



HE4 测定试剂盒（酶联免疫吸附法）

产品编号：404-10



产品使用说明书
2008 年 02 月

酶联免疫吸附试剂盒
规格：96 人份

	有效期至		体外诊断医疗器械
	批号		温度范围
	生产日期		使用说明
	目录号		生物危险性
	制造商		试剂盒组成
	包含有<96>个测试		来源于小鼠
			来源于人类

用途

HE4 EIA 是酶联免疫方法定量测定人血清中 HE4 含量的试剂盒。本测定试剂盒可用于辅助监控对侵袭性上皮细胞型卵巢癌患者的治疗情况。连续监控患者 HE4 应与其它临床方法结合用于卵巢癌的监测。

本测定试剂盒也可进一步与 ARCHITECT CA 125 II 或 CanAg CA125 EIA 试剂盒（用于体外诊断）联合使用，从而可辅助对绝经前和绝经后的盆腔肿瘤妇女进行上皮细胞型卵巢癌的风险评估。测定结果必须按照临床管理规范的要求，结合其他方法的结果进行解释。

概述

人附睾蛋白 4 (HE4) 属于乳清酸性 4-二硫化中心 (WFDC) 蛋白家族, 具有疑似胰蛋白酶抑制剂的特性。此家族中的其它蛋白还包括 SLPI, Elafin 和 PS20 (WFDC1) (1, 2)。HE4 基因编码一段长度为 13kD 的蛋白, 尽管在其成熟的糖基化形式时, 此蛋白大概为 20kD~25kD, 并且包括含有两个 WFDC 结构域的一条单链 (3)。HE4 首先在附睾远端的上皮中被发现, 并且最初认为它是一种与精子成熟相关的蛋白酶抑制剂 (4, 5)。一直以来有报道认为 HE4 在多个正常组织 (包括呼吸道和生殖道组织, 以及卵巢癌组织) 的上皮内均有所表达 (6-10)。不仅在细胞水平上有所表达, 分泌型 HE4 已经在卵巢癌患者的血清中检测到有高水平表达。在一项关于卵巢癌患者与良性状态下的健康者的病例/对照对比性研究中, Hellström 等发现 HE4 检测卵巢癌在特异性水平为 96% 时具有 67% 的敏感性 (11)。在随后一项对卵巢癌相关的大量生物标志物的评价研究中, HE4 检测卵巢癌时具有最高的灵敏度, 尤其是在疾病的早期阶段。该项研究中还发现, HE4 与 CA125 联合使用比单独使用任一种, 对恶性肿瘤都具有更为准确的预测性, 其灵敏度和特异性分别为 76% 和 95% (12)。

在全世界范围内, 卵巢癌是导致妇女癌症相关死亡中的第四大常见原因。在欧洲, 每 100, 000 名妇女的死亡率介于 3.6~9.3 之间 (13)。卵巢癌的症状与附件肿瘤的存在具有相关性, 并且通常是模糊的和非特异性的。对附件肿瘤进行诊断评估的主要目的是为了确定它是良性还是恶性。在美国, 估计大概有 5%~10% 的妇女在一生中因为疑似卵巢肿瘤而需要进行外科手术, 在这些妇女中有 13%~21% 会被诊断为卵巢恶性肿瘤 (14)。美国妇产科协会在 2007 年出版的实用通告中提到以下内容: “由在卵巢癌患者的治疗上具有先进的经验和技术的内科医生 (例如妇科肿瘤医生) 所进行治疗的卵巢癌妇女总体存活率高于其他没经验者。” (15)。既然大多数附件肿瘤是良性的, 对于采取正确的诊断方法, 在手术前确定患者是否具有卵巢恶性肿瘤的高风险性是非常重要的 (15)。自从 1988 年初次报道后, 临床检查, 血清 CA 125 和超声, 以及 CT 扫描, MRI 和 CT/PET 都已经成为确定附件肿瘤是否疑似恶性肿瘤的标准 (16)。尽管各种文献和论著都在描述哪一方式将会更为准确, 但体格检查, CA 125 和影像检查的联合使用将会提供最高的阳性预测率 (17-19)。为了实现对盆腔肿瘤患者的分类治疗, 将 HE4 测定试剂盒 (酶联免疫吸附法) 与 ARCHITECT CA 125 II 试剂盒或 CanAg CA125 EIA 联合使用, 可以帮助评估患上皮细胞型卵巢癌的风险性。测定结果必须与其它临床管理规范规定的方法结合进行解释。HE4 EIA 测定试剂盒的另外一个用途是: 对侵袭性上皮细胞型卵巢癌患者的治疗反应的辅助监控。测定结果应与其它卵巢癌治疗监控的临床方法联合使用。

实验原理

HE4 EIA 是一种非竞争性的夹心酶联免疫方法。它通过两种小鼠单克隆抗体, 即 2H5 和 3D8, 直接针对于 HE4 结构域中 C-WFDC 的两个抗原决定簇位点。操作时将标准品、质控品及患者标本和生物素标记的抗 HE4 鼠单克隆抗体 (MAb) 2H5 滴加至链霉亲和素包被的微孔板中一起温育。在温育过程中, 标准品或患者标本中存在的 HE4 抗原通过生物素标记的抗 HE4 单克隆抗体 (MAb) 吸附到链霉亲和素包被的微孔板上。随后清洗微孔

板,加入 HRP 标记的抗 HE4 单克隆抗体 3D8 进行温育反应。经过第二次清洗后,向每孔加入底物/显色缓冲液(过氧化氢和 3,3',5,5' 四甲基联苯胺)使其发生酶促反应。在酶促反应过程中如果抗原存在则会显示为蓝色。其颜色的深度与标本中 HE4 的含量呈正比。微板孔中颜色的深度可用酶标仪在 620nm (也可选择加入终止液后在 405 nm)进行检测。

每次试验后均需根据每个标准品的浓度与其相对应的吸光度数值绘制标准曲线,患者标本中的 HE4 浓度即可从标准曲线上读出。

试剂盒组分

- HE4 测定试剂盒(酶联免疫吸附法)包含 96 个测试。
- 试剂盒的有效期标示于包装盒外标签上。
- 不要使用过期的试剂盒。
- 不同批号的试剂不要混用。
- 试剂盒应在 2℃~8℃贮存,切勿冷冻。
- 使用后应按照说明,用原包装将试剂密封,2℃~8℃保存。在没有被污染的情况下,已打开包装的试剂的稳定性如下表所示:

组分	数量	第一次开封后试剂的贮存和稳定性
微孔板		
链霉亲和素包被的微孔板	1 块	2℃~8℃贮存至微孔板上标示的失效期
12×8, 链霉亲和素包被的微孔板条, 可拆分。打开包装后, 应立即将未使用的微孔板条放入装有干燥剂的铝箔袋中, 再次密封并保持干燥。		
标准品		
HE4	A	
HE4 标准品 A	1×8mL	2℃~8℃贮存至瓶签上标示的失效期
含有牛血清白蛋白和惰性黄色染料的磷酸盐缓冲溶液, 并且以非叠氮化合物作为防腐剂。直接使用。此标准品也可用于稀释患者的标本。		

稀释缓冲液	CONJ
-------	------

示踪液稀释缓冲液

1×15mL

2℃～8℃贮存至瓶签所标示的有效期

示踪液稀释缓冲液为磷酸盐缓冲液（pH 7.2），含有牛血清白蛋白，封闭剂，清洁剂，惰性蓝色染料以及非叠氮钠化合物作为防腐剂。直接使用。

底物液	TMB
-----	-----

TMB HRP-底物液

1×12mL

2℃～8℃贮存至瓶签所标示的有效期

TMB HRP-底物液含有过氧化氢缓冲液和 3,3',5,5' 四甲基联苯胺（TMB）。直接使用。

终止液

终止液

1×15mL

2℃～8℃贮存至瓶签所标示的有效期

终止液含有 0.12 M 盐酸。直接使用。

清洗缓冲液	25×
-------	-----

清洗浓缩液

1×50mL

2℃～8℃贮存至瓶签所标示的有效期

此溶液为含有吐温 20 的 Tris-HCL 缓冲液。含有 Germall II 作为防腐剂。使用之前用蒸馏水或去离子水进行 25 倍稀释。

不稳定性说明

TMB HRP-底物液应该为无色或呈很浅的淡蓝色。如果溶液为蓝色则提示试剂已被污染，则应丢弃。

警示和注意事项**仅供体外诊断使用：**

- 仅供专业使用。
- 请按照试剂盒包装内的使用说明书进行操作。否则，则不能保证此测试结果的可靠性。
- 患者标本应视为具有潜在生物传染性材料进行处理。对于人源性试剂和人体标本，建议应根据血源性病原体的 OSHA 标准进行处理（20）。对于含有或疑似含有传染性物质的材料应使用生物安全 2 级水平（21）或其它适当的生物安全措施。

- 参照当地的废物处理原则进行废物处理。

注意事项

用于制备人源性试剂的材料都已经过检测，结果显示抗 HIV-1 抗体和抗 HIV-2 抗体、抗 HCV 抗体、乙型肝炎表面抗原（HBsAg）均为阴性。但是没有任何一种方法能完全排除血源性疾病的存在，因此试剂盒中的人源性组分都应被视作潜在传染源。

标本的收集与处理

HE4 EIA 测定试剂盒（酶联免疫吸附法）用于检测血清标本（包括从分离管中收集的血清（SST））。尚未证实血浆和其它体液对 HE4 测定试剂盒（酶联免疫吸附法）有效。通过静脉穿刺采血，同时按照采血管制造商的程序文件分离血清。当评价系列标本时，应在全过程中使用相同类型的标本。

标本在检测之前可置于 2℃~8℃ 贮存 3 天。长期保存标本可将其置于 -40℃ 或更低温度。

将冷冻标本置于室温后，在进行分析之前应轻轻翻转试管多次，使其充分混匀。含有颗粒物的标本应在使用之前以 10,000×g 离心 10 分钟，以去除解冻过程中可能产生的任何颗粒物。

操作程序

本试剂盒未提供，但为试验必需的材料：

1. 微板振荡器

振荡强度应为中度至强度。大概 700-1100 次/分钟。

2. 洗板机

可执行 1 次，3 次和 6 次清洗循环的自动微孔板清洗机，并且其最小加样容积为 350 μL/孔/清洗循环。

如果未使用全自动洗板机，则推荐使用一次性塑料吸头的可加样 350 μL 的 8 道移液器。

3. 酶标仪

波长为 620 nm 和/或 405 nm，可读吸光度范围为 0 ~3.0 的酶标仪。

4. 精密移液器

使用一次性塑料吸头的微升移液器。推荐使用一次性塑料吸头的 100 μL 的 8 道精密移液器或分配器，但非必需。用于分配毫升容积的移液器。

5. 蒸馏水或去离子水

用于复溶 HE4 标准品和 HE4 质控品，以及用于制备稀释清洗缓冲液。

操作程序注意事项

1. 必须充分理解产品说明书，从而确保能够正确使用 HE4 测定试剂盒（酶联免疫吸附法）。试剂盒中所提供的一套试剂是作为整体使用的。不同批号试剂盒不可混用。不要使用超过试剂盒外包装上所标示的有效期的试剂盒。
2. 使用之前应将试剂平衡至室温（20℃至 25℃）。冷冻标本在解冻后应轻轻并且完全混匀。为了保证结果的准确性，实验操作应在室温（20℃至 25℃）进行测试。
3. 在开始对标准品和患者标本进行加样之前，建议在微孔板条上作标记，以便在实验中或实验完成后能清晰的区分各标本。
4. 为了从固相结合抗体-抗原复合物中区分出结合的和未结合的抗原和试剂，对于有效而完全的清洗的要求是酶联免疫吸附方法中最重要的步骤之一。为了确保有效的清洗，应确保在每一次清洗循环中所有板孔均被完全注满至板孔上缘，同时清洗缓冲液以适当的流速进行分配，以及在清洗循环之间或清洗循环之后对各板孔的吸液是完全的，如果残留有液体，则将微孔板翻转并在吸水纸上仔细拍打。
—自动板条洗板机：按照制造商的仪器使用说明定期进行清洁和保养，并且在每次温育之前和温育之后均按照所要求的清洗次数进行清洗。吸液/清洗装置内不应长时间滞留清洗液，因为可引起针头堵塞从而导致液体加样和吸液不畅。
5. TMB HRP-底物液非常容易被污染。为了使 TMB HRP-底物液保持最佳稳定性，应从 TMB HRP 底物液试剂瓶中倒出所需容量至洁净容器中或一次性塑料盘以避免试剂污染。确保使用洁净的一次性塑料吸头（或分配器吸头）吸取 TMB HRP 底物液。
6. 在处理标本和试剂过程中，确保使用洁净的一次性塑料吸头和正确的精密性加样技术。为了避免携带污染，应使移液器的吸头不要触及液体表面。在对标本和 TMB HRP 底物液进行加样时，正确的加样技术尤为重要。

试剂的制备	已制备试剂的稳定性
HE4 标准品 B-F	2℃～8℃可保存 4 周 -20℃或更低温度可保存 4 个月
向各试剂小瓶中精确加入 1.0mL 蒸馏水或去离子水。静置至少 15 分钟，使用前轻轻混匀。注：各标准品的浓度均标示于瓶签上，并且据此进行结果的计算。	
HE4 质控品 1 和 2	2℃～8℃可保存 4 周 -20℃或更低温度可保存 4 个月
向各试剂小瓶中精确加入 1.0mL 蒸馏水或去离子水并轻轻混匀。静置至少 15 分钟，用前轻轻混匀。注：各质控品的浓度范围均标示于瓶签上。	
清洗缓冲液	2℃～25℃下在密闭容器中可保存 2 周
将 50mL 浓缩的清洗缓冲液倒入洁净的容器中，加入 1200mL 蒸馏水或去离子水，即 25 倍稀释后则为所需	

的清洗缓冲液。

示踪工作液

2℃~8℃在密闭容器中可保存 4 周

根据所需要的量制备示踪工作液（见下表所示）。每条微孔板条需要 50 μL 示踪液，HRP 标记的抗 HE4 抗体和 1mL 示踪缓冲液混合。

板条数	示踪液，HRP 标记的 HE4 抗体 (μL)	示踪缓冲液 (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

确保使用洁净的塑料瓶或玻璃瓶制备示踪工作液。

替代方法：将示踪液（HRP 标记的 HE4 抗体）倒入示踪缓冲液小瓶中并轻轻混匀。应确保将示踪液全部倒入，这样 HRP 标记的 HE4 抗体就全部转移至示踪稀释液试剂瓶中。

注：已稀释的示踪工作液可于 2℃~8℃存放 4 周。不要配制多于在此期间所能使用的示踪工作液，并且确保正确的贮存方法。

实验流程

每次测试均应复孔检测各标准品，质控品和未知的患者标本。每次检测均应绘制标准曲线。在检测之前应将所有的试剂和血清标本均平衡至室温（20℃~25℃）。

1. 开始制备标准品 B-F，质控品 1 和 2，清洗缓冲液及示踪工作液。使用洁净容器是非常重要的。仔细按照使用说明书进行操作。
2. 将所需的微孔板条移至板条架上（立即将剩余的未使用的板条放回含有干燥剂的铝箔袋中并仔细密封好）。用清洗缓冲液清洗每条板条一次。不要清洗 30 分钟内不会使用的板条。
3. 按照以下的加样方案分别将 25 μL HE4 标准品（CALA, B, C, D, E 和 F），HE4 质控品（C1, C2）及患者标本（未知浓度—Unk）加样至微孔中。

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

4. 使用 100 μ L 精密移液器（或 8 道 100 μ L 精密移液器）吸取 100 μ L 生物素标记的 HE4 抗体加入每一孔中。
为了避免携带污染，不要使精密移液器的吸头触及液体的表面。
5. 在微孔板振荡器上持续振荡，室温（20℃～25℃）温育反应 1 小时（ $\pm$ 10 分钟）。
6. 在第一次温育后将孔内液体吸干，随后清洗 3 次。按照操作程序注意事项中步骤 4 所描述的清洗方法进行。
7. 同操作程序注意事项的步骤 4，每孔中加入 100 μ L 示踪工作液。
8. 在微孔板振荡器上持续振荡，室温（20℃～25℃）温育反应 1 小时（ $\pm$ 5 分钟）。
9. 在第二次温育后将孔内液体吸干，随后清洗 6 次。按照操作程序注意事项中步骤 4 所描述的清洗方法进行。
10. 使用步骤 4 所描述的相同的加样技术，每孔中加入 100 μ L TMB HRP-底物液。
快速加入 TMB HRP-底物液，而且从第一孔到最后一孔的加液时间不要超过 5 分钟。
11. 在微孔板振荡器上持续振荡，避光室温（20℃～25℃）温育反应 30 分钟（ $\pm$ 5 分钟），。
12. 立即在酶标仪上测定 620nm 的吸光度。

替代方法

如果实验室的酶标仪不能在 620nm 进行读数，可选择以下步骤测定吸光度：

替代步骤 12. 加入 100 μ L 终止液，混匀。15 分钟内在酶标仪选择 405nm 测定吸光度。

测量范围

HE4 EIA 测定试剂盒（酶联免疫吸附法）的测量范围为 15pM～900pM。如果实际 HE4 的浓度高于此测量范围，则推荐在进行分析之前使用 HE4 标准品 A 稀释标本后再检测（见“对稀释标本的结果计算”）。

质量控制

为确保每次检测结果的有效性，每次实验都应使用 HE4 质控品 1 及质控品 2。靶值范围均标示在试剂瓶的标签上。

如果满足下列条件，则认为 HE4 测试结果是有效的：

— 质控品复孔检测结果的平均值在所标明的范围内。

-- 标准品 B-F 和质控品的 2 次重复检测结果的 CV 值不应超过 15%。

-- 标准品 A（零浓度标准品）的 2 次重复检测结果之间的差值不应超过 0.06 OD。

如果检测结果显示标准品和质控品的结果无效，则需要对试剂，移液器的准确性，洗板机和酶标仪的性能进行全面的检查，并且重复进行检测。各实验室也可建立自己的不同水平的血清盘作为内部质控品，以确保每次检测结果的精确性。

参考物质

由于没有适合于 HE4 抗原的通用参考物质，HE4 EIA 测定试剂盒中的标准品参照生产者内部标准。

结果计算

如果使用有数据处理程序的酶标仪，则参考酶标仪的使用手册，并且根据各 HE4 标准品瓶签所标示的浓度值建立程序。

推荐采用下列方法之一进行 HE4 结果的自动计算：

- 3 次方拟合曲线法，标准曲线应包括标准品 A（数值为 0pM）。
- 点对点内插估算法，标准曲线应包括标准品 A（数值为 0pM）。
- 二项式拟合曲线法，标准曲线应包括标准品 A（数值为 0pM）。

注：不能采用 4 参数或线性回归的计算方法。

对于手工计算方法：用 HE4 标准品的浓度（pM）与其对应的吸光度（A）作标准曲线。

则每个患者标本中未知的 HE4 浓度可根据其吸光度平均值从标准曲线上读出。

对稀释标本结果的计算

如果初次检验标本的 HE4 浓度值高于 900pM，则需要用 HE4 标准品 A 按 1/10 或 1/100 进行稀释以获得准确的标本浓度值。

-- 1/10 稀释=50 μL 标本+450 μL HE4 标准品 A

-- 1/100 稀释=50 μL 1/10 稀释标本+450 μL HE4 标准品 A

由此可计算出原标本的 HE4 浓度值：

-- 1/10 稀释：10×测定值

-- 1/100 稀释：100×测定值

用于评估绝经前和绝经后的盆腔肿瘤妇女患有上皮细胞型卵巢癌风险的恶性卵巢癌计算公式（ROMA）的风险预测指数（PI）的计算

对于绝经前妇女和绝经后妇女的预测指数的计算分别用下面所述的方程式（1）和方程式（2）计算预测指数（PI）。为了计算 PI，从 HE4 EIA 测定试剂盒和 ARCHITECT CA125 II 测定试剂盒或 CanAg CA125 EIA 中获

得的测定值根据此妇女的绝经状态而分别输入至下面各适用的算术方程式中。

(1) 绝经前妇女

预测指数 (PI) = $-12.0 + 2.38 \times \text{LN} [\text{HE4}] + 0.0626 \times \text{LN} [\text{CA 125}]$

(2) 绝经后妇女

预测指数 (PI) = $-8.09 + 1.04 \times \text{LN} [\text{HE4}] + 0.732 \times \text{LN} [\text{CA 125}]$

ROMA 值的计算

为了计算 ROMA 值 (即预测概率), 则将计算出的预测指数 (PI) 值输入至下列方程式 (3) 中:

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

PI 和 ROMA 计算的有效性可使用下面的举例:

绝经状态	HE4 (pM)	CA 125 (U/mL)	PI 的计算	PI	ROMA (%)
绝经前	37.5	74.9	$-12.0 + (2.38 \times 3.624) + (0.0626 \times 4.316)$	-3.10388	4.29%
绝经前	386.6	21.8	$-12.0 + (2.38 \times 5.957) + (0.0626 \times 3.082)$	2.371517	91.5%
绝经后	66.7	11.3	$-8.09 + (1.04 \times 4.200) + (0.732 \times 2.425)$	-1.94683	12.5%
绝经后	383.1	22.7	$-8.09 + (1.04 \times 5.948) + (0.732 \times 3.122)$	0.381799	59.4%

测试的局限性

已确诊卵巢癌的患者可能与健康妇女的 HE4 测定值处于相同的范围。卵巢癌的一般常见组织学类型, 例如粘蛋白或生殖细胞肿瘤, 很少表达 HE4, 因此不推荐 HE4 用于监控患有已知粘蛋白型或生殖细胞型卵巢癌患者 (7)。相反地, 在非恶性疾病的个体也可见 HE4 抗原水平升高。因此, HE4 的浓度水平不能用于判断恶性疾病存在或不存在的绝对证据, 也不应用于癌症的筛查。在疾病的诊断和患者的治疗过程中, HE4 的检测结果应与其它诊断检测手段联合使用, 同时 HE4 测试也不能取代任何已建立的临床检查。

对恶性卵巢癌计算公式的风险评估规则尚未证明对下列人群有效: 曾经进行治疗的恶性疾病患者, 正在进行化疗的患者以及年龄低于 18 岁的患者。

未按照说明使用 HE4 测定试剂盒和/或 Architect CA 125 II 测定试剂盒, 或者结果计算时出现错误都可导致不准确的风险评估和对患者的不正确处理。特别地, 测试的假性较低结果可导致做出患者处于患有上皮细胞型卵巢癌低风险的诊断, 这会将患者归类至更低层次的医护水平。只使用此测试结果, 而不考虑其它实验室检查, 影像研究和临床评估都会引起风险。

患者标本中的抗-试剂抗体 (人抗小鼠抗体 (HAMA) 或嗜异性抗体) 可能偶尔会干扰检测, 尽管在缓冲液中含有特异性阻断试剂。

测试必须在温度受控的环境中完成, 因为在超过所推荐的温度范围 (20°C~25°C) 下进行温育可能会引起假性较低结果。

检测结果的期望值

对 1147 份标本进行 HE4 水平的测定分布见下表所示：

HE4 测定值的分布					
	个体数量	0~150 pM	(150.1~300) pM	(300.1~500) pM	>500 pM
健康者					
妇女（绝经前）	76	72	3	0	1
妇女（绝经后）	103	97	5	0	1
良性状态					
妊娠	22	21	1	0	0
良性妇科疾病	347	324	18	1	4
其它良性疾病	108	82	8	7	11
高血压/心力衰竭	96	75	16	2	3
癌症					
卵巢癌	127	27	18	21	61
乳腺癌	46	40	4	2	0
肺癌	50	29	15	6	0
子宫内膜癌	116	86	15	4	11
胃肠癌	56	47	8	0	1

在本研究中，94.4%的健康女性个体的 HE4 测试值位于或低于 150pM。

推荐每个实验室根据相关人群建立自己的参考值范围。

对确诊为卵巢癌患者的疾病状态的监控

HE4 EIA 测定试剂盒作为辅助监控卵巢癌患者的疾病状态的有效性是通过评价从 80 名患者的系列血清标本中 HE4 水平的变化与疾病状态的变化相比较而确定的。我们进行了一项涉及总共有 354 个观察配对的研究，其中每名患者平均进行 4.4 项观察。HE4 的阳性变化定义为当前结果比前一测试结果的测定值高出至少 25%即判断为阳性。此水平的变化也考虑到测试的差异性和生物学差异性。60%或 76/126 名患者的标本显示为与疾病进展程度相对应的阳性变化，而 75%或 171/228 名疾病无进展患者的系列标本未发现 HE4 的显著性变化。由此，总相关性为 70%或 247/354。下表为 2*2 格式的数据：

各连续观察配对的疾病状态的变化			
HE4 浓度的升高	进展	无进展	总数
>25%	76	57	133
≤25%	50	171	221
总数	126	228	354

下表表明每名患者的分布情况。93%或 54/48 名患者的系列标本显示为与疾病进展程度相对应的阳性变化，而 32%或 7/22 名无进展患者的系列标本的 HE 值未发现显著性变化。由此，本研究中的总相关性为 76%或 61/80。

HE4 浓度的升高	每名患者疾病状态的变化		
	进展	无进展	总数
>25%	54	15	69
≤25%	4	7	11
总数	58	22	80

多中心研究、以双盲实验对患有盆腔肿瘤患者的风险评估

HE4 EIA 测定试剂盒联合 ARCHITECT CA 125 II 测定试剂盒或 CanAg CA125 EIA 对患有盆腔肿瘤患者患上皮细胞型卵巢癌的风险评估的有效性进行前瞻性分析。我们建立了一项用于评价患有上皮细胞型卵巢癌风险的运算规则（ROMA，见前面所述）。此规则结合 HE4 测定试剂盒和 ARCHITECT CA125 试剂盒所确定出的 HE4 值和 CA125 值，和患者的绝经状态。此规则可计算出需要进行手术的上皮细胞型卵巢癌的发生概率。在一项对 496 名患者的前瞻性研究中，使用 ROMA 值评估患卵巢 CA 癌可能性，以及根据此值进而区分出低风险群体和高风险群体的可能性。

使用运算公式得出的卵巢癌 ROMA 值，做出的良性肿瘤和恶性肿瘤的累积频率分布图分别见图 1 和图 2（HE4 EIA 和 ARCHITECT CA125II 测试的联合），以及图 3 和图 4（HE4 EIA 和 CANAG CA125 EIA 的联合）。

图 1 绝经前妇女 ROMA 值的累积频率分布图。HE4+ARCHITECT CA125 II 测试的联合

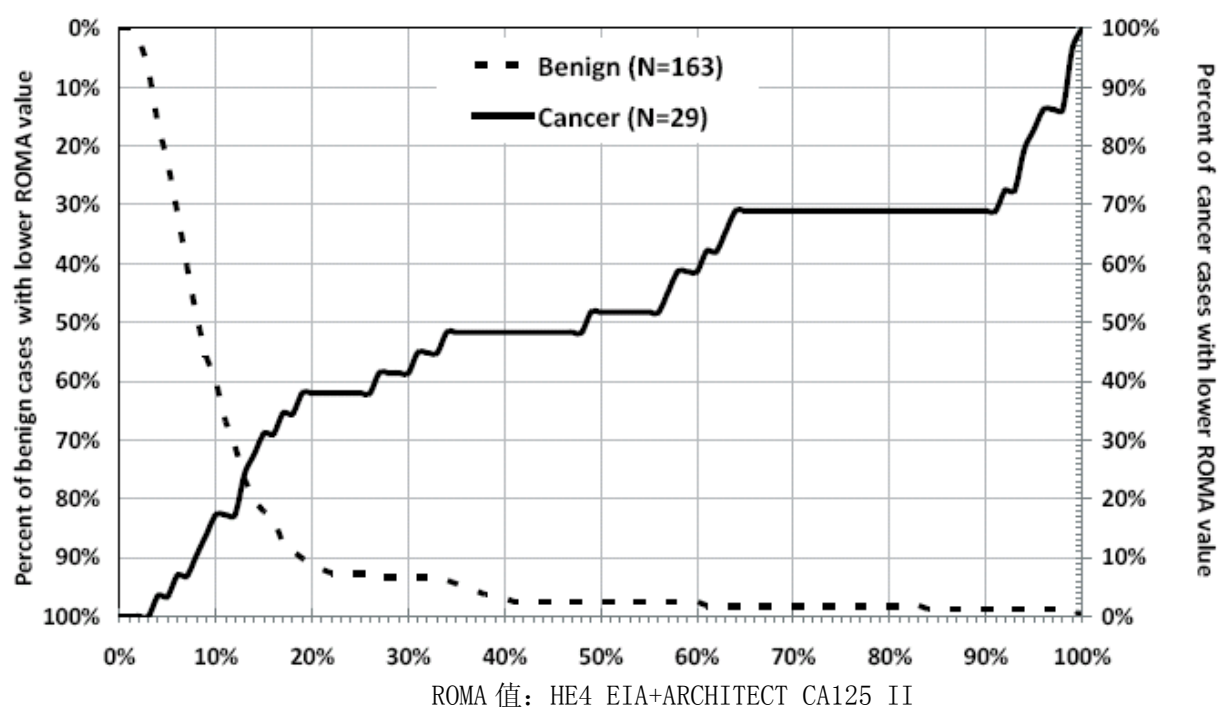


图 2: 绝经后妇女 ROMA 值的累积频率分布图。HE4 EIA+ARCHITECT CA 125II 测试的联合

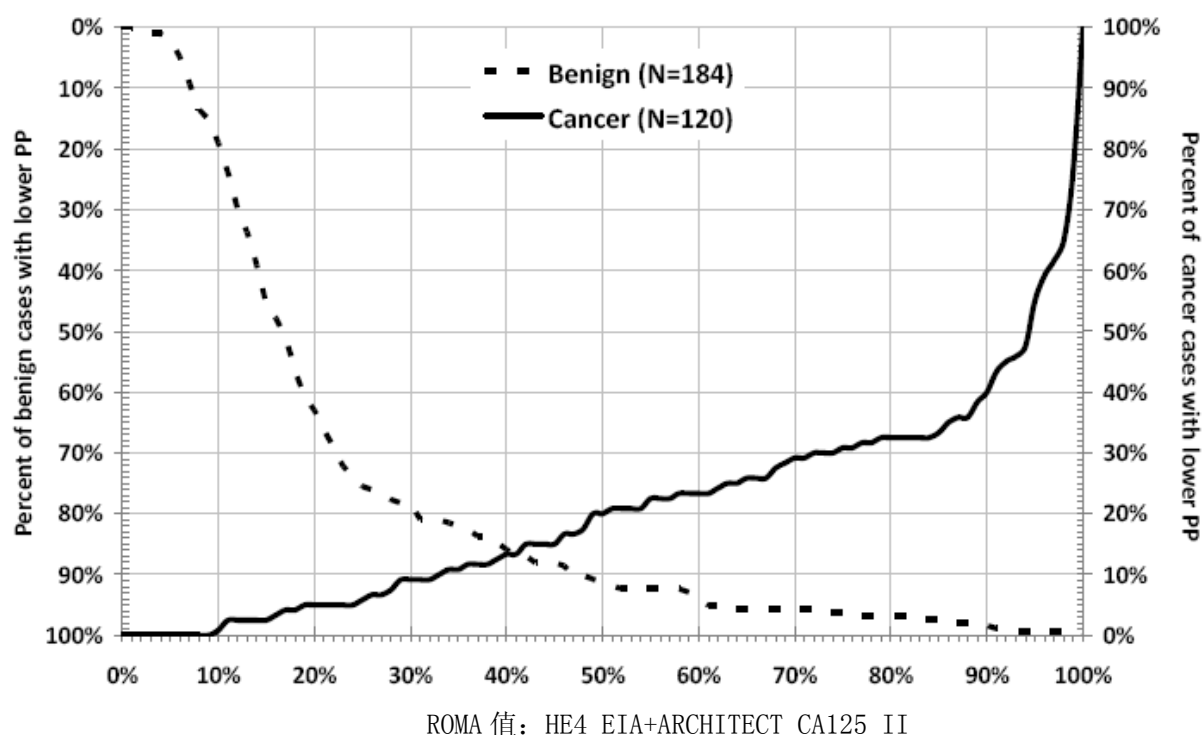


图 3：绝经前妇女 ROMA 值的累积频率分布图。HE4 EIA+CanAg CA 125 EIA 测试的联合

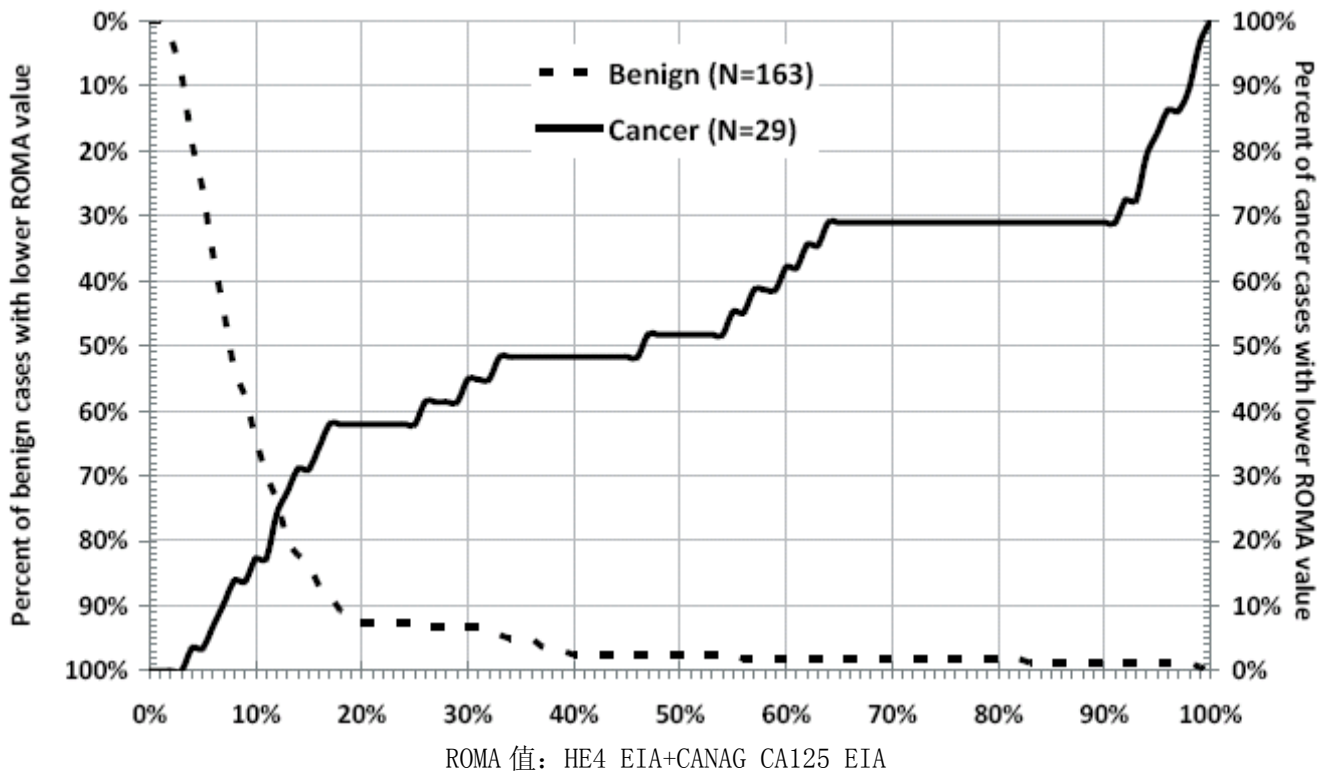
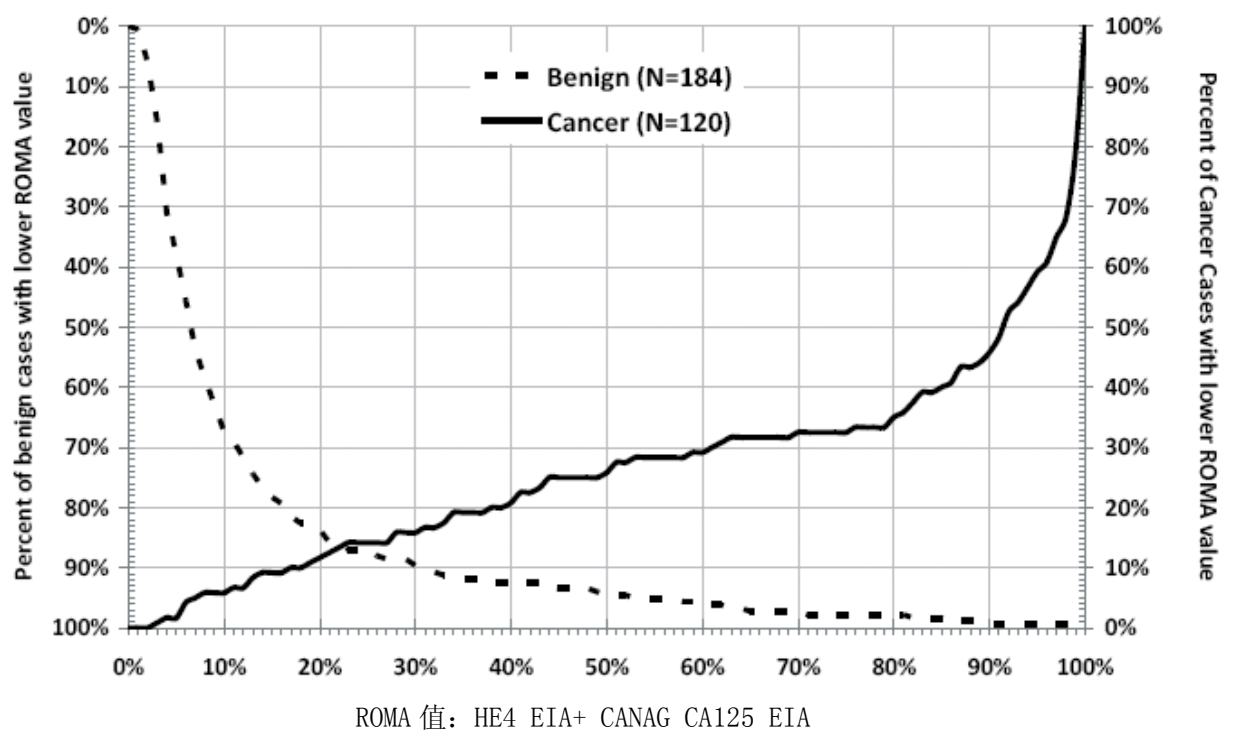


图 4：绝经后妇女 ROMA 值的累积频率分布图。HE4 EIA+ CANAG CA125 EIA 测试的联合



区分低风险人群和高风险人群

患恶性卵巢癌的风险评估计算公式用于将妇女归以发现上皮细胞型卵巢癌的风险分组。为了保证 HE4 EIA 和 ARCHITECT CA125II 的特异性水平为 75%，使用了下列临界点：

绝经前妇女：

ROMA 值 $\geq 12.9\%$ = 具有上皮细胞型卵巢癌的高风险性

ROMA 值 $< 12.9\%$ = 具有上皮细胞型卵巢癌的低风险性

绝经后妇女：

ROMA 值 $\geq 24.7\%$ = 具有上皮细胞型卵巢癌的高风险性

ROMA 值 $< 24.7\%$ = 具有上皮细胞型卵巢癌的低风险性

使用 HE4 EIA 和 ARCHITECT CA125II 的 ROMA 值对所有盆腔肿瘤患者（绝经前和绝经后）的风险分析见表 1 所示。将上皮细胞型卵巢癌患者分类至高风险人群的敏感性为 91%，特异性为 75%，而 75% 的良性盆腔肿瘤患者则被分类至低风险人群中。阳性预测值和阴性预测值分别为 61% 和 95%。

表 1：使用 HE4 EIA 和 ARCHITECT CA125II 测试的联合以计算出 ROMA 值对患有骨盆腔肿瘤的联合绝经前和绝经后患者进行风险分类。绝经前临界值 $\geq 12.9\%$ ，绝经后临界值 $\geq 24.7\%$ 。

骨盆腔肿瘤的患者人群 (联合绝经前和绝经后妇女)	低风险 (PP < 12.9%) (PP < 24.7%)	高风险 (PP $\geq$ 12.9%) (PP $\geq$ 24.7%)	总数
良性疾病	260 (75%)	87 (25%)	347 (70%)
上皮细胞型卵巢癌 (侵袭性和低恶性潜在肿瘤)	14 (9%)	135 (91%)	149 (30%)
总数	274 (55%)	222 (45%)	496 (100%)

使用 ARCHITECT CA125 II 或 CanAg CA125 EIA 所得 ROMA 的数值，以区分良性疾病和上皮细胞型卵巢癌的灵敏度和特异性无统计学上的显著性差异（图 5）。但应注意到在期望的特异性上用于风险分类的高风险组和低风险组的临界值必须根据所使用的 CA125 测试进行调整。图 1~图 4 所示的 ROMA 值的累积频率分布图可用于选择适当的临界值的指导原则。选择下列临界值以用于为 HE4 EIA 和 CanAg CA125 EIA 联合检测提供 75% 的特异性水平。

绝经前妇女：

ROMA 值 $\geq 12.4\%$ = 具有上皮细胞型卵巢癌的高风险性

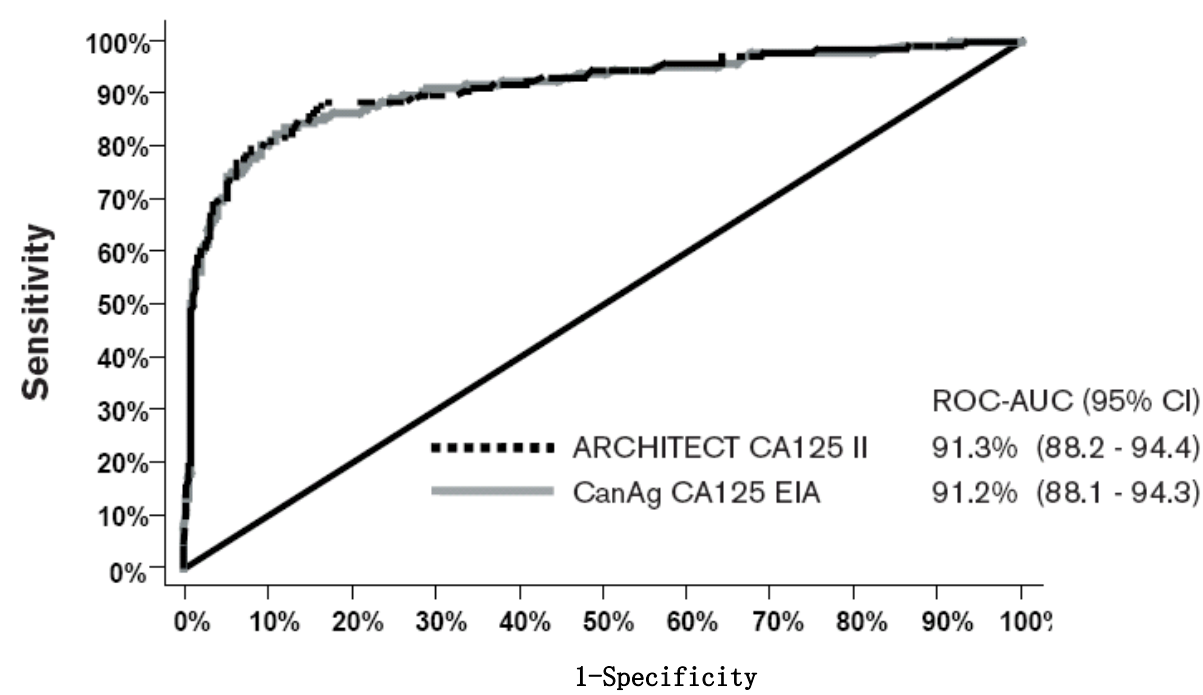
ROMA 值 $< 12.4\%$ = 具有上皮细胞型卵巢癌的低风险性

绝经后妇女：

ROMA 值 $\geq 13.5\%$ = 具有上皮细胞型卵巢癌的高风险性

ROMA 值 $< 13.5\%$ = 具有上皮细胞型卵巢癌的低风险性

图 5. 使用 HE4 EIA 分别与 ARCHITECT CA125 II 或 CanAg CA125 EIA 联合检测，以区分出良性疾病和上皮细胞型卵巢癌（N=496），所得 ROMA 值的灵敏度和特异性的 ROC 分析。



实验性能

精密度

HE4 EIA测定试剂盒的精密度的总CV值≤15%。按照国家临床实验室标准委员会NCCLS（CLSI）指南EP5-A2（22）的要求，采用4份人血清盘标本进行测试。每份标本复孔检测，在20天内每天不同时间内进行2次检测。此项研究的数据总结如下*：

标本	试剂 批号	重复 次数	平均浓 度(pM)	批内标准差 (pM)	批内变异系数 (CV) %	总标准 差 (pM)	总 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

*代表性数据；不同实验室的结果可与这些数据有所不同。

检测限

HE4 EIA 测定试剂盒（酶联免疫吸附法）的检测限≤15pM。检测限（LoD）对应于 95%可信区间的上限，并且代表区别于零浓度的可检测到的 HE4 抗原的最低浓度。按照 NCCLS 指南 EP17-A（23），使用了 HE4 标准品 A（零浓度）和 4 份来源于健康者的标本，后者用标本稀释液稀释至 5pM，在两个独立日内进行 4 次检测，每次重复 24 次检测。

LoD 的计算如下所示：

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

HE4EIA 测定试剂盒的检测限结果为<2.5pM。

功能灵敏度

HE4 EIA 测定试剂盒（酶联免疫吸附法）的功能灵敏度≤25pM。功能灵敏度表示当 CV 为 20%时分析物的浓度。按照 NCCLS 指南 EP5-A2（22）进行功能灵敏度实验。使用有 5 份样品的灵敏度血清盘，用 2 批次试剂在 20 个独立日内进行检测，每日检测 2 次，每份样本检测 4 次。

HE4 EIA 测定试剂盒的功能灵敏度确定的结果为<5pM。

回收率

HE4 EIA测定试剂盒的平均回收率为（100±15）%。将已知浓度的HE4 抗原加入到正常人血清标本中，对标本进行稀释测定HE4 的浓度，计算HE4 测定试剂盒的回收率。代表性数据总结如下表*：

标本	内 源 性 测 定 值 (pM)	加入的 HE4 抗 原 (pM)	HE4 测定值 (pM)	回 收 百 分 率 ** (%)
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

通过上面所显示的 4 份加入的浓度的平均回收率为 97%。

*代表性数据；不同实验室的结果可与这些数据有所不同。

**%回收率=测得的 HE4 浓度（pM） / （内源性 HE4 浓度（pM） + 加入的 HE4 浓度（pM）） *100%

倒钩效应（Hook 效应）

倒钩效应是指极高浓度水平的样本在测试的动态范围内进行读数的现象。HE4 EIA 测定试剂盒，在浓度高达 300 000 pM HE4 天然抗原的标本中没有倒钩效应。

稀释线性

HE4 EIA 测定试剂盒（酶联免疫吸附法）的平均稀释线性为（100±15）%。按照 NCCLS（CLSI）指南 EP6-A（24）HE4 高值血清标本是用 HE4 标准品 A（零浓度）进行稀释，测定 HE4 的浓度，计算回收百分率（%）。

代表性数据总结如下表*：

标本	最终稀释因子	测定值 (pM)	期望值 (pM)	回收百分率** %
1	未稀释	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	22.1	116
2	未稀释	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	未稀释	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

对上面所述的 3 份稀释标本的平均回收率=101%

*代表性数据；不同实验室的结果可与这些数据有所不同。

**%回收率=测得的 HE4 浓度*稀释因子/未稀释的 HE4 浓度*100%

分析特异性

HE4 EIA 测定试剂盒的平均测试特异性为 (100±15) %。按照 NCCLS (CLSI) 干扰性试验指南 EP7-A (25) 通过比较含有下列已标明浓度的复合物的血清与对照血清而得出, 对下列物质和浓度进行了测试, 对 HE4 检测没有干扰。

内源性血清干扰物	测试浓度
甘油三酯	30mg/mL
胆红素	0.2mg/mL
血红蛋白	10mg/mL
总蛋白	120mg/mL
化学治疗性药物干扰物	测试浓度
卡铂	500 μg/mL
顺铂	165 μg/mL
克霉唑	0.3 μg/mL
环磷酰胺	500 μg/mL
地塞米松	10 μg/mL
多柔比星 (Doxorubicin)	1.16 μg/mL
亚叶酸钙 (Leucovorin)	2.68 μg/mL
美法仑 (Melphalan)	2.8 μg/mL
甲氨蝶呤 (Methotrexate)	45 μg/mL
紫杉醇 (Paclitaxel)	3.5ng/mL

潜在干扰性临床状态

HE4 EIA测定试剂盒通过检测含有HAMA和类风湿因子 (RF) 样本, 评估HE4 试剂盒的特异性。向每份样本加入浓度范围大概在 (50~450) pM之间的HE4 抗原, 测定出回收率。平均回收率结果总结见下表所示*:

临床状态	样本数目	平均回收率%
HAMA	5	101
RF	5	95

*代表性数据; 不同实验室的结果可与这些数据有所不同。

说明

此文中所出现的性能数据是通过实验操作而获得的。任何未经 Fujirebio Diagnostis 建议的对实验操作步骤的修改和调整都有可能影响实验结果。对此 Fujirebio Diagnostis 将不做任何包括隐含的或法定的可销售性和适用性的保证。

Fujirebio Diagnostics AB

Majnabbeterminalen

SE-414 55 Göthenburg,

Sweden

电话: + 46 31—85 70 30

传真: + 46 31—85 70 40

info@fdab.com

www.fdab.com

参考文献

1. Israeli O, Goldring-Aviram A, Rienstein S, Ben-Baruch G, Korach J, Goldman B, Friedman E. In silico chromosomal clustering of genes displaying altered expression patterns in ovarian cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;160:35-42.
2. Bouchard D, Morisset D, Bourbonnais Y, Tremblay GM. Proteins with whey-acidic-protein motifs and cancer. *Lancet Oncol* 2006;7:167-174.
3. Bingle L, Singleton V, Bingle CD: The putative ovarian tumour marker gene he4 (wfdc2), is expressed in normal tissues and undergoes complex alternative splicing to yield multiple protein isoforms. *Oncogene* 2002;21:2768-2773.
4. Kirchhoff C, Habben I, Ivell R, et al. A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular protease inhibitors. *Biol Reprod* 1991;45:350-357.
5. Kirchhoff C. Molecular characterization of epididymal proteins. *Rev Reprod* 1998;3:86-95.
6. Galgano MT, Hampton GM, Frierson HF, Jr. Comprehensive analysis of he4 expression in normal and malignant human tissues. *Mod Pathol* 2006;19:847-853.
7. Drapkin R, von Horsten HH, Lin Y, Mok SC, Crum CP, Welch WR, Hecht JL. Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res* 2005; 65:2162-2169.
8. Hough CD, Sherman-Baust CA, Pizer ES, Montz FJ, Im DD, Rosenshein NB, Cho KR, Riggins GJ, Morin PJ. Large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer. *Cancer Res* 2000; 60:6281-6287.
9. Schummer M, Ng WV, Bumgarner RE, Nelson PS, Schummer B, Bednarski DW, Hassell L, Baldwin RL, Karlan BY, Hood L. Comparative hybridization of an array of 21,500 ovarian cdnas for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas. *Gene* 1999;238:375-385.
10. Gilks CB, Vanderhyden BC et al. Distinction between serous tumors of low malignant potential and serous carcinomas based on global mRNA expression profiling. *Gynecologic Oncol* 2005;96:684- 694.
11. Hellstrom I, Raycraft J, et al. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian cancer. *Cancer*

Res 2003; 63: 3695-3700.

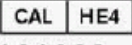
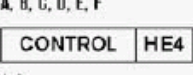
12. Moore RM, Brown AK, Miller MC, et al. The use of multiple novel tumor markers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol* 2007: In Press.
13. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. Ovarian Cancer: Screening, treatment and follow-up. *Gynecol Oncol* 1994;55:S4-14
14. ACOG Practice Bulletin. Clinical Management Guideline for Obstetrician-Gynecologists. Management of Adnexal Masses. *Obstet Gynecol* 2007;110:201-213.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. DePriest PD, Shenson D, Fried A, et al. A morphology index based on sonographic findings in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1993;51:7-11.
19. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Exposure to Blood Borne Pathogens.
20. US Department of Health and Human Services: Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories: 4th Edition Washington DC: US Government Printing Office May, 1999.
21. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI), Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline - Second Edition. EP5-A2 (2004).
22. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI), Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline. EP17-A (2004).
23. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI), Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. EP6-A.
24. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI), Interference Testing in Clinical Chemistry, Approved Guideline, EP7-A.

HE4 测定试剂盒实验操作流程

HE4 EIA REF 404—10

仅在使用前准备以下组分。根据说明进行清洗和温育。

注意：在温度（20~25）℃之间进行反应，以获得最准确的结果。

步骤	试剂瓶/测试板	操作步骤																																							
1. 准备 HE4 标准品		在每个小瓶中加入 1mL 蒸馏水或者去离子水并轻轻混合。使之静置至少 15 分钟。注意：各标准品的准确浓度均标示在标签上。复溶稳定性：在 2—8℃下可保存 4 周。 用 1200mL 蒸馏水或去离子水稀释 50mL 清洗浓缩液。 每个板条用 1mL 示踪剂稀释液混合 50 μ L 示踪剂，HRP 抗 HE—4 抗体																																							
准备 HE4 质控品																																									
准备清洗缓冲液																																									
准备示踪工作液	 																																								
		<table> <tr> <th>板条数目</th><th>示踪剂, HRP 抗 HE-4 (μ L)</th><th>示 踪 剂 稀 释 液 (mL)</th></tr> <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> </table>	板条数目	示踪剂, HRP 抗 HE-4 (μ L)	示 踪 剂 稀 释 液 (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
板条数目	示踪剂, HRP 抗 HE-4 (μ L)	示 踪 剂 稀 释 液 (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. 清洗		使用清洗缓冲液每孔洗涤 1 次，使用手动或自动洗板机																																							
3. 加入标准品，质控品和标本	 	每孔 25 μ L																																							
4. 加入生物素标记抗 HE-4		每孔 100 μ L																																							
5. 温育		（20—25）℃ 振动 1 小时																																							
6. 清洗		使用清洗缓冲液每孔洗涤 3 次，使用手动或自动洗板机																																							
7. 加入示踪工作液		每孔 100 μ L																																							
8. 温育		（20—25）℃ 振动 1 小时																																							

9. 清洗	MICROPLA	使用手动或人工洗板机清洗缓冲液每孔洗涤 6 次
10. 加入 TMB HRP—底物液	SUBS TMB	每孔 100 μ L
11. 温育	MICROPLA	(20—25) °C 振动 30 分钟
12. 吸光度读数	MICROPLA	620nm
Alt. 12 加入终止液	STOP	每孔 100 μ L
Alt. 13 混匀	MICROPLA	允许在 (20—25) °C 混匀
Alt. 14 吸光度读数	MICROPLA	15 分钟内在 405nm 处读数