



HE4 EIA

Prod. No. 404-10

**Návod k použití
2008-09**

**Enzymoimmunometrická souprava
Pro 96 stanovení**

POUŽITÍ

HE4 EIA je enzymoimmunometrická souprava určená pro kvantitativní stanovení HE4 v lidském séru. Souprava slouží jako vodítka při sledování odpovědi na terapii pacientů s invazivním epitelovým ovariálním karcinomem. Pravidelné stanovení patientských hodnot HE4 by mělo být spojeno s dalšími klinickými metodami určenými na sledování ovariálního karcinomu.

Dále je určena pro použití buď spolu s ARCHITECT CA125II nebo CanAg125 EIA jako vodítka na určení rizika epitelového ovariálního karcinomu u žen v premenopauze a postmenopauze s přítomným pánevním ložiskem. Výsledky musí být interpretovány ve spojení s dalšími metodami v souladu se standardními klinickými postupy.

SHRNUTÍ A VYSVĚTLENÍ TESTU

Lidský nadvarlatový protein 4 (HE4) patřící do rodiny syrovátkových kyselých proteinů se čtyř-disulfidickým jádrem (WFDC) s předpokládanými vlastnostmi na inhibici trypsinu. Další proteiny v této rodině jsou také SLPI, Elafin a PS20 (WFDC1) (1,2). Gen HE4 kóduje 13 kDa protein, avšak v jeho kvartérní glykosylované struktuře má hmotnost přibližně 20-25 kDa, a skládá se z jednotlivých peptidů obsahujících dvě WFDC domény (3). HE4 byl jako první identifikován v epitelu distálního nadvarlete a původně se předpokládalo, že slouží jako proteasový inhibitor zapojený do dozrávání spermií (4,5). Od té doby byla exprese HE4 objevena u několika normálních tkání včetně epitelu respiračních a reprodukčních tkání a také v tkáni karcinomu ovaria (6-10). Navíc kromě exprese na buněčné úrovni, byly zjištěny vysoké hodnoty vylučovaného HE4 v séru pacientů s ovariálním karcinomem. V případě kontrolní studie porovnávající pacienty s ovariálním karcinomem se zdravými a benigními stavy, Hellström a kolektiv zjistili, že HE4 detekoval ovariální karcinom se 67% senzitivitou a 96% specificitou (11). V následující studii vyhodnocením velkého množství známých biomarkerů pro ovariální karcinom se ukázalo, že HE4 má nejlepší senzitivitu pro detekci ovariálního karcinomu, zvláště v časně fázi nemoci. V této studii kombinace HE4 a CA125 byla přesnějším prediktorem malignity než jednotlivé biomarkery samostatně, se senzitivitou 76% a specificitou 95% (12).

Ovariální karcinom je na světě 4. nejčastější příčinou smrti způsobenou rakovinou u žen. V Evropě je rozmezí úmrtnosti mezi 3,6 až 9,3 na 100 000 žen (13). Symptomy ovariálního karcinomu jsou spojené s přítomností adnexálních ložisek a jsou často nejasné a nespecifické. Hlavní cíl diagnostického hodnocení adnexálních ložisek je určení, zda jsou maligní nebo benigní. Odhadem 5 až 10 procent žen ve Spojených státech během života podstoupí operaci podezřelého ovariálního novotvaru, a od 13 do 21 procent z nich se zjistí ovariální malignita (14). American College of Obstetricians and Gynecologists Practise Bulletin publikoval v roce 2007 následující prohlášení: „U žen s ovariálním karcinomem pod dohledem lékařů, kteří mají pokročilý trénink a zkušenosti s léčbou žen s ovariálním karcinomem, jako jsou např. gynekologičtí onkologové, se zlepšil celkový poměr přežití v porovnání s těmi, které nebyly léčeny v takové spolupráci.“ (15). Pokud je většina adnexálních ložisek benigní, je důležité stanovit předoperačně, zda pacient má vysoké riziko ovariálních malignit, aby se zajistil vhodný postup (15). Až do první zprávy z roku 1988 byly klinický nález, sérový CA125 a ultrazvuk spolu s CT scan, MRI a CT/PET standardy při stanovení podezření adnexálních ložisek na malignitu (16). Přestože literatura uvádí celou řadu článků popisujících, která

metoda je nej přesnější, kombinace lékařského vyšetření, CA125 a zobrazovací metody má nejvyšší predikční hodnotu (17-19). Pro zlepšení diagnózy u pacientů s pánevním ložiskem, může být použita HE4 EIA buď spolu s ARCHITECT CA125II nebo CanAg125 EIA jako pomůcka při zhodnocení rizika skrytého epiteliálního ovariálního karcinomu. Výsledky musí být interpretovány ve spojení s dalšími metodami v souladu se standardními klinickými postupy. Další použití soupravy HE4 EIA jako pomůcka při sledování odpovědi na terapii pacientů s invazivním epiteliálním ovariálním karcinomem. Výsledky by měly být využity spolu s dalšími klinickými metodami použitými při sledování ovariálního karcinomu.

PRINCIP STANOVENÍ

HE4 EIA je nekompetitivní imunoanalytické stanovení na pevné fázi, založené na dvou myších monoklonálních protilátkách, 2H5 a 3D8, specifických pro dva různé epitopy, obsažené v doméně C-WFDC HE4. Kalibrátory a patientské vzorky jsou inkubovány společně s biotinylovanou monoklonální protilátkou (MAb) proti HE4 2H5 v mikroprouzcích, potažených streptavidinem. HE4, přítomný v kalibrátorech nebo patientských vzorcích, se během inkubace adsorbuje na mikroproužky, potažené streptavidinem, prostřednictvím biotinylované MAb proti HE4. Proužky se pak promyjí a inkubují s křenovou peroxidázou (HRP) značenou MAb proti HE4, 3D8. Po promytí se do každé jamky přidá chromogenní substrát (peroxid vodíku a 3, 3', 5, 5' tetra-methylbenzidin) v tlumivém roztoku a ponechá se probíhat enzymatická reakce. Je-li přítomen antigen, pak během enzymatické reakce dojde k modrému zabarvení roztoku v jamce. Intenzita zabarvení je úměrná množství HE4, přítomnému ve vzorcích.

Intenzita zabarvení se stanoví spektrofotometrem pro mikrodestičky při 620 nm (nebo případně po přidání stop roztoku při 405 nm). Kalibrační křivky jsou sestaveny pro každé stanovení vynesáním hodnoty absorbance proti koncentraci každého kalibrátoru. Koncentrace HE4 v patientských vzorcích se pak odečítají z kalibrační křivky.

REAGENCIE

- Každá souprava HE4 EIA obsahuje reagenty na 96 stanovení.
- Expirační datum soupravy je uvedeno na vnějším štítku na krabici soupravy.
- Po uplynutí expirační doby soupravu již nepoužívejte.
- Nemíchejte reagenty z různých výrobních šarží soupravy.
- Soupravu skladujte při 2 – 8°C. Nezamrazujte.
- Stabilitu otevřených reagentů naleznete v tabulce, uvedené níže. Reagenty jsou stabilní po uvedené dobu, pokud nejsou kontaminovány, jsou skladovány v dobře uzavřených originálních lahvičkách a zachází se s nimi předepsaným způsobem. Okamžitě po použití je opět uskladněte při 2 – 8°C.

| Složka | Množství | Skladování a stabilita po prvním otevření |
|---|------------|---|
| MICROPLA Mikrodestička | 1 destička | 2 – 8°C do data expirace, uvedeného na destičce |
| 12 x 8 jamek potažených streptavidinem. Nepoužité proužky po otevření okamžitě vraťte do hliníkového sáčku, obsahujícího vysoušedlo. Pečlivě uzavřete, aby byly proužky uchovávány v suchu. | | |

| | | |
|-------------------------|------------|---|
| CAL | HE4 | A |
| Kalibrátor HE4 A | 1 x 8 ml | 2 – 8°C do data expirace, uvedeného na lahvičce |

Fosfátový tlumivý solný roztok s hovězím sérovým albuminem, inertní žlutou barvou a s neazidovým antimikrobiálním konzervačním činidlem. Připraven k použití. Také určen pro ředění patientských vzorků.

| Složka | Množství | Skladování a stabilita po prvním otevření |
|--------|----------|---|
|--------|----------|---|

Kalibrátory HE4 B–F 5 lahviček, lyofilizováno
Stabilita po rozpuštění
4 týdny při 2 – 8°C
4 měsíce při –20°C nebo níže

| | | |
|-----|-----|---|
| 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 obsahují antigen HE4 ve fosfátovém tlumivém solném roztoku s hovězím sérovým albuminem, inertní žlutou barvou a s neazidovým antimikrobiálním konzervačním činidlem. Před použitím rozpustit v destilované nebo deionizované vodě. **POZNÁMKA:** Přesná koncentrace HE4 je specifická pro každou výrobní šarži a je vyznačena na štítku každé lahvičky.

Kontroly HE4 2 lahvičky, lyofilizováno
Stabilita po rozpuštění
4 týdny při 2 – 8°C
4 měsíce při –20°C nebo níže

| | | |
|---------|-----|---|
| CONTROL | HE4 | 1 |
|---------|-----|---|

1 x 1 ml

| | | |
|---------|-----|---|
| CONTROL | HE4 | 2 |
|---------|-----|---|

1 x 1 ml

Lyofilizované kontroly obsahují antigen HE4 v matrici lidského séra a neazidové antimikrobiální konzervační činidlo. Před použitím rozpustit v destilované nebo deionizované vodě.

| | |
|--------|----------|
| BIOTIN | Anti-HE4 |
|--------|----------|

Biotin Anti-HE4

1 x 15 ml

2 – 8°C do data expirace,
uvedeného na lahvičce

Biotinylovaná myší monoklonální protilátka proti HE4, přibližně 1 µg/ml. Obsahuje fosfátový tlumivý solný roztok (pH 7,2) s hovězím sérovým albuminem, blokovacími činidly, detergentem a inertní modrou barvou, a neazidovým antimikrobiálním konzervačním činidlem. Připravena k použití.

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

Indikátor, HRP Anti-HE4

1 X 0,75 ml

2 – 8°C do data expirace,
uvedeného na lahvičce

Zásobní roztok myší monoklonální protilátky proti HE4, konjugované s HRP, přibližně 40 µg/ml. Obsahuje neazidové antimikrobiální konzervační látky. Před použitím naředit ředidlem pro indikátor.

| Složka | Množství | Skladování a stabilita po prvním otevření |
|--------|----------|---|
|--------|----------|---|

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

| | | |
|------------------------------|-----------|---|
| Ředidlo pro indikátor | 1 x 15 ml | 2 – 8°C do data expirace, uvedeného na lahvičce |
|------------------------------|-----------|---|

Fosfátový tlumivý solný roztok (pH 7,2) s hovězím sérovým albuminem, blokovacími činidly, detergenty, inertní modrou barvou a neazidovým antimikrobiálním konzervačním činidlem. Připraven k použití.

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

| | | |
|-------------------------|-----------|---|
| Substrát TMB HRP | 1 x 12 ml | 2 – 8°C do data expirace, uvedeného na lahvičce |
|-------------------------|-----------|---|

Obsahuje tlumivý roztok peroxidu vodíku a 3, 3', 5, 5' tetramethylbenzidinu (TMB). Připraven k použití.

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

| | | |
|--------------------|-----------|---|
| Stop roztok | 1 x 15 ml | 2 – 8°C do data expirace, uvedeného na lahvičce |
|--------------------|-----------|---|

Obsahuje 0,12M kyselinu chlorovodíkovou. Připraven k použití.

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

| | | |
|---------------------------------------|-----------|---|
| Koncentrát promývacího roztoku | 1 x 50 ml | 2 – 8°C do data expirace, uvedeného na lahvičce |
|---------------------------------------|-----------|---|

Tlumivý solný roztok Tris-HCl s Tweenem 20. Obsahuje Germall II jako konzervační činidlo. Před použitím naředit 25krát vodou.

Známky nestability

Substrát TMB HRP by měl být bezbarvý nebo slabě namodralý. Modrá barva znamená, že reagentie byla kontaminována a měla by být zlikvidována.

UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

Pouze pro diagnostické použití in vitro

- Dodržujte instrukce v Návodu k použití. Spolehlivost výsledku nemůže být garantována v případě odchylky od Návodu k použití.
- Se všemi patientskými vzorky zacházejte jako s potenciálně infekčními. Doporučuje se zacházet s reagentiemi lidského původu a patientskými vzorky podle OSHA „Standard on Bloodborne pathogens“ (20). Úroveň biologického nebezpečí 2 (21) nebo jiné vhodné doporučení pro manipulaci s biologicky nebezpečným materiálem by mělo být uplatněno při manipulaci s materiálem obsahujícím nebo potenciálně obsahujícím infekční agens.
- Při likvidaci odpadu postupujte podle místních bezpečnostních předpisů.

Upozornění

Materiál použitý při přípravě reagentií lidského původu byl testován a bylo zjištěno, že žádná složka nereagovala s protilátkami proti antigenům HIV1 a HIV2, HCV a povrchovému antigenu hepatitidy B (HBsAg). Avšak žádná metoda nemůže kompletně zaručit nepřítomnost nemoci přenášené krví, a proto se musí se všemi reagentiemi lidského původu zacházet a manipulovat jako s potenciálně infekčními.

PŘÍPRAVA A SKLADOVÁNÍ VZORKŮ

Souprava HE4 EIA je určena pro použití sérových vzorků (včetně séra odebíraného do separačních zkumavek (SST)). Plasma nebo jiné lidské tekutiny nebyly schváleny pro soupravu HE4 EIA. Krev odeberte ze žíly a dodržujte postup uvedený v návodu pro odběrové zkumavky. Při zkoumání série vzorků by se měly použít vzorky stejného původu jako během studie. Sérum může být skladováno 3 dny při 2 – 8°C před analýzou. Pro delší skladování se doporučuje uchovávat vzorky při teplotě -40°C nebo nižší.

Před analýzou vzorky ponechte pozvolna rozmrazit při laboratorní teplotě a DŮKLADNĚ promíchejte vícekrát opatrným otáčením vzorků. Vzorky obsahující větší množství velkých částic by měly být před použitím odstředěny po dobu 10 minut při 10 000 x g, aby se eliminovaly jakékoliv částice, které mohly vzniknout v důsledku procesu tání.

POSTUP

Potřebné materiály nedodávané se soupravou

1. **Třepačka pro mikrodestičky**
Třepání by mělo být střední až silné, přibližně 700 – 1100 kmitů /min.
2. **Promývací zařízení pro mikrodestičky**
Automatická promývačka destiček, která umožní nastavit 1, 3 a 6 promývacích cyklů s minimálním objemem 350 µl/jamku/promývací cyklus.
Pokud není k dispozici automatická promývačka, doporučujeme 8-kanálovou pipetu s vyměnitelnými špičkami o objemu 350 µl.
3. **Spektrofotometr pro mikrodestičky**
S vlnovou délkou 620 nm a/nebo 405 nm a rozsahem absorbance od 0 do 3,0.
4. **Přesné pipety**
S plastovými špičkami na jedno použití, schopné dávkovat mikrolitrové objemy. Užitečná, ale ne nezbytná je i 8-kanálová pipeta nebo opakovací pipeta s plastovými špičkami na jedno použití pro dávkování 100 µl.
Pipety pro mililitrové objemy.
5. **Destilovaná nebo deionizovaná voda**
Pro rozpouštění kalibrátorů, kontrol HE4 a pro přípravu promývacího roztoku.

Poznámky k postupu stanovení

1. Aby bylo zajištěno správné používání soupravy HE4 EIA, je třeba důkladně porozumět obsahu tohoto příbalového letáku. Reagencie dodávané se soupravou jsou nedílnou součástí při jejím použití. Nemíchejte stejné reagencie ze souprav, které mají různá výrobní čísla. Nepoužívejte reagencie ze soupravy po uplynutí data expirace, vytištěného na vnější straně krabice soupravy.
2. Před použitím je třeba reagencie vytemperovat na laboratorní teplotu (20 – 25°C). Zmrazené vzorky nechte rozmrazit pomalu a po roztátí je jemně, ale důkladně promíchejte. **Abyste získali správné výsledky, pracujte pouze při teplotě mezi 20 a 25°C.**
3. Před započítáním pipetování kalibrátorů a patientských vzorků vám doporučujeme označit si jednotlivé proužky, abyste byli schopni během stanovení i po jeho skončení jednoznačně identifikovat všechny vzorky.
4. Podmínka efektivního a důkladného promytí proužků za účelem oddělení navázaného a nenavázaného antigenu a reagentů komplexů antigen-protilátka navázaných na pevné fázi je jedním z nejdůležitějších kroků v EIA. **Zajistěte, aby každá jamka byla úplně naplněna až ke svému okraji a aby jamky mezi jednotlivými promývacími cykly i po skončení promývání byly dokonale odsáty a byly suché. Jestliže v jamkách zbyla nějaká kapalina, jamky obraťte a pečlivě je vyklepejte do vrstvy buničité vaty.**
Automatické promývání proužků: Postupujte podle pokynů výrobce pro provoz a promývejte požadovaným počtem promývacích cyklů před a po každém inkubačním kroku.
V odsávacím/promývacím zařízení by promývací roztok neměl zůstat po delší dobu, protože by se jehly mohly ucpat a špatně dávkovat kapalinu nebo odsávat.
5. Substrát TMB HRP je velmi citlivý na kontaminaci. Abyste zachovali jeho optimální stabilitu a zabránili kontaminaci, odlijte požadované množství z lahvičky do pečlivě vymyté nádoby nebo nejlépe do plastové nádoby na jedno použití. Používejte pouze čisté plastové špičky na jedno použití.

6. Při manipulaci se vzorky a reagensy používejte pouze čisté plastové špičky na jedno použití a správnou techniku pipetování. Špičku pipety držte kousek nad okrajem jamky a nedotýkejte se plastového proužku ani hladiny kapaliny v jamce, abyste zabránili vzájemnému přenosu vzorku a reagensů. Správná technika pipetování je zvláště důležitá při manipulaci se substrátem TMB HRP.

| Příprava reagensů | Stabilita připravené reagensie | |
|--|---|----------------------------|
| Kalibrátory HE4 B - F | 4 týdny při 2 – 8°C 4 měsíce při –20°C nebo níže | |
| Do každé lahvičky přidejte přesně 1 ml destilované nebo deionizované vody. Ponechte alespoň 15 minut stát, aby se obsah dokonale rozpustil a jemně promíchejte. POZNÁMKA: Koncentrace kalibrátorů je uvedena na štítcích a musí být použita při výpočtu výsledků. | | |
| Kontroly HE4 | 4 týdny při 2 – 8°C 4 měsíce při –20°C nebo níže | |
| Do každé lahvičky přidejte přesně 1 ml destilované nebo deionizované vody. Ponechte alespoň 15 minut stát, aby se obsah dokonale rozpustil a jemně promíchejte. POZNÁMKA: Rozsah kontrol je uveden na štítcích. | | |
| Promývací roztok | 2 týdny při 2 – 25°C v uzavřeném zásobníku | |
| Do čisté zásobní lahve nalijte 50 ml koncentráту promývacího roztoku a naředte 25 x přidáním 1200 ml destilované nebo deionizované vody, abyste získali tlumivý promývací roztok. | | |
| Pracovní roztok indikátoru (tracer) | 4 týdny při 2 – 8°C v uzavřeném zásobníku | |
| Připravte požadované množství pracovního roztoku indikátoru (traceru) pro jeden proužek smícháním 50 µl indikátoru HRP Anti-HE4 s 1 ml ředidla pro indikátor (viz níže uvedená tabulka): | | |
| Počet proužků | Indikátor, HRP Anti-S100 (µl) | Ředidlo pro indikátor (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 |

Pro přípravu pracovního roztoku indikátoru použijte čistou plastovou nebo skleněnou lahvičku.

Další možnost: Nalijte obsah lahvičky s indikátorem HRP Anti-HE4 do lahvičky s ředidlem pro indikátor a jemně promíchejte. Přesvědčte se, že jste do lahvičky s ředidlem pro indikátor opravdu přenesli veškerý indikátor HRP Anti-HE4.

Poznámka: Pracovní roztok indikátoru je stabilní 4 týdny při 2 – 8°C. Nepřipravujte víc pracovního roztoku indikátoru, než bude použito během této doby a ujistěte se, že je uchováván správně.

POSTUP STANOVENÍ

Stanovení kalibrátorů a patientských vzorků provádějte v duplikátech. Pro každé stanovení sestrojte novou kalibrační křivku. Všechny reagensie a vzorky musí být před použitím vytemperovány na laboratorní teplotu (20 – 25°C).

1. Začněte připravovat kalibrátory B-F, kontroly 1 a 2, promývací roztok a pracovní roztok indikátoru. Je důležité používat čisté nádoby. Postupujte přesně podle návodu.
2. Do rámečku na proužky vložte požadovaný počet proužků s mikrojamkami. (Zbývající proužky okamžitě vraťte do hliníkového sáčku s vysoušedlem a pečlivě ho uzavřete.) Všechny proužky jedenkrát promyjte promývacím roztokem. Promyjte pouze tolik proužků, kolik jich bude zpracováno během následujících 30 minut.
3. Do jamek napipetujte 25 µl kalibrátorů HE4 (KAL A,B,C,D,E a F), kontroly HE4 (C1, C2) a patientských vzorků (neznámé Nez) podle následujícího schématu:

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 atd. |
|---|----------|----------|-------|---|---|---|--------|
| A | Kal A | Kal E | Nez.1 | | | | |
| B | Kal A | Kal E | Nez.1 | | | | |
| C | Kal B | Kal F | Nez 2 | | | | |
| D | Kal B | Kal F | Nez 2 | | | | |
| E | Kal C | C1 | Atd. | | | | |
| F | Kal C | C1 | | | | | |
| G | Kal D | C2 | | | | | |
| H | Kal D | C2 | | | | | |

4. Pomocí přesné pipety (nebo přesné 8-kanálové pipety na 100 µl) přidejte do všech jamek 100 µl biotinylované Anti-HE4. Pipetu držte kousek nad horním okrajem jamky a nedotýkejte se plastového proužku ani hladiny kapaliny, aby nedocházelo k vzájemné kontaminaci v jamkách.
5. Rámeček s proužky inkubujte za stálého třepání po dobu 1 hodin (± 10 min.) při laboratorní teplotě (20 – 25°C) na třepačce pro mikrodestičky.
6. Po první inkubaci všechny proužky třikrát odsajte a promyjte podle promývacího postupu, popsaného v Poznámkách k postupu stanovení, bod 4.
7. Do všech jamek přidejte 100 µl pracovního roztoku indikátoru. Použijte stejný postup pipetování, jak je popsán výše v bodu 4.
8. Rámeček inkubujte za stálého třepání 1 hodinu (± 5 min.) při laboratorní teplotě.
9. Po druhé inkubaci všechny proužky šestkrát odsajte a promyjte podle promývacího postupu, popsaného v Poznámkách k postupu stanovení, bod 4.
10. Do všech jamek přidejte 100 µl substrátu TMB HRP. Použijte stejný postup pipetování, jak je popsán výše v bodu 4. Substrát TMB HRP pipetujte co nejrychleji, doba mezi napipetováním první a poslední jamky nesmí přesáhnout 5 minut.
11. Inkubujte po dobu 30 minut (± 5 min.) při laboratorní teplotě za stálého třepání. Zabraňte působení přímého slunečního světla.
12. Okamžitě změřte absorbanci při 620 nm ve spektrofotometru pro mikrodestičky.

Další možnost

Pokud v laboratoři není spektrofotometr na mikrodestičky, schopný měřit při 620 nm, můžete stanovit absorbanci následovně:

- Alt. 12.** Přidejte 100 µl Stop roztoku. Promíchejte a během 15 minut od přidání Stop roztoku odečtěte absorbanci ve spektrofotometru pro mikrodestičky při 405 nm.

Rozsah měření

Soupravou HE4 EIA lze měřit koncentrace mezi 15 a 900 pM. Jestliže očekáváte koncentrace HE4 nad tímto rozsahem měření, doporučujeme vzorky před měřením naředit kalibrátorem HE4 - A. (viz. „Výpočet výsledků naředěných vzorků“).

Kontrola kvality

HE4 kontrola 1 a 2 by měly být použity pro validaci série stanovení. Rozsahy očekávaných výsledků jsou na štítkách lahvíček.

Výsledky měření HE4 by měly být považovány za validní, jestliže:

- Průměrné hodnoty kontrol v duplikátu jsou v deklarovaném rozsahu.
- Opakované měření v duplikátu jednotlivých kalibrátorů B-F a kontrol má variační koeficient do 15%
- Při opakovaném měření v duplikátu kalibrátorů A (nula) nebude rozdíl mezi nimi větší než 0,06 O.D.

Jestliže se získají hodnoty mimo hranice deklarovaného rozsahu kalibrátorů a kontrol, je nutno provést důkladnou kontrolu všech reagensů, přesnosti pipet, promývačky mikrotitračních destiček a účinnosti měřicího spektrofotometru a analýzu zopakovat. Každá laboratoř si může připravit vlastní interní kontroly různých hladin ze získaných patientských sér, aby byla zajištěna přesnost měření.

Referenční materiál

Protože žádné obecné referenční materiály pro antigen HE4 nejsou k dispozici, hodnoty kalibrátorů HE4 byly stanoveny ve srovnání se sadou referenčních standardů výrobce.

VÝPOČET VÝSLEDKŮ

Používá-li se spektrofotometr na mikrodestičky s vestavěným výpočetním programem, řiďte se návodem ke spektrofotometru a vytvořte program, ve kterém použijete koncentrace, uvedené na štítkách kalibrátorů HE4.

Pro automatický výpočet výsledků HE4 doporučujeme použít některou z následujících metod:

- Aproximaci křivky „kubický spline“. Do křivky je nutno zahrnout kalibrátor A s hodnotou 0 pM.
- Interpolaci proložením od bodu k bodu. Do křivky je nutno zahrnout kalibrátor A s hodnotou 0 pM.
- Metodu kvadratické aproximace křivky. Do křivky je nutno zahrnout kalibrátor A s hodnotou 0 pM.

POZNÁMKA: Nepoužívejte 4-parametrovou nebo lineární regresi.

Při manuálním vyhodnocení se kalibrační křivka získá vynesením hodnot absorbance (A), získaných pro každý kalibrátor HE4, proti odpovídající koncentraci HE4 (v pM). Neznámé koncentrace HE4 se potom odečtou z kalibrační křivky na základě průměrné hodnoty absorbance každého patientského vzorku.

Výpočet výsledků ředěných vzorků

Jestliže při prvním stanovení vzorky vykazují hodnoty HE4 vyšší než je hodnota 900 pM, musí být naředěny kalibrátorem HE4 A v poměru 1/10 a 1/100 a znovu analyzovány, aby se získala přesná koncentrace HE4.

- 1/10 ředění = 50 μ l patientského vzorku + 450 μ l kalibrátoru HE4 A

- 1/100 ředění = 50 μ l patientského vzorku naředěného 1/10 + 450 μ l kalibrátoru HE4 A

Koncentrace HE4 neředěného vzorku se vypočte následovně:

- Ředění 1/10: 10 x naměřená hodnota

- Ředění 1/100: 100 x naměřená hodnota

Riziko Ovariální Malignity - Algoritmus (ROMA) pro stanovení rizika epiteliálního ovariálního karcinomu u žen v premenopauze a postmenopauze s přítomným pánevním ložiskem

Výpočet prediktivního indexu

Prediktivní index (PI) se vypočítá zvlášť pro ženy v premenopauze a postmenopauze podle níže uvedených rovnic (1) a (2). Do výpočetních rovnic se vkládají hodnoty získané soupravou HE4 EIA, a dále buď soupravami ARCHITECT CA 125II nebo CanAg CA 125 EIA pro výpočet PI podle menopauzálního stavu žen.

(1) Premenopauzální ženy

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

(2) Postmenopauzální ženy

$$\text{Prediktivní index (PI)} = -8,09 + 1,04 \cdot \text{LN}[\text{HE4}] + 0,732 \cdot \text{LN}[\text{CA125}]$$

Výpočet hodnoty ROMA

Pro výpočet hodnoty ROMA (např. Prediktivní pravděpodobnost), vložte vypočítanou hodnotu prediktivního indexu do rovnice (3);

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

Níže uvedené příklady mohou být použity pro účel validace výpočtu PI a hodnoty ROMA:

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

LIMITACE METODY

Pacientky s potvrzeným ovariálním karcinomem mohou mít hodnoty ve stejném rozmezí jako zdravé ženy. Určité histologické typy ovariálního karcinomu např. mucinózní a zárodečné buněčné tumory zřídka exprimují HE4, proto HE4 není doporučována pro sledování pacientů se zjištěným mucinózním a zárodečným buněčným karcinomem (7). Naopak, zvýšené hladiny antigenu HE4 mohou být nalézány u jedinců s nemaligními nemocemi. Proto, zvýšení HE4 nemůže být absolutním důkazem přítomnosti nebo nepřítomnosti malignity a stanovení HE4 by nemělo být používáno pro nádorový screening. Výsledky stanovení by měly být interpretovány jen ve spojení s dalšími vyšetřeními a metodikami diagnostiky nemoci a sledování pacientů. Stanovení HE4 by také nemělo nahradit žádné zavedené klinické vyšetření.

Algoritmus rizika ovariální malignity nebyl schválen pro následující skupiny pacientů: pacienti s předešlou léčbou malignity, pacienti aktuálně léčení chemoterapií a pacienti mladší 18 let. Vzorec matematické funkce, uvedený jako Algoritmus rizika ovariální malignity (ROMA), závisí na premenopauzálním nebo postmenopauzálním stavu žen. Určení premenopauzálního nebo postmenopauzálního stavu musí být provedeno na základě funkce ovaríí, určené z informací, dostupných z klinického vyhodnocení a léčebné historie. Hodnoty ROMA nezahrnují věk, rodinnou historii, klinické nálezy nebo zobrazení výsledků a mohou být interpretovány v souvislosti s těmito parametry.

Selhání soupravy HE4 EIA a/nebo CA125 jako je naznačeno, nebo chyba ve výpočtu výsledků může vést k nepřesným vyhodnocení rizika a nevhodné léčbě pacienta. Speciálně falešně nízké hodnoty stanovení mohou vést k tomu, že pacient má nižší riziko epitelového ovariálního karcinomu, což by mohlo vést k méně specifické léčbě. Použití výsledků bez vzetí v úvahu dalších laboratorních nálezů, výsledků zobrazovacích technik a klinického obrazu by mohlo představovat riziko.

Protilátky proti reagentům (lidské protilátky proti myším imunoglobulinům (HAMA) nebo heterofilní protilátky) v patientském vzorku by případně mohly rušit stanovení, i když jsou použity v tlumivých roztocích specifické blokovací reagentie. **Stanovení musí být prováděno v prostředí s kontrolou teploty, protože inkubace při teplotách vyšších než jsou doporučeny v rozmezí 20 – 25 °C mohou dávat falešně nízké výsledky.**

OČEKÁVANÉ HODNOTY

Distribuce HE4 stanovení v 1147 patientských vzorcích je uvedena v tabulce níže.

| Distribuce hodnot HE4 | | | | | |
|----------------------------------|---------------|----------|--------------|--------------|---------|
| | Počet jedinců | 0-150 pM | 150,1-300 pM | 300,1-500 pM | >500 pM |
| Zdraví | | | | | |
| Ženy (Premenopauzální) | 76 | 72 | 3 | 0 | 1 |
| Ženy (Postmenopauzální) | 103 | 97 | 5 | 0 | 1 |
| Benigní stavy | | | | | |
| Těhotenství | 22 | 21 | 1 | 0 | 0 |
| Benigní gynekologické onemocnění | 347 | 324 | 18 | 1 | 4 |
| Jiné benigní onemocnění | 108 | 82 | 8 | 7 | 11 |
| Hypertenze/Srdeční selhání | 96 | 75 | 16 | 2 | 3 |
| Rakovina | | | | | |
| Ovariální karcinom | 127 | 27 | 18 | 21 | 61 |
| Karcinom prsu | 46 | 40 | 4 | 2 | 0 |
| Karcinom plic | 50 | 29 | 15 | 6 | 0 |
| Karcinom endometria | 116 | 86 | 15 | 4 | 11 |
| Gastrointestinální karcinom | 56 | 47 | 8 | 0 | 1 |

V této studii mělo 94,4% zdravých žen hodnoty HE4 na nebo pod úrovní 150 pM. Doporučuje se, aby si každá laboratoř stanovila vlastní referenční hodnoty pro každou skupinu.

Sledování průběhu nemoci u pacientů s diagnostikovaným ovariálním karcinomem

Účinnost soupravy HE4 EIA jako pomůcka při sledování průběhu nemoci pacientů s ovariálním karcinomem byla vyhodnocena na základě změn hodnot HE4 u vzorků sér od 80 pacientů porovnáním se změnami průběhu nemoci. Studie s celkovým počtem 354 párů pozorování byla provedena s průměrným počtem 4,4 pozorování na pacienta. Pozitivní změna HE4 byla definována jako zvýšení hodnoty o minimálně 25% oproti hodnotě předešlé. Tato změna hladiny zohledňuje variabilitu soupravy a biologickou variabilitu. S progresí nemoci korelovalo 60% nebo 76/126 patientských vzorků s pozitivní změnou, zatím co onemocnění bez progresu korelovalo u 75% nebo 171/228 s běžných patientských vzorků žádnou významnou změnou HE4. Celková shoda byla 70% nebo 247/354. V následující tabulce jsou uvedena data ve formátu 2 x 2

| Změna ve stavu nemoci na související pár | | | |
|--|----------|--------------|---------|
| Zvýšení koncentrace HE4 | Progrese | Bez progresu | Celkově |
| >25% | 76 | 57 | 133 |
| ≤25% | 50 | 171 | 221 |
| celkově | 126 | 228 | 354 |

Následující tabulka uvádí distribuci na pacienta. S progresí nemoci korelovalo 93% nebo 54/58 patientských souborů sér s pozitivní změnou, přičemž u nemoci bez progresy korelovalo 32% nebo 7/22 souborů sér se žádnou významnou změnou hodnot HE4. Celková shoda v této studii byla 76% nebo 61/80.

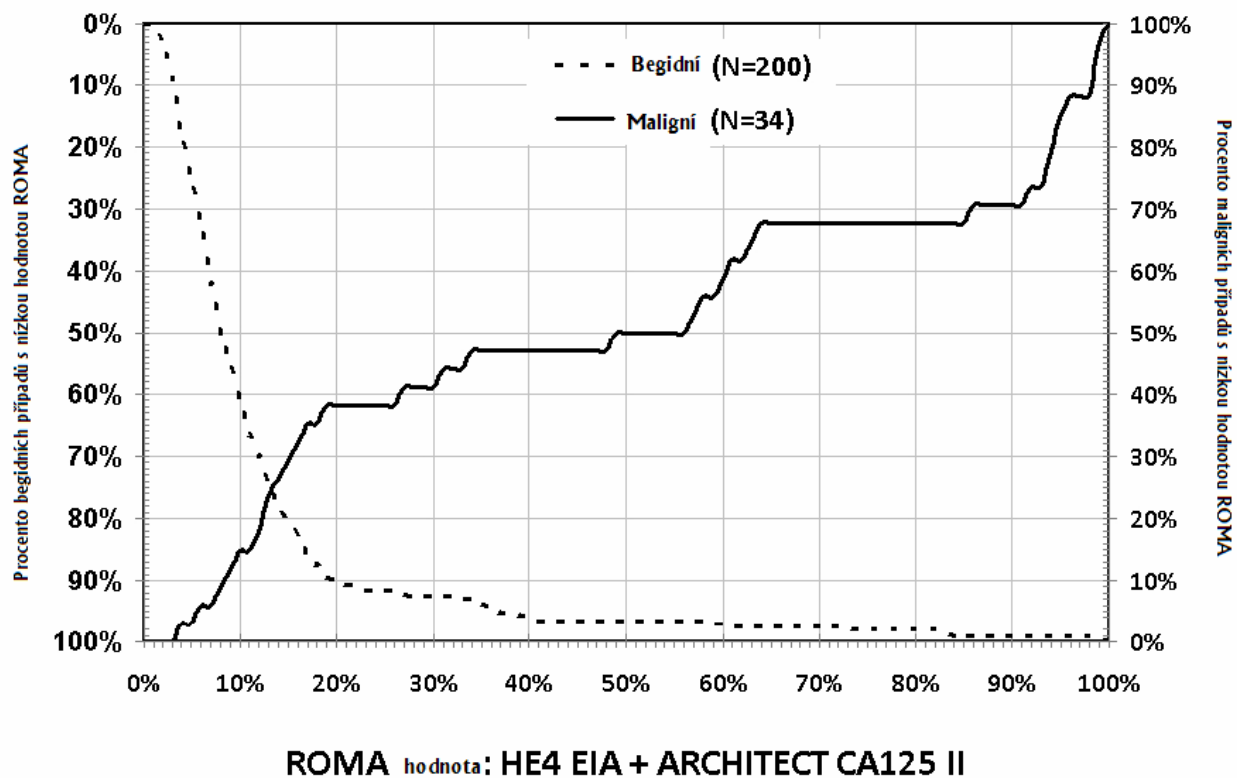
| Změna ve stavu nemoci na pacienta | | | |
|--|-----------------|---------------------|----------------|
| Zvýšení koncentrace HE4 | Progrese | Bez progresy | Celkově |
| >25% | 54 | 15 | 69 |
| ≤25% | 4 | 7 | 11 |
| celkově | 58 | 22 | 80 |

Vyhodnocení rizika u pacientů s pánevním ložiskem

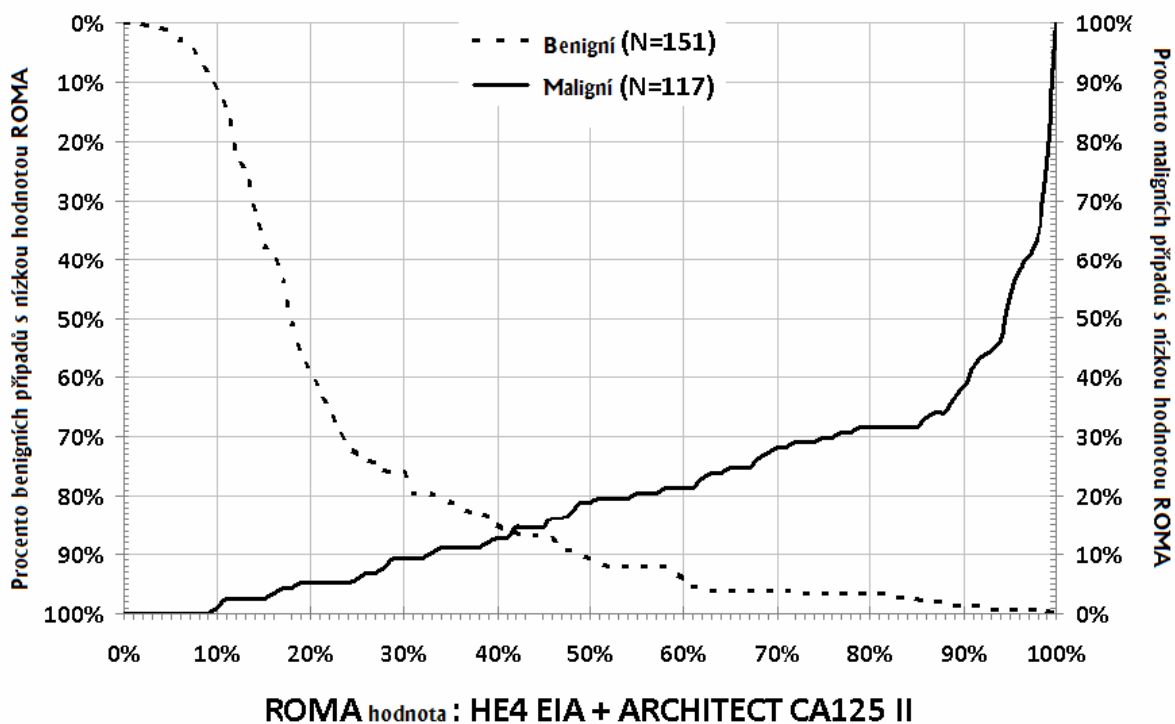
Účinnost vyhodnocení rizika pro epitelový ovariální karcinom u pacientů s pánevním ložiskem byla stanovena v prospektivní, multi-centrické, dvojitě zaslepené klinické studii pomocí soupravy HE4 EIA v kombinaci s CA125 stanoveným buď soupravou ARCHITECT CA125II, nebo CanAg CA125 EIA. Algoritmus ROMA byl vyvinut pro zhodnocení rizika epitelového ovariálního karcinomu. Algoritmus zohledňuje hodnoty jak HE4 a CA125 tak i menopauzální stav pacientky. Algoritmus vypočítává prediktivní pravděpodobnost nalezení epitelového ovariálního karcinomu při chirurgickém zákroku. V prospektivní studii s celkovým počtem 502 pacientů byla vyhodnocena prediktivní pravděpodobnost ovariálního karcinomu a na základě hodnot ROMA bylo možno rozdělit pacienty na skupinu s vysokým a nízkým rizikem.

Kumulativní frekvenční distribuce hodnot ROMA pro případ benigního a ovariálního nádoru, zahrnujícím nádory s nízkým maligním potenciálem (LMP) pomocí algoritmu je uvedena na obrázku 1 a 2 pro kombinaci HE4 EIA a ARCHITECT CA125II a na obrázku 3 a 4 pro kombinaci HE4 EIA a CanAg CA125 EIA. Grafy frekvenční distribuce znázorňují distribuci pacientů s benigním onemocněním a epitelovým ovariálním karcinomem (zahrnujícím LMP) při různých mezních hodnotách ROMA.

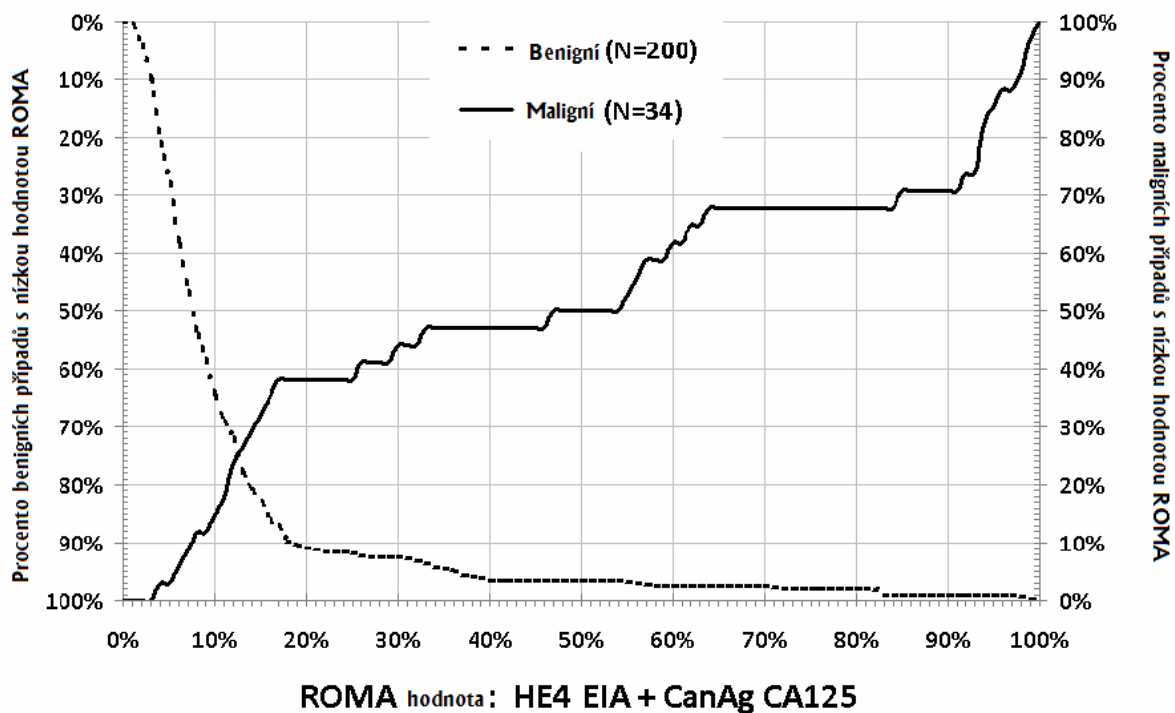
Obr. 1 Kumulativní frekvenční distribuce hodnot ROMA pro **premenopauzální** ženy. HE4 EIA a ARCHITECT CA125II



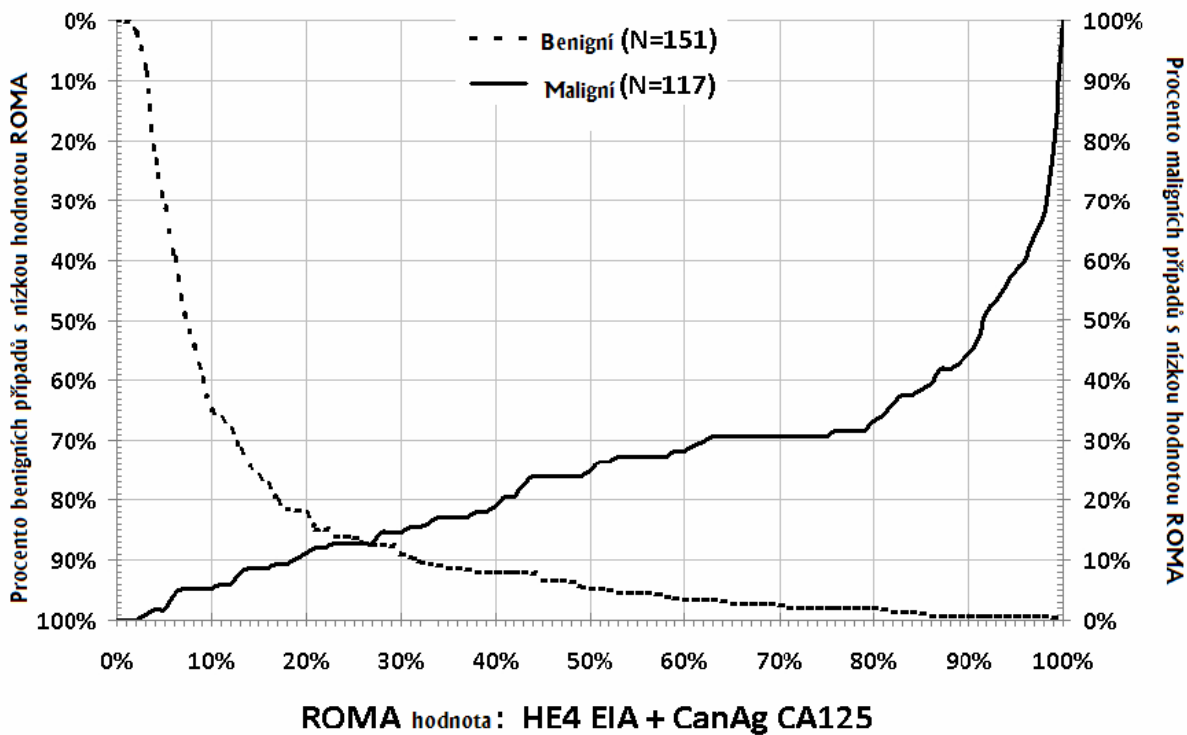
Obr. 2 Kumulativní frekvenční distribuce hodnot ROMA pro **postmenopauzální** ženy. HE4 EIA a ARCHITECT CA125II



Obr. 3 Kumulativní frekvenční distribuce hodnot ROMA pro **premenopauzální** ženy. HE4 EIA a CanAg CA125 EIA



Obr. 4 Kumulativní frekvenční distribuce hodnot ROMA pro **postmenopauzální** ženy. HE4 EIA a CanAg CA125 EIA



Rozdělení do skupin s nízkým a vysokým rizikem

Pro rozdělení žen do skupin podle rizika nalezení epitelového ovariálního karcinomu byl použit algoritmus rizika ovariální malignity. Následující mezní hodnoty byly určeny s cílem poskytnout specifitu 75% pro kombinaci souprav HE4 EIA a ARCHITECT CA125II:

Premenopauzální ženy

Hodnota ROMA $\geq 13,1\%$ = Vysoké riziko nalezení epitelového ovariálního karcinomu

Hodnota ROMA $< 13,1\%$ = Nízké riziko nalezení epitelového ovariálního karcinomu

Postmenopauzální ženy

Hodnota ROMA $\geq 27,7\%$ = Vysoké riziko nalezení epitelového ovariálního karcinomu

Hodnota ROMA $< 27,7\%$ = Nízké riziko nalezení epitelového ovariálního karcinomu

Přiřazení rizika do vysokého rizika skrytého epitelového ovariálního karcinomu využitím hodnoty ROMA při 75% hladině specifity u všech pacientek s adnexálním ložiskem pro kombinaci souprav HE4 EIA a ARCHITECT CA125II je uvedeno v tabulce 1, zahrnující rozdělení rizika, získané pro rozdělení skupin premenopauzálních a postmenopauzálních žen. Citlivost rozdělení pacientek do skupin s vysokým a nízkým rizikem epitelového ovariálního karcinomu stádia I - IV byla 94% a specifita 75%, takže 75% žen s benigním pánevním ložiskem bylo zařazeno do skupiny s nízkým rizikem. Pozitivní a negativní prediktivní hodnoty byly 58% a 97%.

Tabulka 1: Přiřazení rizika do vysokého rizika skrytého epitelového ovariálního karcinomu (EOC) pro výpočet hodnoty ROMA kombinovaných u pacientek s přítomným adnexálním ložiskem použitím kombinace souprav HE4 EIA a ARCHITECT CA125II.

Premenopauzální mezní hodnota pro přiřazení do vysoce rizikové skupiny při 75% hladině specifity je $\geq 13,1\%$,

Postmenopauzální mezní hodnota pro přiřazení do vysoce rizikové skupiny při 75% hladině specifity je $\geq 27,7\%$.

| | Premenopauzální ženy n = 234 | Postmenopauzální ženy n = 268 | Spojené pre- & postmenopauzální ženy n = 502 |
|--|---|--|---|
| Spojené EOC & LMP stádia I - IV | 26/ 34 (76%) | 108/ 117 (92%) | 134/ 151 (89%) |
| Nízký maligní potenciál | 10/ 16 (63%) | 3/ 6 (50%) | 13/ 22 (59%) |
| Stádium I - II EOC | 6/ 7 (86%) | 24/ 28 (86%) | 30/ 35 (86%) |
| Stádium I - III^a EOC | 7/ 8 (88%) | 35/ 39 (90%) | 42/ 47 (89%) |
| Stádium I - IV EOC | 16/ 18 (89%) | 105/ 111 (95%) | 121/ 129 (94%) |

^aStádium I - IIIb & stádium IIIC (předstěra negativní, mízní uzliny pozitivní) epitelového ovariálního karcinomu

Nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly v citlivosti a specifitě hodnoty ROMA při použití hodnot HE4 EIA a ARCHITECT CA125II nebo CanAg CA125 EIA pro rozlišení mezi benigními onemocněními a epitelovým ovariálním karcinomem. Při použití kombinace stanovení CanAg CA125 EIA + HE4 EIA byla citlivost přiřazení pacientek s epitelovým ovariálním karcinomem stádia I - IV do skupiny s vysokým rizikem 93%. Pozitivní a negativní predikční hodnoty byly 57% a 97%. **Je třeba zdůraznit, že různé mezní hodnoty pro rozdělení do skupin s vysokým a nízkým rizikem musí být vybrány na stejném základě jako pro stanovení CA125.**

Následující mezní hodnoty byly určeny s cílem poskytnout specifitu 75% pro kombinaci souprav CanAg CA125 EIA + HE4 EIA:

Premenopauzální ženy

Hodnota ROMA $\geq 12,5\%$ = Vysoké riziko nalezení epitelového ovariálního karcinomu

Hodnota ROMA $< 12,5\%$ = Nízké riziko nalezení epitelového ovariálního karcinomu

Postmenopauzální ženy

Hodnota ROMA $\geq 14,4\%$ = Vysoké riziko nalezení epitelového ovariálního karcinomu

Hodnota ROMA $< 14,4\%$ = Nízké riziko nalezení epitelového ovariálního karcinomu

Falešně negativní poměry a procenta epitelového ovariálního karcinomu u pacientek s přítomným adnexálním ložiskem, zařazující do nízkého rizika skrytého epitelového ovariálního karcinomu, s použitím hodnot ROMA při 75% hladině specifity, jsou ukázány v Tabulce 2. Rozdělení do skupin

s nízkým a vysokým rizikem skrytého epitelového ovariálního karcinomu s použitím algoritmu ROMA při 75% hladině specifity mají celkově za následek falešně negativní poměr v 6,2%. Tři (3) procenta všech případů, přiřazených do skupiny s nízkým rizikem, představují epitelový ovariální karcinom.

Tabulka 2: Falešně negativní poměr (FNR) a procenta epitelových ovariálních karcinomů pro všechny případy, přiřazené do skupiny s nízkým rizikem, u pacientek s přítomným adnexálním ložiskem, s použitím hodnot ROMA.

Premenopauzální mezní hodnota pro přiřazení do skupiny nízkým rizikem při 75% hladině specifity je <13,1%, postmenopauzální mezní hodnota pro přiřazení do skupiny nízkým rizikem při 75% hladině specifity je <27,7%.

| Epitelový ovariální karcinom ^a | Falešně negativní poměr (FNR) | | | Procenta karcinomů ve skupině s nízkým rizikem | | |
|---|-------------------------------|------------------|------------------|--|---------------------------------------|------------------|
| | Falešně negativní karcinomy | Karcinomy celkem | FNR ^b | Falešně negativní karcinomy | Pravdivě pozitivní benigní onemocnění | (%) ^c |
| Premenopauzální | 2 | 18 | 11,1% | 2 | 149 | 1,3% |
| Postmenopauzální | 6 | 111 | 5,4% | 6 | 113 | 5,0% |
| Všechny pacientky | 8 | 129 | 6,2% | 8 | 262 | 3,0% |

^aNádory s nízkým maligním potenciálem (LMP) nejsou zahrnuty; ^bFNR=Falešně negativní/(Pravdivě pozitivní+Falešně negativní); ^cFalešně negativní/(Pravdivě negativní+Falešně negativní)

CHARAKTERISTIKY SOUPRAVY

Preciznost

Preciznost soupravy HE4 je ≤ 15% VK. Studie byla provedena podle doporučení NCCLS EP5-A (22). Panel čtyř vzorků sér byl analyzován za použití dvou výrobních šarží reagentů, ve dvou replikátech a dvakrát denně po dobu 20 dnů. Výsledky této studie jsou shrnuty níže.*

| Vzorek | Číslo šarže | Počet opakování | Průměr (pM) | SD (pM) na stanovení | VK % na stanovení | SD (pM) celková | VK % celkový |
|--------|-------------|-----------------|-------------|----------------------|-------------------|-----------------|--------------|
| 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 |

* typické hodnoty; výsledky v jednotlivých laboratořích se mohou lišit od těchto hodnot

Detekční limit

Detekční limit stanovení je HE4 ≤ 15 pM. Detekční limit (DL) odpovídá hornímu limitu 95% intervalu spolehlivosti a představuje nejnižší koncentraci antigenu HE4, kterou lze odlišit od nuly. Pro experimentální určení DL bylo použito doporučení NCCLS EP17-A (23). V této studii bylo analyzováno 24 replikátů nulového kalibrátoru HE4 A (nula) a čtyř vzorků zdravých jedinců naředěných ředícím roztokem pro vzorky na 5 pM ve 4 sériích během dvou dnů. DL byl vypočítán následovně:

$$DL \text{ (pM)} = 5,0 \text{ pM} \times (1,65 \times SD_0 + 1,65 \times SD_5) / (OD_5 - OD_0)$$

Detekční limit soupravy HE4 EIA je < 2,5 pM.

Funkční citlivost

Funkční citlivost stanovení HE4 EIA je ≤ 25 pM. Funkční citlivost je vyjádřena jako koncentrace analytu, při které je VK 20%. Pro vyhodnocení funkční citlivosti bylo použito doporučení NCCLS

EP5-A (22). Byla provedena studie, ve které bylo testováno pět panelů dvěma výrobními šaržemi ve čtyřech replikátech ve dvou sériích denně po dobu 20ti dnů. Bylo nalezeno, že funkční citlivost soupravy HE4 EIA je < 5 pM.

Výtěžnost

Výtěžnost stanovení HE4 EIA je 100% ± 15%. K vyhodnocení byly použity normální lidské sérové vzorky, ke kterým se přidávaly zředěné pacientské vzorky o známé koncentraci HE4. Koncentrace HE4 byla stanovena použitím soupravy HE4 EIA a byla vypočtena výtěžnost. Typické hodnoty jsou uvedeny v následující tabulce.*

| Vzorek | Hodnota endogenního stanovení (pM) | Přídavek antigenu HE4 (pM) | Naměřená hodnota HE4 (pM) | Výtěžnost %** |
|--------|------------------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------|
| 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 |

Průměrná výtěžnost s přídavkem 4 různých hladin byla 97%, jak je uvedeno v tabulce.

*Typické hodnoty; výsledky z jiných laboratoří se mohou lišit.

**% Výtěžnost = naměřená koncentrace HE4 (pM) / koncentrace endogenní HE4 (pM) + přídavek HE4 (pM)

Hook efekt

Efekt vysokých dávek – Hook efekt je jev, při kterém mohou být odečítány velmi vysoké hladiny v dynamickém rozsahu soupravy. U HE4 EIA nebyl pozorován Hook efekt až koncentrace nativního antigenu 300 000 pM HE4 ve vzorku.

Linearita ředění

Linearita ředění stanovení HE4 EIA je 100% ± 15%. Studie byla provedena podle doporučení NCCLS (CLSI) EP6-A (24). Vzorky séra s vyšší hladinou HE4 byly naředěny nulovým kalibrátorem HE4 A (nula). Pro každé ředění byla stanovena koncentrace HE4 a byla vypočtena výtěžnost.

Typické hodnoty jsou uvedeny v následující tabulce.*

| Vzorek | faktor ředění | naměřená hodnota (pM) | očekávaná hodnota (pM) | Výtěžnost %** |
|--------|---------------|-----------------------|------------------------|---------------|
| 1 | neředěno | 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 | neředěno | 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 | neředěno | 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 |

Průměrná výtěžnost u 3 ředěných vzorků byla, jak vyplývá z tabulky, 101% .

*Typické hodnoty; výsledky z jiných laboratoří se mohou lišit.

**% Výtěžnost = naměřená koncentrace HE4 (pM) x ředící faktor / neředěná koncentrace HE4

Analytická specifita

Souprava HE4 EIA má průměrnou analytickou specifitu $100\% \pm 15\%$. Studie zkřížených reakcí byla provedena srovnáním sér obsahujících následující sloučeniny s uvedenou koncentrací s kontrolními séry. Vyhodnocení interferencí bylo provedeno podle doporučení NCCLS EP7-A (25). Byly testovány následující sloučeniny v uvedených koncentracích a nebyla nalezena žádná inference.

| Endogenní interferenční séra | Testovaná koncentrace |
|-------------------------------------|------------------------------|
| Triglyceridy | 30 mg/ml |
| Bilirubin | 0,2 mg/ml |
| Hemoglobin | 10 mg/ml |
| Celková bílkovina | 120 mg/ml |

| Interference chemoterapeutických látek | Testovaná koncentrace |
|---|------------------------------|
| Carboplatin | 500 µg/ml |
| Cisplatin | 165 µg/ml |
| Clotrimazole | 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 |

Potenciálně interferující klinické podmínky

Specifita stanovení soupravou HE4 EIA byla vyhodnocena použitím vzorků s HAMA a Reumatoidním faktorem (RF). U 5ti vzorků pozitivních na HAMA a 5ti vzorků pozitivních na RF s přídatkem přibližně 50 a 450 pM HE4 antigenu byla stanovena % výtěžnost. Výsledky průměrné výtěžnosti jsou uvedeny v tabulce níže.*

| Klinické podmínky | Počet vzorků | Průměrná % výtěžnosti |
|--------------------------|---------------------|------------------------------|
| HAMA | 5 | 101 |
| RF | 5 | 95 |

*Typické hodnoty; výsledky z jiných laboratoří se mohou lišit.

Záruka

Uvedené výsledky byly získány použitím doporučeného pracovního postupu. Jakákoliv změna nebo úprava pracovního postupu nedoporučená firmou Fujirebio Diagnostics může ovlivnit výsledky. V tomto případě firma Fujirebio Diagnostics neuzná žádný reklamační požadavek v záruční lhůtě, vyplývající ze zákona, na užitečnost nebo vhodnost použití.

LITERATURA

1. Israeli O, Goldring-Avram 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 wheyacidic-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.

Pracovní protokol

HE4 EIA REF 404-10

Bezprostředně před použitím připravte složky. Použijte způsob míchání a inkubace uvedený v návodu.
Poznámka: pro získání správných výsledků se musí stanovení provádět při teplotách 20 – 25 °C.

| Krok | Lahvička/Destička | Postup | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--|--|---------------|------------------------------|----------------------------|---|----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|----|-----|----|----|-----|----|----|-----|----|
| 1. Připravte kalibrátory HE4 | CAL HE4 | Do každé lahvičky přidejte 1 mL destilované nebo deionizované vody a jemně promíchejte. Nechte alespoň 15 minut stát. POZNÁMKA: Přesná koncentrace každého kalibrátoru je uvedena na štítku. Stabilita rozpuštěných přípravků: 4 týdny při 2 – 8°C. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Připravte kontroly HE4 | B, C, D, E, F CONTROL HE4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Připravte promývací roztok | WASHBUF 25X | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Připravte pracovní roztok Indikátoru (tracer) | CONJ Anti-HE4 DIL CONJ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Počet proužků</th> <th>Indikátor, HRP anti-HE4 (µL)</th> <th>Ředidlo pro indikátor (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> | Počet proužků | Indikátor, HRP anti-HE4 (µL) | Ředidlo pro indikátor (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 |
| Počet proužků | Indikátor, HRP anti-HE4 (µL) | Ředidlo pro indikátor (mL) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 50 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 100 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | 150 | 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | 200 | 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | 250 | 5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 300 | 6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 350 | 7 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 400 | 8 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | 450 | 9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | 500 | 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 11 | 550 | 11 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 600 | 12 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2. Promývejte | MICROPLA | Jednou promyjte každou jamku promývacím roztokem. Promývejte ručně nebo použijte automatickou promývačku. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3. Přidejte kalibrátory, kontroly a vzorky | CAL HE4 A, B, C, D, E, F CONTROL HE4 | 25 µl do každé jamky | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4. Přidejte biotinylovanou anti-HE4 | BIOTIN Anti-HE4 | 100 µl do každé jamky | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5. Inkubujte | MICROPLA | 1 hodina třepání při teplotě 20 – 25°C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6. Promývejte | MICROPLA | Všechny jamky třikrát promyjte promývacím roztokem. Promývejte ručně nebo použijte automatickou promývačku. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7. Přidejte pracovní roztok indikátoru (tracer) | TRACER WORKING SOLUTION | 100 µl do každé jamky | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8. Inkubujte | MICROPLA | 1 hodiny třepat při teplotě 20 – 25°C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9. Promývejte | MICROPLA | Všechny jamky šestkrát promyjte promývacím roztokem. Promývejte ručně nebo použijte automatickou promývačku. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10. Přidejte substrát TMB HRP | SUBS TMB | 100 µl do každé jamky | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 11. Inkubujte | MICROPLA | 30 minut třepání při teplotě 20 – 25°C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12. Odečítejte absorbanci | MICROPLA | 620 nm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Alt.12 Přidejte Stop roztok | STOP | 100 µl do každé jamky | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Alt.13 Promíchejte | MICROPLA | Promíchejte při teplotě 20 – 25°C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Alt.14 Odečítejte absorbanci | MICROPLA | Odečítejte v průběhu 15 minut při 405 nm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |



CanAg ® je registrovaná obchodní značka 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