

FOR INFORMATION ONLY.  
WHEN PERFORMING  
THE ASSAY ALWAYS REFER  
TO PACKAGE INSERT  
SUPPLIED  
WITH THE KIT



## HE4 EIA

Prod. Nr. 404-10

Gebrauchsanweisung

Enzymimmunometrischer Assay

2008-09

Für 96 Bestimmungen

### VERWENDUNGSZWECK

Der HE4 EIA ist ein enzymimmunometrischer Assay für die quantitative Bestimmung von HE4 in menschlichem Serum.

Der Test dient als Hilfsmittel bei der Überwachung von Behandlungsreaktionen für Patientinnen mit invasivem epitheliale Ovarialkarzinom. Serielle Tests zur Bestimmung der HE4-Werte sollten gemeinsam mit anderen klinischen Verfahren für die Überwachung von Ovarialkrebs angewandt werden.

Der Test ist zudem für die gemeinsame Verwendung mit dem ARCHITECT CA 125 II bzw. CanAg CA125 EIA als Hilfsmittel bei der Beurteilung des Risikos von epitheliale Ovarialkarzinom bei prä- und postmenopausalen Frauen mit Raumforderung im Becken vorgesehen. Die Ergebnisse sind gemeinsam mit anderen Verfahren gemäß Standardrichtlinien für klinisches Management zu interpretieren.

### ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG DES TESTS

Das humane Epididymis-Protein 4 (HE4) gehört zur Familie der WFDC-Proteine (Whey Acidic Four-Disulfide Core Protein), von denen man annimmt, dass sie über eine trypsinhemmende Wirkung verfügen. Weitere Proteine dieser Familie sind SLPI, Elafin und PS20 (WFDC1) (1, 2) Das HE4-Gen kodiert für ein 13 kD-Protein, auch wenn das Protein in seiner reifen glykosylierten Form etwa 20-25 kD schwer ist, und besteht aus einem einzelnen Peptid mit zwei WFDC-Domänen (3). HE4 wurde zuerst im Epithel des distalen Teils der Epididymis identifiziert und ursprünglich als ein an der Spermienreifung beteiligter Proteasehemmer klassifiziert (4,5). Seitdem wird berichtet, dass HE4 in einer Reihe normaler Gewebe, wie etwa dem Epithelgewebe der Atemwegs- und Fortpflanzungsorgane, sowie auch in Ovarialkarzinomgewebe exprimiert wird (6-10). Neben der Expression auf Zellebene wurde ausgeschüttetes HE4 in hohen Konzentrationen im Serum von Patientinnen mit Ovarialkarzinom nachgewiesen. In Rahmen einer Fall-/Kontrollstudie, bei der Ovarialkarzinom-Patientinnen mit gesunden Personen und gutartigen Erkrankungen verglichen wurden, fanden Hellström *et al.* heraus, dass HE4 Ovarialkrebs mit einer Sensitivität von 67% und einer Spezifität von 96% nachweist (11). In einer

Folgestudie zur Beurteilung zahlreicher bekannter Biomarker für Ovarialkarzinome erwies sich HE4 als jener Marker mit der höchsten Sensitivität für den Nachweis von Ovarialkarzinomen, vor allem im Frühstadium der Erkrankung. Bei dieser Studie ergab die Kombination von HE4 und CA 125 mit einer Sensitivität von 76% und einer Spezifität von 95% eine präzisere Malignitätsprognose als jeder der beiden Marker alleine. (12).

Eierstockkrebs ist die vierthäufigste tumorbedingte Todesursache bei Frauen weltweit. In Europa liegt die Sterblichkeitsrate zwischen 3,6 und 9,3/100.000 Frauen (13). Die Symptome eines Ovarialkarzinoms werden mit dem Vorhandensein eines Adnexbefundes assoziiert und sind oft unbestimmt und unspezifisch. Hauptziel der diagnostischen Beurteilung eines Adnexbefundes ist die Klärung, ob es sich um einen gutartigen oder bösartigen Tumor handelt. Schätzungen gehen davon aus, dass sich 5-10% der Frauen in den USA aufgrund des Verdachts auf Ovarialtumor einem chirurgischen Eingriff unterziehen. Bei 13-21% dieser Frauen wird ein Ovarialmalignom festgestellt (14). Das Bulletin des American College of Obstetricians and Gynecologists Practice aus dem Jahre 2007 stellt Folgendes fest: *“Frauen mit einem Ovarialkarzinom, die von Ärzten mit Spitzenausbildung und fachlicher Kompetenz in der Behandlung von Frauen mit Eierstockkrebs, wie etwa gynäkologische Onkologen, behandelt werden, weisen eine höhere Gesamtüberlebensrate als Frauen ohne derartige Behandlung auf.“* (15). Da es sich beim Großteil der Adnextumoren um gutartige Tumoren handelt, ist die präoperative Feststellung, ob bei einer Patientin ein hohes Risiko an einem Ovarialmalignom vorliegt oder nicht, von entscheidender Bedeutung, um eine angemessene Behandlung sicherzustellen (15). Seit dem Erstbericht im Jahre 1988 sind die klinische Beurteilung, CA 125 im Serum und Ultraschall mit CT, MRI und CT/PET die Standards zur Feststellung, ob bei einem Adnexbefund Verdacht auf Malignität besteht (16). Die Literatur enthält unzählige Veröffentlichungen darüber, welches Verfahren die höchste Präzision aufweist; die Kombination aus einer körperlichen Untersuchung, CA 125 und Bildgebung liefert jedoch den höchsten prädiktiven Präzisionswert (17-19). Für eine bessere Triage der Patientinnen mit Raumforderung im Becken kann der HE4 EIA gemeinsam mit dem ARCHITECT CA 125 II oder CanAg CA125 EIA als Hilfsmittel bei der Beurteilung des Risikos eines epithelialen Ovarialkarzinoms eingesetzt werden. Die Ergebnisse sind gemeinsam mit anderen Verfahren gemäß Standardrichtlinien für klinisches Management zu interpretieren. Der HE4 EIA dient zudem als Hilfsmittel bei der Überwachung von Behandlungsreaktionen bei Patientinnen mit invasivem epitheliale Ovarialkarzinom. Die Ergebnisse sollten gemeinsam mit anderen klinischen Verfahren für die Überwachung von Ovarialkrebs verwendet werden.

## **TESTPRINZIP**

Der HE4 EIA ist ein nicht-kompetitiver Festphasenimmunoassay, der auf dem direkten Sandwichverfahren unter Verwendung zweier monoklonaler muriner Antikörper, 2H5 und 3D8, beruht, die gegen zwei Epitope der C-WFDC-Domäne von HE4 gerichtet sind. Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben werden gemeinsam mit biotinyliertem monoklonalem Anti-HE4-Antikörper (MAb) 2H5 in Streptavidin-beschichteten Kavitäten einer Mikrotiterplatte inkubiert. Ist HE4 in den Kalibratoren oder Proben vorhanden, so wird es vom biotinylierten Anti-HE4-MAb während der Inkubation an die Streptavidin-beschichteten Kavitäten adsorbiert. Die Mikrotiterstreifen werden hierauf gewaschen und mit Anti-HE4-MAb-3D8, markiert mit Meerrettichperoxidase, inkubiert. Nach dem Waschschrift wird jeder Kavität gepuffertes

Substrat/Chromogen (Wasserstoffperoxid und 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin) hinzugefügt und die Enzymreaktion läuft ab. Während der Enzymreaktion entwickelt sich eine blaue Färbung, wenn Antigen vorhanden ist. Die Farbintensität ist proportional zur in den Proben vorhandenen HE4-Menge. Die Farbintensität wird auf einem Mikrotiterplatten-Spektrophotometer bei 620 nm (oder 405 nm nach Zugabe der Stopplösung) bestimmt.

Für jeden Test wird eine Kalibrationskurve mittels Auftragen des Absorptionwertes gegen die Konzentration für jeden Kalibrator erstellt. Die HE4-Konzentrationen der Patientenproben werden hierauf von der Kalibrationskurve abgelesen.

## REAGENZIEN

- Jedes HE4 EIA-Kit enthält Reagenzien für 96 Tests.
- Das Verfallsdatum des Kits ist auf dem Packungsetikett angegeben.
- Verwenden Sie das Kit nicht nach dem Verfallsdatum.
- Reagenzien aus verschiedenen Kit-Chargen nicht mischen.
- Lagern Sie das Kit zwischen 2-8°C. Nicht einfrieren.
- Die Reagenzien sind nach dem Öffnen für die in folgender Tabelle angegebene Zeitdauer haltbar, sofern sie nicht kontaminiert sind, im gut verschlossenen Originalbehälter aufbewahrt und vorschriftsmäßig gehandhabt werden. Unmittelbar nach der Verwendung wieder bei 2-8°C lagern.

Bestandteil	Menge	Lagerung und Haltbarkeit nach dem Öffnen
<b>MICROPLA</b> Streptavidin-Mikrotiterplatte	1 Platte	2-8°C bis Verfallsdatum Datum auf der Platte angegeben

12 x 8 abtrennbare, mit Streptavidin beschichtete Kavitäten. Nicht verwendete Streifen müssen nach dem Öffnen sofort zurück in den Alubeutel mit Trockenmittel gegeben werden. Sorgfältig verschließen, um trocken zu halten.

CAL	HE4	A
<b>HE4-Kalibrator A</b>		
	1 x 8 ml	2-8°C bis Verfallsdatum auf dem Fläschchen angegeben

Phosphatgepufferte Salzlösung mit Rinderserum-Albumin, einem inerten gelben Farbstoff und einem azidfreien antimikrobiellen Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig. Wird auch zur Probenverdünnung verwendet.

Bestandteil	Menge	Lagerung und Haltbarkeit nach dem Öffnen			
<b>HE4-Kalibratoren B-F</b>	5 Fläschchen, lyophilisiert	Haltbarkeit nach Rekonstitution 4 Wochen bei 2-8°C 4 Monate bei -20°C oder darunter			
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>HE4</td><td>B</td></tr></table>	CAL	HE4	B	1 x 1 ml	
CAL	HE4	B			
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>HE4</td><td>C</td></tr></table>	CAL	HE4	C	1 x 1 ml	
CAL	HE4	C			
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>HE4</td><td>D</td></tr></table>	CAL	HE4	D	1 x 1 ml	
CAL	HE4	D			
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>HE4</td><td>E</td></tr></table>	CAL	HE4	E	1 x 1 ml	
CAL	HE4	E			
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>HE4</td><td>F</td></tr></table>	CAL	HE4	F	1 x 1 ml	
CAL	HE4	F			

Die lyophilisierten Kalibratoren enthalten HE4-Antigen in einer phosphatgepufferten Salzlösung mit Rinderserum-Albumin, einem inerten gelben Farbstoff und einem azidfreien antimikrobiellen Konservierungsmittel. Vor der Verwendung mit destilliertem oder entionisiertem Wasser rekonstituieren.

**HINWEIS:** Die genaue HE4-Konzentration ist chargenspezifisch und auf dem Etikett des jeweiligen Fläschchens angegeben.

<b>HE4-Kontrollen</b>	2 Fläschchen, lyophilisiert	Haltbarkeit nach Rekonstitution 4 Wochen bei 2-8°C 4 Monate bei -20°C oder darunter			
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>HE4</td><td>1</td></tr></table>	CONTROL	HE4	1	1 x 1 ml	
CONTROL	HE4	1			
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>HE4</td><td>2</td></tr></table>	CONTROL	HE4	2	1 x 1 ml	
CONTROL	HE4	2			

Die lyophilisierten Kontrollen enthalten HE4-Antigen in einer humanen Serummatrix und ein azidfreies antimikrobielles Konservierungsmittel. Vor der Verwendung mit destilliertem oder entionisiertem Wasser rekonstituieren.

<table border="1"><tr><td>BIOTIN</td><td>Anti-HE4</td></tr></table>	BIOTIN	Anti-HE4	1 x 15 ml	2-8°C bis Verfallsdatum auf dem Fläschchen angegeben
BIOTIN	Anti-HE4			

Monoklonaler Biotin-Anti-HE4-Antikörper aus der Maus, ca. 1 µg/ml. Enthält phosphatgepufferte Salzlösung (pH 7,2), Rinderserum-Albumin, Blocker, Detergenz, einen inerten roten Farbstoff und ein azidfreies antimikrobielles Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig.

---

Bestandteil	Menge	Lagerung und Haltbarkeit nach dem Öffnen
-------------	-------	--

---

CONJ	Anti-HE4
------	----------

<b>Tracer, MP-Anti-HE4</b>	1 x 0,75 ml	2-8°C bis Verfallsdatum auf dem Fläschchen angegeben
----------------------------	-------------	---

Stammösung aus monoklonalem MP-Anti-HE4-Antikörper aus der Maus, ca. 40 µg/ml. Enthält azidfreie antimikrobielle Konservierungsmittel. Vor der Verwendung mit Tracer-Verdünnungsmittel verdünnen.

DIL	CONJ
-----	------

<b>Tracer-Verdünnungsmittel</b>	1 x 15 ml	2-8°C bis Verfallsdatum auf dem Fläschchen angegeben
---------------------------------	-----------	---

Enthält phosphatgepufferte Salzlösung (pH 7,2) mit Rinderserum-Albumin, Blockern, Detergenz, einem inerten blauen Farbstoff und einem azidfreien antimikrobiellen Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig.

SUBS	TMB
------	-----

<b>TMB-MP-Substrat</b>	1 x 12 ml	2-8°C bis Verfallsdatum Datum auf dem Fläschchen angegeben
------------------------	-----------	---

Enthält gepuffertes Wasserstoffperoxid und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB). Gebrauchsfertig.

STOP
------

<b>Stopplösung</b> 1 x 15 ml	2-8°C bis Verfallsdatum Datum auf dem Fläschchen angegeben
------------------------------	---

Enthält 0,12 M Salzsäure. Gebrauchsfertig.

Bestandteil	Menge	Lagerung und Haltbarkeit nach dem Öffnen
-------------	-------	---

WASHBUF	25X
---------	-----

Waschkonzentrat	1 x 50 ml	2-8°C bis Verfallsdatum Datum auf der Flasche angegeben
-----------------	-----------	--

Tris-HCl-gepufferte Salzlösung mit Tween 20. Enthält Germall II als Konservierungsmittel.

Vor der Verwendung mit destilliertem oder entionisiertem Wasser 25-fach verdünnen.

### Verfallsanzeichen

Das TMB-MP-Substrat muss farblos oder leicht bläulich sein. Eine blaue Färbung weist darauf hin, dass das Reagens kontaminiert ist und entsorgt werden muss.

## SICHERHEITSHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

### Für In-vitro-Diagnostik.

- Nur für geschultes Fachpersonal.
- Befolgen Sie die Anweisungen der Packungsbeilage. Wenn die Anweisungen dieser Packungsbeilage nicht genauestens befolgt werden, kann die Verlässlichkeit der Testergebnisse nicht gewährleistet werden.
- Behandeln Sie alle Patientenproben als potenziell infektiös. Es wird empfohlen, Reagenzien menschlichen Ursprungs und menschliche Proben gemäß OSHA-Standard für durch Blut übertragbare Krankheitserreger zu behandeln (20). Für Material mit Infektionserregern oder Verdacht auf Infektionserreger sind Biosicherheitsstufe 2 (21) bzw. andere angemessene Biosicherheitsverfahren anzuwenden.
- Befolgen Sie die örtlichen Richtlinien für die Entsorgung sämtlicher Abfallmaterialien.

### Vorsicht

Das für die Zubereitung der Reagenzien verwendete Material menschlichen Ursprungs wurde getestet und als nichtreaktiv auf HIV-1- und 2-Antikörper, HCV-Antikörper und Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg) befunden. Da das Vorhandensein von durch Blut übertragbaren Krankheiten mit keinem Verfahren vollständig ausgeschlossen werden kann, sollten Reagenzien menschlichen Ursprungs aus diesem Produkt als potenziell infektiöses Material behandelt und entsorgt werden.

## PROBENENTNAHME UND HANDHABUNG

Der HE4 EIA ist für die Verwendung mit Serum (einschließlich Serum aus Trennröhrchen (SST)) vorgesehen. Plasma und andere Körperflüssigkeiten wurden nicht zur Verwendung mit dem HE4 EIA validiert. Entnehmen Sie Blut mittels Venenpunktion, und befolgen Sie die Anweisungen des Herstellers für die Handhabung der Sammelröhrchen. Bei der Evaluierung serieller Proben ist für die gesamte Untersuchung derselbe Probentyp zu verwenden.

Serum kann vor dem Testen bei 2-8°C für 3 Tage gelagert werden. Für einen längeren Zeitraum müssen die Proben bei mindestens -40°C gelagert werden.

Lassen Sie die gefrorenen Proben Raumtemperatur annehmen und mischen Sie vor der Analyse GRÜNDLICH durch mehrmaliges vorsichtiges Umdrehen. Proben, die grobe Partikel aufweisen, müssen vor der Verwendung 10 Minuten lang bei 10.000 x g zentrifugiert werden, um sämtliche Partikel zu entfernen, die sich möglicherweise beim Auftauvorgang gebildet haben.

## VERFAHREN

### Benötigte, nicht im Kit enthaltene Materialien

#### 1. Mikrotiterplatten-Schüttler

Schütteln Sie mittelstark bis kräftig (ca. 700-1100 U/Min).

#### 2. Mikrotiterplatten-Waschgerät

Automatisches Plattenwaschgerät mit 1, 3 und 6 Waschzyklen und Mindestfüllvolumen von 350 µl/Kavität/Waschzyklus.

Wird kein automatisches Mikrotiterplatten-Waschgerät verwendet, so empfiehlt sich eine 8-Kanalpipette mit Einweg-Kunststoffspitzen zur Abgabe von 350 µl.

#### 3. Mikrotiterplatten-Spektrophotometer

Mit einer Wellenlänge von 620 nm und/oder 405 nm und einem Absorptionsbereich von 0 bis 3,0.

#### 4. Präzisionspipetten

Mit Einweg-Kunststoffspitzen zum Dispensieren von Mikrolitermengen. Eine 8-Kanalpipette oder Dispensierpipette mit Einweg-Kunststoffspitzen zur Abgabe von 100 µl wird empfohlen, ist jedoch nicht unbedingt erforderlich. Pipetten zum Dispensieren von Millilitermengen.

#### 5. Destilliertes oder entionisiertes Wasser

Zur Rekonstitution der HE4-Kalibratoren, HE4-Kontrollen und für die Zubereitung der verdünnten Waschlösung.

### Verfahrenshinweise

1. Ein gründliches Verständnis dieser Packungsbeilage ist erforderlich, um eine ordnungsgemäße Anwendung des HE4 EIA-Kits sicherzustellen. Die mit diesem Kit gelieferten Reagenzien sind zur Verwendung als Einheit vorgesehen. Mischen Sie keinesfalls gleiche Reagenzien aus Kits mit verschiedenen Chargennummern. Verwenden Sie die Reagenzien nicht nach Ablauf des auf der Packungsaußenseite angegebenen Verfallsdatums.
2. Lassen Sie die Reagenzien vor dem Gebrauch Raumtemperatur (20–25°C) annehmen. Gefrorene Proben müssen nach dem Auftauen vorsichtig, jedoch gründlich gemischt werden. **Der Test darf ausschließlich bei Temperaturen zwischen 20-25°C durchgeführt werden, um präzise Ergebnisse zu gewährleisten.**
3. Vor dem Pipettieren der Kalibratoren und Patientenproben empfiehlt sich eine Kennzeichnung der Streifen, um die Proben während des Tests sowie danach klar identifizieren zu können.
4. Einer der wichtigsten Schritte eines EIA-Verfahrens ist das gründliche Waschen zur Trennung von gebundenem und ungebundenem Antigen sowie der Reagenzien von den festphasengebundenen

Antikörper-Antigen-Komplexen. **Stellen Sie zur Gewährleistung eines gründlichen Waschvorganges sicher, dass alle Kavitäten während jedes einzelnen Waschzyklus bis zum Rand mit Waschlösung gefüllt sind, dass die Waschlösung bei gutem Durchfluss dispensiert wird und dass die Aspiration der Kavitäten zwischen und nach den Waschzyklen vollständig erfolgt ist und die Kavitäten leer sind. Drehen Sie die Platte um und klopfen Sie sie vorsichtig gegen Saugpapier, falls Flüssigkeitsrückstände vorhanden sind.**

- Automatisches Mikrotiterstreifen-Waschgerät: Befolgen Sie sorgfältig die Anweisungen des Herstellers zur Reinigung und Instandhaltung und führen Sie die erforderliche Anzahl an Waschzyklen vor und nach jedem Inkubationsschritt durch. Lassen Sie das Aspirations-/Waschgerät nicht allzu lange mit der Waschlösung stehen, da dies die Nadeln verstopfen könnte, was zu beeinträchtigter Flüssigkeitsabgabe und Aspiration führt.
- 5. Das TMB-MP-Substrat ist äußerst kontaminationsempfindlich. Für eine optimale Stabilität des TMP-MP-Substrats leeren Sie die benötigte Menge aus dem Fläschchen in einen sorgfältig gereinigten Behälter oder vorzugsweise in eine Einweg-Plastikschale, um so eine Kontamination des Reagens zu vermeiden. Stellen Sie sicher, dass saubere Einweg-Kunststoffpipettenspitzen (oder Dispensierpipettenspitzen) verwendet werden.
- 6. Achten Sie beim Umgang mit den Proben und Reagenzien darauf, saubere Einweg-Kunststoffpipettenspitzen und eine angemessene präzise Pipettiertechnik zu verwenden. Die Pipettenspitze darf keinesfalls die Flüssigkeitsoberfläche berühren, um Verschleppung zu vermeiden. Beim Umgang mit den Proben und der TMB-MP-Substratlösung ist eine sorgfältige Pipettiertechnik ganz besonders wichtig.

---

**Zubereitung der Reagenzien**

---

**Haltbarkeit des zubereiteten Reagens**

**HE4-Kalibratoren B-F**

4 Wochen bei 2-8°C

4 Monate bei -20°C oder darunter.

Geben Sie exakt 1,0 ml destilliertes oder entionisiertes Wasser in jedes Fläschchen. Mindestens 15 Minuten zur Rekonstitution stehen lassen und vor der Verwendung vorsichtig durchmischen. HINWEIS: Die Konzentration der Kalibratoren ist auf den Etiketten angegeben und wird zur Berechnung der Ergebnisse verwendet.

---

**HE4-Kontrollen 1 und 2**

4 Wochen bei 2-8°C

4 Monate bei -20°C oder darunter

Geben Sie exakt 1,0 ml destilliertes oder entionisiertes Wasser in jedes Fläschchen und mischen Sie vorsichtig. Mindestens 15 Minuten zur Rekonstitution stehen lassen und vor der Verwendung vorsichtig durchmischen. HINWEIS: Die Bereiche für die Kontrollen sind auf den Etiketten angegeben.

Zubereitung der Reagenzien	Haltbarkeit des zubereiteten Reagens
----------------------------	--------------------------------------

<b>Waschlösung</b>	2 Wochen bei 2–25°C in einem verschlossenen Behälter
--------------------	--

Leeren Sie die 50 ml Waschkonzentrat in einen sauberen Behälter und verdünnen Sie 1:25 mittels Zugabe von 1200 ml destilliertem oder entionisiertem Wasser, um eine gepufferte Waschlösung zu erhalten.

<b>Tracer-Arbeitslösung</b>	4 Wochen bei 2–8°C in einem verschlossenen Behälter
-----------------------------	---

Bereiten Sie die benötigte Menge an Tracer-Arbeitslösung zu, indem Sie 50 ml Tracer (MP-Anti-HE4) mit 1 ml Tracer-Verdünnungsmittel pro Mikrotiterstreifen mischen (siehe folgende Tabelle):

Az. Streifen	Tracer, MP-Anti-HE4 (µl)	Tracer-Verdünnungsmittel (ml)
1	50	1
2	100	2
3	150	3
4	200	4
5	250	5
6	300	6
7	350	7
8	400	8
9	450	9
10	500	10
11	550	11
12	600	12

Achten Sie darauf, ein sauberes Reagenzröhrchen (Kunststoff oder Glas) für die Zubereitung der Tracer-Arbeitslösung zu verwenden.

**Oder:** Leeren Sie den Inhalt des Tracers HRP Anti-HE4 in das Fläschchen mit dem Tracer-Verdünnungsmittel und mischen Sie vorsichtig. Stellen Sie sicher, dass der gesamte Inhalt des Fläschchens mit dem Tracer HRP Anti-HE4 in das Fläschchen mit dem Tracer-Verdünnungsmittel geleert wird.

**HINWEIS:** Die Tracer-Arbeitsverdünnung ist bei 2–8°C 4 Wochen haltbar. Bereiten Sie nicht mehr Tracer-Arbeitsverdünnung zu, als innerhalb dieses Zeitraums verwendet wird, und achten Sie auf eine korrekte Lagerung.

## TESTVERFAHREN

Führen Sie für beide Kalibratoren, Kontrollen und unbekannten Proben Doppelbestimmungen durch. Für jeden Test sollte eine Kalibrationskurve erstellt werden. Alle Reagenzien und Proben müssen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20–25°C) gebracht werden.

1. Beginnen Sie mit der Zubereitung der Kalibratoren B-F, Kontrollen 1 und 2, Waschlösung und Tracer-Arbeitslösung. Achten Sie unbedingt darauf, dass saubere Behälter verwendet werden. Befolgen Sie genau die Anweisungen.
2. Übertragen Sie die benötigte Anzahl an Mikrotiterplattenstreifen auf einen Streifenrahmen. (Restliche Streifen sofort zurück in den Alubeutel mit Trockenmittel geben und sorgfältig verschließen). Waschen Sie jeden Streifen 1x mit der Waschlösung. Waschen Sie nicht mehr Streifen, als innerhalb von 30 Min. bearbeitet werden können.
3. Pipettieren Sie jeweils 25 µl der HE4-Kalibratoren (KAL A, B, C, D, E und F), HE4-Kontrollen (K1, K2) und unbekannten Proben (Unb) gemäß folgendem Schema in die Kavitäten:

	1	2	3	4	5	6	7 etc
A	Kal A	Kal E	1. Unb				
B	Kal A	Kal E	1. Unb				
C	Kal B	Kal F	2. Unb				
D	Kal B	Kal F	2. Unb				
E	Kal C	K1					
F	Kal C	K1					
G	Kal D	K2					
H	Kal D	K2					

4. Geben Sie in jede Kavität mithilfe einer 100-µl-Präzisionspipette (oder einer 8-Kanal-100 µl-Präzisionspipette) 100 µl Biotin-Anti-HE4. Die Pipettenspitze darf keinesfalls die Flüssigkeitsoberfläche berühren, um Verschleppung zu vermeiden.
5. Inkubieren Sie die Platte unter ständigem Schütteln mit einem Mikrotiterplatten-Schüttler 1 Stunde ( $\pm 10$  Min.) bei Raumtemperatur (20-25°C).
6. Nach der ersten Inkubation aspirieren und waschen Sie jeden Streifen 3x unter Befolgung des Waschverfahrens im Abschnitt „Verfahrenshinweise“, Punkt 4.
7. Geben Sie 100 µl Tracer-Arbeitslösung in jede Kavität. Benutzen Sie dasselbe Pipettierverfahren wie unter Punkt 4 oben.
8. Inkubieren Sie den Rahmen unter ständigem Schütteln 1 Stunde ( $\pm 5$  Min.) bei Raumtemperatur (20-25°C).
9. Nach der zweiten Inkubation aspirieren und waschen Sie jeden Streifen 6x unter Befolgung des Waschverfahrens im Abschnitt „Verfahrenshinweise“, Punkt 4.

10. Geben Sie mit demselben Pipettierverfahren wie unter Punkt 4 oben beschrieben 100 µl TMB-MP-Substrat in jede Kavität.

Das TMB-MP-Substrat muss so rasch wie möglich in die Kavitäten gegeben werden. Es dürfen nicht mehr als 5 Minuten zwischen der Substratzugabe zur ersten und letzten Kavität vergehen.

11. Inkubieren Sie unter ständigem Schütteln 30 Min. ( $\pm$  5 Min.) bei Raumtemperatur (20-25°C).

Vor direktem Sonnenlicht schützen.

12. Lesen Sie die Absorption sofort auf einem Mikrotiterplatten-Spektrophotometer bei 620 nm ab.

### **Alternative**

Sollte das Labor über kein Mikrotiterplatten-Lesegerät zur Messung bei 620 nm verfügen, so kann die Absorption mit folgendem Alternativverfahren bestimmt werden:

**Alt. 12.** Fügen Sie 100 µl Stopplösung hinzu, mischen Sie und lesen Sie die Absorption innerhalb von 15 Minuten nach Zugabe der Stopplösung bei 405 nm auf einem Mikrotiterplatten-Spektrophotometer ab.

### **Messbereich**

Der HE4 EIA misst Konzentrationen zwischen 15 und 900 pM. Werden HE4-Konzentrationen jenseits des Messbereiches erwartet, so empfiehlt sich vor der Analyse eine Verdünnung der Proben mit dem HE4-Kalibrator A (siehe "Ergebnisberechnung mit verdünnten Proben").

### **Qualitätskontrolle**

Die HE4-Kontrolle 1 und 2 sind zur Validierung jeder Testserie zu verwenden. Die Bereiche für die erwarteten Ergebnisse sind auf den Etiketten der Fläschchen angegeben.

Die Ergebnisse des HE4-Tests gelten als gültig, wenn:

- die Mittelwerte der zweifachen Kontrollen innerhalb der angegebenen Bereiche liegen.
- die zweifachen Replikate der Kalibratoren B-F und Kontrollen nicht über einem VK von 15% liegen.
- sich die zweifachen Replikate des Kalibrators A (null) nicht um mehr als 0,06 OD-Einheiten voneinander unterscheiden.

Führt ein Test zu ungültigen Kalibrator- oder Kontrollergebnissen, so muss eine gründliche Überprüfung der Reagenzien, Pipettenpräzision, Leistung des Wasch- und Lesegeräts durchgeführt und die Analyse wiederholt werden. Jedes Labor kann ggf. auch eigene Serumpools auf verschiedenen Ebenen zubereiten, die als interne Kontrollen zur Sicherstellung der Testpräzision verwendet werden können.

### **Referenzmaterial**

Da kein allgemeines Referenzmaterial für HE4-Antigen verfügbar ist, werden die HE4 EIA-Kalibratorwerte nach einer Reihe interner Referenzstandards zugewiesen.

## **BERECHNUNG DER ERGEBNISSE**

Wird ein Mikrotiterplatten-Spektrophotometer mit integriertem Datenberechnungsprogramm verwendet, so halten Sie sich an das Handbuch des Spektrophotometers, und erstellen Sie ein Programm unter Verwendung der auf den jeweiligen Etiketten der HE4-Kalibratoren angegebenen Konzentration.

Für die automatische Berechnung von HE4-Ergebnissen empfiehlt sich eines der folgenden Verfahren:

- Fitting-Verfahren mit kubischer Spline-Kurve. Kalibrator A muss mit Wert 0 pM in die Kurve aufgenommen werden.
- Punkt-zu-Punkt-Interpolation. Kalibrator A muss mit Wert 0 pM in die Kurve aufgenommen werden.
- Fitting-Verfahren mit quadratischer Kurve. Kalibrator A muss mit Wert 0 pM in die Kurve aufgenommen werden.

**HINWEIS:** Vierparametrische Verfahren oder lineare Regressionsverfahren sind nicht geeignet.

Für die manuelle Auswertung wird eine Kalibrationskurve mittels Auftragen der Absorptionswerte (A) eines jeden HE4-Kalibrators gegen die entsprechende HE4-Konzentration (in pM) erstellt.

Die unbekanntenen HE4-Konzentrationen können hierauf anhand des mittleren Absorptionswertes jeder Patientenprobe von der Kalibrationskurve abgelesen werden.

### **Ergebnisberechnung mit verdünnten Proben**

Sollten Proben bei der ersten Analyse HE4-Werte über 900 pM liefern, so müssen die Proben 1:10 und 1:100 mit dem HE4-Kalibrator A verdünnt werden, um die exakte HE4-Konzentration der Proben zu erhalten.

- 1:10-Verdünnung = 50 µl Probe+ 450 µl HE4-Kalibrator A
- 1:100-Verdünnung = 50 µl der 1:10-Verdünnung + 450 µl HE4-Kalibrator A

Die HE4-Konzentration der unverdünnten Probe wird hierauf berechnet als:

- 1:10-Verdünnung: 10 x gemessener Wert
- 1:100-Verdünnung: 100 x gemessener Wert

### **ROMA (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm) zur Beurteilung des Risikos von epithelalem Ovarialkarzinom bei prä- und postmenopausalen Frauen mit Raumforderung im Becken**

#### ***Berechnung des Prognose-Index***

Ein Prognose-Index (PI) wird anhand folgender Gleichungen (1) und (2) separat für prämenopausale und postmenopausale Frauen berechnet. Zu Berechnung des PI werden die Testwerte aus dem HE4 EIA und ARCHITECT CA125 II bzw. CanAg CA125 EIA je nach menopausalem Status der Frau in die geeignete Gleichung des Algorithmus unten eingefügt.

#### **(1) Prämenopausale Frauen**

$$\text{Prognose-Index (PI)} = -12,0 + 2,38 \cdot \text{LN}[\text{HE4}] + 0,0626 \cdot \text{LN}[\text{CA125}]$$

## (2) Postmenopausale Frauen

Prognose-Index (PI) =  $-8,09 + 1,04 \cdot \ln[\text{HE4}] + 0,732 \cdot \ln[\text{CA125}]$

### **Berechnung des ROMA-Wertes**

Zur Berechnung des ROMA-Wertes (also der Vorhersagewahrscheinlichkeit) fügen Sie den für den Prognose-Index berechneten Wert in die Gleichung (3) ein:

$$(3) \text{ ROMA-Wert (\%)} = \text{EXP(PI)} / [1 + \text{EXP(PI)}] \cdot 100$$

Die folgenden Beispiele dienen zur Validierung der Berechnungen des PI- und ROMA-Werts:

Menopausaler Status	HE4 (pM)	CA125 (E/ml)	PI-Berechnung	PI	ROMA (%)
Prämenopausal	37,5	74,9	$-12,0 + (2,38 \cdot 3,624) + (0,0626 \cdot 4,316)$	-3,10388	4,29
Prämenopausal	386,6	21,8	$-12,0 + (2,38 \cdot 5,957) + (0,0626 \cdot 3,082)$	2,371517	91,5
Postmenopausal	66,7	11,3	$-8,09 + (1,04 \cdot 4,200) + (0,732 \cdot 2,425)$	-1,94683	12,5
Postmenopausal	383,1	22,7	$-8,09 + (1,04 \cdot 5,948) + (0,732 \cdot 3,122)$	0,381799	59,4

## **GRENZEN DES VERFAHRENS**

Patientinnen mit bestätigtem Ovarialkarzinom weisen möglicherweise HE4-Testwerte im selben Bereich wie gesunde Frauen auf. Bestimmte histologische Typen von Eierstockkrebs wie etwa muzinöse oder Keimzelltumoren exprimieren HE4 nur selten, daher eignet sich HE4 nicht zur Überwachung von Patientinnen mit bekanntem muzinösem oder Keimzellen-Ovarialkarzinom (7). Umgekehrt können Frauen mit nicht-maligner Erkrankung erhöhte HE4-Antigenkonzentrationen aufweisen. Daher ist die HE4-Konzentration kein absoluter Beweis dafür, ob ein Malignom vorhanden ist oder nicht, und der HE4-Test sollte nicht beim Krebs-Screening eingesetzt werden. Die Ergebnisse des Tests dürfen nur in Zusammenhang mit anderen Untersuchungen und Verfahren zur Diagnose und Behandlung von Patienten interpretiert werden. Der HE4-Test ist kein Ersatz für etablierte klinische Untersuchungen.

Der ROMA wurde nicht für folgende Patientengruppen validiert: Patientinnen mit vorangegangener Malignombehandlung, Patientinnen mit laufender Chemotherapiebehandlung und Patientinnen unter 18 Jahren.

Die mathematische Funktion, die als Malignitätsrisiko-Algorithmus (ROMA - Risk of Ovarian Malignancy Algorithm) bezeichnet wird, hängt vom prä- bzw. postmenopausalen Zustand einer Frau ab. Der prä- bzw. postmenopausale Zustand basiert auf der anhand von Information aus der klinischen Beurteilung und Anamnese definierten Ovarialfunktion. Der ROMA-Wert berücksichtigt weder Alter, Familiengeschichte, klinische Befunde noch Ergebnisse aus der Bildgebung und muss gemeinsam mit diesen Parametern interpretiert werden.

Werden der HE4 EIA- und/oder CA125-Test nicht gemäß Anleitung durchgeführt oder kommt es zu Fehlern bei der Ergebnisberechnung, so kann dies zu einer falschen Risikobeurteilung und unangemessenen Behandlung der Patientin führen. Vor allem falsch niedrige Testergebnisse könnten dazu führen, dass bei der Patientin ein geringes Risiko an epithelalem Ovarialkarzinom festgestellt und diese in der Folge einer unzureichend spezialisierten Behandlung zugewiesen wird. Eine Verwendung der Testergebnisse ohne Berücksichtigung der anderen Laborergebnisse, Bildgebungsuntersuchungen und klinischen Beurteilung kann daher riskant sein.

Anti-Reagens-Antikörper (humaner Anti-Maus-Antikörper (HAMA) oder heterophile Antikörper) in der Patientenprobe können den Test trotz der spezifischen Blocker in den Puffern fallweise beeinflussen.

**Der Test muss in einer temperaturkontrollierten Umgebung durchgeführt werden, da eine Inkubation bei Temperaturen über dem empfohlenen Bereich von 20 - 25°C zu falsch niedrigen Ergebnissen führen kann.**

## ERWARTETE WERTE

Die Verteilung der in 1147 Proben bestimmten HE4-Werte ist aus folgender Tabelle ersichtlich:

Verteilung von HE4-Testwerten					
	Anzahl der Personen	0 - 150 pM	150,1 - 300 pM	300,1 - 500 pM	> 500 pM
<b>SCHEINBAR GESUND</b>					
Weibliche (prämenopausal)	76	72	3	0	1
Weibliche (postmenopausal)	103	97	5	0	1
<b>GUTARTIGE ZUSTÄNDE</b>					
Schwangerschaft	22	21	1	0	0
Gutartige gynäkologische Erkrankung	347	324	18	1	4
Andere gutartige Erkrankungen	108	82	8	7	11
Hypertonie/kong. Herzinsuffizienz	96	75	16	2	3
<b>KARZINOM</b>					
Ovarialkarzinom	127	27	18	21	61
Mammakarzinom	46	40	4	2	0
Lungenkarzinom	50	29	15	6	0
Endometriumkarzinom	116	86	15	4	11
Gastrointestinales Karzinom	56	47	8	0	1

In dieser Studie wiesen 94,4% der gesunden weiblichen Personen einen HE4-Testwert von 150 pM bzw. darunter auf. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Referenzwert für die Zielpopulation bestimmt.

## Überwachung des Krankheitszustandes bei Patientinnen mit diagnostiziertem Ovarialkarzinom

Die Effektivität des HE4 EIA als Hilfe bei der Überwachung des Krankheitszustandes von Patientinnen mit diagnostiziertem Ovarialkarzinom wurde mittels Evaluierung der Änderungen der HE4-Konzentration in seriellen Serumproben von 80 Patientinnen im Vergleich zu Änderungen beim Krankheitszustand ermittelt. Es wurde eine Studie mit insgesamt 354 Beobachtungspaaren und einer durchschnittlichen Anzahl von 4,4 Beobachtungen pro Patientin durchgeführt. Eine positive HE4-Änderung wurde als Erhöhung des Wertes um mindestens 25% im Vergleich zum vorhergehenden Testwert definiert. Dieser Änderungsgrad berücksichtigt die Testvariabilität sowie biologische Variabilität. 60% bzw. 76 von 126 Patientenproben mit einer positiven Änderung korrelierten mit der Krankheitsprogression, während 75% bzw. 171 von 228 seriellen Patientenproben ohne signifikante Änderungen des HE4-Werts mit keiner Progression korrelierten. Die Gesamtübereinstimmung betrug 70% (bzw. 247/354). Folgende Tabelle zeigt die Daten in einem 2x2-Format.

<b>Änderung des Krankheitszustandes pro Folgepaar</b>			
<b>Erhöhung der HE4-Konzentration</b>	<b>Progression</b>	<b>Keine Progression</b>	<b>Gesamt</b>
>25%	76	57	133
≤25%	50	171	221
Gesamt	126	228	354

Folgende Tabelle zeigt die Verteilung pro Patientin. 93% bzw. 54 von 58 Serum-Sets/Patientin mit einer positiven Änderung korrelierten mit der Krankheitsprogression, während 32% bzw. 7 von 22 Serum-Sets ohne signifikante Änderungen des HE4-Werts mit keiner Progression korrelierten. Die Gesamtübereinstimmung in dieser Studie betrug 76 % (bzw. 61/80).

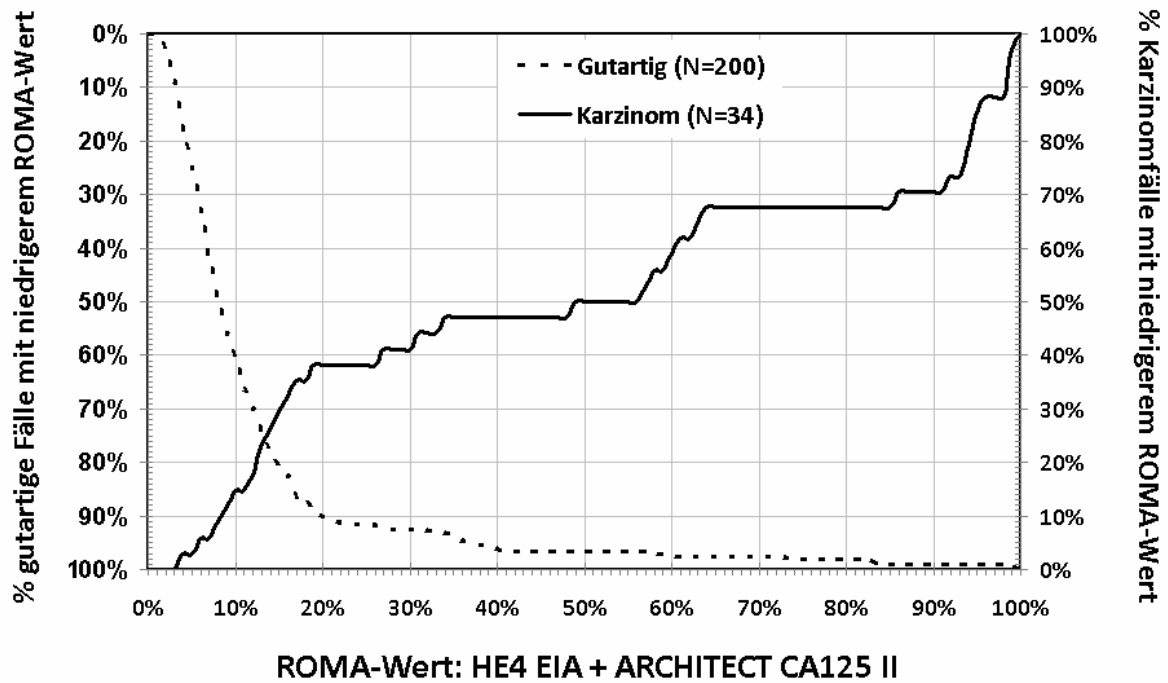
<b>Änderung des Krankheitszustandes pro Patient</b>			
<b>Erhöhung der HE4-Konzentration</b>	<b>Progression</b>	<b>Keine Progression</b>	<b>Gesamt</b>
>25%	54	15	69
≤25%	4	7	11
Gesamt	58	22	80

### **Risikobeurteilung bei Patientinnen mit Raumforderung im Becken**

Die Effektivität des HE4 EIA in Kombination mit CA125 (ARCHITECT CA125 II Assay oder CanAg CA125 EIA) zur Beurteilung des Risikos von epithelalem Ovarialkarzinom bei Patientinnen mit Raumforderung im Becken wurde im Rahmen einer prospektiven, multizentrischen, doppelblinden klinischen Studie bestimmt. Es wurde ein Algorithmus (ROMA, siehe Seite 11) zur Beurteilung des Risikos von epithelalem Ovarialkarzinom erstellt. Der Algorithmus berechnet eine Vorhersagewahrscheinlichkeit für die Entdeckung eines epithelialen Ovarialkarzinoms beim chirurgischen Eingriff. Insgesamt wurden 502 Patienten in die prospektive Studie aufgenommen. Die Vorhersagewahrscheinlichkeit für Ovarialkarzinom sowie die Fähigkeit zur Unterteilung in eine Niedrigrisiko- und eine Hochrisikogruppe wurden auf Basis der ROMA-Werte bestimmt. Die Summenhäufigkeitsverteilung der ROMA-Werte für gutartige bzw. Ovarialkrebsfälle einschließlich möglicher niedrig-maligner Tumoren (LMP) anhand des Algorithmus ist in den Abbildungen 1 und 2 für die Kombination aus HE4 EIA und ARCHITECT CA125 II Assay und in Abb. 3 und 4 für die Kombination aus HE4 EIA und CanAg CA125 EIA dargestellt. Die Häufigkeitsverteilungsdiagramme zeigen die Verteilung von Patientinnen mit gutartiger Erkrankung und epithelalem Ovarialkarzinom (einschl. LMP) bei verschiedenen Trennpunkten des ROMA-Werts.

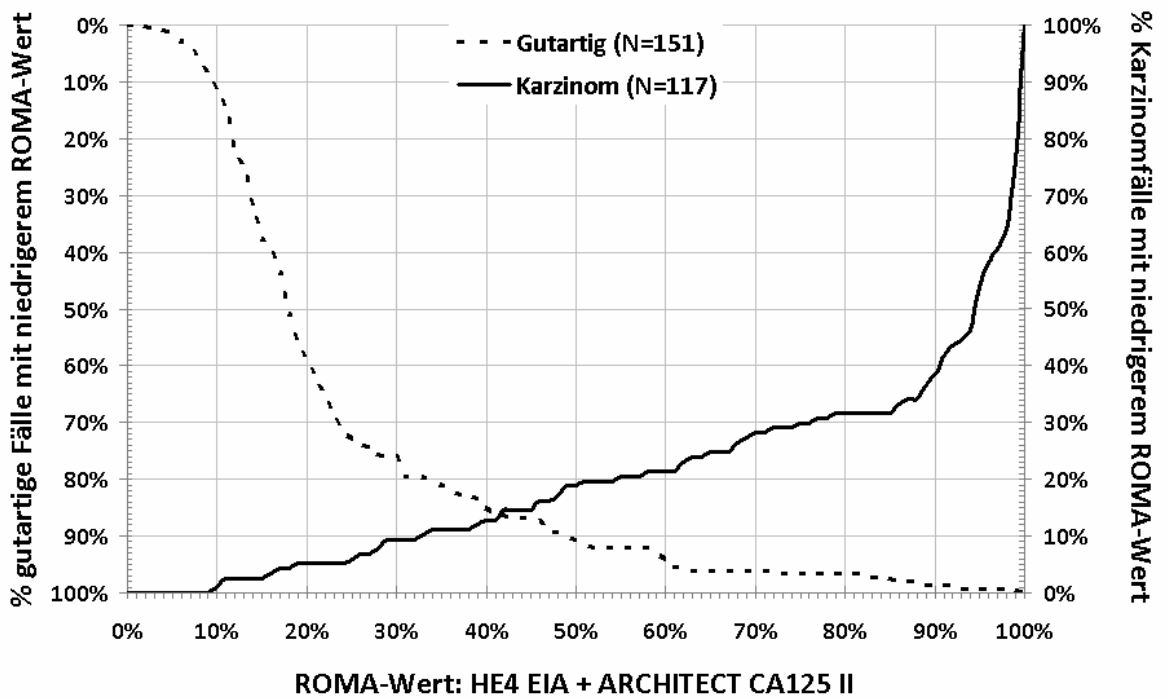
**Abb.1** Summenhäufigkeitsverteilung von ROMA-Werten für **prämenopausale** Frauen.

Kombination HE4 EIA + ARCHITECT CA125 II Assay



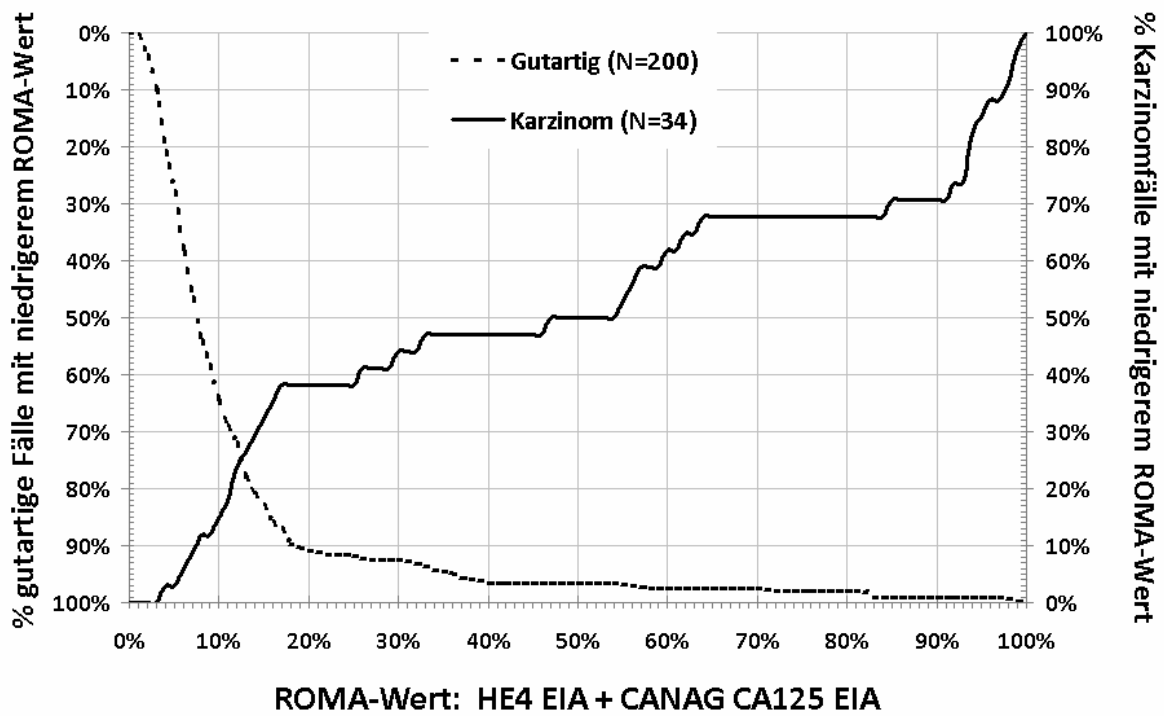
**Abb.2** Summenhäufigkeitsverteilung von ROMA-Werten für **postmenopausale** Frauen.

Kombination HE4 EIA + ARCHITECT CA125 II Assay



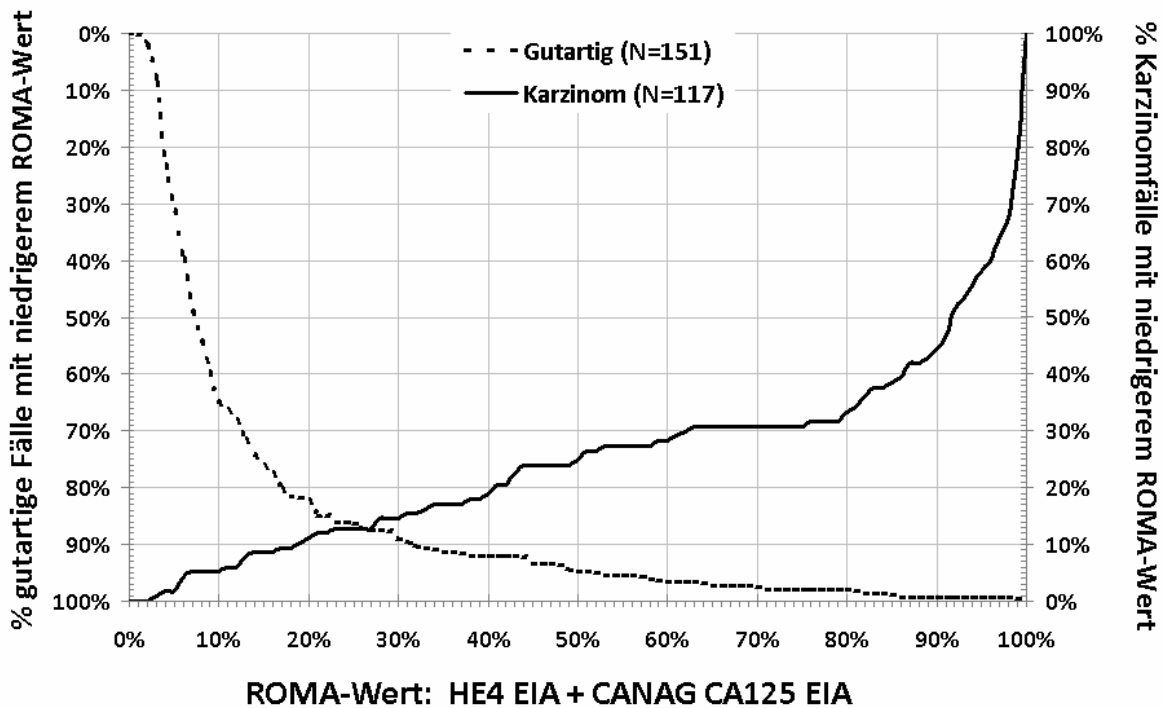
**Abb. 3** Summenhäufigkeitsverteilung von ROMA-Werten für prämenopausale Frauen.

Kombination HE4 EIA + CanAg CA125 EIA



**Abb. 4** Summenhäufigkeitsverteilung von ROMA-Werten für postmenopausale Frauen.

Kombination HE4 EIA + CanAg CA125 EIA



### **Stratifizierung in Niedrigrisiko- und Hochrisikogruppen**

Ausgehend vom Malignitätsrisiko-Algorithmus (ROMA) wurden Frauen in Risikogruppen für die Entdeckung eines epithelialen Ovarialkarzinoms stratifiziert. Folgende Trennpunkte wurden für eine Spezifität von 75% für die Kombination HE4 EIA und ARCHITECT CA125 II Assay verwendet:

#### **Prämenopausale Frauen**

ROMA-Wert  $\geq 13,1\%$  = Hohes Risiko für Entdeckung eines epithelialen Ovarialkarzinoms

ROMA-Wert  $< 13,1\%$  = Geringes Risiko für Entdeckung eines epithelialen Ovarialkarzinoms

#### **Postmenopausale Frauen**

ROMA-Wert  $\geq 27,7\%$  = Hohes Risiko für Entdeckung eines epithelialen Ovarialkarzinoms

ROMA-Wert  $< 27,7\%$  = Geringes Risiko für Entdeckung eines epithelialen Ovarialkarzinoms

Die Risikostratifizierung aller Patientinnen mit Adnexbefund in hohes Risiko für epitheliales Ovarialkarzinom anhand der ROMA-Werte bei einer Spezifität von 75% ist in Tabelle 1 dargestellt (einschließlich der Risikostratifizierung für die separaten Gruppen prämenopausaler bzw. postmenopausaler Patientinnen). Die Sensitivität für die Stratifizierung von Patientinnen mit epitheliales Ovarialkarzinom Stadium I-IV in die Hochrisikogruppe betrug 94% bei einer Spezifität von 75%, sodass 75% der Frauen mit benigner Raumforderung im Becken der risikoarmen Gruppe zugewiesen wurden. Die positiven und negativen Vorhersagewerte lagen bei 58 % bzw. 97%.

**Tabelle 1:** Risikostratifizierung von Patientinnen mit Adnexbefund in hohes Risiko für epitheliales Ovarialkarzinom (EOC) unter Verwendung der Kombination HE4 EIA und ARCHITECT CA125 II Assay zur Berechnung des ROMA-Wertes.

Prämenopausaler Trennpunkt zur Stratifizierung in Hochrisikogruppe bei 75% Spezifität  $\geq 13,1\%$  ;  
postmenopausaler Trennpunkt zur Stratifizierung in Hochrisikogruppe bei 75% Spezifität  $\geq 27,7\%$ .

	<b>Prämenopausale Frauen Az. = 234</b>	<b>Postmenopausale Frauen Az. = 268</b>	<b>Prä- und postmenopausale Frauen zusammen Az. = 502</b>
<b>EOC Stadium I-IV &amp; LMP zusammen</b>	26/34 (76%)	108/117 (92%)	134/151 (89%)
<b>Möglicher niedrig- maligner Tumor</b>	10/16 (63%)	3/6 (50%)	13/22 (59%)
<b>EOC Stadium I-II</b>	6/7 (86%)	24/28 (86%)	30/35 (86%)
<b>EOC Stadium I-IIIC<sup>a</sup></b>	7/8 (88%)	35/39 (90%)	42/47 (89%)
<b>EOC Stadium I-IV</b>	16/18 (89%)	105/111 (95%)	121/129 (94%)

<sup>a</sup>Epitheliales Ovarialkarzinom Stadium I – IIb & Stadium IIIC (Omentum negativ, Lymphknoten positiv)

Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede bei der Sensitivität und Spezifität des ROMA-Wertes mit Werten des ARCHITECT CA125 II bzw. CanAg CA125 EIA zur Unterscheidung zwischen gutartigen Erkrankungen und epitheliales Ovarialkarzinom festgestellt. Die Sensitivität für die

Stratifizierung von Patientinnen mit epitheliales Ovarialkarzinom Stadium I-IV in die Hochrisikogruppe betrug bei der Kombination CanAg CA125 EIA + HE4 EIA 93%. Die positiven und negativen Vorhersagewerte lagen bei 57 % bzw. 97%.

**Bitte beachten Sie, dass je nach verwendetem CA125-Assay verschiedene Trennpunkte zur Risikostratifizierung in Niedrigrisiko- und Hochrisikogruppen gewählt werden müssen. Folgende Trennpunkte wurden zur Bereitstellung einer Spezifität von 75% für die Kombination CanAg CA125 EIA + HE4 EIA verwendet:**

**Prämenopausale Frauen**

ROMA-Wert  $\geq 12,5\%$  = Hohes Risiko für Entdeckung eines epithelialen Ovarialkarzinoms

ROMA-Wert  $< 12,5\%$  = Geringes Risiko für Entdeckung eines epithelialen Ovarialkarzinoms

**Postmenopausale Frauen**

ROMA-Wert  $\geq 14,4\%$  = Hohes Risiko für Entdeckung eines epithelialen Ovarialkarzinoms

ROMA-Wert  $< 14,4\%$  = Geringes Risiko für Entdeckung eines epithelialen Ovarialkarzinoms

Die falsch-negativen Raten und Prozentsätze der Stratifizierung von Patientinnen mit Adnexbefund in niedriges Risiko für epitheliales Ovarialkarzinom anhand des ROMA-Wertes bei einer Spezifität von 75% sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die Stratifizierung in Niedrig- und Hochrisikogruppe für epitheliales Ovarialkarzinom anhand des ROMA-Algorithmus bei einer Spezifität von 75% ergab eine falsch-negative Gesamtrate von 6,2%. 3% aller in die Niedrigrisikogruppe stratifizierten Fälle wiesen ein epitheliales Ovarialkarzinom auf.

**Tabelle 2.** Falsch-negative Rate (FNR) und Prozentsatz von epithelialen Ovarialkarzinomen aller Fälle mit Stratifizierung in die Niedrigrisikogruppe anhand des ROMA-Wertes bei Patientinnen mit Adnexbefund. Prämenopausaler Trennpunkt für Stratifizierung in Niedrigrisikogruppe bei 75% Spezifität  $< 13,1\%$ ; postmenopausaler Trennpunkt für Stratifizierung in Niedrigrisikogruppe bei 75% Spezifität  $< 27,7\%$ .

Epitheliales Ovarialkarzinom <sup>a</sup>	Falsch-negative Rate (FNR)			% Karzinome in Niedrigrisikogruppe		
	Falsch negativ	Gesamt	FNR <sup>b</sup>	Falsch negativ	Echt positiv	(% ) <sup>c</sup>
	Karzinome	Karzinome		Karzinome	Gutartig	
Prämenopausal	2	18	11,1%	2	149	1,3%
Postmenopausal	6	111	5,4%	6	113	5,0%
Alle Patientinnen	8	129	6,2%	8	262	3,0%

<sup>a</sup> Mögliche niedrig-maligne Tumore (LMP) nicht berücksichtigt; <sup>b</sup> FNR = Falsch- negativ/(echt-positiv + falsch-negativ); <sup>c</sup> Falsch-negativ/(echt-negativ + falsch-negativ)

## LEISTUNGSDATEN

### Präzision

Die Präzision des HE4 entspricht einem Gesamt-VK von  $\leq 15\%$ . Es wurde eine Studie gemäß Richtlinie EP5-A2 der National Committee for Clinical Laboratory Standards NCCLS (CLSI) durchgeführt (22). Ein Panel aus 4 Serumproben in zweifachen Replikaten wurde mit 2 Reagenschargen zu zwei separaten Zeitpunkten pro Tag für den Zeitraum von 20 Tagen getestet. Die Daten aus dieser Studie sind unten zusammengefasst.\*

Probe	Reagenscharge	Az.	Mittlere Konz. (pM)	SA in der Serie (pM)	VK in der Serie (%)	SA gesamt (pM)	VK gesamt (%)
1	1	80	50,3	0,81	1,6	2,34	4,7
	2	80	48,0	0,69	1,4	2,17	4,5
2	1	80	75,3	1,81	2,4	2,96	3,9
	2	80	72,4	1,73	2,4	4,70	6,5
3	1	80	255	5,68	2,2	12,0	4,7
	2	80	242	5,21	2,2	12,8	5,3
4	1	80	407	6,22	1,5	14,5	3,6
	2	80	385	8,71	2,3	21,6	5,6

\*Repräsentative Daten; die Ergebnisse der einzelnen Labors unterscheiden sich möglicherweise von diesen Daten.

### Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze des HE4 EIA liegt bei  $\leq 15$  pM. Die Nachweisgrenze (NG) entspricht der oberen Grenze des 95%-Konfidenzintervalls und stellt die niedrigste, von Null unterscheidbare HE4-Antigenkonzentration dar. Das Design der NG-Versuche basiert auf der NCCLS-Richtlinie EP17-A (23). Im Rahmen einer Studie wurden der HE4-Kalibrator A (null) und 4 Proben von gesunden Personen mit Probenverdünner auf 5 pM verdünnt und in 24 Replikaten pro Versuchsreihe in 4 Versuchsreihen an 2 separaten Tagen getestet. Die Nachweisgrenze wurde folgendermaßen berechnet:

$$NG \text{ (pM)} = 5,0 \text{ pM} \times (1,65 \times SA_0 + 1,65 \times SA_9) / (OD_5 - OD_0)$$

Es ergab sich eine Nachweisgrenze von  $\leq 2,5$  pM für das HE4 EIA-Kit.

### Funktionelle Sensitivität

Die funktionelle Sensitivität des HE4 EIA liegt bei  $\leq 25$  pM. Die funktionelle Sensitivität eines Analyten entspricht derjenigen Konzentration, die mit einem VK von 20% gemessen werden kann. Das Design der Versuche zur Bestimmung der funktionellen Sensitivität basiert auf der NCCLS-Richtlinie EP5-A2 (22). Im Rahmen einer Studie wurde ein Sensitivitätspanel mit 5 Bestandteilen in 4 Replikaten in 2 Versuchsreihen an 20 separaten Tagen mit 2 Reagenschargen getestet. Es ergab sich eine funktionelle Sensitivität von  $< 5$  pM für den HE4 EIA.

## Wiederfindung

Die mittlere Wiederfindung des HE4 EIA beträgt  $100 \pm 15\%$ . Im Rahmen einer Studie wurden Verdünnungen einer Patientenprobe mit bekannten HE4-Konzentrationen normalen menschlichen Serumproben hinzugefügt. Die HE4-Konzentration wurde anhand des HE4 EIA bestimmt und die sich daraus ergebende Wiederfindung in % berechnet. Repräsentative Daten aus dieser Studie sind in folgender Tabelle zusammengefasst.\*

Probe	Endogener Assay-Wert (pM)	Hinzugefügtes HE4-Antigen (pM)	Beobachteter HE4-Testwert (pM)	Wiederfindung in % **
1	44,6	15	60,6	102
		75	96,0	89
		350	397	96
		650	686	96
2	41,1	15	55,7	99
		75	95,2	91
		350	400	98
		650	657	93
3	40,6	15	54,0	97
		75	95,1	91
		350	403	99
		650	680	96
4	46,6	15	63,3	103
		75	106	97
		350	410	99
		650	645	90
5	40,2	15	56,5	102
		75	102	98
		350	402	99
		650	676	96

Die durchschnittliche Wiederfindung der 4 o.g. separaten versetzten Konzentrationen betrug 97%.

\*Repräsentative Daten; die Ergebnisse der einzelnen Labors unterscheiden sich möglicherweise von diesen Daten.

\*\*% Wiederfindung = Beobachtete HE4-Konzentration (pM) / Endogene HE4-Konz. (pM) + hinzugefügtes HE4 (pM)

## High-Dose-Hook

Der High-Dose-Hook-Effekt bezeichnet die falsch-niedrige Bestimmung von Analyten, die in sehr hoher Konzentration in Proben vorkommen. Für den HE4 EIA wurde bei Proben mit bis zu 300 000 pM nativem HE4-Antigen kein High-Dose-Hook-Effekt beobachtet.

## Verdünnungslinearität

Die mittlere Verdünnungslinearität des HE4 EIA beträgt  $100 \pm 15\%$ . Eine Studie im Design auf Basis der NCCLS (CLSI)-Richtlinie EP6-A (24) wurde für den HE4 EIA durchgeführt. Serumproben mit erhöhten HE4-Werten wurden mit HE4-Kalibrator A (null) verdünnt. Die HE4-Konzentration wurde für jede Verdünnung bestimmt und die Wiederfindung in % berechnet. Repräsentative Daten aus dieser Studie sind in folgender Tabelle zusammengefasst.\*

Probe	Endgültiger Verdünnungsfaktor	Ergebniswert (pM)	Erwartungswert (pM)	Wiederfindung in % ** (%)
1	Unverdünnt	889,6	889,6	100
	1:1,25	720,0	711,7	101
	1:1,7	543,1	533,8	101
	1:2	450,6	444,8	101
	1:2,5	345,9	355,8	97,2
	1:5	183,6	177,9	103
	1:10	97,6	89,0	109
	1:20	49,1	44,5	110
	1:40	25,9	22,2	116
2	Unverdünnt	697,0	697,0	100
	1:1,25	544,9	557,6	97,7
	1:1,7	429,8	418,2	103
	1:2	361,1	348,5	104
	1:2,5	275,9	278,8	99,0
	1:5	134,5	139,4	96,5
	1:10	74,4	69,7	107
	1:20	39,1	34,9	112
	1:40	21,0	17,4	120
3	Unverdünnt	680,2	680,2	100
	1:1,25	499,7	544,2	91,8
	1:1,7	354,4	408,1	86,8
	1:2	296,7	340,1	87,2
	1:2,5	247,2	272,1	90,9
	1:5	124,9	136,0	91,8
	1:10	61,7	68,0	90,7
	1:20	34,6	34,0	102
	1:40	18,4	17,0	109

Durchschnittliche Wiederfindung der drei o.g. verdünnten Proben = 101%

\*Repräsentative Daten; die Ergebnisse der einzelnen Labors unterscheiden sich möglicherweise von diesen Daten.

\*\*% Wiederfindung= erhaltene HE4-Konzentration x Verdünnungsfaktor / Unverdünnte HE4-Konzentration.

### Analytische Spezifität

Die mittlere Assay-Spezifität des HE4 EIA beträgt  $100 \pm 15\%$ . Im Rahmen von Wiederfindungsstudien wurden Seren mit den folgenden Verbindungen in den angegebenen Konzentrationen mit Kontrollseren verglichen. Das Design der Interferenzversuche basiert auf der NCCLS-Richtlinie EP7-A (25). Folgende Substanzen und Konzentrationen wurden getestet, und es wurde keine Interferenz mit dem Test festgestellt.

Endogene Interferenz mit Seren	Testkonzentration
Triglyceride	30 mg/ml
Bilirubin	0,2 mg/ml
Hämoglobin	10 mg/ml
Gesamtprotein	120 mg/ml

<b>Interferenz mit Chemotherapeutika</b>	<b>Testkonzentration</b>
Carboplatin	500 µg/ml
Cisplatin	165 µg/ml
Clotrimazol	0,3 µg/ml
Cyclophosphamid	500 µg/ml
Dexamethason	10 µg/ml
Doxorubicin	1,16 µg/ml
Leucovorin	2,68 µg/ml
Melphalan	2,8 µg/ml
Methotrexat	45 µg/ml
Paclitaxel	3,5 ng/ml

### **Potenziell interferierende klinische Zustände**

Anhand von Proben mit HAMA und Rheumafaktor (RF) wurde die Spezifität des HE4 EIA weiter untersucht. Für fünf HAMA-positive und 5 RF-positive Proben wurde die prozentuale Wiederfindung mittels Versetzung der einzelnen Proben mit HE4-Antigen (ca. 50 und 450 pM) ermittelt. Die mittleren Ergebniswerte für die Wiederfindung sind in folgender Tabelle zusammengefasst.\*

<b>Klinischer Zustand</b>	<b>Anzahl der Proben</b>	<b>Mittlere Wiederfindung in %</b>
HAMA	5	101
RF	5	95

\*Repräsentative Daten; die Ergebnisse der einzelnen Labors unterscheiden sich möglicherweise von diesen Daten.

### **GARANTIE**

Die hier aufgeführten Leistungsdaten wurden anhand des angegebenen Testverfahrens ermittelt. Jegliche nicht von Fujirebio Diagnostics empfohlenen Ver- und Abänderungen des Verfahrens können die Ergebnisse beeinflussen. In diesem Falle lehnt Fujirebio Diagnostics jegliche ausdrückliche, konkludente bzw. gesetzliche Gewährleistung, einschließlich der konkludenten Gewährleistung hinsichtlich Markt- und Gebrauchstauglichkeit, ab.

## QUELLENANGABE

1. Israeli O, Goldring-Aviram A, Rienstein S, Ben-Baruch G, Korach J, Goldman B, Friedman E. In silico chromosomal clustering of genes displaying altered expression patterns in ovarian cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;160:35-42.
2. Bouchard D, Morisset D, Bourbonnais Y, Tremblay GM. Proteins with whey-acidic-protein motifs and cancer. *Lancet Oncol* 2006;7:167-174.
3. Bingle L, Singleton V, Bingle CD. The putative ovarian tumour marker gene HE4 (wfdc2), is expressed in normal tissues and undergoes complex alternative splicing to yield multiple protein isoforms. *Oncogene* 2002;21:2768-2773.
4. Kirchhoff C, Habben I, Ivell R, et al. A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular protease inhibitors. *Biol Reprod* 1991;45:350-357.
5. Kirchhoff C. Molecular characterization of epididymal proteins. *Rev Reprod* 1998;3:86-95.
6. Galgano MT, Hampton GM, Frierson HF Jr. Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues. *Mod Pathol* 2006;19:847-853.
7. Drapkin R, von Horsten HH, Lin Y, Mok SC, Crum CP, Welch WR, Hecht JL. Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res* 2005;65:2162-2169.
8. Hough CD, Sherman-Baust CA, Pizer ES, Montz FJ, Im DD, Rosenshein NB, Cho KR, Riggins GJ, Morin PJ. Large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer. *Cancer Res* 2000;60:6281-6287.
9. Schummer M, Ng WV, Bumgarner RE, Nelson PS, Schummer B, Bednarski DW, Hassell L, Baldwin RL, Karlan BY, Hood L. Comparative hybridization of an array of 21,500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas. *Gene* 1999;238:375-385.
10. Gilks CB, Vanderhyden BC, et al. Distinction between serous tumors of low malignant potential and serous carcinomas based on global mRNA expression profiling. *Gynecol Oncol* 2005;96:684-694.
11. Hellstrom I, Raycraft J, et al. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian cancer. *Cancer Res* 2003;63:3695-3700.
12. Moore RM, Brown AK, Miller MC, et al. The use of multiple novel tumor markers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol* 2008;108:402-408.
13. Bray F, Loos AH, Tognazzo S, La Vecchia C. Ovarian cancer in Europe: Cross-sectional trends in incidence and mortality in 28 countries, 1953-2000. *Int J Cancer* 2005;113(6):977-90.
14. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. Ovarian Cancer: Screening, treatment and follow-up. *Gynecol Oncol* 1994;55:S4-14.
15. ACOG Practice Bulletin. Clinical Management Guideline for Obstetrician-Gynecologists. Management of Adnexal Masses. *Obstet Gynecol* 2007;110:201-213.
16. Finkler NJ, Benacerraf B, Lavin PT, Wojciechowski C, Knapp RC. Comparison of serum CA 125, clinical impression and ultrasound in the preoperative evaluation of ovarian masses. *Obstet Gynecol* 1988;72:659-64.
17. Maggino T, Gadducci A, D'Addario V, et al. Prospective Multicenter Study on CA 125 in postmenopausal pelvic masses. *Gynecol Oncol* 1994;54:117-123.

18. Roman LD, Muderspach LI, Stein SM, et al. Pelvic Examination, Tumor marker level, and Gray-Scale and Doppler Sonography in the prediction of pelvic cancer. *Obstet Gynecol* 1997;89:493-500.
19. DePriest PD, Shenson D, Fried A, et al. A morphology index based on sonographic findings in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1993;51:7-11.
20. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Exposure to Blood Borne Pathogens.
21. US Department of Health and Human Services: Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories: 4th Edition Washington DC: US Government Printing Office May, 1999.
22. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI), Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline – Second Edition. EP5-A2 (2004).
23. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI), Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline. EP17-A (2004).
24. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI), Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. EP6-A.
25. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI), Interference Testing in Clinical Chemistry, Approved Guideline, EP7-A.

# Protokollblatt

## HE4 EIA REF 404-10

Bereiten Sie die Bestandteile unmittelbar vor der Verwendung zu. Befolgen Sie die Wasch- und Inkubationsbedingungen gemäß Anweisungen.

**Bitte beachten: Der Test darf ausschließlich bei Temperaturen zwischen 20-25°C durchgeführt werden, um präzise Ergebnisse zu gewährleisten.**

Schritt	Fläschchen/Platte	Verfahren																																							
1. HE4-Kalibratoren zubereiten	CAL HE4 B, C, D, E, F	Geben Sie 1 ml destilliertes oder entionisiertes Wasser in jedes Fläschchen und mischen Sie vorsichtig. Mindestens 15 Minuten stehen lassen. HINWEIS: Die exakte Konzentration der einzelnen Kalibratoren ist auf dem Etikett angegeben. Haltbarkeit nach Rekonstitution: 4 Wochen bei 2-8°C.																																							
HE4-Kontrollen zubereiten	CONTROL HE4 1, 2																																								
Waschlösung zubereiten	WASHBUF 25X																																								
Tracer-Arbeitslösung zubereiten	CONJ Anti-HE4 DIL CONJ																																								
		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Az. Streifer</th> <th>Tracer, MP-Anti-HE4 (µL)</th> <th>Tracer-Verdünnungsmittel (ml)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>50</td><td>1</td></tr> <tr><td>2</td><td>100</td><td>2</td></tr> <tr><td>3</td><td>150</td><td>3</td></tr> <tr><td>4</td><td>200</td><td>4</td></tr> <tr><td>5</td><td>250</td><td>5</td></tr> <tr><td>6</td><td>300</td><td>6</td></tr> <tr><td>7</td><td>350</td><td>7</td></tr> <tr><td>8</td><td>400</td><td>8</td></tr> <tr><td>9</td><td>450</td><td>9</td></tr> <tr><td>10</td><td>500</td><td>10</td></tr> <tr><td>11</td><td>550</td><td>11</td></tr> <tr><td>12</td><td>600</td><td>12</td></tr> </tbody> </table>	Az. Streifer	Tracer, MP-Anti-HE4 (µL)	Tracer-Verdünnungsmittel (ml)	1	50	1	2	100	2	3	150	3	4	200	4	5	250	5	6	300	6	7	350	7	8	400	8	9	450	9	10	500	10	11	550	11	12	600	12
Az. Streifer	Tracer, MP-Anti-HE4 (µL)	Tracer-Verdünnungsmittel (ml)																																							
1	50	1																																							
2	100	2																																							
3	150	3																																							
4	200	4																																							
5	250	5																																							
6	300	6																																							
7	350	7																																							
8	400	8																																							
9	450	9																																							
10	500	10																																							
11	550	11																																							
12	600	12																																							
2. Waschen	MICROPLA	Waschen Sie jede Vertiefung 1x mit Waschlösung. Verwenden Sie ein manuelles oder automatisches Waschgerät.																																							
3. Kalibratoren, Kontrolle und Proben hinzufügen	CAL HE4 A, B, C, D, E, F CONTROL HE4 1, 2	25 µL in jede Vertiefung																																							
4. Biotin-Anti-HE4 hinzufügen	BIOTIN Anti-HE4	100 µL in jede Vertiefung																																							
5. Inkubieren	MICROPLA	1 Stunde bei 20-25°C schütteln																																							
6. Waschen	MICROPLA	Waschen Sie jede Vertiefung 3x mit Waschlösung. Verwenden Sie ein manuelles oder automatisches Waschgerät.																																							
7. Tracer-Arbeitslösung hinzufügen	TRACER WORKING SOLUTION	100 µL in jede Vertiefung																																							
8. Inkubieren	MICROPLA	1 Stunde bei 20-25°C schütteln																																							
9. Waschen	MICROPLA	Waschen Sie jede Vertiefung 6x mit Waschlösung. Verwenden Sie ein manuelles oder automatisches Waschgerät.																																							
10. TMB-MP-Substrat hinzufügen	SUBS TMB	100 µL in jede Vertiefung																																							
11. Inkubieren	MICROPLA	30 Min. bei 20-25°C schütteln																																							
12. Absorption ablesen	MICROPLA	620 nm																																							
Alt.12 Stopplösung hinzufügen	STOP	100 µL in jede Vertiefung																																							
Alt.13 Mischen	MICROPLA	Bei 20-25°C vermischen lassen																																							
Alt.14 Absorption ablesen	MICROPLA	Lesen Sie innerhalb von 15 Min. bei 405 nm ab																																							



---

Fujirebio Diagnostics AB  
Majnabbeterminalen  
SE-414 55 Göteborg  
Sweden  
Phone + 46 31-85 70 30  
Fax + 46 31-85 70 40  
info@fdab.com  
www.fdi.com