



HE4 EIA

REF 404-10

Návod na použitie
2008-09

Enzymoimunometrická súprava
pre 96 stanovení

POUŽITIE

Súprava HE4 EIA je určená pre kvantitatívne stanovenie HE4 v ľudskom sére.

Súprava je určená na použitie ako pomoc pri monitoringu odpovede na terapiu pacientov s invazívnym epiteliálnym ovariálnym karcinómom. Stanovovanie hladín HE4 v sére musí byť použité v spojení s ostatnými klinickými metódami na monitoring ovariálneho karcinómu.

Ďalej je odporúčané použitie setu spolu s ARCHITECT CA 125 II, alebo CanAg CA125 EIA ako pomoc pri vypočítavaní rizika epiteliálneho karcinómu ovárií u žien v premenopauze a postmenopauze so zisteným tumorom v oblasti malej panvy. Výsledky musia byť interpretované v spojitosti s ostatnými metódami v súlade so štandardnými klinickými postupmi.

ZHRNUTIE A VYSVETLENIE TESTU

Ľudský nadsemenníkový proteín 4 (HE4, Human epididymis protein 4) patrí do skupiny WFDC proteínov (whey acidic four-disulfide core protein) s pravdepodobnou trypsín inhibičnou aktivitou. Ostatné proteíny v tejto skupine zahŕňujú SLPI, Elařín a PS20 (WFDC1) (1, 2). G3n HE4 kóduje 13kD proteín, napriek tomu vo svojej rozvinutej glykozylovanej forme má proteín 20-25 kD a pozostáva z jedného peptidu obsahujúceho dve WFDC dom3ny (3). HE4 bol ako prvý identifikovaný v epiteli distálneho nadsemenníka a pôvodne pokladaný za inhibitor proteázy pri dozrievaní spermíí (4, 5). Doterajšie publikácie uvádzali, že HE4 sa tvorí v rôznych zdravých tkanivách, napr. respiračnom epiteli, tkanivách pohlavných orgánov a tiež v tkanivách ovariálneho karcinómu (6-10). Popri tvorbe na bunkovej úrovni, boli tiež zistené vysoké hladiny HE4 v sére pacientov s ovariálnym karcinómom. V kontrolnej štúdií porovnávajúcej pacientov s ovariálnym karcinómom a zdravých pacientov, Hellstr3m *et al.* zistil, že HE4 detekoval ovariálny karcinóm so 67% senzitivitou a 96% špecificitou(11). V následnej štúdií vyhodnocujúcej viacero známych biomarkerov pre ovariálny karcinóm, HE4 ukazoval najvyššiu senzitivitu pri detekcii ovariálneho karcinómu, obzvlášť v skorom štádiu ochorenia. V tejto štúdií bola kombinácia HE4 a CA 125 omnoho presnejšia pri stanovení malignity, než ktorýkoľvek marker samostatne, so senzitivitou 76% a špecificitou 95% (12).

Karcinóm ovárií je celosvetovo štvrtá najčastejšia príčina úmrtnosti na rakovinu u žien. V Európe je mortalita medzi 3.6 a 9.3 na 100.000 žien (13). Príznačky ovariálneho karcinómu sú spojené s prítomnosťou tumorov adnex a sú často nejasné a nešpecifické. Primárnym cieľom diagnostického hodnotenia tumorov adnex je zistenie, či ide o benígny proces alebo o malignitu. Odhaduje sa, že 5-10% žien v USA podstúpi chirurgický zákrok pre podozrenie na ovariálnu neoplazmu počas života a 13-21% týchto žien má dokázanú ovariálnu malignitu (14). Bulletin amerického spolku gynekológov a pôrodníkov publikovaný v roku 2007 uvádza nasledovné “*Ženy s ovariálnym karcinómom, ktorých starostlivosť bola v rukách lekára-špecialistu, ktorý má vedomosti a skúsenosti s liečbou ovariálneho karcinómu, ako napr. onko-gynekológ, majú vyššiu šancu na prežitie ako ženy bez tejto starostlivosti.*” (15). Pretože väčšina tumorov adnex je benígnych, je dôležité preoperačne zistiť, či má pacient vysoké riziko ovariálnej malignity, pre zaistenie ďalšieho menežmentu pacienta (15). Už od prvého ohlasu z roku 1988, boli všeobecne prijatými klinickými štandardami pri zisťovaní, či je tumor adnex podozrivý z malignity: sérová hladina CA125 a ultrazvuk spolu s CT-skenom, MRI a CT/PET (16). Tak tiež literatúra je plná dokumentov popisujúcich, ktorá modalita je najpresnejšia, ktoré z fyzikálnych vyšetrovacích metód v kombinácii so stanovením hladiny CA125 a zobrazovacích metód, dosahujú

najvyššiu pozitívnu prediktívnu hodnotu (17-19). Na spresnenie hodnotenia (triage) pacientiek so zisteným tumorom v oblasti malej panvy môže byť súprava HE4 EIA použitá v spojení s napr. ARCHITECT CA 125 II, alebo so súpravou CanAg CA125 EIA, ako pomoc pri zisťovaní rizika epiteliálneho karcinómu ovárií. Výsledky musia byť interpretované v spojitosti s ostatnými metódami a v súlade so štandardnými klinickými odporúčaniami (management guidelines). Doplnkové využitie stanovenia HE4 EIA je ako pomoc pri monitoringu odozvy na liečbu pacienta s invazívnym epiteliálnym karcinómom ovárií. Výsledok môže byť použitý v spojení s ostatnými klinickými metódami používaných pri monitoringu pacientov s ovariálnym karcinómom.

PRINCÍP TESTU

CanAg HE4 EIA je nekompetitívne imunometrické stanovenie na pevnej fáze, založené na priamej sendvičovej technike s použitím dvoch monoklonálnych myších protilátok, 2H5 a 3D8, viažucich sa priamo na dva epitopy na C-WFDC doménu HE4. Kalibrátory, kontrolky a vzorky pacientov sú inkubované spolu s biotinylovanou anti-HE4 monoklonálnou protilátkou (MAb) 2H5 v mikrostripech potiahnutých streptavidínom. HE4 prítomné v kalibrátoroch, alebo vzorkách je adsorbované na streptavidínom potiahnuté mikrostripy biotinylovanou protilátkou Anti-HE4 MAb počas inkubácie. Mikrostripy sú potom premyté a inkubované s druhou protilátkou Anti-HE4 MAb 3D8 značenou chrenovou peroxidázou (konjugát). Po premytí sa do každej jamky pridá pufrovaná substrát/chromogénová reagentia (peroxid vodíka a 3, 3', 5, 5' tetra-metyl-benzidín) a nechá sa prebiehať enzymatická reakcia. Ak je antigén prítomný, objaví sa počas enzymatickej reakcie modré zafarbenie. Intenzita modrého zafarbenia je priamo úmerná množstvu HE4 prítomného vo vzorke. Intenzita zafarbenia sa zistí použitím mikroplatničkového spektrofotometru pri 620 nm (alebo po pridaní STOP roztoku pri 405 nm). Kalibračné krivky sa tvoria pre každé stanovenie odčítaním hodnôt absorbancie oproti hodnotám koncentrácie každého kalibrátora. Koncentrácia HE4 vo vzorke pacienta sa následne odčíta z kalibračnej krivky.

REAGENCIE

- Každá súprava HE4 EIA obsahuje reagentie na 96 stanovení.
- Expirácia súpravy je vyznačená na štítku na vonkajšej strane súpravy.
- Nepoužívajte súpravu po uplynutí dátumu expirácie.
- Nemiešajte reagentie s rôznymi šaržami (LOT).
- Uchovávajúte pri 2–8°C. Nezmrazujte.
- Otvorené reagentie sú stabilné podľa nižšie uvedenej tabuľky za predpokladu, že nie sú kontaminované, sú uložené v uzatvorených originálnych nádobách a boli používané podľa pokynov výrobcu. Uskladnite opäť pri teplote 2-8°C ihneď po použití.

Zložka	Množstvo	Skladovanie a stabilita po prvom použití
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">MICROPLA</div> Streptavidínová mikroplatnička	1 platnička	2-8°C až do uplynutia expirácie vyznačenej na platničke
<p>12 x 8 jamôk potiahnutých streptavidínom. Po otvorení, ihneď uložte nepoužité stripy do hliníkového obalu s vysušovačom. Dôkladne uzavrite.</p>		
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CAL HE4 A</div> HE4 Kalibrátor A	1 x 8 mL	2-8°C až do uplynutia expirácie vyznačenej na fľaštičke
<p>Fosfátom pufrovaný fyziologický roztok obsahujúci hovädzí sérový albumín, inertnú žltú farbu a neazidový antimikrobiálny konzervant. Pripravený na použitie. Môže byť použitý na riedenie vzoriek.</p>		
HE4 Kalibrátory B-F	5 fľaštičiek, lyofil.	Stabilita po rekonštitúcii 4 týždne pri 2-8°C 4 mesiace pri -20°C alebo nižšie

CAL	HE4	B	1 x 1 mL
CAL	HE4	C	1 x 1 mL
CAL	HE4	D	1 x 1 mL
CAL	HE4	E	1 x 1 mL
CAL	HE4	F	1 x 1 mL

Lyofilizované kalibrátory obsahujúce antigén HE4 vo fosfátom pufovanom fyziologickom roztoku obsahujúci hovädzí sérový albumín, inertnú žltú farbu a neazidový antimikrobiálny konzervant. Pred použitím rekonštituujte destilovanou alebo deionizovanou vodou.

POZNÁMKA: Presná koncentrácia antigénu HE4 je špecifická pre každú šaržu a je vyznačená na štítku každej fľaštičky.

Zložka	Množstvo	Skladovanie a stabilita po prvom použití
HE4 Kontrolky	2 fľaštičky, lyofil.	Stabilita po rekonštitúcii 4 týždne pri 2-8°C 4 mesiace pri -20°C alebo nižšie

CONTROL	HE4	1	1 x 1 mL
CONTROL	HE4	2	1 x 1 mL

Lyofilizované kontrolky obsahujú antigén HE4 v ľudskej sérovej matrici a neazidový antimikrobiálny konzervant. Pred použitím rekonštituujte destilovanou, alebo deionizovanou vodou.

BIOTIN	Anti-HE4	
Biotin Anti-HE4	1 x 15 mL	2-8°C až do uplynutia expirácie vyznačenej na fľaštičke

Biotinylovaná Anti-HE4 monoklonálna myšia protilátka, približne 1 µg/mL. Obsahuje fosfátom pufovaný fyziologický roztok (pH 7.2), hovädzí sérový albumín, blokujúce látky, detergent, inertnú červenú farbu a neazidový antimikrobiálny konzervant. Pripravený na použitie.

CONJ	Anti-HE4	
Značkovač, HRP Anti-HE4	1 x 0.75 mL	2-8°C až do uplynutia expirácie vyznačenej na fľaštičke

Konjugátový roztok Anti-HE4 monoklonálnej myšej protilátky značenej chrenovou peroxidázou (HRP), približne 40 µg/mL. Obsahuje neazidový antimikrobiálny konzervant. Pred použitím nariediť roztokom pre značkovač (konjugát).

DIL	CONJ	
Riediaci roztok pre značkovač	1 x 15 mL	2-8°C až do uplynutia expirácie vyznačenej na fľaštičke

Obsahuje fosfátom pufovaný fyziologický roztok (pH 7.2), hovädzí sérový albumín, blokujúce látky, detergent, inertnú modrú farbu a neazidový antimikrobiálny konzervant. Pripravený na použitie.

SUBS	TMB	
TMB HRP-Substrát	1 x 12 mL	2-8°C až do uplynutia expirácie vyznačenej na fľaštičke

Obsahuje pufrovaný roztok peroxidu vodíka a chromogén 3, 3', 5, 5' tetrametyl-benzidín (TMB). Pripravený na použitie.

Zložka	Množstvo	Skladovanie a stabilita po prvom použití
STOP STOP Roztok	1 x 15 mL	2-8°C až do uplynutia expirácie vyznačenej na fľaštičke

Obsahuje 0.12 M kyselinu chlorovodíkovú. Pripravený na použitie.

WASHBUF 25X Premývací koncentrát	1 x 50 mL	2-8°C až do uplynutia expirácie vyznačenej na fľaši
---	-----------	---

Tris-HCl pufrovaný fyziologický roztok s detergentom Tween 20. Obsahuje Germall II ako konzervant. Pred použitím 25x nariediť destilovanou alebo deionizovanou vodou.

Známky nestability

TMB HRP-Substrát musí byť bezfarebný, alebo slabo modrastý. Modré sfarbenie značí, že reagentia bola kontaminovaná a musí byť zlikvidovaná.

UPOZORNENIA A BEZPEČNOSTNÉ UPOZORNENIA

Použitie iba pre *in vitro* diagnostiku.

Dodržujte inštrukcie v príbalovom letáku. Vierohodnosť výsledkov nie je zaručená pri nedodržaní inštrukcií z príbalového letáku.

S patientskými vzorkami narábajte ako s potenciálne infekčným materiálom. S ľudskými vzorkami odporúčame narábať v súlade s OSHA Standard on Bloodborne pathogens (20). Biologická bezpečnosť úrovne 2 (21), alebo iné patričné bezpečnostné opatrenia musia byť použité pri narábaní so vzorkami infekčnými, alebo infekčne podozrivými.

Pri likvidácii odpadu dodržujte miestne bezpečnostné predpisy.

Upozornenie

Materiál použitý pre prípravu reagentov z ľudského zdroja bol testovaný a nevykazuje reaktivitu pre protilátky HIV 1 a 2, HCV ani povrchový antigén Hepatitídy B (HBsAg). Nakoľko žiadna metóda nemôže úplne vylúčiť prítomnosť krvou prenosných ochorení, pri narábaní a likvidácii reagentov pochádzajúcich z ľudského zdroja treba postupovať ako s potenciálne infekčným materiálom.

ODBER A NARÁBANIE SO VZORKAMI

Súprava HE4 EIA je určená pre sérové stanovenia (taktiež na stanovenie zo séra v separačných skúmavkách (SST)). Plazma a ostatné telové tekutiny neboli overované pre použitie so súpravou HE4 EIA. Odoberte krv zo žily a postupujte podľa inštrukcií stanovených výrobcom skúmaviek pre odber vzoriek. Ak boli použité pri stanovení sérové vzorky, musia byť použité vzorky rovnakého typu aj počas ďalšieho sledovania.

Sérum môže byť pred testovaním 3 dni uskladnené pri 2-8°C. Pre dlhšie uskladnenie vzoriek uchovávajte tieto pri teplote -40°C alebo nižšej.

Zmrazené vzorky pred analýzou nechajte rozmraziť pri izbovej teplote a DÔKLADNE premiešajte jemným niekoľkonásobným prevracaním. Vzorky, ktoré obsahujú hrubé (veľké) častice musia byť pred použitím zcentrifugované pri 10.000 x g počas 10 minút kvôli odstráneniu akýchkoľvek častíc, ktoré mohli vzniknúť pri rozmrazovaní.

POSTUP

Potrebné materiály, ktoré nie sú dodávané so súpravou:

1. Miešač mikrotitračných platničiek

Miešanie by malo byť orbitálne rotačné, stredné až silné, približne 700-1100 oscilácií/min.

2. Premývačka mikrotitračných platničiek

Automatická premývačka umožňujúca nastavenie 1, 3 a 6 premývacích cyklov, s minimálnym premývacím objemom 350 µL/jamku/premývací cyklus.

Ak nie je k dispozícii automatická premývačka, je odporúčaná 8-kanálová pipeta s jednorázovými plastovými špičkami pre objem 350 µL na jamku.

3. Mikrotitračný spektrofotometer

S vlnovou dĺžkou 620 nm a/alebo 405 nm a absorbančným rozsahom 0 až 3.0 OD

4. Presné pipety

s jednorázovými plastovými špičkami, ktoré sú schopné dávkovať mikrolitrové a mililitrové objemy. 8-kanálová pipeta, alebo opakovaná pipeta s jednorázovými špičkami pre dávkovanie 100 µL, je odporúčaná ale nie nevyhnutná.

5. Destilovaná alebo deionizovaná voda

Na rekonštitúciu HE4 kalibrátorov, HE4 kontroliek a na prípravu premývacieho roztoku.

Poznámky k postupu stanovenia

- Na zaistenie správneho použitia súpravy HE4 EIA, je potrebné dôkladne porozumieť obsahu tohto príbalového letáku. Reagencie dodávané so setom sú určené na použitie pre danú konkrétnu súpravu. Nemiešajte spolu identické reagenty zo súprav s rozdielnymi šaržami (LOT). Nepoužívajte reagenty po uplynutí ich expirácie, vyznačenej na vonkajšej strane obalu súpravy.
- Pred použitím nechajte reagenty vytemperovať na izbovú teplotu (20-25°C). Zmrznuté vzorky musia byť najskôr pozvoľne rozmrazené na izbovú teplotu, potom jemne, ale dôkladne premiešané.
Pre získanie správnych výsledkov pracujte pri laboratórnej teplote 20-25°C.
- Pred začiatkom pipetovania kalibrátorov a vzoriek musia byť tieto stripy riadne označené a aj po ukončení stanovenia jasne identifikovateľné.
- Požiadavka pre dôkladné oddelenie nenašľaného antigénu a reagentov (premytím) od komplexu antigen-protilátka, ktorý je naviazaný na pevnej fáze, je jedným z najdôležitejších krokov pri EIA. Zaisťte, aby bola každá jamka až po okraj naplnená a po odsatí úplne prázdna. Ak po odsatí ostane v jamkách nejaká tekutina obráťte ich hore dnom a jemne vyklepte o odsávací papier. Automatická premývačka: Dodržujte odporúčania výrobcu pre údržbu a premývajte požadovaným počtom cyklov pred aj po každom inkubačnom kroku. Nenechávajte premývací roztok v automatickej premývačke dlhší čas ako je potrebné, pretože môže dôjsť k upchatiu premývacích ihliel a premývačka nebude schopná dôkladne premývať/odsávať.
- Substrát TMB HRP je veľmi citlivý na kontamináciu. Na zachovanie optimálnej stability substrátu TMB HRP odlejte potrebné množstvo z fľaštičky do dôkladne umytej alebo novej jednorázovej plastovej nádoby, na zabránenie kontaminácie celého roztoku. Používajte iba čisté jednorázové plastové pipetovacie špičky.
- Pri manipulácii so vzorkami a reagentami používajte výhradne jednorázové plastové pipetovacie špičky a správnu pipetovaciu techniku. Držaním špičky pipety tesne nad okrajom jamky sa vyhnete nežiadúcemu prenosu medzi jamkami. Rovnako sa vystríhajte dotyku špičky pipety so stripom, alebo povrchom tekutiny v jamke. Správna pipetovacia technika je obzvlášť dôležitá pri manipulácii s roztokom substrátu TMB HRP.

Príprava reagentov

Stabilita pripravených reagentov

HE4 Kalibrátory B-F

4 týždne pri 2–8°C

4 mesiace pri -20°C alebo nižšie

Pridajte presne 1.0 mL destilovanej alebo demineralizovanej vody do každej fľaštičky a premiešajte. Nechajte voľne rozpúšťať najmenej 15 minút a pred použitím opatrne ale dôkladne premiešajte.

POZNÁMKA: Aktuálne koncentrácie kalibrátorov sú uvedené na štítku fľaštičky.

HE4 Kontrolky 1 a 2

4 týždne pri 2–8°C

4 mesiace pri -20°C alebo nižšie

Pridajte presne 1.0 mL destilovanej alebo demineralizovanej vody do každej fľaštičky a premiešajte. Nechajte voľne rozpúšťať najmenej 15 minút a pred použitím opatrne ale dôkladne premiešajte.

POZNÁMKA: Aktuálne koncentrácie kalibrátorov sú uvedené na štítku fľaštičky.

Príprava reagensii**Stabilita pripravených reagensii**

Premývací roztok2 týždne pri 2–25°C
v uzavretej nádobe

Vlejte 50 mL premývacieho koncentrátu do čistej nádoby a zriedte 25-krát pridaním 1200 mL destilovanej alebo deionizovanej vody pre získanie pufrovaného premývacieho roztoku.

Pracovný roztok značkovača4 týždne pri 2–8 °C
v uzavretej nádobe

Pripravte požadované množstvo pracovného roztoku značkovača zmiešaním 50 µL Značkovača (Tracer) HRP

Anti-HE4 s 1mL riediaceho roztoku pre značkovač pre každý použitý strip (pozri tabuľku nižšie):

Počet prúžkov	Značkovač, HRP Anti-HE4 (µL)	Riediaci roztok (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

Pre prípravu pracovného roztoku značkovača použite čistú plastovú, alebo sklenenú fľaštičku.

Alternatíva: Nalejte obsah fľaštičky Značkovača HRP Anti-S100 do fľaštičky s riediacim roztokom pre značkovač a jemne premiešajte. Uistite sa, že CELÝ obsah fľaštičky značkovača HRP Anti-S100 je preliaty do fľaštičky s riediacim roztokom pre značkovač.

POZNÁMKA: Pracovný roztok značkovača je stabilný počas 3 týždňov pri 2–8°C. Nepripravujte pracovný roztok značkovača, ktorý bude používaný po tejto dobe a uistite sa, že je správne uskladnený.

Postup stanovenia:

Urobte stanovenie kalibrátorov, kontroliek a vzoriek pacientov dvojmo. Pre každú súpravu urobte kalibračnú krivku. Všetky reagensie a vzorky musia mať pred použitím izbovú teplotu (20–25°C).

1. Začnite prípravou kalibrátorov B-F, kontroliek 1 a 2, premývacieho roztoku a pracovného roztoku značkovača. Vždy použite čisté nádoby. Sledujte pozorne inštrukcie.
2. Vložte požadované množstvo mikrotitračných stripov do rámčeka (ihneď vráťte ostatné stripy do pôvodného obalu s vysušovačom a dobre uzavrite). Opláchnite každý strip 1x premývacím roztokom. Neoplachujte viac stripov než stihnete použiť do 30 min.
3. Napipetujte 25 µL HE4 kalibrátorov (CAL A, B, C, D, E, F), HE4 kontrolky (C1, C2) a vzorky pacientov (unknowns-Unk) do jamôk na stripe podľa nasledovnej schémy:

	1	2	3	4	5	6	7 atď.
A	Cal A	Cal E	Pac.1				
B	Cal A	Cal E	Pac.1				
C	Cal B	Cal F	Pac.2				
D	Cal B	Cal F	Pac.2				
E	Cal C	C1					
F	Cal C	C1					
G	Cal D	C2					
H	Cal D	C2					

4. Pridajte 100 μ L Biotin Anti-HE4 do každej jamky pomocou 100 μ L presnou pipetou (alebo 8-kanálovou 100 μ L presnou pipetou). Nedotýkajte sa špičkou pipety povrchu kvapalín, aby nedochádzalo ku krížovej kontaminácii kvapalín.
5. Inkubujte stripy v rámečku 1 hodinu (\pm 10 min) pri izbovej teplote (20–25°C) za stáleho miešania použitím miešača pre mikrotitračné platne.
6. Po prvej inkubácii odsajte a 3x vypláchnite každý strip, použitím premývacieho postupu popísaného vyššie v Poznámkach k postupu stanovenia (bod 4).
7. Pridajte 100 μ L pracovného roztoku značkovača do každej jamky. Použite rovnaký pipetovací postup ako v bode 4.
8. Inkubujte stripy v rámečku 1 hodinu (\pm 5 min) pri izbovej teplote za stáleho miešania.
9. Po druhej inkubácii odsajte a 6x vypláchnite každý strip, použitím premývacieho postupu popísaného vyššie v Poznámkach k postupu stanovenia (bod 4).
10. Pridajte 100 μ L TMB HRP-substrátu do každej jamky použitím rovnakého pipetovacieho postupu ako v bode 4. TMB HRP-substrát musí byť pridaný do jamiek čo najrýchlejšie, čas medzi pridaním do prvej a do poslednej jamky nesmie prekročiť 5 min.
11. Inkubujte 30 min (\pm 5 min) pri izbovej teplote za stáleho miešania. Zabráňte priamemu slnečnému žiareniu.
12. Ihneď odčítajte absorbciu pri 620nm v mikroplatňovom spektrofotometri.

Alternatívne možnosti

Keď laboratórium nemá mikroplatňový spektrofotometer s možnosťou odčítavania pri 620 nm, absorbcia môže byť stanovená aj nasledovne:

- Alt. 12.** Pridajte všade 100 μ L STOP roztoku. Pomiešajte asi 1 min. na miešači. Odčítajte absorbciu pri 405 nm na mikroplatňovom spektrofotometri do 15 min od pridaní STOP roztoku.

Rozsah merania

HE4 EIA meria koncentrácie v rozsahu koncentrácií medzi 15 až 900 pM.

Keď sa očakávajú koncentrácie HE4 nad detekčným limitom, odporúčame nariediť vzorku pred stanovením nulovým HE4 kalibrátorom A (pozri "Výpočet výsledkov riedených vzoriek")

Kontrola kvality

HE4 Kontrolka 1 a 2 by mala byť použitá pri validácii každej analyzovanej série. Rozsahy očakávaných výsledkov sú uvedené na štítkoch fľaštičiek.

Výsledky analýzy HE4 súpravou môžu byť považované za platné, ak:

- Ak stredná hodnota duplikátov kontroliek leží v uvedenom koncentračnom intervale.
- Ak CV duplikátov kalibrátorov B-F a kontroliek nepresahuje 15%.
- Ak rozdiel OD duplikátov nulového kalibrátora A nie je väčší ako 0.06 OD jednotiek.

Ak analýzou dosiahnete neplatné výsledky, je potrebné prekontrolovať všetky reagenty, presnosť pipiet, funkciu premývača, miešača a spektrofotometra a celú analýzu treba zopakovať.

Každé laboratórium si môže tiež pripraviť vlastné poolované séra pre rôzne koncentračné úrovne, ktoré môžu slúžiť, ako interná kontrola presnosti analýzy.

Referenčné materiály

Pretože referenčný materiál pre HE4 antigén nie je dostupný, hodnoty HE4 EIA kalibrátorov sú určené podľa výrobcových vlastných (in-house) referenčných štandardov.

VÝPOČET VÝSLEDKOV

Ak má mikroplošný spektrofotometer vstavaný vlastný výpočtový program, postupujte podľa návodu pre spektrofotometer a vytvorte výpočtový program v ktorom zadáte koncentrácie HE4 kalibrátorov uvedené na fľaštičkách.

Pre automatický výpočet výsledkov HE4 je doporučené využiť niektorú z nasledujúcich metód:

- Metóda „Cubic spline curve fit“. Kalibrátor A by mal byť vložený do krivky s hodnotou 0 pM.
- Metóda interpolačného vyhodnotenia „point-to-point“. Kalibrátor A by mal byť vložený do krivky s hodnotou 0 pM.
- Metóda kvadratického vyhladenia „Quadratic curve fit“. Kalibrátor A by mal byť vložený do krivky s hodnotou 0 pM.

POZNÁMKA: 4-parametrická alebo Lineárna regresná vyhodnocovacia metóda by nemala byť použitá!

Pre manuálne vyhodnotenie vytvorte grafické zobrazenie hodnôt (A) absorbancií jednotlivých HE4 kalibrátorov voči ich zodpovedajúcim HE4 koncentráciám (v pM).

HE4 koncentrácie neznámych vzoriek môžu byť potom odčítané z grafickej kalibračnej krivky podľa zodpovedajúcej hodnoty absorbancie jednotlivej patientskej vzorky.

Výpočet výsledkov riedených vzoriek

Ak vzorky pri prvom stanovení dosahujú vyššie hodnoty než 900 pM vzorky by mali byť nariadené 1/10 a 1/100 s HE4 kalibrátorom A pre zistenie správnych koncentrácií vzoriek.

- 1/10 riedenie = 50 µL vzorky + 450 µL HE4 kalibrátor A
- 1/100 riedenie = 50 µL z 1/10 riedenia + 450 µL HE4 kalibrátor A

Koncentrácie HE4 pôvodných neriedených vzoriek sa vypočítajú nasledovne:

- Riedenie 1/10: 10 x nameraná hodnota

Riedenie 1/100: 100 x nameraná hodnota

Algoritmus Rizika Ovariálnej Malignity (ROMA) pre odhad rizika epitelálnej rakoviny ovárií u žien v premenopauze a postmenopauze s tumorom v malej panve.

Výpočet prediktívneho Indexu

Prediktívny index (PI) pre ženy v premenopauze a postmenopauze sa vypočítava separátne použitím nižšie uvedených rovníc (1) a (2).

Pri výpočte PI sa dosadia číselné hodnoty koncentrácií HE4 EIA a CA 125 (KRYPTOR, ARCHITECT alebo CanAg CA125EIA) do príslušných dolu uvedených algoritmických rovníc v závislosti od menopauzálného stavu pacientky.

(1) Premenopauzálna žena

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

(2) Postmenopauzálna žena

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

Výpočet ROMA hodnoty

Pre výpočet ROMA hodnoty (t.j. prediktívnej, prognostickej), vložte vypočítanú hodnotu prediktívneho indexu PI do rovnice (3):

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

Príklady v nižšie uvedenej tabuľke môžu byť použité k validácii výpočtov PI a ROMA hodnôt:

Menopauzálny status	HE4 (pM)	CA125 (U/mL)	PI výpočet	PI	ROMA (%)
Premenopauzálny	37.5	74.9	$-12.0+(2.38*3.624)+(0.0626*4.316)$	-3.103880	4.3
Premenopauzálny	386.6	21.8	$-12.0+(2.38*5.957)+(0.0626*3.082)$	2.371517	91.5
Postmenopauzálny	66.7	11.3	$-8.09+(1.04*4.200)+(0.732*2.425)$	-1.946830	12.5
Postmenopauzálny	383.1	22.7	$-8.09+(1.04*5.948)+(0.732*3.122)$	0.381799	59.4

OBMEDZENIA PRACOVNÉHO POSTUPU

Pacientky s potvrdenou ovariálnou rakovinou môžu mať hodnoty HE4 v tom istom rozmedzí ako zdravé ženy.

Isté histologické typy ovariálnej malignity (napr. mucinózne alebo germinatívne tumory) zriedka produkujú HE4. Z toho dôvodu HE4 nie je doporučené pre monitorovanie pacientiek s preukázanými mucinóznymi alebo ovariálnymi germinatívnymi tumormi (7)

A opačne, zvýšené hladiny HE4 antigénu môžu byť prítomné u jedincov s nemalígnym ochorením. Z toho dôvodu výška hladiny HE4 nemôže byť použitá ako absolútn dôkaz prítomnosti alebo absencie malígneho ochorenia a samotný HE4 test by nemal byť použitý pri skríningu malignity.

Výsledky HE4 testu by mali byť interpretované len v spojitosti s ďalšími vyšetreniami a diagnostickými postupmi a taktiež HE4 test by nemal nahradzovať žiadne zaužívané klinické vyšetrenia.

Algoritmus rizika ovariálnej malignity (ROMA) nebol dosiaľ validovaný na nasledujúce skupiny pacientiek:

pacientky v minulosti liečené na malignitu, pacientky v súčasnosti liečené chemoterapeutikami a pacientky mladšie ako 18 rokov.

Zlyhanie stanovenia HE4 EIA a/alebo CA125, alebo chyba pri výpočte výsledkov môže viesť k nepresnému zhodnoteniu rizika a nesprávnemu menežmentu pacienta. Obzvlášť falošne nízke výsledky analýz môžu viesť k záveru, že pacientka má nízke riziko epitelálneho nádoru ovárií, čo môže spôsobiť preradenie pacientky na nižšiu úroveň starostlivosti. Použitie výsledkov analýz bez ohľadu na ďalšie laboratórne nálezy, výsledky zobrazovacích metód a klinického zhodnotenia môže byť riskantné.

Reakciu blokujúce protilátky (ľudské protilátky proti myším protilátkam tzv. HAMA, alebo heterofilné protilátky) vo vzorke patientského séra môžu niekedy pri stanovení interferovať, aj napriek špecifickým blokátorm prítomných v pufrach súprav.

Stanovenie musí byť uskutočnené v prostredí s kontrolovanou teplotou, lebo inkubácia pri teplote vyššej ako doporučený teplotný interval 20 – 25 °C môže viesť k falošne nízkym výsledkom !!

OČAKÁVANÉ HODNOTY

Rozdelenie hladín HE4 stanovených v 1147 vzorkách je uvedené v nasledujúcej tabuľke:

Rozdelenie hladín HE4 stanovení					
	Počet subjektov	0 – 150 pM	150 - 300 pM	300 - 500 pM	> 500 pM
ZDRAVÍ					
Ženy (premenopauzálny)	76	72	3	0	1
Ženy (postmenopauzálny)	103	97	5	0	1
BENIGNÉ PODMIENKY					
Tehotenstvo	22	21	1	0	0
Benigné gynekologické ochorenie	347	324	18	1	4
Iné benigné ochorenie	108	82	8	7	11
Hypertenzia/Vrodená srdečná vada	96	75	16	2	3
MALIGNITA					
Ovárium	127	27	18	21	61
Prsník	46	40	4	2	0
Plúca	50	29	15	6	0
Endometrium	116	86	15	4	11
Gastrointestinálna	56	47	8	0	1

V tejto štúdii 94.4% zdravých žien mali sérové hladiny HE4 nižšie alebo rovné 150 pM. Odporúča sa, aby si každé laboratórium stanovilo svoje vlastné referenčné hodnoty pre konkrétnu populáciu.

Monitorovanie stavu ochorenia pacientov s diagnostikovanou ovariálnou malignitou.

Užitočnosť HE4 EIA, ako prostriedku na monitorovanie stavu ochorenia pacientov pri ovariálnej malignite bola potvrdená schopnosťou stanovenia zmien HE4 hladín v porovnaní so zmenou stavu ochorenia pri sérii 80 sérových vzoriek pacientiek. Štúdia zahrňujúca celkovo 354 párov testov bola uskutočnená s priemernom 4.4 skúmaní na jedného pacienta.

Pozitívna zmena koncentrácie HE4 bola definovaná ako nárast hodnoty minimálne o 25% oproti predchádzajúcej hodnote testu.

Táto zmena hladiny zahrňuje variabilitu EIA stanovenia a tiež biologickú variabilitu.

Šesťdesiat percent (60%) alebo 76 zo 126 patientských vzoriek s pozitívnou koncentračnou zmenou koreluje s progresiou ochorenia, kým sedemdesiat päť percent (75%) alebo 171 z 228 patientských sérových vzoriek bez významnej koncentračnej zmeny HE4 koreluje so stavom ochorenia bez progresie.

Celková zhoda bola sedemdesiat percent (70% alebo 247 z 354).

Nasledovná tabuľka prezentuje dáta v 2 x 2 formáte.

Zmena stavu ochorenia podľa sekvenčného vzostupu			
Nárast koncentrácie HE-4	Progresia	Bez progresie	Spolu
>25%	76	57	133
≤25%	50	171	221
Celkom	126	228	354

Nasledujúca tabuľka zobrazuje rozdelenie po pacientoch. Deväťdesiat tri percent (93%) alebo 54 z 58 patientských sér s pozitívnou koncentračnou zmenou koreluje s progresiou ochorenia, kým tridsať dva percent (32%) alebo 7 z 22 patientských sér bez významnej koncentračnej zmeny koreluje s ochorením bez progresie. Celková zhoda v tejto štúdii bola sedemdesiat šesť percent (76 %) alebo 61 z 80.

Zmena stavu ochorenia podľa pacienta			
Nárast koncentrácie HE-4	Progresia	Bez progresie	Spolu
>25%	54	15	69
≤25%	4	7	11
Celkom	58	22	80

Výpočet rizika malignity u pacientov s tumorom v malej panve.

Efektivita HE4 EIA v kombinácii s CA125 (ARCHITECT CA125 II alebo CanAg CA125 EIA) pre odhad rizika prítomnosti epiteliálnej malignity ovária u pacientiek s tumorom v oblasti malej panvy bola potvrdená pomocou prospektívnej, multi-centrickej klinickej štúdie. ROMA algoritmus (ROMA, pozri str. 8) bol navrhnutý pre odhad rizika epiteliálnej malignity ovária. Algoritmus berie do úvahy HE4 a CA125 hodnoty, ako aj menopauzálny stav pacientky. Algoritmus vypočítava prediktívnu pravdepodobnosť chirurgického nálezu epiteliálnej malignity ovária. V prospektívnej štúdii bolo na súbore 496 pacientiek overené vypočítavanie pravdepodobnosti výskytu epiteliálnej malignity ovária, ako aj rozdelenie pacientiek do nízko a vysoko rizikových skupín na základe hodnôt ROMA.

Súhrnná frekvencia rozdelenia hodnôt ROMA pre benigné a maligné prípady pri použití týchto algoritmov je zobrazená na grafe 1 a 2 (pre kombináciu diagnostických súprav HE4 EIA + ARCHITECT CA125II)

a na grafe 3 a 4 (pre kombináciu HE4 EIA + CanAg CA)

Fig. 1 Súhrnná frekvencia rozdelenia hodnôt ROMA pre **premenopauzálne** ženy.
HE4 EIA + ARCHITECT CA125 II kombinácia

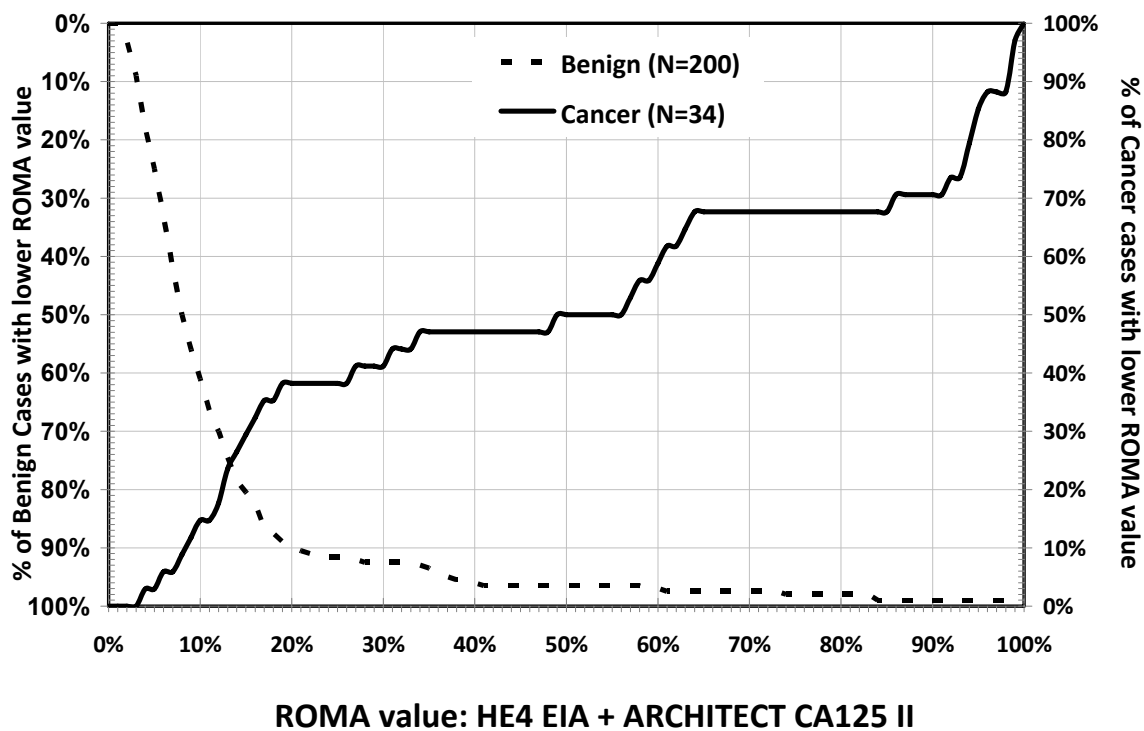


Fig. 2 Súhrnná frekvencia rozdelenia hodnôt ROMA pre **postmenopauzálne** ženy.
HE4 EIA + ARCHITECT CA125 II kombinácia

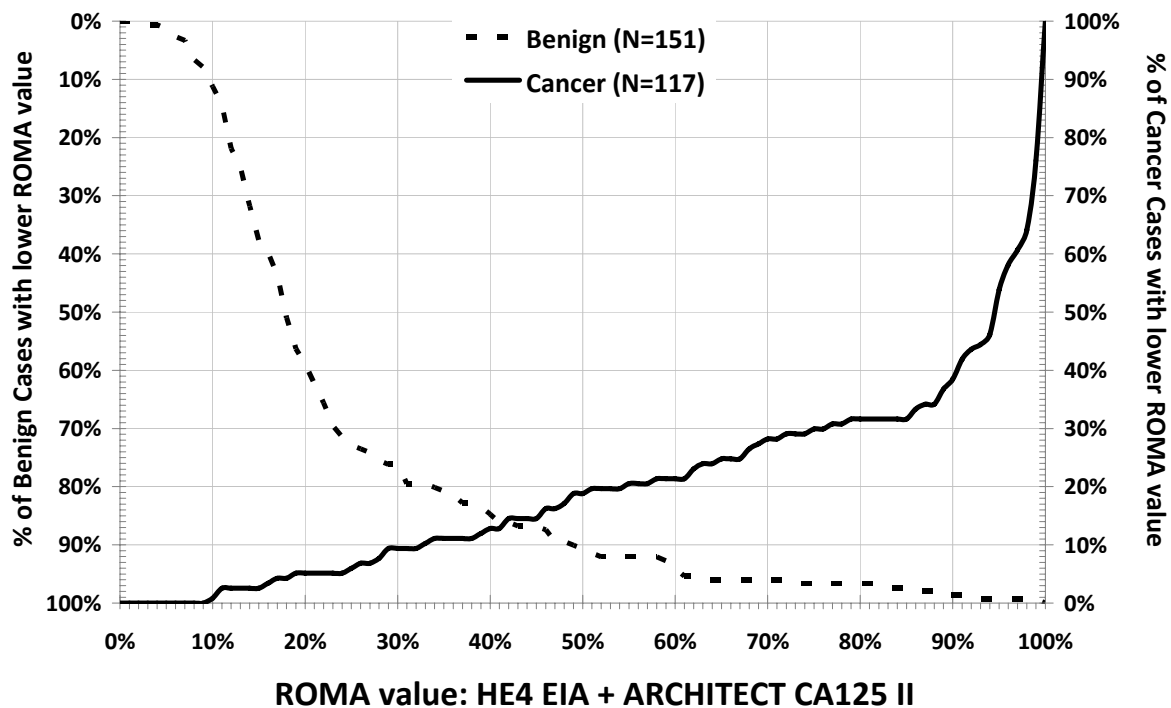


Fig. 3 Súhrnná frekvencia rozdelenia hodnôt ROMA pre **premenopauzálne** ženy. HE4 EIA + CanAg CA125 EIA kombinácia

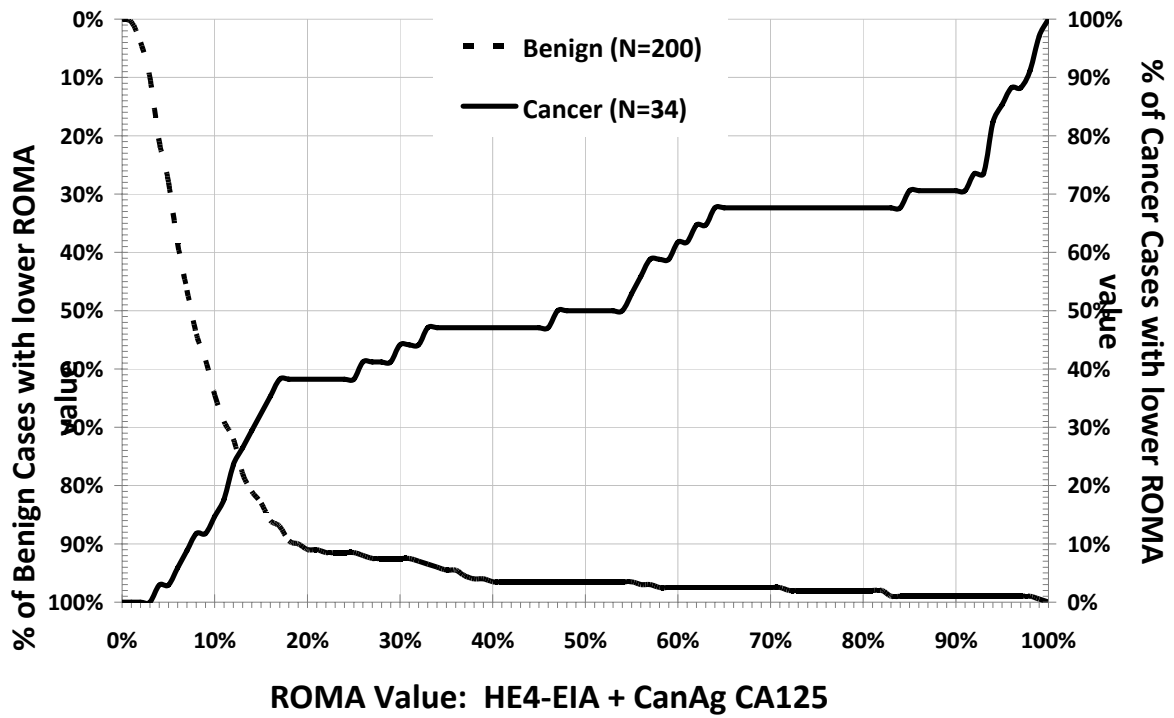
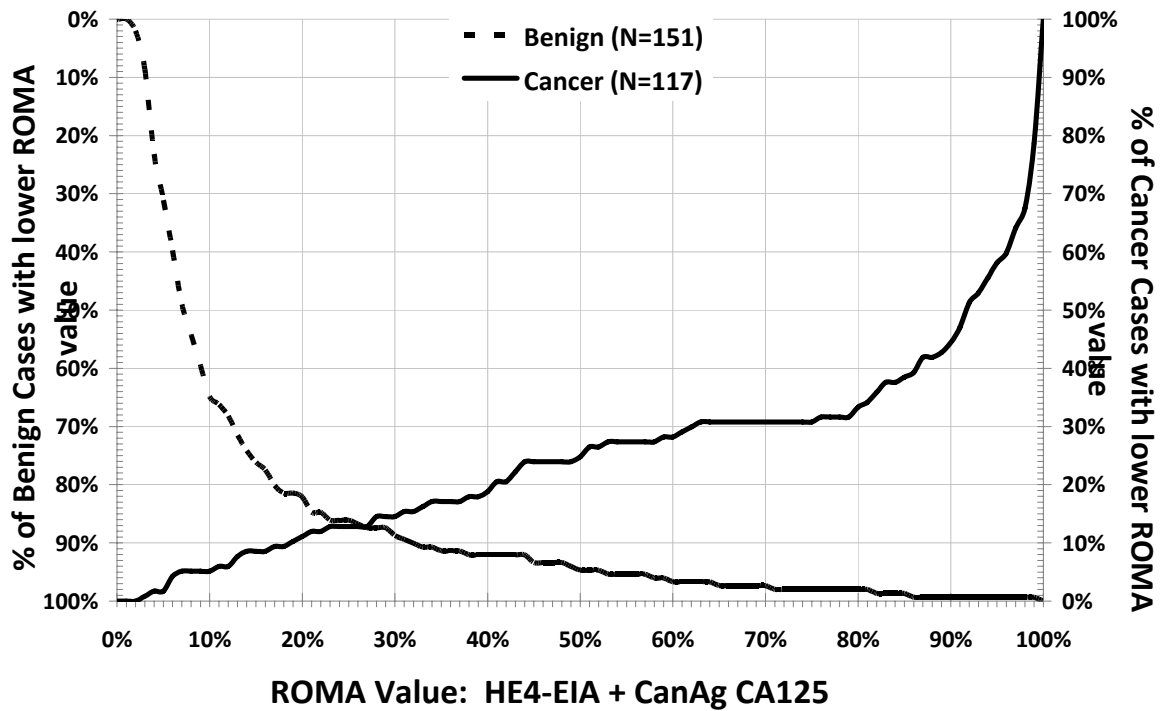


Fig. 4 Súhrnná frekvencia rozdelenia hodnôt ROMA pre **postmenopauzálne** ženy. HE4 EIA + CanAg CA125 EIA kombinácia



Zatriedenie do nízko a vysoko rizikových skupín

Algoritmus rizika ovariálnej malignity bol použitý za účelom triedenia žien do rizikových skupín kvôli vyhľadávaniu epiteliálnej malignity ovárií.

Nasledovné hraničné hodnoty (cut-points) boli použité za účelom dosiahnutia špecificity 75% pre kombináciu dignostických súprav HE4 EIA + ARCHITECT CA125II:

Premenopauzálne ženy

ROMA hodnota $\geq 13.1\%$ = Vysoké riziko výskytu epiteliálnej malignity ovárií

ROMA hodnota $< 13.1\%$ = Nízke riziko výskytu epiteliálnej malignity ovárií

Postmenopauzálne ženy

ROMA hodnota $\geq 27.7\%$ = Vysoké riziko výskytu epiteliálnej malignity ovárií

ROMA hodnota $< 27.7\%$ = Nízke riziko výskytu epiteliálnej malignity ovárií

Zatriedenie všetkých pacientiek s tumorom malej panvy so skrytou epiteliálnou malignitou ovárií do vysoko rizikovej skupiny pomocou hodnôt ROMA pri 75%-nej špecificite je zobrazené v Tab.1 (skupiny pre premenopauzálne a postmenopauzálne pacientky sú tiež uvedené oddelene).

Senzitivita pre zatriedenie pacientiek s epiteliálnou malignitou ovárií v štádiu I-IV do vysokorizikovej skupiny bola 94% pri špecificite 75%, takže 75% žien s benigným tumorom v malej panve bolo klasifikovaných ako nízko riziková skupina. Pozitívna a negatívna prediktívna hodnota bola 58% respektíve 97%.

Tabuľka 1: Roztriedenie zmiešaného súboru pre- a postmenopauzálnych pacientiek s adnexovým tumorom so skrytou epiteliálnou malignitou ovárií (EOC-Epithelial Ovarian Cancer) podľa vypočítaných ROMA hodnôt (pri kombinácii diag. súprav HE4 EIA a ARCHITECT CA125 II). *Premenopauzálna hraničná hodnota rozdelenia (cut-point) $\geq 13.1\%$ (pri špecificite 75%), postmenopauzálna hraničná hodnota rozdelenia (cut-point) $\geq 24.7\%$ (pri špecificite 75%).*

	Premenopauzálne ženy n = 234	Postmenopauzálne ženy n = 268	Ženy spolu n = 502
EOC štádium I-IV & LMP (nízky potenciál malignity)	26 / 34 (75%)	108 / 117 (92%)	134 / 151 (89%)
LMP (nízky potenciál malignity)	10 / 16 (63%)	3 / 6 (50%)	13 / 22 (59%)
EOC štádium I-II	6 / 7 (86%)	24 / 28 (86%)	30 / 35 (86%)
EOC štádium I-IIIC^a	7 / 8 (88%)	35 / 39 (90%)	42 / 47 (89%)
EOC štádium I-IV	16 / 18 (89%)	105 / 111 (95%)	121 / 129 (94%)

^{a)} Epiteliálna malignita ovárií, štádium I-IIb & štádium IIIC (omentum negat., lymfatické uzliny pozit.)

Nie sú žiadne štatisticky významné rozdiely v senzitivite a špecificite ROMA hodnôt, použitím ARCHITECT CA125 II alebo CanAg CA125 EIA hodnôt, pre diferencovanie medzi benigným ochorením a epiteliálnou malignitou ovárií. Pri použití kombinácie súprav CanAg CA125 EIA + HE4 EIA, senzitivita pre zatriedenie pacientiek s epiteliálnou malignitou ovária v štádiách I-IV do skupiny s vysokým rizikom bola 93%. Pozitívna a negatívna prediktívna hodnota bola 57% respektíve 97%.

Musí byť však uvedené, že hraničné hodnoty (cut-points) pre roztriedenie do skupín s vysokým a nízkym rizikom pri požadovanej špecificite musia byť nastavené podľa toho, aký druh súpravy CA125 je použitý.

Nasledovne uvedené hraničné hodnoty boli vybrané za účelom zabezpečiť úroveň špecificity 75% pre kombináciu diag. súprav CanAg CA125 EIA a HE4 EIA:

Premenopauzálna ženy

ROMA hodnota $\geq 12.5\%$ = Vysoké riziko výskytu epiteliálnej malignity ovárií

ROMA hodnota $< 12.5\%$ = Nízke riziko výskytu epiteliálnej malignity ovárií

Postmenopauzálna ženy

ROMA hodnota $\geq 14.4\%$ = Vysoké riziko výskytu epiteliálnej malignity ovárií

ROMA hodnota $< 14.4\%$ = Nízke riziko výskytu epiteliálnej malignity ovárií

Falošne negatívne hodnoty a percentá pri zatriedení epiteliálnej malignity ovária do skupiny s nízkym rizikom skrytej epiteliálnej malignity ovárií u pacientiek s adnexovým tumorom pri použití ROMA hodnôt a pri špecificite 75% je zobrazené v Tab.2

Zatriedenie do skupín s nízkym a vysokým rizikom skrytej epiteliálnej malignity ovária za použitia ROMA algoritmu pri 75%-nej špecificite vychádza celková falošne negatívna hodnota 6.2%.

Prípady s epiteliálnou malignitou ovária zatriedené do skupiny s nízkym rizikom, predstavovali len tri (3) percentá.

Tabuľka 2: Falošne negatívne hodnoty (FNR-False Negative Rate) a percentá pri zatriedení všetkých prípadov epiteliálnej malignity ovária s adnexovým tumorom do skupiny s nízkym rizikom pri použití hodnôt ROMA.

Premenopauzálna hraničná hodnota pre zatriedenie do nízko rizikovej skupiny pri 75%-nej špecificite je $< 13.1\%$, postmenopauzálna hraničná hodnota pre zatriedenie do nízko rizikovej skupiny pri 75%-nej špecificite je $< 27.7\%$.

Epiteliálna malignita ovária ^a	Falošne negatívne hodnoty (FNR)			Podiel malignít v nízko rizikovej skupine		
	Falošne negatívna malignita	Malignity celkom	FNR ^b	Falošne negatívna malignita	Skutočná benignita	(%) ^c
Premenopauzálna	2	18	11.1%	2	149	1.3%
Postmenopauzálna	6	111	5.4%	6	113	5.0%
Všetky pacientky	8	129	6.2%	8	262	3.0%

^a) tumory s nízkym potenciálom malignity (LMP) nie sú zahrnuté

^b) FRN = falošne negatívne / (skutočne pozitívne + falošne negatívne)

^c) (%) = falošne negatívne / (skutočne negatívne + falošne negatívne)

PRACOVNÉ CHARAKTERISTIKY

Presnosť a správnosť

Celková presnosť stanovenia HE4 EIA je $CV \leq 15\%$. Štúdia bola uskutočnená pre inštitúciu National Committee for Clinical Laboratory Standards NCCLS (CLSI) podľa smernice EP5-A2 (22).

Panel štyroch sérových vzoriek bol ananlyzovaný s použitím dvoch rôznych šarží reagensí, v duplikátoch, dve samostatné stanovenia denne počas 20-tich dní. Dáta z tejto štúdie sú sumarizované nižšie.*

Vzorka	Šarža reagensí	n	Stredná konc. (pM)	SD (pM) v rámci analýz	CV % v rámci analýz	Celkové SD (pM)	Celkové 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

*Reprezentatívne dáta; výsledky v iných laboratóriách sa môžu líšiť od týchto dát.

Detekčný limit (analytická senzitivita)

Detekčný limit stanovenia HE4 EIA je ≤ 15 pM. Detekčný limit (LoD) korešponduje s horným limitom 95%-ného intervalu spoľahlivosti a predstavuje najnižšiu koncentráciu HE4 antigénu, ktorá môže byť odlišená od nuly.

Experiment na určenie detekčného limitu (LoD) bol uskutočnený podľa sNCCLS mernice EP17-A (23). V štúdiu bol použitý HE4 kalibrátor A (nulový) a 4 vzorky od zdravých jedincov zriedené na 5 pM riediacim roztokom, tieto vzorky boli testované v 24-replikátoch, 4-krát denne počas dvoch dní.

Detekčný limit (LoD) bol vypočítaný nasledovne:

$$\text{LoD (pM)} = 5.0 \text{ pM} \times (1.65 \times \text{SD}_0 + 1.65 \times \text{SD}_5) / (\text{OD}_5 - \text{OD}_0)$$

Detekčný limit HE4 EIA súpravy bol stanovený ako < 2.5 pM.

Funkčná senzitivita

Funkčná senzitivita HE4 Eia súpravy je ≤ 25 pM.

Funkčná senzitivita je vyjadrená ako koncentrácia analytu, pri ktorej je CV = 20%.

Experiment pre stanovenie funkčnej senzitivity bol uskutočnený podľa NCCLS smernice EP5-A2 (22)

V štúdiu bola testovaná päť členná skupina sér na funkčnú senzitivitu v 4-replikátoch 2-krát denne počas dvadsiatich dní a to s dvoma rôznymi šaržami reagensov.

Funkčná senzitivita HE4 EIA súpravy bola stanovená na < 5 pM.

Spätné stanovenie (recovery)

Spätné stanovenie (recovery) súpravou HE4 EIA je $100 \pm 15\%$.

V tejto štúdiu boli pridané zriedené patientske séra so známou koncentráciou HE4 do vzoriek normálnych ľudských sér. Koncentrácia HE4 bola stanovená súpravou HE4 EIA a bolo vypočítané výsledné percento spätného stanovenia (recovery).

Reprezentatívne dáta z tejto štúdie sú zhrnuté v nižšie uvedenej tabulke*.

Vzorka	Endogénna hodnota HE4 (pM)	Prídavok HE4 Antigénu (pM)	Výsledná hodnota HE4 (pM)	Percent Recovery** (%)
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

Priemerné spätné stanovenie (recovery) pri všetkých štyroch separátnych koncentráciách bolo 97%.

* Reprezentatívne dáta; výsledky v iných laboratóriách sa môžu líšiť od týchto dát.

** % Recovery = výsledná hodnota HE4 (pM) / endogénna hodnota HE4 (pM) + prídavok HE4 (pM)

Efekt vysokej dávky (High Dose Hook Effect)

Efekt vysokej dávky (Hook effect) je jav, pri ktorom vzorky s veľmi vysokými koncentraciami analytu môžu byť odčítané v rozsahu dynamického kalibračného rozsahu súpravy.

Pri použití súpravy HE4 EIA nebol pozorovaný tento efekt vysokej dávky pre vzorky obsahujúce koncentrácie HE4 až do výšky 300 000 pM natívneho antigénu HE4.

Linearita riedenia

HE4 EIA súprava má riediacu linearitu $100 \pm 15\%$. Štúdia bola vedená podľa NCCLS (CLSI) smernice EP6-A (24). Sérové vzorky so zvýšenou hodnotou HE4 boli riedené nulovým HE4 kalibrátorom A (zero).

Koncentrácia HE4 bola určovaná pre každé riedenie a bolo vypočítané percento (%) recovery.

Reprezentatívne dáta z tejto štúdie sú zhrnuté v nižšie uvedenej tabulke*.

Vzorka	Konečný faktor riedenia	Zmeraná hodnota (pM)	Očakávaná hodnota (pM)	Percento Recovery** (%)
1	Neriedené	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	Neriedené	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	Neriedené	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

Priemerná recovery všetkých vyššie uvedených troch riedených vzoriek = 101%

* Reprezentatívne dáta; výsledky v iných laboratóriách sa môžu líšiť od týchto dát.

** % Recovery = HE4 zmeraná koncentrácia x faktor riedenia / neriedená HE4 koncentrácia.

Analytická špecificita

Stredná špecificita HE4 EIA súpravy je $100 \pm 15\%$. Recovery štúdia porovnávala séra obsahujúce nasledovné zlúčeniny pri uvedených koncentráciách s kontrolnými sérami.

Tento experiment interferencií bol vypracovaný podľa NCCLS smernice EP7-A (25).

Boli testované nasledovné zlúčeniny a uvedené koncentrácie a bolo zistené, že neinterferujú s testom.

Endogénne sérové interferencie	Testované koncentrácie
Triglyceridy	30 mg/mL
Billirubín	0.2 mg/mL
Hemoglobín	10 mg/mL
Celkové proteíny	120 mg/mL

Interferencie chemoterapeutík	Testované koncentrácie
Carboplatin	500 µg/mL
Cisplatin	165 µg/mL
Clotrimazol	0.3 µg/mL
Cyclophosphamide	500 µg/mL
Dexamethasone	10 µg/mL
Doxorubicin	1.16 µg/mL
Leucovorin	2.68 µg/mL
Melphalan	2.8 µg/mL
Methotrexate	45 µg/mL
Paclitaxel	3.5 ng/mL

Potenciálne interferujúce klinické podmienky

HE4 EIA bola vyvinutá za použitia vzoriek obsahujúcich HAMA a RF (reumatoidný faktor) pre ďalšie stanovenie špecificity súpravy. Päť vzoriek pozitívnych na HAMA a päť vzoriek pozitívnych na RF bolo vyhodnotených pre % recovery pridaním HE4 antigénu na približnú koncentráciu 50 a 450 pM.

Výsledky priemernej recovery sú zhrnuté v nasledujúcej tabuľke.*

Klinické podmienky	Počet vzoriek	Stredné % recovery
HAMA	5	101
RF	5	95

* Reprezentatívne dáta; výsledky v iných laboratóriách sa môžu líšiť od týchto dát.

ZÁRUKA

Tu prezentované údaje o činnosti boli získané uvedenými postupmi. Akékoľvek zmeny alebo modifikácie postupov, ktoré Fujirebio Diagnostics nedoporučuje, môžu ovplyvniť výsledky. V týchto prípadoch sa Fujirebio Diagnostics zrieka všetkých výslovných garancií, odvodených alebo vyplývajúcich zo zákona, vrátane mlčky predpokladanej výhrady predajnosti a použiteľnosti.

REFERENCIE

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.



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

HE4 EIA Prod. No. 404-10, SK. 2008-09, F5970, r0