻²⁰

Ventana prokázala shodu protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3) a soupravy Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit (ALK FISH) ohledně stanovení ALK u pacientů s NSCLC. ALK FISH může při vyhodnocování výsledků zabarvení představovat technické problémy. Intrachromozomální přestavby mohou vést k subtilnímu rozdělení signálu, což může vést k falešně negativním výsledkům.²¹ Nedávné studie ukazují, že IHC je citlivá a specifická na určení stavu ALK a je alternativou pro ALK FISH.^{10,11, 21-23} Společnost Ventana vyvinula protilátkový test VENTANA anti-ALK (D5F3) a spojený algoritmus hodnocení ke stanovení stavu ALK u vzorků NSCLC.

Interpretace výsledků barvení protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3) na vzorcích tkáně musí být provedena za použití doporučeného algoritmu hodnocení. Histologické tkáňové preparáty s intaktní morfologií tkáně mohou být užitečné při interpretaci pozitivitu ALK vzorku. Všechny histologické testy musí interpretovat patolog, výsledky by měly být doplněny morfologickými studii a řádnými kontrolami a měly by být použity ve spojení s dalšími klinickými a laboratorními údaji. Na cílové antigeny testů IHC má vliv doba fixace, typ fixativa a stáří řezů na sklíčkách, proto je potřebné zajistit kompatibilitu přípravy vzorků před barvením (viz příručka interpretace Interpretation Guide for VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody pro nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC) P/N 1011879 a část Specifická omezení níže).

PRINCIPY METODY

VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody je králičí monoklonální primární protilátka, která se váže na ALK v tkáňových řezech zalitých v parafínu. Specifickou protilátku je možné zobrazit pomocí detekční soupravy OptiView DAB IHC Detection Kit (kat. č. 760-700 / 06396500001) a poté amplifikační soupravy OptiView Amplification Kit (kat. č. 760-099 / 06396518001 (50 testů) nebo 860-099 / 06718663001 (250 testů)). Další informace naleznete v příbalových informacích k soupravám OptiView DAB IHC Detection Kit a OptiView Amplification Kit.

DODÁVANÉ REAGENCIE

VENTANA anti-ALK (D5F3) obsahuje rekombinantní králičí monoklonální protilátku a dostatek reagentie pro obarvení 50 sklíček.

Jeden 5 ml dávkovač protilátky VENTANA anti-ALK (D5F3) obsahuje přibližně 70 µg králičí monoklonální protilátky (D5F3).

Protilátka je naředěna v 0,08 M PBS s obsahem 3 % nosného proteinu a 0,05 % konzervační látky ProClin 300.

Celková koncentrace proteinu v reagentii je asi 10 mg/ml. Koncentrace specifické protilátky je asi 14 µg/ml.

POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ BALENÍ

- Vzorky lidského apendixu nebo ALK-pozitivní a ALK-negativní vzorky nemalobuněčného karcinomu plic, které budou sloužit jako kontrolní tkáň
- Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (kat. č. 790-4795 / 06683380001)
- Mikroskopická sklíčka, pozitivně nabitá
- Sušička schopná udržovat teplotu 60 °C ± 5 °C
- Štítky s čárovými kódy
- Xylen (histologický stupeň)
- Etanol nebo reagenční alkohol (histologický stupeň)
 - 100 % roztok: nezředěný etanol nebo reagenční alkohol
 - 95 % roztok: směs 95 dílů etanolu nebo reagenčního alkoholu s 5 díly deionizované vody
 - 80 % roztok: směs 80 dílů etanolu nebo reagenčního alkoholu s 20 díly deionizované vody
- Deionizovaná nebo destilovaná voda
- Detekční souprava OptiView DAB IHC Detection Kit (kat. č. 760-700 / 06396500001)
- Amplifikační souprava OptiView Amplification Kit (kat. č. 760-099 / 06396518001 (50 testů) nebo 860-099 / 06718663001 (250 testů))
- EZ Prep Concentrate (10X) (kat. č. 950-102 / 05279771001)
- Reaction Buffer Concentrate (10x) (kat. č. 950-300 / 05335955001)
- LCS (Predilute) (kat. č. 650-010 / 05264839001)
- ULTRA LCS (Predilute) (kat. č. 650-210 / 05424534001)
- Cell Conditioning 1 (CC1) (kat. č. 950-124 / 05279801001)
- ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (kat. č. 950-224 / 05424569001)
- Hematoxylin II (kat. č. 790-2208 / 05277965001)
- Bling Reagent (kat. č. 760-2037 / 05266769001)
- Permanentní fixační médium (Permount Fisher, kat. č. SP15-500 nebo ekvivalentní)
- Krycí sklíčko (dostatečně velké pro překrytí tkáně, např. VWR, kat. č. 48393-060)
- Krycí roztok pro barvicí automat (např. krycí roztok pro barvicí automat Tissue-Tek SCA Automated Coverslipper)
- Světelný mikroskop
- Absorpční utěrky

Barvicí reagentie, například detekční soupravy VENTANA a pomocné materiály, včetně kontrolních sklíček pro negativní a pozitivní tkáň, nejsou součástí dodávky.

Všechny produkty uvedené v příbalové informaci nemusejí být dostupné ve všech zeměpisných oblastech. Obratě se na své místní servisní zastoupení.

SKLADOVÁNÍ

Po přijetí a mezi používání uchovávejte při teplotě 2–8 °C. Chraňte před mrazem.

Aby byl zajištěn správný výkon reagentie a stabilita protilátky, musí se dávkovač po každém použití uzavřít víčkem a okamžitě umístit ve vertikální poloze do chladničky.

Každý dávkovač s protilátkou má stanovenou dobu expirace. Při řádném skladování zůstane reagentie stabilní do data uvedeného na štítku. Po uplynutí data expirace reagentie nepoužívejte.

PŘÍPRAVA VZORKŮ

Pro použití této primární protilátky s detekčními soupravami VENTANA a přístroji BenchMark IHC/ISH jsou vhodné tkáně zpracované běžným způsobem, fixované ve formalínu a zalité v parafínu.

Na základě modelů xenograftů z lidské buněčné linie NSCLC NCI-H2228 s pozitivitou na ALK doporučuje společnost Ventana tkáňovou fixaci v 10 % neutrálním pufovaném formalínu (NBF) po dobu alespoň 6 hodin.²⁴ Fixační doby kratší než 6 hodin vedou

k významnému poklesu intenzity barvení u ALK. Fixativum zinkového formalínu je rovněž akceptovatelné pro dobu fixace nejméně 6 hodin. Použití množství by mělo odpovídat 15 až 20 násobku objemu tkáně. Během 24 hodin neproniknou fixativa do větší hloubky než 2 až 3 mm pevné tkáně nebo 5 mm porézní tkáně. Fixace může být provedena při pokojové teplotě (15–25 °C).²⁵

Fixativa, např. alkohol-formalín-kyselina octová (AFA), fixativum PREFER, B5 a další kyseliny a fixativa s obsahem alkoholu, vykázala při všech testovaných dobách fixace (1 až 72 hodin) ztrátu intenzity barvení na ALK. Jejich použití u tohoto testu tedy nelze doporučit. Prodleva ve fixačních studiích vedla také ke ztrátě intenzity fixace u ALK, když vzorky xenograftu nebyly fixované do 6 hodin od excize. Další informace o vlivu přípravy vzorků na intenzitu barvení na ALK naleznete v příručce interpretace výsledků Interpretation Guide for VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody pro nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC) P/N 1011879.

Je třeba nařezat řezy silně zhruba 4 µm a fixovat je na pozitivně nabitá podložní sklíčka. Sklíčka je nutné obarvit okamžitě, neboť antigenost tkáňových řezů časem slabne a bývá narušena po 3 měsících od odkrojení z parafinového bločku (viz interpretační příručka Interpretation Guide for VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody pro nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC) P/N 1011879 a část Funkční charakteristiky níže).

UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ PŘEDPISY

- K diagnostice *in vitro* (IVD).
- Pouze k odbornému použití.
- Nezapomínejte, že sklíčka s pozitivním nábojem mohou být citlivá na zátěž prostředí, což povede k neodpovídajícímu barvení u všech testů IHC (např. nedostatek primární protilátky nebo kontrastního barviva tkáně). Vlivu zátěže prostředí na pozitivně nabitá sklíčka IHC lépe porozumíte na základě informací v referenčním dokumentu N4629_0313B-Impact of environmental stress on various histology slide types.
- Roztok ProClin 300 se používá v této reagentii jako konzervační prostředek. Je klasifikován jako dráždivý a při styku s pokožkou může způsobit senzibilizaci. Při manipulaci dodržujte příslušná bezpečnostní opatření. Zamezte kontaktu reagentii s očima, pokožkou a sliznicemi. Používejte vhodný ochranný oděv a rukavice.
- S materiálem lidského nebo živočišného původu je třeba nakládat jako s nebezpečným biologickým materiálem a likvidovat jej v souladu s platnými bezpečnostními opatřeními.
- Zabraňte kontaktu reagentii s očima a sliznicemi. Jestliže se reagentie dostanou do kontaktu s citlivými oblastmi, omyjte je velkým množstvím vody.
- Zabraňte mikrobiální kontaminaci reagentii, mohla by způsobit nepřesnost výsledků.
- Doporučené metody likvidace jsou uvedeny v celostátních a místních předpisech.
- Další informace o bezpečnosti naleznete v bezpečnostních listech a v příručce s výkladem symbolů a rizik na adrese www.ventana.com.

POSTUP BARVENÍ

Protilátkový test VENTANA anti-ALK (D5F3) je určený k použití na přístrojích BenchMark IHC/ISH v kombinaci s kontrolou Rabbit Monoclonal Negative Control Ig, detekční soupravou OptiView DAB IHC Detection Kit, amplifikační soupravou OptiView Amplification Kit a přídatnými reagentii. Doporučený barvicí protokol pro jednotlivé barvicí automaty uvádí Tabulka 1, Tabulka 2 a Tabulka 3.

Tato protilátka byla optimalizována pro specifické inkubační doby, uživatel však musí výsledky získané pomocí této reagentie ověřit. Odchyly od protokolu, který uvádí Tabulka 1, Tabulka 2 nebo Tabulka 3, mohou vést k falešně pozitivním nebo falešně negativním výsledkům. U přístroje BenchMark ULTRA byl vyvinut postup barvení specifický pro ALK, **U VENTANA ALK (D5F3)**. Před výběrem položek protokolu z postupu barvení specifického pro ALK je nutné zkontrolovat, že přístroj BenchMark ULTRA má software VSS 12.3 s postupem barvení OptiView v5 nebo vyšším.

Parametry automatických procedur lze zobrazit, vytisknout a upravovat podle postupů uvedených v návodu k obsluze přístroje. Podrobnější informace o postupech imunohistochemického barvení naleznete v příbalové informaci příslušné detekční soupravy VENTANA.

Tabulka 1. Doporučený barvicí protokol pro protilátkový test VENTANA anti-ALK (D5F3) a Rabbit Monoclonal Negative Control Ig s detekčními soupravami OptiView DAB IHC Detection Kit a OptiView Amplification Kit na přístroji BenchMark ULTRA.

| Postup barvení: U VENTANA ALK (D5F3) | |
|--------------------------------------|--|
| Postup protokolu | Zadání parametru |
| Protilátka (primární) | VENTANA ALK AB – 16 minut (poté vyberte USA nebo EU/Jiné) nebo negativní kontrola |
| Kontrastní barvivo | Hematoxylin II, 4 minuty |
| Po kontrastním barvení | Bluing, 4 minuty |

Tabulka 2. Doporučený barvicí protokol pro protilátku VENTANA anti-ALK (D5F3) a Rabbit Monoclonal Negative Control Ig s detekčními soupravami OptiView DAB IHC Detection Kit a OptiView Amplification Kit na přístroji BenchMark XT.

| Typ postupu | Metoda |
|---|--|
| Volba IHC synchronizace | Zvoleno* |
| Odparafinování | Zvoleno |
| Kondicionování buněk (odmaskování antigenu) | Cell Conditioning 1, 92 minut, 100 °C |
| Preprimární inhibitor peroxidázy | Zvoleno |
| Protilátka (primární) | Ventana anti-ALK (D5F3) nebo Rabbit Mono Neg 16 minut, 37 °C |
| OptiView HQ Univ Linker | 12 minut |
| OptiView HRP Multimer | 12 minut |
| OptiView Amplification | Zvoleno |
| OV AMP H2O2, OV Amplifier | 8 minut |
| OV AMP Multimer | 8 minut |
| Kontrastní barvivo | Hematoxylin II, 4 minuty |
| Po kontrastním barvení | Bluing, 4 minuty |

*Tento volitelný krok se uplatňuje pouze při použití XT OptiView DAB v4; u dřívějších verzí softwaru k dispozici není.

Tabulka 3. Doporučený barvicí protokol pro protilátku VENTANA anti-ALK (D5F3) a Rabbit Monoclonal Negative Control Ig s detekčními soupravami OptiView DAB IHC Detection Kit a OptiView Amplification Kit na přístroji BenchMark GX.

| Typ postupu | Metoda |
|---|--|
| Odparafinování | Zvoleno |
| Kondicionování buněk (odmaskování antigenu) | Cell Conditioning 1, 92 minut, 100 °C |
| Preprimární inhibitor peroxidázy | Zvoleno |
| Protilátka (primární) | Ventana anti-ALK (D5F3) nebo Rabbit Mono Neg 16 minut, 37 °C |
| OptiView HQ Univ Linker | 12 minut |
| OptiView HRP Multimer | 12 minut |
| OptiView Amplification | Zvoleno |
| OV AMP H2O2, OV Amplifier | 8 minut |
| OV AMP Multimer | 8 minut |
| Kontrastní barvivo | Hematoxylin II, 4 minuty |
| Po kontrastním barvení | Bluing, 4 minuty |

Vzhledem k různým způsobům fixace a zpracování tkání, jakož i stavu vybavení a podmínkám laboratorního prostředí, může být potřeba prodloužit nebo zkrátit dobu inkubace s primární protilátkou, kondicionování buněk nebo předběžného zpracování proteázou u jednotlivých vzorků v závislosti na použité metodě detekce a vlastní preferenci. Další informace o proměnných faktorech fixace naleznete v dokumentu „Immunohistochemistry Principles and Advances“.²⁶

KONTROLY

POSTUPY KONTROLY KVALITY

Kontrola Rabbit Monoclonal Negative Control Ig

K usnadnění interpretace výsledků je třeba provést pro každý vzorek cyklus se sklíčkem obsahujícím negativní reagenční kontrolu. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (kat. č. 790-4795 / 06683380001), protilátka pro negativní reagenční kontrolu, je určena výhradně pro tento test a je použita místo primární protilátky, aby se dalo vyhodnotit nespecifické zbarvení. Postup barvení pro negativní reagenční kontrolu by měl odpovídat inkubační době primární protilátky. Použití jiné reagenční pro negativní kontrolu nebo nepoužití doporučené reagenční pro negativní kontrolu může vést k nesprávným výsledkům.

Kontroly úrovně systému

Kontroly úrovně systému se musejí zpracovat společně se vzorky pacienta. Může se jednat o lidský appendix²⁶ nebo známé tkáňové vzorky NSCLC pozitivní/negativní na ALK. Kontrolní tkáň by měla být vzorky z pitvy, biopsie nebo operace, zpracované a fixované co nejdříve stejným způsobem jako testované řezy. Tyto řezy mohou sloužit ke sledování všech kroků analýzy, od přípravy tkáně až po její barvení. Použití tkáňového řezu fixovaného nebo zpracovaného jiným způsobem než testovaný vzorek zajistí kontrolu pro všechny reagenční a kroky metody kromě fixace a zpracování tkáně.

Apendix nebo tkáňové kontroly NSCLC pozitivní/negativní na ALK

S každým provedeným barvením pomocí testu VENTANA anti-ALK (D5F3) je třeba testovat ALK-pozitivní a ALK-negativní kontrolní tkáň.

Případy NSCLC se zbarvením, které reprezentuje klinicky pozitivní a klinicky negativní výsledek na ALK, jsou vhodné pro optimální kontrolu kvality a detekci nízkých úrovní degradace reagenční nebo problémů spojených s parametry mimo specifikace přístroje.

Tkáň lidského appendixu obsahuje prvky pro pozitivní i negativní barvení proteinu ALK, a je proto vhodná pro použití jako kontrola úrovně systému. Složky tkáně s pozitivním zbarvením slouží k potvrzení, že protilátka byla přidána a přístroj pracuje správně; prvky negativního barvení se používají k detekci mírných hladin degradace reagenční nebo problémů spojených s parametry mimo specifikace přístroje.

Odpovídající barvení na součásti tkáně NSCLC a appendixu pozitivní a negativní na ALK popisuje Tabulka 4 a Tabulka 5 a interpretační příručka Interpretation Guide for VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody pro nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC) P/N 1011879.

Znamé pozitivní a známé negativní tkáňové kontroly používané ke sledování funkce testu ALK v patientských vzorcích musí být fixované a zpracovávány stejným způsobem jako vzorek pacienta. V opačném případě lze tyto tkáňové kontroly použít pouze k monitorování správné funkce testových reagenčních. Tkáňové kontroly se nesmí používat při diagnostice vzorků pacienta.

Ověření testu

Před prvním použitím protilátky nebo barvicího systému v diagnostickém postupu musí být ověřena specifita protilátky testováním na řadě dostupných tkání se známými IHC charakteristikami účinnosti, které představují ALK-pozitivní a negativní tkáň (prostudujte si Postupy kontroly kvality popsané výše v této části příbalového letáku a požadavky pro kontrolu kvality akreditačního programu College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist,²⁷ nebo schválenou směrnici CLSI²⁸). Tyto postupy kontroly kvality musejí být provedeny vždy, když se změní šarže protilátky nebo když se změní parametry testu. Pro ověření testu jsou vhodné tkáň NSCLC se známým stavem ALK nebo vzorky lidského appendixu.

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Imunologický postup barvení na automatech VENTANA způsobuje, že se hnědě zbarvený DAB produkt reakce sráží v oblasti antigenu lokalizovaných protilátkou VENTANA anti-ALK (D5F3). Dříve než budou výsledky interpretovány, musí kvalifikovaný patolog se zkušenostmi s imunohistochemickými postupy vyhodnotit negativní reagenční kontroly, kontroly úrovně systému a kvalitu nabarvených produktů.

Pozitivní/negativní tkáňové kontroly na systémové úrovni

Je třeba zkontrolovat zbarvené pozitivní a negativní tkáňové kontroly, a ověřit tak správnost funkce všech reagensů. Přítomnost správně zbarveného reakčního produktu na pozitivní kontrolní tkáni uvnitř cytoplazmy cílových buněk indikuje pozitivní reaktivitu. Pokud se u pozitivních nebo negativních tkáňových kontrol neprojeví vhodné zbarvení nebo vykazuje změnu v interpretaci klinické diagnózy, je nutné považovat výsledky testovaných vzorků za neplatné.

Tabulka 4. Kritéria hodnocení kontrolní tkáně appendixu. Reprezentativní obrázky jsou uvedeny v příručce VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody pro nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC) P/N 1011879.

| Přijatelné | Nepřijatelné |
|--|---|
| Přítomnost silného granulárního cytoplazmatického zbarvení v gangliových buňkách. (viz poznámka) | Absence silného granulárního cytoplazmatického zbarvení v gangliových buňkách. |
| Absence silného granulárního cytoplazmatického zbarvení v glandulárních epitelálních buňkách, svalové a lymfoidní tkáni (slabé nebo vzácně se vyskytující lymforetikulární buňky je možné pozorovat v lymfoidních agregátech). | Nadměrné nespecifické zbarvení pozadí glandulárních epitelálních buněk, svalové nebo lymfoidní tkáně, které interferují s hodnocením. |

Poznámka: Nervy ve svalových vrstvách appendixu vykazují pozitivní zbarvení.

Negativní reagenční kontrola

Pokud je přítomno nespecifické zbarvení, bude mít difúzní vzhled a může být hodnoceno za použití sklíčka pro negativní reagenční kontrolu barveného kontrolou Rabbit Monoclonal Negative Control Ig. K interpretaci výsledků použijte pouze intaktní buňky, jelikož nekrotické nebo degenerované buňky mohou často barvit nespecificky. Pokud je zbarvení pozadí nadměrné, je nutné považovat výsledky testovacího vzorku za neplatné. Ukázky přijatelných hladin barvení pozadí u tohoto testu naleznete v interpretační příručce VENTANA ALK Scoring Interpretation Guide pro nemalobuněčný karcinom plic P/N 1011879.

Tkáň pacienta

Tkáň pacienta musí být hodnocena podle hodnotícího algoritmu pro test VENTANA anti-ALK (D5F3), který uvádí Tabulka 5. Viz příručka VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody pro nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC) P/N 1011879.

Tabulka 5. Algoritmus hodnocení pro test VENTANA anti-ALK (D5F3). Reprezentativní obrázky jsou uvedeny v příručce VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody pro nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC) P/N 1011879.

| Klinická interpretace | Popis zbarvení |
|-----------------------|---|
| Pozitivní pro ALK | <p>Přítomnost silného granulárního cytoplazmatického zbarvení v nádorových buňkách (libovolné procento pozitivních nádorových buněk). Určité prvky zbarvení je třeba vyřadit; např.:</p> <ul style="list-style-type: none"> • slabé cytoplazmatické skvrny v alveolárních makrofázích, • buňky neutrálního původu (nervové a gangliové buňky), • glandulární epitelální zbarvení, • rozptýlené lymforetikulární buňky v lymfocytickém infiltrátu. <p>Je možné rovněž pozorovat zbarvení pozadí uvnitř normální sliznice v NSCLC (včetně mucinu) a v nekrotických oblastech nádoru, které je třeba z klinického hodnocení vyřadit.</p> |
| Negativní pro ALK | Přítomnost silného granulárního cytoplazmatického zbarvení v nádorových buňkách. |

VŠEOBECNÁ OMEZENÍ

1. Imunohistochemie je diagnostický proces zahrnující více kroků a vyžadující specializované školení ve výběru vhodných reagensů, řezů tkáně, fixaci a zpracování, přípravě imunohistochemického sklíčka a interpretaci výsledků zbarvení.
2. Zbarvení tkáně závisí na způsobu zacházení s tkání a na jejím zpracování před barvením. Nesprávná fixace, zmrazení, rozmrazení, oplach, sušení, zahřívání, řezání nebo kontaminace jinými tkáněmi nebo tekutinami může vést ke vzniku artefaktů, záchytu protilátky nebo k falešně negativním výsledkům. V důsledku odchylek při fixaci a metodách zalévání či následkem stávajících nerovnoměrností ve tkáni mohou být výsledky nekonzistentní.
3. Nadměrné nebo neúplné kontrastní barvení může narušit správnou interpretaci výsledků.
4. Klinická interpretace jakéhokoli pozitivního zbarvení nebo jeho nepřítomnosti musí být vyhodnocena v kontextu klinické anamnézy, morfolgie a jiných histopatologických kritérií. Klinická interpretace jakéhokoli zbarvení nebo jeho nepřítomnosti musí být doplněna morfoloickými studii a kontrolami úrovně systému a také dalšími diagnostickými testy. Je povinností kvalifikovaného patologa, aby byl dobře obeznámený s protilátkami, reagensy a metodami používanými při interpretaci barveného preparátu. Barvení se musí provádět v certifikované akreditované laboratoři pod dohledem patologa zodpovědného za hodnocení barvených sklíčků, který zajistí adekvátnost pozitivních a negativních kontrol.
5. Společnost Ventana Medical Systems, Inc. dodává protilátky a reagensy pro použití optimálně nařaděné, pokud jsou dodrženy pokyny, které jsou součástí produktu. Jakákoli odchylka od doporučených postupů testu může vést k tomu, že očekávané výsledky budou neplatné. Je nutno používat a dokumentovat příslušné kontroly. Uživatel, který se od doporučených postupů odchýlí, musí přijmout odpovědnost za interpretaci výsledků pacientů.
6. Tento produkt není určen pro průtokovou cytometrii, charakteristiky účinnosti zatím nejsou známy.
7. U tkáni, které nebyly předem testovány, mohou reagensy vykazovat neočekávané reakce. V důsledku biologické variability exprese antigenu v neoplazmách nebo jiných patologických tkáních nelze zcela vyloučit možnost neočekávaných reakcí, dokonce i v testovaných skupinách tkání.²⁹
8. Tkáň osob infikovaných virem hepatitidy B, které obsahují povrchový antigen (HBsAg) hepatitidy B, mohou u křenuvé peroxidázy vykazovat nespecifické zbarvení.³⁰
9. Falešně negativní výsledky se mohou vyskytovat v důsledku neimunologické vazby proteinů nebo produktů reakce se substrátem. Falešně pozitivní výsledky mohou být rovněž důsledkem aktivity pseudoperoxidázy (erytrocytů), aktivity endogenní peroxidázy (cytochromu C) nebo endogenního biotinu (například z jater, mozku, prsu, ledvin) v závislosti na typu použitého imunologického barvení.³¹
10. Jako u každého imunohistochemického testu znamená negativní výsledek pouze to, že antigen nebyl detekován, nikoli že antigen není v testovaných buňkách nebo tkáni přítomen.

SPECIFICKÁ OMEZENÍ

1. Protilátkový test VENTANA anti-ALK (D5F3) byl optimalizován pro inkubační dobu primární protilátky v délce 16 minut pro použití na přístrojích IHC/ISH BenchMark v kombinaci s detekční soupravou OptiView DAB IHC Detection Kit při zvolené možnosti amplifikace soupravou OptiView Amplification v protokolu.
2. Sklíčko se vzorkem pacienta je nutné nabarvit kontrolou Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (kat. č. 790-4795 / 06683380001). Jiné negativní kontrolní reagensy nejsou pro tento test vhodné.
3. Použití tohoto testu u cytologických rozetěrů ani u dekalciifikovaných vzorků nebylo dosud ověřeno.
4. Tkáň pacienta musí být obarvena do 3 měsíců od nařezání tkáňového bločku. Na řezech barvených protilátkovým testem VENTANA anti-ALK (D5F3) byla pozorována ztráta účinnosti zbarvení, pokud byly uchovávány při pokojové teplotě déle než 3 měsíce.
5. Společnost Ventana doporučuje, aby se vzorky fixovaly po dobu alespoň 6 hodin v 10 % NBF nebo zinkovém formalínu. Použití jiných dob fixace nebo použití jiných než doporučených fixativ může vést k falešně negativním výsledkům. Fixativa AFA, PREFER, B5 a další fixativa s obsahem kyselin a/nebo alkoholu vykazovala ztrátu specifického barvení proteinu ALK. Další informace naleznete v příručce VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody pro nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC) P/N 1011879.

6. Při provádění protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3) byly zaznamenány artefakty zbarvení. Na podložních sklíčkách barvených protilátkou anti-ALK i negativní kontrolou byly přítomny světlé cytoplazmatické skvrny v alveolárních makrofázích, což představuje artefakt detekčního systému a nesmí se interpretovat jako pozitivní zbarvení protilátkou anti-ALK. Dále bylo pozorováno tečkovité zbarvení v nekrotických oblastech nádoru, které je třeba během vyhodnocování vzorku pacienta rovněž ignorovat. Při použití protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3) bylo pozorováno barvení neurální tkáně včetně nervů a občasných lymforetikulocytů s lymfocytárním infiltrátem. Další informace naleznete v příručce VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody pro nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC) P/N 1011879.
7. Na tkáňových kontrolách je možné pozorovat mírnou variabilitu v celkové intenzitě zbarvení způsobenou soupravou OptiView Amplification Kit. Příklady akceptovatelné účinnosti zbarvení naleznete v příručce interpretace.

ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ

Jestliže se objeví nesprávné barvení na lidských tkáních NSCLC na úrovni systému, tkáňových kontrolách apendixu nebo vzorcích pacienta, zjistěte, zda byly dodrženy postupy údržby přístroje BenchMark ULTRA, BenchMark XT nebo BenchMark GX. Pokud nebyly zjištěny technické problémy nebo odchylky, kontaktujte místní zastoupení společnosti Ventana, než budete cyklus opakovat.

FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY

Analytická specifita a senzitivita byly stanoveny obarvením více případů normální a neoplastické lidské tkáně protilátkovým testem VENTANA anti-ALK (D5F3). Výsledky uvádí Tabulka 6 a Tabulka 7.

Specifita

Tabulka 6. Specifita/senzitivita protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3) v normální tkáni. Testování používalo normální tkáně fixované ve formalínu a zalité v parafínu.

| Tkáň | Počet pozitivních / celkový počet případů | Tkáň | Počet pozitivních / celkový počet případů |
|-------------------|---|------------------------------|---|
| Mozek | 0/3* | Brzlík | 0/3 |
| Mozeček | 0/3 | Myeloidní tkáň (kostní dřeň) | 0/3 |
| Nadledvinka | 0/3 | Plice | 0/3 |
| Vaječník | 0/3 | Srdce | 0/3 |
| Slinivka břišní | 0/3 | Jícen | 0/3 |
| Příštítné tělísko | 0/3 | Žaludek | 0/3 |
| Hypofýza | 0/3** | Tenké střevo | 0/3*** |
| Varle | 0/3 | Tlusté střevo | 0/3*** |
| Štítná žláza | 0/3 | Játra | 0/3 |
| Prs | 0/3 | Slinná žláza | 0/3 |
| Slezina | 0/3 | Ledvina | 0/3 |
| Mandle | 0/3 | Prostata | 0/3 |
| Endometrium | 0/3 | Děložní čípek | 0/3 |
| Kosterní sval | 0/4 | Kůže | 0/3 |
| Nerv (rozptýlený) | 0/3 | Mezotel a plíce | 0/3 |

*2/3 Několik málo buněk glie ve tkáni mozku vykazovalo slabou až střední pozitivitu.

**3/3 Barvení hypofýzy bylo slabé.

***Gangliové buňky v 4/6 vzorcích intestinální tkáně vykazovaly pozitivní barvení na ALK o různých intenzitách.

Senzitivita

Tabulka 7. Specifita/senzitivita protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3) v neoplastických tkáních. Testování používalo různé neoplastické tkáně fixované ve formalínu a zalité v parafínu.

| Patologie | Počet pozitivních / celkový počet případů |
|--|---|
| Glioblastom | 0/1 |
| Atypický meningeom | 0/1 |
| Maligní ependyom | 0/1 |
| Maligní oligodendrogliom | 0/1 |
| Serózní ovariální adenokarcinom | 1/1 |
| Ovariální adenokarcinom | 0/1 |
| Karcinom ostrůvkových buněk | 0/1 |
| Adenokarcinom pankreatu | 0/1 |
| Seminom | 0/1 |
| Embryonální karcinom | 0/1 |
| Medulární karcinom | 0/1 |
| Papilární karcinom | 0/1 |
| Intraduktální karcinom prsu | 0/1 |
| Invasivní duktální karcinom prsu | 0/2 |
| Difuzní lymfom z B-buněk | 0/3 |
| Malobuněčný nediferencovaný karcinom plic | 0/1 |
| Karcinom z dlaždicových buněk plic | 0/1 |
| Adenokarcinom plic | 0/1 |
| Karcinom jícnu z dlaždicových buněk | 0/1 |
| Adenokarcinom jícnu | 0/1 |
| Mucinózní adenokarcinom žaludku | 0/1 |
| Gastrointestinální adenokarcinom | 0/1 |
| Maligní intersticiální | 0/1 |
| Rektální adenokarcinom | 0/1 |
| Rektální maligní novotvar z pojivové tkáně | 0/1 |
| Hepatoceleulární karcinom | 0/1 |
| Hepatoblastom | 1/1 |
| Karcinom ledvin ze světlých buněk | 0/1 |
| Adenokarcinom prostaty | 0/2 |
| Leiomyom | 0/1 |
| Adenokarcinom endometria | 0/1 |
| Karcinom endometria ze světlých buněk | 0/1 |
| Karcinom dělohy z dlaždicových buněk | 0/2 |

| Patologie | Počet pozitivních / celkový počet případů |
|---|---|
| Embryonální rhabdomyosarkom | 0/1 |
| Maligní melanom konečniku | 0/1 |
| Karcinom z bazálních buněk | 0/1 |
| Karcinom ze skvamózních buněk | 0/1 |
| Neurofibrom | 0/1 |
| Retroperitoneální neuroblastom | 1/1 |
| Maligní mezoteliom | 0/1 |
| Hodgkinův lymfom | 0/1 |
| Anaplastický velkobuněčný lymfom | 0/1 |
| Karcinom močového měchýře z přechodných buněk | 0/1 |
| Leiomyosarkom nízkého stupně | 0/1 |
| Osteosarkom | 0/1 |
| Rhabdomyosarkom z vřetenových buněk | 0/1 |
| Leiomyosarkom středního stupně | 0/1 |

Shoda platform (překlenovací studie)

Protilátkový test VENTANA anti-ALK (D5F3) byl na začátku zaveden na trh pro přístroje BenchMark XT a GX. Byla provedena přemostovací studie s cílem prokázat ekvivalenční výkon testů u přístrojů BenchMark ULTRA a BenchMark XT. Tato studie hodnotila klinický stav ALK (na základě algoritmu hodnocení ALK v tabulce 5) u 184 unikátních vzorků NSCLC obarvených protilátkovým testem VENTANA anti-ALK (D5F3) v obou platformách. Výsledná obarvená sklička byla zaslepena a randomizována. Poté byla vyhodnocena třemi patologi. Výsledky shody platform pro tuto studii uvádí Tabulka 8 a Tabulka 9.

Tabulka 8. Shoda výsledků mezi přístrojem BenchMark XT a přístrojem BenchMark ULTRA.

| Shoda testu VENTANA anti-ALK (D5F3) mezi přístrojem BenchMark ULTRA a přístrojem BenchMark XT | | | |
|---|--------------|-----------|--------|
| BenchMark ULTRA | BenchMark XT | | Celkem |
| | Pozitivní | Negativní | |
| Pozitivní | 85 | 1 | 86 |
| Negativní | 1 | 97 | 98 |
| Celkem | 86 | 98 | 184 |

Tabulka 9. Shoda stavu ALK mezi přístrojem BenchMark XT a přístrojem BenchMark ULTRA.

| Míra shody mezi platformami | Pozitivní procentuální shoda (95 % IS) | Negativní procentuální shoda (95 % IS) | Celková procentuální shoda (95 % IS) |
|---|--|--|--------------------------------------|
| Shoda mezi přístroji BenchMark XT a BenchMark ULTRA | 98,8 % (93,7–99,8 %) | 99,0 % (94,4–99,8 %) | 98,9 % (96,1–99,7 %) |

Tloušťka tkání

Tloušťka tkání byla hodnocena pomocí 4 jednoznačných případů lidského NSCLC (3 pozitivní na ALK a 1 negativní na ALK) a 4 unikátních vzorků lidského appendixu. Tkáně byly nakrájeny a testovány v duplikátech s tloušťkou 3, 4, 5, 6 a 7 mikronů. Všechny tloušťky tkání prokázaly správné specifické zabarvení pro ALK a správné úrovně pozadí s protilátkovým testem VENTANA anti-ALK (D5F3). U žádného vzorku nebyla pozorována žádná změna v klinickém stavu ALK v tomto rozmezí tloušťky. Společnost Ventana doporučuje vzorky pro test krájet na 4–6 mikronů.

Studie opakovatelnosti a mezilehlé přesnosti

Opakovatelnost a střední přesnost protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3) byla hodnocena na přístrojích BenchMark ULTRA, XT a GX v kombinaci s detekčními soupravami OptiView DAB IHC Detection Kit a OptiView Amplification Kit.

10 unikátních vzorků tkáně NSCLC (5 pozitivních na ALK a 5 negativních na ALK) bylo vyhodnoceno na přístroji BenchMark XT i BenchMark ULTRA. Pro intradenní přesnost bylo barveno 5 kopií skliček z každého vzorku NSCLC jedním přístrojem BenchMark XT a BenchMark ULTRA. V rámci testování přesnosti mezi přístroji byly obarveny 3 kopie skliček jednotlivých vzorků NSCLC pomocí protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3) na třech přístrojích BenchMark XT a 2 kopie skliček jednotlivých vzorků NSCLC na třech přístrojích BenchMark ULTRA. Pro mezidenní přesnost byly barveny 2 kopie skliček jednotlivých vzorků NSCLC protilátkovým testem VENTANA anti-ALK (D5F3) na jednom přístroji BenchMark XT nebo BenchMark ULTRA v průběhu 5 ne po sobě jdoucích dní. Všechna sklička byla zaslepena a randomizována v každé z tkáňových kohort přístrojů. Každá kohorta byla hodnocena individuálně patologem dle hodnotícího algoritmu pro protilátkový test VENTANA anti-ALK (D5F3) (viz Tabulka 5). Každá kopie vzorku NSCLC poskytla rovnocenné výsledky barvení IHC ALK. Souhrn výsledků pro opakovatelnost a střední přesnost přístrojů BenchMark XT a BenchMark ULTRA uvádí Tabulka 10, resp. Tabulka 11.

Proběhla meziplatformová studie srovnávající výkon protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3) mezi přístrojem BenchMark XT a přístrojem BenchMark GX. V rámci této studie byly hodnoceny 2 vícetkáňové bloky, každý obsahující 8 vzorků NSCLC (3 ALK pozitivní, 1 ALK negativní na blok). V rámci tohoto srovnání bylo obarveno 5 kopií skliček na třech přístrojích BenchMark XT a třech přístrojích BenchMark GX. U těchto skliček byla vyhodnocena správnost barvení dle algoritmu hodnocení IHC VENTANA anti-ALK (D5F3), viz Tabulka 5. Každá kopie vzorku NSCLC poskytla rovnocenné výsledky barvení IHC ALK mezi dvěma platformami. Souhrn výsledků uvádí Tabulka 12.

Navíc byla také hodnocena reprodukovatelnost VENTANA anti-ALK (D5F3) barvením lidského appendixu (kontrola úrovně systému). Pro tuto studii bylo použito osm unikátních tkání lidského appendixu. V rámci hodnocení intradenní přesnosti bylo barveno 13 kopií skliček ve dvou vícetkáňových blocích po 4 vzorcích appendixu jedním přístrojem BenchMark XT. V rámci hodnocení přesnosti mezi přístroji bylo protilátkovým testem VENTANA anti-ALK (D5F3) barveno 5 kopií skliček ve dvou vícetkáňových blocích po 4 vzorcích appendixu na jednom přístroji BenchMark XT v průběhu 5 po sobě nenásledujících dnů. Všechna sklička byla vyhodnocena patologem s použitím hodnotícího algoritmu pro protilátkový test VENTANA anti-ALK (D5F3) pro kontrolní tkáň appendixu (uveden v tabulce 4). Každá kopie vzorku appendixu poskytla rovnocenné výsledky barvení IHC ALK. Celková procentuální shoda opakovatelnosti v rámci jednoho dne a mezi přístroji (na 3 přístrojích) byla 100 %, opakovatelnost mezi dny (v průběhu 5 po sobě nenásledujících dní) byla 98 %.

Tabulka 10. Reprodukovatelnost a střední přesnost protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3) u jednotlivých vzorků NSCLC barvených na přístroji BenchMark XT.

| Reprodukovatelnost/přesnost tkáně NSCLC | N = všechna sklička hodnocená v kohortě | Celková procentuální shoda stavu ALK (95 % IS) |
|--|---|--|
| Reprodukovatelnost v rámci jednoho dne | 50 | 100 % (97,5–100 %) |
| Přesnost v rámci platformy (mezi 3 přístroji BenchMark XT) | 60 | 100 % (97,9–100 %) |
| Přesnost mezi jednotlivými dny (5 po sobě nenásledujících dní) | 100 | 100 % (98,7–100 %) |

Tabulka 11. Reprodukovatelnost a střední přesnost protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3) u jednotlivých vzorků NSCLC barvených na přístroji BenchMark ULTRA.

| Reprodukovatelnost/přesnost tkáně NSCLC | N = všechna sklíčka hodnocená v kohortě | Celková procentuální shoda stavu ALK (95 % IS) |
|--|---|--|
| Reprodukovatelnost v rámci jednoho dne | 50 | 100 % (92,9–100,0 %) |
| Přesnost v rámci platformy (mezi 3 přístroji BenchMark ULTRA) | 60 | 100 % (94,0–100,0 %) |
| Přesnost mezi jednotlivými dny (5 po sobě nenásledujících dní) | 100 | 100 % (96,3–100,0 %) |

Tabulka 12. Přesnost protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3) mezi platformami u vzorků NSCLC z vícečláňového bloku barvených na přístroji BenchMark XT a BenchMark GX.

| Přesnost tkáně NSCLC | N = všechna sklíčka hodnocená v kohortě | Celková procentuální shoda stavu ALK |
|--|---|--------------------------------------|
| Přesnost mezi platformami u přístrojů BenchMark XT a BenchMark GX (mezi 3 přístroji) | 30 | 100 % |

Opakovatelnost mezi šaržemi

Opakovatelnost mezi šaržemi protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3) byla stanovena testováním tří šarží testu VENTANA anti-ALK (D5F3) na 38 unikátních vzorcích NSCLC (21 ALK pozitivních vzorků (z 18 unikátních případů) a 20 ALK negativních tkáňových vzorků NSCLC) přístrojem BenchMark XT s použitím souprav OptiView DAB IHC Detection kit a OptiView Amplification kit. Všechny případy byly barveny duplicitně každou ze tří šarží primární protilátky. Sklíčka byla před hodnocením klinického stavu třemi patology pomocí algoritmu hodnocení protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3) (viz Tabulka 5) zaslepena a randomizována. Všechny tři šarže protilátek vykazovaly shodné výsledky barvení na stav ALK u 41 hodnocených vzorků tkáně NSCLC ve více než 90 %. Výsledky jsou uváděny jako celková procentuální shoda, pozitivní procentuální shoda a negativní procentuální shoda. Celková procentuální shoda mezi šaržemi byla 99,2 %. Protilátkový test VENTANA anti-ALK (D5F3) poskytuje tudíž reprodukovatelné výsledky barvení v různých šaržích protilátek. Výsledky uvádí Tabulka 13.

Opakovatelnost mezi šaržemi protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3) byla stanovena testováním tří šarží testu VENTANA anti-ALK (D5F3) na 30 unikátních vzorcích NSCLC (15 ALK pozitivních vzorků a 15 ALK negativních tkáňových vzorků NSCLC) přístrojem BenchMark ULTRA s použitím souprav OptiView DAB IHC Detection kit a OptiView Amplification kit. Všechny případy byly barveny duplicitně každou ze tří šarží primární protilátky. Sklíčka byla před hodnocením klinického stavu patologem pomocí algoritmu hodnocení protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3) (viz Tabulka 5) zaslepena a randomizována. Všechny tři šarže protilátek vykazovaly shodné výsledky barvení na stav ALK u 30 hodnocených vzorků tkáně NSCLC ve více než 90 %. Výsledky jsou uváděny jako celková procentuální shoda, pozitivní procentuální shoda a negativní procentuální shoda. Celková procentuální shoda mezi šaržemi byla 99,1 %. Protilátkový test VENTANA anti-ALK (D5F3) poskytuje tudíž reprodukovatelné výsledky barvení v různých šaržích protilátek. Výsledky uvádí Tabulka 14.

Opakovatelnost mezi šaržemi testu VENTANA anti-ALK (D5F3) byla také hodnocena použitím 12 unikátních vzorků lidské tkáně apendixu. Opakovatelnost byla stanovena testováním tří šarží protilátky v kombinaci se třemi šaržemi soupravy OptiView DAB IHC Detection Kit a OptiView Amplification Kit na třech barvicích automatech BenchMark XT. Celková míra shody pro správně pozitivně a negativně zbarvené prvky apendixu s použitím protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3) byla 100 %.

Tabulka 13. Míry shody opakovatelnosti mezi šaržemi u 41 tkáňových vzorků NSCLC na přístroji BenchMark XT. Bylo testováno 21 ALK pozitivních vzorků (z 18 unikátních případů) a 20 ALK negativních vzorků.

| Shoda hodnot – opakovatelnosti mezi šaržemi | Průměrná pozitivní shoda (95 % IS) | Průměrná negativní shoda (95 % IS) | Celková procentuální shoda (95 % IS) |
|---|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| Průměr všech tří srovnání mezi šaržemi | 99,2 % (97,4–100 %) | 99,1 % (96,8–100 %) | 99,2 % (97,5–100 %) |

Tabulka 14. Míry shody opakovatelnosti mezi šaržemi u 30 tkáňových vzorků NSCLC na přístroji BenchMark ULTRA. Bylo testováno 15 ALK pozitivních vzorků a 15 ALK negativních vzorků.

| Shoda hodnot – opakovatelnosti mezi šaržemi | Pozitivní procentuální shoda (95 % IS) | Negativní procentuální shoda (95 % IS) | Celková procentuální shoda (95 % IS) |
|---|--|--|--------------------------------------|
| Průměr všech tří srovnání mezi šaržemi | 98,9 % (96,8–99,6 %) | 99,3 % (97,3–99,8 %) | 99,1 % (97,9–99,6 %) |

Studie přesnosti mezi hodnotiteli

Bylo provedeno několik studií přednosti mezi pracovníky: dvě studie na přístroji BenchMark XT a jedna na přístroji BenchMark ULTRA.

Ve studii přesnosti mezi hodnotiteli u přístroje BenchMark XT hodnotili tři patologové celkem 185 unikátních případů. 185 případů korelovalo se 100 ALK pozitivními a 100 ALK negativními bloky obarvenými pomocí protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3). Případy byly před hodnocením barvení ALK IHC zaslepeny a randomizovány dle hodnotícího algoritmu pro protilátkový test VENTANA anti-ALK (D5F3), který uvádí Tabulka 5. Výsledky, které uvádí Tabulka 15 níže, odrážejí míru přesnosti mezi pracovníky pro unikátní případy z kohorty studie.

Tabulka 15. Studie přesnosti mezi hodnotiteli 1 na přístroji BenchMark XT.

| Přesnost mezi hodnotiteli | Průměrná pozitivní shoda (95 % IS) | Průměrná negativní shoda (95 % IS) | Celková procentuální shoda (95 % IS) |
|--|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| Průměr všech tří srovnání mezi hodnotiteli | 98,8 % (97,3–100 %) | 99,0 % (97,7–100 %) | 98,9 % (97,4–100 %) |

Byla provedena studie 2 přesnosti mezi hodnotiteli na přístroji BenchMark XT u kohorty případů z randomizované klinické studie ALK pozitivních vzorků NSCLC pacientů zařazených pomocí soupravy Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit. Přibližně 300 případů bylo obarveno protilátkovým testem VENTANA anti-ALK (D5F3) na přístroji BenchMark XT. Případy byly zaslepené na stav ALK FISH, randomizované a předané třem pracovníkům, kteří hodnotili stav barvení ALK IHC dle algoritmu hodnocení protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3), jak uvádí Tabulka 5. Výsledky, které uvádí Tabulka 16, odrážejí míru přesnosti mezi pracovníky z této kohorty klinického hodnocení.

Studie přesnosti mezi hodnotiteli u přístroje BenchMark ULTRA hodnotila kohortu 184 unikátních případů NSCLC. Kohortu tvořilo 90 ALK pozitivních a 94 ALK negativních případů, které byly obarveny protilátkovým testem VENTANA anti-ALK (D5F3) na přístroji BenchMark ULTRA. Případy byly zaslepené, randomizované a předané třem pracovníkům, kteří hodnotili stav barvení ALK IHC dle algoritmu hodnocení protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3), jak uvádí Tabulka 5. Tabulka 16 odrážejí míru přesnosti mezi hodnotiteli této studie.

Tabulka 16. Studie 2 přesnosti mezi hodnotiteli na stav ALK u vzorků NSCLC získaných srovnáním klinických metod. Kohorta č. 1 byla obarvena protilátkovým testem VENTANA anti-ALK (D5F3) na přístroji BenchMark XT.

| Přesnost mezi hodnotiteli | Průměrná pozitivní shoda (95 % IS) | Průměrná negativní shoda (95 % IS) | Celková procentuální shoda (95 % IS) |
|--|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| Průměr všech tří srovnání mezi hodnotiteli | 97,6 % (95,0–99,5 %) | 99,5 % (98,9–99,9 %) | 99,1 % (98,2–99,8 %) |
| Hodnotitel 1 versus hodnotitel 2 | 99,1 % (97,1–100 %) | 99,8 % (99,4–100 %) | 99,7 % (98,2–99,9 %) |
| Hodnotitel 1 versus hodnotitel 3 | 96,3 % (92,3–99,2 %) | 99,2 % (98,3–99,8 %) | 98,6 % (96,6–99,5 %) |
| Hodnotitel 2 versus hodnotitel 3 | 97,2 % (93,5–100 %) | 99,4 % (98,6–100 %) | 99,0 % (97,1–99,7 %) |

Tabulka 17. Přesnost mezi hodnotiteli na stav ALK u vzorků NSCLC obarvených protilátkovým testem VENTANA anti-ALK (D5F3) na přístroji BenchMark ULTRA.

| Přesnost mezi hodnotiteli | Průměrná pozitivní shoda (95 % IS) | Průměrná negativní shoda (95 % IS) | Celková procentuální shoda (95 % IS) |
|--|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| Průměr všech tří srovnání mezi hodnotiteli | 98,4 % (96,5–99,6 %) | 98,6 % (96,9–99,7 %) | 98,5 % (96,7–99,6 %) |
| Hodnotitel 1 versus hodnotitel 2 | 98,9 % (96,8–100 %) | 98,9 % (97,0–100 %) | 98,9 % (96,0–99,7 %) |
| Hodnotitel 1 versus hodnotitel 3 | 98,8 % (96,7–100 %) | 99,0 % (97,2–100 %) | 98,9 % (96,0–99,7 %) |
| Hodnotitel 2 versus hodnotitel 3 | 97,6 % (94,7–99,4 %) | 97,9 % (95,4–99,5 %) | 97,8 % (94,4–99,1 %) |

Shoda s ALK FISH

Pro porovnání výsledků zabarvení protilátkou VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody s ALK FISH z hlediska klinického stavu ALK se použily tři kohorty. Kohorty zahrnovaly řadu lidských tkáňových vzorků NSCLC od primárních a metastatických nádorů, včetně resekcí, punkčních biopsií jehlou, bronchiálních biopsií a buněčných bločků z FNA fixovaných formalínem a zalitých v parafínu (FFPE). Všechny studie byly hodnoceny za použití algoritmu hodnocení (jak popisuje Tabulka 5).

Studie shody 1

Byla provedena studie v externí laboratoři porovnávající protilátku VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody s retrospektivními údaji Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit. Externí pracoviště barvilo 100 případů NSCLC za použití protilátky VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody na přístroji BenchMark XT. Protilátkový test VENTANA anti-ALK (D5F3) prokázal 98 % celkovou shodu s retrospektivními údaji Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit na této kohortě případů NSCLC. Výsledky uvádí Tabulka 18 a Tabulka 19. Upozorňujeme, že 86 ze 100 případů mělo k dispozici údaje FISH a dostatečný počet nádorů pro porovnání s výsledkem ALK IHC.

Tabulka 18. Výsledky protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3) v porovnání se sondou Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.

| Výsledky protilátky VENTANA anti-ALK (D5F3) v porovnání s Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit | | | |
|---|---|-----------|-----------|
| Protilátka VENTANA anti-ALK (D5F3) | Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit | | Celkem |
| | Pozitivní | Negativní | |
| Pozitivní | 10 | 0 | 10 |
| Negativní | 1 | 75 | 76 |
| Celkem | 11 | 75 | 86 |

Tabulka 19. Celkové, pozitivní a negativní míry shody pro protilátkový test VENTANA anti-ALK (D5F3) ve srovnání s Abbott Vysis Break Apart FISH Probe Kit.

| Celkové, pozitivní a negativní míry shody | | | |
|---|-------|-------|-------------|
| Míra | n/N | % | 95 % IS [a] |
| Celková procentuální shoda | 85/86 | 98,8 | 93,7, 99,8 |
| Pozitivní procentuální shoda | 10/11 | 90,9 | 62,3, 98,4 |
| Negativní procentuální shoda | 75/75 | 100,0 | 95,1, 100,0 |

[a] Oboustranný 95 % interval spolehlivosti vypočítaný pomocí metody hodnocení.

Upozorňujeme, že při přípravě vzorku tkáně u této studie nebylo ověřeno, zda byly dodrženy doporučené postupy přípravy vzorku pro tento test.

Studie shody 2

Byla provedena studie ve druhé externí laboratoři porovnávající VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody s údaji Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit na 73 případech NSCLC (řezy k dispozici do týdne od obarvení). V externí laboratoři byly případy barveny za použití VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody na přístroji BenchMark XT. Protilátkový test VENTANA anti-ALK (D5F3) prokázal 93 % celkovou shodu s retrospektivními údaji Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit na této kohortě případů NSCLC. Výsledky uvádí Tabulka 20 a Tabulka 21.

Tabulka 20. Výsledky protilátky VENTANA anti-ALK (D5F3) v porovnání se sondou Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.

| Výsledky protilátky VENTANA anti-ALK (D5F3) v porovnání s Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit | | | |
|---|---|-----------|-----------|
| Protilátka VENTANA anti-ALK (D5F3) | Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit | | Celkem |
| | Pozitivní | Negativní | |
| Pozitivní | 2 | 4 | 6 |
| Negativní | 0 | 56 | 56 |
| Celkem | 2 | 60 | 62 |

Tabulka 21. Celkové, pozitivní a negativní míry shody pro protilátkový test VENTANA anti-ALK (D5F3) ve srovnání s Abbott Vysis Break Apart FISH Probe Kit.

| Celkové, pozitivní a negativní míry shody | | | |
|---|-------|--------|-------------|
| Míra | n/N | % | 95 % IS [a] |
| Celková procentuální shoda | 58/62 | 93,5 % | 84,6–97,5 |
| Pozitivní procentuální shoda | 2/2 | 100 % | 34,2–100,0 |
| Negativní procentuální shoda | 56/60 | 93 % | 84,1–97,4 |

[a] Oboustranný 95 % interval spolehlivosti vypočítaný pomocí metody hodnocení.

U čtyř neshodných (FISH negativní, ALK IHC pozitivní) případů byla testována další neobarvená sklička s jiným testem ALK (jiný klon a detekční systém). Tři ze čtyř případů vyhovovaly protilátkovému testu VENTANA anti-ALK (D5F3) z hlediska detekovaného obarvení ALK IHC.

Vyskytlo se též 10 případů, kdy výsledky FISH byly nespecifické nebo nebyly stanoveny. Čtyři z těchto případů byly pozitivní v protilátkovém testu VENTANA anti-ALK (D5F3) a dalším klonu ALK a šest případů bylo v testu ALK IHC negativních. Vyskytl se jeden případ, který byl FISH pozitivní, ale k dispozici nebylo dostatečné množství vzorku pro obarvení s IHC.

Studie shody 3

V této studii 300 případů z probíhající globální klinické studie ALK pozitivních pacientů s NSCLC zařazených do Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit bylo obarvených králiči monoklonální protilátkou VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Antibody. Je to stejná kohorta, jaká je uvedena výše ve studii přesnosti mezi hodnotiteli na straně 7 této příbalové informace. Z těchto přibližně 300 případů byly některé testem FISH klasifikovány jako „neinformativní“ nebo „test FISH nebyl proveden“ a byly obarveny a vyhodnocovány pouze pro informační účely.

Případy byly pro stav FISH zaslepené, randomizované a poskytnuté dvěma hodnotitelům, kteří vyhodnocovali výsledky zabarvení. Výsledky byly porovnány se stavem FISH získanými z globální klinické studie.

Výsledky porovnání ALK IHC s ALK FISH uvádí Tabulka 22 dole.

Tabulka 22. Shoda protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3) s Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit, jak bylo vyhodnoceno 2 patologi.

| Výsledky protilátky VENTANA anti-ALK (D5F3) v porovnání s Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit | | | | |
|---|-----------|---|-----------|--------|
| Protilátka VENTANA anti-ALK (D5F3) | | Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit | | Celkem |
| Hodnotitel | | Pozitivní | Negativní | |
| Hodnotitel 1 | Pozitivní | 37 | 13 | 50 |
| | Negativní | 11 | 223 | 234 |
| | Celkem | 48 | 236 | 284 |
| Hodnotitel 2 | Pozitivní | 37 | 12 | 49 |
| | Negativní | 11 | 225 | 236 |
| | Celkem | 48 | 237 | 285 |

Upozorňujeme, že při přípravě vzorků tkáně u této studie nebylo ověřeno, zda byly dodrženy doporučené postupy přípravy vzorků pro tento test.

Rozporné případy, které byly ALK pozitivní v protilátkovém testu VENTANA anti-ALK (D5F3), ale ALK FISH negativní:

- 4 případy byly vyhodnoceny alespoň jedním hodnotitelem jako ALK IHC pozitivní, FISH negativní. Po konsenzuálním posouzení bylo rozhodnuto, že by měly být vyhodnoceny jako IHC negativní. Tyto případy vykazovaly fokální cytoplazmatické/membránové barvení a jsou vysvětleny v příručce Interpretation Guide for VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody pro nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC) P/N 1011879.
- 9 případů bylo ALK IHC pozitivních a ALK FISH negativní případy byly považovány za skutečně rozporné.

Z 9 rozporných případů bylo k dispozici 7 neobarvených skliček pro další diagnostické testování ALK (molekulární testování a testování IHC využívající jiný klon a detekční systém). Výsledky těchto dalších testování ukázaly, že většina rozporných případů preferovala pozitivní hodnocení IHC pro stav ALK, kdy byl ALK FISH negativní.

(Upozorňujeme, že řezu na skličkách u těchto případů překročily doporučené 3 měsíce.) Rozporné případy, které byly ALK negativní v protilátkovém testu VENTANA anti-ALK (D5F3), ale ALK FISH pozitivní:

- Vyskytlo se 11 případů, které byly FISH pozitivní, ale negativní v protilátkovém testu VENTANA anti-ALK (D5F3). 10 případů neobarvených skliček, které byly k dispozici pro další diagnostické testování ALK s molekulárními metodami a IHC. Výsledky těchto dalších testování ukázaly, že většina případů, které byly negativní v protilátkovém testu VENTANA anti-ALK (D5F3), byly rovněž negativní v jiného systému ALK IHC, ale pozitivní u jednoho testu nebo u více molekulárních testů. Upozorňujeme, že řezu na skličkách u těchto případů překročily doporučené 3 měsíce pro ALK IHC.
- Ve skupině se vyskytlo též 14 případů, které byly testem FISH klasifikovány jako neinformativní (nebyl získán žádný výsledek). Oběma hodnotiteli byly 3 z těchto případů v protilátkovém testu VENTANA anti-ALK (D5F3) vyhodnoceny jako pozitivní. Kromě toho existovalo 19 případů, kdy test FISH nebylo možné provést na skličku H&E (obvykle z důvodu nedostatečného obsahu nádoru). Výsledky zabarvení ALK IHC byly u 4 z těchto případů oběma hodnotiteli vyhodnoceny jako pozitivní. V průměru 21 % případů, kdy výsledky FISH nebyly získány, mělo pozitivní stav ALK v protilátkovém testu VENTANA anti-ALK (D5F3).

Studie opakovatelnosti mezi laboratoři na přístroji BenchMark XT

Byla provedena studie opakovatelnosti mezi laboratoři pro protilátkový test VENTANA anti-ALK (D5F3) s cílem prokázat opakovatelnost testu ve stanovení klinického stavu ALK na přístroji BenchMark XT pomocí vzorků tkáně NSCLC (6 ALK pozitivních a 6 ALK negativních) zpracovaných 3 šaržemi reagentů, 3 přístroji a během 5 po sobě nenásledujících dní ve třech externích laboratořích. Vzorky byly randomizovány a hodnoceny celkem 6 pracovníky (2 pracovníci/laboratoř), kteří byli zaslepeni vůči klinickému stavu ALK kohorty. Tato kohorta obsahovala 180 skliček vytvořených z 12 případů NSCLC s pozitivitou a negativitou exprese ALK dle IHC a FISH. Tyto případy byly v replikátech barveny v průběhu 21 dní ve 3 laboratořích. Výsledky viz Tabulka 23. Přijatelnost morfologie a pozadí v těchto studiích činila 100 %. Studie opakovatelnosti mezi laboratoři (ILR) pro protilátkový test VENTANA anti-ALK (D5F3) na přístroji BenchMark XT poskytla průměrnou pozitivní shodu (APA) a průměrnou negativní shodu (ANA) pro srovnání mezi pracovišti, mezi hodnotiteli a mezi zpracováními (den). Srovnání byla provedena párově za použití hodnotitelných měření.

Tabulka 23. ILR: Míra shody u protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3) na přístroji BenchMark XT (n = 180 hodnocených skliček).

| Míry shody pro opakovatelnost mezi laboratoři (klinický stav ALK) | Průměrná pozitivní shoda (95 % IS) | Průměrná negativní shoda (95 % IS) | Celková procentuální shoda (95 % IS) |
|---|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| Mezi pracovišti (3 pracoviště) | 93,8 % (76,2–100 %) | 94,9 % (79,2–100 %) | 94,4 % (83,3–100 %) |
| Mezi dny (5 po sobě nenásledujících dní) | 99,1 % (96,4–100 %) | 99,2 % (96,9–100 %) | 99,2 % (97,5–100 %) |
| Mezi hodnotiteli (2 hodnotitelé/pracoviště) | 98,8 % (95,2–100 %) | 99,0 % (95,8–100 %) | 98,9 % (96,7–100 %) |

Studie opakovatelnosti mezi laboratořemi na přístroji BenchMark ULTRA

Byla provedena další studie opakovatelnosti mezi laboratořemi pro protilátkový test VENTANA anti-ALK (D5F3) s cílem prokázat opakovatelnost testu ve stanovení klinického stavu ALK na přístroji BenchMark ULTRA pomocí vzorků tkáně NSCLC (7 ALK pozitivních a 7 ALK negativních) zpracovaných 3 šaržemi reagentů, 3 přístroji a v průběhu 5 po sobě nenásledujících dní ve třech externích laboratořích. Vzorky byly randomizovány a hodnoceny celkem 6 pracovníky (2 pracovníci/laboratoř), kteří byli zaslepeni vůči klinickému stavu ALK kohorty. Tato kohorta obsahovala 210 sklíček vytvořených z 14 případů NSCLC s pozitivitou a negativitou exprese ALK dle IHC a FISH. Tyto případy byly v replikátech barveny v průběhu 21 dní ve 3 laboratořích. Výsledky viz Tabulka 24. Celková přijatelnost konečného barvení pro všechny souhrnné údaje byla 99 %. Přijatelnost morfologie a pozadí v těchto studiích činila 100 %. Výsledky viz Tabulka 25.

Studie ILR pro protilátkový test VENTANA anti-ALK (D5F3) na přístroji BenchMark ULTRA poskytla pozitivní procentuální shodu (PPA) a negativní procentuální shodu (NPA) ze všech hodnotitelných měření získaných ze studie na souhrnu údajů ze všech pracovišť, od všech pracovníků a ze všech dnů za použití konsenzuálního skóre jako referenční metody.

Tabulka 24. ILR: Míra shody u protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3) na přístroji BenchMark ULTRA (n = 210 hodnocených sklíček).

| Míry shody pro opakovatelnost mezi laboratořemi (klinický stav ALK) | Pozitivní procentuální shoda (95 % IS) | Negativní procentuální shoda (95 % IS) | Celková procentuální shoda (95 % IS) |
|---|--|--|--------------------------------------|
| Napříč všemi hodnotitelnými měřeními | 92,8 % (88,4, 95,6 %) | 100,0 % (98,2, 100,0 %) | 96,4 % (94,1, 97,8 %) |

Tabulka 25. Opakovatelnost mezi laboratořemi: Míra shody mezi pracovníky u protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3) na přístroji BenchMark ULTRA (n = 210 hodnocených sklíček).

| Míry shody pro opakovatelnost mezi laboratořemi (klinický stav ALK), míra shody mezi hodnotiteli | Průměrná pozitivní shoda (95 % IS) | Průměrná negativní shoda (95 % IS) | Celková procentuální shoda (95 % IS) |
|--|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| Hodnotitel A1 vs A2 | 97,0 % (87,5–100 %) | 97,3 % (89,5–100 %) | 97,1 % (90,2–99,2 %) |
| Hodnotitel B1 vs B2 | 93,5 % (71,4–100 %) | 94,7 % (81,0–100 %) | 94,2 % (86,0–97,7 %) |
| Hodnotitel C1 vs C2 | 92,3 % (66,7–100 %) | 93,2 % (74,7–100 %) | 92,8 % (84,1–96,9 %) |
| Celkem | 94,3 % (75,6–100 %) | 95,1 % (81,6–100 %) | 94,7 % (84,1–100 %) |

Studie srovnání metod na přístroji BenchMark XT

Kohorty studie srovnání metod byly vytvořené ze dvou nezávislých randomizovaných klinických studií crizotinibu (označené jako studie č. 1 a studie č. 2), do kterých byli zařazováni pacienti s ALK pozitivním NSCLC. Stav ALK pro tyto pacienty byl stanoven pomocí klinického testu Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit v několika centrálních laboratořích. Platné výsledky Vysis ALK FISH byly získané pro celkově 1 644 vzorků tkáně NSCLC (1 018 a 626 vzorků pro studii č. 1, resp. 2).

Ve studii srovnání metod za použití protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3) byly vzorky pacientů analyzované pro studii č. 1 a č. 2 odeslané do centrální laboratoře za účelem barvení protilátkovým testem VENTANA anti-ALK (D5F3) a vyhodnocení stavu ALK IHC na základě kritérií algoritmu hodnocení protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3) (Tabulka 5). Ze vzorků, které ve screeningu klinické studie poskytl platné výsledky Vysis ALK FISH, poskytlo 933 vzorků ze studie č. 1 (Tabulka 26) a 598 vzorků ze studie č. 2 (Tabulka 28) také platné výsledky pro protilátkový test VENTANA anti-ALK (D5F3).

Počty vzorků poskytujících ALK pozitivní a ALK negativní výsledky pro jednotlivé testy jsou uvedené v tabulkách 26 a 28 pro kohorty studie č. 1, resp. 2. Míra shody mezi dvěma testy je uvedena v tabulkách 27 a 29 pro kohorty studie č. 1, resp. 2. Uváděné pozitivní

a negativní procentuální míry shody byly 86,0 %, resp. 96,3 % pro studii č. 1 (Tabulka 27) a 92,7 %, resp. 94,8 %, pro studii č. 2 (Tabulka 29).

Tabulka 26. Srovnání stavu ALK u vzorků NSCLC (kohorta ze studie č. 1) stanovených pomocí protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3) ve srovnání s testem Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.

| Stav ALK | | Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit | | |
|------------------------------------|-----------|--------------------------------------|-----------|--------|
| | | Pozitivní | Negativní | Celkem |
| Protilátka VENTANA anti-ALK (D5F3) | Pozitivní | 154 | 28 | 182 |
| | Negativní | 25 | 726 | 751 |
| | Celkem | 179 | 754 | 933 |

Tabulka 27. Shoda protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3) s Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit ve studii č. 1.

| Míra shody mezi studii ALK | Pozitivní procentuální shoda (95 % IS) | Negativní procentuální shoda (95 % IS) | Celková procentuální shoda (95 % IS) |
|---|--|--|--------------------------------------|
| Protilátka VENTANA anti-ALK (D5F3) a 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 %) |

Tabulka 28. Srovnání stavu ALK ze studie č. 2 u vzorků NSCLC pomocí protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3) ve srovnání s testem Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.

| Stav ALK | | Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit | | |
|------------------------------------|-----------|--------------------------------------|-----------|--------|
| | | Pozitivní | Negativní | Celkem |
| Protilátka VENTANA anti-ALK (D5F3) | Pozitivní | 179 | 21 | 200 |
| | Negativní | 14 | 384 | 398 |
| | Celkem | 193 | 405 | 598 |

Tabulka 29. Shoda protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3) s Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit ve studii č. 2.

| Míra shody mezi studii ALK | Pozitivní procentuální shoda (95 % IS) | Negativní procentuální shoda (95 % IS) | Celková procentuální shoda (95 % IS) |
|---|--|--|--------------------------------------|
| Protilátka VENTANA anti-ALK (D5F3) a 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 %) |

Vzorky tkáně použité ve studii č. 1 a studii č. 2 neprošly kontrolou přípravy dle postupů přípravy vzorku doporučených pro protilátkový test VENTANA anti-ALK (D5F3).

Studie klinických výsledků crizotinibu

Analýza klinické účinnosti pro protilátkový test VENTANA anti-ALK (D5F3) jako diagnostický prostředek pro výběr pacientů, kteří mohou mít prospěch z léčby crizotinibem, přípravkem zaměřeným proti ALK, byla založena na studii č. 1. Tito pacienti prošli analýzou pomocí protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3) ve studii srovnání metod i další studii. Studie č. 1 byla multicentrická nadnárodní randomizovaná otevřená

studie fáze 3 hodnotící bezpečnost a účinnost crizotinibu ve srovnání s chemoterapií první linie (pemetrexed/cisplatin nebo pemetrexed/karboblatin) u předtím neléčených pacientů s ALK pozitivním pokročilým nespinozellárním NSCLC. Souprava Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit (ALK FISH) byla použita ke stanovení pozitivitu ALK a vhodnosti pro studii č. 1. Na základě výsledků testu Vysis ALK FISH bylo randomizováno 343 pacientů (172 do ramene crizotinibu a 171 do chemoterapeutického ramene). Ve studii klinického výsledku s protilátkovým testem VENTANA anti-ALK (D5F3) byly retrospektivně testovány tkáňové vzorky ze studie č. 1 pomocí protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3). Z 343 pacientů zařazených do studie č. 1 bylo 133 analyzováno pomocí protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3) dle protokolu studie srovnání metod. Dalších 39 pacientů prošlo testováním pod samostatným protokolem studie. Celkem bylo protilátkovým testem VENTANA anti-ALK (D5F3) analyzováno 172 pacientů. Z těchto pacientů bylo pomocí ALK (D5F3) IHC 166 diagnostikováno jako ALK pozitivní nebo ALK negativní. Celkové výsledky účinnosti pro tyto pacienty jsou shrnuté ve výsledcích protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3), viz Tabulka 30.

Tabulka 30. Klinický benefit crizotinibu (přežívání bez progresse) u pacientů zařazených do studie č. 1.

| Stav ALK | FISH | HR [a] | SE [a] | 95 % IS [a] | Velikost vzorku | |
|---------------------------|------------|--------|--------|----------------|--------------------------|--------------------|
| | | | | | Chemoterapeutické rameno | Rameno crizotinibu |
| Celkem zařazeno | FISH+ | 0,454 | 0,139 | (0,346, 0,596) | 171 | 172 |
| Testován o pomoci ALK IHC | FISH+ [b] | 0,407 | 0,214 | (0,267, 0,618) | 82 | 90 |
| | FISH+/IHC+ | 0,401 | 0,237 | (0,252, 0,639) | 63 | 78 |
| | FISH+/IHC- | 1,711 | 0,703 | (0,431, 6,789) | 17 | 8 |

[a] Pozorovaný poměr rizik (HR) pro přežívání bez progresse (PFS) u crizotinibu ve srovnání s chemoterapií; standardní chyba (SE) a 2 stranný 95 % interval spolehlivosti (IS). Výsledky byly odhadnuty pomocí stratifikovaného Coxova modelu s následujícími vrstvami: rasa, mozkové metastázy a skóre ECOG.

[b] Pro dva pacienty ALK FISH+ v rameni chemoterapie a 4 pacienty v rameni crizotinibu není k dispozici výsledek ALK IHC (pozitivní či negativní).

Byly provedeny další imputační analýzy zařazující pacienty s chybějícími nebo neplatnými výsledky protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3) s cílem vyhodnotit robustnost závěrů studie. Statistická analýza pacientů vykazujících neshodu nezařazených do studie č. 1 zahrnovala simulaci širokého spektra možných výsledků u těchto pacientů. Výsledky ze všech hypotetických analýz byly obecně shodné s výsledky primární analýzy účinnosti.

Případy vykazující neshodu FISH+/IHC- ze studie č. 1:

Studie srovnání metod

Ve studii srovnání metod (tabulky 26 a 27) bylo vyhodnoceno 25 pacientů ze studie č. 1 jako FISH+/IHC-. Mediánové skóre Vysis ALK FISH (% nádorových buněk s pozitivní změnou uspořádání genu ALK) pro tyto případy bylo 20 % (průměr 31,6 %, SD 21,58 %). Pro 14 z těchto případů bylo skóre FISH 25 % nebo méně. I když všechny tyto případy měly skóre Vysis ALK FISH nad 15 % hraniční hodnotou pro ALK pozitivitu, jejich skóre ve FISH ležela v nejednoznačné zóně (10–50 %). Na rozdíl od toho bylo mediánové skóre FISH pozorované u všech zařazených pacientů otestovaných IHC 58 % (průměr 56,9 %, SD 21,97 %).

Studie klinických výsledků

Ve studii klinických výsledků bylo 25 pacientů zařazených do studie č. 1 vyhodnoceno jako FISH+/IHC- (viz poslední řádek tabulky 30). Osm z těchto případů bylo randomizováno do ramene crizotinibu klinické studie. Z těchto pacientů mělo pět skóre FISH blízké hraniční hodnotě FISH (15–18 % nádorových buněk vykazujících pozitivitu na změnu uspořádání genu ALK) a také vykazovalo objektivní progresi nebo stabilní onemocnění / absenci odpovědi. Dva z 8 pacientů měli skóre FISH mimo nejednoznačné zóny FISH (66 a 72 % nádorových buněk pozitivních na změnu uspořádání genu ALK) a vykazovali parciální objektivní odpověď nádoru. Osmý IHC- pacient byl FISH- a byl zařazen chybně. Tento pacient vykazoval neurčitou odpověď.

Případy vykazující neshodu FISH-/IHC+ ze studie č. 1

Ve studii srovnání metod protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3) bylo 28 případů po screeningu pro studii č. 1 vyhodnoceno jako FISH-/IHC+. Jelikož FISH byl test klinické studie a do studie č. 1 byly zařazovány pouze případy FISH+, nejsou k případům vykazujícím neshodu FISH-/IHC+ dostupné žádné údaje o výsledku.

Studie klinických výsledků ceritinibu

Analýza klinické účinnosti pro protilátkový test VENTANA anti-ALK (D5F3) jako diagnostický prostředek pro výběr pacientů, kteří mohou mít prospěch z léčby ceritinibem, byla založena na otevřené randomizované multicentrické studii fáze 3 s aktivní kontrolou (studie č. 3) perorálního ceritinibu. Tato studie srovnávala klinickou účinnost a bezpečnost léčby ceritinibem s chemoterapií (dvojkombinace založená na platině s pemetrexedem následovaná udržovací léčbou pemetrexedem u pacientů bez progresivního onemocnění po 4 cyklech) u předtím neléčených dospělých pacientů s ALK pozitivním lokálně pokročilým nebo metastatickým nespinozellárním NSCLC. Protilátkový test VENTANA anti-ALK (D5F3) na přístroji BenchMark XT byl použit k analýze celkem 1 778 pacientů s cílem ověřit jejich vhodnost pro studii č. 3, jejímž kritériem byl pozitivní stav ALK. Na základě pozitivního výsledku testu tumoru na ALK bylo randomizováno celkem 376 pacientů (189 do ramene ceritinibu a 187 do chemoterapeutického ramene). Celkové výsledky účinnosti pro pacienty léčené ceritinibem shrnuje Tabulka 31. Ceritinib vykazoval statisticky významnou a klinicky smysluplnou výhodu ve srovnání s chemoterapií se 45 % snížením rizika v PFS dle BIRC (HR = 0,55; 95 % IS: 0,42, 0,73; $p < 0,001$) pro pacienty zvolené pomocí protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3) Mediánové PFS dle vyhodnocení BIRC bylo 16,6 měsíce (95 % IS: 12,6, 27,2) a 8,1 měsíce (95 % IS: 5,8, 11,1) pro rameno ceritinibu, resp. chemoterapie.

Tabulka 31. Klinický benefit ceritinibu (přežívání bez progresse) u pacientů zařazených do studie č. 3.

| Přežívání bez progresse | ZYKADIA (N = 189) | Chemoterapie (N = 187) |
|---|-------------------|------------------------|
| Medián, měsíce (95 % IS) ^[a] | 16,6 (12,6, 27,2) | 8,1 (5,8, 11,1) |
| HR (95 % IS) ^[b] | 0,55 (0,42, 0,73) | |
| hodnota p ^[c] | <0,0001 | |

HR = poměr rizik; IS = interval spolehlivosti; BIRC = zaslepená nezávislá kontrolní komise; NR = nedosaženo; NE = nelze odhadnout

[a] Odhad pomocí Kaplan-Meierovy metody.

[b] Coxův regresní model stratifikovaný dle randomizačních stratifikačních faktorů (výkonnostní stav WHO: 0 vs. 1–2; přítomnost nebo nepřítomnost BM, přítomnost nebo nepřítomnost předchozí neo-/adjuvantní chemoterapie) byl použit k odhadu poměru rizik PFS spolu s 95 % IS na základě Waldova testu.

[c] Na základě stratifikovaného log-rank testu (stejná stratifikace jako [b]).

Míru přijatelnosti barvení pro protilátkový test VENTANA anti-ALK (D5F3) v populaci určené k diagnostice (1 778 pacientů analyzovaných pomocí testu) uvádí Tabulka 32. Rovněž jsou zde uvedena procenta přijatelné morfologie a přijatelného pozadí u sklíček barvených protilátkovým testem VENTANA anti-ALK (D5F3). U 122 vzorků selhal úvodní pokus o barvení protilátkovým testem VENTANA anti-ALK (D5F3) a byl proveden další pokus o barvení. U posledního pokusu o barvení zůstávalo 48 ze 122 vzorků stále nepřijatelných (1 kvůli neplatné kontrole zpracování, 30 kvůli nepřijatelnému H&E a 12 kvůli nepřijatelné negativní reagenční kontrole, 1 kvůli nepřijatelnému pozadí, 2 kvůli nepřijatelnému pozadí a morfologii a 2 kvůli nehodnotitelnému IHC sklíčku). Test VENTANA anti-ALK (D5F3) vykazoval vysokou prvotní i konečnou celkovou přijatelnost barvení; 93,1 %, resp. 97,3 %. Konečná přijatelnost morfologie a pozadí byla 99 % nebo více.

Tabulka 32. Úvodní a konečné charakteristiky barvení pomocí protilátkového testu VENTANA anti-ALK (D5F3) pro vzorky studie NSCLC v rámci screeningu pro zařazení do studie č. 3.

| Vyhodnocené parametry barvení | Míra přijatelnosti v % (n/N) (95 % IS) | |
|--------------------------------------|--|-------------------------------------|
| | Úvodní* | Konečná** |
| Celková přijatelnost barvení ALK IHC | 93,1 % (1656/1778) (91,9–94,2 %) | 97,3 % (1730/1778) (96,4–98,0 %) |
| Barvení pozadí | 99,0 % (1655/1672) (98,4–99,4 %) | 99,8 % (1727/1730) (99,5–99,9 %) |
| Morfologie | 99,0 % (1657/1674) (98,4–99,4 %) | 99,9 % (1728/1730) (99,6–100 %) |

* První pokus o barvení ** Konečný pokus o barvení

Studie klinických výsledků alectinibu

Analýza klinické účinnosti pro protilátku VENTANA ALK (D5F3) jako diagnostický prostředek pro výběr pacientů, kteří mohou mít prospěch z léčby alectinibem, byla založena na otevřené randomizované multicentrické studii fáze 3 s aktivní kontrolou (studie č. BO28984) perorálního alectinibu. Tato studie srovnávala klinickou účinnost a bezpečnost léčby alectinibem s léčbou crizotinibem u předtím neléčených dospělých pacientů s ALK pozitivním lokálně pokročilým nebo metastatickým NSCLC. Protilátka VENTANA ALK (D5F3) na přístroji BenchMark XT byla použita k analýze celkem 1 239 pacientů s cílem ověřit jejich vhodnost pro studii č. BO28984, jejímž kritériem byl pozitivní stav ALK při centrálním testování. Na základě pozitivního výsledku testu tumoru na ALK bylo randomizováno celkem 303 pacientů (152 do ramene alectinibu a 151 do ramene crizotinibu) a analyzováno z hlediska účinnosti. Celkové výsledky účinnosti shrnuje Tabulka 33. Alectinib vykazoval statisticky významnou a klinicky smysluplnou výhodu ve srovnání s crizotinibem s 53 % snížením rizika v PFS dle vyhodnocení zkoušejícího (HR = 0,47, 95 % IS: 0,34, 0,65; p < 0,0001) a 50 % snížením rizika v PFS dle IRC (HR = 0,50, 95 % IS: 0,36, 0,7; p < 0,0001), u pacientů vybraných pomocí protilátky VENTANA ALK (D5F3). Mediánové PFS dle vyhodnocení zkoušejícího nebylo v rameni s alectinibem dosaženo a dle vyhodnocení IRC bylo 25,7 měsíce (95 % IS: 19,9, NE) a 10,4 měsíce (95 % IS: 7,7, 14,6) pro rameno alectinibu, resp. crizotinibu.

Tabulka 33. Klinický benefit alectinibu nebo crizotinibu (přežívání bez progresu) u pacientů zařazených do studie č. BO28984.

| Přežívání bez progresu, podle vyhodnocení zkoušejícího | Alectinib (N = 152) | Crizotinib (N = 151) |
|--|---------------------|----------------------|
| Medián, měsíce (95 % IS) [a] | NE (17,7, NE %) | 11,1 (9,1, 13,1 %) |
| HR (95 % IS) [b] | 0,47 (0,34, 0,65 %) | |
| hodnota p [c] | <0,0001 | |
| Přežívání bez progresu, podle vyhodnocení IRC | Alectinib (N = 152) | Crizotinib (N = 151) |
| Medián, měsíce (95 % IS) [a] | 25,7 (19,9, NE %) | 10,4 (7,7, 14,6 %) |
| HR (95 % IS) [b] | 0,50 (0,36, 0,70 %) | |
| hodnota p [c] | <0,0001 | |

HR = poměr rizik; IS = interval spolehlivosti; IRC = nezávislá kontrolní komise; NE = nelze odhadnout

[a] Odhad pomocí Kaplan-Meierovy metody.

[b] Poměr rizik byl odhadnutý Coxovou regresí, stratifikovanou podle kovariantů Rasa (asijská x mimoasijská) a přítomnosti metastáz v CNS ve výchozím stavu (přítomnost/nepřítomnost) podle IRC.

[c] Na základě stratifikovaného log-rank testu (stejná stratifikace jako [b]).

Míra přijatelnosti barvení pro protilátku VENTANA ALK (D5F3) v populaci určené k diagnostice (1 239 pacientů analyzovaných pomocí testu) byla srovnatelná s výsledky ve studii A2301.

Závěr

Protilátkový test VENTANA anti-ALK (D5F3) je reprodukovatelný ve výsledcích zbarvení pro klinický stav ALK na přístrojích BenchMark ULTRA, BenchMark XT a BenchMark GX. Algoritmus binárního hodnocení je vysoce reprodukovatelný napříč hodnotiteli. Test je ve shodě se soupravou Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit pro stav ALK. Protilátkový test VENTANA anti-ALK (D5F3) lze použít k identifikaci pacientů vhodných pro léčbu přípravkem XALKOR® (crizotinib), ZYKADIA® (ceritinib) nebo ALECENSA® (alectinib).

LITERATURA

- Kutok JL, Aster JC, et al. Molecular biology of anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large-cell lymphoma. *J Clin Onc.* 2002;20(17):3691-3702.
- Iwahara T, et al. Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene.* 1997;14:439-49.
- Soda M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature.* 2007;448(7153):561-66.
- Inamura K, et al. EML4-ALK fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers. *J Thorac Oncol.* 2008;3(1):13-17.
- Choi YL, et al. Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2008;68(13):4971-6.
- Koivunen JP, et al. EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(13):4275-83.
- Shimura K, et al. EML4-ALK fusion transcripts, but no NPM-, TPM3-, CLTC-, ATIC-, or TFG-ALK fusion transcripts, in non-small cell lung carcinomas. *Lung Cancer.* 2008;61:163-9.
- Takeuchi K, et al. Multiplex reverse transcription-PCR screening for EML4-ALK fusion transcripts. *Clin Cancer Res.* 2008;14(20):6618-24.
- Shaw AT, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol.* 2009;27(26):4247-53.
- Yi ES, et al. Correlation of IHC and FISH for ALK gene rearrangement in non-small cell lung carcinoma: IHC score algorithm for FISH. *J Thorac Oncol.* 2011;6(3):459-65.
- McLeer-Florin A, et al. Dual IHC and FISH testing for ALK gene rearrangement in lung adenocarcinomas in a routine practice: a French study. *J of Thorac Oncol.* 2012;7(2):348-54.
- Christensen JG, et al. Cytoreductive antitumor activity of PF-2341066, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experimental models of anaplastic large-cell lymphoma. *Mol Cancer Ther.* 2007;6(12 Pt 1):3314-22.
- Yamazaki S, et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of crizotinib for anaplastic lymphoma kinase inhibition and antitumor efficacy in human tumor xenograft mouse models. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;340(3):549-57.
- XALKOR package insert. Pfizer. Document ID:6427427a-821b-48b4-8f06-0477f0ae4e36. LAB-0441-6.0.June 2014
- ZYKADIA package insert Novartis. Document ID:T2015-114/T2015-115. July 2015.
- H Sakamoto, et al. CH5424802, a selective ALK inhibitor capable of blocking the resistant gatekeeper mutant. *Cancer Cell.* 2011;19(5):679-90.
- Kodama T, et al. Antitumor activity of the selective ALK inhibitor alectinib in models of intracranial metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014;75(5):1023-28.
- Gadgeel S, et al. Safety and activity of alectinib against systemic disease and brain metastases in patients with crizotinib-resistant ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (AF-002JG): results from the dose finding portion of a phase 1/2 study. *Lancet Oncol.* 2014;15(10):1119-28.
- Shaw A, et al. Alectinib in ALK-positive, crizotinib-resistant, non-small-cell lung cancer: a single-group, multicenter, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(2):234-42.
- ALECENSA package insert
- Galetta D, et al. The emerging role of ALK inhibitors in the treatment of advanced non-small cell lung cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2012 Suppl 2:S545-54.
- Jokoji R, et al. Combination of morphological feature analysis and immunohistochemistry is useful for screening of EML4-ALK-positive lung adenocarcinoma. *J Clin Pathol.* 2010;63(12):1066-70.
- Mino-Kenudson M, et al. A novel, highly sensitive antibody allows for the routine detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas by standard immunohistochemistry. *Clin Cancer Res.* 2010;16(5):1561-71.

24. Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and practice of Histotechnology, 2nd edition. St. Louis: The C.V. Mosby Company; 1980.
25. Carson F, Hladik C. Histotechnology: A Self Instructional Text, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
26. Roche PC, Hsi ED. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. In: NR Rose, ed. ASM Press; 2002.
27. NordiQC: Nordic Immunohistochemical Quality Control Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) (lung protocol). Assessment Run 39 2013. http://www.nordiqc.org/Run-39-B16-H4/Assessment/Run39_ALK.pdf. 07-12-2013. Accessed February 26, 2014.
28. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2011.
29. CLSI. Quality Assurance for Design Control and Implementation of Immunohistochemistry Assays: Approved Guideline-Second Edition. CLSI document I/LA28-A2 (ISBN 1-56238-745-6). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 2011.
30. Herman GE, et al. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech Histochem. 1991;66(4):194-9.
31. Omata M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen. A possible source of error in immunohistochemistry. Am J Clin Pathol. 1980;73(5):626-32.
32. Nadjji M, et al. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. Lab Med. 1983;14:767.

DUŠEVNÍ VLASTNICTVÍ

VENTANA, BENCHMARK, OPTIVIEW a logo VENTANA jsou ochranné známky společnosti Roche.

Všechny další ochranné známky patří příslušným vlastníkům.

© 2017 Ventana Medical Systems, Inc.

Prodáváno pod licencí od



KONTAKTNÍ INFORMACE



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany



www.ventana.com