



## HE4 EIA

Prod. Nr. 404-10

Használati utasítás

Enzim immunmetrikus vizsgálati készlet

2008-09

96 meghatározáshoz

### **CÉLSZERŰ HASZNÁLAT**

A HE4 EIA a humán szérumban található HE4 mennyiségi meghatározására szolgáló immunmetrikus teszt. A teszt használható a hámeredetű petefészekrák kezelésekor a terápiás válasz monitorizálására monitorozására használható. A beteg HE4 értékeinek sorozatos meghatározására alkalmazott sorozatos tesztelést a petefészekrák monitorizálására monitorozására alkalmazott egyéb klinikai módszerekkel együtt javasolt használni.

A tesztet az ARCHITET CA 125 II-vel, vagy a CanAg 125 EIA-val történő kombinációban összekapcsolva használható történő felhasználásra szánták továbbá a kismencedeiben jelentkező tumorral daganatsal rendelkező pre-, vagy posztmenopauzális betegek petefészekrák kockázatának becslésére is.

Az eredményeket más módszerekkel összekapcsoltan kell értelmezni, összhangban az érvényes klinikai irányelvekkel összhangban.

### **A TESZT ÖSSZEGZÉSE ÉS MAGYARÁZATA**

A humán mellékhere protein 4 (HE4) a tejsavas négy-diszulfid magvú (WFDC) proteinek családjába tartozik, amelyről feltételezik, hogy tripszin-gátló tulajdonságokkal rendelkezik. A család más fehérjéi, többek között, az SLPI, elafin és PS20 (WFDC1) (1,2). A HE4 gén kódol egy 13kD proteint, azonban habár érett glikoszilált formájában a protein körülbelül 20-25 kD, és két WFDC tartományt (3) tartalmazó egyedi peptidből áll. A HE4-et először a disztális mellékhere hámszövetében azonosították, és eredetileg azt feltételezték róla, hogy fehérjebontó enzim-gátló, amely a sperma érésében (4,5) játszik szerepet. A Azóta HE4-ről et feltárták, mint amely azóta bizonyították, hogy számos normál szövetben kifejeződik, úgymint a légző és reprodukciós szövetek hámszövetében, és a petefészekrák szövetében (6-10). A sejtszinten történő kifejeződésen kívül, HE4-et találtak nagy mennyiségben a petefészekrákban szenvedő betegek szérumában is. A petefészekrákban szenvedő betegeket egészséges, és jóindulatú betegségben szenvedőkkel összehasonlító eset/kontroll tanulmányban, Hellström és munkatársai mások azt találták, hogy a HE4 67%-os érzékenységgel mutatta ki a petefészekrákot,

96%-os specificitás meghatározottság mellett (11). Egy későbbi, a petefészekrák számos ismert biomarkerét értékelő tanulmányban a HE4 mutatta a legnagyobb érzékenységet a petefészekrák vonatkozásában, különösen a betegség korai szakaszában. Ebben a tanulmányban a HE4 és a CA 125 pontosabb előrejelzője volt a rosszindulatú betegségeknek, mint bármelyik marker önmagában, 76%-os érzékenységgel és 95%-os specificitásmeghatározottsággal.

A petefészekrák a nők rákkal összefüggő elhalálzásának negyedik leggyakoribb oka világszerte. Európában a halálzási arányszám 3,6-9,3/100.000 nő

(13). A petefészekrák tünetei a kismedencei nyúlványi tumor daganat jelenlétével kapcsolatosak, gyakran hirtelen jelentkeznek és aspecificusak meghatározatlanok. Egy kismedencei daganat nyúlványi daganat diagnosztikai értékelésének az elsődleges célja annak meghatározása, hogy az jóindulatú, vagy rosszindulatú-e. Becslések szerint az USA-ban a nők 10 százaléka fog élete során valamilyen műtéten átesni kismedencei petefészek daganat miatt, de csak és 13-21 százalékuknál fognak rosszindulatú petefészek elváltozást találni

(14). Az Amerikai Szülészeti és Nőgyógyászati Kollégium 2007-ben kiadott Gyakorlati Útmutója a következőt állapítja meg: „Az olyan petefészekrákban szenvedő nők, akiket megfelelő szakképzettségű és nagy tapasztalatokkal rendelkező nőgyógyász-onkológusok kezeltek, jobb túlélési arányszámokat mutattak, mint azok a nők, akiket ilyen együttműködés nélkül kezeltek.” (15). Mivel a kismedencei függelék daganatok többsége jóindulatú, már az operáció előtt fontos meghatározni, hogy a betegnél nagy-e a kockázata a petefészekrák fennállásának. (15). Egy 1988-as első közlemény megjelenése óta a klinikai vizsgálat, a szérum CA 125 szintjének meghatározása, az ultrahang-, és CT-vizsgálat, valamint az MRI és PET/CT jelenti a standard diagnosztikai eljárást kismedencei tumor függelék daganat malignitásának gyanúja esetén. (16). Bár a szakirodalom bővelkedik olyan dolgozatokban, amelyek azt értékelik, hogy melyik eljárás a pontosabb, a fizikális vizsgálat, a CA125-szintjének meghatározása és a képalkotó diagnosztika kombinációja adja a legmagasabb pozitív prediktív (előrejelző) értéket (17-19). A kismedencei daganattal rendelkező betegek differenciáldiagnosztikájának javítása érdekében, a HE4 EIA használható az ARCHITECT CA125 II-vel, vagy a CanAg CA 125 EIA teszttel összekapcsolva, mivel segítséget nyújt a hámeredetű petefészekrák kockázatnak becslésében. Az eredményeket más módszerek igénybevételével együtt, az érvényes klinikai irányelveknek megfelelően kell értelmezni. A HE4 EIA teszt további segítséget nyújt a rosszindulatú hámeredetű petefészek daganatban szenvedő betegeknél a terápiás válasz monitorizálásában. Az eredményeket a petefészekrák monitorizálásához alkalmazott más klinikai módszerek eredményeivel együtt kell értékelni.

## **A TESZT ALAPELVE**

A HE4 EIA szilárd halmazállapotú, nem kompetitív, kettő egér monoklonális antitestet, a 2H5-öt és a 3D8-at használó közvetlen szendvics technika alapján működő immuneszt, amely a HE4 C-WFDC tartományában lévő epitópjai (antigén determinánsai) ellen irányul. Kalibrátorokat, kontrollokat és betegektől vett mintákat kell együtt inkubálni a biotinozott Anti-HE4 monoklon antitesttel (MAb) 2H5-tel, streptavidin-nel burkolt mikroszalagokon. Az inkubáció alatt a kalibrátorokon, vagy a mintákban lévő HE4 a biotinizált Anti-HE4 MAb segítségével adszorbeálódik megköt a streptavidin-nel burkolt befedett mikroszalagmikroszalagon. A szalagokat lemosást követően a HRP jelű Anti-HE4 MAb 3D8-cal kell inkubálni. A mosás után a pufferozott

szubsztrát/ kromogén reagenst (hidrogén peroxid és 3, 3', 5, 5' tetra-metil benzidint) kell hozzáadni minden egyes tartályhoz, biztosítva, hogy az enzim reakció folytatódhasson. Az enzim reakció során kék szín észlelhető, ha antigén van jelen. A szín erőssége a mintákban jelenlévő HE4 mennyiségével arányos. A szín erősségét erőssége mikrolemezes spektrofotométerrel határozható meg, 620 nm-nél (vagy 405 nm-nél, a Blokkoló Oldat hozzáadása után).

Minden egyes teszthez a felszívási értéket az egyes kalibrátorok koncentrációjával szemben ábrázoló kalibrációs görbéket szerkesztettek. A betegekből vett minták HE4 koncentrációi a kalibrációs görbéről olvashatóak le.

## REAGENSEK

- Minden egyes HE4 EIA készlet 96 teszthez elegendő reagenst tartalmaz.
- A készlet lejárati dátuma a készlet dobozának külső részén található címkén szerepel.
- A készletet a lejárati dátumát követően ne használják.
- Ne keverjék a reagenseket más készlet tételekkel.
- A készletet 2-8 C<sup>o</sup> hőmérsékleten tárolják. Ne fagyasszák.
- A felnyitott reagensek stabilak az alábbi táblázat szerint, feltéve, hogy nem szennyeződtek, eredeti visszazárt csomagolásukban tárolják azokat, és az előírás szerint kezelik. Használat után azonnal hűtsék vissza 2-8 C<sup>o</sup> hőmérsékletre.

Alkotóelem	Mennyiség	Tárolás és az első használat utáni stabilitás
------------	-----------	---

### MICROPLA

Streptavidin-es mikrolemez	1 lemez	2-8 C <sup>o</sup> a lemezen feltüntetett lejárati dátumig
----------------------------	---------	--

12x8 feltörhető üreg, streptavidin bevonattal. Felnyitás után, azonnal helyezték vissza a fel nem használt szalagokat a páratlanító tartalmazó alumínium tasakba. Gondosan zárják vissza, hogy szárazon maradjon

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

HE4- kalibráló A	1 x 8 ml	2-8 C <sup>o</sup> az ampullán feltüntetett lejárati dátumig
------------------	----------	--

Marhaszérum albumint, semleges sárga színárnyalatú, és nem azides (nem N<sub>3</sub><sup>-</sup> képletű anionos) mikrobaölő tartósítószerrel tartalmazó foszfát-pufferolt sóoldat. Felhasználásra kész. Minták feloldására is használatos.

<b>Alkotóelem</b>	<b>Mennyiség</b>	<b>Tárolás és az első használat utáni stabilitás</b>			
HE4 kalibrátorok B-F	5 ampulla, liofilizált	Regeneráció utáni stabilitás 4 hét 2-8 C° -on 4 hónap -20 C°-n, vagy az alatt			
<table border="1" style="display: inline-table;"><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" style="display: inline-table;"><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" style="display: inline-table;"><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" style="display: inline-table;"><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" style="display: inline-table;"><tr><td>CAL</td><td>HE4</td><td>F</td></tr></table>	CAL	HE4	F	1 x 1 ml	
CAL	HE4	F			

A liofilizált kalibrátorok foszfát-pufferolt, marhaszérum albumint tartalmazó sóoldatban tartalmaznak HE4 antigént, amely semleges sárga színű, és nem savas azides (nem N<sub>3</sub><sup>-</sup> képletű anionos) mikroba-gátló tartósítószerrel. Használat előtt desztillált, vagy deionizált vízzel kell regenerálni.

**MEGJEGYZÉS:** A pontos HE4 koncentráció tétel-specifikus, és az egyes ampullákon található címkéken szerepel.

<b>HE4 kontrollok</b>	2 ampulla, liofilizált	Regeneráció utáni stabilitás 4 hét 2-8 C° -on 4 hónap -20 C°-n, vagy az alatt			
<table border="1" style="display: inline-table;"><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" style="display: inline-table;"><tr><td>CONTROL</td><td>HE4</td><td>2</td></tr></table>	CONTROL	HE4	2	1 x 1 ml	
CONTROL	HE4	2			

A liofilizált kontrollok HE4 antigént tartalmaznak humán szérum mátrixban, és nem azides (nem N<sub>3</sub><sup>-</sup> képletű anionos)savas, mikroba-gátló tartósítószerben. Használat előtt desztillált, vagy deionizált vízzel kell regenerálni.

Alkotóelem	Mennyiség	Tárolás és az első használat utáni stabilitás
------------	-----------	---

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

<b>Biotin-Anti-HE4</b>	1 x 15 ml	2-8 C° az ampullán feltüntetett lejárati dátumig
------------------------	-----------	--

Az eEgérből származó Biotin Anti-HE4 monoklonális monoklon antitest, kb. 1 µg/ml. Foszfát-pufferolt sóoldatot (pH7,2), marhaszérum albumint, gátló szereket, mosószert, semleges vörös festéket és nem azides (nem N<sub>3</sub><sup>-</sup> képletű anionos)savas mikroba-gátló tartósítószeret tartalmaz. Használatra kész.

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

<b>HRP Anti HE4</b>	1 x 0,75 ml	2-8 C° az ampullán feltüntetett lejárati dátumig
---------------------	-------------	--

A HRP anti-HE4 egérből származó monoklonális monoklon antitest szabványos oldata, kb. 40 µg/ml. nem azides (nem N<sub>3</sub><sup>-</sup> képletű anionos) savas mikroba-gátló tartósítószeret tartalmaz. Nyomkövető izotóp oldószerrel oldandó fel használat előtt.

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

<b>Nyomkövető izotóp oldószer</b>	1 x 15 ml	2-8 C° az ampullán feltüntetett lejárati dátumig
-----------------------------------	-----------	--

Foszfát-pufferolt, marhaszérum albumint, blokkoló szereket, mosószereket és semleges kék festéket, és nem azides (nem N<sub>3</sub><sup>-</sup> képletű anionos) savas mikroba-gátló tartósítószeret tartalmazó sóoldat (pH 7,2). Használatra kész.

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

<b>TMB-MP-Substrat</b>	1 x 12 ml	2-8 C° az ampullán feltüntetett lejárati dátumig
------------------------	-----------	--

Pufferolt hidrogén peroxidot és 3, 3', 5, 5' tetra-metil benzidint (TMB) tartalmaz. Használatra kész.

Alkotóelem	Mennyiség	Tárolás és az első használat utáni stabilitás
------------	-----------	---

**STOP**

<b>Blokkoló oldat</b>	1 x 15 ml	2-8 C° az ampullán feltüntetett lejárati dátumig
-----------------------	-----------	--

0,12 M sósavat tartalmaz. Használatra kész.

**WASHBUF 25X**

<b>Mosó koncentrátum</b>	1 x 50 ml	2-8 Co az ampullán feltüntetett lejárati dátumig
--------------------------	-----------	--

Tris-HCl pufferolt sóoldat Tween 20-szal. Germall II-t tartalmaz tartósítószerként. Használat előtt 25-szörös desztillált, vagy deionizált vízzel kell oldani.

#### **Instabilitási indikációk**

A TMBHRP anyagnak színtelennek, vagy kissé kékes színűnek kell lennie. A kék szín azt jelzi, hogy a reagens szennyeződött, és selejtezni kell.

### **FIGYELMEZTETÉSEK ÉS ÓVINTÉZKEDÉSEK**

#### **In vitro diagnosztikai felhasználáshoz**

- Járjon el a csomagba helyezett utasítások szerint. A teszteredmények megbízhatósága nem garantálható, ha a csomagba helyezett utasításoktól bármilyen eltérés van.
- Minden betegől származó mintát potenciálisan fertőzőként kell kezelni. Ajánlott, hogy a humán eredetű reagenst és a humán mintákat a vérben szállított kórokozókról szóló OSHA szabvány szerint kezeljék (20). 2 (21) szintű biológiai biztonságot, vagy egyéb megfelelő biológiai biztonsági gyakorlatokat kell alkalmazni olyan anyagok esetében, amelyek fertőző anyagokat tartalmaznak, vagy amelyekről az vélelmezhető.
- Az összes hulladék anyag selejtezésénél a helyi irányelvek szerint járjanak el.

#### **Vigyázat!**

A humán forrásból származó reagens elkészítésénél használt anyagot tesztelték, és úgy találták, hogy nem reaktív a HIV1 és 2 antitestre, a HCV antitestre és a Hepatitis B felületi antigénre (HBsAg). Mivel semmilyen módszer nem zárhatja ki teljesen a vérben szállított betegségek jelenlétét, az ebből a termékből készített humán forrású reagenseket úgy kell selejtezni, mintha potenciálisan fertőzők lennének.

## MINTAVÉTEL ÉS KEZELÉS

A HE4IEA célja szérummal történő felhasználás (az SST leválasztó csövekben gyűjtött szérumot is beleértve). Plazmát, vagy más testnedveket nem érvényesítettek a HE4EIA-val történő felhasználásra. A vért vénaszúrással vegyék, és a gyűjtő csövek gyártójának a feldolgozási utasításai szerint járjanak el. Amikor sorozatos mintákat értékelnek, a tanulmány során ugyanazt a fajta mintát kell használni mindvégig.

A szérum 2-8 Co-n tárolható 3 napig a tesztelés előtt. Hosszabb időszakok esetén, a mintákat tárolják -40 Co-n, vagy az alatt.

A fagyasztott mintákat vigyék hagyják szobahőmérsékletűre felmelegedni, és ALAPOSAN keverjék össze, óvatosan, többször fejre állítva, elemzés előtt. A nagy részecskéket tartalmazó mintákat 10.000x g -on kell centrifugálni 10 percig, használat előtt, bármilyen olyan részecske anyag kiszűrésére, amely az oladási a kiengedési folyamatból esetlegesen kifejlődhetett.

## ELJÁRÁS

### Szükséges, de a készlettel nem szállított anyagok

#### 1. Mikrolemez rázó

A rázásnak közepestől, hevesig kell terjednie, kb. 700-1100 rezgés/perc.

#### 2. Mikrolemez mosó

1,3 és 6 mosóciklus elvégzésére képes, és minimálisan 350 µL/üreg/mosóciklus töltési térfogatú automata lemezmosó.

Egy 8 csatornás pipetta 350 µL-es eldobható műanyag fúvókákkal ajánlatos, ha nem használnak automata mikrolemez mosót.

#### 3. Mikrolemez spektrofotométer

620 nm és/vagy 405 nm hullámhosszal és 0-3,0 elnyelési aránnyal.

#### 4. Precíziós pipetták

Egyszer használatos műanyag fúvókákkal, a mikroliter mennyiségek adagolására. 8 csatornás pipetta, vagy 100 µL szállítására alkalmas, egyszer használatos műanyag adagoló pipetta ajánlott, de nem szükséges. Pipetták milliliteres mennyiségek adagolására.

#### 5. Desztillált, vagy deionizált víz

A HE4 kalibrátorok, HE4 kontrollok regenerálására és oldott mosóoldat készítésére.

### Eljárással kapcsolatos megjegyzések

1. A csomagba helyezett utasításokat alaposan meg kell érteni, a HE4 EIA készlet megfelelő használatának a biztosítására. A készlettel szállított reagenseket egységes egységként történő felhasználásra szánták. Ne keverjenek össze eltérő tételszámú készletekből származó azonos reagenseket. A készlet reagenseket ne használják a készlet dobozának külsején feltüntetett lejárat dátum után.
2. A reagenseknek szobahőmérsékletet (20-25 C°) kell elérniük a használat előtt. A fagyott mintákat óvatosan, de alaposan fel kell keverni a kiolvadás után. **A pontos eredmények elérése érdekében, a tesztet csak 20-25 C° között végezzék el.**

3. A pipetta kalibrátorok és betegektől származó minták kezelése előtt, tanácsos a szalagokat feliratozni, a minták egyértelmű azonosításának a biztosítására, a teszt alatt és után.
4. A megkötött és meg nem kötött antigén és reagensek hatékony és alapos kimosási követelménye a szilárd halmazállapotú megkötött antitest-antigén komplexekből, az egyik legfontosabb lépés az EIA-ban. **Az elegendő mosás biztosítására, ellenőrizzék, hogy az összes üreg teljesen, a felső széléig fel legyen töltve mosóoldattal az egyes mosási ciklusok alatt, hogy a mosóoldat jó átfolyási sebességgel áramoljon, hogy az üregek elszívása a mosóciklusok között és alatt teljes legyen, és hogy az üregek üresek legyenek. Ha van maradék folyadék, fordítsák fel a lemezt, és gondosan ütögessék nedvszívó papírhoz.**  
Automata szalagmosó: Kövessék a gyártó utasításait az alapos tisztításról és karbantartásról, és az egyes inkubációs lépések előtt és után, végezzék el a szükséges számú mosási ciklust. Az elszívó/mosó készülékben ne hagyják állni a mosóoldatot hosszú ideig, mivel a tűk eltömődhetnek a gyenge folyadékáramlás és elszívás miatt.
5. A TMBHRP táptalaj nagyon érzékeny a szennyeződésre. A TMBHRP táptalaj optimális stabilitásáért, a szükséges mennyiséget öntsék ki az ampullából egy gondosan megtisztított edénybe, vagy lehetőség szerint eldobható műanyag tálcára, a reagens szennyeződésének az elkerülése érdekében. Ellenőrizzék, hogy csak tiszta, egyszer használatos pipetta fúvókákat (vagy adagoló pipetta fúvókát) használjanak.
6. Ellenőrizzék, hogy csak tiszta, egyszer használatos pipetta fúvókákat használjanak és megfelelő precíziós pipettázó technikát alkalmazzanak a minták és a reagensek kezelésekor. Ne érintkezzen a pipetta fúvókája a folyadék felszínével, az áthordás elkerülésére. A gondos pipettázó technika különös jelentőségű, a minták és a TMBHRB táptalaj oldatának a kezelésekor.

---

**Reagensek készítménykészítése**


---

**Az elkészített reagens stabilitása**


---

**HE4 B-F. kalibrátor**

4 hét 2-8 C°-n

4 hónap -20 C°-n, vagy alatta

Adjon pontosan 1,0 ml desztillált, vagy deionizált vizet minden egyes ampulláhozampullába. Hagyja állni legalább 15 percig a regenerálódás érdekében, majd használat előtt óvatosan keverje meg. **MEGJEGYZÉS:** A kalibrátorok koncentrációja a feliratokon szerepel, és az eredmények kiszámításához fel kell azt használni.

---

Reagensok készítményekészítése	Az elkészített reagens stabilitása
--------------------------------	------------------------------------

**HE4 1. és 2. kontroll**

**4 hét 2-8 C<sup>o</sup>-n**

4 hónap -20 C<sup>o</sup>-n, vagy alatta

Adjon pontosan 1,0 ml desztillált, vagy deionizált vizet minden egyes ampullához, és óvatosan keverje össze.

Hagyja állni legalább 15 percig a regenerálódás érdekében, majd használat előtt óvatosan keverje meg.

MEGJEGYZÉS: A kontrollok koncentrációja a feliratokon szerepel.

**Mosóoldat**

2 hét 2-25 C<sup>o</sup>-n lezárt edényben

Leeren Sie die 50 ml Waschkonzentrat in einen sauberen Behälter und verdünnen Sie 1:25 mittels Zugabe von 1200 ml destilliertem oder entionisiertem Wasser, um eine gepufferte Waschlösung zu erhalten.

**Nyomkövető izotóp munkaoldat**

4 hét 2-8 C<sup>o</sup>-n lezárt edényben

Készítse el a szükséges mennyiségű Nyomkövető izotóp munkaoldatot legalább 50µl nyomkövető izotóppal, HRP Anti HE4-gyel 1 ml nyomkövető izotóp oldattal szalagonként (ld. az alábbi táblázatot).

Szalagok száma	Nyomkövető izotóp, HRP Anti-HE4 (µl)	Nyomkövető izotóp oldószer (µl)
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

Ellenőrizték, hogy tiszta műanyag, vagy üvegsövet használjanak a nyomkövető izotóp munkaoldat elkészítéséhez.

**Egyéb lehetőség:** A nyomkövető izotóp tartalmát, HRP anti-HE4-et öntsék a nyomkövető izotóp oldat ampullába, és óvatosan keverjék össze. Ellenőrizzék, hogy a teljes nyomkövető izotóp, HRP anti-HE4 ampulla tartalom a nyomkövető izotóp oldószeres ampullába kerüljön.

**MEGJEGYZÉS:** A nyomkövető izotóp 4 hétig stabil 2-8 C°-n. Ne készítsen több nyomkövető izotóp munkaoldatot annál, mint amelyet fel fog használni ezen az időszakon belül, és ellenőrizze, hogy a tárolása megfelelő legyen.

## TESZT ELJÁRÁS

Minden egyes meghatározást egyidejűleg két példányban végezzen el a kalibrátorok, a kontrollok és az ismeretlen minták tekintetében egyaránt. Minden egyes teszttel együtt kalibrációs görbét kell futtatni. Minden reagenst és mintát hagyjon szobahőmérsékletűre kell hoznifelmelegedni, (20-25 C°) felhasználás előtt.

1. Kezdje a B-F kalibrátor, 1-2. kontroll, mosóoldat és nyomkövető izotóp munkaoldat elkészítésével. Fontos, hogy tiszta edényeket használjon. Pontosan kövesse az utasításokat.
2. A szükséges számú mikrolemez szalagot helyezze szalag-keretre (a megmaradó szalagokat azonnal helyezze vissza a páratlanítót tartalmazó alumínium tasakba, és gondosan zárja vissza). Minden egyes szalagot mosson meg a mosóoldattal. Ne mosson több szalagot annál, mint amennyi 30 percen belül kezelhető.
3. Pipetázzon egyaránt 25-25 µl-t a HE4 kalibrátorokból (CAL A,B,C,D,E és F), a HE4 kontrollokból (C1, C2) és az ismeretlen mintákból (Unk) a szalag üregekbe, a következő elrendezés szerint:

	1	2	3	4	5	6	7 etc
A	Kal A	Kal E	1. Unb				
B	Kal A	Kal E	1. Unb				
C	Kal B	Kal F	2. Unb				
D	Kal B	Kal F	2. Unb				
E	Kal C	K1					
F	Kal C	K1					
G	Kal D	K2					
H	Kal D	K2					

(1st = első, 2nd = második, Unk – ismeretlen minta, etc. = stb.)

4. Adjon 100 µl biotin anti-HE4-et minden egyes üreghez, 100µl -es precíziós pipettát használva (vagy egy 8 csatornás 100 µl-es precíziós pipettát). Ne hagyja, hogy a pipetta fúvókája a folyadék felszínéhez érjen, az áthordás elkerülése érdekében.
5. Inkubálja a tálcát 1 órán keresztül ( $\pm 10$  perc) szobahőmérsékleten (20-25 C°), folyamatosan rázva a tálcát mikrolemez rázógéppel.

6. Az első inkubáció után, szívjon le és mosson le minden egyes szalagot 3-szor, az Eljárási megjegyzések 4. tételében leírt mosási eljárással.
7. Adjon 100 µl nyomkövető izotóp munkaoldatot minden egyes üregbe. A fenti 4. tételben leírttal azonos pipettázó eljárást alkalmazza.
8. Inkubálja a tálcát 1 órán keresztül ( $\pm 5$  perc) szobahőmérsékleten ( $20-25\text{ C}^{\circ}$ ), folyamatosan rázva azt.
9. A második inkubáció után, szívjon le és mosson le minden egyes szalagot 6-szor, az Eljárási megjegyzések 4. tételében leírt mosási eljárással.
10. Adjon 100 µl TMB HRP anyagot az egyes üregekbe, a fenti 4. tételben leírttal azonos pipettázó eljárást alkalmazva.  
A TMB HRP anyagot a lehető leggyorsabban kell az üregekbe adagolni, és az első és az utolsó üreg közötti idő ne legyen több 5 percnél.
11. Inkubálja a tálcát 30 percen keresztül ( $\pm 5$  perc) szobahőmérsékleten ( $20-25\text{ C}^{\circ}$ ), folyamatosan rázva azt. Kerülje el, hogy az anyag közvetlen napsugárzásnak legyen kitéve.
12. Azonnal olvassa le az elnyelést 620 nm-nél mikrolemezes spektrum-fotométerrel.

### Változat

Ha a laboratórium számára 620 nm-nél olvasni képes mikrolemez olvasó nem áll rendelkezésre, az elnyelést az alábbi 12. változatban leírtak szerint lehet meghatározni:

**12. változat:** Adjon 100 µl Stop (blokkoló) oldatot, keverje össze, és olvassa le az elnyelést 405 nm-nél mikrolemezes spektrum fotométerrel a Stop oldat hozzáadását követő 15 percen belül.

### Mérési tartomány

A HE4 EIA a koncentrációkat 15 és 900 pM között méri. Ha a mérési tartomány feletti HE4 koncentrációk várhatók, ajánlatos, hogy a mintákat HE4 A kalibrátorral oldják az elemzés előtt (ld. „Az eredmények kiszámítása oldott mintákkal”).

### Minőségellenőrzés

Az 1. és a 2. HE4 kontrollt használni kell használni az egyes teszt sorozatok érvényesítésére. A várható eredmények értéktartománya szerepel az ampullák címkéin.

A HE4 teszteredményeket akkor tekintjük érvényesnek, ha:

- A kontroll másodlati példányok átlagértékei a meghatározott értéktartományon belül vannak
- A B-F kalibrátorok másodlati másodpéldányai és a kontrollok nem haladják meg a 15%-os CV-t.
- Az „A” kalibrátor másodlati másodpéldányai nem többek, mint 0,06 egymástól eltérő OD egység.

Ha egy teszt érvénytelen kalibrátor, vagy kontroll eredményeket hoz, a reagensek, a pipetták pontossága, a lemezmosó és a leolvasó teljesítményének a teljes ellenőrzését el kell végezni, és az elemzést meg kell ismételni. Minden egyes laboratórium is elkészítheti saját, különböző szintű szérum gyűjteményeit, amelyek belső ellenőrzésként használhatók, a teszt pontosságának a biztosítása érdekében.

## Referencia anyag

Mivel a HE4 antigénre semmilyen általános referencia anyag nem áll rendelkezésre, a HE4 EIA kalibrátor értékeket házon belüli referencia szabványok sorozatával kell szembeállítani.

## AZ EREDMÉNYEK KISZÁMÍTÁSA

Ha beépített adatszámító programmal ellátott, egy mikrolemezes spektrum-fotométer, beépített adatszámító programmal használatos, ld. a spektrum-fotométer gépkönyvét, és hozzon létre egy programot, az egyes HE4 kalibrátorokon található címkén megjelölt koncentrációk felhasználásával.

A HE4 eredmények automatikus kiszámításához, az alábbi módszerek közül valamelyiket ajánlatos alkalmazni:

- Köbös csapos görbeillesztési módszer. Az „A” kalibrátort a görbébe 0 pM értékkel kell bevinni.
- Interpolálás pontról pontra történő értékeléssel. Az „A” kalibrátort a görbébe 0 pM értékkel kell bevinni.
- Másodfokú görbeillesztési módszer. Az „A” kalibrátort a görbébe 0 pM értékkel kell bevinni.

**MEGJEGYZÉS:** 4 paraméteres, vagy lineáris regressziós módszereket ne használjanak. A kézi értékeléshez, kalibrációs görbét kell felvenni az egyes HE4 kalibrátorokra nyert felszívási értékek (A) berajzolásával, a megfelelő HE4 koncentrációval (pM-ben) szemben.

Az ismeretlen HE4 koncentrációk ezt követően leolvashatók a görbéről, az egyes beteg-minták átlagos felszívási értékét használva.

### Az eredmények kiszámítása oldott mintákkal

Ha egy kezdeti elemzés mintái 900 pM-nél magasabb HE4 értékeket adnak, a mintákat 1/10 és 1/100-ra kell oldani HE4 „A” kalibrátorral, a minták pontos HE4 koncentrációjának a megállapításához.

- 1/10 oldat = 50 µl minta + 450 µl HE4 „A” kalibrátor
- 1/100 oldat = 50 µl 1/10 oldat + 450 µl HE4 „A” kalibrátor

Az oldatlan minta HE4 koncentrációját a következőképpen számítjuk ki:

- 1/10 oldat: 10x mért érték
- 1/100 oldat: 100x mért érték

## A Petefészekrák Kockázati Algoritmus (ROMA) a rosszindulatú hámeredetű petefészek daganat kockázatának becslésére kismencedei daganattal rendelkező, menopauza előtti és utáni nőknél

### A prediktív index kiszámítása

Prediktív index (PI) számítható ki külön-külön a menopauza előtti és utáni nőknél az alábbi (1) és (2) egyenlettel. A PI kiszámításához, a HE4 EIA-ból nyert teszteredményeket, és vagy az ARCHITECT CA125 II, vagy a CanAgCA125 EIA teszt eredményét beillesztjük az alábbi algoritmus egyenletébe, a nőbeteg menopauzális státuszától függően.

#### (1) Menopauza előtti nők

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

#### (2) Menopauza utáni nők

Prediktív index (PI) =  $-8,9 + 1,4 \cdot \text{LN}[\text{HE4}] + 0,732 \cdot \text{LN}[\text{CA125}]$

### A ROMA érték kiszámítása

A ROMA érték (azaz, a prediktív valószínűség) kiszámításához, helyezze a prediktív index számított értékét a (3) egyenletbe.

$$(3) \quad \text{ROMA érték (\%)} = \exp(\text{PI}) / [1 + \exp(\text{PI})] * 100$$

Az alábbi példák használhatók a PI és a ROMA érték számításainak az érvényesítésére:

Menopauza státusz	HE4 (pM)	CA125 (E/ml)	PI számítás	PI	ROMA (%)
Menopauza előtt	37,5	74,9	$-12,0 + (2,38 * 3,624) + (0,0626 * 4,316)$	-3,10388	4,29
Menopauza előtt	386,6	21,8	$-12,0 + (2,38 * 5,957) + (0,0626 * 3,082)$	2,371517	91,5
Menopauza után	66,7	11,3	$-8,09 + (1,04 * 4,200) + (0,732 * 2,425)$	-1,94683	12,5
Menopauza után	383,1	22,7	$-8,09 + (1,04 * 5,948) + (0,732 * 3,122)$	0,381799	59,4

### AZ ELJÁRÁS KORLÁTAI

Az igazolt petefészekrákban szenvedő betegek HE4 tesztértékei azonosak lehetnek az egészséges nők értékeivel. A petefészekrák bizonyos szövettani típusai, pl. mucinózusnyálka, vagy csírasejt-eredetű tumorok ritkán expresszálják fejezik ki a HE4-et, ezért a HE4 nem ajánlott a mucinózusnyálka, vagy csírasejt-eredetű petefészekrákban szenvedő betegek monitorizálásmonitorozására (7). Emellett a HE4 antigén magas szintjei lehetnek észlelhetők olyan egyéneknél, akik nem rosszindulatú betegségben szenvednek. Mivel a HE4 szintje nem használható a rosszindulatú betegség jelenlétének, vagy hiányának abszolút bizonyítékeként, a HE4 tesztet ne használják a rosszindulatú betegség szűrésére!

A teszt eredményeit csak más vizsgálatokkal és eljárásokkal együtt értelmezzék, a betegség diagnózisa és kezelése során. A HE4 teszt nem helyettesíthet semmilyen már elfogadott klinikai módszertvizsgálatot.

A Petefészekrák Kockázati Algoritmust nem validálták a következő betegcsoportokban: korábban rosszindulatú betegséggel kezelt betegek; aktuálisan kemoterápiával kezelt betegek, és 18 évesnél fiatalabb betegek. A Petefészekrák Kockázati Algoritmusként (ROMA) említett matematikai összefüggés függvény az adott nő menopauza előtti, vagy utáni státuszától függ. A menopauza előtti, vagy utáni státusz, a státusz a petefészekműködéstől függ, amely a klinikai vizsgálatok és a kórtörténet segítségével állapítható megmegállapítható petefészek működésén kell alapulnia. A ROMA érték nem veszi figyelembe az életkort, a családi kórtörténetet, a klinikai vizsgálatot és a képalkotó eljárások eredményeit, ezért csak ezekkel a paraméterekkel együttesen javasolt az eredményt értelmezni.

A HE4 EIA és/vagy a CA 125 teszt végzése közben elkövetett hiba, vagy az eredmények nem megfelelő kiszámítása pontatlan kockázatértékeléshez, és a beteg helytelen ellátásához vezethet. A teszt(ek) hamisan alacsony szintje(i) azt eredményezhetik, hogy a beteg a hámeredetű petefészekrák szempontjából alacsony kockázatú csoportba kerül, és nem a megfelelő szintű ellátásban fog részesülni. Ezért a teszteredmények egyedüli kizárólagos használata az egyéb laboratóriumi eredmények, képalkotó vizsgálatok leletei, és klinikai értékelés nélkül kockázatot jelenthet támaszthat.

A beteg-mintában található anti-reagens antitestek (humán anti-egér antitest (HAMA) vagy heterofil antitestek) alkalmanként interferálhatnak zavart kelthetnek a teszttel, még akkor is, ha egyedi blokkoló anyagok találhatóak

a pufferekben. A tesztet hőmérséklet-szabályozott hőmérsékletű környezetben kell elvégezni, mivel az ajánlott 20-25 C° hőmérséklettartománynál magasabb tartományban végzett inkubáció hamisan alacsony eredményeket hozhat.

## VÁRT ÉRTÉKEK

1147 mintából meghatározott HE4 szintek szerepelnek az alábbi táblázatban:

<b>A HE4 tesztértékek megoszlása</b>					
	<b>Alanyok száma</b>	<b>0 - 150 pM</b>	<b>150,1 - 300 pM</b>	<b>300,1 - 500 pM</b>	<b>&gt; 500 pM</b>
<b>LÁTSZÓLAG EGÉSZSÉGES</b>					
Nők (menopauza előtt)	76	72	3	0	1
Nők (menopauza után)	103	97	5	0	1
<b>JÓINDULATÚ ELVÁLTOZÁSOK VAGY ÉLETTANI ÁLLAPOTOK</b>					
Terhesség	22	21	1	0	0
Jóindulatú nőgyógyászati betegség	347	324	18	1	4
Egyéb jóindulatú betegség	108	82	8	7	11
Magas vérnyomás / veleszületett szívélgtelenség	96	75	16	2	3
<b>ROSSZINDULATÚ DAGANATOK</b>					
Petefészekrák	127	27	18	21	61
Emlőrák	46	40	4	2	0
Tüdőrák	50	29	15	6	0
Méhnyálkahártya rák	116	86	15	4	11
Gyomor-bél rák	56	47	8	0	1

Ebben a tanulmányban, az egészséges női vizsgálati alanyok 94,4%-ának 150 pM, vagy az alatti HE4 tesztértéke volt. Ajánlott, hogy minden egyes laboratórium hozza létre saját referencia értékét a vizsgálandó populációra vonatkozólag.

## Petefészekrákkal diagnosztizált betegek betegség-státuszának monitorizálásmonitorozása

A HE4 EIA teszt hatékonyságát a petefészekrákban szenvedő páciensek betegség-státuszának monitorizálásmonitorozásában úgy határozták meg, hogy a HE4 szintek változásait értékelték 80 betegtől vett sorozatos szérummintákban, és összevetették a betegség-státusszal. Egy összesen 354 pár megfigyelésre kiterjedő tanulmányt végeztek, minden egyes betegnél átlagosan 4,4 meghatározás történt. Pozitív változást határoztak meg az érték növekedésében, ha a változás legalább 25%-kal nagyobb volt, mint a teszt előző értéke. Ez a változási szint figyelembe veszi mind a teszt variabilitását, mind a biológiai variabilitást. A beteg-minták 60%-a (hatvan százaléka), vagyis 76/126 pozitívan korrelált megfelelt a betegség előrehaladásával, míg a beteg-minták 75%-a (hetvenöt százaléka) vagyis 171/228 esetében nem volt jelentős változás a HE4 értékeiben, ami korrelált azzal, hogy a betegség nem progrediálthaladt előre. A teljes konkordancia 70% (hetven százaléka) vagyis 247/354 volt. A következő táblázat az adatokat 2x2 formátumban mutatja be.

<b>Betegségstátusz-változás szekvenciális párokként</b>			
<b>HE-4 koncentráció növekedése</b>	<b>Progresszió</b>	<b>Nincsen további progresszió</b>	<b>Összesen</b>
>25%	76	57	133
≤25%	50	171	221
Összesen	126	228	354

A következő táblázat a betegenkénti megoszlást mutatja. A pozitív változások, betegenkénti szérumszintek 93%-a (kilencvenhárom százalék) vagyis 54/58 korrelációban volt a betegség progressziójával, míg a szérumszint tesztek 32%-a (harminckét százalék) vagyis 7/22 nem mutatott semmilyen jelentős változást a HE4 értékben, ami a progresszió hiányával volt korrelációban. A teljes konkordancia ebben a tanulmányban 76% (hetvenhat százalék) vagy 61/80 volt.

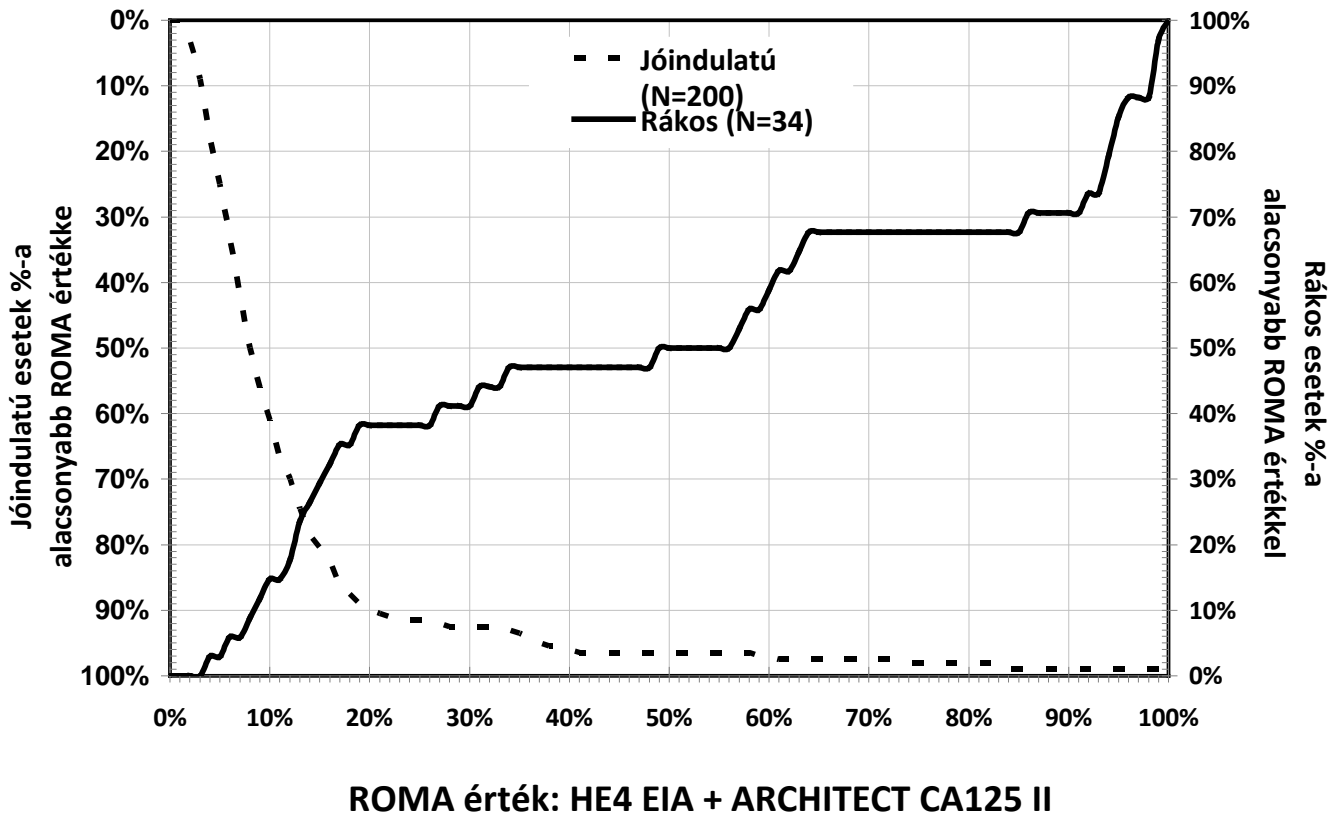
<b>Betegségstátusz-változás betegenként</b>			
<b>HE-4 koncentráció növekedése</b>	<b>Progresszió</b>	<b>Nincsen további progresszió</b>	<b>Összesen</b>
>25%	54	15	69
≤25%	4	7	11
Összesen	58	22	80

#### **Kismedencei daganattal jelentkező betegek kockázatbecslése**

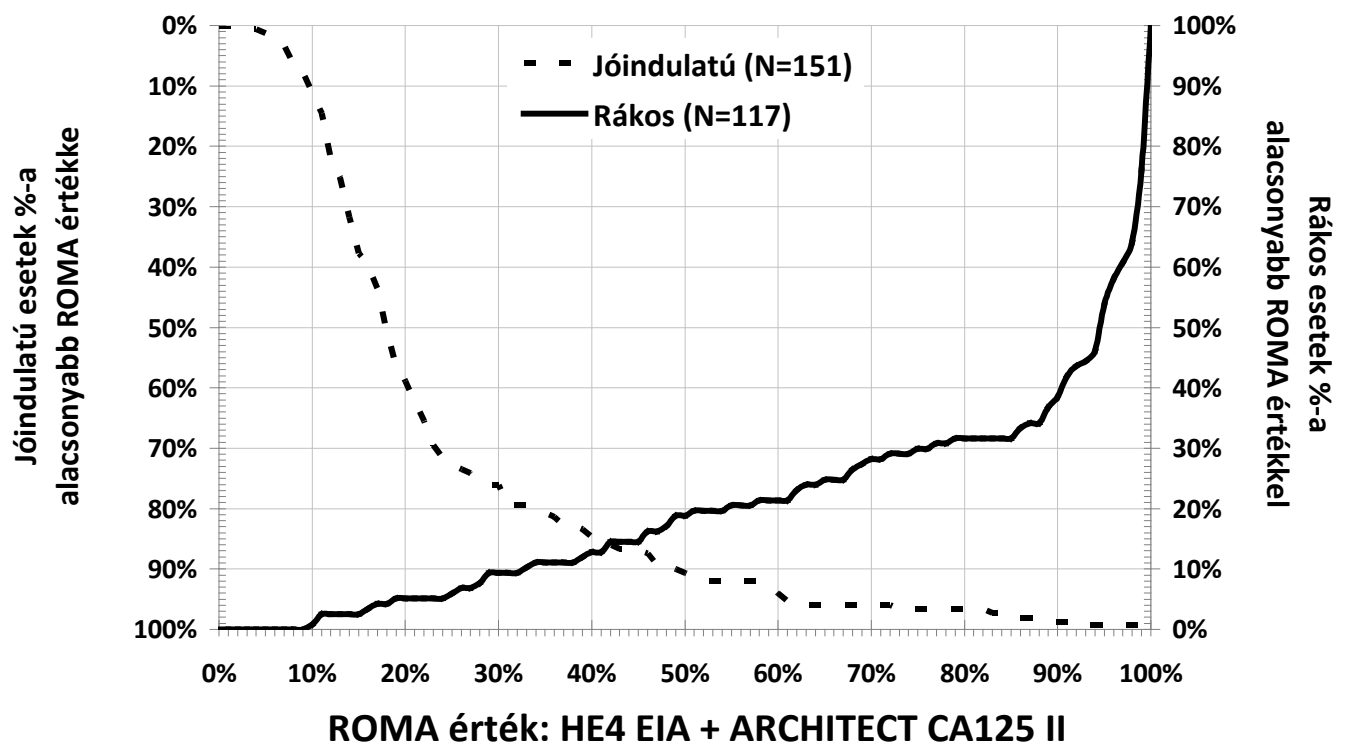
A HE4 EIA hatékonyságát a CA 125 teszttel kombinálva, akár az ARCHITECT CA 125 II teszttel, akár a CanAg CA125 EIA teszttel kombinálták, prospektívelőretekintő, multicentrikustöbbközpontú, kettős-vak dupla szűrős vizsgálatban határozták meg a kismedencei daganattal jelentkező betegek hámeredetű petefészekrák-kockázatának becslése vonatkozásában. (ROMA, ld. a 17. oldalon). Az algoritmus figyelembe veszi a HE4 és a CA125 értékeket, valamint a beteg menopauzális státuszát. Az algoritmus segítségével meghatározható a hámeredetű petefészekrák észlelésének valószínűsége a későbbi műtét során. Az előretekintő prospektív tanulmányba összesen 502 beteget vontak be, és a ROMA értékek alapján meghatározták a petefészekrák prediktív valószínűségét, valamint az alacsony vagy magas kockázati csoportba való besorolhatóságot.

A ROMA értékek halmozott gyakorisági eloszlása látható az 1. és a 2. ábrán (HE4 EIA és az ARCHITECT CA 125 II teszt kombinációjával), és a 3. és a 4. ábrán (HE4 EIA és a CanAg CA125 EIA kombinációjával), a jóindulatú daganatoknál és a petefészekrákos esetekben, az alacsony malignus potenciálú (LMP) daganatokat is beleértve. A gyakorisági megoszlási grafikonok a jóindulatú betegségben és a hámeredetű petefészekrákban (LMP-t is beleértve) szenvedő betegek megoszlását szemléltetik, eltérő ROMA érték metszéspontoknál.

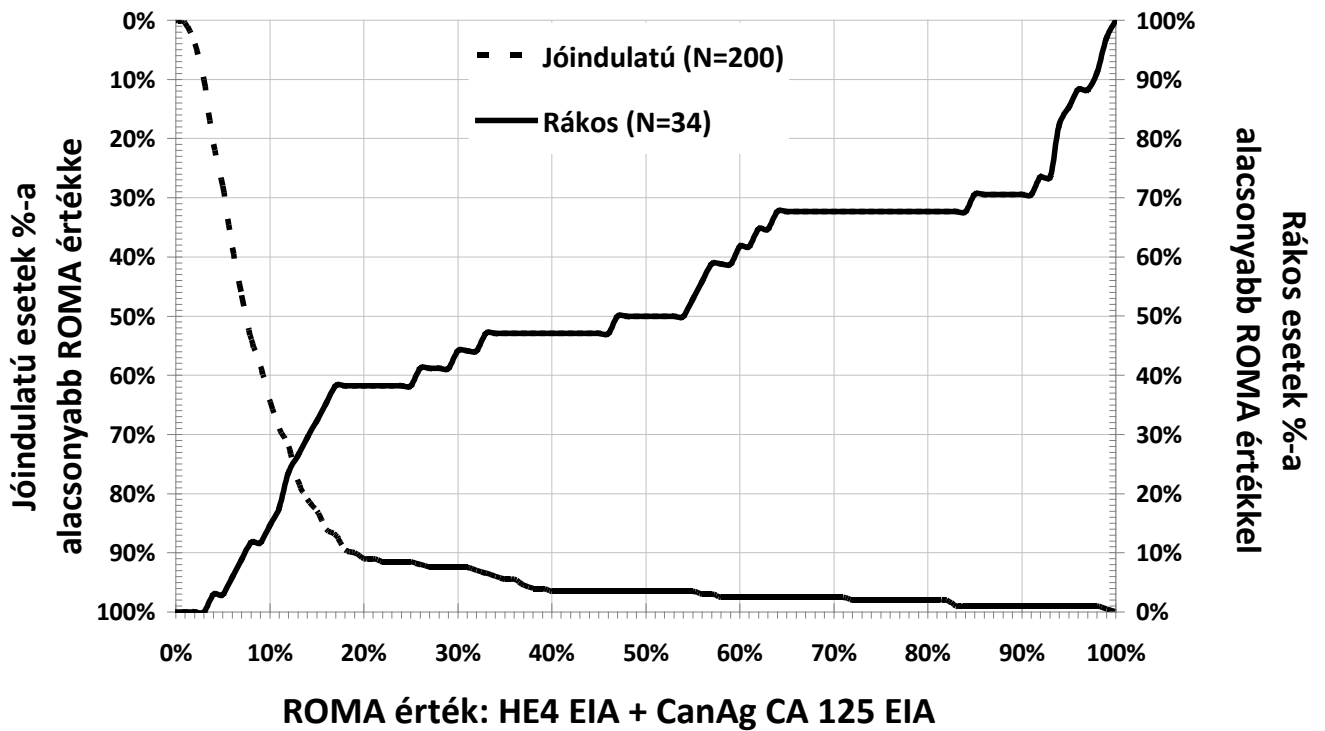
1. ábra: A ROMA értékek halmozott gyakorisági megoszlása a **menopauza előtti** nők esetében. HE4 EIA + ARCHITECT CA 125 II tesztkombináció



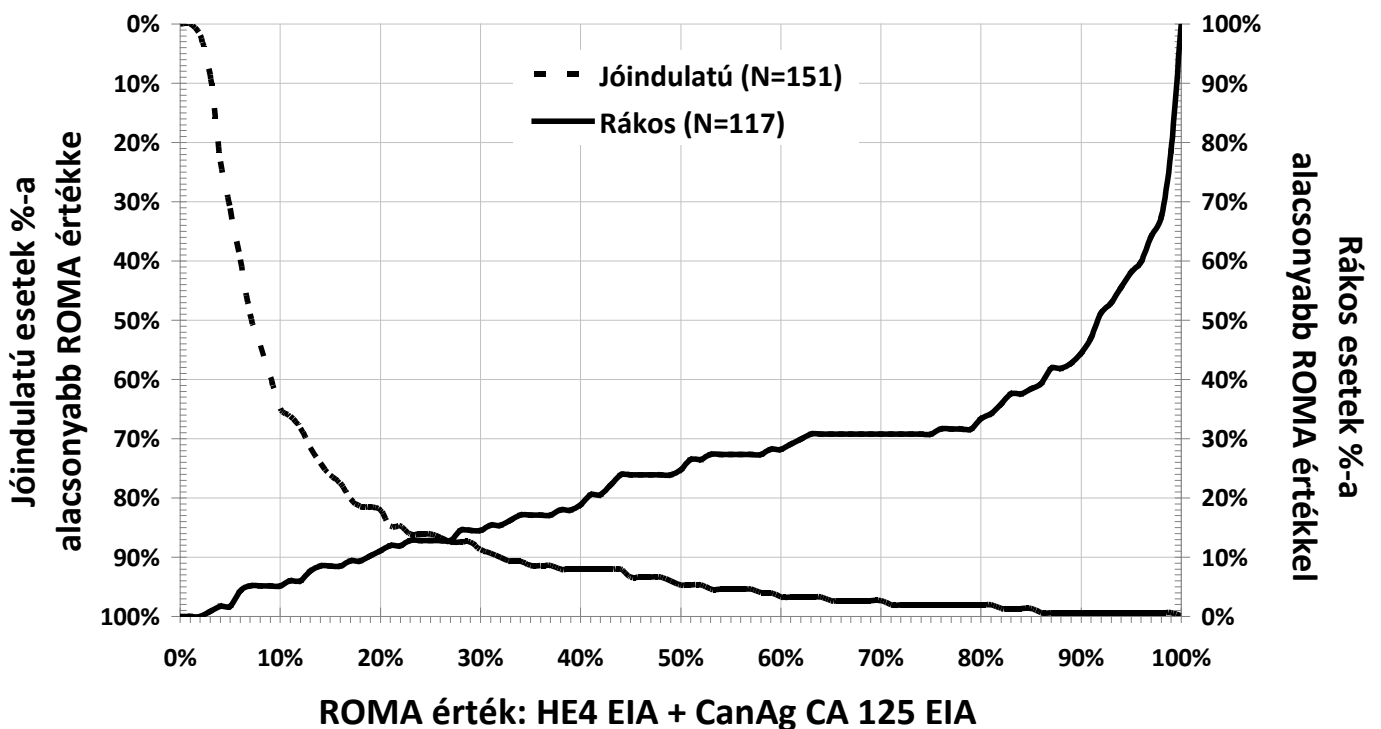
2. ábra: A ROMA értékek halmozott gyakorisági megoszlása a **menopauza utáni** nők esetében. HE4 EIA + ARCHITECT CA 125 II tesztkombináció



3. ábra: A ROMA értékek halmozott gyakorisági megoszlása a **menopauza előtti** nők esetében. HE4 EIA + CanAg CA 125 EIA tesztkombináció



4. ábra: A ROMA értékek halmozott gyakorisági megoszlása a **menopauza utáni** nők esetében. HE4 EIA + CanAg CA 125 EIA tesztkombináció



### **Rétegződés (besorolás) alacsony és magas kockázatú csoportokba**

A petefészekrák kockázati algoritmust használták fel arra, hogy a nőket kockázati csoportokba sorolják az epitheliális a hámszöveti petefészekrák kockázata vonatkozásábanfeltárása érdekében. A következő határértékeket használták a HE4 EIA és az ARCHITECT CA 125 II tesztkombinációra 75%-os specificitásmeghatározottság elérése érdekében:

#### **Menopauza előtti nők**

ROMA érték  $\geq 13,1\%$  = Epitheliális hámszöveti petefészekrák feltárásának magas a kockázata

ROMA érték  $< 13,1\%$  = hámszöveti Epitheliális petefészekrák feltárásának alacsony kockázata

#### **Menopauza utáni nők**

ROMA érték  $\geq 27,7\%$  = hámszöveti Epitheliális petefészekrák feltárásának magas kockázata

ROMA érték  $< 27,7\%$  = hámszöveti Epitheliális petefészekrák feltárásának alacsony kockázata

Az 1. táblázatban az epitheliális a hámszöveti petefészekrák szempontjából magas kockázatú betegek megoszlása látható, akik kismedencei függeléki daganattal jelentkeztek, ahol a 75%-os specificitási meghatározottsági ROMA értéket alkalmaztuk, és ez a táblázat tartalmazza a menopauza előtti és utáni betegcsoportokat külön-külön, kockázati rétegződésben. Az I-IV. stádiumú epitheliális hámszöveti petefészekrákos betegek magas kockázati csoportba sorolásának érzékenysége 94%-os volt, 75%-os specificitásmeghatározottság mellett. A jóindulatú daganatban szenvedő nők 75%-a az alacsony kockázati csoportba került. A pozitív prediktív előrevetítő érték 58%, míg a negatív előrevetítő prediktív érték 97% volt.

**1. táblázat:** Kismedencei Függeléki daganattal rendelkező betegek magas kockázatú csoportja, akik valószínűleg a petefészek epitheliális hámszöveti rákjában (EOC) szenvednek, (ROMA érték kiszámítása HE4 EIA és az ARCHITECT CA125 II teszt kombinációjával)

A menopauza előtti csoport határértéke a magas kockázati csoportba soroláshoz, 75%-os specificitásmeghatározottságnál  $\geq 13,1\%$ .

A menopauza utáni csoport határértéke a magas kockázati csoportba soroláshoz, 75%-os specificitásmeghatározottságnál  $\geq 27,7\%$ .

	<b>Menopauza előtti nők n=234</b>	<b>Menopauza utáni nők n=268</b>	<b>Menopauza előtti &amp; utáni nők együttesen n=502</b>
<b>I-IV. stádiumú EOC &amp; LMP együttesen</b>	26/34 (76%)	108/117(92%)	134/151 (89%)
<b>Alacsony rosszindulatúsági potenciál (LMP)</b>	10/16 (63%)	3/6 (50%)	13/22 (59%)
<b>I-II. stádiumú EOC</b>	6/7 (86%)	24/28 (86%)	30/35 (86%)
<b>I-III.C * *</b>	7/8 (88%)	35/39 (90%)	42/47 (89%)
<b>I-IV. stádiumú EOC</b>	16/18 (89%)	105/111 (95%)	121/129 (94%)

\* Az I-IIIb és IIIc stádiumú (cseplesz- (hashártya) negatív, nyirokcsomó pozitív)

epitheliálishámszöveti petefészekrák

Nem voltak statisztikailag szignifikáns jelentős eltérések a ROMA érték érzékenységében és specifikusságában meghatározottságában akár az ARCHITECT CA 125II tesztet, akár a CanAg CA 125 EIA tesztet használták a jóindulatú betegségek és a rosszindulatú elváltozások hámszöveti petefészekrák elkülönítésére. A CanAg CA125 EIA + HE4 EIA tesztkombináció alkalmazása esetén, a I-IV. stádiumú epitheliális hámszöveti petefészekrákos betegek magas kockázati csoportba sorolásakor az érzékenység 93% volt. A pozitív prediktív érték 57%, a negatív prediktív érték pedig 97% volt. **Megjegyzendő, hogy a magas és az alacsony kockázati csoportokba soroláshoz használt különféle határértékeket attól függően kell meghatározni, hogy melyik CA125 tesztet használják.**

A következő határértékeket alkalmazták 75%-os specifikusság meghatározottság eléréséhez, a CanAg CA125EIA + HE4 EIA tesztkombináció alkalmazásakor:

#### **Menopauza előtti nők**

ROMA érték  $\geq 12,5\%$  = EpitheliálisHámszöveti petefészekrák jelenlétének feltárásának magas a kockázata

ROMA érték  $< 12,5\%$  = EpitheliálisHámszöveti petefészekrák jelenlétének feltárásának alacsony a kockázata

#### **Menopauza utáni nők**

ROMA érték  $\geq 14,4\%$  = EpitheliálisHámszöveti petefészekrák feltárásának jelenlétének magas a kockázata

ROMA érték  $< 14,4\%$  = EpitheliálisHámszöveti petefészekrák feltárásának jelenlétének alacsony a kockázata

A 2. táblázat mutatja az álnegatív értékeket, és az epitheliális petefészekrákban szenvedő betegek százalékos megoszlását az alacsony kockázati csoportban, 75%-os meghatározottság mellett. A hámszöveti petefészekrákos betegek alacsony és magas kockázati csoportokba soroláskor, a ROMA használatával, 75%-os specifitással mellett 6,2%-os teljes álnegatív arány mutatkozott. Az alacsony kockázati csoportba soroltak közül összesen 3 (három) százalékban diagnosztizáltak hámszöveti petefészekrákot.

2. Táblázat: Az alacsony kockázati csoportba sorolt összes eset álnegatív értékei és a hámszöveti petefészekrák százalékos megoszlása a ROMA érték alkalmazásával azoknál, akik kismencedei daganattal jelentkeztek. A menopauza előtti határérték az alacsony kockázati csoportba soroláshoz, 75%-os specifitással mellett  $<13,1\%$ , a menopauza utáni határérték az alacsony kockázati csoportba soroláshoz, 75%-os specifitással mellett  $<27,7\%$ .

Eptheliális Hámszöveti petefészekrák*	Hamis negatív arány (FNR)			Rákbetegségek százaléka az alacsony kockázatú csoportban		
	Hamis negatív rák-betegségek	Rák-betegségek összesen	FNR <sup>b</sup>	Hamis negatív rák- betegsé- gek	Valós pozitív jóindul- atú	(%)
<b>Menopauza előtti</b>	2	18	11,1%	2	149	1,3%
<b>Menopauza utáni</b>	6	111	5,4%	6	113	5,0%
<b>Az összes beteg</b>	8	129	6,2%	8	262	3,0%

\* Alacsony malignitási potenciállal (LMP) rendelkező daganatok nem szerepelnek itt; <sup>b</sup>\*FNR – Hamis negatív / (valódis pozitív + hamis negatív); \* Hamis negatív / (valódis negatív + hamis negatív)

## TELJESÍTMÉNY JELLEMZŐK

### Pontosság

A HE4 teszt pontossága  $\leq 15\%$  összes CV. A tanulmányt a Klinikai Laboratóriumi Szabványok Nemzeti Bizottságának (NCCLS – CLSI) az EP-A2 (22) irányelvében leírtak szerint végezték. Négy szérummintából álló panelt teszteltek, két tétel reagenst használva, két másolatot készítve, a nap két eltérő időpontjában, 20 napon keresztül. Az ebből a tanulmányból származó adatokat az alábbiakban összegezzük\*

Minta	Reagens tétel	Szám	Átlagos kon- centráció (pM)	Futta- táson belüli SD (pM)	Futta- táson belüli CV%	SD összesen (pM)	CV% összesen
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

\*Reprezentatív adatok; az egyes laboratóriumok eredményei eltérhetnek ezektől az adatoktól.

### Feltárási határérték

A HE4 EIA teszt detektálási feltárási határértéke  $\leq 15\text{pM}$ . A detektálási feltárási határérték (LoD) megfelel a 95 % konfidencia megbízhatósági intervallum felső határértékének, és a HE4 antigén legalacsonyabb olyan koncentrációját képviseli, amely a nullától megkülönböztethető. Az NCCLS EP 17-A (23) irányelvét a LoD kísérletek meghatározására használták. Tanulmányt kezdtek, ahol HE4 kalibrátort (A) (nulla) és egészséges alanyok 4 mintáját oldották fel 5pM-re minta oldószerrel, és

ezeket futtatásonként 24 másolattal, 4 futtatásban, két eltérő napon. Az LoD értéket a következőképpen számították ki:

$$\text{LoD (pM)} = 5,0 \text{ pM} \times 1,65 \times \text{SD}_0 + 1,65 \times \text{SD}_5 / (\text{OD}_5 - \text{OD}_0)$$

A HE4 EIA készlet detektálási feltárási határértékének számításakor az eredmény <2,5 pM lett.

### Funkcionális érzékenység

A HE4 EIA teszt funkcionális érzékenysége  $\leq 25\text{pM}$ . Az olyan analizált oldat koncentrációjaként fejezzük ki a funkcionális érzékenységet, ahol a CV 20%. Az NCCLS EP5-A2 (22) irányelvét használtuk fel a funkcionális érzékenység meghatározására szánt kísérletek megtervezésére.

Tanulmányt végeztünk, ahol egy öttagú érzékenységi panelt teszteltünk 2 futásból 4 futásban, húszt eltérő napon, két tétel reagenssel. A HE4 EIA tesztre meghatározott funkcionális érzékenység értékét <5pM-ben határozták meg.

### Regenerálás

A HE4 EIA teszt átlagos regenerálása  $100 \pm 15\%$ . Egy tanulmányban egy beteg-minta ismert HE4 koncentrációit hozzáadták a normál humán szérummintákhoz. A HE4 koncentrációt a HE4 EIA teszt alkalmazásával határozták meg, és az ennek eredményeként létrejövő százalékos regenerációt kiszámították. Ennek a tanulmánynak a reprezentatív adatait összegzi az alábbi táblázat\*

Minta	Belső tesztérték (pM)	Hozzáadott HE4 antigén (pM)	Megfigyelt HE4 tesztérték (pM)	Százalékos regeneráció %
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

A fent látható négy külön kiemelt koncentráció átlagos regenerációját 97%-nak ban állapították megtalálták.

\* Reprezentatív adatok; az egyedi laboratóriumokban az eredmények eltérhetnek ezektől az adatoktól.

\*\* %-os regeneráció=Megfigyelt HE4 koncentráció (pM)/Belső HE4 koncentráció (pM)+ hozzáadott HE4

### Magas dózisú horog („hook”)

A magas dózisú horog olyan jelenség, ahol nagyon magas szintű minták olvashatók a teszt dinamikus skáláján belül. A HE4 EIA tekintetében, semmilyen magas dózisú horog-hatást nem figyeltek meg a legfőbb 300 000 pM HE4 veleszületett antigént tartalmazó minták esetében.

### Oldat linearitás

A HE4 EIA teszt átlagos oldat linearitása  $100 \pm 15\%$ . Tanulmányt folytattak az NCCLS (CLSI) EP6\*A (24) irányelv szerint modellezett HE4 EIA-ról. Emelt HE4 értékeket mutató széruminutákat oldottak HE4 „A” kalibrátorral (zéró). A HE4 koncentrációt az egyes oldatokra meghatározták, és a százalékos (%) regenerációt kiszámították. Ennek a tanulmánynak a reprezentatív adatait összegzi az alábbi táblázat\*

Minta	Végleges oldat tényező	Kapott érték (pM)	Várt érték (pM)	Százalékos regeneráció ** (%)
1	Oldatlan	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	Oldatlan	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	Oldatlan	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

A fent bemutatott három oldott minta átlagos regenerációja = 101%.

\* Reprezentatív adatok; az egyes laboratóriumokban kapott értékek eltérhetnek ezektől az adatoktól.

\*\*%-os regeneráció = HE4 kapott koncentrációja x Oldási tényező / Oldatlan HE4 koncentráció

### Analitikai specifikusság

A HE4 EIA teszt átlagos tesztspecifikussága  $100 \pm 15\%$ . Regenerációs tanulmányokat folytattak a következő vegyületeket a megadott koncentrációban tartalmazó szérumok összehasonlítására, a kontroll szérumokkal. Az NCCLS EP7\*A (25) irányelvét alkalmazták a zavarkísérletek

megtervezésére. A következő anyagokat és koncentrációkat tesztelték, és úgy találták, hogy nem okoznak zavart a tesztben

<b>Belső szérum zavarok</b>	<b>Tesztkoncentráció</b>
Trigliceridek	30 mg/ml
Billirubin	0,2 mg/ml
Hemoglobin	10 mg/ml
Fehérje összesen	120 mg/ml
<b>Kemoterápiás gyógyszer zavarok</b>	<b>Tesztkoncentráció</b>
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 µg/ml

#### **Potenciálisan zavart okozó klinikai körülmények**

A HE4 EIA tesztet Hama-t és Rheumatoid faktort (RF) tartalmazó mintákkal értékelték, a teszt specifikusságának meghatározottságának a további értékelésére. Öt HAMA-pozitív és öt RF-pozitív mintát értékelték a %-os regenerációra, HE4 antigént fecskendezve az egyes mintákba, kb. 50 és 450 pM értékben. Az átlagos regenerációs eredményeket a következő táblázat\* összegzi.

<b>Klinikai feltétel</b>	<b>Minták száma</b>	<b>Átlagos %-os regeneráció</b>
HAMA	5	101
RF	5	95

\* Reprezentatív adatok; az egyes laboratóriumok eredményei eltérhetnek ezektől az adatoktól.

#### **SZAVATOSSÁG**

Az itt bemutatott teljesítmény-adatokat a leírt teszteljárással kaptuk. A Fujirebio Diagnostics által nem ajánlott bármilyen változtatás, vagy módosítás az eljárásban befolyásolhatja az eredményeket, amely esetben a Fujirebio Diagnostics elhárít magától mindenfajta kifejezett, beleérthető, vagy kötelező szavatosságot, a kereskedelmi forgalomba hozatal és egy célnak való megfeleléség beleérthető szavatosságát is beleértve.

## REFERENCIÁK

1. Israeli O, Goldring-Aviram A, Rienstein S, Ben-Baruch G, Korach J, Goldman B, Friedman E. In silico chromosomal clustering of genes displaying altered expression patterns in ovarian cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;160:35-42.
2. Bouchard D, Morisset D, Bourbonnais Y, Tremblay GM. Proteins with whey-acidic-protein motifs and cancer. *Lancet Oncol* 2006;7:167-174.
3. Bingle L, Singleton V, Bingle CD. The putative ovarian tumour marker gene HE4 (wfdc2), is expressed in normal tissues and undergoes complex alternative splicing to yield multiple protein isoforms. *Oncogene* 2002;21:2768-2773.
4. Kirchhoff C, Habben I, Ivell R, et al. A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular protease inhibitors. *Biol Reprod* 1991;45:350-357.
5. Kirchhoff C. Molecular characterization of epididymal proteins. *Rev Reprod* 1998;3:86-95.
6. Galgano MT, Hampton GM, Frierson HF Jr. Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues. *Mod Pathol* 2006;19:847-853.
7. Drapkin R, von Horsten HH, Lin Y, Mok SC, Crum CP, Welch WR, Hecht JL. Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res* 2005;65:2162-2169.
8. Hough CD, Sherman-Baust CA, Pizer ES, Montz FJ, Im DD, Rosenshein NB, Cho KR, Riggins GJ, Morin PJ. Large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer. *Cancer Res* 2000;60:6281-6287.
9. Schummer M, Ng WV, Bumgarner RE, Nelson PS, Schummer B, Bednarski DW, Hassell L, Baldwin RL, Karlan BY, Hood L. Comparative hybridization of an array of 21,500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas. *Gene* 1999;238:375-385.
10. Gilks CB, Vanderhyden BC, et al. Distinction between serous tumors of low malignant potential and serous carcinomas based on global mRNA expression profiling. *Gynecol Oncol* 2005;96:684-694.
11. Hellstrom I, Raycraft J, et al. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian cancer. *Cancer Res* 2003;63:3695-3700.
12. Moore RM, Brown AK, Miller MC, et al. The use of multiple novel tumor markers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol* 2008;108:402-408.
13. Bray F, Loos AH, Tognazzo S, La Vecchia C. Ovarian cancer in Europe: Cross-sectional trends in incidence and mortality in 28 countries, 1953-2000. *Int J Cancer* 2005;113(6):977-90.
14. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. Ovarian Cancer: Screening, treatment and follow-up. *Gynecol Oncol* 1994;55:S4-14.
15. ACOG Practice Bulletin. Clinical Management Guideline for Obstetrician-Gynecologists. Management of Adnexal Masses. *Obstet Gynecol* 2007;110:201-213.
16. Finkler NJ, Benacerraf B, Lavin PT, Wojciechowski C, Knapp RC. Comparison of serum CA 125, clinical impression and ultrasound in the preoperative evaluation of ovarian masses. *Obstet Gynecol* 1988;72:659-64.

17. Maggino T, Gadducci A, D'Addario V, et al. Prospective Multicenter Study on CA 125 in postmenopausal pelvic masses. *Gynecol Oncol* 1994;54:117-123.
18. Roman LD, Muderspach LI, Stein SM, et al. Pelvic Examination, Tumor marker level, and Gray-Scale and Doppler Sonography in the prediction of pelvic cancer. *Obstet Gynecol* 1997;89:493-500.
19. DePriest PD, Shenson D, Fried A, et al. A morphology index based on sonographic findings in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1993;51:7-11.
20. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Exposure to Blood Borne Pathogens.
21. US Department of Health and Human Services: Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories: 4th Edition Washington DC: US Government Printing Office May, 1999.
22. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI), Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline – Second Edition. EP5-A2 (2004).
23. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI), Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline. EP17-A (2004).
24. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI), Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. EP6-A.
25. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI), Interference Testing in Clinical Chemistry, Approved Guideline, EP7-A.

# JEGYZŐKÖNYV ŰRLAP

HE4 EIA REF 404-10

Az alkotóelemeket közvetlenül használat előtt készítse elő. Az Utasítások szerint alkalmazza a mosó és inkubációs feltételeket.

**Megjegyzés: A tesztet csak 20-25 C° közötti hőmérsékleten végezzék, pontos eredmények érdekében.**

Lépés	Ampulla/lemez	Eljárás																																							
1. Készítse elő a HE4 kalibrátorokat	CAL HE4 B, C, D, E, F	Adjon 1 ml desztillált, vagy deionizált vizet az egyes ampullákba, és óvatosan keverje össze. Hagyja állni legalább 15 percig. MEGJEGYZÉS: Az egyes kalibrátorok pontos koncentrációja a címkén szerepel. Regenerált stabilitás: 4 hét 2-8 C°-n.																																							
Készítse elő a HE4 kontrollokat	CONTROL HE4 1, 2																																								
Készítsen mosóoldatot	WASHBUF 25X																																								
Készítsen nyomkövető izotópos munkaoldatot	CONJ Anti-HE4 DIL CONJ																																								
		Oldjon fel 50 ml mosó koncentrátumot 1200 ml desztillált, vagy deionizált vízzel.																																							
		Keverjen 50 µl nyomkövető izotópot, HRP anti-HE4-et 1 ml nyomkövető izotóp oldószerezrel, szalagonként:																																							
		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Szalagok száma</th> <th>Nyomkövető izotóp, HRP Anti-HE4 (µL)</th> <th>Nyomkövető izotóp oldószerez (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>	Szalagok száma	Nyomkövető izotóp, HRP Anti-HE4 (µL)	Nyomkövető izotóp oldószerez (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
Szalagok száma	Nyomkövető izotóp, HRP Anti-HE4 (µL)	Nyomkövető izotóp oldószerez (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. Mosás	MICROPLA	Mosson ki minden egyes üreget mosóoldattal. Alkalmazzon kézi, vagy automata mosót.																																							
3. Adja hozzá a kalibrátorokat, kontrollokat és mintákat	CAL HE4 A, B, C, D, E, F CONTROL HE4 1, 2	25 µl minden egyes üregbe																																							
4. Adjon hozzá Biotin Anti-HE4-et	BIOTIN Anti-HE4	100 µl minden egyes üregbe																																							
5. Inkubáljon	MICROPLA	1 óra rázás 20-25 C°-n.																																							
6. Mosás	MICROPLA	Mosson ki minden egyes üreget mosóoldattal. Alkalmazzon kézi, vagy automata mosót.																																							
7. Adja hozzá a nyomkövető izotóp munkaoldatot.	TRACER WORKING SOLUTION	100 µl minden egyes üregbe.																																							
8. Inkubáljon	MICROPLA	1 óra rázás 20-25 C°-n.																																							
9. Mosás	MICROPLA	Mosson ki minden egyes üreget mosóoldattal. Alkalmazzon kézi, vagy automata mosót.																																							
10. Adjon hozzá TMB HRP táptalajt	SUBS TMB	100 µl minden egyes üregbe.																																							
11. Inkubáljon	MICROPLA	30 perc rázás 20-25 C°-n																																							
12. Olvassa le a felszívást	MICROPLA	620 m																																							
12 változat. Adjon hozzá blokkoló oldatot	STOP	100 µl minden egyes üregbe																																							
13 változat. Keverje össze	MICROPLA	Hagyja keveredni 20-25 C°-n																																							
14 változat. Olvassa le a felszívást	MICROPLA	Olvassa le 405 nm-nél 15 percen belül																																							



Fujirebio Diagnosztikai AB  
Majnabbeterminalen  
SE 414 55 Göteborg  
Svédország  
Telefonszám +46 31-85 70 30  
Fax + 46 31-85 70 40  
info@fdab.com  
www.fdab.com