



HE4 EIA

Réf. prod. 404-10

Mode d'emploi

Trousse de dosage enzymo-immunométrique

2008-09

Pour 96 tests

USAGE PREVU

Le test HE4 EIA est un dosage enzymo-immunométrique destiné à l'analyse quantitative des HE4 dans le sérum humain.

Il doit servir d'outil diagnostique pour contrôler la réponse thérapeutique des patientes atteintes d'un cancer épithélial invasif de l'ovaire. Une série de tests permettant de doser les valeurs HE4 chez les patientes doit être utilisée en parallèle avec les autres méthodes cliniques de suivi du cancer de l'ovaire.

Le test HE4 EIA est également destiné à compléter les tests ARCHITECT CA 125 II ou CanAg CA125 EIA pour estimer le risque de cancer épithélial de l'ovaire chez les femmes préménopausées ou postménopausées présentant des masses pelviennes. Les résultats doivent être interprétés en parallèle avec les autres méthodes, conformément aux directives de prise en charge clinique standard.

RESUME ET EXPLICATION DU DOSAGE

La protéine épидидymaire humaine de type 4 (HE4) appartient à la famille des protéines de lactosérum à quatre ponts disulfures ayant la propriété supposée d'inhiber la trypsine. Les protéines SLPI, élafine et PS20 (WDFC1) font également partie de cette famille (1, 2). Le gène HE4 code une protéine de 13 kD, bien que, dans sa forme mature glycosylée, elle approche les 20-25 kD, et se constitue d'un seul peptide contenant deux domaines à quatre ponts disulfures (3). La HE4, identifiée à l'origine dans l'épithélium épидидymaire distal, a été tout d'abord considérée comme un inhibiteur de protéase impliqué dans la maturation du sperme (4, 5). Depuis, son expression a été observée dans plusieurs tissus sains, dont l'épithélium respiratoire et l'épithélium du système reproducteur, ainsi que dans les tissus qui constituent les tumeurs ovariennes (6-10). Outre son expression au niveau cellulaire, la HE4 sécrétée est détectée en forte concentration dans le sérum des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire. Dans une étude de cas / contrôle avec des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire comparées à des patientes en bonne santé ou atteintes de pathologies bénignes, Hellström *et coll.* ont constaté que la HE4 permettait de détecter un cancer de l'ovaire avec une sensibilité de 67 % et une spécificité de 96 % (11). Dans une

étude ultérieure évaluant différents biomarqueurs connus du cancer de l'ovaire, la HE4 a présenté la sensibilité la plus élevée pour le dépistage du cancer de l'ovaire, notamment dans les stades précoces de la maladie. Dans cette étude, la combinaison de la HE4 et du CA 125 a permis de prévoir plus précisément les tumeurs malignes que chaque marqueur seul, avec une sensibilité de 76 % et une spécificité de 95 % (12).

Le cancer de l'ovaire est la quatrième cause de décès par cancer chez les femmes dans le monde. En Europe, le taux de mortalité s'étend de 3,6 à 9,3 pour 100 000 femmes (13). Les symptômes du cancer de l'ovaire, liés à la présence de tumeurs annexielles, sont souvent vagues et non spécifiques. L'objectif principal de l'évaluation diagnostique d'une tumeur annexielle est de déterminer si elle est bénigne ou maligne. On estime que 5 à 10 % des femmes aux États-Unis connaîtront une intervention chirurgicale au cours de leur vie pour suspicion de tumeur de l'ovaire, confirmée dans 13 à 21 pour cent de ces cas (14). L'American College of Obstetricians and Gynecologists Practice Bulletin publié en 2007 déclare : « *Les femmes atteintes de cancer de l'ovaire prises en charge par les médecins qui bénéficient d'une formation et d'une expérience poussées dans ce type de traitement, comme les oncologues spécialisés en gynécologie, ont des taux de survie globale supérieurs à celles traitées sans cette collaboration.* » (15). La plupart des tumeurs annexielles étant bénignes, il est primordial de déterminer avant l'intervention si une patiente est à risque élevé de tumeur maligne, pour lui assurer une prise en charge adaptée (15). Depuis le compte-rendu initial de 1988, un examen clinique, un dosage du CA 125 sérique et une échographie, ainsi qu'un tomodensitogramme, un examen IRM et une tomographie par émission de positrons représentent les moyens standard pour déterminer si une tumeur annexielle peut être suspectée de malignité (16). Bien que la littérature fourmille d'articles décrivant quelle modalité est la plus précise, l'association entre examen physique, dosage de CA 125 et imagerie offre la meilleure valeur prédictive positive (17-19). Pour améliorer la classification des patientes présentant des masses pelviennes, le test HE4 EIA peut être utilisé parallèlement aux tests ARCHITECT CA 125 II ou CanAg CA125 EIA pour estimer le risque que la patiente présente un cancer épithélial de l'ovaire. Les résultats doivent être interprétés en parallèle avec les autres méthodes, conformément aux directives de prise en charge clinique standard. Le test HE4 EIA peut également servir d'outil diagnostique pour contrôler la réponse thérapeutique des patientes atteintes d'un cancer épithélial invasif de l'ovaire. Les résultats doivent être confrontés aux autres méthodes cliniques utilisées pour le suivi du cancer de l'ovaire.

PRINCIPE DU TEST

Le test HE4 EIA est un dosage immunoenzymatique non compétitif en phase solide de type sandwich direct, qui utilise deux anticorps monoclonaux de souris, 2H5 et 3D8, dirigés contre deux épitopes du domaine C à quatre ponts disulfures de la HE4. Les étalons, les contrôles et les échantillons sont incubés avec un anticorps monoclonal anti-HE4 biotinylé (MAb) 2H5 dans des micropuits enduits de streptavidine. La HE4 présente dans les étalons ou les échantillons est adsorbée sur les micropuits enduits de streptavidine par le MAb anti-HE4 biotinylé pendant l'incubation. Les barrettes sont ensuite lavées puis incubées avec le MAb anti-HE4 3D8 marqué à la HRP. Après lavage, le réactif chromogène / substrat tamponné (peroxyde d'hydrogène et 3, 3', 5, 5' tétraméthylbenzidine) est ajouté dans chaque puits et la réaction enzymatique se produit. Une couleur bleue se développe alors si l'antigène est présent.

L'intensité de la couleur, déterminée par un spectrophotomètre pour microplaques à 620 nm (ou éventuellement 405 nm après ajout de la solution d'arrêt), est proportionnelle à la quantité de HE4 présente dans les échantillons.

Les courbes d'étalonnage sont créées pour chaque dosage en reportant la valeur d'absorbance en regard de la concentration de chaque étalon. Les concentrations HE4 des échantillons sont alors lues sur la courbe d'étalonnage.

REACTIFS

- Chaque trousse HE4 EIA contient les réactifs nécessaires pour 96 tests.
- La date de péremption de la trousse est indiquée sur l'étiquette extérieure de l'emballage.
- Ne pas utiliser la trousse après cette date.
- Ne pas mélanger les réactifs de différents lots.
- Conserver la trousse entre 2 et 8°C. Ne pas la congeler.
- Les réactifs ouverts sont stables conformément au tableau ci-dessous, pour peu qu'ils ne soient pas contaminés, qu'ils soient conservés dans les conteneurs étanches d'origine et manipulés selon les instructions. Les replacer entre 2 et 8°C immédiatement après usage.

| Composant | Quantité | Stockage et stabilité après premier emploi |
|-----------|----------|--|
|-----------|----------|--|

MICROPLA

| | | |
|---------------------------------------|----------|--|
| Microplaque avec streptavidine | 1 plaque | 2 à 8°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur la plaque |
|---------------------------------------|----------|--|

12 x 8 puits séparables enduits de streptavidine. Après ouverture, replacer immédiatement les barrettes non utilisées dans le sachet en aluminium avec le dessiccateur. Refermer hermétiquement avec soin pour les garder au sec.

CAL HE4 A

| | | |
|---------------------|----------|--|
| Étalon HE4 A | 1 x 8 mL | 2 à 8°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur le flacon |
|---------------------|----------|--|

Solution saline tamponnée au phosphate contenant de l'albumine de sérum bovin, un colorant jaune inerte et un conservateur antimicrobien non azide. Prêt à l'emploi. Sert également à la dilution des échantillons.

| Composant | Quantité | Stockage et stabilité après premier emploi | | | |
|---|------------------------|---|---|----------|--|
| Étalons HE4 B-F | 5 flacons, lyophilisés | Stabilité après reconstitution 4 semaines à 2 - 8°C 4 mois à -20°C ou moins | | | |
| <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 | | | |

Les étalons lyophilisés contiennent un antigène HE4 dans une solution saline tamponnée au phosphate avec de l'albumine de sérum bovin, un colorant jaune inerte et un conservateur antimicrobien non azide. À reconstituer avec de l'eau distillée ou déionisée avant usage.

REMARQUE : la concentration exacte de HE4, propre à chaque lot, est indiquée sur l'étiquette des flacons.

| | | | | | |
|---|------------------------|---|---|----------|--|
| Contrôles HE4 | 2 flacons, lyophilisés | Stabilité après reconstitution 4 semaines à 2 - 8°C 4 mois à -20°C ou moins | | | |
| <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 | | | |

Les contrôles lyophilisés contiennent un antigène HE4 dans une matrice de sérum humain et un conservateur antimicrobien non azide. À reconstituer avec de l'eau distillée ou déionisée avant usage.

| | | | | |
|---|-----------|--|--|--|
| <table border="1"><tr><td>BIOTIN</td><td>Anti-HE4</td></tr></table> | BIOTIN | Anti-HE4 | | |
| BIOTIN | Anti-HE4 | | | |
| Biotine anti-HE4 | 1 x 15 mL | 2 à 8°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur le flacon | | |

Anticorps monoclonal avec biotine anti-HE4 de souris, environ 1 µg/mL. Contient une solution saline tamponnée au phosphate (pH 7,2), de l'albumine de sérum bovin, des agents bloquants, un détergent, un colorant rouge inerte et un conservateur antimicrobien non azide. Prêt à l'emploi.

| Composant | Quantité | Stockage et stabilité après premier emploi |
|------------------|-----------------|---|
|------------------|-----------------|---|

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

| | | |
|-----------------------------|-------------|--|
| Traceur HRP anti-HE4 | 1 x 0,75 mL | 2 à 8°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur le flacon |
|-----------------------------|-------------|--|

Solution mère d'anticorps monoclonal de souris anti-HE4 avec HRP, environ 40 µg/mL.

Contient des conservateurs antimicrobiens non azides. À diluer avec le diluant pour traceur avant usage.

| | |
|------------|-------------|
| DIL | CONJ |
|------------|-------------|

| | | |
|-----------------------------|-----------|--|
| Diluant pour traceur | 1 x 15 mL | 2 à 8°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur le flacon |
|-----------------------------|-----------|--|

Solution saline tamponnée au phosphate (pH 7,2) contenant de l'albumine de sérum bovin, des agents bloquants, des détergents, un colorant bleu inerte et un conservateur antimicrobien non azide. Prêt à l'emploi.

| | |
|-------------|------------|
| SUBS | TMB |
|-------------|------------|

| | | |
|-------------------------|-----------|--|
| Substrat HRP TMB | 1 x 12 mL | 2 à 8°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur le flacon |
|-------------------------|-----------|--|

Contient du peroxyde d'hydrogène tamponné et de la 3, 3', 5, 5' tétraméthylbenzidine (TMB). Prêt à l'emploi.

| |
|-------------|
| STOP |
|-------------|

| | | |
|-------------------------|-----------|--|
| Solution d'arrêt | 1 x 15 mL | 2 à 8°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur le flacon |
|-------------------------|-----------|--|

Contient 0,12 M d'acide chlorhydrique. Prêt à l'emploi.

| Composant | Quantité | Stockage et stabilité après premier emploi |
|-----------------------------|-----------------|--|
| WASHBUF 25X | | |
| Concentré de lavage | 1 x 50 mL | 2 à 8°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur la bouteille |

Solution saline tamponnée au Tris-HCl avec Tween 20. Contient du Germall II comme conservateur.
À diluer avec de l'eau distillée ou déionisée 25 fois avant usage.

Indications d'instabilité

Le substrat TMB HRP doit être incolore, voire légèrement bleuté. Une couleur bleue indique que le réactif a été contaminé et doit être mis de côté.

AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

Pour utilisation diagnostique in vitro :

- Pour usage professionnel seulement.
- Respecter les instructions de la notice. La fiabilité des résultats du dosage ne peut être garantie en cas de non respect des instructions de cette notice.
- Manipuler tous les échantillons comme présentant un risque infectieux. Il est recommandé de manipuler les réactifs d'origine humaine et les échantillons humains selon la norme OSHA relative aux pathogènes véhiculés par le sang (20). Un niveau de biosécurité 2 (21) ou d'autres pratiques de biosécurité appropriées doivent être utilisées pour les substances contenant ou suspectées de contenir des agents infectieux.
- Respecter les réglementations locales pour la mise au rebut de tous les déchets.

Attention

Les substances utilisées dans la préparation du réactif d'origine humaine ont été testées et se sont avérées non réactives pour les anticorps anti-VIH 1 et 2, les anticorps anti-HCV et l'antigène de surface anti-hépatite B (HBsAg). Aucune méthode ne pouvant exclure totalement la présence de maladies véhiculées par le sang, la manipulation et la mise au rebut des réactifs d'origine humaine de ce produit doivent tenir compte du risque infectieux.

PRELEVEMENT ET MANIPULATION DES ECHANTILLONS

Le test HE4 EIA est prévu pour être utilisé avec du sérum (y compris du sérum prélevé dans des tubes SST pour séparation stérile). L'utilisation du plasma et des autres fluides corporels n'a pas été validée avec le test HE4 EIA. Prélever le sang par ponction veineuse et respecter les instructions de traitement du fabricant concernant les tubes de prélèvement. Si des échantillons en série sont évalués, le même type d'échantillon doit être utilisé tout au long de l'étude.

Le sérum peut être conservé entre 2 et 8°C pendant 3 jours avant d'être testé. Pour des périodes plus longues, stocker les échantillons à -40°C ou moins.

Amener les échantillons congelés à température ambiante et les mélanger SOIGNEUSEMENT en les renversant en douceur à plusieurs reprises avant l'analyse. Les échantillons qui contiennent des particules grossières doivent être centrifugés à 10 000 x g pendant 10 minutes avant l'emploi pour éliminer les particules pouvant avoir été générées par la décongélation.

PROCEDURE

Matériel requis non fourni

1. Agitateur de microplaques

L'agitation doit être de moyenne à vigoureuse, environ 700 à 1100 oscillations/min.

2. Laveur de microplaques

Laveur de microplaques automatique en mesure de réaliser 1, 3 et 6 cycles de lavage et doté d'un volume de remplissage minimum de 350 µL/puits/cycle de lavage.

Une pipette à 8 canaux avec embouts plastiques jetables pour distribution de 350 µL est recommandée en l'absence d'un laveur de microplaques automatique.

3. Spectrophotomètre pour microplaques

Avec une longueur d'onde de 620 nm ou 405 nm et une plage d'absorbance de 0 à 3,0.

4. Pipettes de précision

Avec embouts plastiques jetables pour la distribution de volumes en microlitres. Une pipette à 8 canaux ou un distributeur avec embouts plastiques jetables pour la distribution de 100 µL est recommandé mais non obligatoire. Pipettes pour la distribution de volumes en millilitres.

5. Eau distillée ou déionisée

Pour la reconstitution des étalons HE4, des contrôles HE4 et la préparation de la solution de lavage diluée.

Remarques sur la procédure

1. Il est impératif de comprendre en détail cette notice pour s'assurer du bon emploi de la trousse HE4 EIA. Les réactifs fournis dans la trousse sont destinés à être utilisés comme un tout. Ne pas mélanger les réactifs identiques issus de trousse portant des numéros de lot différents. Ne pas utiliser les réactifs de la trousse après la date de péremption imprimée à l'extérieur de l'emballage.
2. Les réactifs doivent être amenés à température ambiante (20 à 25°C) avant emploi. Les échantillons congelés doivent être mélangés soigneusement mais en douceur après la décongélation. **Le dosage doit être réalisé à une température comprise entre 20 et 25°C pour obtenir des résultats précis.**
3. Avant de commencer à pipeter les étalons et les échantillons, il est conseillé de repérer les barrettes pour pouvoir identifier clairement les échantillons pendant et après le dosage.
4. L'une des étapes les plus importantes d'un dosage immunoenzymatique est le lavage visant à séparer les antigènes et réactifs liés et non liés des complexes anticorps-antigènes liés en phase solide. **Pour s'assurer que le lavage est efficace, vérifier que tous les puits sont complètement remplis jusqu'au bord supérieur de la solution de lavage pendant chaque cycle de lavage, que la solution de lavage est distribuée à la bonne vitesse, que l'aspiration des puits entre et après les**

cycles de lavage est complète et que les puits sont vides. S'il reste du liquide, renverser la plaque et la tapoter doucement sur du papier absorbant.

- Laveur de barrettes automatique : respecter scrupuleusement les instructions du fabricant pour le nettoyage et la maintenance et laver selon le nombre de cycles de lavage requis avant et après chaque étape d'incubation. L'appareil de lavage / aspiration ne doit pas garder de solution de lavage pendant de longues périodes, car les aiguilles peuvent s'obstruer et compromettre la distribution du liquide et son aspiration.
- 5. Le substrat TMB HRP est très sensible à la contamination. Pour obtenir sa stabilité optimale, verser la quantité nécessaire du flacon dans un conteneur soigneusement nettoyé ou, de préférence, un plateau plastique jetable pour éviter toute contamination du réactif. Veiller à utiliser des embouts de pipette (ou de distributeur) jetables en plastique propres.
- 6. Utiliser des embouts de pipettes plastiques jetables et une technique de pipetage précise et correcte lors de la manipulation des échantillons et des réactifs. Ne pas faire toucher l'embout de la pipette à la surface du liquide pour éviter toute contamination par transfert. La technique de pipetage est d'une importance capitale lors de la manipulation des échantillons et de la solution de substrat TMB HRP.

Préparation des réactifs**Stabilité du réactif préparé**

Étalons HE4 B-F

4 semaines à 2 - 8°C

4 mois à -20°C ou moins

Ajouter exactement 1,0 mL d'eau distillée ou déionisée dans chaque flacon. Laisser reposer pendant au moins 15 minutes pour reconstituer et mélanger en douceur avant emploi. REMARQUE : la concentration des étalons est indiquée sur les étiquettes et doit être utilisée pour le calcul des résultats.

Contrôles HE4 1 et 2

4 semaines à 2 - 8°C

4 mois à -20°C ou moins

Ajouter exactement 1,0 mL d'eau distillée ou déionisée dans chaque flacon et mélanger doucement. Laisser reposer pendant au moins 15 minutes pour reconstituer et mélanger en douceur avant emploi. REMARQUE : les fourchettes des contrôles sont indiquées sur les étiquettes.

Solution de lavage

2 semaines entre 2 et 25°C

dans un conteneur hermétique

Verser 50 mL de concentré de lavage dans un conteneur propre et diluer 25 fois en ajoutant 1200 mL d'eau distillée ou déionisée pour obtenir une solution de lavage tamponnée.

| Préparation des réactifs | Stabilité du réactif préparé |
|--------------------------------|--|
| Solution de travail du traceur | 4 semaines entre 2 et 25°C dans un conteneur hermétique |

Préparer la quantité requise de traceur en mélangeant 50 µL de traceur HRP anti-HE4 avec 1 mL de diluant pour traceur pour chaque barrette (voir tableau ci-dessous) :

| Nb. de barrettes | Traceur HRP anti-HE4 (µL) | Diluant pour traceur (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 |

Veiller à utiliser un tube en verre ou plastique propre pour la préparation de la solution de travail du traceur.

Autre méthode : verser le contenu du traceur HRP anti-HE4 dans le flacon du diluant pour traceur et mélanger doucement. Veiller à transférer l'intégralité du contenu du flacon du traceur HRP anti-HE4 dans le flacon du diluant.

REMARQUE : la solution de travail du traceur est stable pendant 4 semaines à 2 - 8°C. Ne pas préparer davantage de solution que la quantité utilisée pendant cette période et veiller à la conserver correctement.

PROCÉDURE DE DOSAGE

Réaliser chaque test en double pour les étalons, les contrôles et les échantillons inconnus. Une courbe d'étalonnage doit être réalisée pour chaque dosage. Tous les réactifs et échantillons doivent se trouver à température ambiante (20 à 25°C) au moment de l'emploi.

- Commencer à préparer les étalons B à F, les contrôles 1 et 2, la solution de lavage et la solution de travail du traceur. La propreté des conteneurs est essentielle. Respecter scrupuleusement les instructions.
- Transférer le nombre requis de barrettes de microplaques sur un cadre (ranger immédiatement les barrettes restantes dans le sachet en aluminium avec le dessiccateur et refermer hermétiquement avec soin). Laver chaque barrette une fois avec la solution de lavage. Ne pas laver plus de barrettes que la quantité pouvant être traitée en 30 min.

3. Pipeter 25 µL de chaque étalon HE4 (CAL A, B, C, D, E et F), de contrôles HE4 (C1, C2) et d'échantillons inconnus (Inc) dans les puits, selon le schéma suivant :

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 etc. |
|---|----------|----------|-------------------------|---|---|---|--------|
| A | Cal A | Cal E | 1 ^{er} Inc | | | | |
| B | Cal A | Cal E | 1 ^{er} Inc | | | | |
| C | Cal B | Cal F | 2 ^{ème} Inc | | | | |
| D | Cal B | Cal F | 2 ^{ème} Inc | | | | |
| E | Cal C | C1 | | | | | |
| F | Cal C | C1 | | | | | |
| G | Cal D | C2 | | | | | |
| H | Cal D | C2 | | | | | |

4. Ajouter 100 µL de biotine anti-HE4 dans chaque puits à l'aide d'une pipette de précision de 100 µL (ou une pipette de précision de 100 µL à 8 canaux). Ne pas faire toucher l'embout de la pipette à la surface du liquide pour éviter toute contamination par transfert.
5. Laisser incuber la plaque pendant 1 heure (\pm 10 min) à température ambiante (20-25°C), en l'agitant constamment dans un agitateur de microplaques.
6. Après la première incubation, aspirer et laver chaque barrette 3 fois selon la procédure de lavage décrite dans Remarques sur la procédure, paragraphe 4.
7. Ajouter 100 µL de solution de travail du traceur dans chaque puits. Procéder selon le pipetage décrit à l'étape 4 ci-dessus.
8. Incuber le cadre pendant 1 heure (\pm 5 min) à température ambiante (20-25°C) en l'agitant constamment.
9. Après la deuxième incubation, aspirer et laver chaque barrette 6 fois selon la procédure de lavage décrite dans Remarques sur la procédure, paragraphe 4.
10. Ajouter 100 µL de substrat TMB HRP dans chaque puits selon la technique de pipetage décrite à l'étape 4 ci-dessus.
- Le substrat TMB HRP doit être ajouté dans les puits aussitôt que possible et le délai entre l'ajout au premier et au dernier puits ne doit pas dépasser 5 min.
11. Laisser incuber pendant 30 min (\pm 5 min) à température ambiante (20-25°C) en agitant constamment. Éviter l'exposition à la lumière directe du soleil.
12. Lire immédiatement l'absorbance à 620 nm à l'aide d'un spectrophotomètre pour microplaques.

Option

Si le laboratoire ne dispose pas d'un lecteur de microplaques équipé d'un filtre à 620 nm, l'absorbance peut être déterminée en remplaçant l'étape 12 ci-dessus par la suivante :

Étape 12 modifiée Ajouter 100 µL de solution d'arrêt, mélanger et lire l'absorbance à 405 nm à l'aide d'un spectrophotomètre pour microplaques dans les 15 minutes qui suivent l'ajout de la solution d'arrêt.

Plage de mesures

Le test HE4 EIA mesure les concentrations entre 15 et 900 pM. Si des concentrations de HE4 au-dessus de la plage de mesures sont prévisibles, il est recommandé de diluer les échantillons avec l'étalon HE4 A avant l'analyse (voir « Calcul des résultats avec des échantillons dilués »).

Contrôle de la qualité

Les contrôles HE4 1 et 2 servent à valider chaque série de dosage. Les plages des résultats attendus sont indiquées sur les étiquettes des flacons.

Les résultats du dosage de HE4 sont considérés comme valables si :

- les valeurs moyennes des doublons de contrôle sont dans la plage spécifiée.
- les répliques des étalons B à F et des contrôles n'excèdent pas un CV de 15 %.
- les répliques de l'étalon A (étalon zéro) n'ont pas plus de 0,06 unités DO de différence entre elles.

Si un test donne des résultats non valables pour un étalon ou un contrôle, contrôler tous les réactifs, la précision des pipettes, les performances du lecteur et du laveur de microplaques et recommencer l'analyse. Chaque laboratoire peut également préparer ses propres pools de sérum à différents niveaux et les utiliser comme contrôles internes afin de garantir la précision du dosage.

Documentation de référence

Aucune documentation de référence commune n'étant disponible pour l'antigène HE4, les valeurs d'étalonnage HE4 EIA sont attribuées en fonction d'un ensemble de normes de référence internes.

CALCUL DES RESULTATS

En cas d'utilisation d'un spectrophotomètre pour microplaques avec programme de calcul de données intégré, se reporter au manuel du lecteur pour créer un programme utilisant la concentration indiquée sur l'étiquette de chaque étalon HE4.

Pour le calcul automatique des résultats de HE4, il est recommandé d'utiliser l'une des méthodes suivantes :

- méthode d'ajustement de spline cubique. L'étalon A doit être inclus dans la courbe avec la valeur 0 pM.
- interpolation avec évaluation point par point. L'étalon A doit être inclus dans la courbe avec la valeur 0 pM.
- méthode d'ajustement de courbe quadratique. L'étalon A doit être inclus dans la courbe avec la valeur 0 pM.

REMARQUE : il est déconseillé d'utiliser les méthodes d'évaluation par régression linéaire ou à 4 paramètres.

Pour l'évaluation manuelle, une courbe d'étalonnage est construite en reportant les valeurs d'absorbance (A) obtenues pour chaque étalon HE4 en regard de la concentration de HE4 correspondante (en pM).

Les concentrations de HE4 inconnues peuvent alors être lues sur la courbe d'étalonnage d'après la valeur d'absorbance moyenne de chaque échantillon de patient.

Calcul des résultats avec des échantillons dilués

Si les échantillons donnent des taux de HE4 supérieurs à 900 pM dans une analyse initiale, les diluer au 1/10^{ème} et 1/100^{ème} avec l'étalon HE4 A pour obtenir la concentration de HE4 précise des échantillons.

- Dilution au 1/10^{ème} = 50 µL d'échantillon + 450 µL d'étalon HE4 A
- Dilution au 1/100^{ème} = 50 µL de la dilution au 1/10^{ème} + 450 µL d'étalon HE4 A

La concentration de HE4 de l'échantillon non dilué est alors calculée ainsi :

- Dilution au 1/10^{ème} : 10 x valeur mesurée
- Dilution au 1/100^{ème} : 100 x valeur mesurée

Algorithme ROMA (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm) pour estimer le risque de cancer épithélial de l'ovaire chez les femmes préménopausées ou postménopausées présentant une masse pelvienne

Calcul de l'indice prédictif

Un indice prédictif (IP) est calculé pour les femmes préménopausées ou postménopausées séparément à l'aide des équations (1) et (2) ci-dessous. Pour calculer l'IP, les valeurs de dosage obtenues à partir du test HE4 EIA et du test ARCHITECT CA125 II ou CanAg CA125 EIA, respectivement, sont insérées dans l'équation applicable de l'algorithme ci-dessous, selon le statut de ménopause de la femme.

(1) Femmes préménopausées

Indice prédictif (IP) = $-12,0 + 2,38 \cdot \text{LN}[\text{HE4}] + 0,0626 \cdot \text{LN}[\text{CA125}]$

(2) Femmes postménopausées

Indice prédictif (IP) = $-8,09 + 1,04 \cdot \text{LN}[\text{HE4}] + 0,732 \cdot \text{LN}[\text{CA125}]$

Calcul de la valeur ROMA

Pour calculer la valeur ROMA (c'est-à-dire la probabilité prédictive), insérer la valeur calculée pour l'indice prédictif dans l'équation (3) :

(3) Valeur ROMA (%) = $\exp(\text{IP}) / [1 + \exp(\text{IP})] \cdot 100$

Les exemples ci-dessous peuvent être utilisés pour valider les calculs de l'IP et la valeur ROMA :

| Statut de ménopause | HE4 (pM) | CA125 (U/mL) | Calcul de l'IP | IP | ROMA (%) |
|---------------------|----------|--------------|---|----------|----------|
| Préménopause | 37,5 | 74,9 | $-12,0 + (2,38 \cdot 3,624) + (0,0626 \cdot 4,316)$ | -3,10388 | 4,29 |
| Préménopause | 386,6 | 21,8 | $-12,0 + (2,38 \cdot 5,957) + (0,0626 \cdot 3,082)$ | 2,371517 | 91,5 |
| Postménopause | 66,7 | 11,3 | $-8,09 + (1,04 \cdot 4,200) + (0,732 \cdot 2,425)$ | -1,94683 | 12,5 |
| Postménopause | 383,1 | 22,7 | $-8,09 + (1,04 \cdot 5,948) + (0,732 \cdot 3,122)$ | 0,381799 | 59,4 |

LIMITES DE LA PROCEDURE

Les patientes présentant un cancer de l'ovaire confirmé peuvent présenter des valeurs de dosage de HE4 de l'ordre des femmes en bonne santé. Certains types histologiques de cancer de l'ovaire, comme les carcinomes mucineux ou les tumeurs germinales, expriment rarement de la HE4. Le dépistage de cette protéine n'est donc pas recommandé pour le suivi des patientes atteintes de tumeurs germinales ou de

carcinomes mucineux de l'ovaire (7). D'autre part, des taux élevés d'antigène HE4 peuvent exister chez des personnes atteintes de pathologies bénignes. Le taux de HE4 ne peut donc pas être utilisé comme preuve absolue de présence ou d'absence de pathologie maligne et ne doit pas servir à dépister le cancer. Les résultats du test doivent être interprétés uniquement en parallèle avec d'autres études et procédures dans le diagnostic de la maladie et la prise en charge des patientes. Le test HE4 ne doit absolument pas se substituer à l'examen physique.

L'algorithme ROMA n'a pas été validé pour les groupes de patientes suivants : patientes précédemment traitées pour tumeurs malignes, patientes en cours de traitement par chimiothérapie et patientes de moins de 18 ans. La forme de la fonction mathématique appelée ROMA (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm) dépend du statut préménopausé ou postménopausé des femmes. Ce statut doit reposer sur la fonction ovarienne déterminée à partir des informations disponibles d'après l'évaluation clinique et les antécédents médicaux. La valeur ROMA n'inclut pas l'âge, les antécédents familiaux, les résultats cliniques ou les résultats d'imagerie et doit donc être interprétée en fonction de ces paramètres.

Si les tests HE4 EIA ou CA125 ne fonctionnent pas comme prévu ou en cas d'erreur dans le calcul des résultats, l'évaluation du risque pourrait s'avérer inexacte et se traduire par une prise en charge incorrecte de la patiente. Plus particulièrement, un résultat faussement faible de l'un des tests pourrait amener à déterminer que la patiente présente un risque moindre de cancer épithélial de l'ovaire, entraînant la patiente vers des soins moins spécialisés. L'utilisation des résultats du test sans prise en compte des autres résultats de laboratoire, de l'imagerie et de l'examen clinique pourrait donc entraîner un risque. Les anticorps anti-réactif (anticorps anti-souris humain (HAMA) ou anticorps hétérophiles) de l'échantillon de la patiente peuvent occasionnellement interférer avec le dosage, même si des agents bloquants spécifiques sont inclus dans les tampons.

Le test doit être réalisé dans un environnement à température contrôlée car l'incubation à une température supérieure à la plage recommandée de 20 à 25°C peut donner des résultats faussement faibles.

VALEURS ATTENDUES

La répartition des taux de HE4 déterminés sur 1 147 échantillons est présentée dans le tableau ci-dessous :

| Répartition des valeurs de dosage HE4 | | | | | |
|---|------------------|------------|----------------|----------------|----------|
| | Nombre de sujets | 0 - 150 pM | 150,1 - 300 pM | 300,1 - 500 pM | > 500 pM |
| BONNE SANTÉ APPARENTE | | | | | |
| Femmes (préménopausées) | 76 | 72 | 3 | 0 | 1 |
| Femmes (postménopausées) | 103 | 97 | 5 | 0 | 1 |
| ÉTATS BÉNINS | | | | | |
| Grossesse | 22 | 21 | 1 | 0 | 0 |
| Maladie gynécologique bénigne | 347 | 324 | 18 | 1 | 4 |
| Autre maladie bénigne | 108 | 82 | 8 | 7 | 11 |
| Hypertension / insuffisance cardiaque cong. | 96 | 75 | 16 | 2 | 3 |
| CANCER | | | | | |
| Cancer de l'ovaire | 127 | 27 | 18 | 21 | 61 |
| Cancer du sein | 46 | 40 | 4 | 2 | 0 |
| Cancer des poumons | 50 | 29 | 15 | 6 | 0 |
| Cancer de l'endomètre | 116 | 86 | 15 | 4 | 11 |
| Cancer gastro-intestinal | 56 | 47 | 8 | 0 | 1 |

Dans cette étude, 94,4 % des femmes en bonne santé présentaient une valeur de dosage de HE4 inférieure ou égale à 150 pM.

Chaque laboratoire doit établir ses propres valeurs de référence pour la population concernée.

Suivi du stade de la maladie chez les patientes diagnostiquées avec cancer de l'ovaire

L'efficacité du test HE4 EIA comme outil de suivi du stade du cancer de l'ovaire a été déterminée en évaluant les modifications des taux de HE4 dans des échantillons de sérum en série chez 80 patientes et en les comparant avec l'évolution du stade de la maladie. Une étude incluant 354 observations appariées a été menée avec un nombre moyen de 4,4 observations par patiente. La modification positive du taux de HE4 a été définie comme l'augmentation de la valeur d'au moins 25 % par rapport à la valeur précédente du test. Ce niveau de modification tient compte de la variabilité du test et de la variabilité biologique. Soixante pour cent (60 %) ou 76/126 échantillons avec une modification positive ont été corrélés à la progression de la maladie alors que soixante-quinze pour cent (75 %) ou 171/228 échantillons en série sans modification significative ont été corrélés à l'absence de progression. La concordance globale était de soixante-dix pour cent (70 % ou 247/354). Le tableau suivant présente les données au format 2 x 2.

| Modification du stade de la maladie par paire séquentielle | | | |
|--|-------------|------------------------|-------|
| Augmentation de la concentration de HE4 | Progression | Absence de progression | Total |
| >25 % | 76 | 57 | 133 |
| ≤25 % | 50 | 171 | 221 |
| Total | 126 | 228 | 354 |

Le tableau suivant montre la répartition par patiente. Quarante-treize pour cent (93 %) ou 54/58 des ensembles de sérum par patiente avec une modification positive ont été corrélés avec la progression de la

maladie alors que trente-deux pour cent (32 %) ou 7/22 des ensembles de sérum sans modification significative de la valeur HE4 ont été corrélés à l'absence de progression. La concordance globale dans cette étude était de soixante-seize pour cent (76 %) ou 61/80.

| Modification du stade de la maladie par patiente | | | |
|---|--------------------|-------------------------------|--------------|
| Augmentation de la concentration de HE4 | Progression | Absence de progression | Total |
| >25 % | 54 | 15 | 69 |
| ≤25 % | 4 | 7 | 11 |
| Total | 58 | 22 | 80 |

Estimation du risque chez les patientes présentant une masse pelvienne

L'efficacité du test HE4 EIA associé au dosage de CA125 par le test ARCHITECT CA125 II ou CanAg CA125 EIA pour l'estimation du risque de cancer épithélial de l'ovaire chez les patientes présentant une masse pelvienne a été déterminée lors d'un essai clinique multicentrique prospectif en double aveugle. Un algorithme (ROMA, voir page 12) a été développé pour estimer le risque de cancer épithélial de l'ovaire. L'algorithme calcule la probabilité prédictive de révéler un cancer épithélial de l'ovaire lors de la chirurgie. L'étude prospective a recruté un total de 502 patientes et a permis de déterminer la probabilité prédictive de cancer de l'ovaire ainsi que la possibilité de distinction entre deux groupes à haut risque et à faible risque, d'après les valeurs ROMA.

La distribution de fréquences cumulées des valeurs ROMA utilisant l'algorithme pour les cas bénins ou cancéreux, y compris les tumeurs faiblement malignes, est présentée dans les figures 1 et 2 pour l'association des tests HE4 EIA et ARCHITECT CA125 II et dans les figures 3 et 4 pour l'association des tests HE4 EIA et CanAg CA125 EIA. Les graphiques de distribution de fréquence illustrent la répartition des patientes avec pathologie bénigne et cancer épithélial de l'ovaire (y compris les tumeurs faiblement malignes) en fonction de différentes valeurs de seuil ROMA.

Fig. 1 Distribution des fréquences cumulées des valeurs ROMA pour les femmes **préménopausées**.

Association des tests HE4 EIA + ARCHITECT CA125 II

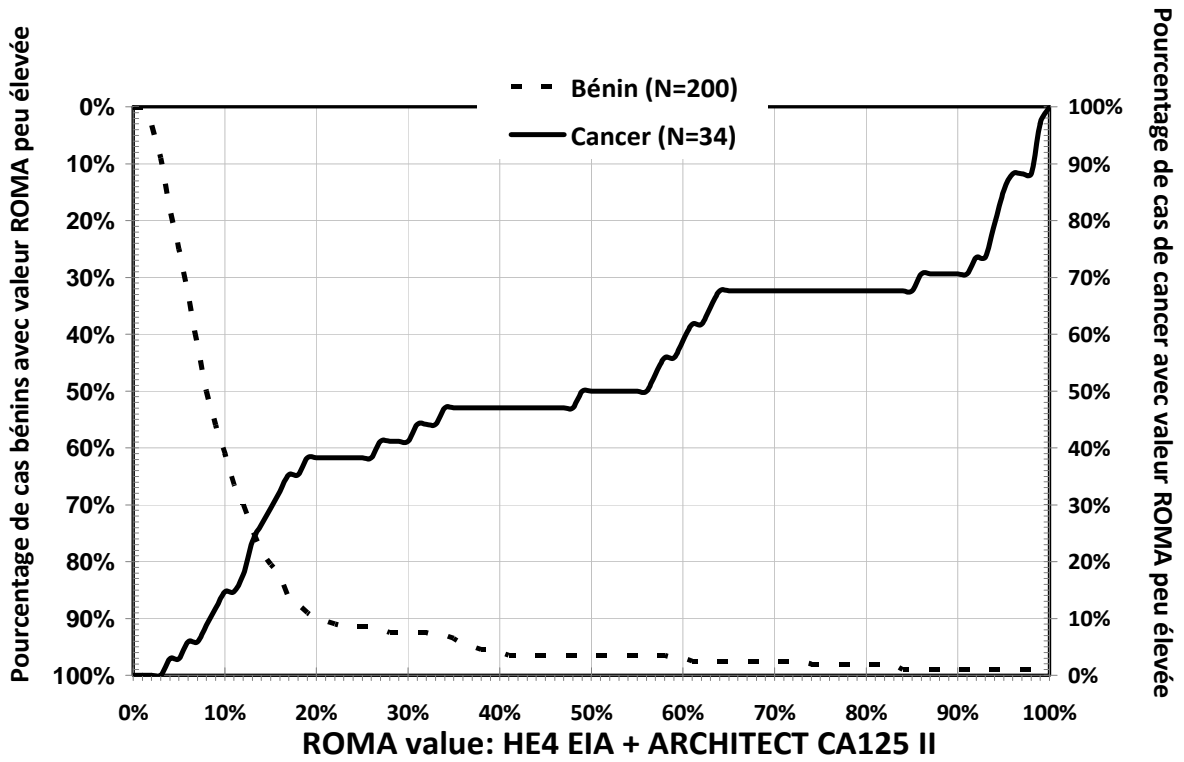


Fig. 2 Distribution des fréquences cumulées des valeurs ROMA pour les femmes **postménopausées**.

Association des tests HE4 EIA + ARCHITECT CA125 II

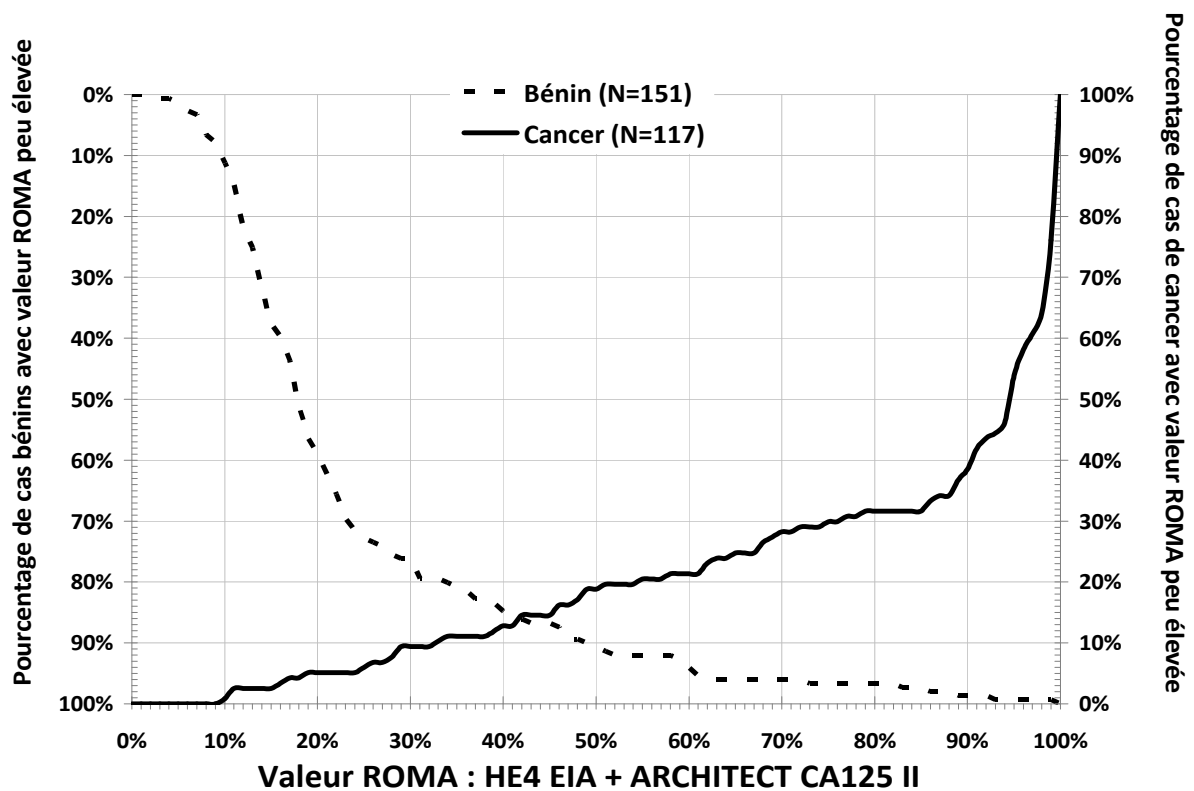


Fig. 3 Distribution des fréquences cumulées des valeurs ROMA pour les femmes **préménopausées**.

Association des tests HE4 EIA + CanAg CA125 EIA

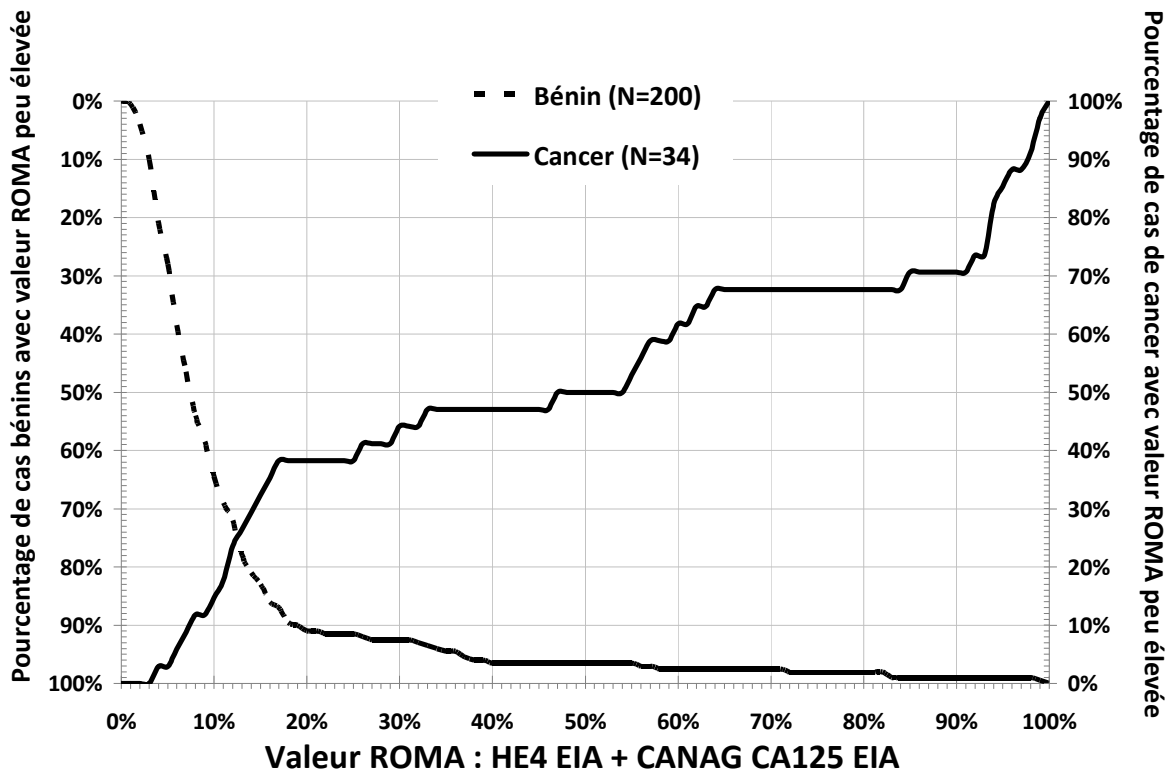
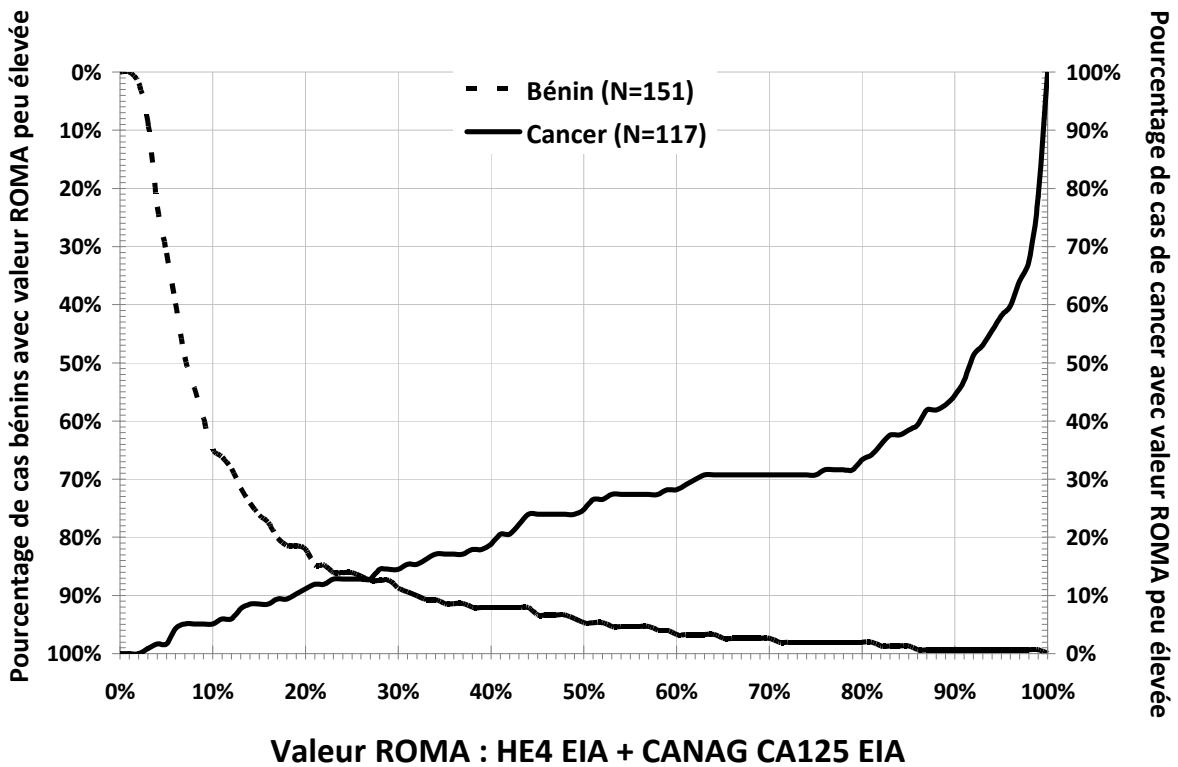


Fig. 4 Distribution des fréquences cumulées des valeurs ROMA pour les femmes **postménopausées**.

Association des tests HE4 EIA + CanAg CA125 EIA



Stratification entre les groupes à haut risque et à faible risque

L'algorithme ROMA (risk of ovarian malignancy) a été utilisé pour la stratification des femmes en groupes de risque de cancer épithélial de l'ovaire. Les seuils suivants ont été utilisés pour donner un niveau de spécificité de 75 % à l'association des tests HE4 EIA et ARCHITECT CA125 II :

Femmes préménopausées

Valeur ROMA $\geq 13,1$ % = haut risque de cancer épithélial de l'ovaire

Valeur ROMA $< 13,1$ % = faible risque de cancer épithélial de l'ovaire

Femmes postménopausées

Valeur ROMA $\geq 27,7$ % = haut risque de cancer épithélial de l'ovaire

Valeur ROMA $< 27,7$ % = faible risque de cancer épithélial de l'ovaire

La stratification des risques dans le groupe à haut risque de développement d'un cancer épithélial de l'ovaire parmi toutes les patientes présentant une tumeur annexielle à l'aide des valeurs ROMA pour un niveau de spécificité de 75 % est indiquée dans le tableau 1, en particulier la stratification du risque obtenue pour les groupes distincts de patientes préménopausées et postménopausées. La sensibilité de stratification des patientes avec cancer épithélial de l'ovaire de stades I à IV dans le groupe à haut risque était de 94 % avec une spécificité de 75 %, de sorte que 75 % des femmes avec masse pelvienne bénigne étaient classées dans le groupe à faible risque. Les valeurs prédictives positives et négatives étaient de 58 % et 97 % respectivement.

Tableau 1 : Stratification du risque dans le groupe à haut risque de développement d'un cancer épithélial de l'ovaire chez les patientes présentant une masse annexielle à l'aide de l'association des tests HE4 EIA et ARCHITECT CA125 II pour calculer la valeur ROMA.

Seuil de préménopause pour stratification dans le groupe à haut risque avec un niveau de spécificité à 75 % $\geq 13,1$ %, seuil de postménopause pour stratification dans le groupe à haut risque avec un niveau de spécificité à 75 % $\geq 27,7$ %.

| | Femmes préménopausées n = 234 | Femmes postménopausées n = 268 | Femmes préménopausées et postménopausées combinées n = 502 |
|--|--|---|---|
| Cancer épithélial de l'ovaire stades I à IV et tumeurs faiblement malignes combinés | 26/34 (76 %) | 108/117 (92 %) | 134/151 (89 %) |
| Tumeurs faiblement malignes | 10/16 (63 %) | 3/6 (50 %) | 13/22 (59 %) |
| Cancer épithélial de l'ovaire stades I à II | 6/7 (86 %) | 24/28 (86 %) | 30/35 (86 %) |
| Cancer épithélial de l'ovaire stades I à IIIC^a | 7/8 (88 %) | 35/39 (90 %) | 42/47 (89 %) |
| Cancer épithélial de l'ovaire stades I à IV | 16/18 (89 %) | 105/111 (95 %) | 121/129 (94 %) |

^aCancer épithélial de l'ovaire stades I à IIIb et stade IIIC (négatif pour l'épiploon, positif pour le ganglion lymphatique)

Aucune différence statistiquement significative n'est apparue en termes de sensibilité et spécificité de la valeur ROMA par rapport à l'utilisation des valeurs ARCHITECT CA125 II ou CanAg CA125 EIA pour distinguer les états bénins du cancer épithélial de l'ovaire. Avec l'association des tests CanAg CA125 EIA + HE4 EIA, la sensibilité de stratification des patientes avec cancer épithélial de l'ovaire de stades I à IV dans le groupe à haut risque était de 93 %. Les valeurs prédictives positives et négatives étaient de 57 % et 97 % respectivement.

Noter que les seuils de stratification du risque entre les groupes à faible risque et à haut risque doivent être ajustés selon le test utilisé pour doser le CA125. Les seuils suivants ont été sélectionnés pour donner un niveau de spécificité de 75 % à l'association des tests HE4 EIA et CanAg CA125 EIA :

Femmes préménopausées

Valeur ROMA $\geq 12,5$ % = haut risque de cancer épithélial de l'ovaire

Valeur ROMA $< 12,5$ % = faible risque de cancer épithélial de l'ovaire

Femmes postménopausées

Valeur ROMA $\geq 14,4$ % = haut risque de cancer épithélial de l'ovaire

Valeur ROMA $< 14,4$ % = faible risque de cancer épithélial de l'ovaire

Le tableau 2 présente les taux de faux négatifs et le pourcentage de cancers épithéliaux de l'ovaire stratifiés dans le groupe à faible risque de développement d'un cancer épithélial de l'ovaire chez les patientes présentant une masse annexielle d'après la valeur ROMA, avec une spécificité de 75 %. La stratification dans les groupes à faible risque et à haut risque de développement d'un cancer épithélial de l'ovaire à l'aide de l'algorithme ROMA avec un niveau de spécificité de 75 % a fourni un taux de faux négatifs global de 6,2 %. Trois (3) pour cent de tous les cas stratifiés dans le groupe à faible risque représentaient en fait des cancers épithéliaux de l'ovaire.

Tableau 2. Taux de faux négatifs et pourcentage de cancers épithéliaux de l'ovaire pour tous les cas stratifiés dans le groupe à faible risque chez les patientes présentant une masse annexielle à l'aide de la valeur ROMA.

Seuil de préménopause pour stratification dans le groupe à faible risque avec un niveau de spécificité à 75 % $< 13,1$ %, seuil de postménopause pour stratification dans le groupe à faible risque avec un niveau de spécificité à 75 % $< 27,7$ %.

| Cancer épithélial de l'ovaire ^a | Taux de faux négatifs (TFN) | | | Pourcentage de cancers dans le groupe à faible risque | | |
|--|-----------------------------|---------|------------------|---|--------------|------------------|
| | Faux négatif | Total | TFN ^b | Faux négatif | Vrai positif | (%) ^c |
| | Cancers | Cancers | | Cancers | Bénin | |
| Préménopause | 2 | 18 | 11,1 % | 2 | 149 | 1,3 % |
| Postménopause | 6 | 111 | 5,4 % | 6 | 113 | 5,0 % |
| Toutes les patientes | 8 | 129 | 6,2 % | 8 | 262 | 3,0 % |

^a Tumeurs faiblement malignes non comprises ; ^b TFN = faux négatifs/(vrais positifs + faux négatifs) ; ^c Faux négatifs/(vrais négatifs + faux négatifs)

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Précision

La précision du dosage de HE4 est ≤ 15 % de CV total. Une étude a été menée selon la description de la directive EP5-A2 du National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS / CLSI) (22). Un panel de quatre échantillons de sérum a été testé, avec deux lots de réactifs, par répliques de deux, à deux moments de la journée, pendant 20 jours. Les données de cette étude sont résumées ci-dessous.*

| Échantillon | Lot de réactifs | n | Conc. moy. (pM) | ET intrasérie (pM) | % CV intrasérie | ET total (pM) | % CV total |
|-------------|-----------------|----|-----------------|--------------------|-----------------|---------------|------------|
| 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 |

* Données représentatives ; les résultats de chaque laboratoire peuvent varier par rapport à ces données.

Limite de détection

La limite de détection du test HE4 EIA est ≤ 15 pM. La limite de détection correspond à la limite supérieure de l'intervalle de confiance de 95 % et représente la concentration la plus faible de l'antigène HE4 pouvant être distinguée de zéro. La directive NCCLS EP17-A (23) a été utilisée pour concevoir les expériences de limite de détection. Une étude a été menée où l'étalon HE4 A (étalon zéro) et 4 échantillons de sujets en bonne santé ont été dilués à 5 pM avec le diluant pour échantillon puis testés par série de 24 répliques en 4 séries sur deux jours. La limite de détection a été calculée ainsi

$$\text{Limite (pM)} = 5,0 \text{ pM} \times (1,65 \times \text{ET}_0 + 1,65 \times \text{ET}_5) / (\text{DO}_5 - \text{DO}_0)$$

La limite de détection de la trousse HE4 EIA a été calculée comme étant $< 2,5$ pM.

Sensibilité fonctionnelle

La sensibilité fonctionnelle du test HE4 EIA est ≤ 25 pM. La sensibilité fonctionnelle est exprimée comme la concentration d'un analyte pour lequel le CV est 20 %. La directive NCCLS EP5-A2 (22) a été utilisée pour concevoir les expériences permettant de déterminer la sensibilité fonctionnelle. Une étude a porté sur un panel de sensibilité de cinq membres testés par série de 4 répliques en 2 séries sur 20 jours avec deux lots de réactifs. La sensibilité fonctionnelle déterminée pour le test HE4 EIA était < 5 pM.

Récupération

La récupération moyenne du test HE4 EIA est 100 ± 15 %. Une étude a été menée avec des dilutions d'un échantillon, aux concentrations de HE4 connues, ajoutées à des échantillons de sérum humain normal. La concentration de HE4 a été déterminée à l'aide du test HE4 EIA et le résultat du pourcentage de récupération a été calculé. Les données représentatives de cette étude sont résumées dans le tableau ci-dessous*.

| Échantillon | Valeur de dosage endogène (pM) | Antigène HE4 ajouté (pM) | Valeur de dosage HE4 observée (pM) | Pourcentage de récupération** (%) |
|-------------|--------------------------------|--------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| 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 |

La récupération moyenne pour les quatre concentrations enrichies présentées ci-dessus s'est révélée de 97 %.

* Données représentatives ; les résultats de chaque laboratoire peuvent varier par rapport à ces données.

**% récupération = $\text{conc. HE4 observée (pM)} / \text{conc. HE4 endogène (pM)} + \text{HE4 ajoutée (pM)}$

Effet crochet

L'effet crochet est le phénomène selon lequel des échantillons aux concentrations très élevées peuvent donner des résultats dans la plage dynamique du test. Pour le test HE4 EIA, aucun effet crochet n'a été observé pour les échantillons contenant jusqu'à 300 000 pM d'antigène natif HE4.

Linéarité de la dilution

La linéarité de la dilution moyenne du test HE4 EIA est 100 ± 15 %. Une étude a été menée sur le HE4 EIA, d'après le modèle de la directive EP6-A du NCCLS (CLSI) (24). Les échantillons de sérum avec valeurs de HE4 élevées ont été dilués avec l'étalon HE4 A (étalon zéro). La concentration de HE4 a été déterminée pour chaque dilution et le pourcentage de récupération (%) a été calculé. Les données représentatives de cette étude sont résumées dans le tableau ci-dessous*.

| Échantillon | Facteur de dilution final | Valeur obtenue (pM) | Valeur attendue (pM) | Pourcentage de récupération** (%) |
|-------------|---------------------------|---------------------|----------------------|-----------------------------------|
| 1 | Non dilué | 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 | Non dilué | 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 | Non dilué | 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 |

Récupération moyenne pour les trois échantillons dilués présentés ci-dessus = 101 %

* Données représentatives ; les résultats de chaque laboratoire peuvent varier par rapport à ces données.

**% récupération = conc. HE4 obtenue x facteur de dilution / conc. HE4 non diluée.

Spécificité analytique

La spécificité moyenne du test HE4 EIA est 100 ± 15 %. Les études de récupération effectuées ont comparé les sérums contenant les composés suivants aux concentrations indiquées avec les sérums de contrôle. La directive NCCLS EP7-A (25) a été utilisée pour concevoir les expériences d'interférence. Les substances et concentrations suivantes ont été testées sans donner d'interférences avec le test.

| Interférences endogènes | Concentration testée |
|--------------------------------|-----------------------------|
| Triglycérides | 30 mg/mL |
| Bilirubine | 0,2 mg/mL |
| Hémoglobine | 10 mg/mL |
| Protéine totale | 120 mg/mL |

| Interférences avec médicaments de chimiothérapie | Concentration testée |
|---|-----------------------------|
| Carboplatine | 500 µg/mL |
| Cisplatine | 165 µg/mL |
| Clotrimazole | 0,3 µg/mL |
| Cyclophosphamide | 500 µg/mL |
| Dexaméthasone | 10 µg/mL |
| Doxorubicine | 1,16 µg/mL |
| Leucovorine | 2,68 µg/mL |
| Melphalan | 2,8 µg/mL |
| Méthotrexate | 45 µg/mL |
| Paclitaxel | 3,5 ng/mL |

Interférences possibles avec des états pathologiques Le test HE4 EIA a été évalué sur des échantillons contenant des HAMA et des facteurs rhumatoïdes (FR) pour tester sa spécificité. Le % de récupération de cinq échantillons positifs pour les HAMA et cinq échantillons positifs pour les FR a été évalué avec l'antigène HE4 enrichi dans chaque échantillon à près de 50 et 450 pM. Les résultats de récupération moyens sont résumés dans le tableau ci-dessous.*

| État clinique | Nombre d'échantillons | % de récupération moyen |
|----------------------|------------------------------|--------------------------------|
| HAMA | 5 | 101 |
| FR | 5 | 95 |

* Données représentatives ; les résultats de chaque laboratoire peuvent varier par rapport à ces données.

GARANTIE

Les données de performance présentées ici ont été obtenues à l'aide de la procédure de dosage indiquée. Toute modification de la procédure non recommandée par Fujirebio Diagnostics peut affecter les résultats, auquel cas Fujirebio Diagnostics décline toutes les garanties explicites, implicites ou légales, y compris la garantie implicite de qualité marchande et de conformité du produit.

REFERENCES

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.

Fiche de protocole

HE4 EIA REF 404-10

Préparer les composants juste avant emploi. Utiliser les conditions d'incubation et de lavage conformément aux instructions.

Remarque : le test doit être réalisé à une température comprise entre 20 et 25°C pour obtenir des résultats précis.

| Étap | Flacon / plaque | Procédure | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--|---|------------------|---------------------------|---------------------------|---|----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|----|-----|----|----|-----|----|----|-----|----|
| 1. Préparer les étalons HE4 | CAL HE4 | Ajouter 1 mL d'eau distillée ou déionisée dans chaque flacon et mélanger doucement. Laisser reposer pendant au moins 15 minutes. REMARQUE : la concentration exacte de chaque étalon est indiquée sur l'étiquette. Stabilité reconstituée : 4 semaines à 2 - 8°C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Préparer les contrôles HE4 | B, C, D, E, F CONTROL HE4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Préparer la solution de lavage | 1, 2 WASHBUF 25X | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Préparer la solution de travail du traceur | CONJ Anti-HE4 DIL CONJ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Nb. de barrettes</th> <th>Traceur HRP anti-HE4 (µL)</th> <th>Diluant pour traceur (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> | Nb. de barrettes | Traceur HRP anti-HE4 (µL) | Diluant pour traceur (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 |
| Nb. de barrettes | Traceur HRP anti-HE4 (µL) | Diluant pour traceur (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. Laver | MICROPLA | Laver chaque puits une fois avec la solution de lavage. Utiliser un laveur automatique ou manuel. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3. Ajouter les étalons, contrôles et échantillons | CAL HE4 A, B, C, D, E, F CONTROL HE4 1, 2 | 25 µL dans chaque puits | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4. Ajouter la biotine anti-HE4 | BIOTIN Anti-HE4 | 100 µL dans chaque puits | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5. Incuber | MICROPLA | Agiter pendant 1 heure entre 20 et 25°C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6. Laver | MICROPLA | Laver chaque puits trois fois avec la solution de lavage. Utiliser un laveur automatique ou manuel. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7. Ajouter la solution de travail du traceur | TRACER WORKING SOLUTION | 100 µL dans chaque puits | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8. Incuber | MICROPLA | Agiter pendant 1 heure entre 20 et 25°C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9. Laver | MICROPLA | Laver chaque puits six fois avec la solution de lavage. Utiliser un laveur automatique ou manuel. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10. Ajouter le substrat TMB HRP | SUBS TMB | 100 µL dans chaque puits | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 11. Incuber | MICROPLA | 30 min. de 20 à 25°C en agitant | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12. Lire l'absorbance | MICROPLA | 620 nm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Étape 12 mod. Ajouter la solution d'arrêt | STOP | 100 µL dans chaque puits | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Étape 13 mod. Mélanger | MICROPLA | Mélanger entre 20 et 25°C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Étape 14 mod. Lire l'absorbance | MICROPLA | Lire à 405 nm dans les 15 min | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |



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.fdab.com