



## HE4 EIA

Prod. No. 404-10

Istruzioni per l'uso

2008-09

Dosaggio Immunoenzimometrico

96 tests

### FINALITA' DEL TEST

HE4 è un dosaggio immunoenzimometrico per la determinazione quantitativa di HE4 nel siero umano. Il dosaggio viene proposto nel monitoraggio della risposta terapeutica in pazienti affette da tumore ovarico epiteliale invasivo. Il dosaggio seriale di HE4 nelle pazienti dovrebbe essere effettuato congiuntamente agli altri metodi clinici comunemente usati nel monitoraggio di questa malattia.

Il dosaggio deve essere effettuato unitamente ad ARCHITECT CA 125 II oppure a CanAg CA125 EIA allo scopo di quantificare il rischio di tumore epiteliale ovarico in donne in pre e post menopausa che presentano una massa pelvica. I risultati devono essere interpretati unitamente agli altri metodi previsti dalle direttive standard relative alla gestione clinica delle pazienti.

### INTRODUZIONE

La proteina 4 dell'epididimo umano appartiene alla famiglia WFDC (Whey Acidic Four-Disulphide Core) e presenta probabili proprietà di inibitore della tripsina. Altre proteine di questa famiglia includono SLPI, Elafina e PS20 (WFDC1) (1,2). Il gene HE4 codifica una proteina di 13kD, anche se nella sua forma glicosilata matura la proteina è approssimativamente 20-25 kD e consiste di un singolo peptide contenente due regioni WFDC (3). HE4 è stata dapprima identificata nell'epitelio dell'epididimo distale ed originariamente considerata un inibitore della proteasi coinvolta nella maturazione dello sperma (4,5). HE4 viene espressa da numerosi tessuti normali come gli epitelii dell'apparato respiratorio e tessuti dell'apparato riproduttivo come pure nel tessuto ovarico canceroso (6-10). Oltre all'espressione a livello cellulare, HE4 è stata dosata ad alta concentrazione nel siero di pazienti con tumore ovarico. In uno studio che metteva a confronto pazienti con tumore ovarico con pazienti sani o con patologie ovariche benigne, Hellström et al. trovarono che HE4 veniva espresso nel tumore ovarico con una sensibilità del 67% ad un livello di specificità del 96% (11). In uno studio susseguente che valutava numerosi biomarcatori tumorali, HE4 mostrava la più alta sensibilità per la determinazione del tumore ovarico, specialmente negli stadi precoci della malattia. In questo studio la combinazione di HE4 e CA125 ha evidenziato un valore

predittivo per il tumore più accurato di quello di ogni singolo marcatore, con una sensibilità del 76% ed una specificità del 95% (12).

Il tumore dell'ovaio è al quarto posto quale responsabile di morte per tumore nelle donne in tutto il mondo (13). La sintomatologia del tumore dell' ovaio è correlata alla presenza di masse addensanti che sono spesso vaghe ed aspecifiche. L'obiettivo primario della determinazione diagnostica di una massa addensante è determinare se essa sia benigna o maligna. Si stima che dal 5 al 10% delle donne negli Stati Uniti vengano sottoposte ad intervento chirurgico per una sospetta neoplasia ovarica nel corso della loro vita e che nel 13-21% di questi casi si tratti effettivamente di tumore ovarico (14). The American College of Obstetricians and Gynecologists Practice Bulletin ha pubblicato nel 2007 la seguente notizia "Le donne con tumore ovarico la cui cura è stata affidata a medici con grande esperienza ed avanzata pratica operatoria nel trattamento di questa malattia, quali i ginecologi oncologi, hanno raggiunto livelli di sopravvivenza superiori a quelli ottenuti quando il trattamento del paziente viene effettuato da personale non specialistico" (15). Dal momento che la maggior parte delle masse addensanti sono benigne, è importante determinare a livello pre-operatorio se una paziente è ad alto rischio di tumore ovarico allo scopo di assicurare una corretta gestione della paziente (15). Fin dai primi resoconti nel 1988 la valutazione clinica, il livello serico di CA125 e gli Ultrasuoni unitamente alla Tomografia Computerizzata (CT), la Risonanza Magnetica (MRI) ed il PET sono stati gli standard di riferimento più seguiti nella valutazione della possibile malignità di una massa pelvica (16). Sebbene la letteratura riporti parecchi lavori che descrivono quale modalità sia più accurata nel trattamento della massa pelvica, sicuramente la combinazione della visita specialistica, del CA125 e dell' "imaging" fornisce il più alto valore predittivo positivo (17-19). Per migliorare l'ammnesi delle pazienti che presentano una massa pelvica, HE4 EIA può essere usato sia con ARCHITECT CA125 II che con CanAg CA125 EIA come un ulteriore elemento per la definizione del rischio di sviluppo di tumore ovarico epiteliale da parte della paziente. I risultati devono essere interpretati congiuntamente a quelli ottenuti con gli altri metodi usati secondo le direttive della gestione clinica standard delle pazienti. Un ulteriore uso di HE4 è il monitoraggio della risposta alla terapia in pazienti con tumore ovarico epiteliale invasivo. I risultati devono essere interpretati unitamente agli altri metodi clinici usati per il monitoraggio del tumore ovarico.

## **PRINCIPIO DEL DOSAGGIO**

Il metodo immunoenzimatico utilizzato da HE4 EIA è di tipo fase solida, sandwich diretto non competitivo che usa due anticorpi monoclonali murini, 2H5 e 3D8, diretti contro due epitopi nella regione C-WFDC di HE4. I calibratori, i controlli ed i campioni vengono incubati in pozzetti sensibilizzati con streptavidina unitamente con l'anticorpo monoclonale biotinilato (Mab) 2H5 Anti-HE4. L'antigene HE4 presente nei calibratori o nei campioni si lega ai pozzetti sensibilizzati con streptavidina tramite l'anticorpo monoclonale biotinilato Anti-HE4 durante l'incubazione.

I pozzetti vengono quindi lavati ed incubati con Anti-HE4 MAb 3D8 marcato con HRP . Dopo il lavaggio il reagente tamponato Substrato/Cromogeno (perossido d'idrogeno e 3, 3', 5, 5' tetrametil benzidina) viene dispensato in tutti i pozzetti attivando in tal modo la reazione enzimatica. Durante la reazione enzimatica si sviluppa una colorazione blu nel caso l'antigene sia presente. L'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di HE4 presente nei campioni. L'intensità del

colore viene misurata per mezzo di un lettore spettrofotometrico di micropiastre alla lunghezza d'onda di 620 nm (oppure a 405 nm dopo l'aggiunta del Reattivo Bloccante). Le curve di calibrazione vengono estrapolate dai valori di assorbanza ottenuti alla concentrazione di ogni calibratore. La concentrazione di HE4 nei campioni viene quindi letta sulla curva di calibrazione.

## REATTIVI

- Ogni kit HE4 EIA contiene reattivi sufficienti per eseguire 96 dosaggi
- La data di scadenza è specificata sull'etichetta posta sull'esterno della scatola del kit
- Non usare il prodotto oltre la data di scadenza
- Non mescolare i reattivi provenienti da kit di lotti diversi
- Conservare il kit a 2-8°C. Non congelare
- I reattivi una volta aperti sono stabili alle condizioni descritte nella tabella che segue a condizione che non siano contaminati, vengano conservati nei flaconi originali opportunamente chiusi e manipolati come prescritto. Riportare i reattivi a 2-8°C immediatamente dopo l'uso.

Componenti	Quantità	Stabilità e conservazione dopo apertura
<b>MICROPLA</b>		
<b>Micropiastra sensibilizzata con streptavidina</b>	1 Piastra	2-8°C fino alla scadenza riportata sulla micropiastra

12x8 pozzetti a frattura prestabilita sensibilizzati con streptavidina. Dopo l'apertura riporre immediatamente le strips non usate nella busta di alluminio contenente l'essiccatore. Richiudere attentamente in modo da conservare in ambiente asciutto.

<b>CAL</b>	<b>HE4</b>	<b>A</b>
<b>HE4 Calibratore A</b>	1 x 8 mL	2-8°C fino alla scadenza riportata sul flacone

Soluzione salina in tampone fosfato contenente sieralbumina bovina, un colorante giallo inerte ed un conservante anti-microbico non azidico. Pronto all'uso deve anche essere usato per la diluizione dei campioni.

Componenti	Quantità	Stabilità e conservazione dopo apertura			
<b>HE4 Calibratori B-F</b>	5 flaconi, liofilizzati	Stabilità dopo ricostituzione 4 settimane a 2-8°C 4 mesi ad almeno -20°C			
<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			

I calibratori liofilizzati contengono l'antigene HE4 in soluzione salina in tampone fosfato contenente sieralbumina bovina, un colorante giallo inerte ed un conservante anti-microbico (non azide).

Ricostituire con acqua distillata o demineralizzata prima dell'uso.

**NOTA** : L'esatta concentrazione di HE4 varia da lotto a lotto ed è riportata sull'etichetta di ogni flacone.

<b>HE4 Controlli</b>	2 flaconi, liofilizzati	Stabilità dopo ricostituzione 4 settimane a 2-8°C 4 mesi ad almeno -20°C			
<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			

I controlli liofilizzati contengono l'antigene HE4 in una matrice di siero umano contenente un conservante anti-microbico (non azide). Ricostituire con acqua distillata o deionizzata prima dell'uso.

Componenti	Quantità	Stabilità e conservazione dopo apertura
------------	----------	---

<b>BIOTIN</b>	<b>Anti-HE4</b>
---------------	-----------------

<b>Biotina Anti-HE4</b>	1 x 15 mL	2–8°C fino alla scadenza riportata sul flacone
-------------------------	-----------	--

Biotina Anti-HE4 anticorpo monoclonale di origine murina, approssimativamente 1 µg/mL. Contiene soluzione salina in tampone fosfato (pH 7.2), sieroalbumina bovina, agenti bloccanti, detergenti, un colorante rosso inerte ed un conservante anti-microbico (non azide). Pronto all'uso.

<b>CONJ</b>	<b>Anti-HE4</b>
-------------	-----------------

<b>Tracciante, HRP Anti-HE4</b>	1x 0.75 mL	2–8°C fino alla scadenza riportata sul flacone
---------------------------------	------------	--

Soluzione stock di HRP Anti-HE4 anticorpo monoclonale di origine murina, approssimativamente 40 µg/mL. Contiene conservanti anti-microbici (non azide). Diluire col Diluente del Tracciante prima dell'uso.

<b>DIL</b>	<b>CONJ</b>
------------	-------------

<b>Diluente del tracciante</b>	1 x 15 mL	2–8°C fino alla scadenza riportata sul flacone
--------------------------------	-----------	--

Tampone fosfato (pH 7.2) con sieroalbumina bovina, agenti bloccanti, detergenti, un colorante blu inerte ed un conservante anti-microbico (non azide). Pronto all'uso.

<b>SUBS</b>	<b>TMB</b>
-------------	------------

<b>TMB HRP-Substrate</b>	1 x 12 mL	2–8°C fino alla scadenza riportata sul flacone
--------------------------	-----------	--

Contiene perossido d'idrogeno tamponato e 3, 3', 5, 5' tetra-metilbenzidina (TMB). Pronto all'uso.

<b>STOP</b>
-------------

<b>Reattivo bloccante</b>	1 x 15 mL	2–8°C fino alla scadenza riportata sul flacone
---------------------------	-----------	--

Contiene 0.12 M HCl. Pronto all'uso.

Componenti	Quantità	Stabilità e conservazione dopo apertura
------------	----------	---

<b>WASHBUF</b>	<b>25X</b>
----------------	------------

<b>Tampone Lavaggio concentrato</b>	1 x 50 mL	2–8°C fino alla scadenza riportata sul flacone
-------------------------------------	-----------	--

Diluire con H<sub>2</sub>O distillata o deionizzata x25 prima dell'uso. Soluzione salina tampone Tris-HCl con Tween 20. Contiene Germall II come conservante.

### Indicatori d'instabilità

La soluzione TMB HRP-substrato deve essere incolore o al massimo leggermente azzurra. Una intensa colorazione blu significa che il reattivo è stato contaminato e pertanto non deve essere usato.

### AVVERTENZE E PRECAUZIONI

#### Per uso diagnostico in vitro

- Seguire le istruzioni del package insert. L'affidabilità dei risultati non può essere garantita se le istruzioni non vengono fedelmente seguite
- Manipolare i campioni dei pazienti come potenzialmente infetti. Si raccomanda che i reattivi di derivazione umana ed i campioni umani vengano manipolati secondo le indicazioni contenute in OSHA Standard o Bloodborne pathogen (20).
- Seguire le normative vigenti relative all'eliminazione del materiale usato

#### Precauzioni

Il materiale usato nella preparazione dei reattivi di origine umana è stato testato e trovato Non Reattivo per l'anticorpo anti-HIV 1-2, per l'anticorpo anti-HCV e per l'antigene di superficie dell'Epatite B (HbsAg). Tuttavia poichè nessun metodo diagnostico è in grado di escludere completamente la possibilità di trasmissione di infezioni attraverso il sangue si consiglia di manipolare questi reattivi di origine umana come potenzialmente infettivi.

### PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Il kit HE4 EIA richiede l'uso di campioni di siero umano (incluso il siero raccolto in tubi separatori (SST). Plasma ed altri liquidi biologici non sono stati dosati per l'uso con HE4 . Prelevare il sangue per via venosa e seguire le istruzioni per la raccolta del sangue fornite dal produttore delle provette. Quando vengono valutati campioni seriali, lo stesso tipo di campionatura deve essere seguita in tutte le fasi dello studio. I campioni si possono conservare a 2-8°C per 3 giorni prima di essere testati. Per periodi più lunghi conservare i campioni ad almeno -40°C. Portare i campioni congelati a temperatura ambiente e mescolarli ACCURATAMENTE facendo ruotare dolcemente il tubo da saggio prima del test. I campioni che contengono grossi particolati dovrebbero essere centrifugati a 10 000 x g,

10 minuti in modo tale da rimuovere tutti gli aggregati che si possono formare durante il processo di scongelamento.

## PROCEDIMENTO OPERATIVO

### Materiali richiesti per il dosaggio ma non forniti con il kit

#### 1. Agitatore di micropiastre

L'agitazione va effettuata con modalità mediamente vigorose ad approssimativamente 700-1100 oscillazioni/min.

#### 2. Lavatore di micropiastre

Lavatore di micropiastre automatico in grado di effettuare 1, 3 e 6 cicli di lavaggio, e con un minima capacità di pipettare 350µL/pozzetto/ciclo di lavaggio. Si consiglia l'uso di una pipetta ad 8 canali con puntali di plastica monouso del volume di 350µL nel caso che un lavatore di micropiastre automatico non sia disponibile.

#### 3. Spettrofotometro per micropiastre

Lettore spettrofotometrico con lunghezza d'onda a 620nm e/o 405nm ed un intervallo di assorbanza da 0 a 3.0.

#### 4. Pipette di precisione

Con puntali monouso in grado di dispensare microlitri. Utili ma non indispensabili per dispensare 100 µl sono le pipette a 8 canali o i dispensatori graduati con puntali di plastica monouso. Pipette in grado di dispensare millilitri.

#### 5. Acqua distillata o deionizzata

Per la ricostituzione dei calibratori e dei controlli HE4 e per la preparazione della soluzione di lavaggio diluita.

## NOTE

1. La comprensione globale di questo libretto d'istruzioni garantisce l'uso appropriato del kit HE4 EIA. I reattivi forniti col kit devono essere usati come una unità integrale. Non mescolare reattivi di kit con differente numero di lotto. Non usare i reattivi dopo la data di scadenza indicata sull'esterno della scatola del kit.
2. Portare i reattivi a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso. I campioni congelati devono essere gentilmente ma accuratamente mescolati dopo il scongelamento. **Il dosaggio deve essere effettuato ad una temperatura compresa tra 20-25° C per ottenere risultati accurati.**
3. Prima di dispensare i calibratori ed i campioni dei pazienti è consigliabile segnare le strip in modo tale da poterle facilmente identificare durante e dopo il dosaggio.
4. Una attenta procedura di lavaggio delle strip è un passaggio essenziale nei dosaggi immunoenzimatici. **Assicurarsi che ogni pozzetto sia completamente riempito fino al bordo superiore con il tampone di lavaggio ad ogni ciclo di lavaggio, che il tampone di lavaggio venga dispensato con un buon flusso, che l'aspirazione del liquido nei pozzetti fra un lavaggio e l'altro ed alla fine dei lavaggi sia completa, in modo tale che i pozzetti rimangano**

**completamente asciutti. In caso rimanga del liquido residuo nei pozzetti capovolgere la micropiastra premendola accuratamente su della carta assorbente.**

- Lavaggio automatico: seguire le istruzioni del produttore per la manutenzione dello strumento usato ed effettuare il numero richiesto di cicli di lavaggio prima e dopo ogni incubazione. I sistemi di lavaggio e di aspirazione non devono essere lasciati per lunghi periodi a contatto con il Tampone Lavaggio in quanto gli ugelli potrebbero intasarsi compromettendo l'efficienza delle operazioni di dispensazione ed aspirazione.
- 5.** Il TMB HRP-Substrato è molto sensibile alla contaminazione. Per garantire una stabilità ottimale del TMB HRP-Substrato versare la quantità necessaria dal flacone in un contenitore accuratamente pulito o preferibilmente in una vaschetta di plastica monouso in modo da evitare la contaminazione del reattivo. Usare puntali di plastica puliti monouso (o puntali di dispensatore).
- 6.** Assicurarsi di usare pipette con puntali di plastica monouso ed un appropriata tecnica di pipettamento quando si manipolano campioni e reattivi. Tenere il puntale della pipetta leggermente al di sopra del bordo superiore del pozzetto, evitando di toccare la superficie del liquido per non provocare contaminazione fra i pozzetti (carry over). Un appropriata tecnica di pipettamento è particolarmente importante quando si maneggia il TMB HRP-Substrato.

---

<b>Preparazione dei reattivi</b>	<b>Stabilità dei reattivi ricostituiti</b>
<b>HE4 Calibratori B-F</b>	4 settimane a 2-8°C 4 mesi ad almeno -20°C

Aggiungere 1.0 mL di acqua distillata o deionizzata ad ogni flacone. Far riposare per almeno 15 minuti per permettere una perfetta ricostituzione e mescolare gentilmente prima dell'uso. **NOTA:** La concentrazione dei calibratori è riportata sulle etichette e deve essere usata per il calcolo dei risultati.

---

<b>HE4 Controlli 1 and 2</b>	4 settimane a 2-8°C 4 mesi ad almeno -20°C
------------------------------	---

Aggiungere 1.0 mL di acqua distillata o deionizzata ad ogni flacone. Far riposare per almeno 15 minuti per permettere una perfetta ricostituzione e mescolare gentilmente prima dell'uso. **NOTA:** La concentrazione dei calibratori è riportata sulle etichette.

---

<b>Soluzione Lavaggio</b>	2 settimane a 20-25° in un contenitore accuratamente chiuso
---------------------------	---

Versare 50 mL di Tampone Lavaggio concentrato in un contenitore pulito e diluire x25 aggiungendo 1200 mL di acqua distillata o deionizzata ottenendo in tal modo una Soluzione Lavaggio tamponata.

---

**Preparazione dei reattivi**

---

---

**Stabilità dei reattivi ricostituiti**

---

**Soluzione lavoro del tracciante**

4 settimane at 2–8 °C in un contenitore accuratamente chiuso

Preparare la quantità necessaria di Soluzione lavoro del tracciante mescolando 50 µL di Tracciante, HRP Anti-HE4 con 1 mL di Diluente del tracciante per ogni strip (vedi tabella):

---

No. di Strips	Tracciante, HRP Anti-HE4 (µL)	Diluente del tracciante (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

---

Assicurarsi di usare un flacone di plastica o di vetro pulito per la preparazione della Soluzione lavoro del tracciante.

**Alternativa:** Versare il contenuto del flacone del Tracciante, HRP Anti-HE4 nel flacone del Diluente del tracciante e mescolare gentilmente. Assicurarsi che tutto il contenuto del flacone del Tracciante, HRP Anti-HE4 sia stato effettivamente trasferito in quello del Diluente del tracciante.

**NOTA:** la Soluzione lavoro del tracciante è stabile per 4 settimane a 2-8°C. Non preparare più Soluzione lavoro del tracciante del necessario ed assicurarsi che venga conservata correttamente.

**PROCEDIMENTO ANALITICO**

Eseguire in duplicato il dosaggio dei calibratori, controlli e dei campioni. Eseguire una curva di calibrazione per ogni seduta analitica. Tutti i reattivi ed i campioni devono essere portati a temperatura ambiente (20-25°C) prima di eseguire il dosaggio.

1. Iniziare a preparare i Calibratori B-F, i Controlli 1 e 2 la Soluzione Lavaggio e la Soluzione lavoro del tracciante. E' importante usare contenitori puliti. Seguire attentamente le istruzioni.
2. Trasferire il numero necessario di strips nell'apposito supporto (riporre immediatamente le restanti strips nella busta di alluminio contenente un essiccante e sigillare con cura). Lavare ogni strip una volta con la Soluzione Lavaggio. Non lavare un numero maggiore di strips di quelle che possono essere usate in 30 minuti.

3. Pipettare 25µL dei calibratori (CAL A, B, C, D, E ed F), dei controlli (C1, C2) e dei campioni (Unk) nei pozzetti seguendo lo schema sottoindicato:

	1	2	3	4	5	6	7 etc
A	Cal A	Cal E	1 st Unk				
B	Cal A	Cal E	1 st Unk				
C	Cal B	Cal F	2nd Unk				
D	Cal B	Cal F	2nd Unk				
E	Cal C	C1					
F	Cal C	C1					
G	Cal D	C2					
H	Cal D	C2					

4. Aggiungere 100 µL di Biotina Anti-HE4 ad ogni pozzetto usando una pipetta di precisione (od una pipetta di precisione da 100 µL ad 8 canali) Tenere il puntale della pipetta leggermente al disopra del bordo superiore del pozzetto, evitando di toccare la superficie del liquido per evitare la contaminazione (carry over).
5. Incubare la micropiastro per 1 ora ( $\pm$  5 min) a temperatura ambiente (20-25°C) agitando in continuazione con un agitatore per micropiastre.
6. Dopo la prima incubazione lavare 3 volte ogni strip, usando il procedimento di lavaggio descritto nelle Note Procedurali al punto 4.
7. Aggiungere 100 µL della Soluzione di lavoro del tracciante ad ogni pozzetto usando la stessa procedura descritta al punto 4.
8. Incubare per 1 ora ( $\pm$  5min) a temperatura ambiente in costante agitazione
9. Dopo la seconda incubazione aspirare e lavare ogni strip 6 volte, usando il procedimento di lavaggio descritto nelle Note Procedurali al punto 4.
10. Aggiungere 100 µL di TMB HRP Substrato ad ogni pozzetto usando la stessa procedura descritta al punto 4. Il TMB HRP Substrato deve essere dispensato nei pozzetti il più velocemente possibile ed il tempo di dispensazione fra il primo e l'ultimo pozzetto non deve superare i 5 minuti.
11. Incubare per 30 min ( $\pm$  5 min) a temperatura ambiente (20-25°C) con costante agitazione. Evitare l'esposizione diretta alla luce del sole.
12. Leggere subito l'assorbanza a 620nm usando uno spettrofotometro per micropiastre.

#### Opzione

Se uno spettrofotometro per micropiastre in grado di leggere a 620 nm non è disponibile in laboratorio la densità ottica può essere determinate come descritto sotto al punto 12.

**Alternativa 12:** Aggiungere 100µL di Reattivo Bloccante, mescolare e leggere l'assorbanza a 405 nm con uno spettrofotometro per micropiastre entro 15 minuti.

### **Intervallo di misura**

HE4 EIA misura concentrazioni comprese fra 15 e 900 pM. Se si devono misurare concentrazioni superiori si raccomanda di diluire i campioni con HE4 Calibratore A prima dell'analisi (vedi "Calcolo dei risultati con i campioni diluiti").

### **Controllo di Qualità**

I controlli HE4 numero 1 e 2 possono essere usati per la validazione delle serie analitiche. Gli intervalli dei risultati attesi sono indicati sulle etichette dei flaconi. I risultati del dosaggio di HE4 dovrebbero essere considerati validi se:

- I valori medi dei duplicati dei controlli sono all'interno degli intervalli prestabiliti
- Le repliche dei duplicati dei calibratori B-F e dei controlli non danno un CV superiore a 15%
- Le repliche dei duplicati del calibratore A (zero) non presentano una con l'altro variazioni di OD superiori alle 0.06 unità

Se per calibratori e controlli si ottengono valori al di fuori degli intervalli indicati, bisogna effettuare un controllo completo della funzionalità dei reattivi, della precisione delle pipette e della funzionalità del lettore e l'analisi deve essere ripetuta. Si raccomanda a tutti i laboratori di preparare i propri pool di sieri a diverse concentrazioni da usare come controlli interni per garantire la precisione del dosaggio.

### **Riferimenti**

Poiché non esistono riferimenti ufficiali per l'antigene HE4, il valore dei calibratori di HE4 EIA vengono definiti sulla base di un set di standard di riferimento interno.

### **CALCOLO DEI RISULTATI**

Se viene usato uno spettrofotometro con procedimento di calcolo programmato consultare il manuale e creare un programma usando le concentrazioni riportate sulle etichette di ogni calibratore HE4.

Per il calcolo automatico dei risultati di HE4 si raccomanda di usare uno dei seguenti metodi:

- Metodo di fitting con curva spline cubica: inserire il calibratore A nella curva col valore 0 pM
- Interpolazione con valutazione punto a punto. Il calibratore A deve essere incluso nella curva col valore 0 pM
- Metodo di fitting con curva quadratica. Il calibratore A deve essere incluso nella curva col valore 0 pM

**NOTA:** Si sconsiglia di usare metodi di valutazione 4-parametrica o di regressione lineare.

Per la valutazione manuale si costruisce una curva di calibrazione tracciando i valori di assorbanza (A) ottenuti per ogni calibratore HE4 contro le corrispondenti concentrazioni di HE4 espresse in pM.

La concentrazione ignota può quindi essere letta sulla curva di calibrazione usando il valore medio di assorbanza di ogni campione.

### **Calcolo dei risultati con campioni diluiti**

Se i campioni ad una prima analisi danno valori di HE4 superiori a 900 pM devono essere diluiti 1/10 ed 1/100 con il calibratore A di HE4 per ottenere una più accurata concentrazione di HE4.

- diluizione 1/10 = 50µL di campione + 450µL di Calibratore A di HE4
- diluizione 1/100 = 50µL di diluizione 1/10 + 450µL di Calibratore A di HE4

La concentrazione dei campioni non diluiti viene pertanto calcolata nel seguente modo:

- Diluizione 1/10 : 10 x il valore misurato
- Diluizione 1/100 : 100 x il valore misurato

### **Algoritmo di Rischio di Tumore Ovarico (ROMA) per stimare il rischio di cancro epiteliale ovarico in donne che presentano una massa pelvica in periodo premenopausale o postmenopausale**

#### **Calcolo dell'Indice Predittivo**

L'indice Predittivo (PI) viene calcolato separatamente per le donne in pre menopausa e quelle in post menopausa usando le equazioni (1) e (2) sotto elencate. Per calcolare il PI, i valori ottenuti dal dosaggio di HE4 EIA e dal dosaggio di CA125 sia con ARCHITECT CA125 II che con CanAg CA125 EIA vengono inseriti nell'equazione dell'algoritmo sottostante, a seconda dello stato di menopausa della donna.

(1) Donne in premenopausa

$$\text{Indice Predittivo (PI)} = -12.0 + 2.38 \cdot \text{LN}[\text{HE4}] + 0.0626 \cdot \text{LN}[\text{CA125}]$$

(2) Donne in postmenopausa

$$\text{Indice predittivo (PI)} = -8.09 + 1.04 \cdot \text{LN}[\text{HE4}] + 0.732 \cdot \text{LN}[\text{CA125}]$$

#### **Calcolo del valore di ROMA**

Per calcolare il valore di ROMA (Probabilità Predittiva), inserire i valori calcolati per l'indice predittivo nell'equazione (3):

$$(3) \text{ ROMA valore (\%)} = \text{valore atteso (PI)} / [1 + \text{valore atteso (PI)}] \cdot 100$$

Gli esempi sottostanti possono essere usati per validare il calcolo del PI ed il valore di ROMA :

Stato menopausale	HE4 (pM)	CA125 (U/mL)	Calcolo del PI	PI	ROMA (%)
Premenopausa	37.5	74.9	$-12.0 + (2.38 \cdot 3.624) + (0.0626 \cdot 4.316)$	-3.10388	4.29
Premenopausa	386.6	21.8	$-12.0 + (2.38 \cdot 5.957) + (0.0626 \cdot 3.082)$	2.371517	91.5
Postmenopausa	66.7	11.3	$-8.09 + (1.04 \cdot 4.200) + (0.732 \cdot 2.425)$	-1.94683	12.5
Postmenopausa	383.1	22.7	$-8.09 + (1.04 \cdot 5.948) + (0.732 \cdot 3.122)$	0.381799	59.4

### **LIMITI DEL DOSAGGIO**

Pazienti con tumore ovarico confermato possono avere valori di HE4 dello stesso livello delle donne sane. Alcuni tipi istologici di tumore ovarico ad esempio di tipo mucinico o a cellule germinali raramente esprimono HE4 per cui HE4 non è raccomandabile per il monitoraggio di pazienti con confermato tumore ovarico di natura mucinica o a cellule germinali (7). Al contrario, elevati livelli di HE4 possono essere presenti in individui con malattia benigna. Pertanto la concentrazione di HE4 non può essere intesa come evidenza assoluta della presenza o della assenza di patologia tumorale ed il dosaggio di HE4 non deve essere usato per lo screening del tumore. I risultati del dosaggio sono interpretabili solo unitamente ad altri sistemi di indagine della diagnosi della malattia ed il dosaggio di HE4 non può sostituire altri metodi consolidati di valutazione clinica.

L'algoritmo per il rischio di tumore ovarico maligno non è stato validato per i seguenti gruppi di pazienti: pazienti precedentemente trattati contro il cancro, pazienti sotto trattamento chemioterapico e pazienti con età inferiore a 18 anni. La formula della funzione matematica definita ROMA (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm) dipende dalle condizioni di premenopausa o postmenopausa della donna. Lo stato di premenopausa o postmenopausa viene definito sulla base della funzionalità dell'ovaio, determinato attraverso la valutazione clinica e l'anamnesi medica. I dati forniti da ROMA non considerano l'età, la storia familiare, le informazioni cliniche o di diagnostica d'immagine, e pertanto dovrebbero essere interpretati insieme a questi parametri.

Non determinare HE4 EIA e/o CA125 come indicato od errori nel calcolo dei risultati potrebbero condurre ad una valutazione inaccurata del rischio di tumore epiteliale ovarico e ad una non appropriata gestione del paziente. Specificatamente un falso basso valore del dosaggio potrebbe indurre a considerare il paziente a basso rischio con conseguenti possibili applicazioni di terapie meno specializzate. Pertanto l'uso dei risultati del dosaggio senza considerare altri elementi informativi di laboratorio, studi di immagine e considerazioni cliniche potrebbe pertanto comportare dei rischi.

Anticorpi diretti contro agenti contenuti nei reattivi (anticorpi umani anti-topo (HAMA) od anticorpi eterofili) presenti nel siero dei pazienti possono occasionalmente interferire nel dosaggio, anche se specifiche sostanze bloccanti sono contenute nel tampone.

**Il dosaggio deve essere effettuato in ambienti a temperatura controllata poichè incubazioni a temperature più elevate di quelle raccomandate (20 – 25°C) potrebbero dare falsi bassi valori**

## VALORI ATTESI

La distribuzione dei livelli di HE4 determinati in 1147 campioni è mostrata nella tabella sottostante

Distribuzione dei Valori del Dosaggio di HE4					
	Numero di soggetti	0 - 150 pM	150.1 - 300 pM	300.1 - 500 pM	> 500 pM
<b>APPARENTEMENTE SANI</b>					
Femmine (Premenopausa)	76	72	3	0	1
Femmine (Postmenopausa)	103	97	5	0	1
<b>MALATTIA BENIGNA</b>					
Gravidanza	22	21	1	0	0
Patologia Ginecologica Benigna	347	324	18	1	4
Altre Patologie Benigne	108	82	8	7	11
Iperensione/Cardiopatie congenite	96	75	16	2	3
<b>TUMORE</b>					
Tumore Ovarico	127	27	18	21	61
Tumore Mammario	46	40	4	2	0
Tumore Polmonare	50	29	15	6	0
Tumore dell' Endometrio	116	86	15	4	11
Tumore Gastrointestinale	56	47	8	0	1

In questo studio il 94,4% dei soggetti femminili sani presenta valori di HE4 di 150 pM o inferiori.

Si raccomanda che ogni laboratorio stabilisca i propri valori di riferimento relativi alla popolazione d'interesse.

### Monitoraggio dello Stato della Malattia in Pazienti con Diagnosi di Tumore Ovarico

L'efficacia della determinazione di HE4 nel monitoraggio dello stato della malattia nelle pazienti con tumore ovarico è stata determinata confrontando le variazioni di concentrazione di HE4 in campioni seriali di siero di 80 pazienti con le variazioni dello stato della malattia. E' stato condotto uno studio su un totale di 354 paia di osservazioni con una media di 4,4 osservazioni per paziente. Una variazione positiva di HE4 viene definita come un aumento del valore di almeno il 25% superiore al valore del dosaggio precedente. Tale livello di variazione tiene conto della variabilità del dosaggio e della variabilità biologica. Il 60% (76/126) dei campioni delle pazienti con una variazione positiva correlava con la progressione della malattia mentre il 75% (171/228) dei campioni seriali delle pazienti senza significative variazioni di HE4 correlava con nessuna progressione della malattia.

La concordanza totale è stata del 70% (247/354). La tabella seguente presenta i dati in formato 2x2.

Variazioni dello Stato della Malattia per Paia Sequenziali			
Aumento della concentrazione di HE4	Progressioni	N° di Progressioni	Totale
>25%	76	57	133
≤25%	50	171	221
Total	126	228	354

La tabella seguente mostra la distribuzione per paziente. Il 93% (54/58) dei pannelli di siero per paziente con una variazione positiva correlava con la progressione della malattia mentre il 32% (7/22) dei pannelli di siero che non mostravano variazioni significative di HE4 correlavano con nessuna progressione della malattia. La concordanza totale è stata del 76% (61/80)

Variazioni dello Stato della Malattia per Paziente			
Aumento della concentrazione di HE4	Progressioni	N° di Progressioni	Totale
>25%	54	15	69
≤25%	4	7	11
Total	58	22	80

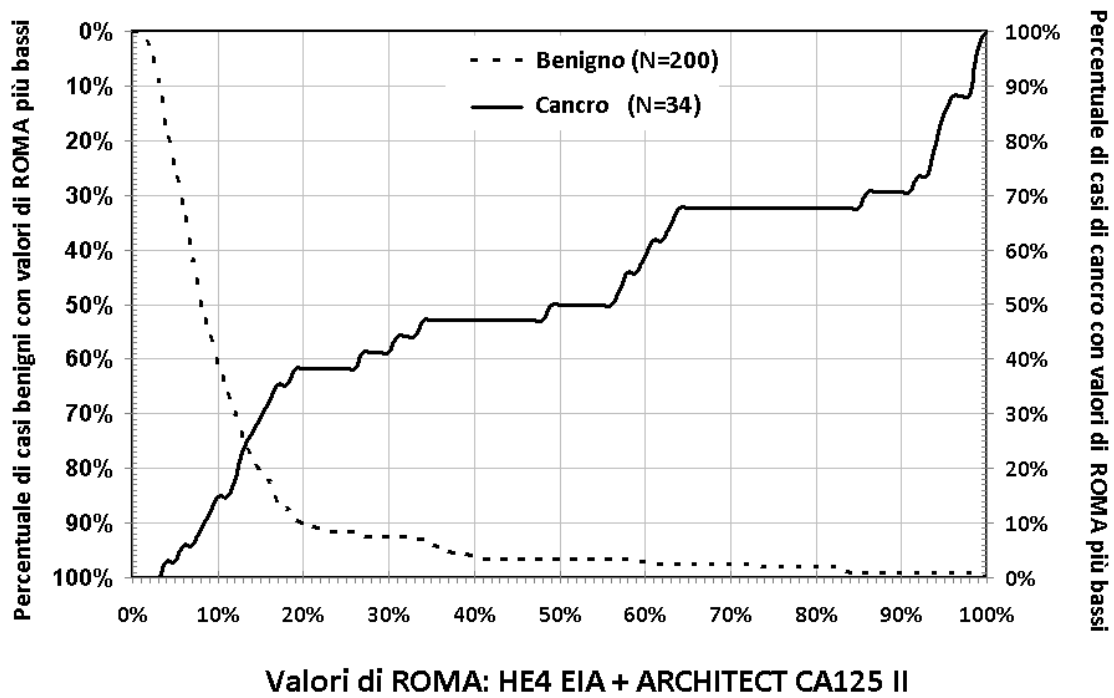
### Valutazione del rischio in pazienti che presentano masse pelviche

L'efficacia della determinazione di HE4 insieme a CA125 determinata sia con ARCHITECT CA125 II che con CanAg CA125 EIA nella valutazione del rischio di tumore ovarico epiteliale in pazienti che presentano masse pelviche è stata determinata in uno studio clinico doppio-cieco prospettico multi-centrico.

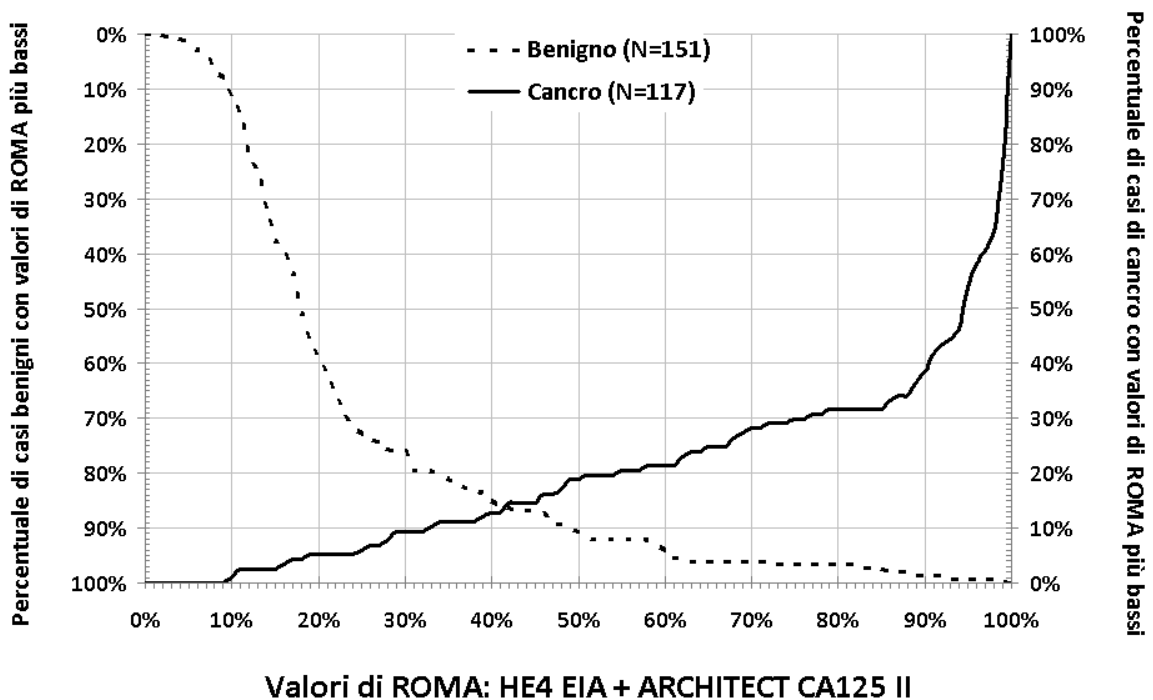
L'algoritmo (ROMA vedi pagina 12) è stato sviluppato allo scopo di stimare la probabilità di tumore epiteliale ovarico. L'algoritmo ROMA considera i valori di HE4 e CA125 come pure lo stato di menopausa delle pazienti. L'algoritmo calcola la probabilità predittiva di trovare un tumore epiteliale ovarico nel corso dell'intervento chirurgico. Nello studio prospettico sono state incluse un totale di 502 pazienti ed è stata determinata sia la probabilità predittiva di tumore ovarico che la capacità di separare i gruppi di pazienti ad alto e basso rischio per mezzo dell'algoritmo ROMA.

La frequenza cumulativa della distribuzione dei valori di ROMA rispettivamente per la patologia benigna che per il tumore ovarico inclusi i tumori a basso potenziale di malignità (LMP), usando l'algoritmo ROMA, è mostrato nelle figure 1 e 2 per HE4 EIA e ARCHITECT CA125 II e nelle figure 3 e 4 per HE4 e CanAg CA125 EIA. I grafici della frequenza di distribuzione mostrano la distribuzione dei pazienti con patologia benigna e con tumore epiteliale ovarico (inclusi LMP) a differenti valori di cut-point di ROMA

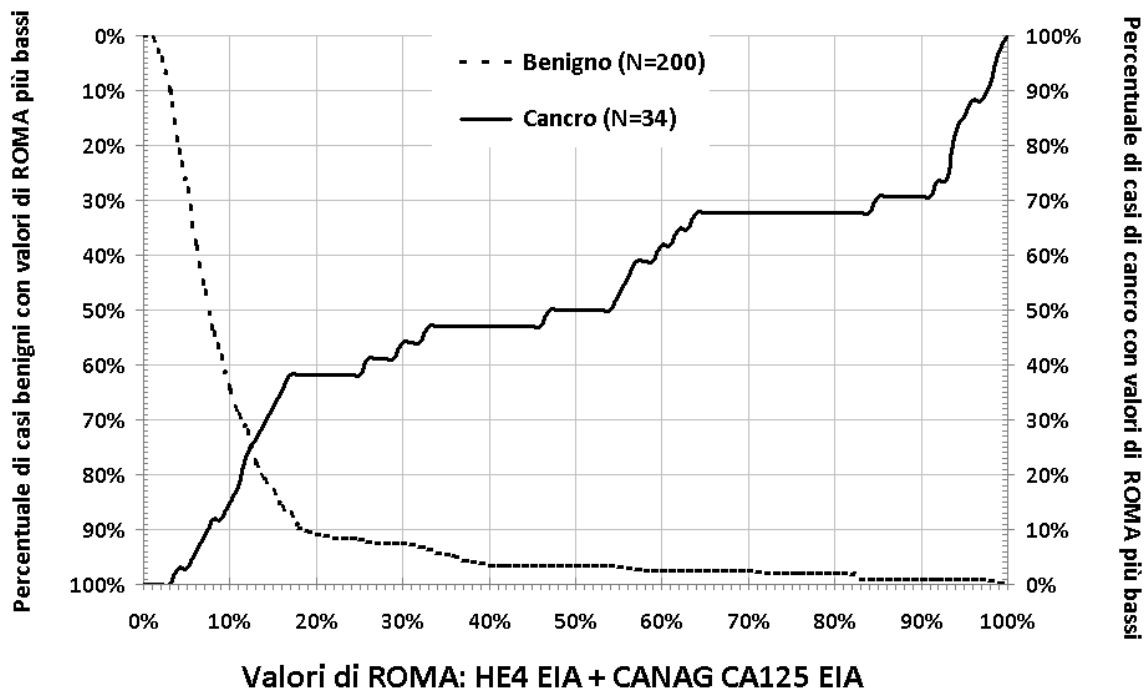
**Fig. 1** Frequenza cumulativa della distribuzione dei valori di ROMA nelle donne in **premenopausa**  
 Combinazione HE4 EIA + ARCHITECT CA125 II



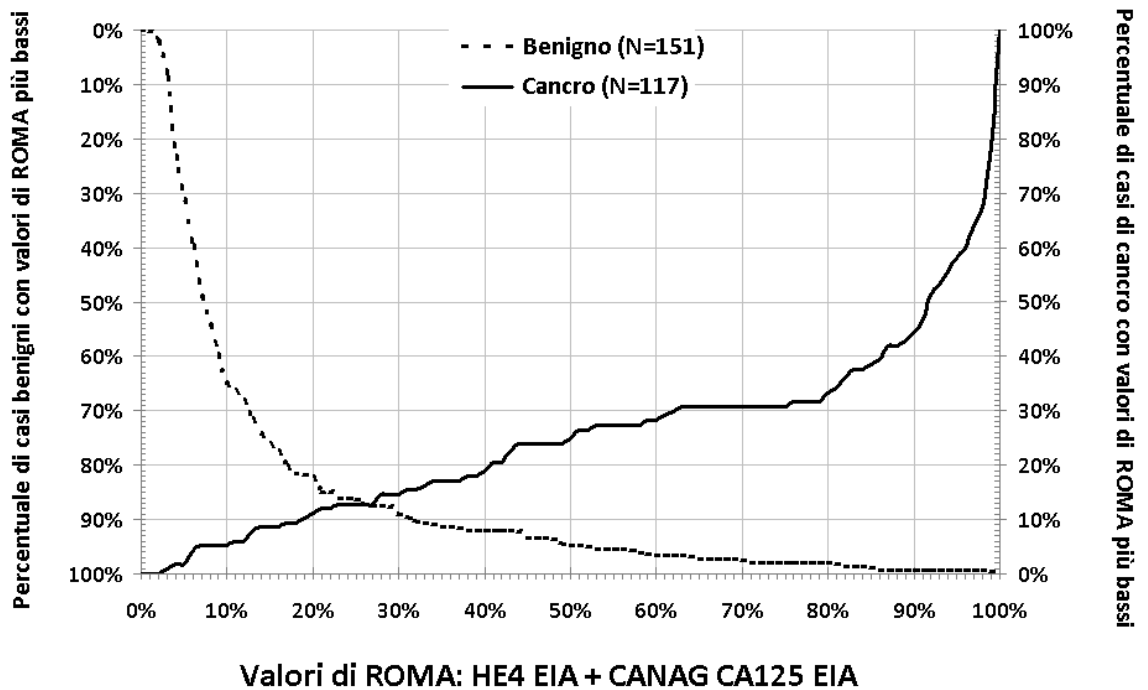
**Fig. 2** Frequenza cumulativa della distribuzione dei valori di ROMA nelle donne in **postmenopausa**  
 Combinazione HE4 EIA + ARCHITECT CA125 II



**Fig. 3** Frequenza cumulativa della distribuzione dei valori di ROMA nelle donne in **premenopausa**  
 Combinazione HE4 EIA + CanAg CA125 EIA



**Fig. 4** Frequenza cumulativa della distribuzione dei valori di ROMA nelle donne in **postmenopausa**  
 Combinazione HE4 EIA + CanAg CA125 EIA



### **Stratificazione dei gruppi a basso rischio e ad alto rischio**

L'algoritmo ROMA è stato usato per stratificare le donne in gruppi a rischio per il tumore epiteliale ovarico. I seguenti valori di riferimento sono stati usati allo scopo di ottenere un livello di specificità del 75% con la combinazione HE4 EIA e ARCHITECT CA125 II:

#### **Donne in premenopausa**

Valore di ROMA  $\geq$  13.1% = Alto rischio di tumore epiteliale ovarico

Valore di ROMA  $<$  13.1% = Basso rischio di tumore epiteliale ovarico

#### **Donne in postmenopausa**

Valore di ROMA  $\geq$  27.7% = Alto rischio di tumore epiteliale ovarico

Valore di ROMA  $<$  27.7% = Basso rischio di tumore epiteliale ovarico

La stratificazione del rischio in rischio elevato di considerare un tumore ovarico epiteliale in tutte le pazienti che presentano una massa pelvica utilizzando i valori di ROMA ad un livello del 75% di specificità è mostrato nella tabella 1 incluso il rischio di stratificazione ottenuto rispettivamente per gruppi separati di pazienti in premenopausa e post menopausa. La sensibilità per la stratificazione delle pazienti con tumore epiteliale ovarico negli stadi I-IV nel gruppo ad alto rischio è del 94% ad una specificità del 75% così che il 75% delle donne con massa pelvica benigna sono state classificate nel gruppo a basso rischio. I valori predittivi positivo e negativo erano rispettivamente il 58% ed il 97%.

**Tabella 1:** Stratificazione del rischio in rischio elevato di considerare Tumore Epiteliale Ovarico (EOC) nelle pazienti che presentano una massa pelvica usando la combinazione del dosaggio di HE4 EIA con ARCHITECT CA125 per calcolare il valore di Roma.

Cut-point premenopausale per la stratificazione in gruppo ad alto rischio alla specificità del 75%  $\geq$  13,1%

Cut-point postmenopausale per la stratificazione in gruppo ad alto rischio alla specificità del 75%  $\geq$  27,7%

	<b>Donne in premenopausa n = 234</b>	<b>Donne in postmenopausa n = 268</b>	<b>Donne in pre e postmenopausa combinate n = 502</b>
<b>Stadio I – IV EOC &amp; LMP combinati</b>	26/34 (76%)	108/117 (92%)	134/151 (89%)
<b>Basso potenziale di malignità (LPM)</b>	10/16 (63%)	3/6 (50%)	13/22 (59%)
<b>Stadio I-II EOC</b>	6/7 (86%)	24/28 (86%)	30/35 (86%)
<b>Stadio I – IIIC<sup>a</sup> EOC</b>	7/8 (88%)	35/39 (90%)	42/47 (89%)
<b>Stadio I – IV EOC</b>	16/18 (89%)	105/111 (95%)	121/129 (94%)

<sup>a</sup>Stadio I – IIIB & Stadio IIIC (Omentum negativo, linfonodi positivi) Tumore Epiteliale Ovarico

Non vi sono differenze statisticamente significative nella sensibilità e specificità dei valori di ROMA usando i valori ottenuti con ARCHITECT CA125 o CanAg CA125 EIA per differenziare la malattia benigna dal tumore epiteliale ovarico. Usando la combinazione CanAg CA125 EIA +HE4 EIA la sensibilità per stratificare i pazienti con tumore epiteliale ovarico negli stadi I-IV nel gruppo ad alto rischio è stata del 93%. I valori predittivi positivo e negativo erano rispettivamente del 57% e del 97%.

**E' importante considerare che i differenti cut-points per la stratificazione del rischio in gruppi ad alto e basso rischio devono essere selezionati sulla base del dosaggio di CA125 che viene usato.**

**Allo scopo di ottenere un livello di specificità del 75% nella combinazione dei dosaggi CanAg CA125 EIA + HE4 sono stati usati i seguenti cut-points :**

**Donne in premenopausa**

Valori di ROMA  $\geq 12,5\%$  = Elevato rischio di tumore epiteliale ovarico

Valori di ROMA  $<12,5\%$  = Basso rischio di tumore epiteliale ovarico

**Donne in postmenopausa**

Valori di ROMA  $\geq 14,4\%$  = Elevato rischio di tumore epiteliale ovarico

Valori di ROMA  $< 14,4\%$  = Basso rischio di tumore epiteliale ovarico

Le aliquote di falsi negativi e la percentuale di tumore epiteliale ovarico stratificati nel basso rischio di tumore epiteliale ovarico in pazienti con masse pelviche usando il valore di ROMA ad un livello di specificità del 75% sono riportati nella Tabella 2. La stratificazione in gruppi ad alto e basso rischio di tumore epiteliale ovarico usando l'algoritmo ROMA ad un valore di specificità del 75% ha originato alla fine un' aliquota di falsi negativi del 6,2%. Il 3% di tutti i casi stratificati nel gruppo a basso rischio sono tumori epiteliali ovarici.

**Tabella 2:** Aliquota di falsi negativi (FNR) e percentuale di tumori epiteliali ovarici per tutti i casi stratificati nel gruppo a basso rischio in pazienti con massa pelvica usando i valori di ROMA.

Premenopausa cut-point per la stratificazione in gruppi a basso rischio ad un livello di specificità del 75%  $< 13,1\%$

Postmenopausa cut-point per la stratificazione in gruppi a basso rischio ad un livello di specificità del 75%  $< 27,7\%$

Tumore Epiteliale Ovarico	Aliquota di falsi negativi (FNR)			Percentuale di tumori nei gruppi a basso rischio		
	Falsi Negativi Tumori	Totale Tumori	FNR <sup>b</sup>	Falsi Negativi Tumori	Veri Positivi Benigno	(%) <sup>c</sup>
<b>Premenopausa</b>	2	18	11.1%	2	149	1.3%
<b>Postmenopausa</b>	6	111	5.4%	6	113	5.0%
<b>Tutti i pazienti</b>	8	129	6.2%	8	262	3.0%

<sup>a</sup> I tumori a basso potenziale di malignità non sono inclusi (LPM); <sup>b</sup> FNR = Falsi Negativi/(Veri Positivi + Falsi Negativi); <sup>c</sup> Falsi Negativi/(Veri Negativi + Falsi Negativi)

## RESTAZIONI METODOLOGICHE

### Precisione

La precisione del dosaggio è  $\leq 15\%$  del CV totale. La precisione totale è stata determinata in accordo con NCCLS (CLSI) direttiva EP5-A (22). Un pannello di quattro campioni di siero è stato dosato usando 2 lotti di reattivi, replicati due volte, in due tempi separati due volte al giorno per 20 giorni consecutivi. I dati di questo studio sono riportati nella tabella sottostante.\*

Campioni	Lotto di Reattivi	n	Conc. media (pM)	Intra-aggio (pM)	Intra-saggio CV %	Totale SD (pM)	Totale CV %
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

\*Dati indicativi; i risultati nei singoli laboratori possono variare da questi dati

### Limiti del dosaggio

Il limite di determinazione di HE4 EIA è  $\leq 15$  pM. Il limite di determinazione (LoD) corrisponde al limite più elevato del 95% dell'intervallo di confidenza e rappresenta la più bassa concentrazione di HE4 che si può distinguere da zero. La direttiva EP17-A (23) di NCCLS è stata usata per definire i test LoD. Si è effettuato uno studio dove il Calibratore A (zero) di HE4 e 4 campioni da soggetti sani diluiti fino ad una concentrazione di 5 pM con il Diluente del campione sono stati dosati in replicati di 24 per serie analitica in 4 sedute analitiche differenti in due giorni separati. Il LoD è stato calcolato come segue:

$$\text{LoD (pM)} = 5.0 \text{ pM} \times (1.65 \times \text{SD}_0 + 1.65 \times \text{SD}_s) / (\text{OD}_s - \text{OD}_0)$$

Il Limite of Determinazione del kit HE4 EIA è stato calcolato essere  $< 2.5$  pM.

### Sensibilità funzionale

La sensibilità funzionale del dosaggio di HE4 EIA è  $\leq 25$  pM. La sensibilità funzionale è espressa come la concentrazione di un'analita alla quale il CV è il 20%. La direttiva EP5-A2 (22) di NCCLS è stata usata per definire i dosaggi per la determinazione della sensibilità funzionale. E' stato condotto uno studio dove un pannello a cinque sensibilità diverse è stato dosato in replicati di 4 in due sedute analitiche diverse per venti giorni con due lotti di reattivi. La sensibilità funzionale determinata per HE4 EIA è stata calcolata essere  $< 5$  pM.

### Recupero

Il recupero medio del dosaggio di HE4 è  $100 \pm 15\%$ . E' stato condotto uno studio dove a diluizioni di un campione a concentrazione nota sono stati aggiunti dei sieri umani normali. La concentrazione di HE4 è stata determinata dosando HE4 con calcolo del risultante recupero percentuale. Dati significativi di questo studio sono indicati nella tabella sotto riportata\*

Campioni	Valore endogeno (pM)	Aggiunta dell'antigene HE4 (pM)	Valori di HE4 ottenuti (pM)	Recupero** percentuale (%)
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

Il recupero medio ottenuto nelle quattro concentrazioni è stato del 97%.

\*Dati indicativi; i risultati ottenuti nei singoli laboratori possono essere diversi da questi dati.

\*\* Ricupero % = Concentrazioni di HE4 Ottenute (pM)/Concentrazioni di HE4 Endogene (pM) + HE4 Aggiunto (pM)

### Effetto Gancio

L'effetto gancio è un fenomeno per il quale campioni a concentrazione molto alta possono essere letti nell'intervallo dinamico del dosaggio. Per HE4 EIA nessun effetto gancio è stato osservato per campioni contenenti fino a 300.000 pM dell'antigene HE4 nativo.

### Linearità

Il valore medio di linearità di HE4 è  $100 \pm 15\%$ . E' stato condotto uno studio per HE4 in accordo con NCCLS (CSL) direttiva EP6-A(24). Campioni di siero con elevati valori di HE4 sono stati diluiti con il Calibratore A (zero) di HE4. La concentrazione di HE4 è stata determinata per ogni diluizione ed è stato calcolato il recupero percentuale (%). Dati indicativi di questo studio sono elencati nella tabella sottostante\*

Campioni	Fattore di diluizione finale	Valori Ottenuti (pM)	Valori Attesi (pM)	Recupero Percentuale** (%)
1	Non diluito	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 diluito	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 diluito	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

Il recupero medio nei tre campioni diluiti mostrati nella tabella è = 101%

\*Dati indicativi; i risultati ottenuti nei singoli laboratori possono essere diversi da questi dati.

\*\* Recupero % = Concentrazione di HE4 ottenuta x Fattore di diluizione / Concentrazione di HE4 non diluita.

### Specificità Analitica

La specificità media del dosaggio di HE4 EIA è  $100 \pm 15\%$ . Sono stati condotti studi su campioni contenenti le sostanze indicate paragonati ai sieri di controllo seguendo le indicazioni di NCCLS direttiva EP7-A(25) per verificare le interferenze. Le seguenti sostanze sono state dosate alle concentrazioni indicate ed hanno dimostrato non interferire nel dosaggio:

Interferenze da sostanze endogene del siero	Concentrazione nel dosaggio
Trigliceridi	30 mg/mL
Billirubina	0.2 mg/mL
Emoglobina	10 mg/mL
Proteine totali	120 mg/mL
Interferenze da farmaci chemioterapici	Concentrazione nel dosaggio
Carboplatino	500 µg/mL
Cisplatino	165 µg/mL
Clotrimazolo	0.3 µg/mL
Ciclofosfamide	500 µg/mL
Dexametasone	10 µg/mL
Doxorubicina	1.16 µg/mL
Leucovorina	2.68 µg/mL
Melfalan	2.8 µg/mL
Metatrexate	45 µg/mL
Paclitaxel	3.5 ng/mL

### **Condizioni cliniche potenzialmente interferenti**

Il dosaggio di HE4 è stato valutato usando campioni contenenti HAMA e Fattore Reumatoide (RF) per ulteriormente verificarne la specificità. Cinque campioni positivi per HAMA e cinque positivi per RF sono stati dosati per il recupero % dopo aggiunta dell'antigene HE4 in ogni campione alla concentrazione di circa 50 e 450pM. I recuperi medi sono elencati nella tabella che segue.\*

<b>Condizioni cliniche</b>	<b>Numero di campioni</b>	<b>Media % recupero</b>
HAMA	5	101
RF	5	95

\*Dati indicativi; i risultati ottenuti nei singoli laboratori possono essere diversi da questi dati.

### **AVVERTENZE**

I dati di funzionalità presentati sono stati ottenuti usando il procedimento analitico descritto in questo libretto d'istruzioni. Ogni variazione o modifica del procedimento analitico non indicato da Fujirebio Diagnostics può alterare questi risultati. In tal caso Fujirebio Diagnostics non si assume alcuna delle responsabilità espresse, implicite o legali, inclusa la responsabilità implicita della commerciabilità e della proprietà d'uso.

## BIBLIOGRAFIA

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. *Gynecologic 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* 2007: In Press.
13. Bray F, Loos AH, Tognazzo S. and 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.

# Protocollo Analitico

## HE4 EIA REF 404-10

Preparare i componenti subito prima dell'uso. Effettuare i procedimenti di lavaggio ed incubazione seguendo le istruzioni.

**Nota. Il dosaggio deve essere effettuato esclusivamente a temperature tra i 20-25°C per ottenere risultati accurati.**

Passaggi	Flacone/Micropiastra	Procedimento Analitico																																							
1. Preparare i Calibratori HE4	CAL HE4	<p>Aggiungere 1 mL di acqua distillata o deionizzata ad ogni flacone e mescolare dolcemente. Fare riposare per almeno 15 minuti. NOTA: l'esatta concentrazione di ogni calibratore è riportata sull'etichetta. Stabilità del reattivo ricostituito: 4 settimane a 2-8°C.</p> <p>Diluire 50 mL di Tampone Lavaggio Concentrato in 1200 mL di acqua distillata o deionizzata.</p> <p>Mescolare 50 µL di Tracciante, HRP Anti-HE4 con 1 mL di diluente del Tracciante:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>No. di Strips</th> <th>Tracciante, HRP Anti-HE4 (µL)</th> <th>Diluente del tracciante (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>	No. di Strips	Tracciante, HRP Anti-HE4 (µL)	Diluente del tracciante (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
No. di Strips	Tracciante, HRP Anti-HE4 (µL)		Diluente del tracciante (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																																							
Preparare i Controlli HE4	B, C, D, E, F CONTROL HE4 1, 2																																								
Preparare la Soluzione Lavaggio	WASHBUF 25X																																								
Preparare la Soluzione Lavoro Tracciante	CONJ Anti-HE4 DIL CONJ																																								
2. Lavare	MICROPLA	Lavare ogni pozzetto una volta con la Soluzione Lavaggio. Usare un lavatore di strip manuale od automatico.																																							
3. Aggiungere calibratori, controlli e campioni	CAL HE4 A, B, C, D, E, F CONTROL HE4 1, 2	Dispensare 25 µL in ogni pozzetto																																							
4. Aggiungere Biotina Anti-HE4	BIOTIN Anti-HE4	Dispensare 100 µL in ogni pozzetto																																							
5. Incubare	MICROPLA	1 ora a 20-25°C sotto agitazione																																							
6. Lavare	MICROPLA	Lavare ogni pozzetto tre volte con la Soluzione Lavaggio. Usare un lavatore di strip manuale od automatico																																							
7. Aggiungere la Soluzione Lavoro Tracciante	TRACER WORKING SOLUTION	Dispensare 100 µL in ogni pozzetto																																							
8. Incubare	MICROPLA	1 hour shaking at 20-25°C																																							
9. Lavare	MICROPLA	Lavare ogni pozzetto sei volte con la Soluzione Lavaggio. Usare un lavatore di strip manuale od automatico																																							
10. Aggiungere TMB-HRP Substrato	SUBS TMB	Dispensare 100 µL in ogni pozzetto																																							
11. Incubare	MICROPLA	30 minuti a 20-25°C sotto agitazione																																							
12. Leggere l'assorbanza	MICROPLA	620 nm																																							
Alt.12 Aggiungere il Reattivo Bloccante	STOP	100 µL per ogni pozzetto																																							
Alt.13 Mescolare	MICROPLA	Mescolare a 20-25°C																																							
Alt.14 Leggere l'assorbanza	MICROPLA	Leggere a 405 nm entro 15 minuti																																							



---

CanAg<sup>®</sup> is a registered trademark of Fujirebio Diagnostics AB

Fujirebio Diagnostics AB  
Elof Lindälvs gata 13  
PO Box 121 32  
SE-402 42 Göteborg  
Sweden  
Phone + 46 31-85 70 30  
Fax + 46 31-85 70 40  
info@fdab.com  
www.fdab.com