



## HE4 EIA

Tootekood 404-10

Kasutusjuhend

2008-09

Immunoensüümtest

96 määramiseks

### KASUTUSVALDKOND

HE4 EIA on immunoensüümtest HE4 kvantitatiivseks määramiseks inimese seerumist. Test on abivahend invasiivse epiteliaalse munasarjavähiga patsientide ravi monitooringul. Munasarjavähi monitooringul kombineeritakse HE4 väärtuste perioodiline testimine teiste tavapäraste monitooringumeetoditega. Samuti kasutatakse testi kombineeritult ARCHITECT CA 125 II või CanAg CA125 EIA testiga, epiteliaalse munasarjavähi riski hindamisel naistel, kellel on pre- või postmenopausaalselt avastatud vaagnamass. Testi tulemuste interpreteerimisel arvestatakse ka teiste meetoditega saadud tulemustega vastavalt kliiniliste standardite juhistele.

### ÜLEVAADE TESTIST

HE4 (Human epididymis protein 4) kuulub WFDC (whey acidic four-disulfide core) proteiinide hulka, arvatakse olevat trüpsiini inhibiitoriks. Sama perekonna teised proteiinid on SLPI, elafiin ja PS20 (WFDC-1) (1, 2). HE4 geen kodeerib 13kD proteiini, kuigi glükosüleeritud valmiskujul on proteiini ca 20-25 kD, ning koosneb ühest kahe WFDC domeeniga peptiidist (3). HE4 määrati esmakordselt distaalepididüümi epiteelis ning algselt arvati see olevat sperma küpsemisel osalev proteaasi inhibiitor (4, 5). Nüüdseks on kinnitatud HE4 leidumine mitmetes normaalsetes kudedes, kaasa arvatud respiratoorsete ja reproduktiivsete kudede epiteel, samuti munasarjavähi kudedes (6-10). Lisaks rakulisel tasemel avaldumisele on HE4 kõrgeid tasemeid määratud munasarjavähiga patsientide seerumist. Hellström et al. kontrolluuringus, kus võrreldi munasarjavähiga patsiente ja terveid või healoomuliste haigustega patsiente, selgus, et HE4 abil oli võimalik määrata munasarjavähki 67% tundlikkusega ning 96% spetsiifilisusega (11). Sellele järgnevas uuringus, kus hinnati mitmeid munasarjavähi biomarkereid, näitas HE4 kõige suuremat tundlikkust munasarjavähi määramisel, eriti haiguse varajases faasis. Uuringus osutus HE4 ja CA 125 kombinatsiooniga saadud ennustus täpsem maliigsuse marker kui kumbki test eraldi, tundlikkusega 76% ja spetsiifilisusega 95% (12).

Munasarjavähk on kogu maailmas tähtselt neljas naiste seas aset leidnud vähi põhjustatud surmajuhtudest. Euroopas on suremuseks 3,6 kuni 9,3 100 000 naise kohta 6 (13). Munasarjavähi sümptomid on seotud vaagnamassi leiuga ning on tihti ebamäärased ja vähespetsiifilised. Vaagnamassi diagnostilisel hindamisel on peamiseks eesmärgiks otsustada, kas see on hea- või pahaloomuline. Arvestuslikult läbib USA-s 5-10 % naistest kahtlustatava munasarjaneoplasmiga seotud lõikuse ning neist 13-21 % osutub kasvaja pahaloomuliseks (14). Väljaanne The "American College of Obstetricians and Gynecologists Practice Bulletin" märgib 2007.aastal järgmist: "Munasarjavähiga naistel, kelle ravi kontrollivad vastava väljaõppe ja kogemusega arstid, näiteks günekoloogide ja onkoloogide koostöö kaudu, on märgatavalt suuremad võimalused võitluses vähiga kui naistel, kelle ravi sellise kogemusega arstid ei osale." (15). Kuivõrd enam vaagnamassi leidudest on healoomulised, on väga oluline juba enne operatsiooni edasise ravikäitumise kontrollimiseks jõuda selgusele, kas patsient on munasarjavähi maliigsuse suhtes kõrge riskiga või mitte (15). Alates 1988 on vaagnamassi maliigsusriski hindamisel standardina kasutatud kliinilist haiguspilti, CA125 seerumit ning ultraheli koos kompuutertomograafia, magnetresonantspildistusega ja CT/PET uuringuga (16). Kuigi käivad vaidlused

selle üle, milline neist uuringutest on kõige täpsem, on siiski kõige efektiivsemaks ennustustäpsuse jaoks kombinatsioon läbivaatustulemustest, CA125 testimisest ja erinevatest skaneeringutest (17-19). Epiteliaalse munasarjavähiga patsientidel kasvaja maliigusriski hindamiseks soovitatakse kasutada HE4 EIA testi kombineeritult koos kas ARCHITECT CA 125 II testiga või CanAg CA125 EIA testiga. Tulemuste hindamisel peab tingimata arvestama teiste uuringumeetoditega ning lähtuma ravi kontrollimise standarditest. HE4 EIA testi kasutatakse lisauuringuna invasiivse epiteliaalse munasarjavähiga patsientide ravi monitooringul. Tulemusi kasutatakse koos teiste munasarjavähi monitooringuks ettenähtud meetoditega.

## TESTI PÕHIMÕTE

HE4 EIA on tahke faasiga, otsesel sandwich-meetodil põhinev mittekompetatiivne immuuntest. Testis kasutatakse kahte monoklonaalset hiire antikeha, 2H5 ja 3D8, mis on suunatud HE C-WFDC domeeni kahe epitooibi vastu. Kalibraatorid, kontrollid ja patsiendi proovid inkubeeritakse koos monoklonaalse biotinüülitud anti-HE4 antikehadega (MAb) 2H5 streptavidiiniga kaetud mikroribadel. Inkubeerimisel adsorbeerub kalibraatorites või proovides leiduv HE4 biotinüülitud anti-HE4 Mab 3D8 vahendusel streptavidiin-ribadele. Ribad pestakse ja inkubeeritakse HRP-märgistatud Anti-HE4 MAb 3D8 antikehadega. Pärast pesemist lisatakse igasse testsüvendisse puhvriga substraat/kromogeenreaktiiv (vesinikperoksiid ja 3, 3', 5, 5' tetrametüülbensidiin), toimub ensüümreaktsioon. Antigeeni leidumisel tekib ensüümreaktsiooni ajal sinine värvus. Värvuse intensiivsus on proportsionaalne proovis leiduva HE4 hulgaga. Värvuse intensiivsuse hindamiseks kasutatakse mikroplaadi spektrofotomeetrit lainepikkusel 620 nm (või 405 nm) pärast reaktsiooni peatava lahuse lisamist).

Iga testi jaoks luuakse kalibratsioonikõver (absorptsioon vs iga kalibraatori kontsentratsioon), selle kalibratsioonikõvera alusel saadakse patsiendiproovide HE4 kontsentratsioonid.

## REAKTIIVID

- Igas HE4 EIA komplektis on reaktiive 96 testi läbiviimiseks.
- Testkomplekti aegumiskuupäev on trükitud testkomplekti karbil olevale etiketile.
- Ärge kasutage testkomplekti pärast aegumistähtaega.
- Ärge kasutage koos erinevatest partiidest pärit reaktiive.
- Säilitage testkomplekte temperatuuril 2–8°C. Mitte külmutada.
- Avatud reaktiivide säilivad vastavalt alltoodud tabelis toodud säilivusaegadele, eeldusel, et reagendid ei ole saastunud, et neid hoitakse originaalanumates ning käsitletakse vastavalt juhiste. Pärast kasutamist viia reaktiivid kohe tagasi temperatuurile 2-8°C.

Testkomplekti osad	säilitamine ja	stabiilsus pärast esimest avamist
--------------------	----------------	-----------------------------------

### MICROPLA

<b>Streptavidiiniga mikroplaat</b>	1 plaat	2–8°C kuni plaadil näidatud aegumistähtajani
------------------------------------	---------	---

12 x 8 testsüvendit ribadeks jagataval plaadil, mis on kaetud streptavidiiniga. Pärast avamist pange kasutamata ribad kohe tagasi desikandiga alumiiniumpakendisse. Sulgege kott, et ribad ei kuivaks.

CAL	HE4	A
-----	-----	---

<b>HE4 kalibraator A</b>	1 x 8 mL	2–8°C kuni pudelil näidatud aegumistähtajani
--------------------------	----------	---

Fosfaatpuhverlahus, sisaldab albumiini (veiseserum), inertset kollast värvainet ja mitteasiidset antimikroobset säilitusainet. Kasutusvalmis. Soovitatakse kasutada ka proovide lahendamiseks.8

Testkomplekti osad	säilitamine ja	stabiilsus pärast esimest avamist			
<b>HE4 kalibraatori B-F</b>	5 pudelit, lüofiliseeritud	Stabiilsus pärast lahustamist 4 nädalat temperatuuril 2-8°C 4 kuud temperatuuril -20°C või madalamal temperatuuril			
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>HE4</td><td>B</td></tr></table>	CAL	HE4	B	1 x 1 mL	
CAL	HE4	B			
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>HE4</td><td>C</td></tr></table>	CAL	HE4	C	1 x 1 mL	
CAL	HE4	C			
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>HE4</td><td>D</td></tr></table>	CAL	HE4	D	1 x 1 mL	
CAL	HE4	D			
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>HE4</td><td>E</td></tr></table>	CAL	HE4	E	1 x 1 mL	
CAL	HE4	E			
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>HE4</td><td>F</td></tr></table>	CAL	HE4	F	1 x 1 mL	
CAL	HE4	F			

Lüofiliseeritud kalibraatorid sisaldavad HE4 antigeeni fosfaatpuhverlahuses, mis sisaldab albumiini (veise seerum), inertset kollast värvainet ja mitteasiidset antimikroobset säilitusainet. Enne kasutamist lisada lahustamiseks destilleeritud või deioniseeritud vett.

**MÄRKUS:** HE4 täpne kontsentratsioon võib varieeruda, see on näidatud iga pudeli etiketil.

<b>HE4 kontrollid</b>	2 pudelit, lüofiliseeritud	Stabiilsus pärast lahustamist 4 nädalat temperatuuril 2-8°C 4 kuud temperatuuril -20°C või madalamal temperatuuril			
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>HE4</td><td>1</td></tr></table>	CONTROL	HE4	1	1 x 1 mL	
CONTROL	HE4	1			
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>HE4</td><td>2</td></tr></table>	CONTROL	HE4	2	1 x 1 mL	
CONTROL	HE4	2			

Lüofiliseeritud kontrollid sisaldavad HE4 antigeeni, inimseerumi maatriksi, ja mitteasiidset antimikroobset säilitusainet. Enne kasutamist lisatakse lahustamiseks destilleeritud või deioniseeritud vett.

<table border="1"><tr><td>BIOTIN</td><td>Anti-HE4</td></tr></table>	BIOTIN	Anti-HE4		
BIOTIN	Anti-HE4			
<b>Biotin Anti-HE4</b>	1 x 15 mL	2-8°C kuni pudelitel näidatud aegumistähtajani.		

Biotin Anti-HE4 monoklonaalsed hiire antikehad, umbes 1 µg/mL. Sisaldab fosfaatpuhverlahust (pH 7.2), albumiini (veise seerum), blokeerivaid ühendeid, detergenti, inertset punast värvainet ja mitteasiidset antimikroobset säilitusainet. Kasutusvalmis.

<table border="1"><tr><td>CONJ</td><td>Anti-HE4</td></tr></table>	CONJ	Anti-HE4		
CONJ	Anti-HE4			
<b>HRP Anti-HE4 konjugaat</b>	1 x 0.75 mL	2-8°C kuni pudelil näidatud aegumistähtajani		

Lahuse alus : monoklonaalsed HRP Anti-HE4 hiire antikehad, umbes 40 µg/mL. Sisaldab mitteasiidseid antimikroobseid säilitusaineid. Enne kasutamist lahjendada konjugaadi diluendiga (Tracer Diluent).

<table border="1"><tr><td>DIL</td><td>CONJ</td></tr></table>	DIL	CONJ		
DIL	CONJ			
<b>Konjugaadi diluent (Tracer Diluent)</b>	1 x 15 mL	2-8°C kuni pudelil näidatud aegumistähtajani		

Fosfaatpuhverlahus (pH 7.2), mis sisaldab albumiini (veise seerum), blokeerivaid osiseid, detergenti, inertset sinist värvainet ja mitteasiidset antimikroobset säilitusainet. Kasutusvalmis.

Testkomplekti osad	säilitamine ja	stabiilsus pärast esimest avamist
--------------------	----------------	-----------------------------------

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

TMB HRP substraat	1 x 12 mL	2–8°C kuni pudelil näidatud aegumistähtajani
-------------------	-----------	--

Sisaldab puhverdatud vesinikperoksiidi ja 3, 3', 5, 5' tetrametüülbensidiini (TMB). Kasutusvalmis.

STOP
------

Reaktsiooni peatamislahus	1 x 15 mL	2–8°C kuni pudelil näidatud aegumistähtajani
---------------------------	-----------	--

Sisaldab 0,12 M soolhapet. Kasutusvalmis.10

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

Pesulahuse kontsentraat	1 x 50 mL	2–8°C kuni pudelil näidatud aegumistähtajani
-------------------------	-----------	--

Tris-HCl puhverlahus, sisaldab Tween 20. Sisaldab säilitusainet Germall II. Enne kasutamist lahjendada vahekorras 1:25 destilleeritud või deioniseeritud veega.

### Ebastabiilsuse näitajad

TMB HRP-substraat peab olema värvitu või õrnalt sinakas. Kui reaktiiv on siniseks värvunud, siis on ta saastunud; sellist reaktiivi mitte kasutada, reaktiiv ära visata.

### OHUTUS

#### Ainult in vitro diagnostikaks:

- Järgige testkomplektis olevat kasutusjuhust, sellest kõrvalekaldumisel ei ole testi tulemused usaldusväärsed.
- Käsitsege kõiki proove kui potentsiaalselt nakkusohtlikke. Inimpäritolu proove ning inimpäritolu osiseid sisaldavaid reaktiive soovitatakse käsitseda vastavalt juhiste dokumendis „OSHA Standard on Bloodborne pathogens” (20). Nakkusohtlike või oletatavalt nakkusohtlike ainete käsitlemisel rakendage ohutusnõudeid, mis vastavad bioloogilise ohu turvatasemele nr 2 (21) või muid sarnaseid bioloogiliselt ohtlike materjalide käsitlemise juhiseid.
- Jäätmete hävitamisel järgige kohalikke nõudeid.

### Ettevaatust

Inimpäritolu osistega reaktiivid on testimisel osutunud negatiivseks HIV 1 ja 2 antikehade, HCV antikehade ja B-hepatiidi pinnaantigeeni (HBsAg) suhtes. Kuivõrd ühegi kasutatava meetodiga ei ole võimalik täielikult välistada vere kaudu levivate haigust esinemist, soovitatakse testkomplekti inimpäritolu osistega reaktiivide käsitlemisel ja reaktiivijääkide likvideerimisel neid käsitseda kui potentsiaalselt nakkusohtlikke.

### PROOVIDE KOGUMINE JA KÄSITSEMINE

HE4 EIA testis kasutatakse seerumit (sealhuglas separaatorikatsutitesse (SST) võetud seerum). Plasma ja teiste kehavedelike kasutamine HE4 EIA testiga ei ole valideeritud. Vere võtmiseks tehke veenipunktsioon, järgige katsutootja juhiseid. Kui hinnatakse proovide seeriat, kasutada kõikides analüüsides sama liiki proove. <sup>11</sup>

Seerumit võib enne testimist säilitada kuni 3 päeva temperatuuril 2–8°C. Pikemaajaliseks säilitamiseks proovid külmutatakse -40°C juures või madalamal temperatuuril.

Külmunud proovidel lastakse soojeneda toatemperatuurini, enne analüüsi segatakse hoolikalt (keerates käes mitu korda üles-alla). Suuri osakesi sisaldavaid proove tsentrifuugitakse enne analüüsi 10.000 x g juures 10 minutit, et sulamise ajal tekkinud kogumid seguneksid.

## **PROTSEERUUR**

### **Vajalikud lisavahendid ( ei kuulu komplekti)**

#### **1. Mikroplaadi loksuti**

Loksutamise intensiivsus keskmisest tugevani, ca 700-1100 võnget/minutis.

#### **2. Mikroplaadi pesija**

Automaatne mikroplaadi pesija, mis suudab sooritada 1, 3 ja 6 pesutsükli, minimaalne täitmismaht 350 µL/süvendi kohta/pesutsükli.

Kui ei kasutata automaatpesijat, soovitatakse kasutada 8 kanaliga pipetti ühekordsete otsikutega, 350 µL pipeteerimiseks.

#### **3. Mikroplaadi spektrofotomeeter**

Lainepikkusel 620 nm ja/või 405 nm, absorptsioonivahemik 0 kuni 3.0.

#### **4. Täpsuspipetid**

Ühekordsete plastotsikutega, mikrolitrite mahtude pipeteerimiseks. Soovitatakse kasutada 8 kanaliga pipette või dispenseripipette ühekordsete plastikotsikutega 100 µL pipeteerimiseks, kuid see ei ole nõue. Pipetid milliliitrite mahtude pipeteerimiseks.

#### **5. Destilleeritud või deioniseeritud vesi**

HE4 kalibraatorite ja HE4 kontrollide lahustamiseks ning lahjendatud pesulahuse valmistamiseks.

### **Märkused protseduuri kohta**

1. Enne HE4 EIA testi kasutamist tutvuge kasutusjuhendiga. Kasutage ainult komplektis olevaid reaktiive. Ärge kasutage koos erinevatest partiidest reaktiive. Ärge kasutage reaktiive pärast aegumistähtaega (trükitud karbi etiketile).
2. Enne kasutamist peavad reaktiivid olema toatemperatuuril (20–25°C). Külmutatud proove pärast sulatamist segada. Tulemuste õigsuse kindlustamiseks viiakse test läbi temperatuuril 20–25°C. 12
3. Enne kalibraatorite ja proovide pipeteerimist soovitatakse ribad tähistada, et proovid oleksid testi tegemisel üheselt identifitseeritavad.
4. EIA testi tegemisel on väga oluline pesufaas, mille käigus eraldatakse seondunud ja seondumata antigeenid ja reaktiivid tahkes faasis seondunud antigeen/antikeha kompleksist. Kontrollige, et kõik testsüvendid oleksid igas pesutsükli pesulahusega ääreni täidetud, et pesulahuse voolukiirus on piisav, et enne ja pärast pesufaasi oleksid süvendid täielikult tühjaks aspireeritud. Kui süvenditesse jääb vedelikku, keerake plaat tagurpidi ja koputage vastu kuivatuspaberit.
  - Automaatne ribapesija: puhastamisel järgige tootja kasutus- ja hooldusjuhiseid, viige enne ja pärast inkubatsiooni läbi nõutud arv pesutsükleid. Ärge jätke aspiratsiooni-/pesemisseadeldisse pikemaks ajaks pesulahust, nõelad võivad ummistuda.
5. TMB HRP substraat on väga tundlik saastumise suhtes. TMB HRP substraadi stabiilsuse tagamiseks valage pudelikesest ettenähtud kogus puhtasse nõusse või soovitatavalt ühekordsele plastalusele, et ülejäänud reaktiiv ei saastuks. Pipetidel kasutage puhtaid ühekordseid plastotsikuid (või dispensaatorpipeti otsikuid).
6. Proovide ja reaktiivide käsitlemisel kasutage ainult puhtaid ühekordseid pipetiotsikuid ja täppis-pipeteerimise võtteid. Ristsaastumise vältimiseks ärge puudutage pipetiotsaga teise lahuse pinda. Proovide ja TMB HRP lahuse käsitlemisel on õiged pipeteerimisvõtted äärmiselt olulised.

---

<b>Reaktiivide ettevalmistamine</b>	<b>Valmistatud reaktiivide stabiilsus.</b>
-------------------------------------	--

---

**HE4 kalibraatorid B-F**

4 nädalat temperatuuril 2–8°C  
4 kuud -20°C juures või madalamal temperatuuril

Lisage igasse viaali täpselt 1,0 mL destilleeritud või deioniseeritud vett. Laske vähemalt 15 minutit seista, enne kasutamist segage kergelt. **MÄRKUS:** kalibraatorite kontsentratsioon on trükitud etikettidele, kalibratsioone kasutatakse tulemuste arvutamisel.

---

**HE4 kontrollid 1 ja 2**

4 nädalat temp.-il 2–8°C  
4 kuud temp.-il -20°C või madalamal

Lisage igasse viaali täpselt 1.0 mL destilleeritud või deioniseeritud vett ja segage kergelt. Segunemiseks laske vähemalt 15 minutit seista ning enne kasutamist segage korraks. **MÄRKUS:** kontrollide vahemikud on kirjas etikettidel.

---

**Pesulahus**

2 nädalat temp.-il 2–25°C suletud hoiunõus.

Lisage 50 mL pesukontsentrati puhtasse hoiunõusse ja tehke 25-kordne lahjendus, selleks lisage 1200 mL destilleeritud või deioniseeritud vett, et tekiks puhvriga pesulahus.

**Konjugaadi töölahus** 4 nädalat temp.-il 2–8 °C  
suletud hoiunõus

Valmistage vajalik kogus konjugaadi töölahust, selleks segage 1 riba kohta 50 µL konjugaati (Tracer, HRP Anti-HE4) 1 mL konjugaadi diluendiga (Tracer Diluent) (vt alltoodud tabel):

---

<b>ribade arv</b>	<b>HRP Anti-HE4 konjugaat (µL)</b>	<b>konjugaadi diluent (mL)</b>
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

---

Konjugaadi töölahuse valmistamisel kasutage puhast plastikust või klaasist katsutit.

**Teine võimalus: kallake konjugaadivialli** (Tracer, HRP Anti-HE4 ) sisu konjugaadi diluendi viaali ja segage kergelt. Kontrollige, et lahjenduslahusesse satuks kogu HRP Anti-14 konjugaadivialli sisu.

**MÄRKUS: konjugaadi töölahus on on stabiilne 4 nädalat temperatuuril 2–8°C.** Äрге valmistage rohkem lahust, kui selle aja jooksul kavatsete ära kasutada; järgige lahusele ettenähtud hoiutingimusi.

## TESTPROTSEDUUR

Testige nii kalibraatoreid, kontrolle kui ka patsiendiproove duplikaadis. Enne kasutamist peavad kõik reagendid ja proovid olema toatemperatuuril (20–25°C).

1. Alustage kalibraatorite B-F, kontrollide 1 ja 2, pesulahuse ja konjugaadi töölahuse ettevalmistamist. Kasutage ainult puhtaid anumaid. Järgige täpselt kasutusjuhiseid.
2. Viige vajalik arv mikroplaadiribasid raamile. (kasutamata ribad pange kohe tagasi alumiiniumkotti, kuhu jääb ka desikant, ning sulgege hoolikalt). Peske igat riba üks kord pesulahusega. Ärge peske rohkem ribasid, kui jõuaksite 30 minuti jooksul käsitseda.
3. Pipeteerige 25 µL igat HE4 kalibraatorit (CAL A, B, C, D, E ja F), HE4 kontrolli (C1, C2) ja patsiendiproovi (Unk) riba testsüvenditesse järgmise skeemi alusel:

	1	2	3	4	5	6	7 jne
A	Cal A	Cal E	esimene Unk				
B	Cal A	Cal E	esimene Unk				
C	Cal B	Cal F	teine Unk				
D	Cal B	Cal F	teine Unk				
E	Cal C	C1					
F	Cal C	C1					
G	Cal D	C2					
H	Cal D	C2					

4. Lisage igasse süvendisse 100 µL Biotin Anti-HE4, kasutage selleks 100 µL täppispipetti (või 8-kanalilist 100 µL täppispipetti). Ärge puudutage otsikuga vedeliku pinda, et ei tekiks ristsaastumine. 15
5. Inkubeerige plaati 1 tund ( $\pm$  10 min) toatemperatuuril (20–25°C), plaati pidevalt loksutades, kasutage mikroplaadi loksutajat.
6. Pärast esimest inkubeerimist aspireerige ja peske igat riba 3 korda, kasutades osas "Märkused protseduuri kohta", punkt 4 kirjeldatud pesuprotseduuri.
7. Lisage igasse testsüvendisse 100 µL konjugaadi töölahust, kasutades ülaltoodud punktis nr 4 kirjeldatud pipeteerimisprotseduuri.
8. Inkubeerige raami 1 tund ( $\pm$  5 min) toatemperatuuril (20–25°C), hoides seda pidevas liikumises.
9. Pärast teist inkubeerimist aspireerige ja peske ribasid 6 korda, kasutades osas "Märkused protseduuri kohta", punkt 4 kirjeldatud pesuprotseduuri.
10. Lisage igasse süvendisse 100 µL TMB HRP substraati, kasutades ülaltoodud punktis nr 4 kirjeldatud pipeteerimisprotseduuri.  
TMB HRP substraati lisatakse süvenditesse võimalikult kiiresti, esimesest süvendist viimasesse jõudmine ei tohi kesta üle 5 min.
11. Inkubeerige 30 min ( $\pm$  5 min) toatemperatuuril (20–25°C), pidevalt ribasid loksutades. Ärge hoidke otseses päikesevalguses.
12. Lugege kohe mikroplaadi spektrofotomeetriga absorptsiooni lainepikkusel 620 nm.

## TEINE VARIANT

Kui laboril ei ole mikroplaadi lugejat, mis loeks lainepikkusel 620 nm, vt järgmisest punktist absorptsiooni määramise alternatiivi:

Alternatiivne punkt 12: lisage 100 µL reaktsiooni seiskamise lahust, segage ja lugege absorptsiooni lainepikkusel 405 nm mikroplaadi spektrofotomeetriga, 15 min jooksul pärast stopp-lahuse lisamist.

### **Mõõtevahemik**

HE4 EIA testiga mõõdetakse kontsentratsioone vahemikus 15 ja 900 pM. Kui eeldatakse, et testitavad HE4 kontsentratsioonid on suuremad kui mõõtevahemik, soovitatakse proove enne analüüsimist lahjendada HE4 kalibraatoriga A (vt "Tulemuste arvutamine lahjendatud proovide korral").

### **Kvaliteedi kontroll**

HE4 kontrolle 1 ja 2 kasutatakse iga testseeria valideerimiseks. Tulemuste ettenähtud vahemikud on näidatud viaali etikettidel.

HE4 testi tulemusi saab valideerida, kui:

- kontrolli duplikaatide keskmised väärtused jäävad ettenähtud vahemikku.
- kontrollide ja kalibraatorite B-F duplikaatide replikaadid ei ületa 15%CV.
- kalibraator A (null) duplikaatide replikaadid ei erine üksteisest enam kui 0,06 OD ühikut.16

Kui testi ei saa kalibraatorite või kontrollide kehtetute tulemuste tõttu valideerida, kontrollige üle nii reagendid, pipettide täpsus, mikroplaadi pesija ja lugeja töö ning korrake testi. Labor võib valmistada ka ise laborisiseseks testi täpsuse hindamiseks erinevatel tasemetel seerumi puule.

### **Referentsmaterjal**

Kuivõrd HE4 antigeeni kohta ei leidu üldkasutatavaid referentsmaterjale, siis on HE4 EIA kalibraatori kalibr.väärtused määratud laborisisesest referentsstandardite alusel.

### **TULEMUSTE ARVUTAMINE**

Kui kasutatakse mikroplaadi spektrofotomeetrit integreeritud andmetöötlusprogrammiga, siis koostage vastavalt kasutusjuhendile vastav arvutusprogramm HE4 kalibraatorite etikettidel toodud kontsentratsioonide alusel.

HE4 tulemuste automaatsel arvutamisel soovitatakse kasutada ühte järgmistest meetoditest:

- "Cubic spline curve fit" meetod. Kalibraator A sisaldub kõveras, väärtusega 0 pM.
- "Interpolation with point-to-point evaluation". Kalibraator A sisaldub kõveras, väärtusega 0 pM.
- "Quadratic curve fit" meetod. Kalibraator A sisaldub kõveras, väärtusega 0 pM.

MÄRKUS: ei peaks kasutama 4-parameetrilist või lineaarregressiooni meetodeid. Manuaalsel hindamisel on kalibratsioonikõvera loomise aluseks punktid, mis saadakse iga HE4 kalibraatori absorptsiooni väärtustest (A) vastava HE4 kontsentratsiooni suhtes (ühikutes pM).

Seejärel saab kalibratsioonikõveralt lugeda tundmatu HE4 kontsentratsioone, kasutades iga patsiendiproovi keskmist absorptsiooni.

### **Tulemuste arvutamine lahjendatud proovide puhul**

Kui esialgsel analüüsil on proovi HE4 väärtused suuremad kui 900 pM, lahjendatakse õige testtulemuse saamiseks proove enne analüüsi HE4 kalibraatoriga A vahekorras 1:10 ja 1:100.

- lahjendus 1:10 = 50 µL proovi + 450 µL HE4 kalibraator A

- lahjendus 1:100 = 50 µL proovi lahjendusega 1:10 + 450 µL HE4 kalibraator A

Seejärel arvutatakse lahjendamata proovi HE4 kontsentratsioon järgmiselt:

- kui lahjendati 1:10: mõõdetud väärtus x 10

- kui lahjendati 1:100: mõõdetud väärtus x 100

## Munasarjavähi pahaloolumisuse riski algoritmi ehk ROMA (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm) kasutamine epiteeliale munasarjavähi riski hindamisel vaagnamassi leiuga pre- või postmenopausaalsetel naistel

### Prognoosi indeksi arvutamine

Prognoosi indeks (Predictive Index, PI) arvutatakse pre- ja postmenopausaalsetel naistel erinevalt. Selleks kasutatakse alltoodud võrrandeid (1) ja (2). PI arvutamiseks viiakse HE4 EIA testiga saadud väärtused ning vastavalt ARCHITECT CA125 II või CanAg CA125 EIA testide väärtused sobiva algoritmi võrrandisse, olenevalt menopausi staatusest.

#### (1) Pre-menopausaalsed naised

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

#### (2) Post-menopausaalsed naised

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

### ROMA väärtuse arvutamine

ROMA väärtuse (ennustustõenäosuse) arvutamiseks sisestage PI arvutuslik väärtus valmeisse nr (3):

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

PI ja ROMA väärtuste arvutuste valideerimiseks võib kasutada alltoodud näidist:

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

## PIIRANGUD

Kinnitatud munasarjavähi diagnoosiga patsientidel võivad HE4 väärtused olla samas suurusjärgus tervete naiste HE4 näitudega. Munasarjavähi teatud histoloogiliste tüüpide puhul, näiteks mutsinoossed või sugurakulised kasvaja, esineb harva HE4 näitude tõus, seetõttu ei soovitata selliste vähiliikide kinnitatud diagnoosi puhul kasutada HE4 analüüsi ravi monitooringuks (7). Samas võib HE4 antigeeni kõrge tasemeid leida mittemaliigse haigusega patsientidel. Sellest lähtuvalt ei saa kasutada HE4 taseme näite absoluutse tõestusena pahaloolumuliste kasvaja kinnitamiseks või välistamiseks; HE4 testi ei kasutata vähi skriinimisel. Testi tulemuste hindamisel arvestatakse diagnoosi langetamisel alati ka teiste uuringute ja protseduuride tulemusi, HE4 testiga ei asendata väljatõotatud kliinilisi uuringuid.

Pahaloolumuliste munasarjakasvajate algoritm ei ole valideeritud järgmiste patsiendigruppide puhul: eelnevalt pahaloolumuliste kasvaja ravi saanud patsiendid, hetkel keemiravi saavad patsiendid ning alla 18 a vanused patsiendid. Kasutatav matemaatiline funktsioon ehk ROMA oleneb sellest, kas naised on pre- või postmenopausaalsed. Menopausi staatuse üle otsustamiseks hinnatakse kliiniliste uuringute ja patsiendi haiguslool alusel munasarjade funktsionaalsust. ROMA väärtus ei arvesta informatsiooni patsiendi vanuse, perekonnas esinevate haiguste, kliiniliste leidude ega röntgen- vms skaneeringute kohta, kõiki nimetatud parameetreid peab diagnoosimisel kindlasti arvestama.

HE4 EIA ja/või CA125 testide läbiviimine valede meetoditega või arvutuslik viga võivad viia vähiriski suhtes valehinnangu andmiseni ning edasiste valede toiminguteni. Eriti ohtlik on, kui valesti saadud madal testitulemus viib selleni, et patsiendi epiteeliale munasarjakasvaja riski hinnatakse liiga väikeseks ning seetõttu ei pöörata patsiendile piisavalt tähelepanu. Seetõttu peab riski hindamisel alati arvestama ka teiste uuringute ning kliiniliste hindamiste tulemusi.

Patsiendi proovis olevad HAMA-antikehad või heterofiilsed antikehad võivad mõnikord testi tulemust mõjutada, kuigi testpuhvrites sisaldub spetsiifilisi blokaatoreid. Seetõttu peab testi läbi viima kindla temperatuuriga keskkonnas, sest inkubatsioon kõrgematel temperatuuridel kui soovituslik **20 - 25°C võib anda tegelikust madalamaid tulemusi.**

## ETTENÄHTUD VAHEMIKUD

Alltoodud tabel illustreerib uuringus testitud 1147 proovi HE4 tasemete jaotumist:21

HE4 testi tulemuste jaotus					
	Arvuliselt patsienti	0 - 150 pM	150.1 - 300 pM	300.1 - 500 pM	> 500 pM
<b>ARVATAVALT TERVED</b>					
Naised (premenopausaalsed)	76	72	3	0	1
Naised (postmenopausaalsed)	103	97	5	0	1
<b>HEALOOMULISED HAIGUSED</b>					
Rasedus	22	21	1	0	0
Healoomulised günekoloogilised haigused	347	324	18	1	4
Teised healoomulised haigused	108	82	8	7	11
Hüpertoonia/Südamepuudulikkus	96	75	16	2	3
<b>VÄHK</b>					
Munasarjavähk	127	27	18	21	61
Rinnavähk	46	40	4	2	0
Kopsuvähk	50	29	15	6	0
Endomeetriumi vähk	116	86	15	4	11
Gastrointestinaalne vähk	56	47	8	0	1

Antud uuringu kohaselt oli 94,4% tervetest naistest HE4 väärtus 150 pM või alla selle. Laboritel soovitatakse välja töötada omad referentsväärtused vastavalt kohalikule populatsioonile.

### Diagnoositud munasarjavähiga patsientide haiguse monitooring

Hinnati HE4 EIA testi efektiivsust munasarjavähi diagnoosiga patsientide haiguse monitooringul, selleks testiti HE4 tasemeid seerumiproovide seeriast, mis võeti 80 vastavalt patsiendilt. Uuringus viidi läbi kokku 354 jälgimist, keskmiselt 4,4 jälgimist patsiendi kohta. HE4 väärtuse positiivseks muutuseks loeti selline väärtuse tõus, mis oli vähemalt 25% suurem eelmisest testväärtusest. Väärtuste muutumise mõõtmisel arvestati nii testimisvarieeruvust ning bioloogilist varieerivust. 60% ehk 76/126 positiivse muutusega patsiendiproovidest vastas haiguse edasiarengule, 75% ehk 171/228 patsiendiproovidest, kus ei olnud märgata HE4 väärtuse erilist tõusu, vastas mitteprogresseerunud haigusele. Üldine kokkulangevus oli 70% ehk 247/354). Alltoodud tabelis on ära toodud kõik vastavad andmed 2 x 2 formaadis.22

Haiguse kulu muutus kahe järjestikkuse testimise alusel			
HE-4 kontsentratsiooni tõus	Progresseeruv	Mitteprogresseeruv	Kokku
>25%	76	57	133
≤25%	50	171	221
Kokku	126	228	354

Alltoodud tabel näitab jaotust patsiendi kohta. 93% ehk 54/58 'per-patsient' positiivse muutusega seerumitestide seeriastest vastas haiguse progressioonile, 32% (7/22) seeriastest, mis ei näidanud HE4 väärtuste olulist tõusu, vastas mitteprogresseerunud haigusele. Üldine kokkulangevus oli selle uuringu puhul 76 % ehk 61/80.

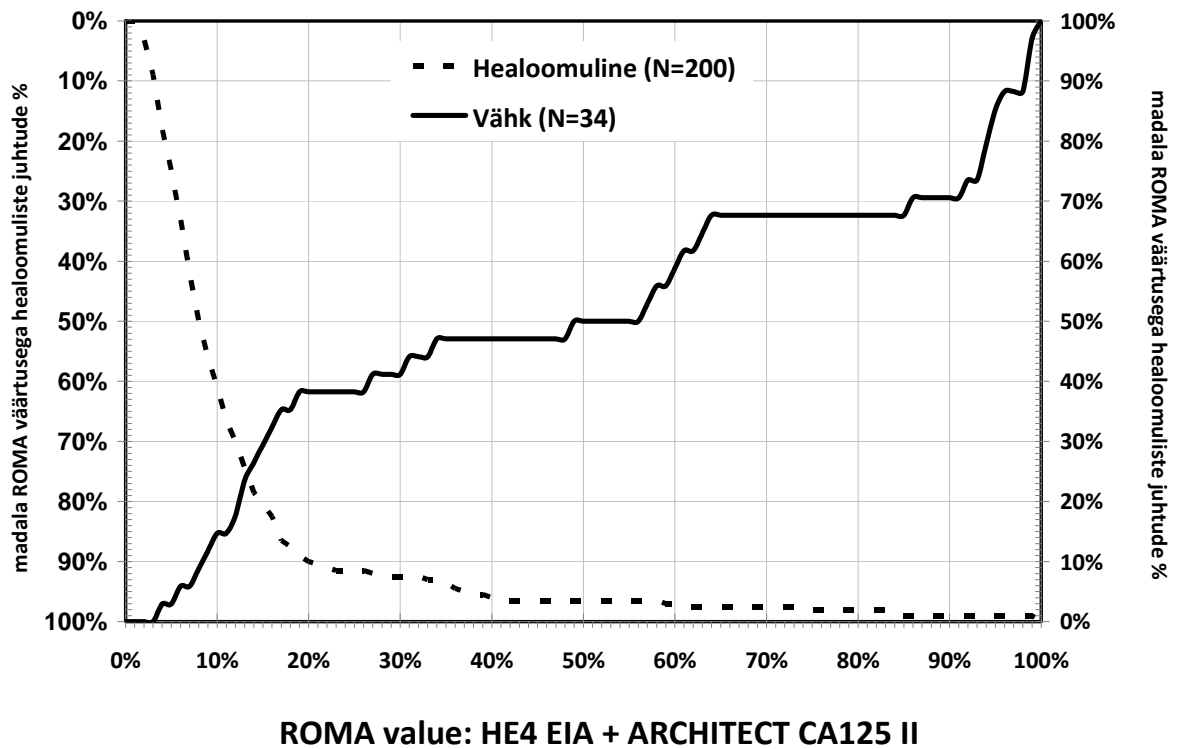
Haiguse kulu muutus ühe patsiendi suhtes			
HE-4 kontsentratsiooni tõus	Progresseeruv	Mitteprogresseeruv	Kokku
>25%	54	15	69
≤25%	4	7	11
Kokku	58	22	80

### Vaagnamassiga patsientide riski hindamine

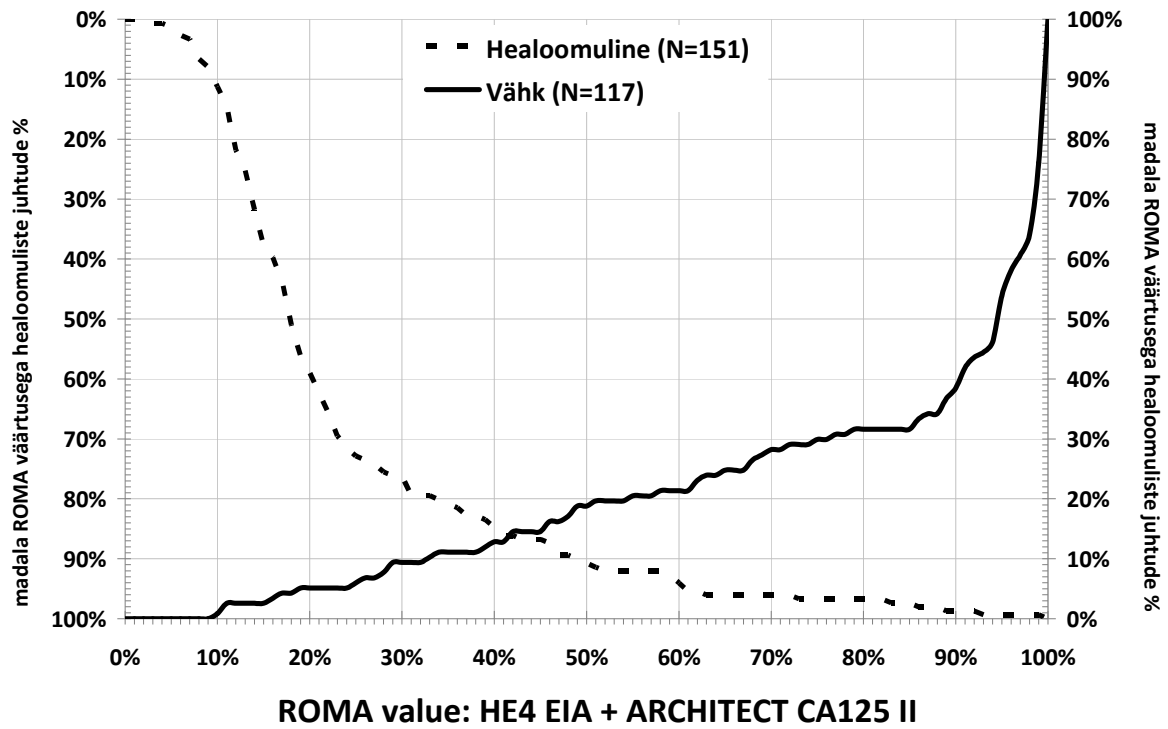
Viidi läbi prospektiivne, 'topeltpime', mitmekeskuseline kliiniline uuring, hindamaks epiteeliale munasarjavähi riski kindlakstegemisel HE4 EIA testi efektiivsust kombineerituna CA125 testiga. Uuringus kasutati ARCHITECT CA125 II teste või CanAg CA125 EIA teste. Epiteeliale munasarjavähi riski hindamiseks loodi algoritm (ROMA, vt lk 17), mis arvestab HE4 ja CA125 väärtusi ning ka patsiendi menopausi staatust. Algoritmiga arvutatakse epiteeliale munasarjavähi leiu tõenäosus. Uuring hõlmas 502 patsienti, uuringu käigus määrati ROMA väärtuste alusel nii munasarjavähi ennustamise tõenäosus kui ka patsientide jaotumine suure ja väikese riskiga gruppideks.

ROMA väärtuste kumulatiivne jaotumine healoomulisteks kasvajateks ja munasarjavähiks, sealhulgas vähese halvaloomulise potentsiaaliga kasvajateks (LMP), on näidatud joonistel 1 ja 2 (HE4 EIA ja ARCHITECT CA125 II testi kombinatsioon) ning 3 ja 4 (HE4 EIA ja CanAg CA125 EIA kombinatsioon). Jaotusdiagrammid illustreerivad patsientide jagunemist healoomulise haigusega ja epiteeliale munasarjavähiga (kaasa arvatud LMP) gruppidesse vastavalt erinevatele ROMA väärtuste punktidele.<sup>23</sup>

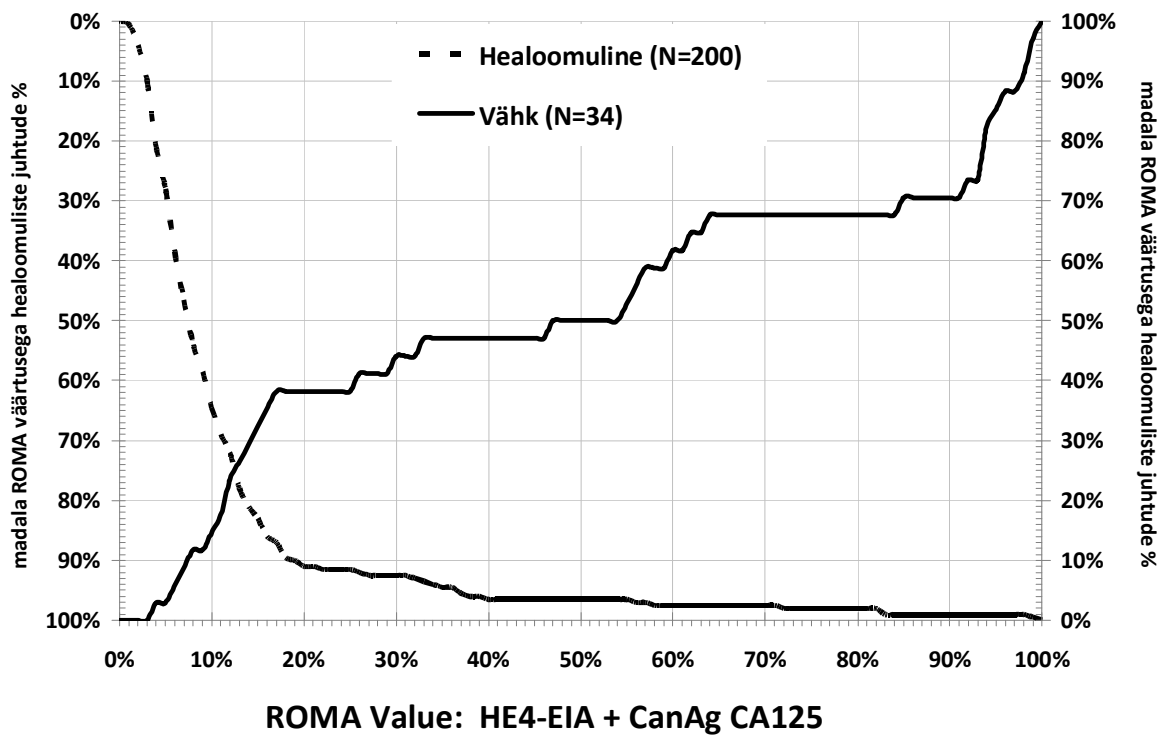
**Joon. 1** ROMA väärtuste kumulatiivne jaotus premenopausaalsetel naistel. HE4 EIA + ARCHITECT CA125 II testi kombinatsioon



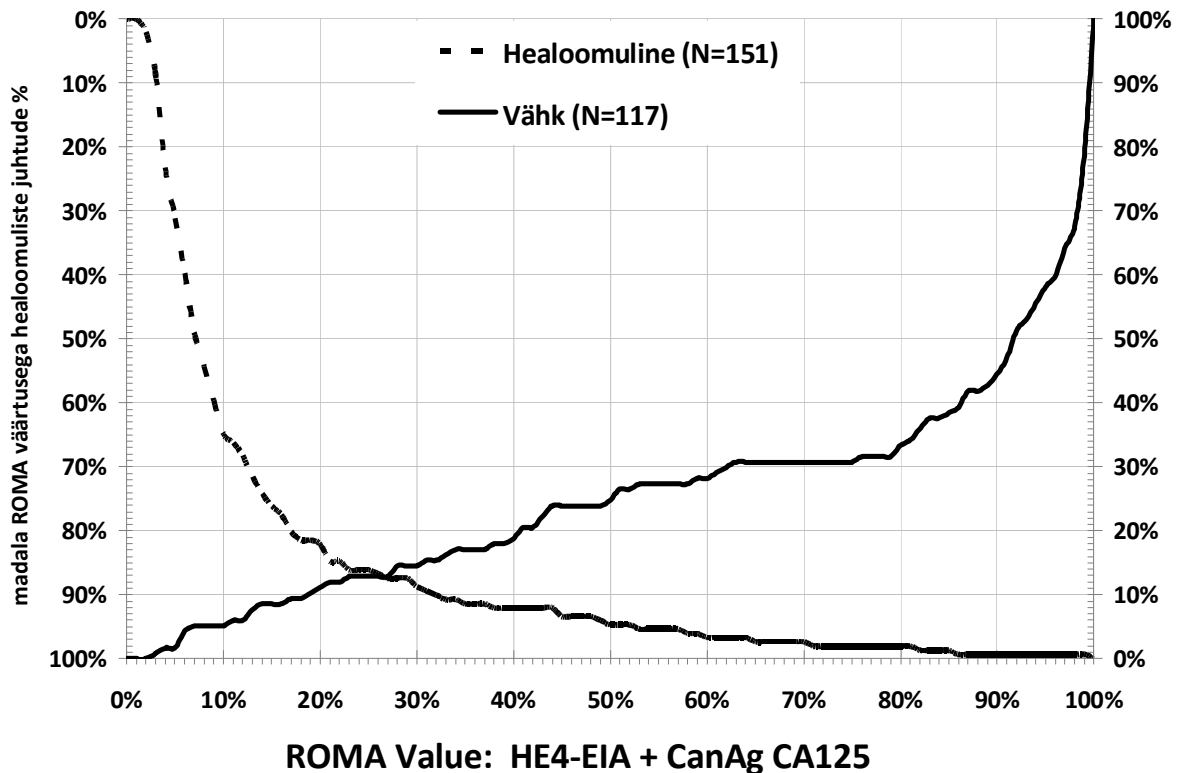
**Joon. 2** ROMA väärtuste kumulatiivne jaotus postmenopausaalsetel naistel. HE4 EIA + ARCHITECT CA125 II testi kombinatsioon 24



**Joon. 3** ROMA väärtuste kumulatiivne jaotus premenopausaalsetel naistel. HE4 EIA + CanAg CA125 EIA kombinatsioon



**Joon. 4** ROMA väärtuste kumulatiivne jaotus postmenopausaalsetel naistel. HE4 EIA + CanAg CA125 EIA combination25



**Jaotumine suure ja väikese riskiga gruppideks**

Munasarjakasvaja pahaloomulisuse riski algoritmi alusel jaotati naised epiteliaalse munasarjavähi riskigruppidesse. Järgmiste punktide alusel saadi spetsiifilisuse tase 75% HE4 EIA ja ARCHITECT CA125 II testi kombinatsioonile:

**Premenopausaalsed naised**

ROMA väärtus > 13.1% = epiteliaalse munasarjavähi leidumise suur risk

ROMA väärtus < 13.1% = epiteliaalse munasarjavähi leidumise väike risk

**Postmenopausaalsed naised**

ROMA väärtus > 27.7% = epiteliaalse munasarjavähi leidumise suur risk

ROMA väärtus < 27.7% = epiteliaalse munasarjavähi leidumise väike risk

Tabelis nr 1 näidatakse kõikide vaagnamassi leidudega patsientide jaotumine, kus suure riskiga patsiendid leiti ROMA väärtuste alusel 75% tõenäosusega, tabelis tuuakse eraldi välja pre- ja postmenopausaalsed naised. I-IV astme epiteliaalse munasarjavähiga patsientide jaotamisel suure riskiga gruppi oli tundlikkus 94% ning spetsiifilisus 75%, mis tähendas, et 75% healoomulise vaagnamassiga naistest liigitati väikese riskiga gruppi. Positiivne ja negatiivne ennustusväärtus oli vastavalt 58 % ja 97%.

**Tabel 1:** vaagnamassiga patsientide jaotumine epiteliaalse munasarjakasvaja vähi (EOC) suure riskiga patsiendigruppi, kasutades HE4 EIA ja ARCHITECT CA125 II testide kombinatsiooni ROMA väärtuse arutamiseks.

Premenopausaalsed väärtused suurde riskigruppi liigitamisel spetsiifilisusega 75% > 13.1%,

Premenopausaalsed väärtused suurde riskigruppi liigitamisel spetsiifilisusega 75% > 27.7%.

	<b>Premenopaus. naised n = 234</b>	<b>Postmenopaus. naised n = 268</b>	<b>Pre- &amp; Postmenopausal naised kombineeritult n = 502</b>
<b>Aste I – IV EOC &amp; LMP kombineeritud</b>	26/34 (76%)	108/117 (92%)	134/151 (89%)
<b>Väike Pahaloomuline Potentsiaal</b>	10/16 (63%)	3/6 (50%)	13/22 (59%)
<b>Aste I-II EOC</b>	6/7 (86%)	24/28 (86%)	30/35 (86%)
<b>Aste I – IIICa EOC</b>	7/8 (88%)	35/39 (90%)	42/47 (89%)
<b>Aste I – IV EOC</b>	16/18 (89%)	105/111 (95%)	121/129 (94%)

Aste I – IIIb & aste IIIC (rasvik negatiivne, lümfisõlmed positiivne) epiteliaalne munasarjavähk

Kasutades ARCHITECT CA125 II või CanAg CA125 EIA väärtusi healoomuliste haiguste ning epiteliaalse munasarjavähi eristamisel, ei esinenud erilisi erinevusi ROMA väärtuse tundlikkuse ja spetsiifilisuse vahel. Kasutades CanAg CA125 EIA + HE4 EIA testi kombinatsiooni, oli I-IV astme epiteliaalse munasarjavähiga patsientide kõrge riskiga gruppi määramisel tundlikkuseks 93%. Positiivne ja negatiivne ennustusväärtus oli vastavalt 57 % ja 97%. On oluline märkida, et riskigruppide jaotumisel peab valima erinevad otsustuspiirid, olenevalt sellest, millist CA125 testi kasutatakse.

Et CanAg CA125 EIA + HE4 EIA testi kombinatsiooniga oleks spetsiifilisuseks 75%, kasutati järgmiseid määramispunkte:

Premenopausaalsed naised

ROMA väärtus > 12.5% = epiteliaalse munasarjavähi leiu suur risk

ROMA väärtus < 12.5% = epiteliaalse munasarjavähi leiu väike risk

Postmenopausaalsed women

ROMA väärtus > 14.4% = epiteliaalse munasarjavähi leiu suur risk

ROMA väärtus < 14.4% = epiteliaalse munasarjavähi leiu väike risk

**Tabel 2:** vaagnamassi leiuga patsientide arvamine epiteliaalse munasarjavähi väikese riskiga gruppi, valenegatiivsete määr ning protsent, kasutades ROMA väärtust spetsiifilisusega 75%. Sellise spetsiifilisuse tasemega väikese ja suure epiteliaalse munasarjavähi riskiga gruppidesse jaotamisel oli valenegatiivsete määraks 6.2%. Kokku 3% kõigist väikese riskiga gruppi arvatutest olid epiteliaalse munasarjavähi kandjad. Tabel 2: FNR (valenegatiivsete määr) ja epiteliaalse munasarjavähi esinemisprotsent kõigil vaagnamassi leiuga patsientidel, kes arvati ROMA väärtusi kasutades väikese riskiga gruppi.

Premenopausaalsel oli väikese riskiga gruppi arvamisel 75% spetsiifilisuse juures otsustuspiiriks < 13.1%, postmenopausaalsel naistel oli samasse gruppi arvamisel otsustuspiiriks < 27.7%.

Epiteliaalne munasarjavähk a	Valenegatiivseid (FNR)			vähi % väikese riskiga grupis		
	Vale-negat. vähk	Kokku vähk	FNR b	Vale-negatiivne vähk	Õige positiivne healoomuline	(%) c
Premenopausaalsed	2	18	11.1%	2	149	1.3%
Postmenopausaalsed	6	111	5.4%	6	113	5.0%
Kõik patsiendid	8	129	6.2%	8	262	3.0%

(a) väikese pahaloomulisuse potentsiaaliga kasvajaid (Low Malignant Potential, LMP) ei arvestatud; (b) FNR = valenegatiivsed / (õiged positiivsed + valenegatiivsed); (c) valenegatiivsed / (õiged negatiivsed + valenegatiivsed)

## TESTI ISELOOMUSTAVAD ANDMED

### Täpsus

HE4 testi täpsus on < 15% kogu CV-st. Viidi läbi uuring vastavalt NCCLS (CLSI) juhiste EP5-A2 (22). Testiti neljast seerumiproovist koosnevat paneeli, kasutati kahest partiist reaktiive, testiti duplikaatidena, kahel erineval ajal päevas, 20 päeva jooksul. Uuringu tulemused on välja toodud allpool.\*

Proov	Reagent Partii	n	Keskmine konts (pM)	Tsüklisene (pM)	Tsüklisene CV %	Kokku SD (pM)	Kokku 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

\*Konkreetses uuringu kohta; laborites saadud tulemused võivad neist andmetes erineda.

### Määramispiir

HE4 EIA testi määramispiiriks on < 15 pM. Määramispiir (LoD, limit of detection) vastab 95% usaldusintervalli ülemisele piirile ja tähendab väikseimat HE4 antigenei kontsentratsiooni, mida on võimalik nullist eristada. LoD uuringute koostamisel kasutati NCCLS juhiseid EP17-A (23). Viidi läbi uuring, kus HE4 kalibraator A (null) ja 4 proovi tervetelt individidelt lahjendati proovi diluendiga 5 pM ning testiti 24 replikaadina tsüklis, neljas tsüklis, kahel päeval. LoD arutati järgmiselt:

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

HE4 EIA testkomplekti määramispiiriks saadi arvutuslikult < 2.5 pM.

### Funktsionaalne tundlikkus

HE4 EIA testi funktsionaalne tundlikkus on < 25 pM. Funktsionaalset tundlikkust väljendatakse kui analüüdi kontsentratsiooni, mille juures CV on 20%. Uuringute korraldamisel funktsionaalse tundlikkuse määramiseks lähtuti NCCLS juhistest EP5-A2 (22). Uuringus testiti viieliikmelist tundlikkuspaneeli, neljas replikaadis, kahes tsüklis, 20 päeva jooksul, kahe erineva reaktiivpartiiga. HE4 EIA funktsionaalne tundlikkus oli < 5 pM.<sup>29</sup>

### Saagis (recovery)

HE4 EIA testi keskmine saagis on 100 ± 15%. Viidi läbi uuring, kus kindlatel HE4 kontsentratsioonidel patsiendiproovi lisati tavalistele inimvere seerumiproovidele. HE4 kontsentratsiooni määrati HE4 EIA testiga, arutati saagiseprotsent. uuringu tulemused on kirjas alltoodud tabelis \*.

Proov	Endogeenne test (pM)	HE4 Antigeen Lisatud Täheldatud HE4 (pM)	HE4 Test Saagiseprotsent (pM)	Väärtus ** (%)
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

Nelja erineva "rikastatud" (spiked) kontsentratsiooni keskmine saagiseprotsent oli 97%.

\* Andmed ainult konkreetse katse kohta, erinevates laborites võidakse saada erinevaid tulemusi.

\*\*% Saagis=leitud HE4 kontsentratsioon (pM)/endogeenne HE4 konts.. (pM) + lisatud HE4 (pM)30

#### "Hook-efekt" ehk negatiivne tulemus ülisuurtel kontsentratsioonidel

"High dose hook"-efekt on nähtus, kus testitavat ainet on proovis ülisuurtel kontsentratsioonides, kuid see ei kajastu testi tulemustes. HE4 EIA testi puhul ei täheldatud ülisuure doosi efekti kuni kogustel 300 000 pM HE4 natiivantigeeni.

#### Lineaarsus lahjendamisel

HE4 EIA testi keskmine lineaarsus lahjendamisel on  $100 \pm 15\%$ . Viidi läbi uuring, kus uuriti HE4 EIA testi vastavalt NCCLS (CLSI) juhiste EP6-A (24). Kõrge HE4 sisaldusega seerumiproove lahjendati HE4 kalibraator A-ga (null). Iga lahjenduse puhul määrati HE4 kontsentratsioon ning arvutati saagiseprotsent. Alltoodud tabelis on välja toodud uuringu tulemused \*.

Proov	Lõplik lahjendus Leitud	Ettenähtud Protsent (pM)	Faktor Väärtus (pM)	Saagis ** (%)
1	Non diluito	889.6	889.6	100
	1:1.25	720.0	711.7	101
	1:1.7	543.1	533.8	101
	1:2	450.6	444.8	101
	1:2.5	345.9	355.8	97.2
	1:5	183.6	177.9	103
	1:10	97.6	89.0	109
	1:20	49.1	44.5	110
	1:40	25.9	22.2	116

2	Lahjendamata	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	Lahjendamata	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

Kolme ülalnäidatud lahjendatud proovi keskmine saagis = 101%

\* Andmed ainult konkreetse katse kohta, erinevates laborites võidakse saada erinevaid tulemusi.

\*\*Saagise % = leitud HE4 kontsentratsioon x lahjendusfaktor / lahjendamata HE4 kontsentratsioon.

#### Analüütiline spetsiifilisus

HE4 EIA testi keskmine spetsiifilisus on  $100 \pm 15\%$ . Viidi läbi uuring, võrdlemaks seerumeid, mis sisaldasid järgmisi aineid näidatud kontsentratsioonides. uuringu läbiviimisel järgiti interferentsi uurimiseks soovitatud NCCLS juhiseid EP7-A (25). Järgmised ained järgmistes kontsentratsioonides ei mõjuta testi.

Endogeense seerumi interferents	Testi kontsentratsioon
Triglütseriidid	30 mg/mL
Bilirubiin	0.2 mg/mL
Hemoglobiin	10 mg/mL
Totaalne proteiin	120 mg/mL

Keemiaravimite interferents	Testi kontsentratsioon
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

#### Potentsiaalselt interferentsi põhjustavad kliinilised tingimused

HE4 EIA testi spetsiifilisuse lisauuringul hinnati testi HAMA-d ja reumatoidfaktorit (RF) sisaldavate proovidega. Testiti viit HAMA-positiivset proovi ja viit RF-positiivset proovi, uuriti saagise protsenti HE $\alpha$  proovides, mis olid eelnevalt antigeeniga rikastatud mahtudes umbes 50 ja 450 pM. Keskmised saagiseprotsendid on toodud välja järgmises tabelis.\*32

Kliiniline staatus	Proovide arv	Keskmine saagise %
HAMA	5	101
RF	5	95

## **GARANTII**

Siintoodud andmed on saadud kirjeldatud testprotseduure järgides. Igasugune muudatus protseduuris, mida ei näe ette Fujirebio Diagnostics, võib mõjutada tulemusi, millest tulenevalt ei võta Fujirebio Diagnostics endale mingit otsest ega kaudset vastutust, kaasa arvatud vastutus toote kaubanduslikkuse ning kasutuseesmärgiks sobivuse suhtes.<sup>33</sup>

## VIITED

1. Israeli O, Goldring-Aviram A, Rienstein S, Ben-Baruch G, Korach J, Gold man B, Friedman E. In silico chromosomal clustering of genes display- ing 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 alter- native 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 overex pressed 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 expres- sion 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;108:402-408.34
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 State- ment. 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. Compari- son 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, Munderspach 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 sono graphic 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 Quantita- tion; 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.

# Protokoll

## HE4 EIA REF 404-10

Valmistada komponendid vahetult enne testi. Kasutada juhendis ettenähtud pesu- ja inkubatsioonitingimusi.  
**Märkus. Korrektsete tulemuste saamiseks testi tehakse temperatuuril 20–25°C.**

Etapp	Viaali/plaadiga	Protseduur																																							
1. Valmistada ette HE4 kalibraatorid	CAL HE4	Lisada 1 mL destilleeritud või deioniseeritud vett igasse viaali, segada kergelt. Lasta seista vähemalt 15 minutit. MÄRKUS: kalibraatorite täpne kontsentratsioon on kirjas etiketil. Stabiilsus pärast lahustamist: 4 nädalat temperatuuril 2-8°C.																																							
Valmistada HE4 kontrollid	B, C, D, E, F CONTROL HE4																																								
Valmistada pesulahus	WASHBUF 25X																																								
Valmistada konjugaadi töölahus	CONJ Anti-HE4 DIL CONJ																																								
		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Ribade arv</th> <th>HRP Anti-HE4 konjugaat (µL)</th> <th>Konjugaadi diluent (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>	Ribade arv	HRP Anti-HE4 konjugaat (µL)	Konjugaadi diluent (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
Ribade arv	HRP Anti-HE4 konjugaat (µL)	Konjugaadi diluent (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. Pesta	MICROPLA	Pesta iga süvend ühe korra pesulahusega. Kasutada manuaalselt või automaatset pesijat.																																							
3. Lisada kalibraatorid, kontrollid ja proovid	CAL HE4 A, B, C, D, E, F CONTROL HE4	25 µL igasse süvendisse																																							
4. Lisada Biotin Anti-HE4	BIOTIN Anti-HE4	100 µL igasse süvendisse																																							
5. Inkubeerida	MICROPLA	1 tund loksutada temperatuuril 20–25°C																																							
6. Pesta	MICROPLA	Pesta iga süvendit 3 korda pesulahusega. Kasutada manuaalselt või automaatset pesijat.																																							
7. Lisada konjugaadi töölahus	KONJUGAADI TÖÖLAHUS	100 µL igasse süvendisse																																							
8. Inkubeerida	MICROPLA	1 tund loksutada temperatuuril 20–25°C																																							
9. Pesta	MICROPLA	Pesta iga süvendit 6 korda pesulahusega. Kasutada manuaalselt või automaatset pesijat.																																							
10. Lisada TMB HRP-substraat	SUBS TMB	100 µL igasse süvendisse																																							
11. Inkubeerida	MICROPLA	30 min loksutada temperatuuril 20–25°C																																							
12. Lageda absorptsioon	MICROPLA	620 nm																																							
Variant 12. Lisada stopp-lahus	STOP	100 µL igasse süvendisse																																							
Variant 13. Segada	MICROPLA	Segada temp-il 20–25°C																																							
Variant 14. Lageda absorptsioon	MICROPLA	Lageda 405 nm, 15 min jooksul																																							



---

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

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