

HER-2/neu ELISA

REF 06489876

WILEX

IVD



INSTRUCTIONS FOR USE

MODE D'EMPLOI

ANWEISUNGEN ZUR VERWENDUNG

ISTRUZIONI PER L'USO

INSTRUCCIONES DE USO

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

BRUGSVEJLEDNING

ANVÄNDARINSTRUKTIONER

ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

OncogeneScience



WILEX Inc.

Cambridge, MA 02140 USA

Intended Use

The HER-2/neu ELISA is intended to quantitatively measure HER-2/neu protein in serum of women with metastatic breast cancer. The use of the HER-2/neu ELISA is indicated for follow-up and monitoring of patients with metastatic breast cancer whose initial serum HER-2/neu value is greater than 15 ng/mL. HER-2/neu values should be used in conjunction with information available from clinical and other diagnostic procedures in the management of metastatic breast cancer. The clinical utility of the serum measurement of HER-2/neu as a prognostic indicator for early recurrence and in the management of patients on immunotherapy regimens has not been fully established.

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE

Method Principle	Solid Phase Sandwich ELISA
Analytical Range	0 ng/mL to 35 ng/mL
Specimen Type	Human Serum
Sample Test Volume	10.0 microliters
Sensitivity	1.5 ng p105/mL serum
Purchase of this kit licenses its use under the following patents: US patents 5,401,638 and 5,604,107; EPO patents 0494135 and 0412116; Canadian patent 2,026,250-8	

Table of Contents

Intended Use	2	Assay Procedure	4
Background	2	Sample Standard Curve	4
Principle of the Assay	2	Evaluation of Results	4
Summary of Procedure	2	Assay Quality Control	5
Standards Traceability	2	Expected Values	5
Materials Provided	2	Nonclinical Performance Characteristics	5
Safety and Warning Phrases	3	Troubleshooting	6
Materials Required but Not Provided	3	Stability and Storage Information	6
Precautions and Recommendations	3	Technical Support	6
Sample Preparation	3	References	51
Detailed Protocol	3	Explanation of Symbols	53

Background

The HER-2/neu oncogene, also referred to as c-erbB-2, encodes a protein with a molecular weight of 185,000 Daltons (p185) and belongs to a family of epithelial growth factor receptors structurally related to the human epidermal growth factor receptor [1]. The full-length p185 HER-2/neu protein is composed of a cytoplasmic domain with tyrosine kinase activity, a transmembrane domain, and an extracellular domain (ECD) that is shed from the surface of breast cancer cells [2,3]. Numerous studies have shown that the shed ECD of HER-2/neu is a glycoprotein with a molecular weight between 97 and 115 kDa and is designated p105 [3,4]. The ECD can be quantified accurately in serum with an assay [4] that uses monoclonal antibodies [5] that are directed to the external epitopes of the HER-2/neu protein. Many publications show that the ECD is shed into the blood of normal individuals and can be measured at high levels in women with metastatic breast cancer [4,6–26]. Many of these serum HER-2/neu studies have confirmed the substantial data from tissue studies that increased expression of HER-2/neu is a marker of poor prognosis, shorter overall survival, and biological aggressiveness.

Recent scientific studies suggest that quantitation of the ECD may have several important clinical applications such as monitoring breast cancer patients with metastatic disease and monitoring breast cancer patients for early recurrence [6–10,12,15,17–20,22–26]. These reports have shown that 30–50% of women with positive HER-2/neu tumors at primary diagnosis develop elevated levels of serum HER-2/neu with progression to metastatic breast cancer [4,6–26]. These studies also have illustrated that monitoring serum ECD levels post-surgery correlated with clinical course of disease and that serum HER-2/neu levels were observed to increase with disease progression or to decrease with response to therapy [12,15,19,20,25,26]. Several reports also show that elevated levels of serum HER-2/neu can occur in women with metastatic breast cancer who had primary breast tumors that were HER-2/neu negative by immunohistochemistry [6,11,18,21,27]. According to many immunohistochemistry and serum studies, the HER-2/neu protein is overexpressed in many tumors of epithelial origin including lung [28], prostate [29], pancreatic [30], colon [31], stomach [32], ovarian [33], and hepatocellular cancers [34].

Patents have been granted related to the quantitation and detection of the ECD p105 domain (in the US, patent #5,401,638; in Canada #2,026,250-8; and in Europe #0494135) as well as patents related to the quantitation and detection of the full-length p185 molecule (in the US, patent #5,604,107 and in Europe, patent #0412116). Similar patents are pending in Japan.

Principle of the Assay

The HER-2/neu ELISA is a sandwich enzyme immunoassay that utilizes a mouse monoclonal antibody for capture and a different biotinylated mouse monoclonal antibody for the detection of human HER-2/neu protein. Both capture and detector reagents specifically bind to the extracellular domain of HER-2/neu protein. The Capture Antibody has been immobilized on the interior surface of microtiter plate wells. To perform the test, an appropriate volume of specimen is incubated in the coated well to allow binding of the antigen by the Capture Antibody. The immobilized antigen is then reacted with the detector antiserum. The amount of Detector Antibody bound to antigen is measured by binding it with a streptavidin/horseradish peroxidase Conjugate, which then catalyzes the conversion of the chromogenic Substrate o-phenylenediamine (OPD) into a colored product. The colored reaction product is quantitated by spectrophotometry and is related to the amount of HER-2/neu protein in the sample.

For instructions, see the Detailed Protocol and Evaluation of Results sections of this booklet.

Summary of Procedure

Steps	Incubations
1. Add samples and Standards to wells	3 hours, 37°C
2. Wash	
3. Add Detector Antibody to wells	1 hour, 37°C
4. Wash	
5. Add Conjugate Antibody to wells	30 minutes, RT*
6. Wash	
7. Add Substrate to wells	45 minutes, RT*
8. Add Stop Solution to wells	
9. Read plate at 490 nm	

*Room temperature

Standards Traceability

The HER-2/neu ELISA was developed and calibrated by WILEX Inc., Cambridge MA, 02140, USA.

The HER-2/neu ELISA standards are calibrated against a master calibrator stock material maintained in Cambridge MA. This material is identified as HER-2/neu Master Calibrator lot R5345, and is a series of six (6) liquid reagents, spanning the range of zero to 35 ng/mL HER-2/neu p105 protein. The mass determinations for the HER-2/neu Master Calibrator have been assigned based on assay of the calibrator material in direct comparison to three (3) highly purified HER-2/neu p105 protein samples. Mass equivalents (moles) of the purified samples were determined by quantitative amino acid analysis.

Materials Provided

The following components are supplied.

Microtiter plate—Precoated microtiter plate supplied ready to use, with 96 wells (12 strips of eight) in foil zip-lock bags with a desiccant pack. Wells are coated with monoclonal anti-HER-2/neu protein antibody.

HER-2/neu Standards—Six (6) separate vials of recombinant HER-2/neu p105. Standards are calibrated in ng/mL and are labeled with values that are 50-fold greater than the actual vial dosage. Assigning these label values to a standard curve obviates the need to correct the reported dose for a 1:50 diluted sample (2% serum in buffer). See Evaluation of Results for details.

Standard#	ng/mL	Volume
6	35.0	1 mL
5	25.0	1 mL
4	15.0	1 mL
3	7.5	1 mL
2	2.5	1 mL
1	0.0	1 mL

Sample Diluent—One (1) bottle containing BSA and 0.09% sodium azide.

Detector Antibody—One (1) bottle supplied ready to use, containing biotinylated mouse monoclonal anti-HER-2/neu protein antibody in 0.01 M PBS (pH 7.4), protein stabilizer, and 0.09% sodium azide.

Conjugate Diluent—One (1) bottle containing 0.01 M PBS (pH 7.4), BSA, and 0.1% chloroacetamide.

Conjugate Concentrate—One (1) vial containing 50X streptavidin/horseradish peroxidase in buffer. Must be diluted to 1X with Conjugate Diluent to make Working Conjugate. See Table 1.

Substrate Diluent—0.1 M citrate buffer (pH 5.0) and 0.01% H₂O₂ (hydrogen peroxide).

Substrate—One (1) vial containing OPD tablets. Must be dissolved in Substrate Diluent (1 tablet/4 mL) to make Working Substrate. See Table 1.

Stop Solution—One (1) bottle containing 2.5 N H₂SO₄ (sulfuric acid).

Plat wash Concentrate (20X)—One (1) bottle. Dilute one (1) part concentrate in 19 parts high-quality water prior to use.

Safety and Warning Phrases



Harmful!

R22 – Harmful if swallowed.

S28 – After contact with skin, wash immediately with plenty of water.

Contains Sodium Azide

(Standards, Sample Diluent, Detector Antibody)

Harmful!

R40 – Possible risks of irreversible effects.

R43 – May cause sensitization by skin contact.

S36/37 – Wear suitable protective clothing and gloves.

Contains ortho-Phenylenediamine dihydrochloride

(Substrate Tablets)

Irritant!

R36/38 – Irritating to eyes and skin.

S36/37/39 – Wear suitable protective clothing, gloves, and eye/face protection.

S26 – In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.

Contains Sulfuric Acid

(Stop Solution)

Irritant!

R43 – May cause sensitization by skin contact.

S24 – Avoid contact with skin.

S37 – Wear suitable gloves.

Contains Chloroacetamide

(Conjugate Diluent and Conjugate Concentrate)

Materials Required but Not Provided

- Dry heat incubator capable of maintaining 37°C
- Pipettors: 2–20 µL, 20–200 µL, and 200–1000 µL pipettors with disposable tips
- Precision repeating pipettor
- Automated 96-well microtiter plate washer
- 12 x 75 mm culture tubes for sample preparation
- Vortex mixer
- Microtiter plate reader capable of measuring absorbance in 96-well plates at a wavelength of 490 nm
- 500- or 1000-mL graduated cylinder
- Reagent reservoirs
- Deionized water
- Plastic wrap or adhesive plate sealers
- Liquid household bleach for inactivating clinical specimens and decontamination of plate washer
- Disposable paper towels

Controls—HER-2/neu ELISA Controls consisting of recombinant p105 in Sample Diluent are available from WILEX Inc. Refer to HER-2/neu ELISA Controls, Part No. 06489884, when ordering. Controls are diluted at 1:50 prior to assay. Volumes are 0.5 mL each. Store between 2–8°C.

Precautions and Recommendations

- Store components at 2–8°C. Do not expose reagents to excessive light. Do not freeze any of the kit components.
- Do not use kit reagents past the expiration date.
- Use only the microtiter wells provided with the kit.
- Rinse all detergent residue from glassware.
- Use deionized water of the highest quality.
- Do not mix reagents from different kits.
- The buffers and reagents used in this kit contain either sodium azide or chloroacetamide as preservatives. Care should be taken to avoid direct contact with these reagents.
- Do not mouth pipet or ingest any of the reagents.
- Do not smoke, eat, or drink when performing the assay or where samples or reagents are handled.
- Human samples may be contaminated with infectious agents. Do not ingest, expose to open wounds, or breathe aerosols. Wear protective gloves and dispose of biological samples properly.
- Do not handle the Substrate Tablets with fingers or permit contact with skin, metal, or oxidizing agents. Dispose of OPD-containing solutions in compliance with local regulations.
- Wear disposable gloves and eye protection when handling Stop Solution (2.5 N sulfuric acid).
- Dispose of all working solutions (Plat wash, Conjugate, Substrate) at the end of each day.
- Prepare fresh working solutions for each subsequent assay.

CAUTION: This device contains material of human or animal origin and should be handled as a potential carrier and transmitter of disease.

Sample Preparation

For samples (and Controls), an initial dilution of 1:50 into Sample Diluent must be prepared prior to assay. Remove any flocculent material from samples by microcentrifugation prior to dilution. Label tubes and add 0.98 mL of Sample Diluent to each, followed by 0.02 mL of specimen/Control. Mix gently and avoid foaming of the diluted sample. Diluted samples and Controls may be stored in capped tubes for up to one week at 2–8°C, and six months at –20°C. Protect from light exposure. Re-assay of some samples at a higher dilution may be required. Discard any 2–8°C-stored samples showing signs of contamination. Redilute from serum.

Detailed Protocol

RECOMMENDED PROCEDURES

1. Addition of reagents must be in the order specified.
2. All six (6) Standards and test specimens should be run in duplicate.
3. Equilibrate all reagents to room temperature (15–30°C) before use.
4. Dispense only enough of each assay reagent for the number of wells being used. For every 8-well strip, dispense 1 mL of Detector Antibody, Conjugate, etc.
5. Prepare a plate map to use as a guide for location of samples, Standards, and Control wells.
6. Transfer of samples, Standards, and Controls from dilution tubes into wells can be simplified by using semi-automated, multi-channel pipettors. Contact Technical Service for recommended devices.
7. Preparation of Plat wash
 - a. If the Plat wash Concentrate is cold, allow it to reach room temperature (15–30°C) before use. Make sure all crystals are dissolved. If desired, warm at 37°C and mix well.
 - b. Dilute one (1) volume of Plat wash Concentrate with 19 volumes of distilled or deionized water. Mix well. This solution is Plat wash. The total volume required will depend on the washing method/instrument used. Approximately 1 L of this solution is required to prime an automated washer and run one microtiter plate; about 700 mL is required for each microtiter plate when manual washing is performed. Plat wash must be freshly prepared each day. Do not store Plat wash.
 - c. Plat wash must be freshly prepared each day. Do not store Plat wash.
8. When using manual methods, use caution when inverting the microtiter plate to decant or blot; press the side tabs of the frame inward to prevent the strips from falling out.
9. Microtiter plate washing is best performed by an automated plate washer. Plate washing equipment must be properly adjusted, cleaned, and maintained. Automated washers with 96 ports are recommended. Dummy 8-well strips can be used to fill the unused portion of the holder for assays using a partial plate. Retain and label previously used strips for this purpose.

- Set the fill volume to 300 μL /well. Prime the instrument with Platemash. For 96-port washers, use two 3-cycle washes. After the initial 3-cycle wash, rotate the plate 180 degrees and repeat. If a strip washer is used, perform a single wash cycle across the plate, and repeat five more times.
- After the final wash, invert the microtiter plate and strike it on an absorbent surface. Visually check that all wells are empty.

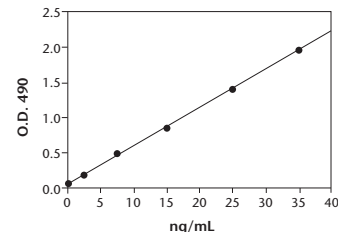
Assay Procedure

- Remove the microtiter plate from the bag. From the number of specimens to be tested and replicate determinations desired (duplicates recommended), calculate the number of strips needed. (Each Standard requires two wells; one well is needed for Substrate blank determination.) Store unused strips in the zip-lock bag with desiccant at 2–8°C (see Stability and Storage Information).
- Dilute specimens and Controls 1:50 (2%) with Sample Diluent.
- Mix the Standards, Controls, and specimens thoroughly and add 100 μL to duplicate wells. Set up one well with 100 μL of Sample Diluent for use as Substrate blank. Set up duplicate wells for each of the Controls.
- Cover the plate (food wrap or adhesive plastic cover). Incubate for 3 hours at 37°C.
- Carefully remove the plastic cover and wash the microtiter plate with Platemash.
- Add 100 μL of Detector Antibody to all wells except the Substrate blank well. Cover and incubate at 37°C for 1 hour.
- During the incubation with Detector Antibody, prepare Working Conjugate by diluting the Conjugate Concentrate with Conjugate Diluent. See Table 1 for the quantities to use for the number of strips being run.
- Wash the microtiter plate with Platemash.
- Add 100 μL of Working Conjugate to all wells except the Substrate blank well. Cover and incubate at room temperature (15–30°C) for 30 minutes.
- During the incubation with Working Conjugate, prepare Working Substrate by dissolving Substrate Tablets in Substrate Diluent. See Table 1 for the quantities to use for the number of strips being run. Vortex vigorously to assure complete dissolution. Once prepared, Working Substrate should be used within 30 minutes. Avoid exposure to light.
- Wash the microtiter plate with Platemash.
- Including the Substrate blank well, add 100 μL of Working Substrate to all wells. Cover with a fresh plastic cover and incubate the plate in the dark at room temperature (15–30°C) for 45 minutes.
- Add 100 μL of Stop Solution to each well to stop the reaction.
- Read the absorbance at 490 nm within 30 minutes.

TABLE 1. HER-2/neu ASSAY—PREPARATION OF ASSAY REAGENTS

# Strips Used	Conj. Concentrate	Conj. Diluent	Substrate Tablets	Substrate Diluent
1	20 μL	0.98 mL	1	4 mL
2	40 μL	1.96 mL	1	4 mL
3	60 μL	2.94 mL	1	4 mL
4	80 μL	3.92 mL	1	4 mL
5	100 μL	4.90 mL	2	8 mL
6	120 μL	5.88 mL	2	8 mL
7	140 μL	6.86 mL	2	8 mL
8	160 μL	7.84 mL	2	8 mL
9	180 μL	8.82 mL	3	12 mL
10	200 μL	9.80 mL	3	12 mL
11	220 μL	10.78 mL	3	12 mL
12	240 μL	11.76 mL	3	12 mL

Figure 1. Sample Standard Curve



Evaluation of Results

CONCENTRATION OF STANDARDS

The antibodies used in this assay recognize the extracellular, ligand-binding domain of the HER-2/neu protein [5]. This form of HER-2/neu has been identified with a molecular weight at or around 105 kDa. The Standards in the kit are calibrated in nanograms, which take into account this molecular weight found in serum and are prepared from a recombinant form of the 105 kDa fragment of HER-2/neu.

CONCENTRATION OF UNKNOWNNS

- Average the absorbance values for each Standard, Control, and specimen dilution to obtain the mean absorbances.
- On graph paper, plot the mean absorbance for each Standard on the y-axis versus the concentration of HER-2/neu protein (ng/mL) on the x-axis and connect points.
- Determine the concentration of HER-2/neu protein for each specimen dilution by interpolation from the standard curve. Software packages are available (such as SoftMax Pro™, Molecular Devices, Sunnyvale, CA; KC4™, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT) which can simplify this process. Use a quadratic curve fit (second order polynomial) algorithm.
- Note: Do not assign “blank” wells using software. This will subtract the average blank readings from all other wells. It is useful for quality control and troubleshooting purposes to be able to inspect the absorbance values reported for all wells without adjustments applied to the raw data.
- Results for samples are expressed in nanograms per mL by reading directly from the standard curve values (ng/mL) as designated on the vials and in the Materials Supplied section of this booklet. For convenience, no mathematical dilution correction is needed for 1:50 diluted samples since the actual concentration in the Standard preparations are at 2% of the labeled dosage (i.e., they have been prediluted at 1:50).

DILUTION OF SAMPLES WITH HIGH CONCENTRATIONS

- For samples that give absorbance (OD) values exceeding the range of the standard curve, subsequent assay at greater dilutions will be necessary.
- To prepare further dilutions, always begin with an initial 1:50 dilution (see Sample Preparation), and then dilute serially 1:2 into Sample Diluent. Example:

Sample Dilution	Volume of Previous Dilution	Volume of Sample Diluent
1:100	0.5 mL of 1:50	0.5 mL
1:200	0.5 mL of 1:100	0.5 mL
1:400	0.5 mL of 1:200	0.5 mL

- If further diluted samples produce OD values of < 0.3, they must be re-assayed using less dilute material. The Dilution Correction Factor (see Step 4 below), when multiplied by results from such a low OD value, may result in an erroneously high HER-2/neu protein estimation.
- Any results from further diluted samples will require correcting the values obtained from the assay for any dilution beyond 1:50. Example:

Sample Dilution	Dilution Correction Factor (multiply reported result by)
1:100	2
1:200	4
1:400	8

Assay Quality Control

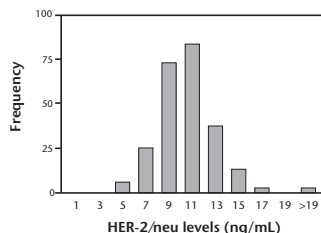
It is recommended that each assay meet the following performance parameters:

- Examine the results for the Controls run in the assay to confirm that the recoveries fall within the expected ranges (noted in the product insert) for each level.
- Inspect the dynamic range of the standard curve. Level 1 standard should fall between 0.04 to 0.09 OD and Level 6 standard should fall between 1.5 to 2.4 OD.
- If curve fitting software is used, inspect the calculation for R². This should fall between 0.997 and 1.0. If any of these parameters are not met, consideration should be made to repeat sample testing in a subsequent assay.

Expected Values HEALTHY INDIVIDUALS

As with all tests, each laboratory should establish its own reference range. In a population of 241 healthy women, 95% of the serum HER-2/neu protein values were found to be less than 13.7 ng/mL. There was no significant difference in HER-2/neu values between pre- and post-menopausal women. Based on this same population, the upper limit of normal (mean + 2SD) was 14.7 ng/mL. ROC analysis confirms 15 ng/mL as the appropriate cut-off between normal and elevated serum HER-2/neu protein levels. The distribution of serum HER-2/neu levels for the entire population (n = 241) is shown in Figure 2.

Figure 2. Distribution of serum HER-2/neu protein in a population of healthy women.



MONITORING OF METASTATIC BREAST CANCER PATIENTS

The clinical utility of the HER-2/neu ELISA in longitudinal monitoring of metastatic breast cancer patients was evaluated using retrospective serum samples from patients with late-stage breast cancer, covering a 6- to 12-month period, at three clinical sites in the United States. Fifty-six patients undergoing therapy whose initial serum HER-2/neu oncoprotein level was elevated (15 ng/mL or greater) were evaluated for correspondence of changes in their serum HER-2/neu levels with changes in their clinical course of disease.

A visit-to-visit analysis of the study results is presented in Table 2. The changes in serum HER-2/neu level from one visit to the next were calculated for each patient. These changes were separated into two groups: Group I had changes in serum HER-2/neu which paralleled the clinical course of disease, and Group II had changes in serum HER-2/neu level that did not parallel the clinical course of disease. Clinical course or status was determined by the physician. Correspondence of HER-2/neu changes to clinical status was determined as follows: An increase of 20% or greater from the previous visit was reflective of disease progression. If the change was less than a 20% increase from the previous visit, this was reflective of a lack of disease progression during therapy (including responding or stable disease). Stable and responding were consolidated since both reflect effectiveness of a current therapy. The 20% criterion was derived from the longitudinal variability in normal patients (determined from the serum HER-2/neu levels in six serial samples from each of 38 healthy women).

TABLE 2. CORRESPONDENCE OF METASTATIC BREAST CANCER PATIENT DISEASE STATUS WITH CHANGES IN SERUM HER-2/neu LEVELS: VISIT-BY-VISIT

Change in HER-2/neu	Change in Clinical Status		Total
	Progression	No Progression	
≥ 20% increase	52	33	85
< 20% increase	55	96	151
Total	107	129	236

Concordance = 62.7% (CI = 56.4 to 68.6%)

Predictive Value: Lack of Progression = 63.6% (CI = 55.7 to 70.8%)

Progression = 61.2% (CI = 50.6 to 70.8%)

The following figures show typical examples of changes in serum HER-2/neu levels over time for two of the 56 metastatic breast cancer patients from the clinical study. Figure 3 shows a patient whose disease is responding and Figure 4 shows a patient with progressive disease.

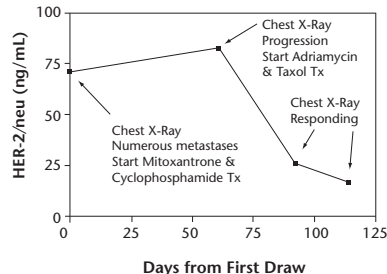


Figure 3. Monitoring of a 38-year-old Stage IV breast cancer patient with the HER-2/neu ELISA. Longitudinal changes in serum HER-2/neu levels correlate with changes in disease status.

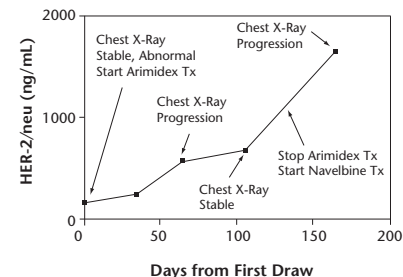


Figure 4. Monitoring of a 74-year-old Stage IV breast cancer patient with the HER-2/neu ELISA. Longitudinal changes in serum HER-2/neu levels correlate with changes in disease status.

Nonclinical Performance Characteristics

IMPRECISION

Imprecision was determined by testing four control samples consisting of three buffer-based Controls and one human serum pool. Three different kit lots were used at each of three different laboratories. Triplicate determinations per run for each Control were determined in 130 runs. Within-run and total precision were calculated for each Control based on the NCCLS EP-5A protocol. Within-run imprecision for three sites and kit lots were at or below 10% CV with total imprecision across all kits and sites between 10 and 17.7% CV.

Control Sample	# of Runs	# of Replicates	Mean (ng/mL)
Control 1	130	385	24.5
Control 2	131	390	9.8
Control 3	131	386	3.3
Serum 4	130	385	9.5

Control Sample	Within-Run Precision		Total Precision	
	Std Dev	% CV	Std Dev	% CV
Control 1	1.46	6.0	2.62	10.7
Control 2	0.69	7.0	1.03	10.4
Control 3	0.34	10.2	0.59	17.7
Serum 4	0.65	6.9	1.02	10.8

SENSITIVITY

Minimal detectable concentration of analyte was determined by repeated measurement of a zero dose sample (Sample Diluent). Mean and standard deviation of apparent recovery of HER-2/neu were calculated for 230 determinations made over a period of 20 days between three different kit lots and three different laboratories. After addition of two standard deviations to the mean recovered dose of HER-2/neu, the minimal detectable concentration was determined to be 1.5 ng of p105/mL serum.

ANALYTICAL SPECIFICITY

Cross-reactivity. Epidermal growth factor receptor (EGFr) is a closely related molecule to the HER-2/neu growth factor receptor at 88% homology with the intracellular domain and 44% homology with the extracellular domain.

We challenged the HER-2/neu ELISA with EGFR at 850 ng/mL. This material produced no signal in the assay, indicating that the immunoreagents in the device produce no cross-reaction with EGFR.

Interfering substances. Human anti-mouse antibody (HAMA), found in rare instances in some human serum, has the potential to bind to the critical reagents in immunoassays, causing false positive or negative signals. Several known HAMA-positive serum samples as well as rheumatoid-factor-positive samples were tested in the device. No false signals were generated with these samples. Device reagents have been formulated to block any such false reactivity.

Serum HER-2/neu measurements might be performed while patients are taking vitamins, over-the-counter drugs, or undergoing chemotherapy. To test the possibility that such agents could interfere with accurate HER-2/neu determinations, potential exogenous interferents were spiked into a Positive Control serum containing a known concentration of HER-2/neu and were subsequently tested in the assay. Some common serum constituents also were tested for their potential to act as endogenous interferents. None of the compounds tested had an effect on analyte recovery. See Table 3.

ANALYTICAL RANGE

The HER-2/neu ELISA is capable of accurate quantitation of serum HER-2/neu levels in prediluted samples, which provide an assay response in the range of 1.5 to 35 ng of p105 HER-2/neu protein per mL serum. Samples that produce a signal in excess of the upper limit of the standard curve range (35 ng/mL) must be further diluted with Sample Diluent and re-tested in the assay. Be certain to correct the reported recovery of HER-2/neu protein for dilution preparations that are greater than the routine 1:50 dilution.

TABLE 3. POTENTIAL ELISA INTERFERENTS

POTENTIAL INTERFERENTS	TEST CONCENTRATIONS	POTENTIAL INTERFERENTS	TEST CONCENTRATIONS
ENDOGENOUS		OTC DRUGS, ETC.	
Triglycerides (Intralipin-20%)	3000.0 mg/dL	Acetaminophen	200.0 µg/mL
Hemoglobin	1.0 g/dL	Aspirin	500.0 µg/mL
Immunoglobulin (gamma globulin)	6.0 g/dL	Ibuprofen	400.0 µg/mL
Albumin	6.5 g/dL	Caffeine	100.0 µg/mL
Bilirubin	25.0 mg/dL		
Heparin	0.46 mg/mL		
EXOGENOUS		CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS	
Vitamin A trans Retinol Acetate	10.0 IU/mL	Aminoglutethamide	398.0 µg/mL
Vitamin B1 Thiamine	3.0 µg/mL	Bleomycin	0.16 U/mL
Vitamin B2 Riboflavin	3.4 µg/mL	Cis-Platin	173.0 µg/mL
Vitamin B6 Pyroxide HCL	4.0 µg/mL	Doxorubicin	51.8 µg/mL
Vitamin B12	12.0 ng/mL	Cyclophosphamide	800.0 µg/mL
Vitamin C Ascorbic Acid	30.0 µg/mL	Diethylstilbestrol	23.0 µg/mL
Vitamin D2 Ergocalciferol	0.8 IU/mL	Estramustine	102.2 µg/mL
Vitamin E Tocopherol Acetate	0.06 IU/mL	Flutamide	10.0 µg/mL
Folic Acid	0.8 µg/mL	5-Fluorouracil	1600.0 µg/mL
Niacin	40.0 µg/mL	Lupron	15.0 µg/mL
		Methotrexate	450.0 µg/mL
		Mitoxantrone	56.0 µg/mL
		Mitomycin C	73.0 µg/mL
		Megace	27.0 ng/mL
		Tamoxifen	1.4 µg/mL
		Vincristine	4.88 µg/mL
		Vinblastine	16.3 µg/mL
		Herceptin (Trastuzumab)	500 µg/mL

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

In performing steps in manual immunoassays, there is the potential of erroneous measurement (sample recovery) as a result of variation in the incubation time that samples are subjected to in each of the incubation steps. All wells should receive essentially the same incubation time required for each reagent step. In particular, when adding Standards, Controls, and samples to wells in the plate, the time between addition of the first sample and the last should be within, at most, a 15-minute time frame. Prepare all samples in advance. Use of semi-automated, multi-tip pipettors is highly recommended for shortening the times for these proce-

dures. In order to prevent cross-contamination, be sure to use fresh tips for each sample addition.

Immunoassays using so-called sandwich configurations, such as this device, are subject to interference and false results arising from samples that contain immunoreactive agents against mouse antibodies. HAMA (human anti-mouse antibody), heterophilic antibody, and rheumatoid factor are the primary examples of these interferents. Precautions have been taken by the manufacturer in formulating reagents contained in this device to minimize or eliminate such interference. However, care should be taken when evaluating assay results that may be inconsistent with the overall clinical status of the patient in light of this possible interference.

It is possible that a patient with confirmed breast cancer may have serum HER-2/neu protein levels within the range of those observed in healthy individuals. Use caution in the interpretation of HER-2/neu results. Serum HER-2/neu levels may not always indicate the presence or absence of malignant disease. The HER-2/neu value should be used as part of an overall clinical assessment that includes additional clinical evaluation and diagnostic tests.

Troubleshooting

- Each assay must include the six (6) Standards tested in duplicate using the protocol described in the Detailed Protocol. Incubation times or temperatures significantly different from those specified may give erroneous results.
- The shape of the standard curve is nonlinear and varies slightly from assay to assay. For data reduction by hand, apply point-to-point graphing. If using ELISA software, apply a quadratic curve fit (second order polynomial) algorithm.
- Poor duplicates, if accompanied by elevated values for the zero Standard, indicate insufficient washing. If all instructions in the Detailed Protocol were followed accurately, such results indicate a need for washer maintenance. Also, avoid introducing bubbles into wells when pipetting samples and reagents.
- The Substrate blank well should read less than or equal to 0.05 absorbance units. A possible cause of higher values is exposure of the Working Substrate to light either before or during the incubation step. Working Substrate should be used within 30 minutes of preparation.
- Low signal may indicate 1) that drying of the plate has occurred between steps. Do not allow the plate to dry out. Add the next reagent immediately after wash; or 2) that improper washing has been performed. Be sure the microtiter plate washer has been properly primed with Platetwash (See Detailed Protocol).

Stability and Storage Information

All of the reagents included in the HER-2/neu ELISA have been tested for stability. Reagents should not be used beyond the stated expiration date. Kit reagents should be stored at 2–8°C, with the exception of Platetwash Concentrate, which may be stored at room temperature. Assay plates should be stored sealed in the original foil bag with desiccant pack. Once opened, the device will perform within specifications for up to 4 weeks (30 days) within the expiration date period indicated on the label.

Technical Support

tel: +1 617 492 3900 x502
email: oncogenetech@wilex.com



WILEX Inc.
Cambridge, MA 02140 USA



EMERGO EUROPE
Molenstraat 15
2513 BH, The Hague
The Netherlands
Tel: +31 (0)70 345 8570
Fax: +31 (0)70 346 7299

Domaine d'utilisation

Le dosage ELISA HER-2/neu a pour objectif de mesurer quantitativement la protéine HER-2/neu dans le sérum des femmes atteintes d'un cancer du sein métastatique. L'utilisation du dosage ELISA HER-2/neu est indiquée pour le suivi et la surveillance des patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique dont la valeur de protéine HER-2/neu sérique initiale est supérieure à 15 ng/mL. Les valeurs HER-2/neu doivent être utilisées conjointement avec les informations provenant de procédures cliniques et autres procédures diagnostiques dans le traitement du cancer du sein métastatique. L'utilité clinique de la mesure de la protéine HER-2/neu sérique en tant qu'indicateur pronostic d'une récurrence précoce et dans le cadre du traitement des patientes suivant des régimes immunothérapeutiques n'a pas été démontrée avec certitude.

POUR UTILISATION DIAGNOSTIQUE IN VITRO

Principe de la méthode	ELISA en sandwich en phase solide
Plage analytique	0 ng/mL à 35 ng/mL
Type de spécimen	Sérum humain
Volume du test des échantillons	10,0 microlitres
Sensibilité	sérum 1,5 ng p105/mL

L'utilisation de cette trousse est soumise aux brevets suivants : brevets américains 5,401,638 et 5,604, 107 ; brevets OEB 0494135 et 0412116 ; brevet canadien 2,026,250-8

Sommaire

Domaine d'utilisation	7	Protocole du dosage	9
Contexte	7	Courbe standard d'échantillons	9
Principe du dosage	7	Évaluation des résultats	9
Résumé de la procédure	7	Contrôle de qualité du dosage	10
Traçabilité des standards	7	Valeurs attendues	10
Produits fournis	7	Caractéristiques des performances non cliniques	11
Phrases relatives à la sécurité et aux avertissements	8	Résolution de problèmes	12
Produits requis mais non fournis	8	Informations sur la stabilité et la conservation	12
Précautions et recommandations	8	Support technique	12
Préparation des échantillons	8	Références bibliographiques	51
Protocole détaillé	9	Explication des symboles	53

Contexte

L'oncogène HER-2/neu, également appelé c-erbB-2, encode une protéine avec un poids moléculaire de 185 000 daltons (p185) et appartient à une famille de récepteurs de facteur de croissance des cellules épithéliales liés structurellement au récepteur de facteur de croissance de l'épiderme humain [1]. La protéine HER-2/neu p185 de pleine longueur est composée d'un domaine cytoplasmique avec une activité de la tyrosine kinase, un domaine transmembranaire et un domaine extracellulaire (ECD, extracellular domain) obtenu à la surface des cellules du cancer du sein [2,3]. De nombreuses études ont montré que l'ECD obtenu de la protéine HER-2/neu est une glycoprotéine avec un poids moléculaire compris entre 97 et 115 kDa désignée sous le nom de p105 [3,4]. L'ECD peut être quantifié avec précision dans le sérum à l'aide d'un dosage [4] utilisant des anticorps monoclonaux [5] dirigés contre les épitopes externes de la protéine HER-2/neu. Plusieurs publications ont montré que l'ECD est libéré dans le sang des individus normaux et qu'il peut être mesuré à des niveaux élevés chez les femmes atteintes d'un cancer du sein métastatique [4,6-26]. La plupart de ces études sur la protéine HER-2/neu sérique ont confirmé les données substantielles fournies par des études de tissus selon lesquelles une expression accrue de HER-2/neu constitue un marqueur de pronostic insuffisant, de survie globale plus courte et d'agressivité biologique.

Des études scientifiques récentes suggèrent que la quantification de l'ECD peut avoir plusieurs applications cliniques importantes telles que la surveillance des patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique et la surveillance des patientes atteintes d'un cancer du sein pour détecter toute récurrence précoce [6-10, 12,15,17-20,22-26]. Ces rapports ont montré que 30 à 50 % des femmes présentant des tumeurs HER-2/neu positives lors du premier diagnostic développent des niveaux élevés de protéine HER-2/neu sérique dégénérant en cancer du sein métastatique [4,6-26]. Ces études ont également indiqué que la surveillance des niveaux de protéine ECD sérique après une intervention chirurgicale correspondait à l'évolution clinique de la maladie et que les niveaux de protéine HER-2/neu sérique augmentaient avec la progression de la maladie ou diminuaient en réponse au traitement [12,15,19,20,25,26]. Plusieurs rapports indiquent également que

des niveaux élevés de protéine HER-2/neu sérique peuvent survenir chez des femmes atteintes d'un cancer du sein métastatique qui présentaient des tumeurs du sein primaires négatives à la protéine HER-2/neu par immunohistochimie [6,11,18,21,27]. Selon plusieurs études sériques et immunohistochimiques, la protéine HER-2/neu est sur-exprimée dans plusieurs tumeurs d'origine épithéliale, y compris les cancers du poumon [28], de la prostate [29], du pancréas [30], du colon [31], de l'estomac [32], des ovaires [33] et du foie [34].

Des brevets ont été accordés concernant la quantification et la détection du domaine p105 de l'ECD (brevet américain 5,401,638 ; brevet canadien 2,026,250-8 et brevet européen 0494135) ainsi que des brevets sur la quantification et la détection de la molécule p185 de pleine longueur (brevet américain 5,604,107 et brevet européen 0412116). Des brevets similaires sont en attente au Japon.

Principe du dosage

Le dosage ELISA HER-2/neu est un dosage immuno-enzymatique en sandwich qui utilise un anticorps monoclonal de souris et un anticorps monoclonal de souris biotinylé différent pour, respectivement, capturer et détecter la protéine HER-2/neu humaine. Les deux réactifs de capture et de détection se couplent spécifiquement au domaine extracellulaire de la protéine HER-2/neu. L'anticorps de capture a été immobilisé sur la surface interne des puits de la plaque de microtitration. Pour effectuer le test, un volume suffisant du spécimen est incubé dans les puits enrobés pour permettre le couplage de l'antigène par l'anticorps de capture. L'antigène immobilisé est ensuite mis en contact avec l'antisérum de détection. La quantité d'anticorps de détection couplé à l'antigène est mesurée en le couplant à un conjugué de streptavidine/peroxydase de raifort qui catalyse ensuite la conversion du substrat chromogène o-phénylènediamine (OPD) dans un produit coloré. Le produit réactif coloré est quantifié par spectrophotométrie et est lié à la quantité de protéine HER-2/neu dans l'échantillon.

Pour des instructions, voir les sections Protocole détaillé et Évaluation des résultats de la présente brochure.

Résumé de la procédure

Étapes	Incubations
1. Ajouter des échantillons et des standards à des puits	3 heures, 37 °C
2. Laver	
3. Ajouter un anticorps de détection aux puits	1 heure, 37 °C
4. Laver	
5. Ajouter un anticorps conjugué aux puits	30 minutes, TA*
6. Laver	
7. Ajouter un substrat aux puits	45 minutes, TA*
8. Ajouter une solution d'arrêt aux puits	
9. Lire la plaque à 490 nm	

*Température ambiante

Traçabilité des standards

Le dosage ELISA HER-2/neu a été développé et calibré par WILEX Inc., Cambridge MA, 02140, États-Unis.

Les standards ELISA HER-2/neu sont calibrés sur le matériel de départ d'un calibrateur maître qui se trouve sur le site de Cambridge MA. Ce matériel est identifié sous le lot R5345 du calibrateur maître HER-2/neu et se compose d'une série de six réactifs liquides couvrant la plage comprise entre zéro et 35 ng/mL de protéine HER-2/neu p105. Les déterminations de la masse pour le calibrateur maître HER-2/neu ont été assignées en fonction du dosage du matériel du calibrateur par comparaison directe avec trois échantillons de protéine HER-2/neu p105 extrêmement purifiés. Les équivalents de la masse (moles) des échantillons purifiés ont été déterminés par le biais d'une analyse quantitative des acides aminés.

Produits fournis

Les composants suivants sont fournis.

Plaque de microtitration : plaque de microtitration pré-enrobée fournie prête à l'emploi, avec 96 puits (12 bandes de huit) en aluminium, des sachets à fermeture par pression et glissière avec un déshydratant. Les puits sont enrobés d'anticorps monoclonal anti-protéine HER-2/neu.

Standards HER-2/neu : six (6) flacons séparés de HER-2/neu p105 recombinaison. Les standards sont calibrés en ng/mL et sont étiquetés avec des valeurs qui sont 50 fois supérieures au dosage de flacon réel. Grâce à l'attribution de ces valeurs d'étiquette à une courbe standard, il ne faut plus corriger la dose signalée pour un échantillon dilué au 1:50 (2 % sérum dans une solution tampon). Voir la section Évaluation des résultats pour plus de détails.

N° de standard	ng/mL	Volumes
6	35,0	1 mL
5	25,0	1 mL
4	15,0	1 mL
3	7,5	1 mL
2	2,5	1 mL
1	0,0	1 mL

Diluant d'échantillons : une (1) bouteille contenant du BSA et 0,09 % d'azide de sodium.

Anticorps de détection : une (1) bouteille fournie prête à l'emploi, contenant un anticorps monoclonal de souris biotinylé anti-protéine HER-2/neu dans 0,01 M de PBS (pH 7,4), un stabilisateur des protéines et 0,09 % d'azide de sodium.

Diluant de conjugué : une (1) bouteille contenant 0,01 M de PBS (pH 7,4), BSA et 0,1 % de chloroacétamide.

Concentré de conjugué : un (1) flacon contenant 50X de streptavidine/peroxydase de raifort dans une solution tampon. À diluer à 1X avec un diluant de conjugué pour obtenir le conjugué de travail. Voir le tableau 1.

Diluant de substrat : 0,1 M de solution tampon citrate (pH 5,0) et 0,01 % d'H₂O₂ (peroxyde d'hydrogène).

Substrat : un (1) flacon contenant des tablettes OPD. À dissoudre dans un diluant de substrat (1 tablette/4 mL) pour obtenir le substrat de travail. Voir le tableau 1.

Solution d'arrêt : une (1) bouteille contenant 2,5 N d'H₂SO₄ (acide sulfurique).

Concentré de plaque de lavage (20X) : une (1) bouteille. Diluer une (1) part de concentré dans 19 parts d'eau de haute qualité avant usage.

Phrases relatives à la sécurité et aux avertissements



Nocif !

R22 – Nocif en cas d'ingestion.

S28 – Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec de l'eau.

Contient de l'azide de sodium

(standards, diluant d'échantillons, anticorps de détection)

Nocif !

R40 – Possibilité d'effets irréversibles.

R43 – Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau.

S36/37 – Porter un vêtement de protection et des gants protecteurs appropriés.

Contient du dihydrochlorure d'ortho-phénylènediamine

(tablettes de substrat)

Irritant !

R36/38 – Irritant pour les yeux et la peau.

S36/37/39 – Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage.

S26 – En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.

Contient de l'acide sulfurique

(solution d'arrêt)

Irritant !

R43 – Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau.

S24 – Éviter le contact avec la peau.

S37 – Porter des gants appropriés.

Contient du chloroacétamide

(diluant de conjugué et concentré de conjugué)

Produits requis mais non fournis

- Incubateur à chaleur sèche capable de maintenir une température de 37 °C
- Pipeteurs : pipeteurs 2-20 µL, 20-200 µL et 200-1 000 µL avec embouts jetables
- Pipeteur de précision
- Dispositif de lavage automatisé de plaques à microtitration à 96 puits
- Tubes à culture 12 x 75 mm pour la préparation des échantillons
- Agitateur vortex
- Lecteur de plaques à microtitration capable de mesurer l'absorbance dans les plaques à 96 puits à une longueur d'onde de 490 nm
- Cylindre gradué de 500 ou 1 000 mL
- Réservoirs de réactifs
- Eau désionisée
- Emballage en plastique ou bandes de plaque adhésives
- Eau de javel liquide pour désactiver les spécimens cliniques et décontaminer le dispositif de lavage de plaques
- Serviettes en papier jetables

Contrôles : Les contrôles d'ELISA HER-2/neu qui consistent en une recombinaison de p105 dans le diluant testé sont disponibles chez WILEX Inc.. Indiquer le No de la pièce 06489884 des Contrôles ELISA HER-2/neu lors de la commande. Les contrôles sont dilués au 1:50 avant le dosage. Les volumes sont de 0,5 mL chacun. Conserver à une température comprise entre 2 et 8 °C.

Précautions et recommandations

- Conserver les composants à une température comprise entre 2 et 8 °C. Ne pas exposer les réactifs à une lumière trop forte. Ne pas congeler les composants de la trousse.
- Ne pas utiliser les réactifs de la trousse au-delà de leur date de péremption.
- Utiliser uniquement les puits de microtitration fournis avec la trousse.
- Enlever tout résidu de détergent des articles en verre.
- Utiliser de l'eau désionisée de la plus haute qualité.
- Ne pas mélanger des réactifs issus de trousse différentes.
- Les solutions tampons et les réactifs utilisés dans cette trousse contiennent de l'azide de sodium ou du chloroacétamide qui jouent le rôle de conservateurs. Procéder avec soin pour éviter tout contact direct avec ces réactifs.
- Ne pas pipeter à la bouche ou ingérer les réactifs.
- Ne pas fumer, manger ou boire lors du dosage ou de la manipulation des échantillons ou des réactifs.
- Les échantillons humains peuvent être contaminés par des agents infectieux. Ne pas ingérer, exposer à des blessures ouvertes ou respirer en aérosol. Porter des gants de protection et mettre les échantillons biologiques au rebut selon la réglementation applicable.
- Ne pas toucher les tablettes de substrat avec les doigts et ne pas laisser entrer en contact avec la peau, le métal ou des agents oxydants. Mettre au rebut les solutions contenant de l'OPD conformément aux réglementations locales.
- Porter des gants jetables et un dispositif de protection oculaire lors de manipulation de la solution d'arrêt (2,5 N d'acide sulfurique).
- Mettre au rebut toutes les solutions de travail (lavage de plaque, conjugué, substrat) à la fin de la journée.
- Préparer des solutions de travail fraîches pour chaque dosage suivant.

PRÉCAUTION : L'instrument contient des matériaux d'origine humaine ou animale et doit être manipulé comme s'il pouvait être porteur de maladies et les transmettre.

Préparation des échantillons

Pour les échantillons (et les contrôles), une dilution initiale au 1:50 dans un diluant d'échantillons doit être préparée avant le dosage. Retirer tout matériel flocculeux des échantillons par microcentrifugation avant dilution. Étiqueter les tubes et ajouter 0,98 mL de diluant d'échantillons à chaque tube, puis 0,02 mL de spécimen/contrôle. Mélanger doucement et éviter de faire mousser l'échantillon dilué. Les échantillons et les contrôles dilués peuvent être conservés dans des tubes fermés pendant une semaine à une température comprise entre 2 et 8 °C et pendant six mois à une température de -20 °C. Protéger de la lumière. Le redosage de certains échantillons à une dilution supérieure peut s'avérer nécessaire. Jeter tout échantillon conservé à une température comprise entre 2 et 8 °C s'il montre des signes de contamination. Rediluer à partir du sérum.

Protocole détaillé

PROCÉDURES RECOMMANDÉES

1. L'ajout de réactifs doit se faire dans l'ordre spécifié.
2. Les six (6) standards et spécimens de test doivent être analysés en double.
3. Équilibrer tous les réactifs à température ambiante (entre 15 et 30 °C) avant utilisation.
4. Distribuer une quantité suffisante de chaque réactif de dosage pour le nombre de puits utilisés. Pour chaque bande de 8 puits, distribuer 1 mL d'anticorps de détection, de conjugué, etc.
5. Préparer une carte de plaque qui servira de guide pour localiser les échantillons, les standards et les puits de contrôle.
6. Le transfert des échantillons, des standards et des contrôles des tubes de dilution dans les puits peut être simplifié grâce à l'utilisation de pipeteurs multi-canaux semi-automatisés. Contacter le service technique pour connaître les appareils recommandés.
7. Préparation du lavage de plaque
 - a. Si le concentré de lavage de plaque est froid, le laisser atteindre la température ambiante (15 à 30 °C) avant utilisation. Vérifier que tous les cristaux sont dissous. Si besoin est, réchauffer à 37 °C et bien mélanger.
 - b. Diluer un (1) volume de concentré de lavage de plaque avec 19 volumes d'eau distillée ou désionisée. Bien mélanger. Cette solution est un lavage de plaque. Le volume total requis dépend de la méthode de lavage et de l'instrument utilisé. Environ 1 L de cette solution est nécessaire pour amorcer un dispositif de lavage automatisé et analyser une seule plaque de microtitration et environ 700 mL sont nécessaires pour chaque plaque de microtitration en cas de lavage manuel.
 - c. Le lavage de plaque doit être préparé frais chaque jour. Ne pas conserver le lavage de plaque.
8. En cas d'utilisation de méthodes manuelles, renverser avec prudence la plaque de microtitration pour qu'elle décante ou qu'elle sèche ; appuyer sur les languettes intérieures du cadre en poussant vers l'intérieur pour empêcher les bandes de tomber.
9. Le lavage des plaques à microtitration est optimal avec un dispositif de lavage de plaques automatisé. L'équipement de lavage de plaques doit être correctement réglé, nettoyé et entretenu. Il est recommandé d'utiliser des dispositifs de lavage automatisés avec 96 ports. Des bandes factices à 8 puits peuvent être utilisées pour remplir la partie inutilisée du support pour les dosages utilisant une plaque partielle. Conserver et étiqueter les bandes déjà utilisées à cet effet.
10. Définir le volume de remplissage sur 300 µL/puits. Amorcer l'instrument avec le lavage de plaque. Pour les dispositifs de lavage à 96 ports, utiliser deux dispositifs de lavage à 3 cycles. Après le lavage initial à 3 cycles, tourner la plaque de 180 degrés et répéter la procédure. En cas d'utilisation d'un dispositif de lavage de bandes, réaliser un seul cycle de lavage sur la plaque et répéter la procédure cinq fois.
11. Après le dernier lavage, renverser la plaque de microtitration et la tapoter sur une surface absorbante. Vérifier que tous les puits sont vides.

Protocole du dosage

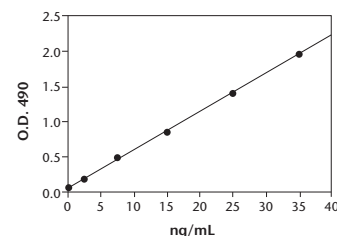
1. Retirer la plaque de microtitration de son sachet. À partir du nombre de spécimens à tester et de déterminations répliquées souhaitées (duplicats recommandés), calculer le nombre de bandes requises. (Chaque standard utilise deux puits, dont un puits pour la détermination du blanc du substrat.) Conserver les bandes inutilisées dans le sachet à fermeture par pression et glissière avec un déshydratant entre 2 et 8 °C (voir la section Informations sur la stabilité et la conservation).
2. Diluer les spécimens et les contrôles au 1:50 (2 %) avec le diluant d'échantillons.
3. Mélanger les standards, les contrôles et les spécimens avec minutie et ajouter 100 µL aux puits dupliqués. Préparer un puits avec 100 µL de diluant d'échantillons pour l'utiliser comme blanc de substrat. Préparer les puits dupliqués pour chacun des contrôles.
4. Couvrir la plaque (emballage alimentaire ou couvercle en plastique adhésif). Incuber pendant 3 heures à 37 °C.
5. Retirer avec précaution le couvercle en plastique et laver la plaque de microtitration avec le lavage de plaque.
6. Ajouter 100 µL d'anticorps de détection à tous les puits, excepté le puits du blanc du substrat. Couvrir et incuber à 37 °C pendant 1 heure.
7. Lors de l'incubation avec l'anticorps de détection, préparer le conjugué de travail en diluant le concentré du conjugué avec du diluant de conjugué. Voir le tableau 1 pour connaître les quantités à utiliser en fonction du nombre de bandes analysées.
8. Laver la plaque de microtitration avec le lavage de plaque.

9. Ajouter 100 µL de conjugué de travail à tous les puits, excepté le puits du blanc du substrat. Couvrir et incuber à température ambiante (entre 15 et 30 °C) pendant 30 minutes.
10. Lors de l'incubation avec le conjugué de travail, préparer le substrat de travail en dissolvant les tablettes de substrat dans le diluant de substrat. Voir le tableau 1 pour connaître les quantités à utiliser en fonction du nombre de bandes analysées. Agiter vigoureusement au vortex pour garantir une dissolution totale. Une fois préparé, le substrat de travail doit être utilisé dans les 30 minutes. Éviter toute exposition à la lumière.
11. Laver la plaque de microtitration avec le lavage de plaque.
12. Outre le puits de blanc de substrat, ajouter 100 µL de substrat de travail à tous les puits. Couvrir avec un couvercle en plastique neuf et laisser incuber la plaque dans l'obscurité à température ambiante (entre 15 et 30 °C) pendant 45 minutes.
13. Ajouter 100 µL de solution d'arrêt à chaque puits pour stopper la réaction.
14. Lire l'absorbance à 490 nm dans les 30 minutes.

TABLEAU 1. DOSAGE HER-2/neu : PRÉPARATION DES RÉACTIFS DE DOSAGE

Nb. de bandes utilisées	Concentré de conjugué	Diluant de conjugué	Tablettes de substrat	Diluant de substrat
1	20 µL	0,98 mL	1	4 mL
2	40 µL	1,96 mL	1	4 mL
3	60 µL	2,94 mL	1	4 mL
4	80 µL	3,92 mL	1	4 mL
5	100 µL	4,90 mL	2	8 mL
6	120 µL	5,88 mL	2	8 mL
7	140 µL	6,86 mL	2	8 mL
8	160 µL	7,84 mL	2	8 mL
9	180 µL	8,82 mL	3	12 mL
10	200 µL	9,80 mL	3	12 mL
11	220 µL	10,78 mL	3	12 mL
12	240 µL	11,76 mL	3	12 mL

Figure 1. Courbe standard d'échantillons



Évaluation des résultats

CONCENTRATION DES STANDARDS

Les anticorps utilisés dans ce dosage reconnaissent le domaine extracellulaire couplé à un ligand de la protéine HER-2/neu [5]. Cette forme de protéine HER-2/neu a été identifiée avec un poids moléculaire avoisinant 105 kDa. Les standards contenus dans la trousse sont calibrés en nanogrammes, qui prennent en compte ce poids moléculaire trouvé dans le sérum et qui sont préparés à partir d'une forme recombinée du fragment 105 kDa de la protéine HER-2/neu.

CONCENTRATIONS INCONNUES

- Calculer la moyenne des valeurs d'absorbance pour chaque standard, contrôle et dilution de spécimen afin d'obtenir les absorbances moyennes.
- Sur papier millimétré, tracer l'absorbance moyenne pour chaque standard sur l'axe des y par opposition à la concentration de la protéine HER-2/neu (ng/mL) sur l'axe des x, puis relier les points.
- Déterminer la concentration de la protéine HER-2/neu pour chaque dilution de spécimen par interpolation à partir de la courbe standard. Des logiciels (tels que SoftMax Pro™, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, États-Unis ; KC4™, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, États-Unis) peuvent simplifier ce processus. Utiliser un algorithme pour courbe quadratique (polynomial du second ordre).
- Remarque : ne pas assigner de puits de « blanc » à l'aide du logiciel car cela risquerait de soustraire les lectures moyennes du blanc de tous les autres puits. Cet algorithme permet de contrôler la qualité et de résoudre les problèmes afin de pouvoir examiner les valeurs d'absorbance reportées pour chaque puits sans modifier les données brutes.
- Les résultats des échantillons sont exprimés en nanogrammes par mL par lecture directe des valeurs de la courbe standard (ng/mL) comme indiquées sur les flacons et dans la section Produits fournis de la présente brochure. Pour des raisons de commodité, aucune correction mathématique de la dilution n'est requise pour les échantillons dilués au 1:50 car la concentration réelle dans les préparations standards se monte à 2 % du dosage étiqueté (c'est-à-dire qu'elles ont été pré-diluées au 1:50).

DILUTION DES ÉCHANTILLONS AVEC DES CONCENTRATIONS ÉLEVÉES

- Pour les échantillons produisant des valeurs d'absorbance (OD) excédant la plage de la courbe standard, il sera nécessaire de procéder à un dosage consécutif à des dilutions plus élevées.
- Pour préparer les dilutions supplémentaires, toujours commencer avec une dilution initiale au 1:50 (voir la section Préparation des échantillons), puis diluer en série au 1:2 dans le diluant d'échantillons. Exemple :

Dilution d'échantillons	Volume de la dilution précédente	Volume de diluant d'échantillons
1:100	0,5 mL au 1:50	0,5 mL
1:200	0,5 mL au 1:100	0,5 mL
1:400	0,5 mL au 1:200	0,5 mL
- Si des échantillons ayant subi une dilution supplémentaire produisent des valeurs OD supérieures à 0,3, ils doivent être redosés en utilisant un matériel moins dilué. Le facteur de correction de la dilution (voir l'étape 4 ci-dessous), lorsqu'il est multiplié par des résultats produits par une valeur OD faible, peut fausser l'estimation de la protéine HER-2/neu en la notant comme élevée.
- Les résultats produits par des échantillons ayant subi une dilution supplémentaire nécessiteront la correction des valeurs provenant du dosage pour toute dilution au-delà du 1:50. Exemple :

Dilution d'échantillons	Facteur de correction de la dilution (multiplier le résultat reporté par)
1:100	2
1:200	4
1:400	8

Contrôle de qualité du dosage

Veiller à ce que chaque dosage observe les paramètres de performance suivants.

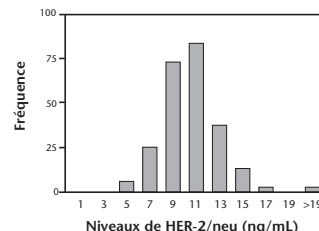
- Examiner les résultats des contrôles analysés dans le dosage afin de confirmer que les pourcentages de recouvrement se situent dans les plages attendues (notées dans la notice du produit) pour chaque niveau.
- Inspecter la plage dynamique de la courbe standard. Le standard de niveau 1 doit être compris entre 0,04 et 0,09 OD et le standard de niveau 6 entre 1,5 et 2,4 OD.
- Si le logiciel d'adaptation à la courbe est utilisé, vérifier le calcul de R². Il doit se situer entre 0,997 et 1,0. Si ces paramètres ne sont pas remplis, répéter l'analyse des échantillons dans un dosage consécutif.

Valeurs attendues INDIVIDUS EN BONNE SANTÉ

Comme pour tous les tests, chaque laboratoire doit établir sa propre plage de valeurs de référence. Sur une population de 241 femmes en bonne santé, 95 % des valeurs de la protéine HER-2/neu sérique représentent moins de 13,7 ng/mL. Aucune différence significative n'a été constatée pour les valeurs de HER-2/neu entre les femmes pré et post ménopausées. Pour cette même population, la limite supérieure de la normale

(moyenne + écart-type de 2) atteignait 14,7 ng/mL. L'analyse ROC confirme 15 ng/mL comme valeur seuil appropriée entre les niveaux de protéine HER-2/neu sérique normaux et élevés. La distribution des niveaux de protéine HER-2/neu sérique pour la population entière (n = 241) est présentée à la figure 2.

Figure 2. Distribution de la protéine HER-2/neu sérique à une population de femmes en bonne santé.



SURVEILLANCE DES PATIENTES ATTEINTES D'UN CANCER DU SEIN MÉTASTATIQUE

L'utilité clinique du dosage ELISA HER-2/neu dans la surveillance longitudinale des patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique a été évaluée à l'aide d'échantillons de sérum rétrospectifs prélevés sur des patientes atteintes d'un cancer du sein en phase terminale, sur une période de 6 à 12 mois, dans trois sites cliniques aux États-Unis. Cinquante-six patientes sous traitement dont le niveau d'oncoprotéines HER-2/neu sériques initial était élevé (15 ng/mL minimum) ont été soumises à des tests afin d'évaluer la correspondance des modifications de leurs niveaux de protéine HER-2/neu sérique avec les modifications de l'évolution clinique de leur maladie.

Une analyse visite après visite des résultats de l'étude est présentée dans le tableau 2. Les modifications du niveau de protéine HER-2/neu sérique d'une visite à l'autre ont été calculées pour chaque patiente. Ces modifications ont été réparties en deux groupes : le groupe I présentait des modifications de protéine HER-2/neu sérique qui correspondaient à l'évolution clinique de la maladie, à l'inverse du groupe II. L'état ou l'évolution clinique ont été déterminés par le médecin. La correspondance entre les modifications de HER-2/neu et l'état clinique a été déterminée comme suit : une augmentation de 20 % minimum depuis la dernière visite reflétait la progression de la maladie. Une augmentation inférieure à 20 % depuis la dernière visite reflétait l'absence de progression de la maladie au cours du traitement (y compris une maladie réactive ou stable). Les maladies stables et réactives ont été consolidées car toutes deux reflètent l'efficacité du traitement en cours. Le critère de 20 % était dérivé de la variabilité longitudinale chez les patientes normales (déterminé à partir des niveaux de protéine HER-2/neu sérique dans six échantillons en série prélevés sur 38 femmes en bonne santé).

TABEAU 2. CORRESPONDANCE DE L'ÉTAT DE LA MALADIE DES PATIENTES ATTEINTES D'UN CANCER DU SEIN MÉTASTATIQUE AVEC DES MODIFICATIONS DES NIVEAUX DE PROTÉINE HER-2/neu SÉRIQUE : VISITE APRÈS VISITE

Modification de HER-2/neu	Modification de l'état clinique		Total
	Progression	Absence de progression	
Augmentation ≥ à 20 %	52	33	85
Augmentation < à 20 %	55	96	151
Total	107	129	236

Concordance = 62,7 % (CI = 56,4 à 68,6 %)

Valeur prédictive : Absence de progression = 63,6 % (IC = 55,7 à 70,8 %)

Progression = 61,2 % (IC = 50,6 à 70,8 %)

Les figures suivantes présentent des exemples types de modifications des niveaux de protéine HER-2/neu sérique au fil du temps pour deux des 56 patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique participant à l'étude clinique. La figure 3 présente une patiente dont la maladie est réactive et la figure 4 une patiente avec une maladie progressive.

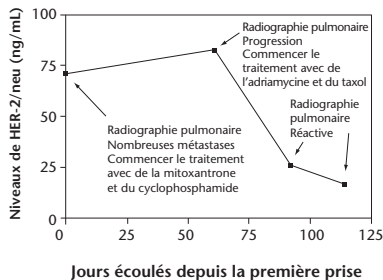


Figure 3. Surveillance d'une patiente de 38 ans atteinte d'un cancer du sein en phase IV avec ELISA HER-2/neu.

Des modifications longitudinales des niveaux de protéine HER-2/neu sérique correspondent à des modifications de l'état de la maladie.

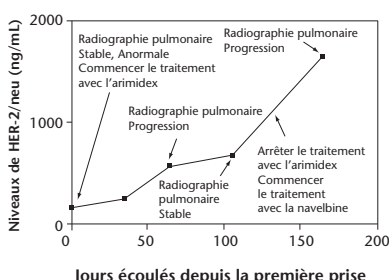


Figure 4. Surveillance d'une patiente de 74 ans atteinte d'un cancer du sein en phase IV avec ELISA HER-2/neu.

Des modifications longitudinales des niveaux de protéine HER-2/neu sérique correspondent à des modifications de l'état de la maladie.

Caractéristiques des performances non cliniques

IMPRÉCISION

L'imprécision a été déterminée en testant quatre échantillons de contrôle composés de trois contrôles basés sur une solution tampon et un pool de sérum humain. Trois différents lots de trousse ont été utilisés dans les trois laboratoires. Des déterminations triples par analyse pour chaque contrôle ont été déterminées dans 130 analyses. Une précision intra-série et totale a été calculée pour chaque contrôle selon le protocole NCCLS EP-5A. L'imprécision intra-série pour les trois sites et les lots de trousse était égale ou inférieure à 10 % CV avec une imprécision totale sur toutes les trouses et les sites comprise entre 10 et 17,7 % CV.

Échantillon de contrôle	Nb. d'analyses	Nb. de réplicats	Moyenne (ng/mL)	
Contrôle 1	130	385	24,5	
Contrôle 2	131	390	9,8	
Contrôle 3	131	386	3,3	
Sérum 4	130	385	9,5	
	Précision intra-série		Précision totale	
Échantillon de contrôle	Écart-type	% CV	Écart-type	% CV
Contrôle 1	1,46	6,0	2,62	10,7
Contrôle 2	0,69	7,0	1,03	10,4
Contrôle 3	0,34	10,2	0,59	17,7
Sérum 4	0,65	6,9	1,02	10,8

SENSIBILITÉ

Une concentration détectable minimale de l'analyte a été déterminée par une mesure répétée d'un échantillon de dose nul (diluant d'échantillons). L'écart moyen et l'écart-type du pourcentage de recouvrement apparent de HER-2/neu ont été calculés pour 230 déterminations réalisées sur une période de 20 jours entre trois différents lots de trousse et trois différents laboratoires. Après ajout de deux écarts-types à la dose recouvrée moyenne de HER-2/neu, la concentration détectable minimale a été déterminée à 1,5 ng de sérum p105/mL.

SPÉCIFICITÉ ANALYTIQUE

Réactions croisées. Le récepteur de facteur de croissance de l'épiderme (EGFr) est une molécule étroitement liée au récepteur de facteur de croissance HER-2/neu à une homologie de 88 % avec le domaine intracellulaire et de 44 % avec le domaine extracellulaire. Nous avons utilisé le dosage ELISA HER-2/neu avec un EGFr de 850 ng/mL. Ce matériel n'a produit aucun signal dans le dosage, ce qui indique que les immunoréactifs du système n'ont produit aucune réaction croisée avec l'EGFr.

Substances interférentes. L'anticorps humain anti-souris (HAMA, Human Anti-Mouse Antibody), trouvé dans de rares instances dans le sérum humain, possède le potentiel requis pour se coupler aux réactifs critiques dans les immunodosages, entraînant des signaux faussement positifs ou négatifs. Plusieurs

échantillons connus de sérum positifs à HAMA ainsi que des échantillons positifs au facteur rhumatoïde ont été testés dans le système. Aucun faux signal n'a été généré avec ces échantillons. Les réactifs du système ont été formulés pour bloquer ce type de fausse réactivité.

Des mesures de protéine HER-2/neu sérique pourraient être réalisées lorsque les patientes prennent des vitamines, des médicaments sans ordonnance ou suivent un traitement par chimiothérapie. Pour tester la possibilité que ces agents puissent interférer avec des déterminations précises de protéine HER-2/neu, des interférents exogènes potentiels ont été surchargés dans un sérum de contrôle positif contenant une concentration connue de protéine HER-2/neu et ont été testés par la suite dans le dosage. Certains constituants sériques courants ont également été analysés pour leur potentiel d'action comme interférents endogènes. Aucun des composants analysés n'a eu un effet sur le recouvrement de l'analyte. Voir le tableau 3.

PLAGE ANALYTIQUE

Le dosage ELISA HER-2/neu est capable de quantifier avec précision les niveaux de protéine HER-2/neu sérique dans des échantillons pré-dilués qui fournissent une réponse au dosage dans la plage comprise entre 1,5 et 35 ng de protéine p105 HER-2/neu par mL de sérum. Les échantillons qui produisent un signal dépassant la limite supérieure de la plage de courbe standard (35 ng/mL) doivent encore être dilués avec un diluant d'échantillons, puis retestés dans le dosage. Veiller à corriger le recouvrement reporté de protéine HER-2/neu pour les préparations de dilution supérieures à la dilution de routine au 1:50.

TABLEAU 3. INTERFÉRENTS ELISA POTENTIELS

INTERFÉRENTS POTENTIELS	CONCENTRATIONS DES TESTS	INTERFÉRENTS POTENTIELS	CONCENTRATIONS DES TESTS
ENDOGENES		MÉDICAMENTS EN VENTE LIBRE, ETC.	
Triglycérides (intralipine-20 %)	3 000,0 mg/dL	Paracétamol	200,0 µg/mL
Hémoglobine	1,0 g/dL	Aspirine	500,0 µg/mL
Immunoglobuline (gamma globuline)	6,0 g/dL	Ibuprofène	400,0 µg/mL
Albumine	6,5 g/dL	Caféine	100,0 µg/mL
Bilirubine	25,0 mg/dL		
Héparine	0,46 mg/mL	AGENTS CHIMIOTHÉRAPEUTIQUES	
		Aminoglutéthamide	398,0 µg/mL
		Bléomycine	0,16 U/mL
		Cisplatine	173,0 µg/mL
		Doxorubicine	51,8 µg/mL
		Cyclophosphamide	800,0 µg/mL
		Diéthylstilbestérol	23,0 µg/mL
		Estramustine	102,2 µg/mL
		Flutamide	10,0 µg/mL
		5-fluorouracile	1 600,0 µg/mL
		Lupron	15,0 µg/mL
		Méthotrexate	450,0 µg/mL
		Mitoxantrone	56,0 µg/mL
		Mitomycine C	73,0 µg/mL
		Megace	27,0 ng/mL
		Tamoxifène	1,4 µg/mL
		Vincristine	4,88 µg/mL
		Vinblastine	16,3 µg/mL
		Herceptin (Trastuzumab)	500 µg/mL
EXOGENES			
Vitamine A acétate trans rétinol	10,0 UI/mL		
Vitamine B1 Thiamine	3,0 µg/mL		
Vitamine B2 Riboflavine	3,4 µg/mL		
Vitamine B6 Pyroxide			
Chlorure d'hydrogène	4,0 µg/mL		
Vitamine B12	12,0 ng/mL		
Vitamine C Acide ascorbique	30,0 µg/mL		
Vitamine D2 Ergocalciférol	0,8 UI/mL		
Vitamine E Tocophérol Acétate	0,06 UI/mL		
Acide folique	0,8 µg/mL		
Niacine	40,0 µg/mL		

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Les immunodosages manuels comportent un risque de mesures erronées (recouvrement d'échantillons) suite à une variation de la durée d'incubation à laquelle les échantillons sont soumis dans chacune des étapes d'incubation. Tous les puits doivent bénéficier pour l'essentiel de la même durée d'incubation nécessaire pour chaque étape de réactif. Plus particulièrement, lors de l'ajout de standards, de contrôles et d'échantillons à des puits de la plaque, la durée entre l'ajout du premier échantillon et le dernier doit être de 15 minutes. Préparer tous les échantillons à l'avance. Il est vivement conseillé d'utiliser des pipeteurs semi-automatisés à plusieurs embouts pour raccourcir les délais de ces procédures. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser des embouts neufs à chaque ajout d'échantillon.

Les immunodosages utilisant des configurations soi-disant en sandwich, comme le présent système, sont soumis à des interférences et à de faux résultats engendrés par des échantillons contenant des agents immunoréactifs dirigés contre les anticorps de souris. HAMA, l'anticorps hétérophile et le facteur rhumatoïde constituent les principaux exemples de ces interférents. Des précautions ont été prises par le fabricant lors de la formulation des réactifs contenus dans ce système afin de réduire ou d'éliminer ces interférences. Procéder toutefois avec soin lors de l'évaluation des résultats du dosage qui peuvent ne pas correspondre à l'état clinique général de la patiente à la lumière de ces interférences possibles.

Il est possible qu'une patiente atteinte d'un cancer du sein diagnostiqué puisse comporter des niveaux de protéine HER-2/neu sérique situés dans la plage des niveaux observés chez des individus en bonne santé. Procéder avec prudence lors de l'interprétation des résultats de HER-2/neu. Les niveaux de protéine HER-2/neu sérique n'indiquent pas toujours la présence ou l'absence de maladie maligne. La valeur HER-2/neu doit être utilisée dans le cadre d'une évaluation clinique globale qui inclut des tests d'évaluation clinique et de diagnostic supplémentaires.

Résolution de problèmes

- Chaque dosage doit inclure les six (6) standards analysés en double à l'aide du protocole décrit dans la section Protocole détaillé. Des durées ou les températures d'incubation sensiblement différentes de celles spécifiées peuvent produire des résultats erronés.
- La forme de la courbe standard n'est pas linéaire et varie légèrement d'un dosage à l'autre. Pour réduire les données manuellement, appliquer une analyse point à point. En cas d'utilisation du logiciel ELISA, appliquer un algorithme adapté aux courbes quadratiques (polynomial du second ordre).
- Les duplicats de mauvaise qualité, s'ils sont accompagnés de valeurs élevées pour le standard zéro, indiquent un lavage insuffisant. Si toutes les instructions de la section Protocole détaillé ont été suivies à la lettre, ces résultats indiquent la nécessité de procéder à la maintenance du dispositif de lavage. Éviter également d'introduire des bulles dans les puits en pipétant des échantillons et des réactifs.
- Le puits du blanc du substrat doit afficher une valeur inférieure ou égale à 0,05 unités d'absorbance. Des valeurs plus élevées peuvent s'expliquer en partie par l'exposition du substrat de travail à la lumière avant ou pendant l'étape d'incubation. Le substrat de travail doit être utilisé dans les 30 minutes qui suivent la préparation.
- Un signal faible peut indiquer 1) que la plaque a séché entre les étapes. Ne pas laisser sécher la plaque. Ajouter le réactif suivant immédiatement après le lavage, ou 2) qu'un lavage incorrect a été effectué. S'assurer que le dispositif de lavage de plaques à microtitration a été correctement amorcé avec le lavage de plaque (voir la section Protocole détaillé).

Informations sur la stabilité et la conservation

Tous les réactifs inclus dans le dosage ELISA HER-2/neu ont été analysés pour tester leur stabilité. Les réactifs ne doivent pas être utilisés au-delà de leur date de péremption. Les réactifs de la trousse doivent être stockés entre 2 et 8 °C, à l'exception du concentré de lavage de plaque qui peut être stocké à température ambiante. Les plaques de dosage doivent être conservées fermées hermétiquement dans le sachet en aluminium d'origine avec le déshydratant. Une fois ouvert, le système fonctionne selon les spécifications indiquées pendant 4 semaines (30 jours) ou jusqu'à l'expiration de la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

Support technique

Tél: +1 617 492 3900 x502
email: oncogenetech@wilex.com



WILEX Inc.
Cambridge, MA 02140 USA



EMERGO EUROPE
Molenstraat 15
2513 BH, The Hague
The Netherlands
Tel: +31 (0)70 345 8570
Fax: +31 (0)70 346 7299

Verwendungszweck

Der HER-2/neu ELISA dient zur quantitativen Bestimmung des HER-2/neu Proteins im Serum von Frauen mit metastatischem Mammakarzinom. Der HER-2/neu ELISA ist zur Nachsorge und Überwachung von Patientinnen mit metastatischem Mammakarzinom vorgesehen, bei denen die Anfangskonzentration von HER-2/neu im Serum über 15 ng/mL liegt. Für das Management von metastatischem Mammakarzinom sind die HER-2/neu Werte zusammen mit den Ergebnissen klinischer und anderer Diagnosemethoden zu verwenden. Die klinische Verwendbarkeit der Messung von HER-2/neu im Serum als Prognoseindikator für ein frühes Rezidiv und für das Management von Patientinnen in Immunotherapie ist noch nicht vollständig etabliert.

IN VITRO DIAGNOSTIKUM

Verfahrensprinzip	Solid Phase (Festphasen)-Sandwich ELISA
Analytischer Bereich	0 ng/mL bis 35 ng/mL
Probentyp	Humanserum
Probentestvolumen	10,0 Mikroliter
Sensitivität	1,5 ng p105/mL Serum

Mit diesem Kit wird die Lizenz zu seiner Verwendung unter folgenden Patenten erworben: US-Patente 5,401,638 und 5,604,107; EP-Patente 0494135 und 0412116; Kanadisches Patent 2,026,250-8

Inhaltsverzeichnis

Verwendungszweck	12	Testverfahren	14
Hintergrund	12	Probenstandardkurve	15
Testprinzip	13	Bewertung der Ergebnisse	15
Zusammenfassung des Verfahrens	13	Assay-Qualitätskontrolle	15
Rückverfolgbarkeit der Standards	13	Sollwerte	15
Enthaltene Materialien	13	Nichtklinische Leistungsmerkmale	16
Sicherheits- und Warnhinweise	13	Fehlersuche	17
Nicht enthaltene, aber notwendige Materialien	14	Informationen zu Stabilität und Lagerung	17
Vorsichtsmassnahmen und Empfehlungen	14	Technischer Support	17
Probenvorbereitung	14	Literaturnachweise	51
Detailliertes Protokoll	14	Erklärung der Symbole	53

Hintergrund

Das HER-2/neu Oncogen, auch als c-erbB-2 bezeichnet, kodiert ein Protein mit einem Molekulargewicht von 185.000 Dalton (p185) und gehört zu einer Familie der Epithel-Wachstumsfaktorrezeptoren, die von ihrer Struktur her mit dem humanen Epidermis-Wachstumsfaktorrezeptor verwandt ist [1]. Das gesamte p185 HER-2/neu Protein besteht aus einer Cytoplasma-Domäne mit Tyrosinkinase-Aktivität, einer Transmembran-Domäne und einer extrazellulären Domäne (ECD), die von der Oberfläche von Brustkrebszellen abgegeben wird [2,3]. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die abgegebene ECD des HER-2/neu ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht zwischen 97 und 115 kDa ist, das als p195 bezeichnet wird [3,4]. Mit einem Assay [4], der gegen die externen Epitope des HER-2/neu Proteins gerichtete monoklonale Antikörper [5] verwendet, kann die ECD im Serum genau quantifiziert werden. Viele Publikationen zeigen, dass die ECD in das Blut normaler Individuen abgegeben wird und bei Frauen mit metastatischem Mammakarzinom in hohen Konzentrationen gemessen werden kann [4,6–26]. Viele dieser Serum HER-2/neu Studien haben die wesentlichen Daten von Gewebestudien bestätigt, dass erhöhte Expression des HER-2/neu ein Marker für eine schlechte Prognose, geringere Gesamtüberlebenschancen und biologische Aggressivität ist.

Jüngste wissenschaftliche Studien lassen erkennen, dass die ECD-Quantifizierung verschiedene wichtige klinische Anwendungen haben kann, darunter das Monitoring von Patientinnen mit metastatischem Mammakarzinom und das Monitoring von Brustkrebspatientinnen auf frühzeitiges Rezidiv [6–10,12,15,17–20,22–26]. Diese Berichte haben gezeigt, dass 30–50% der Frauen mit positiven HER-2/neu Tumoren bei der Erstdiagnose mit dem Fortschreiten zu metastatischem Mammakarzinom erhöhte Konzentrationen des HER-2/neu im Serum entwickeln [4,6–26]. Diese Studien haben auch gezeigt, dass im Monitoring die ECD-Serumkonzentrationen nach Operation mit dem klinischen Krankheitsverlauf korrelieren und die HER-2/neu Serumkonzentrationen mit Progression der Erkrankung steigen bzw. mit Reaktion auf die Therapie sinken [12,15,19,20,25,26]. Mehrere Berichte zeigen auch, dass erhöhte HER-2/neu Serumkonzentrationen bei Frauen mit metastatischem Mammakarzinom auftreten können, deren primärer Brusttumor nach der Immunohistochemie HER-2/neu negativ war [6,11,18,21,27]. Nach vielen immunohistochemischen und Serumstudien wird das HER-2/neu Protein in vielen Tumoren epithelischen

Ursprungs, darunter Lungen- [28], Prostata- [29], Pankreas- [30], Dickdarm- [31], Magen- [32], Eierstock- [33] und Leberzellkrebs [34], überexprimiert.

Patente zur Quantifizierung und Erkennung der ECD p105 Domäne (in den USA Patent-Nr. 5, 401 , 638; in Kanada Nr. 2, 026, 250-8; und in Europa Nr. 0494135) sowie Patente für die Quantifizierung und Erkennung des vollständigen p185 Moleküls (in den USA Patent-Nr. 5, 604 ,107 und in Europa Patent-Nr. 0412116) wurden erteilt. Ähnliche Patente sind in Japan anhängig.

Testprinzip

HER-2/neu ELISA ist in Sandwich Enzym-Immunoassay, der einen monoklonalen Maus-Antikörper für das Capture und einen anderen biotinylierten monoklonalen Maus-Antikörper für die Detektion des humanen HER-2/neu Proteins verwendet. Sowohl Capture- wie auch Detektor-Reagenz binden spezifisch an die extrazelluläre Domäne des HER-2/neu Proteins. Der Capture-Antikörper wurde auf der inneren Oberfläche der Mikrotiterplattenmulden immobilisiert. Für den Test wird ein entsprechendes Probenvolumen in der beschichteten Mulde inkubiert, damit das Antigen vom Capture-Antikörper gebunden werden kann. Das immobilisierte Antigen wird dann mit dem Detektor-Antiserum zur Reaktion gebracht. Zur Messung der an das Antigen gebundenen Menge an Detektor-Antikörper wird dieser mit einem Streptavidin/Meerrettichperoxidase-Konjugat gebunden, das dann die Umwandlung des chromogenen Substrats o-Phenylendiamin (OPD) zu einem farbigen Produkt katalysiert. Das farbige Reaktionsprodukt wird spektrophotometrisch quantifiziert und daraus die in der Probe enthaltene Menge an HER-2/neu Protein ermittelt.

Anweisungen hierzu finden Sie weiter unten in den Abschnitten Detailliertes Protokoll und Bewertung der Ergebnisse.

Zusammenfassung des Verfahrens

Schritte	Inkubation
1. Zugabe der Proben und Standards in die Testmulden	3 Stunden, 37°C
2. Waschung	
3. Zugabe des Detektor-Antikörpers in die Testmulden	1 Stunde, 37°C
4. Waschung	
5. Zugabe des Antikörper-Konjugats in die Testmulden	30 Minuten, RT*
6. Waschung	
7. Zugabe des Substrats in die Testmulden	45 Minuten, RT*
8. Zugabe der Stopplösung in die Testmulden	
9. Ablesen der Platte bei 490 nm	

*Raumtemperatur

Rückverfolgbarkeit der Standards

Der HER-2/neu ELISA wurde von WILEX Inc., Cambridge MA, 02140, USA entwickelt und kalibriert.

Die HER-2/neu ELISA-Standards werden gegen ein Master-Kalibratormaterial in Cambridge, MA kalibriert. Dieses Material, die HER-2/neu Master Kalibrator Charge R5345, besteht aus sechs flüssigen Reagenzien im Bereich von Null bis 35 ng/mL HER-2/neu p105 Protein. Die Massenbestimmungen für den HER-2/neu Master Kalibrator wurden durch Test des Kalibratormaterials im direkten Vergleich mit drei hochgereinigten HER-2/neu p105 Proteinproben vorgenommen. Die Massenäquivalente (Mol) der gereinigten Proben wurden durch quantitative Aminosäureanalyse bestimmt.

Enthaltene Materialien

Die folgenden Komponenten sind enthalten.

Mikrotiterplatte – gebrauchsfertige vorbeschichtete Mikrotiterplatte, mit 96 Testmulden (12 Streifen zu je 8 Mulden), in Folientasche mit Reißverschluss und Trockenmittelbeutel. Die Testmulden sind mit monoklonalem anti-HER-2/neu Proteinantikörper beschichtet.

HER-2/neu Standards – sechs (6) einzelne Fläschchen mit rekombinantem HER-2/neu p105. Die Standards sind in ng/mL kalibriert und etikettiert mit Werten, die das 50-fache der tatsächlichen Fläschchendosis betragen. Durch Zuordnung dieser Etikettenwerte zu einer Standardkurve müssen die angegebenen Werte nicht mehr für eine 1:50 verdünnte Probe (2% Serum in Puffer) korrigiert werden. Einzelheiten siehe Bewertung der Ergebnisse.

Standard Nr.	ng/mL	Volumina
6	35,0	1 mL
5	25,0	1 mL
4	15,0	1 mL
3	7,5	1 mL
2	2,5	1 mL
1	0,0	1 mL

Proben-Diluent – eine (1) Flasche mit BSA und 0,09% Natriumazid.

Detektor-Antikörper – eine (1) Flasche, gebrauchsfertig, enthält biotinylierten monoklonalen Maus-anti-HER-2/neu-Proteinantikörper in 0,01 M PBS (pH 7,4), Proteinstabilisator und 0,09% Natriumazid.

Konjugat-Diluent – eine (1) Flasche mit 0,01 M PBS (pH 7,4), BSA und 0,1% Chloracetamid.

Konjugat-Konzentrat – ein (1) Fläschchen mit 50X Streptavidin/Meerrettichperoxidase in Puffer. Muss für das Arbeitskonjugat mit Konjugat-Diluent auf 1X verdünnt werden. Siehe Tabelle 1.

Substrat-Diluent – 0,1 M Zitratpuffer (pH 5,0) und 0,01% H₂O₂ (Wasserstoffperoxid).

Substrat – ein (1) Fläschchen mit OPD Tabletten. Muss in Substrat-Diluent (1 Tablette/4 mL) aufgelöst werden, um das Arbeitssubstrat zu erhalten. Siehe Tabelle 1.

Stopplösung – eine (1) Flasche mit 2,5 N H₂SO₄ (Schwefelsäure).

Plattenwaschkonzentrat (20X) – eine (1) Flasche. Vor der Verwendung einen (1) Teil Konzentrat in 19 Teilen hochreinem Wasser verdünnen.

Sicherheits- und Warnhinweise



Mindergiftig!

R22 – Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.

S28 – Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel Wasser abwaschen.

Enthält Natriumazid

(Standards, Proben-Diluent, Detektor-Antikörper)

Mindergiftig!

R40 – Irreversibler Schaden möglich.

R43 – Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich.

S36/37 – Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung und -handschuhe tragen.

Enthält ortho-Phenylendiamindihydrochlorid

(Substrattabletten)

Reizend!

R36/38 – Reizt die Augen und die Haut.

S36/37/39 – Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.

S26 – Bei Berührung mit den Augen sofort mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.

Enthält Schwefelsäure

(Stopplösung)

Reizend!

R43 – Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich.

S24 – Berührung mit der Haut vermeiden.

S37 – Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe tragen.

Enthält Chloracetamid.

(Konjugat-Diluent und Konjugat-Konzentrat)

Nicht enthaltene, aber notwendige Materialien

- Trockenwärmeinkubator für konstant 37°C
- Pipettiervorrichtungen: 2–20 µL, 20–200 µL und 200–1000 µL Pipettiervorrichtungen mit Einwegspitzen
- Präzisions-Multistep-Pipettiervorrichtung
- Automatischer 96-Mulden-Mikrotiterplattenwäscher
- 12 x 75 mm Kulturröhrchen für die Probenvorbereitung
- Vortex-Mischer
- Mikrotiterplattenleser für die Messung der Extinktion in Platten mit 96 Mulden bei einer Wellenlänge von 490 nm
- 500 mL oder 1000 mL Messzylinder
- Reagenzbehälter
- Entionisiertes Wasser
- Plastikumschlag oder selbstklebende Plattenhüllen
- Flüssige Haushaltsbleiche zur Deaktivierung klinischer Proben und Dekontamination des Plattenwäschers
- Einweg-Papiertücher

Kontrollen: HER-2/neu ELISA-Kontrollen, bestehend aus rekombinatem p105 in Proben-Diluent, sind von WILEX Inc. erhältlich. Bestellung: HER-2/neu ELISA Controls, Teile-Nr. 06489884. Vor der Verwendung im Assay die Kontrollen 1:50 verdünnen. Volumen: je 0,5 mL. Lagerung bei 2–8°C.

Vorsichtsmassnahmen und Empfehlungen

- Die Komponenten bei 2–8°C lagern. Die Reagenzien vor starken Lichteinfall schützen. Keine der Kit-Komponenten darf gefrieren.
- Nach Ablauf des Verfallsdatums Kit-Reagenzien nicht mehr verwenden.
- Nur die mit dem Kit gelieferten Mikrotiter-Testmulden verwenden.
- Alle Reinigungsmittelreste von Glasgeräten abspülen.
- Nur entionisiertes Wasser der höchsten Reinheitsstufe verwenden.
- Reagenzien aus unterschiedlichen Kits nicht mischen.
- Die Puffer und Reagenzien in diesem Kit enthalten entweder Natriumazid oder Chloracetamid als Konservierungsmittel. Direkten Kontakt mit diesen Reagenzien unbedingt vermeiden.
- Die Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren oder verschlucken.
- Während der Tests oder beim Umgang mit Proben oder Reagenzien nicht rauchen, essen oder trinken.
- Humanproben können mit Infektionserregern kontaminiert sein. Nicht verschlucken, in offene Wunden bringen, oder Aerosole einatmen. Schutzhandschuhe tragen und biologische Proben ordnungsgemäß entsorgen.
- Die Substrat-Tabletten nicht mit den Fingern berühren oder in Kontakt mit Haut, Metall oder Oxidantien bringen. OPD-haltige Lösungen den Vorschriften entsprechend entsorgen.
- Beim Umgang mit der Stopplösung (2,5 N Schwefelsäure) Einweghandschuhe und Augenschutz tragen.
- Am Ende eines jeden Arbeitstages alle Arbeitslösungen (Plattenwaschlösung, Konjugat, Substrat) entsorgen.
- Für jeden Assay frische Arbeitslösungen ansetzen.

Probenvorbereitung

Vor dem Test muss für Proben (und Kontrollen) eine Anfangsverdünnung von 1:50 mit Proben-Diluent angesetzt werden. Vor dem Verdünnen ausgeflocktes Material durch Mikrozentrifugation aus den Proben entfernen. Die Röhrchen etikettieren und in jedes zuerst 0,98 mL Proben-Diluent, dann 0,02 mL Probe bzw. Kontrolle pipettieren. Sanft durchmischen; dabei darauf achten, dass die verdünnte Probe nicht schäumt. Verdünnte Proben und Kontrollen können in verschlossenen Röhrchen bis zu einer Woche bei 2–8°C, und sechs Monate bei –20°C gelagert werden. Vor Licht schützen. Gegebenenfalls müssen manche Proben bei höherer Verdünnung erneut getestet werden. Proben, die bei 2–8°C gelagert wurden und Anzeichen von Kontamination zeigen, entsorgen. Eine neue Verdünnung aus Serum ansetzen.

Detailliertes Protokoll

EMPFOHLENES VORGEHEN

1. Die Reagenzien dürfen nur in der angegebenen Reihenfolge zugegeben werden.
2. Alle sechs (6) Standards und Testproben als Duplikate abarbeiten.

3. Vor der Verwendung alle Reagenzien auf Raumtemperatur (15–30°C) äquilibrieren.
4. Von jedem Reagenz nur so viel entnehmen, wie für die verwendeten Testmulden benötigt wird. Für jeden Streifen mit 8 Mulden 1 mL Detektor-Antikörper, Konjugat usw. entnehmen.
5. Ein Plattenbelegungsplan hilft dabei, die Mulden für Proben, Standards und Kontrollen festzulegen.
6. Der Transfer von Proben, Standards und Kontrollen aus den Verdünnungsröhrchen in die Testmulden kann durch halbautomatische Mehrkanal-Pipettiervorrichtungen vereinfacht werden. Geräteempfehlungen erhalten Sie von Technischen Kundendienst.
7. Vorbereitung der Plattenwaschlösung
 - a. Vor der Verwendung kaltes Plattenwaschkonzentrat auf Raumtemperatur (15–30°C) äquilibrieren. Darauf achten, dass alle Kristalle gelöst sind. Wenn gewünscht, auf 37°C erwärmen und gut durchmischen.
 - b. Einen (1) Teil Plattenwaschkonzentrat mit 19 Teilen destilliertem oder entionisiertem Wasser verdünnen. Gut durchmischen. Diese Lösung ist die Plattenwaschlösung. Die benötigte Gesamtmenge ist abhängig von der verwendeten Waschmethode bzw. dem verwendeten Waschgerät. Etwa 1 L dieser Lösung ist erforderlich, um einen Waschautomaten zu füllen und eine Mikrotiterplatte zu waschen; bei manueller Waschung werden für jede Mikrotiterplatte etwa 700 mL Lösung benötigt.
 - c. Die Plattenwaschlösung muss jeden Tag frisch angesetzt werden. Plattenwaschlösung nicht lagern.
8. Bei manueller Waschung die Mikrotiterplatte vorsichtig zum Abtropfen oder Abtupfen umdrehen; dabei die seitlichen Nasen am Rahmen nach innen drücken, damit die Streifen nicht herausfallen.
9. Für das Waschen der Mikrotiterplatten ist ein Plattenwaschautomat am besten geeignet. Die Plattenwaschausrüstung muss richtig eingestellt, gereinigt und gewartet werden. Empfohlen werden Waschautomaten mit 96 Ports. Mit leeren 8-Mulden-Streifen können bei Assays, die nur einen Teil der Platte nutzen, nicht genutzte Teile des Halters gefüllt werden. Für diesen Zweck können früher verwendete Streifen aufgehoben und entsprechend mit Etiketten versehen werden.
10. Das Füllvolumen auf 300 µL/Mulde einstellen. Das Gerät mit Plattenwaschlösung füllen. Für Waschautomaten mit 96 Ports zwei Waschgänge mit je 3 Zyklen verwenden. Nach dem ersten 3-Zyklus-Waschgang die Platte um 180 Grad drehen und den Waschvorgang wiederholen. Bei Streifenwaschgeräten einen Waschzyklus über die Platte durchführen und weitere 5 Mal wiederholen.
11. Nach dem letzten Waschgang die Mikrotiterplatte umdrehen und gegen eine absorbierende Fläche klopfen. Durch Augenschein überprüfen, dass alle Mulden leer sind.

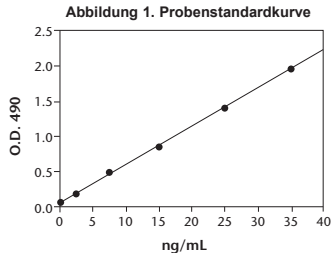
Testverfahren

1. Die Mikrotiterplatte aus dem Beutel herausnehmen. Anhand der Zahl der zu testenden Proben und gewünschten Replikate (Duplikate werden empfohlen) die Zahl der benötigten Streifen ermitteln. (Jeder Standard erfordert zwei Mulden; eine Mulde wird für die Substrat-Leerbestimmung benötigt.) Nicht benötigte Streifen im Reißverschlussbeutel mit Trockenmittel bei 2–8°C aufbewahren (siehe Informationen zu Stabilität und Lagerung).
2. Proben und Kontrollen 1:50 (2%) mit Proben-Diluent verdünnen.
3. Standards, Kontrollen und Proben gründlich durchmischen und 100 µL in zwei Mulden pipettieren. In eine Mulde 100 µL Proben-Diluent für die Substrat-Leerbestimmung pipettieren. Für jede Kontrolle zwei Mulden vorsehen.
4. Die Platte abdecken (Frischhaltefolie oder selbstklebender Plastikdeckel). 3 Stunden bei 37°C inkubieren.
5. Vorsichtig den Plastikdeckel abnehmen und die Mikrotiterplatte mit Plattenwaschlösung waschen.
6. In alle Mulden mit Ausnahme der Substrat-Leerbestimmungs-Mulde 100 µL Detektor-Antikörper pipettieren. Abdecken und 1 Stunde lang bei 37°C inkubieren.
7. Während der Inkubation mit Detektor-Antikörper das Arbeitskonjugat vorbereiten; dazu das Konjugat-Konzentrat mit Konjugat-Diluent verdünnen. Die für die Anzahl der verwendeten Streifen benötigte Menge entnehmen Sie bitte der Tabelle 1.
8. Die Mikrotiterplatte mit Plattenwaschlösung waschen.
9. In alle Mulden mit Ausnahme der Substrat-Leerbestimmungs-Mulde 100 µL Arbeitskonjugat pipettieren. Abdecken und bei Raumtemperatur (15–30°C) 30 Minuten lang inkubieren.
10. Während der Inkubation mit Arbeitskonjugat das Arbeitssubstrat vorbereiten; dazu Substrattabletten in Substrat-Diluent auflösen. Die für die Anzahl der verwendeten Streifen benötigte Menge entnehmen Sie bitte der Tabelle 1. Gründlich verwirbeln, um vollständiges Auflösen zu gewährleisten. Nach dem Ansetzen muss das Arbeitssubstrat innerhalb von 30 Minuten verwendet werden. Vor Licht schützen.
11. Die Mikrotiterplatte mit Plattenwaschlösung waschen.

- In alle Mulden, auch die Substrat-Leerbestimmungs-Mulde, je 100 µL Arbeitssubstrat pipettieren. Mit einem frischen Plastikdeckel abdecken und die Platte im Dunkeln bei Raumtemperatur (15–30°C) 45 Minuten lang inkubieren.
- In jede Position 100 µL Stopplösung pipettieren, um die Reaktion zu stoppen.
- Innerhalb von 30 Minuten die Extinktion bei 490 nm messen.

TABELLE 1. HER-2/neu ASSAY – VORBEREITUNG DER ASSAY-REAGENZIEN

Anzahl verwendeter Streifen	Konj. Konzentrat	Konj. Diluent	Substrattabletten	Substrat-Diluent
1	20 µL	0,98 mL	1	4 mL
2	40 µL	1,96 mL	1	4 mL
3	60 µL	2,94 mL	1	4 mL
4	80 µL	3,92 mL	1	4 mL
5	100 µL	4,90 mL	2	8 mL
6	120 µL	5,88 mL	2	8 mL
7	140 µL	6,86 mL	2	8 mL
8	160 µL	7,84 mL	2	8 mL
9	180 µL	8,82 mL	3	12 mL
10	200 µL	9,80 mL	3	12 mL
11	220 µL	10,78 mL	3	12 mL
12	240 µL	11,76 mL	3	12 mL



Bewertung der Ergebnisse KONZENTRATION DER STANDARDS

Die in diesem Assay verwendeten Antikörper erkennen die extrazelluläre ligand-bindende Domäne des HER-2/neu Proteins [5]. Bei dieser Form des HER-2/neu wurde ein Molekulargewicht von etwa 105 kDa gefunden. Die Standards im Kit sind in Nanogramm kalibriert – damit wird dieses im Serum gefundene Molekulargewicht berücksichtigt – und werden aus einer rekombinanten Form des 105 kDa Fragments des HER-2/neu hergestellt.

KONZENTRATION UNBEKANNTER PROBEN

- Den Mittelwert der Extinktionswerte für jeden Standard, jede Kontrolle und jede Probenverdünnung ermitteln.
- Auf Diagrammpapier die mittlere Extinktion für jeden Standard auf der Y-Achse gegen die Konzentration des HER-2/neu Proteins (ng/mL) auf der X-Achse auftragen und die Punkte verbinden.
- Durch Interpolation von der Standardkurve die Konzentration des HER-2/neu Proteins für jede Probenverdünnung bestimmen. Zur Vereinfachung dieses Verfahrens sind Softwarepakete erhältlich (zum Beispiel SoftMax Pro™, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA; KC4™, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). Eine quadratische Gleichung (Polynom zweiter Ordnung) verwenden.
- Hinweis: Bei Verwendung von Software keine "Leerbestimmungs"-Mulden zuweisen. Dadurch würde die durchschnittliche Leermessung von allen anderen Mulden subtrahiert. Für Qualitätskontrolle und Fehlersuche ist es nützlich, die für alle Mulden gemessenen Extinktionswerte ohne Korrekturen der Rohdaten überprüfen zu können.
- Probenresultate werden in Nanogramm pro Milliliter direkt aus den Standardkurvenwerten (ng/mL), die auf den Fläschchen und im Abschnitt Enthaltene Materialien angegeben sind, abgelesen. Eine mathematische Verdünnungskorrektur ist für 1:50 verdünnte Proben nicht notwendig, da die tatsächliche Konzentration in den Standardpräparationen 2% der auf dem Etikett angegebenen Konzentration beträgt (d.h. sie wurden 1:50 vorverdünnt).

VERDÜNNUNG VON PROBEN MIT HOHEN KONZENTRATIONEN

- Für Proben mit Extinktionswerten (OD) über dem Bereich der Standardkurve ist ein weiterer Test mit höherer Verdünnung erforderlich.
- Für weitere Verdünnungen immer mit einer Anfangsverdünnung 1:50 beginnen (siehe Probenvorbereitung) und seriell 1:2 mit Proben-Diluent weiter verdünnen. Beispiel:

Probenverdünnung	Volumen der vorherigen Verdünnung	Volumen an Proben-Diluent
1:100	0,5 mL von 1:50	0,5 mL
1:200	0,5 mL von 1:100	0,5 mL
1:400	0,5 mL von 1:200	0,5 mL

- Stärker verdünnte Proben, die OD-Werte kleiner als 0,3 liefern, müssen mit weniger stark verdünntem Material noch einmal getestet werden. Der Verdünnungskorrekturfaktor (siehe unten, Schritt 4) kann, wenn er mit dem Ergebnis so niedriger OD-Messungen multipliziert wird, eine falsch hohe HER-2/neu Protein-Bewertung ergeben.

- Die Ergebnisse von Tests mit einer Verdünnung größer als 1:50 müssen rechnerisch korrigiert werden.

Beispiel:

Probenverdünnung	Verdünnungskorrekturfaktor (Messergebnis multiplizieren mit)
1:100	2
1:200	4
1:400	8

Assay-Qualitätskontrolle

Jeder Assay sollte die folgenden Leistungskriterien erfüllen.

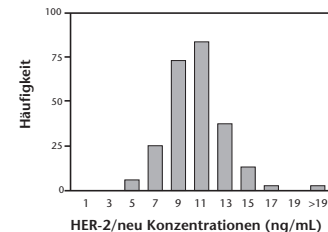
- Die Ergebnisse der im Assay abgearbeiteten Kontrollen dahin überprüfen, dass die Wiederfindungsraten für jeden Level innerhalb der Sollwertbereiche (in der Produktbeilage angegeben) liegen.
- Den dynamischen Bereich der Standardkurve überprüfen. Standard Level 1 sollte zwischen 0,04 und 0,09 OD, und Standard Level 6 zwischen 1,5 und 2,4 OD liegen.
- Bei Verwendung von Kurvenanpass-Software die Berechnung von R² überprüfen. Der Wert sollte zwischen 0,997 und 1,0 liegen. Wenn eines dieser Kriterien nicht erfüllt ist, sollte die Probe erneut getestet werden.

Sollwerte

GESUNDE PERSONEN

Wie bei allen Tests sollte jedes Labor seine eigenen Referenzbereiche aufstellen. In einer Population aus 241 gesunden Frauen lagen 95% der Serum-HER-2/neu Proteinwerte unter 13,7 ng/mL. Es gab keinen nennenswerten Unterschied in den HER-2/neu Werten zwischen Frauen vor und nach der Menopause. Auf der Grundlage dieser Population lag der obere Grenzwert des Normalen (Mittelwert + 2SD) bei 14,7 ng/mL. Die ROC-Analyse bestätigt 15 ng/mL als geeigneten Grenzwert zwischen normalen und erhöhten HER-2/neu Serumproteinkonzentrationen. Abbildung 2 zeigt die Verteilung der HER-2/neu Serumkonzentrationen für die gesamte Population (n = 241).

Abbildung 2. Verteilung des HER-2/neu Proteins im Serum in einer Population gesunder Frauen.



MONITORING VON PATIENTINNEN MIT METASTATISCHEM MAMMAKARZINOM

Die klinische Bedeutung des HER-2/neu ELISA für das longitudinale Monitoring von Patientinnen mit metastatischem Mammakarzinom wurde anhand retrospektiver Serumproben von Patientinnen mit Brustkrebs im Spätstadium über eine 6- bis 12-monatige Periode an drei Kliniken in den Vereinigten Staaten bewertet. 56 Patientinnen in Therapie, bei denen zunächst die HER-2/neu Onkoproteinkonzentration im Serum erhöht war (15 ng/mL oder höher), wurden daraufhin beobachtet, ob die Veränderungen der HER-2/neu Serumkonzentrationen mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung korrelierten.

Eine visitenweise Analyse der Studienergebnisse ist in Tabelle 2 dargestellt. Die Veränderungen der HER-2/neu Serumkonzentrationen von einer Visite zur nächsten wurden für jede Patientin berechnet. Diese Veränderungen wurden in zwei Gruppen eingeteilt: Bei Gruppe I verliefen die Veränderungen der HER-2/neu Serumkonzentrationen parallel zum klinischen Verlauf der Erkrankung, bei Gruppe II verliefen sie nicht parallel. Der klinische Verlauf oder Status wurde vom behandelnden Arzt bestimmt. Die Korrelation der HER-2/neu Veränderungen zum klinischen Status wurde wie folgt bestimmt: ein Anstieg um 20% oder mehr gegenüber der letzten Visite spiegelte eine Progression der Erkrankung wider. Ein Anstieg um weniger als 20% gegenüber der letzten Visite bedeutete fehlende Erkrankungsprogression während der Therapie (einschließlich Ansprechen auf die Therapie oder stabiler Status). Stabil und Ansprechen wurden zusammengefasst, weil beide auf die Effektivität einer laufenden Therapie zurückzuführen sind. Das 20% Kriterium wurde aus der longitudinalen Variabilität in normalen Patienten abgeleitet (ermittelt aus den HER-2/neu Serumkonzentrationen in 6 seriellen Proben von jeder der 38 gesunden Frauen).

TABELLE 2. ZUSAMMENHANG ZWISCHEN KRANKHEITSTATUS VON PATIENTINNEN MIT METASTATISCHEM MAMMAKARZINOM UND VERÄNDERUNGEN DER HER-2/neu SERUMKONZENTRATIONEN: VISITE-ZU-VISITE

HER-2/neu Veränderung	Veränderung des klinischen Status		Gesamt
	Progression	Keine Progression	
≥ 20% Erhöhung	52	33	85
< 20% Erhöhung	55	96	151
Gesamt	107	129	236

Konkordanz = 62,7% (CI = 56,4 bis 68,6%)

Vorhersagewert: fehlende Progression = 63,6% (CI = 55,7 bis 70,8%)

Progression = 61,2% (CI = 50,6 bis 70,8%)

Nachfolgend typische Beispiele für Veränderungen in HER-2/neu Serumkonzentrationen im Zeitverlauf für zwei der 56 Patientinnen mit metastatischem Mammakarzinom aus der klinischen Studie. Abbildung 3 zeigt eine Patientin mit Reaktion auf die Therapie, und Abbildung 4 eine Patientin mit progressiver Erkrankung.

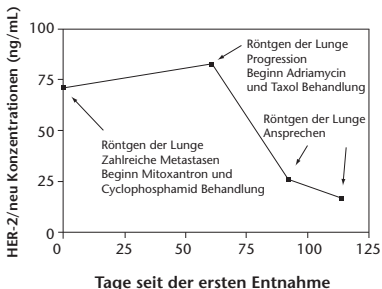


Abbildung 3. Monitoring einer 38-jährigen Patientin mit Brustkrebs Stadium IV mit dem HER-2/neu ELISA. Longitudinale Veränderungen der HER-2/neu Serumkonzentrationen korrelieren mit Änderungen im Krankheitsstatus.

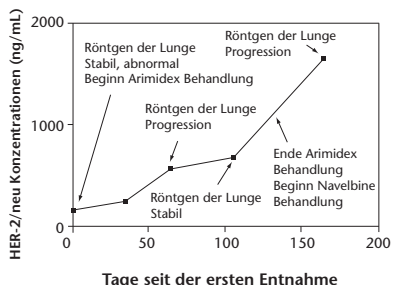


Abbildung 4. Monitoring einer 74-jährigen Patientin mit Brustkrebs Stadium IV mit dem HER-2/neu ELISA. Longitudinale Veränderungen der HER-2/neu Serumkonzentrationen korrelieren mit Änderungen im Krankheitsstatus.

Nichtklinische Leistungsmerkmale

UNGENAUIGKEIT

Die Ungenauigkeit wurde durch Testen von vier Kontrollproben – drei Kontrollen auf Pufferbasis und einem Humanserumpool – ermittelt. In jedem der drei Labors wurden drei unterschiedliche Kitchargen verwendet. In 130 Ansätzen wurden für jede Kontrolle Triplikate abgearbeitet. Für jede Kontrolle wurde die intra-Assay- und die Gesamtpräzision nach dem NCCLS EP-5A Protokoll berechnet. Die intra-Assay-Ungenauigkeit für alle drei Labors und Kitchargen betrug 10% CV oder weniger, mit einer Gesamt-Ungenauigkeit über alle Kits und Labors zwischen 10 und 17,7% CV.

Kontrollprobe	Anzahl Versuche	Anzahl Replikate	Mittelwert (ng/mL)	
Kontrolle 1	130	385	24,5	
Kontrolle 2	131	390	9,8	
Kontrolle 3	131	386	3,3	
Serum 4	130	385	9,5	

Kontrollprobe	Intra-Assay-Präzision		Gesamt-Präzision	
	Std Abw	% CV	Std Abw	% CV
Kontrolle 1	1,46	6,0	2,62	10,7
Kontrolle 2	0,69	7,0	1,03	10,4
Kontrolle 3	0,34	10,2	0,59	17,7
Serum 4	0,65	6,9	1,02	10,8

SENSITIVITÄT

Die nachweisbare Mindestkonzentration des Analyten wurde durch wiederholte Messung einer Null-Dosis-Probe (Proben-Diluent) ermittelt. Die mittlere und die Standardabweichung der scheinbaren Wiederfindung von HER-2/neu wurden für 230 Messungen, die während 20 Tagen mit drei verschiedenen Kitchargen in drei verschiedenen Labors vorgenommen wurden, berechnet. Nach Addition von zwei Standardabweichungen zur mittleren wiedergefundenen HER-2/neu Dosis betrug die nachweisbare Mindestkonzentration 1,5 ng p105/mL Serum.

ANALYTISCHE SPEZIFITÄT

Kreuzreaktivität Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFr) ist ein dem HER-2/neu Wachstumsfaktorrezeptor nahe verwandtes Molekül mit 88% Homologie zur intrazellulären Domäne und 44% Homologie zur extrazellulären Domäne. Wir prüften den HER-2/neu ELISA mit EGFr bei 850 ng/mL. Dieses Material ergab kein Signal im Assay, was darauf hinweist, dass es keine Kreuzreaktion der Immunoagenzien im Test mit EGFr gibt.

Störende Substanzen. In seltenen Fällen findet man Human-Anti-Mause-Antikörper (HAMA) im Humanserum, der an die kritischen Reagenzien in Immunoassays binden und dadurch falsch positive oder falsch negative Signale auslösen kann. Mehrere bekannt HAMA-positive Serumproben, wie auch Rheumafaktor-positive Proben wurden in dem Gerät getestet. Diese Proben lieferten keine falschen Signale. Die Formulierung der Testreagenzien des Geräts wurden so gewählt, dass derartige falsche Reaktivitäten blockiert werden.

HER-2/neu Serummessungen können durchgeführt werden, während die Patientin Vitamine oder frei erhältliche Medikamente einnimmt oder sich einer Chemotherapie unterzieht. Um die Möglichkeit der Störung genauer HER-2/neu Messungen durch solche Substanzen zu prüfen, wurden mögliche exogene störende Substanzen einem positiven Kontrollserum mit einer bekannten HER-2/neu Konzentration zugegeben und im Assay getestet. Einige übliche Serumbestandteile wurden ebenfalls auf ihr Potential als endogene störende Substanzen untersucht. Keine der getesteten Substanzen hatte Auswirkungen auf die Analyt-Wiederfindung. Siehe Tabelle 3.

ANALYTISCHER BEREICH

Der HER-2/neu ELISA ermöglicht die genaue Quantifizierung von HER-2/neu Serumkonzentrationen in vorverdünnten Proben, die Testergebnisse im Bereich von 1,5 bis 35 ng p105 HER-2/neu Protein pro mL Serum liefern. Proben, die ein Ergebnis oberhalb des oberen Grenzwertes des Standardkurvenbereiches (35 ng/mL) liefern, müssen mit Proben-Diluent weiter verdünnt und erneut getestet werden. Bei Verdünnungen größer als die routinemäßige Verdünnung von 1:50 muss die gemessene HER-2/neu Proteinwiederfindung korrigiert werden.

TABELLE 3. MÖGLICHE ELISA INTERFERENTIIEN

MÖGLICHE STÖRENDE TESTKONZENTRATIONEN SUBSTANZ	MÖGLICHE STÖRENDE TESTKONZENTRATIONEN SUBSTANZ
ENDOGEN	FREIE MEDIKAMENTE USW.
Triglyceride 3000,0 mg/dL (Intralipin-20%)	Acetaminophen 200,0 µg/mL
Hämoglobin 1,0 g/dL	Aspirin 500,0 µg/mL
Immunglobulin 6,0 g/dL (Gammaglobulin)	Ibuprofen 400,0 µg/mL
Albumin 6,5 g/dL	Koffein 100,0 µg/mL
Bilirubin 25,0 mg/dL	
Heparin 0,46 mg/mL	
EXOGEN	CHEMOTHERAPEUTIKA
Vitamin A trans-Retinolacetat 10,0 IU/mL	Aminoglutethamid 398,0 µg/mL
Vitamin B1 Thiamin 3,0 µg/mL	Bleomycin 0,16 U/mL
Vitamin B2 Riboflavin 3,4 µg/mL	Cis-Platin 173,0 µg/mL
Vitamin B6 Pyroxid HCL 4,0 µg/mL	Doxorubicin 51,8 µg/mL
Vitamin B12 12,0 ng/mL	Cyclophosphamid 800,0 µg/mL
Vitamin C Ascorbinsäure 30,0 µg/mL	Diethylstilbesterol 23,0 µg/mL
Vitamin D2 Ergocalciferol 0,8 IU/mL	Estramustin 102,2 µg/mL
Vitamin E Tocopherolacetat 0,06 IU/mL	Flutamid 10,0 µg/mL
Folsäure 0,8 µg/mL	5-Fluoruracil 1600,0 µg/mL
Niacin 40,0 µg/mL	Lupron 15,0 µg/mL
	Methotrexat 450,0 µg/mL
	Mitoxantron 56,0 µg/mL
	Mitomycin C 73,0 µg/mL
	Megace 27,0 ng/mL
	Tamoxifen 1,4 µg/mL
	Vincristin 4,88 µg/mL
	Vinblastin 16,3 µg/mL
	Herceptin (Trastuzumab) 500 µg/mL

VERFAHRENSEINSCHRÄNKUNGEN

Bei manuell durchgeführten Immunoassays besteht die Gefahr falscher Messungen (Probenwiederfindung) infolge unterschiedlicher Inkubationszeiten in den einzelnen Inkubationsschritten. Alle Testmulden sollten im Wesentlichen die gleiche, für den jeweiligen Schritt erforderliche Inkubationszeit erhalten. Insbesondere beim Zugabe von Standards, Kontrollen und Proben in die Testmulden in der Platte muss darauf geachtet werden, dass die Zugaben innerhalb von maximal 15 Minuten abgeschlossen ist. Alle Proben vorher vorbereiten. Halbautomatische Multipetten werden dringend empfohlen, um die Pipettierzeiten so kurz wie möglich zu halten. Zur Vermeidung von Kreuzkontamination für jede Probenzugabe frische Spitzen verwenden.

Immunoassays mit Sandwich-Architektur wie dieser Assay sind empfindlich gegenüber störenden Substanzen und falschen Ergebnissen durch Proben, die immunoreaktive Substanzen gegen Maus-Antikörper enthalten. HAMA, heterophile Antikörper und Rheumafaktoren sind die häufigsten Beispiele für solche störenden Substanzen. Der Hersteller hat bei der Formulierung der in diesem Test verwendeten Reagentien jedoch alles unternommen, um solche Störungen auf ein Minimum zu reduzieren oder ganz zu eliminieren. Bei der Bewertung von Testergebnissen, die mit dem klinischen Gesamtstatus der Patientin nicht übereinstimmen, ist angesichts dieser möglichen Störungen Vorsicht geboten.

Es ist möglich, dass bei einer Patientin mit bestätigtem Brustkrebs die HER-2/neu Proteinkonzentrationen im Serum in dem Bereich liegen, der bei gesunden Personen gemessen wird. HER-2/neu Ergebnisse mit sind mit Vorsicht zu interpretieren. Die HER-2/neu Serumkonzentrationen belegen nicht immer Vorliegen oder Fehlen einer malignen Erkrankung. Der HER-2/neu Wert sollte als Teil einer klinischen Gesamtbewertung verwendet werden, die auch zusätzliche klinische Befunde und Diagnosetests beinhaltet.

Fehlersuche

- Jeder Assay muss die sechs (6) Standards enthalten, die in doppelten Tests nach dem im Abschnitt Detailliertes Protokoll beschriebenen Protokoll durchgeführt wurden. Deutlich von den Vorgaben abweichende Inkubationszeiten oder Temperaturen können zu falschen Ergebnissen führen.
- Die Standardkurve verläuft nicht linear und variiert leicht von Assay zu Assay. Für die Datenreduktion von Hand Punkt-zu-Punkt-Graphiken anwenden. Bei der Verwendung von ELISA Software eine quadratische Gleichung (Polynom zweiter Ordnung) anwenden.
- Schlechte Duplikate, zumal wenn sie mit erhöhten Werten für den Null-Standard einhergehen, deuten auf mangelhafte Waschung hin. Wenn alle Anweisungen des Abschnitts Detailliertes Protokoll genau befolgt wurden, weisen solche Ergebnisse darauf hin, dass der Wäscher gewartet werden muss. Bei der Pipettierung von Proben und Reagenzien darauf achten, dass sich keine Blasen in den Testmulden bilden.
- Das Messergebnis der Substrat-Leerbestimmungs-Mulde sollte höchstens 0,05 Extinktionseinheiten betragen. Eine mögliche Ursache für höhere Werte ist Lichteinwirkung auf das Arbeitssubstrat vor oder während der Inkubation. Das Arbeitssubstrat muss nach der Vorbereitung innerhalb von 30 Minuten verwendet werden.
- Ein geringes Signal weist darauf hin, 1) dass die Platte zwischen zwei Schritten trocken geworden ist. Die Platte darf nicht austrocknen. Das nächste Reagenz unmittelbar nach der Waschung zugeben; oder 2) dass die Platte nicht richtig gewaschen wurde. Darauf achten, dass der Mikrotiterplattenwäscher richtig mit Plattenwaschlösung gespült wurde (siehe Detailliertes Protokoll).

Informationen zu Stabilität und Lagerung

Alle im HER-2/neu ELISA enthaltenen Reagenzien wurden auf Stabilität getestet. Reagenzien nicht nach Ablauf des angegebenen Verfallsdatums verwenden. Kitreagenzien bei 2–8°C lagern, außer dem Plattenwaschkonzentrat, das bei Raumtemperatur gelagert werden kann. Assayplatten im Original-Folienbeutel mit Trockenmittel versiegelt lagern. Nach dem Öffnen bleibt der Test bis zu 4 Wochen (30 Tage) innerhalb der Spezifikation, sofern der auf dem Etikett angegebene Haltbarkeitszeitraum nicht überschritten wird.

Technischer Support

Tel: +1 617 492 3900 x502
E-mail: oncogenetech@wilex.com



WILEX Inc.
Cambridge, MA 02140 USA



EMERGO EUROPE

Molenstraat 15
2513 BH, The Hague
The Netherlands
Tel: +31 (0)70 345 8570
Fax: +31 (0)70 346 7299

Uso previsto

ELISA HER-2/neu ha lo scopo di misurare quantitativamente la proteina HER-2/neu nel siero delle donne affette da cancro metastatico al seno. L'utilizzo di ELISA HER-2/neu è indicato per il follow-up e il monitoraggio di pazienti con cancro metastatico al seno il cui valore iniziale di HER-2/neu nel siero sia maggiore di 15 ng/mL. I valori di HER-2/neu vanno utilizzati assieme ad informazioni disponibili dalle procedure cliniche e da altre procedure diagnostiche nel trattamento del cancro metastatico al seno. L'utilità clinica della misura di HER-2/neu nel siero come indicatore prognostico di recidiva precoce e nel trattamento di pazienti in regimi immunoterapici non è stata pienamente stabilita.

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

Principio del metodo	ELISA sandwich in fase solida
Range analitico	Da 0 ng/mL a 35 ng/mL
Tipo di campione	Siero umano
Volume di test del campione	10,0 microlitri
Sensibilità	1,5 ng di p105/mL siero
L'acquisto di questo kit ne autorizza l'utilizzo in licenza nell'ambito dei seguenti brevetti: Brevetti USA 5.401.638 e 5.604.107; brevetti EPO 0494135 e 0412116; brevetto canadese 2.026.250-8	

Indice

Uso previsto	18	Procedura di analisi	20
Background	18	Curva standard di un campione	20
Principio del dosaggio	18	Valutazione dei risultati	20
Sommario della procedura	18	Controllo di qualità del dosaggio	21
Tracciabilità degli standard	18	Valori attesi	21
Materiali forniti	18	Caratteristiche di rendimento non cliniche	22
Frase di sicurezza e di avviso	19	Risoluzione dei problemi	23
Materiali richiesti ma non forniti	19	Informazioni sulla stabilità e sulla conservazione	23
Precauzioni e consigli	19	Supporto tecnico	23
Preparazione dei campioni	19	Bibliografia	51
Protocollo dettagliato	19	Spiegazione dei simboli	53

Background

HER-2/neu, noto anche come c-erbB-2, codifica una proteina con un peso molecolare di 185 000 Dalton (p185) e appartiene ad una famiglia di recettori del fattore di crescita epiteliale strutturalmente correlati al recettore del fattore di crescita epidermico umano [1]. La proteina di lunghezza completa HER-2/neu p185 è composta da un dominio citoplasmatico con attività della tirosina chinasi, un dominio transmembrana e un dominio extracellulare (extracellular domain, ECD) che è perso dalla superficie delle cellule cancerose del seno [2,3]. Numerosi studi hanno mostrato che l'ECD perso di HER-2/neu è una glicoproteina con un peso molecolare compreso tra 97 e 115 kDa e viene denominata p105 [3,4]. L'ECD può essere quantificato accuratamente nel siero con un dosaggio [4] che utilizza anticorpi monoclonali [5] che sono diretti contro gli epitopi esterni della proteina HER-2/neu. Molte pubblicazioni mostrano che l'ECD è perso nel sangue di persone normali e può essere misurato a livelli alti in donne con cancro metastatico al seno [4,6–26]. Molti di questi studi su HER-2/neu nel siero hanno confermato i dati sostanziali forniti da studi sui tessuti che indicavano che l'aumento dell'espressione di HER-2/neu è un marker di prognosi insoddisfacente, di minore sopravvivenza complessiva e di aggressività biologica.

Recenti studi scientifici suggeriscono che la quantificazione dell'ECD possa avere diverse importanti applicazioni cliniche, quali ad esempio il monitoraggio di pazienti affette da cancro al seno con tumore metastatico e il monitoraggio di pazienti affette da cancro al seno per rilevarne la recidiva precoce [6–10,12,15,17–20,22–26]. Questi rapporti hanno mostrato che il 30–50% delle donne con tumori HER-2/neu positivi alla diagnosi primaria sviluppano livelli elevati di HER-2/neu nel siero con progressione a cancro metastatico al seno [4,6–26]. Questi studi hanno anche illustrato che il monitoraggio dei livelli di ECD nel siero dopo l'intervento chirurgico era correlato al decorso clinico della malattia e che i livelli di HER-2/neu nel siero sono stati osservati crescere con la progressione della malattia o decrescere con la risposta alla terapia [12,15,19,20,25,26]. Diversi rapporti mostrano anche che livelli elevati di HER-2/neu nel siero possono manifestarsi in donne con cancro metastatico al seno che avevano presentato tumori primari al seno negativi HER-2/neu mediante immunistochimica [6,11,18,21,27]. Secondo molti studi immunocitochimici e sierologici, la proteina HER-2/neu è sovraespressa in molti tumori di origine epiteliale tra cui il cancro al polmone [28], alla prostata [29], al pancreas [30], al colon [31], allo stomaco [32], alle ovaie [33] ed epatocellulare [34].

Sono stati rilasciati brevetti relativi alla quantificazione e al rilevamento del dominio p105 ECD (negli USA, brevetto n. 5.401.638; in Canada n. 2.026.250-8; in Europa n. 0494135), nonché brevetti relativi alla quantificazione e al rilevamento della molecola p185 di lunghezza completa (negli USA, brevetto n. 5.604.107; in Europa, brevetto n. 0412116). Brevetti simili sono in attesa di approvazione in Giappone.

Principio del dosaggio

ELISA HER-2/neu è un immunodosaggio enzimatico sandwich che utilizza un anticorpo monoclonale murino per la cattura e un diverso anticorpo monoclonale murino biotinilato per il rilevamento della proteina HER-2/neu umana. I reagenti, sia di cattura sia di rilevamento, si legano specificamente al dominio extracellulare della proteina HER-2/neu. L'anticorpo di cattura è stato immobilizzato sulla superficie interna dei pozzetti della piastra di microtitolazione. Per eseguire il test, un volume appropriato di campione è incubato nel pozzetto rivestito per consentire il legame dell'antigene con l'anticorpo di cattura. L'antigene immobilizzato è quindi fatto reagire con l'antisiero rilevatore. La quantità di anticorpo di rilevamento legato all'antigene è misurata legandolo con un coniugato della streptavidina/perossidasi del rafano, che quindi catalizza la conversione del substrato cromogeno o-fenilendiammina (OPD) in un prodotto colorato. Il prodotto di reazione colorato è quantificato tramite spettrofotometria ed è correlato alla quantità di proteina HER-2/neu nel campione.

Per le istruzioni, vedere le sezioni Protocollo dettagliato e Valutazione dei risultati di questo opuscolo.

Sommario della procedura

Punti	Incubazioni
1. Aggiungere campioni e standard ai pozzetti	3 ore, 37 °C
2. Lavare	
3. Aggiungere anticorpo di rilevamento ai pozzetti	1 ora, 37 °C
4. Lavare	
5. Aggiungere anticorpo coniugato ai pozzetti	30 minuti, TA*
6. Lavare	
7. Aggiungere substrato ai pozzetti	45 minuti, TA*
8. Aggiungere soluzione di arresto ai pozzetti	
9. Leggere la piastra a 490 nm	

*Temperatura ambiente

Tracciabilità degli standard

ELISA HER-2/neu è stato sviluppato e calibrato da WILEX Inc., Cambridge MA, 02140, USA.

Gli standard ELISA HER-2/neu sono calibrati nei confronti di un materiale di supporto del calibratore master conservato a Cambridge MA, USA. Questo materiale è identificato come lotto R5345 del Calibratore master HER-2/neu ed è una serie di sei reagenti liquidi, che coprono il range da zero a 35 ng/mL della proteina p105 HER-2/neu. Le determinazioni di massa per il Calibratore master HER-2/neu sono state assegnate in base al dosaggio del materiale del calibratore a confronto diretto con tre campioni di proteina p105 HER-2/neu altamente purificati. Gli equivalenti di massa (moli) dei campioni purificati sono stati determinati tramite analisi degli amminoacidi.

Materiali forniti

Sono forniti i seguenti componenti.

Piastra di microtitolazione: piastra di microtitolazione priverivita fornita pronta per l'uso, con 96 pozzetti (12 strisce di otto) in buste metallizzate, con chiusura lampo, con una confezione di essiccante. I pozzetti sono rivestiti con anticorpo monoclonale anti-proteina HER-2/neu.

Standard HER-2/neu: sei (6) flaconi separati di p105 HER-2/neu ricombinante. Gli standard sono calibrati in ng/mL e sono etichettati con valori maggiori di 50 volte rispetto al dosaggio effettivo con flaconi.

L'assegnazione di questi valori delle etichette ad una curva standard evita la necessità di correggere la dose riportata per un campione diluito 1:50 (siero al 2% in soluzione tampone). Vedere Valutazione dei risultati per dettagli.

N. standard	ng/mL	Volumi
6	35,0	1 mL
5	25,0	1 mL
4	15,0	1 mL
3	7,5	1 mL
2	2,5	1 mL
1	0,0	1 mL

Diluyente campione: una (1) tanica contenente BSA e sodio azide allo 0,09%.

Anticorpo di rilevamento: un (1) flacone fornito pronto per l'uso, contenente anticorpo monoclonale anti-proteina HER-2/neu murino biotinilato in 0,01 M di PBS (pH 7,4), stabilizzatore proteico e sodio azide allo 0,09%.

Diluyente coniugato: un (1) flacone contenente 0,01 M di PBS (pH 7,4), BSA e 0,1% di cloroacetammide.

Concentrato coniugato: un (1) flacone contenente 50X streptavidina/perossidasi del rafano in soluzione tampone. Deve essere diluito ad 1X con diluyente coniugato per preparare coniugato di lavoro. Vedere Tabella 1.

Diluyente substrato: 0,1 M di soluzione tampone citrato (pH 5,0) e 0,01% di H₂O₂ (perossido di idrogeno).

Substrato: un (1) flacone contenente compresse di OPD. Deve essere disciolto in diluyente substrato

(1 compressa/4 mL) per preparare substrato di lavoro. Vedere Tabella 1.

Soluzione di arresto: un (1) flacone contenente 2,5 N di H₂SO₄ (acido solforico).

Concentrato di lavaggio piastre (20X): un (1) flacone. Diluire una (1) parte di concentrato in 19 parti di acqua di alta qualità prima dell'uso.

Frasi di sicurezza e di avviso



Nocivo!

R22 – Nocivo se ingerito.

S28 – In caso di contatto con la pelle, lavarsi immediatamente ed abbondantemente con acqua.

Contiene sodio azide

(standard, diluyente campione, anticorpo di rilevamento)

Nocivo!

R40 – Possibilità di effetti irreversibili.

R43 – Può provocare sensibilizzazione per contatto con la pelle.

S36/37 – Usare indumenti protettivi e guanti adatti.

Contiene orto-fenildiammina diidrocloreto

(compresse di substrato)

Irritante!

R36/38 – Irritante per gli occhi e la pelle.

S36/37/39 – Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.

S26 – In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico.

Contiene acido solforico

(soluzione di arresto)

Irritante!

R43 – Può provocare sensibilizzazione per contatto con la pelle.

S24 – Evitare il contatto con la pelle.

S37 – Usare guanti adatti.

Contiene cloroacetammide

(diluyente coniugato e concentrato coniugato)

Materiali richiesti ma non forniti

- Incubatore a calore a secco in grado di mantenere 37 °C
- Sistemi di pipettamento: Sistemi di pipettamento da 2–20 µL, 20–200 µL e 200–1000 µL con puntali monouso
- Sistema di pipettamento di ripetizione di precisione
- Lavatore automatizzato per piastra di microtitolazione da 96 pozzetti
- Provette di coltura da 12 x 75 mm per la preparazione di campioni
- Mescolatore a vortice
- Lettore di piastre di microtitolazione in grado di misurare l'assorbanza in piastre da 96 pozzetti ad una lunghezza d'onda di 490 nm
- Cilindro graduato da 500 o 1000 mL
- Serbatoi di reagente
- Acqua deionizzata

- Involucro in plastica o isolanti adesivi per piastre
- Candeggiante domestico liquido per disattivare campioni clinici e per la decontaminazione di lavatori per piastre
- Tovaglioli di carta monouso

Controlli: i controlli ELISA HER-2/neu composti da p105 ricombinante in diluyente campione sono disponibili presso WILEX Inc. Fare riferimento a Controlli ELISA HER-2/neu, n. di parte 06489884, per ordinare. I controlli sono diluiti a 1:50 prima del dosaggio. I volumi sono di 0,5 mL ciascuno. Conservare a temperature comprese tra 2 e 8 °C.

Precauzioni e consigli

- Conservare i componenti a 2–8 °C. Non esporre i reagenti a luce eccessiva. Non congelare alcuno dei componenti del kit.
- Non utilizzare i reagenti del kit oltre la loro data di scadenza.
- Utilizzare solo i pozzetti di microtitolazione forniti assieme al kit.
- Sciacquare tutti i residui di detergente dagli articoli di vetro.
- Utilizzare acqua deionizzata della massima qualità.
- Non mescolare, inoltre, reagenti di kit diversi.
- Le soluzioni tampone e i reagenti utilizzati in questo kit contengono sodio azide o cloroacetammide come conservanti. Va prestata attenzione ad evitare il contatto diretto con questi reagenti.
- Evitare il pipettaggio con la bocca o l'ingestione di qualsiasi reagente.
- Non fumare, mangiare o bere durante l'esecuzione del dosaggio o nei luoghi in cui i campioni o i reagenti sono maneggiati.
- I campioni umani potrebbero essere contaminati da agenti infettivi. Non ingerire, esporre a ferite aperte, né respirare aerosol. Usare guanti protettivi e smaltire i campioni biologici nella maniera corretta.
- Non maneggiare le compresse di substrato con le dita, né permettere il contatto con la pelle, con metalli o con agenti ossidanti. Smaltire le soluzioni contenenti OPD in conformità alle normative locali.
- Usare guanti monouso e protezioni per gli occhi quando si maneggia la soluzione di arresto (2,5 N di acido solforico).
- Smaltire tutte le soluzioni di lavoro (lavaggio piastre, coniugato, substrato) alla fine di ciascuna giornata.
- Preparare soluzioni di lavoro nuove per ciascun dosaggio successivo.

Preparazione dei campioni

Per campioni (e controlli), è necessario preparare una diluizione iniziale di 1:50 in diluyente campione prima del dosaggio. Rimuovere eventuale materiale fioccoso dai campioni per microcentrifugazione prima della diluizione. Etichettare le provette e aggiungere 0,98 mL di diluyente campione a ciascuna, seguito da 0,02 mL di campione/controllo. Miscelare delicatamente ed evitare la produzione di schiuma nel campione diluito. I controlli e i campioni diluiti possono essere conservati in provette tappate per un periodo massimo di una settimana a 2–8 °C e di sei mesi a –20 °C. Proteggere dall'esposizione alla luce. Potrebbe essere richiesto un nuovo dosaggio di alcuni campioni ad una diluizione più elevata. Scartare eventuali campioni, conservati a 2–8 °C, che mostrino segni di contaminazione. Diluire nuovamente dal siero.

Protocollo dettagliato

PROCEDURE CONSIGLIATE

1. L'aggiunta di reagenti deve avvenire nell'ordine specificato.
2. Tutti i sei (6) standard e i campioni di test dovranno essere analizzati in duplicato.
3. Equilibrare tutti i reagenti alla temperatura ambiente (15–30 °C) prima dell'utilizzo.
4. Erogare ciascun reagente solo nella quantità sufficiente per il numero di pozzetti utilizzati. Per ogni striscia da 8 pozzetti, erogare 1 mL di anticorpo di rilevamento, coniugato, ecc.
5. Preparare una mappa delle piastre da utilizzare come guida per la localizzazione dei campioni, degli standard e dei pozzetti di controllo.
6. Il trasferimento di campioni, standard e controlli dalle provette di diluizione nei pozzetti può essere semplificato utilizzando sistemi di pipettamento semiautomatici multicanali. Rivolgersi all'Assistenza tecnica per i dispositivi consigliati.
7. Preparazione di lavaggio piastre
 - a. Se il concentrato di lavaggio piastre è freddo, lasciare che raggiunga la temperatura ambiente (15–30 °C) prima dell'uso. Accertarsi che tutti i cristalli siano disciolti. Se lo si desidera, riscaldare a 37 °C e miscelare bene.

- b. Diluire un (1) volume di concentrato di lavaggio piastre con 19 volumi di acqua distillata o deionizzata. Miscelare bene. Questa soluzione è di lavaggio piastre. Il volume totale richiesto dipende dal metodo di lavaggio/dallo strumento utilizzato. È richiesto circa 1 L di questa soluzione per riempire un lavatore automatizzato e analizzare una piastra di microtitolazione; circa 700 mL sono richiesti per ciascuna piastra di microtitolazione; quando è eseguito il lavaggio manuale.
- c. Il lavaggio piastre deve essere preparato nuovo ogni giorno. Non conservare il lavaggio piastre.
- Quando si utilizzano metodi manuali, prestare attenzione quando si inverte la piastra di microtitolazione per decantare o asciugare; premere le linguette laterali del telaio verso l'interno per evitare che le strisce cadano.
 - Il lavaggio della piastra di microtitolazione è eseguito al meglio da un lavatore automatizzato per piastre. L'apparecchiatura per il lavaggio delle piastre deve essere correttamente regolata, pulita e sottoposta a manutenzione. Si consigliano lavatori automatizzati con 96 porte. È possibile utilizzare strisce fittizie da 8 pozzetti per riempire la parte inutilizzata del contenitore per dosaggi che utilizzino una piastra parziale. Conservare ed etichettare a tal fine strisce utilizzate in precedenza.
 - Impostare il volume di riempimento a 300 µL/pozzetto. Riempire lo strumento con lavaggio piastre. Per lavatori a 96 porte, utilizzare due lavaggi a 3 cicli. Dopo il lavaggio iniziale a 3 cicli, ruotare la piastra di 180 gradi e ripetere. Se utilizza un lavatore di strisce, eseguire un singolo ciclo di lavaggio sulla piastra, quindi ripetere altre cinque volte.
 - Dopo il lavaggio finale, invertire la piastra di microtitolazione e batterla su una superficie assorbente. Controllare visivamente che tutti i pozzetti siano vuoti.

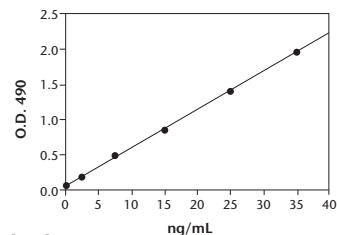
Procedura di analisi

- Rimuovere dalla busta la piastra di microtitolazione. Calcolare il numero di strisce necessarie a partire dal numero di campioni da testare e dalle determinazioni di replicato desiderate (duplicati consigliati) (ciascuno standard richiede due pozzetti; un pozzetto è necessario per la determinazione del bianco del substrato). Conservare le strisce non utilizzate nella busta con chiusura lampo con essiccante a 2-8 °C (vedere Informazioni sulla stabilità e sulla conservazione).
- Diluire i campioni e i controlli 1:50 (2%) con diluente campione.
- Miscelare a fondo gli standard, i controlli e i campioni e aggiungere 100 µL ai pozzetti duplicati. Impostare un pozzetto con 100 µL di diluente campione da utilizzare come bianco del substrato. Impostare pozzetti duplicati per ciascuno dei controlli.
- Coprire la piastra (involucro per alimenti o coperchio adesivo in plastica). Incubare per 3 ore a 37 °C.
- Rimuovere con cura il coperchio in plastica e lavare la piastra di microtitolazione con lavaggio piastre.
- Aggiungere 100 µL di anticorpo di rilevamento a tutti i pozzetti eccetto il pozzetto del bianco del substrato. Coprire e incubare a 37 °C per 1 ora.
- Durante l'incubazione con anticorpo di rilevamento, preparare coniugato di lavoro diluendo il concentrato coniugato con diluente coniugato. Vedere la Tabella 1 per le quantità da utilizzare per il numero di strisce che si analizzano.
- Lavare la piastra di microtitolazione con lavaggio piastre.
- Aggiungere 100 µL di coniugato di lavoro a tutti i pozzetti eccetto il pozzetto del bianco del substrato. Coprire e incubare a temperatura ambiente (15-30 °C) per 30 minuti.
- Durante l'incubazione con coniugato di lavoro, preparare substrato di lavoro disciogliendo compresse di substrato in diluente substrato. Vedere la Tabella 1 per le quantità da utilizzare per il numero di strisce che si analizzano. Agitare vigorosamente con un moto vorticoso per garantire il completo discioglimento. Una volta preparato, il substrato di lavoro va utilizzato entro 30 minuti. Evitare l'esposizione alla luce.
- Lavare la piastra di microtitolazione con lavaggio piastre.
- Includendo il pozzetto del bianco del substrato, aggiungere 100 µL di substrato di lavoro a tutti i pozzetti. Coprire con un coperchio nuovo in plastica e incubare la piastra nel dark a temperatura ambiente (15-30 °C) per 45 minuti.
- Aggiungere 100 µL di soluzione di arresto a ciascun pozzetto per arrestare la reazione.
- Leggere l'assorbanza a 490 nm entro 30 minuti.

TABELLA 1. DOSAGGIO HER-2/neu: PREPARAZIONE DI REAGENTI DEL DOSAGGIO

N. di strisce utilizzate	Concentrato coniug.	Diluente coniug.	Compresse di substrato	Diluente substrato
1	20 µL	0,98 mL	1	4 mL
2	40 µL	1,96 mL	1	4 mL
3	60 µL	2,94 mL	1	4 mL
4	80 µL	3,92 mL	1	4 mL
5	100 µL	4,90 mL	2	8 mL
6	120 µL	5,88 mL	2	8 mL
7	140 µL	6,86 mL	2	8 mL
8	160 µL	7,84 mL	2	8 mL
9	180 µL	8,82 mL	3	12 mL
10	200 µL	9,80 mL	3	12 mL
11	220 µL	10,78 mL	3	12 mL
12	240 µL	11,76 mL	3	12 mL

Figura 1. Curva standard di un campione



Valutazione dei risultati

CONCENTRAZIONE DEGLI STANDARD

Gli anticorpi utilizzati in questo dosaggio riconoscono il dominio extracellulare, con legame di legante, della proteina HER-2/neu [5]. Questa forma di HER-2/neu è stata identificata con un peso molecolare uguale o vicino a 105 kDa. Gli standard nel kit sono calibrati in nanogrammi, che prendono in considerazione questo peso molecolare rilevato nel siero e sono preparati a partire da una forma ricombinante del frammento da 105 kDa di HER-2/neu.

CONCENTRAZIONI DI SCONOSCIUTI

- Calcolare la media dei valori di assorbanza per ciascuna diluizione di standard, controllo e campione per ottenere le assorbanze medie.
- Su carta per grafici, rappresentare la relazione tra l'assorbanza media per ciascuno standard sull'asse Y e la concentrazione della proteina HER-2/neu (ng/mL) sull'asse X e collegare i punti.
- Determinare la concentrazione di proteina HER-2/neu per ciascuna diluizione di campione per interpolazione dalla curva standard. Sono disponibili pacchetti software (quali ad esempio SoftMax Pro™, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA; KC4™, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) che possono semplificare questo processo. Utilizzare un algoritmo di regressione con curva quadratica (polinomio di secondo ordine).
- Nota: non assegnare pozzetti "in bianco" utilizzando il software. Ciò sottrarrebbe le letture in bianco medie da tutti gli altri pozzetti. È utile, a fini di controllo di qualità e di risoluzione dei problemi, essere in grado di esaminare i valori di assorbanza riportati per tutti i pozzetti senza regolazioni applicate ai dati non elaborati.
- I risultati per i campioni sono espressi in nanogrammi per mL leggendo direttamente dai valori della curva standard (ng/mL), come indicato sui flaconi e nella sezione Materiali forniti di questo opuscolo. Per comodità, non è necessaria alcuna correzione alla diluizione matematica per campioni diluiti 1:50, dal momento che la concentrazione effettiva nelle preparazioni standard è al 2% del dosaggio etichettato (in altri termini, sono state prediluite a 1:50).

DILUIZIONE DI CAMPIONI CON CONCENTRAZIONI ELEVATE

- Per campioni che forniscono valori di assorbanza (OD) superiori al range della curva standard, sarà necessario un dosaggio successivo a diluizioni maggiori.
- Per preparare ulteriori diluizioni, iniziare sempre con una diluizione iniziale di 1:50 (vedere Preparazione dei campioni), quindi diluire serialmente 1:2 in diluente campione. Esempio:

Diluizione del campione	Volume della diluizione precedente	Volume del diluente campione
1:100	0,5 mL di 1:50	0,5 mL
1:200	0,5 mL di 1:100	0,5 mL
1:400	0,5 mL di 1:200	0,5 mL

- Se campioni ulteriormente diluiti producono valori di OD < 0,3, questi devono essere dosati utilizzando materiale meno diluito. Il fattore di correzione della diluizione (vedere punto 4 nel seguito), se moltiplicato per risultati da un valore di OD tanto basso, può comportare una stima erroneamente alta della proteina HER-2/neu.
- Eventuali risultati di campioni ulteriormente diluiti richiedono la correzione dei valori ottenuti dal dosaggio per qualsiasi diluizione oltre 1:50. Esempio:

Diluizione del campione	Fattore di correzione della diluizione (per cui moltiplicare il risultato riportato)
1:100	2
1:200	4
1:400	8

Controllo di qualità del dosaggio

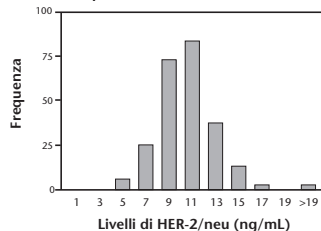
Si consiglia che ciascun dosaggio soddisfi i seguenti parametri di rendimento.

- Esaminare i risultati relativamente ai controlli eseguiti nel dosaggio per confermare che i recuperi rientrino nei range attesi (pubblicati nell'inserto del prodotto) per ciascun livello.
- Esaminare il range dinamico della curva standard. Lo standard di livello 1 dovrà essere compreso tra 0,04 e 0,09 OD e quello di livello 6 dovrà essere compreso tra 1,5 e 2,4 OD.
- Se si utilizza un software di regressione con curve, esaminare il valore di R² del calcolo: dovrebbe essere compreso tra 0,997 e 1,0. Se uno di questi parametri non è soddisfatto, va presa in considerazione la ripetizione dei test di campioni in un dosaggio successivo.

Valori attesi PERSONE SANE

Come per tutti i test, ciascun laboratorio dovrà stabilire il proprio range di riferimento. In una popolazione di 241 donne sane, il 95% dei valori di proteina HER-2/neu nel siero sono risultati essere minori di 13,7 ng/mL. Non esiste alcuna differenza significativa nei valori di HER-2/neu tra donne in età compresa tra quella pre e post-menopausa. In base a questa stessa popolazione, il limite superiore del normale (media + 2 SD) era di 14,7 ng/mL. L'analisi ROC conferma 15 ng/mL come il cutoff appropriato tra livelli normali ed elevati di proteina HER-2/neu nel siero. La distribuzione dei livelli di HER-2/neu nel siero per l'intera popolazione (n = 241) è mostrata in Figura 2.

Figura 2. Distribuzione della proteina HER-2/neu nel siero in una popolazione di donne sane.



MONITORAGGIO DI PAZIENTI AFFETTE DA CANCRO METASTATICO AL SENO

L'utilità clinica di ELISA HER-2/neu nel monitoraggio longitudinale di pazienti affette da cancro metastatico al seno è stata valutata utilizzando campioni retrospettivi di siero prelevati da pazienti con cancro al seno in fase avanzata, che coprivano un periodo da 6 a 12 mesi, presso tre siti clinici negli Stati Uniti. Cinquantasei

pazienti sottoposte a terapia il cui livello iniziale dell'oncoproteina HER-2/neu nel siero era elevato (15 ng/mL o maggiore) sono state valutate per rilevare la corrispondenza dei cambiamenti nel loro livelli di HER-2/neu nel siero con i cambiamenti nel decorso clinico della loro malattia.

Un'analisi visita per visita dei risultati dello studio è presentata nella Tabella 2. I cambiamenti nel livello di HER-2/neu nel siero tra una visita e la successiva sono stati calcolati per ciascuna paziente. Questi cambiamenti sono stati separati in due gruppi: il Gruppo I presentava cambiamenti nel livello di HER-2/neu nel siero, che erano paralleli al decorso clinico della malattia, mentre il Gruppo II presentava cambiamenti nel livello di HER-2/neu nel siero che non erano paralleli al decorso clinico della malattia. Lo stato o il decorso clinico sono stati determinati dal medico. La corrispondenza dei cambiamenti nel livello di HER-2/neu con lo stato clinico è stata determinata come segue: un aumento non inferiore al 20% rispetto alla visita precedente era indicativo di progressione nella malattia. Se il cambiamento presentava un aumento minore del 20% rispetto alla visita precedente, era indicativo di una mancanza di progressione nella malattia durante la terapia (compresa la risposta o una malattia stabile). I valori stabili e di risposta erano consolidati in quanto entrambi rispecchiano l'efficacia di una terapia attuale. Il criterio del 20% è stato derivato dalla variabilità longitudinale in pazienti normali (determinata dai livelli di HER-2/neu nel siero in sei campioni seriali da ciascuna di 38 donne sane).

TABELLA 2. CORRISPONDENZA DELLO STATO DELLA MALATTIA DI PAZIENTI AFFETTE DA CANCRO METASTATICO AL SENO CON CAMBIAMENTI NEI LIVELLI DI HER-2/neu NEL SIERO: VISITA PER VISITA

Cambiamento in HER-2/neu	Cambiamento nello stato clinico		Totale
	Progressione	Assenza di progressione	
Aumento ≥ 20%	52	33	85
Aumento < 20%	55	96	151
Totale	107	129	236

Concordanza = 62,7% (CI = da 56,4 a 68,6%)
 Valore predittivo: Assenza di progressione = 63,6% (CI = da 55,7 a 70,8%)
 Progressione = 61,2% (CI = da 50,6 a 70,8%)

Le figure seguenti mostrano esempi tipici di cambiamenti nei livelli di HER-2/neu nel siero nel tempo, per due delle 56 pazienti affette da cancro metastatico al seno, dallo studio clinico. La Figura 3 mostra una paziente la cui malattia sta rispondendo, mentre la Figura 4 mostra una paziente con una malattia ingravescente.

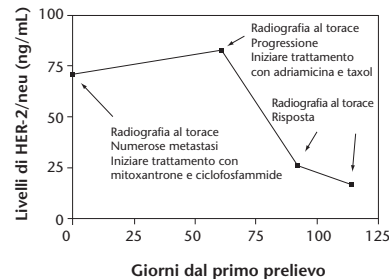


Figura 3. Monitoraggio di una paziente di 38 anni affetta da cancro al seno in Fase IV con ELISA HER-2/neu. Cambiamenti longitudinali nei livelli di HER-2/neu nel siero sono correlati ai cambiamenti nello stato della malattia.

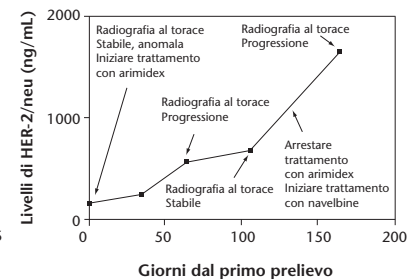


Figura 4. Monitoraggio di una paziente di 74 anni affetta da cancro al seno in Fase IV con ELISA HER-2/neu. I cambiamenti longitudinali nei livelli di HER-2/neu nel siero sono correlati ai cambiamenti nello stato della malattia.

Caratteristiche di rendimento non cliniche IMPRECISIONE

L'imprecisione è stata determinata esaminando quattro campioni di controllo composti da tre controlli basati su soluzione tampone e da una raccolta di siero umano. Tre diversi lotti di kit sono stati utilizzati presso ciascuno di tre laboratori diversi. Le determinazioni triplicate per analisi per ciascun controllo sono state determinate in 130 serie. La precisione intra-serie e quella totale sono state calcolate per ciascun controllo in base al protocollo NCCLS EP-5A. Le imprecisioni intra-serie per tre siti e lotti di kit erano non superiori al 10% CV, mentre l'imprecisione totale fra tutti i kit e i siti era compresa tra 10 e 17,7% CV.

Campione di controllo	N. di serie	N. di repliche	Media (ng/mL)
Controllo 1	130	385	24,5
Controllo 2	131	390	9,8
Controllo 3	131	386	3,3
Siero 4	130	385	9,5

Campione di controllo	Precisione intra-serie		Precisione totale	
	Dev std	CV %	Dev std	CV %
Controllo 1	1,46	6,0	2,62	10,7
Controllo 2	0,69	7,0	1,03	10,4
Controllo 3	0,34	10,2	0,59	17,7
Siero 4	0,65	6,9	1,02	10,8

SENSIBILITÀ

La concentrazione rilevabile minima dell'analita è stata determinata da una misura ripetuta di un campione a dose zero (diluente campione). La media e la deviazione standard del recupero apparente di HER-2/neu sono state calcolate per 230 determinazioni eseguite in un periodo di 20 giorni fra tre diversi lotti di kit e tre laboratori diversi. Dopo l'aggiunta di due deviazioni standard alla dose media recuperata di HER-2/neu, la concentrazione rilevabile minima è risultata di 1,5 ng di p105/mL di siero.

SPECIFICITÀ ANALITICA

Cross-reattività. Il recettore del fattore di crescita epidermico (epidermal growth factor receptor, EGFR) è una molecola strettamente correlata al recettore del fattore di crescita HER-2/neu con omologia dell'88% col dominio intracellulare e omologia del 44% col dominio extracellulare. Abbiamo provato ELISA HER-2/neu con EGFR a 850 ng/mL. Questo materiale non ha prodotto alcun segnale nel dosaggio, ad indicare che gli immunoreagenti nel dispositivo non producono alcuna reazione crociata con EGFR.

Sostanze interferenti. L'anticorpo umano anti-murino (human anti-mouse antibody, HAMA), rilevato in rari casi nel siero umano, ha il potenziale di legarsi ai reagenti critici negli immunodosaggi, provocando segnali falsamente positivi o negativi. Nel dispositivo sono stati esaminati diversi campioni di siero noti come positivi HAMA nonché positivi al fattore reumatoide. Con questi campioni non è stato generato alcun falso segnale. Sono stati formulati reagenti per il dispositivo per bloccare qualsiasi reattività falsa di questo tipo.

Le misure di HER-2/neu nel siero potrebbero essere eseguite mentre le pazienti assumono vitamine o farmaci da banco, oppure sono sottoposte a chemioterapia. Per esaminare la possibilità che tali agenti possano interferire con determinazioni accurate di HER-2/neu, i potenziali interferenti esogeni sono stati forati in un siero di controllo positivo contenente una concentrazione nota di HER-2/neu e sono stati successivamente esaminati nel dosaggio. Alcuni costituenti comuni del siero sono stati esaminati anche per rilevarne il potenziale di agire come interferenti endogeni. Nessuno dei composti esaminati aveva un effetto sul recupero dell'analita. Vedere Tabella 3.

RANGE ANALITICO

ELISA HER-2/neu è in grado di fornire una quantificazione accurata dei livelli di HER-2/neu nel siero in campioni prediluiti, che forniscono una risposta del dosaggio nel range da 1,5 a 35 ng di proteina HER-2/neu p105 per mL di siero. I campioni che producono un segnale superiore al limite superiore del range della curva standard (35 ng/mL) devono essere ulteriormente diluiti con diluente campione e riesaminati nel dosaggio. Accertarsi di correggere il recupero riportato di proteina HER-2/neu per preparazioni di diluizione maggiori della diluizione di routine 1:50.

TABELLA 3. POTENZIALI INTERFERENTI ELISA

POTENZIALI INTERFERENTI	CONCENTRAZIONI DI TEST	POTENZIALI INTERFERENTI	CONCENTRAZIONI DI TEST
ENDOGENI			
Trigliceridi (intralipina-20%)	3000,0 mg/dL	FARMACI DA BANCO, ECC.	
Emoglobina	1,0 g/dL	Acetaminofenolo	200,0 µg/mL
Immunoglobulina (gamma globulina)	6,0 g/dL	Aspirina	500,0 µg/mL
Albumina	6,5 g/dL	Ibuprofen	400,0 µg/mL
Bilirubina	25,0 mg/dL	Caffeina	100,0 µg/mL
Eparina	0,46 mg/mL		
AGENTI CHEMIOTERAPEUTICI			
ESOGENI			
Vitamina A trans retinol acetato	10,0 IU/mL	Amminoglutetamide	398,0 µg/mL
Vitamina B1 tiamina	3,0 µg/mL	Bleomicina	0,16 U/mL
Vitamina B2 riboflavina	3,4 µg/mL	Cisplatino	173,0 µg/mL
Vitamina B6 pirrossido HCL	4,0 µg/mL	Dossorubicina	51,8 µg/mL
Vitamina B12	12,0 ng/mL	Ciclofosfamide	800,0 µg/mL
Vitamina C acido ascorbico	30,0 µg/mL	Diethylstilbestero	23,0 µg/mL
Vitamina D2 ergocalciferol	0,8 IU/mL	Estramustina	102,2 µg/mL
Vitamina E tocoferolo acetato	0,06 IU/mL	Flutamide	10,0 µg/mL
Acido folico	0,8 µg/mL	5-Fluorouracile	1600,0 µg/mL
Niacina	40,0 µg/mL	Lupron	15,0 µg/mL
		Metotressato	450,0 µg/mL
		Mitoxantrone	56,0 µg/mL
		Mitomicina C	73,0 µg/mL
		Megace	27,0 ng/mL
		Tamossifene	1,4 µg/mL
		Vincristina	4,88 µg/mL
		Vinblastina	16,3 µg/mL
		Herceptin (Trastuzumab)	500 µg/mL

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Nell'esecuzione della procedura negli immunodosaggi manuali, esiste la possibilità di misure erranee (recupero di campioni) come conseguenza della variazione nel tempo di incubazione a cui i campioni sono soggetti in ciascuna delle fasi di incubazione. Tutti i pozzetti dovranno ricevere essenzialmente lo stesso tempo di incubazione richiesto per ciascuna fase di reagente. In particolare, quando si aggiungono standard, controlli e campioni a pozzetti nella piastra, il tempo compreso tra l'aggiunta del primo campione e quella dell'ultimo dovrà rientrare, al massimo, entro un intervallo di tempo di 15 minuti. Preparare tutti i campioni in anticipo. L'utilizzo di sistemi di pipettamento semiautomatizzati a più puntali è altamente consigliato per ridurre il tempo richiesto per queste procedure. Al fine di prevenire la contaminazione crociata, accertarsi di utilizzare puntali nuovi per ciascuna aggiunta di campione.

Gli immunodosaggi che utilizzano le cosiddette configurazioni sandwich, come nel caso di questo dispositivo, sono soggetti ad interferenza e falsi risultati derivanti da campioni che contengono agenti immunoreattivi contro anticorpi murini. HAMA, l'anticorpo eterofilo e il fattore reumatoide sono gli esempi primari di questi interferenti. Il produttore ha preso precauzioni nella formulazione di reagenti contenuti in questo dispositivo per minimizzare o eliminare tale interferenza. Tuttavia, va prestata attenzione quando si valutano risultati del dosaggio che potrebbero non essere coerenti con lo stato clinico complessivo della paziente alla luce di questa possibile interferenza.

È possibile che una paziente con cancro al seno confermato possa avere livelli di proteina HER-2/neu nel siero entro il range di quelli osservati in persone sane. Prestare attenzione nell'interpretazione dei risultati di HER-2/neu. I livelli di HER-2/neu nel siero potrebbero non indicare sempre la presenza o l'assenza di tumore maligno. Il valore di HER-2/neu va utilizzato come parte di una valutazione clinica complessiva che includa una valutazione clinica aggiuntiva e altri test diagnostici.

Risoluzione dei problemi

- Ciascun dosaggio deve comprendere i sei (6) standard esaminati in duplicato utilizzando il protocollo descritto nel Protocollo dettagliato. Temperature o tempi di incubazione significativamente diversi da quelli specificati potrebbero dare risultati erranei.
- La forma della curva standard è non lineare e varia leggermente da un dosaggio all'altro. Per la riduzione manuale dei dati, costruire un grafico da punto a punto. Se si utilizza il software ELISA, applicare un algoritmo di regressione con curva quadratica (polinomio di secondo ordine).
- Duplicati insoddisfacenti, se accompagnati da valori elevati per lo standard zero, indicano un lavaggio insufficiente. Se tutte le istruzioni nel Protocollo dettagliato sono state seguite accuratamente, tali risultati indicano la necessità di manutenzione del lavatore. Evitare inoltre di introdurre bolle nei pozzetti quando si pipettano campioni e reagenti.
- Il pozzetto di bianco del substrato dovrà riportare un valore minore o uguale a 0,05 unità di assorbanza. Una possibile causa di valori più elevati è l'esposizione del substrato di lavoro alla luce, prima o durante la fase di incubazione. Il substrato di lavoro va utilizzato entro 30 minuti dalla preparazione.
- Un segnale basso potrebbe indicare 1) che l'essiccazione della piastra si è verificata tra le fasi. Non lasciare essiccare la piastra. Aggiungere il reagente successivo immediatamente dopo il lavaggio; oppure 2) che è stato eseguito un lavaggio improprio. Accertarsi che il lavatore della piastra di microtitolazione sia stato correttamente riempito con lavaggio piastre (vedere Protocollo dettagliato).

Informazioni sulla stabilità e sulla conservazione

Tutti i reagenti inclusi in ELISA HER-2/neu sono stati esaminati relativamente alla stabilità. I reagenti non vanno utilizzati oltre la data di scadenza indicata. I reagenti del kit vanno conservati a 2–8 °C, con l'eccezione del concentrato di lavaggio piastre, che può essere conservato a temperatura ambiente. Le piastre di dosaggio vanno conservate sigillate nella busta metallizzata originale con confezione di essiccate. Una volta aperto, il dispositivo opera all'interno delle specifiche per un periodo non superiore alle 4 settimane (30 giorni) entro il periodo della data di scadenza indicato sull'etichetta.

Supporto tecnico

tel.: +1 617 492 3900 x502

posta elettronica: oncogenetech@wilex.com



WILEX Inc.
Cambridge, MA 02140 USA



EMERGO EUROPE

Molenstraat 15
2513 BH, The Hague
The Netherlands
Tel: +31 (0)70 345 8570
Fax: +31 (0)70 346 7299

Uso previsto

El ensayo ELISA HER-2/neu está diseñado para la medición cuantitativa de la proteína HER-2/neu sérica en mujeres con cáncer de mama con metástasis. El uso del ensayo ELISA HER-2/neu está indicado para el control y seguimiento de pacientes que padecen cáncer de mama con metástasis cuyo valor inicial de HER-2/neu sérica sea superior a 15 ng/mL. Los valores de HER-2/neu deben emplearse en combinación con la información disponible procedente de otros procedimientos clínicos y de diagnóstico para el tratamiento del cáncer de mama con metástasis. La utilidad clínica de la medición en suero de HER-2/neu como un indicador de pronóstico de la reproducción temprana y en el tratamiento de pacientes con regímenes de inmunoterapia no ha sido determinada plenamente.

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO

Principio del método	Fase sólida para ensayo ELISA tipo sandwich
Rango analítico	de 0 ng/mL a 35 ng/mL
Tipo de espécimen	Suero humano
Volumen de la muestra para la prueba	10,0 microlitros
Sensibilidad	1,5 ng p105/mL sérica

La adquisición de este kit otorga licencia de uso bajo las patentes siguientes: Patentes de EE.UU. 5.401.638 y 5.604.107; patentes EPO 0494135 y 0412116; patente de Canadá 2.026.250-8

Contenido

Uso previsto	23	Procedimiento del ensayo	25
Historia	23	Curva estándar de muestra	26
Principio del ensayo	24	Evaluación de resultados	26
Resumen del procedimiento	24	Control de calidad del ensayo	26
Trazabilidad de estándares	24	Valores esperados	26
Materiales suministrados	24	Características de funcionamiento no clínicas	27
Frases de seguridad y de advertencia	24	Resolución de problemas	28
Materiales necesarios pero no provistos	25	Información de estabilidad y almacenamiento	28
Precauciones y recomendaciones	25	Servicio técnico	28
Preparación de muestras	25	Referencias	51
Detalles del protocolo	25	Explicación de símbolos	53

Historia

El oncogén HER-2/neu, también conocido como c-erbB-2, codifica una proteína con un peso molecular de 185.000 daltons (p185) y pertenece a una familia de receptores del factor de crecimiento epitelial relacionados estructuralmente con el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano [1]. La proteína p185 HER-2/neu de longitud completa está compuesta por un dominio citoplasmático con actividad tirosina quinasa, un dominio transmembranal y un dominio extracelular (ECD) que se obtiene de la superficie de las células mamarias cancerígenas [2,3]. Numerosos estudios han mostrado que el ECD obtenido de HER-2/neu es una glicoproteína con un peso molecular entre 97 y 115 kDa denominada p105 [3,4]. El ECD se puede cuantificar en suero de una forma precisa mediante un ensayo [4] que emplea anticuerpos monoclonales [5] que se dirigen a los epitopos externos de la proteína HER-2/neu. Un gran número de publicaciones muestran que el ECD se descarta en la sangre de individuos normales y puede medirse en niveles elevados en mujeres con cáncer de mama con metástasis [4,6–26]. Muchos de estos estudios de HER-2/neu sérica han confirmado datos importantes de estudios de tejidos que afirman que la expresión elevada de HER-2/neu constituye un marcador de pobre prognosis, supervivencia general más corta y agresividad biológica.

Estudios recientes sugieren que la cuantificación del ECD puede tener diversas aplicaciones clínicas importantes, como el control de pacientes con cáncer de mama con metástasis y la supervisión de pacientes de cáncer de mama para detectar la reproducción temprana [6–10,12,15,17–20,22–26]. Estos informes han demostrado que el 30–50% de mujeres con tumores HER-2/neu positivos detectados en la diagnosis primaria desarrollan niveles elevados de HER-2/neu sérica con progresión de cáncer de mama con metástasis [4,6–26]. El seguimiento realizado en estos estudios también ha ilustrado que los niveles de ECD sérico tras la cirugía se corresponden con la evolución clínica de la enfermedad, y permitieron observar el aumento de los niveles de HER-2/neu sérica con la progresión de la enfermedad y su reducción con la respuesta a la terapia [12,15,19,20,25,26]. Varios informes también han demostrado que los niveles elevados de HER-2/neu sérica se pueden encontrar en mujeres con cáncer de mama con metástasis que tuvieron tumores mamarios primarios con resultados de HER-2/neu negativos en ensayos inmunológicos [6,11,18,21,27]. De acuerdo

con numerosos estudios séricos e inmunoquímicos, la proteína HER-2/neu se encuentra sobreexpresada en muchos tumores de origen epitelial, incluidos los de pulmón [28], próstata [29], páncreas [30], colon [31], estómago [32], ovarios [33] y células hepáticas [34].

Se han obtenido patentes relacionadas con la cuantificación y detección del dominio p105 ECD (en EE.UU., patente número 5.401.638; en Canadá, número 2.026.250-8; y en Europa, número 0494135), así como patentes relacionadas con la cuantificación y detección de la molécula p185 de longitud completa (en EE.UU., patente número 5.604.107, y en Europa, patente número 0412116). Patentes similares están pendientes en Japón.

Principio del ensayo

El ensayo ELISA HER-2/neu es un inmunoensayo enzimático tipo sandwich que utiliza un anticuerpo monoclonal de ratón para la captura y un anticuerpo monoclonal de ratón biotinilado diferente para la detección de la proteína HER-2/neu humana. Tanto los reactivos de captura como los de detección se unen específicamente al dominio extracelular de la proteína HER-2/neu. El anticuerpo de captura se ha inmovilizado en la superficie interior de los pocillos de la placa de microtitulación. Para realizar la prueba, se incuba el volumen adecuado de espécimen en el pocillo revestido para permitir la unión del antígeno con el anticuerpo de captura. Entonces, el antígeno inmovilizado reacciona con el antisuero de detección. La cantidad de anticuerpo de detección unido al antígeno se mide uniéndolo con un conjugado de peroxidasa de rábano rústicano/estreptavidina, que cataliza la conversión del sustrato cromogénico o-fenilendiamina (OPD) en un producto coloreado. El producto reactivo coloreado se cuantifica mediante espectrofotometría y se relaciona con la cantidad de proteína HER-2/neu de la muestra.

Para obtener instrucciones, consultar las secciones Detalles del protocolo y Evaluación de resultados de este documento.

Resumen del procedimiento

Pasos	Incubaciones
1. Añadir muestras y estándares a los pocillos	3 horas, 37°C
2. Lavado	
3. Añadir anticuerpo de detección a los pocillos	1 hora, 37°C
4. Lavado	
5. Añadir anticuerpo conjugado a los pocillos	30 minutos, TA*
6. Lavado	
7. Añadir sustrato a los pocillos	45 minutos, TA*
8. Añadir solución de interrupción a los pocillos	
9. Leer placa a 490 nm	

*Temperatura ambiente

Trazabilidad de estándares

El ensayo ELISA HER-2/neu ha sido desarrollado y calibrado por WILEX Inc., Cambridge MA, 02140, EE.UU.

Los Estándares ELISA HER-2/neu se han calibrado utilizando material de reserva de calibrador maestro almacenado en Cambridge MA. Este material, identificado como el lote R5345 de calibrador maestro para HER-2/neu, es una serie de seis reactivos líquidos, que abarca el rango de cero a 35 ng/mL de proteína p105 HER-2/neu. Las determinaciones de masa del calibrador maestro HER-2/neu se han asignado basándose en el análisis del calibrador, comparándolo directamente con tres muestras de proteína p105 HER-2/neu muy pura. Los equivalentes de masa (moles) de las muestras purificadas se determinaron mediante análisis cuantitativo de aminoácidos.

Materiales suministrados

Se suministran los componentes siguientes.

Placa de microtitulación: placa de microtitulación revestida previamente, suministrada lista para su uso, con 96 pocillos (12 tiras de ocho) en bolsas de papel metalizado con cierre hermético y un paquete desecante. Los pocillos están revestidos de anticuerpo monoclonal anti-proteína HER-2/neu.

Estándares HER-2/neu: seis (6) viales separados de p105 HER-2/neu recombinante. Los estándares se calibran en ng/mL y se etiquetan con valores que son 50 veces mayores que la dosis de vial real. Al asignar estos valores de etiquetas a una curva estándar se obvia la necesidad de corregir la dosis obtenida para una muestra diluida al 1:50 (2% de suero en tampón). Ver la sección Evaluación de resultados para obtener más detalles.

Núm. de estándar	ng/mL	Volumenes
6	35,0	1 mL
5	25,0	1 mL
4	15,0	1 mL
3	7,5	1 mL
2	2,5	1 mL
1	0,0	1 mL

Diluyente de muestras: una (1) botella que contiene BSA y 0,09% de azida sódica.

Anticuerpo de detección: una (1) botella suministrada lista para su uso, que contiene anticuerpo monoclonal de ratón anti-proteína HER-2/neu biotinilado en 0,01 M PBS (pH 7,4), estabilizante de proteínas y 0,09% de azida sódica.

Diluyente conjugado: una (1) botella que contiene 0,01 M PBS (pH 7,4), BSA y 0,1% de cloroacetamida.

Concentrado conjugado: un (1) vial que contiene 50X de peroxidasa de rábano rústicano/estreptavidina en tampón. Debe diluirse al 1X con diluyente conjugado para obtener conjugado de trabajo. Ver la Tabla 1.

Diluyente de sustrato: 0,1 M en tampón con citrato (pH 5,0) y 0,01% H₂O₂ (peróxido de hidrógeno).

Sustrato: un (1) vial que contiene pastillas OPD. Debe disolverse en diluyente de sustrato (1 pastilla/4 mL) para obtener sustrato de trabajo. Ver la Tabla 1.

Solución de interrupción: una (1) botella que contiene 2,5 N H₂SO₄ (ácido sulfúrico).

Concentrado de lavado de placas (20X): una (1) botella. Diluir una (1) parte de concentrado en 19 partes de agua de alta calidad antes de su uso.

Frases de seguridad y de advertencia



¡Nocivo!

R22 – Nocivo por ingestión.

S28 – En caso de contacto con la piel, lávese inmediata y abundantemente con agua.

Contiene azida sódica (estándares, diluyente de muestra, anticuerpo de detección)

¡Nocivo!

R40 – Posibilidad de efectos irreversibles.

R43 – Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel.

S36/37 – Úsense indumentaria y guantes de protección adecuados.

Contiene dihidrocloruro de ortofenilendiamina (pastillas de sustrato)

¡Irritante!

R36/38 – Irrita los ojos y la piel.

S36/37/39 – Úsense indumentaria, guantes adecuados y protección para los ojos/la cara.

S26 – En caso de contacto con los ojos, lávenlos inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.

Contiene ácido sulfúrico (solución de interrupción)

¡Irritante!

R43 – Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel

S24 – Evítense el contacto con la piel.

S37 – Úsense guantes adecuados.

Contiene cloroacetamida (diluyente conjugado y concentrado conjugado)

Materiales necesarios pero no provistos

- Incubadora de calor seco con capacidad para mantener una temperatura de 37°C
- Dispositivos de pipeteo: dispositivos de pipeteo de 2–20 µL, 20–200 µL y 200–1000 µL con puntas desechables
- Dispositivo de pipeteo reiterativo de precisión
- Dispositivo automático de lavado de placas de microtitulación de 96 pocillos
- Tubos de cultivo de 12 x 75 mm para preparación de muestras
- Mezclador Vortex
- Lector de placas de microtitulación con capacidad para medir la absorción en las placas de 96 pocillos a una longitud de onda de 490 nm
- Cilindro graduado de 500 mL o 1000 mL
- Depósitos de reactivos
- Agua desionizada
- Sellos de placas adhesivos o envoltorio de plástico
- Lejía doméstica líquida para la inactivación clínica de los especímenes y descontaminación del dispositivo de lavado de placas
- Toallas de papel desechables

Controles: los controles ELISA HER-2/neu que están compuestos de p105 recombinante en diluyente de muestras están disponibles en WILEX Inc. Para realizar pedidos, consultar los Controles ELISA HER-2/neu, Ref. 06489884. Almacenar a una temperatura entre 2 y 8°C.

Precauciones y recomendaciones

- Almacenar los componentes a una temperatura entre 2 y 8°C. No exponer los reactivos a luz excesiva. No congelar ninguno de los componentes del kit.
- No utilizar los reactivos del kit después de la fecha de caducidad.
- Usar sólo los pocillos de microtitulación suministrados con el kit.
- Enjuagar cualquier residuo de detergente de los elementos de cristal.
- Usar agua desionizada de la mejor calidad.
- No mezclar reactivos de kits diferentes.
- Los tampones y los reactivos de este kit contienen conservantes, que pueden ser bien azida sódica o bien cloracetamida. Se debe tener cuidado de evitar el contacto directo con estos reactivos.
- No llevarse a la boca las pipetas ni ingerir reactivos.
- Cuando se realice el ensayo o cuando se manipulen reactivos o muestras, no fumar, comer ni beber.
- Las muestras humanas pueden estar contaminadas con agentes infecciosos. No ingerir, no exponer a heridas ni inhalar aerosoles. Llevar guantes protectores y desechar las muestras biológicas de manera adecuada.
- No manipular las pastillas de sustrato con los dedos ni permitir el contacto con la piel, metal o agentes oxidantes. Desechar las soluciones que contengan OPD conforme a lo estipulado por la normativa local.
- Llevar guantes desechables y protección para los ojos al manipular solución de interrupción (ácido sulfúrico 2,5 N).
- Desechar todas las soluciones de trabajo (lavado de placas, conjugado, sustrato) al final de cada día.
- Preparar soluciones de trabajo nuevas para cada ensayo subsecuente.

Preparación de muestras

Para las muestras (y controles), se debe preparar una dilución inicial de diluyente de muestras a 1:50 antes del ensayo. Eliminar cualquier material floculento de las muestras mediante microcentrifugado antes de la dilución. Etiquetar los tubos y añadir 0,98 mL de diluyente de muestras a cada uno, seguido de 0,02 mL de espécimen/control. Mezclar suavemente y evitar la formación de espuma en la muestra diluida. Las muestras y los controles diluidos se pueden almacenar en tubos tapados durante una semana a una temperatura entre 2 y 8°C, y durante seis meses a –20°C. Proteger de la exposición a la luz. Puede ser necesario repetir el ensayo de algunas muestras a un grado de dilución mayor. Desechar las muestras almacenadas a una temperatura entre 2 y 8°C que muestren signos de contaminación. Volver a diluir a partir de suero.

Detalles del protocolo

PROCEDIMIENTOS RECOMENDADOS

1. La adición de reactivos se debe realizar en el orden especificado.
2. Los seis (6) estándares y especímenes de pruebas deben analizarse por duplicado.
3. Equilibrar todos los reactivos a temperatura ambiente (15–30°C) antes de su uso.
4. Dispensar sólo la cantidad suficiente de cada reactivo de ensayo para el número de pocillos utilizado. Para cada tira de 8 pocillos, dispensar 1 mL de anticuerpo de detección, conjugado, etc.
5. Preparar un mapa de la placa para usarlo como guía para la localización de muestras, estándares y pocillos de control.
6. La transferencia de muestras, estándares y controles desde los tubos de dilución a los pocillos se puede simplificar utilizando dispositivos de pipeteo semiautomatizados de varios canales. Para obtener información de los dispositivos recomendados, ponerse en contacto con el Servicio técnico.
7. Preparación de lavado de placas
 - a. Si el concentrado de lavado de placas está frío, dejar que llegue a temperatura ambiente (15–30°C) antes de su uso. Asegurarse de que todos los cristales se hayan disueltos. Si se desea, calentar a 37°C y mezclar bien.
 - b. Diluir un (1) volumen de concentrado de lavado de placas con 19 volúmenes de agua destilada o desionizada. Mezclar bien. Esta solución es lavado de placas. El volumen total necesario depende del método o instrumento de lavado que se utilice. Se necesita aproximadamente 1 L de esta solución para cebar un dispositivo de lavado automático y analizar una placa de microtitulación; cuando se realiza el lavado manual, se necesitan aproximadamente 700 mL para cada placa de microtitulación.
 - c. El lavado de placas debe prepararse nuevo cada día. No almacenar el lavado de placas.
8. Cuando se usen métodos manuales, tener precaución al invertir la placa de microtitulación para decantar o secar; presionar las lengüetas laterales del marco interior para evitar que se caigan las tiras.
9. Los dispositivos de lavado de placas automáticos obtienen los mejores resultados de lavado de placas de microtitulación. Los equipos de lavado de placas deben ajustarse, lavarse y mantenerse adecuadamente. Se recomiendan los dispositivos de lavado automáticos de 96 puertos. Las tiras de 8 pocillos de prueba se pueden utilizar para rellenar las partes que no se utilicen del soporte de los ensayos que usen una placa parcial. Retener y etiquetar las tiras ya usadas para este fin.
10. Establecer el volumen de llenado en 300 µL/pocillo. Cebar el instrumento con Lavado de placas. Para dispositivos de lavado de 96 puertos, realizar dos lavados de 3 ciclos. Después del lavado inicial de 3 ciclos, girar la placa 180 grados y repetir. Si se usa un dispositivo de lavado de tiras, realizar un ciclo de un solo lavado en la placa y repetirlo cinco veces.
11. Después del último lavado, invertir la placa de microtitulación y depositarla en una superficie absorbente. Comprobar visualmente que los pocillos estén vacíos.

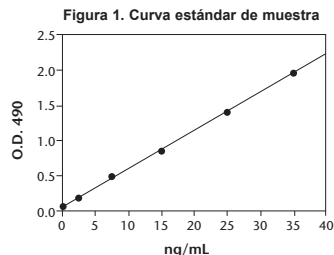
Procedimiento del ensayo

1. Sacar la placa de microtitulación de la bolsa. Calcular el número de tiras necesarias a partir del número de especímenes que se van a analizar y de las determinaciones replicadas (se recomienda realizar copias). (Cada estándar requiere dos pocillos; para la determinación del sustrato blanco se necesita uno.) Almacenar las tiras sin usar en la bolsa con cierre hermético y con paquete desecante a una temperatura entre 2 y 8°C (consultar Información de estabilidad y almacenamiento).
2. Diluir los especímenes y los controles a 1:50 (2%) con diluyente de muestras.
3. Mezclar bien los estándares, los controles y los especímenes y añadir 100 µL a los pocillos duplicados. Preparar un pocillo con 100 µL de diluyente de muestras para usarlo como sustrato blanco. Preparar pocillos duplicados para cada uno de los controles.
4. Cubrir la placa (con plástico para envolver alimentos o plástico adhesivo). Incubar durante 3 horas a 37°C.
5. Retirar cuidadosamente la cobertura de plástico y lavar la placa de microtitulación con lavado de placas.
6. Añadir 100 µL de anticuerpo de detección a todos los pocillos excepto al pocillo de sustrato blanco. Cubrir e incubar a 37°C durante 1 hora.
7. Durante la incubación con anticuerpo de detección, diluir el concentrado conjugado con diluyente conjugado para preparar conjugado de trabajo. Consultar la Tabla 1 para obtener las cantidades a usar según el número de tiras que se analicen.
8. Lavar la placa de microtitulación con lavado de placas.

- Añadir 100 µL de conjugado de trabajo a todos los pocillos excepto al pocillo de sustrato blanco. Cubrir e incubar a temperatura ambiente (15–30°C) durante 30 minutos.
- Durante la incubación con conjugado de trabajo, disolver pastillas de Sustrato en Diluyente de sustrato para preparar sustrato de trabajo. Consultar la Tabla 1 para obtener las cantidades a usar según el número de tiras que se analicen. Someter a vortex enérgicamente para garantizar la disolución completa. Una vez preparado, el sustrato de trabajo debe usarse antes de 30 minutos. Evitar la exposición a la luz.
- Lavar la placa de microtitulación con Lavado de placas.
- Añadir 100 µL de conjugado de trabajo a todos los pocillos, incluido el pocillo de sustrato blanco. Cubrir con una cobertura de plástico nueva e incubar la placa en la oscuridad a temperatura ambiente (15–30°C) durante 45 minutos.
- Añadir 100 µL de solución de interrupción a cada pocillo para interrumpir la reacción.
- Realizar la lectura de la absorción a 490 nm antes de transcurridos 30 minutos.

TABLA 1. ENSAYO HER-2/neu: PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS DEL ENSAYO

Núm. tiras usadas	Concentrado conjugado	Diluyente conjugado	Pastillas de sustrato	Diluyente de sustrato
1	20 µL	0,98 mL	1	4 mL
2	40 µL	1,96 mL	1	4 mL
3	60 µL	2,94 mL	1	4 mL
4	80 µL	3,92 mL	1	4 mL
5	100 µL	4,90 mL	2	8 mL
6	120 µL	5,88 mL	2	8 mL
7	140 µL	6,86 mL	2	8 mL
8	160 µL	7,84 mL	2	8 mL
9	180 µL	8,82 mL	3	12 mL
10	200 µL	9,80 mL	3	12 mL
11	220 µL	10,78 mL	3	12 mL
12	240 µL	11,76 mL	3	12 mL



Evaluación de resultados

CONCENTRACIÓN DE ESTÁNDARES

Los anticuerpos usados en este ensayo reconocen el dominio extracelular de unión al ligando de la proteína HER-2/neu [5]. Esta forma de HER-2/neu se identifica con un peso molecular aproximado de 105 kDa. Los estándares del kit, que se calibran en nanogramos, tienen en cuenta este peso molecular detectado en suero y se preparan a partir de una forma recombinante de un fragmento de 105 kDa de HER-2/neu.

CONCENTRACIÓN DE VALORES DESCONOCIDOS

- Obtener el promedio de los valores de absorción de cada estándar, control y dilución de espécimen con el fin de obtener la media de las absorciones.
- En papel milimetrado, trazar la absorción media de cada estándar en el eje Y, la concentración de proteína HER-2/neu (ng/mL) en el eje X y conectar los puntos.
- Determinar la concentración de proteína HER-2/neu de cada dilución de espécimen mediante su interpolación en la curva estándar. Hay disponibles paquetes de software (como SoftMax Pro™, Molecular Devices, Sunnyvale, CA EE.UU.; KC4™, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT EE.UU.) que pueden simplificar este proceso. Usar un algoritmo de cálculo de la curva cuadrática (polinómico de segundo orden).

- Nota: no realizar la asignación de pocillos "blancos" mediante programas de software. Esta acción restará las lecturas en blanco medias de todos los demás pocillos. Para el control de calidad y la resolución de problemas es útil poder inspeccionar los valores de absorción obtenidos de todos los pocillos sin realizar ajustes en los datos iniciales.
- Los resultados de las muestras se expresan en nanogramos por mL mediante la lectura directa de los valores de la curva estándar (ng/mL), tal como se indica en los viales y en la sección Materiales suministrados de este documento. Por comodidad, no es necesaria ninguna corrección matemática de la dilución para las muestras diluidas a 1:50, ya que la concentración real de las preparaciones estándar es el 2% de la dosis marcada (es decir, que se han prediluido a 1:50).

DILUCIÓN DE MUESTRAS A CONCENTRACIONES ELEVADAS

- Para las muestras que presenten valores de absorción (OD) que excedan el rango de la curva estándar, es necesario realizar ensayos subsiguientes a diluciones mayores.
 - Para preparar muestras más diluidas, comenzar siempre con una dilución inicial a 1:50 (consultar Preparación de muestras) y, a continuación, diluir seriamente a 1:2 en diluyente de muestras. Ejemplo:
- | Dilución de muestra | Volumen de dilución previo | Volumen de diluyente de muestras |
|---------------------|----------------------------|----------------------------------|
| 1:100 | 0,5 mL a 1:50 | 0,5 mL |
| 1:200 | 0,5 mL a 1:100 | 0,5 mL |
| 1:400 | 0,5 mL a 1:200 | 0,5 mL |
- Si las muestras más diluidas generan valores OD < 0,3, deben volver a analizarse usando menos material de dilución. Cuando se multiplica el factor de corrección de dilución (consultar el Paso 4 a continuación) por resultados de un valor OD tan bajo, puede que se obtenga una estimación de proteína HER-2/neu erróneamente elevada.
 - Los resultados de muestras más diluidas requerirán la corrección de los valores obtenidos a partir del análisis de cualquier dilución superior a 1:50. Ejemplo:
- | Dilución de muestra | Factor de corrección de dilución (multiplicar el resultado obtenido por) |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| 1:100 | 2 |
| 1:200 | 4 |
| 1:400 | 8 |

Control de calidad del ensayo

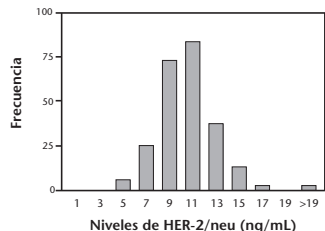
Es recomendable que todos los ensayos cumplan los siguientes parámetros de funcionamiento.

- Examinar los resultados de los análisis de controles del ensayo para confirmar que las recuperaciones se encuentren dentro de los rangos esperados (incluidos en el folleto del producto) para cada nivel.
- Inspeccionar el rango dinámico de la curva estándar. El estándar de Nivel 1 debe encontrarse entre 0,04 y 0,09 OD, y el estándar de Nivel 6 entre 1,5 y 2,4 OD.
- Si se usa software de generación de curvas, examinar el cálculo de R^2 , que debe encontrarse entre 0,997 y 1,0. Si no se cumple alguno de estos parámetros, debe considerarse la posibilidad de repetir el análisis de la muestra en un ensayo subsiguiente.

Valores esperados INDIVIDUOS SANOS

Al igual que con todas las pruebas, cada laboratorio debe establecer su propio rango de referencia. En una población de 241 mujeres sanas, se detectó que el 95% de los valores de proteína HER-2/neu sérica eran inferiores a 13,7 ng/mL. No existía una diferencia significativa entre los valores de HER-2/neu de mujeres pre y postmenopáusicas. Basándose en la misma población, el límite superior de normalidad (media + 2SD) era 14,7 ng/mL. El análisis ROC confirma el valor 15 ng/mL como el punto límite adecuado entre los niveles normales y elevados de proteína HER-2/neu sérica. La distribución de los niveles de HER-2/neu sérica para toda la población (n = 241) se muestra en la Figura 2.

Figura 2. Distribución de proteína sérica HER-2/neu en una población de mujeres sanas.



SEGUIMIENTO DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA CON METÁSTASIS

La utilidad clínica del ensayo ELISA HER-2/neu en la supervisión longitudinal de las pacientes con cáncer de mama con metástasis se evaluó utilizando muestras de suero retrospectivas procedentes de pacientes con cáncer de mama en la fase tardía, abarcando un periodo de 6 a 12 meses, en tres sitios clínicos de Estados Unidos. Cincuenta y seis pacientes en terapia cuyo nivel inicial de oncoproteína HER-2/neu sérica era elevado (15 ng/mL o superior) se evaluaron para obtener la correspondencia de los cambios en los niveles de HER-2/neu sérica con los cambios en el curso clínico de la enfermedad.

En la Tabla 2 se presenta el análisis de los resultados del estudio en cada visita. Los cambios del nivel de HER-2/neu sérica en cada paciente se calcularon de una visita a otra. Estos cambios se separaron en dos grupos: El grupo I tuvo cambios en el nivel de HER-2/neu sérica paralelos al curso clínico de la enfermedad, mientras que el grupo II no tuvo cambios en el nivel de HER-2/neu sérica paralelos al curso clínico de la enfermedad. El estado o curso clínico fue determinado por el médico. La correspondencia entre los cambios de HER-2/neu y el estado clínico se determinó de la siguiente manera: un aumento del 20% o superior con respecto a la visita anterior era indicativo de la progresión de la enfermedad. Si el cambio era un aumento inferior al 20% con respecto a la visita anterior, indicaba la ausencia de progresión de la enfermedad durante la terapia (incluida la respuesta a la terapia o la estabilidad de la enfermedad). Se consolidó la estabilidad y la respuesta a la enfermedad, ya que ambas reflejaban la efectividad de la terapia actual. El criterio del 20% está basado en la variabilidad longitudinal en pacientes normales (determinada a partir de los niveles de HER-2/neu sérica en seis muestras seriadas de cada una de 38 mujeres sanas).

TABLA 2. CORRESPONDENCIA ENTRE EL ESTADO DE LA ENFERMEDAD DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA CON METÁSTASIS Y LOS NIVELES DE HER-2/neu SÉRICA: DE UNA VISITA A OTRA

Cambio de HER-2/neu	Cambio del estado clínico		Total
	Progresión	Sin progresión	
Aumento ≥ 20%	52	33	85
Aumento < 20%	55	96	151
Total	107	129	236

Concordancia = 62,7% (CI = de 56,4 a 68,6%)

Valor predictivo: Carencia de progresión = 63,6% (CI = de 55,7 a 70,8%)

Progresión = 61,2% (CI = de 50,6 a 70,8%)

En las figuras siguientes se muestran ejemplos típicos de los cambios de los niveles de HER-2/neu sérica a lo largo del tiempo en 56 pacientes con cáncer de mama con metástasis obtenidos a partir del estudio clínico. En la Figura 3 se muestra una paciente cuya enfermedad está respondiendo, y en la Figura 4 se muestra una paciente con enfermedad progresiva.

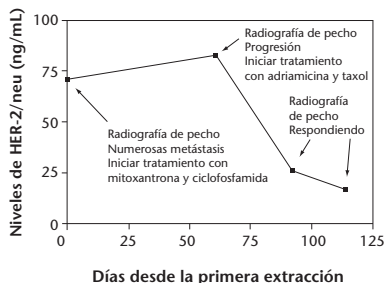


Figura 3. Seguimiento de una paciente de 38 años con cáncer de mama en Fase IV utilizando ELISA HER-2/neu. Los cambios longitudinales de los niveles de HER-2/neu sérica se corresponden con los cambios en el estado de la enfermedad.

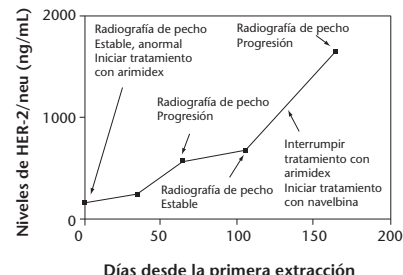


Figura 4. Seguimiento de una paciente de 74 años con cáncer de mama en Fase IV utilizando ELISA HER-2/neu. Los cambios longitudinales de los niveles de HER-2/neu sérica se corresponden con los cambios en el estado de la enfermedad.

Características de funcionamiento no clínicas IMPRECISIÓN

La imprecisión se determinó mediante el análisis de cuatro muestras de control que contenían tres controles basados en tampón y un pool de suero humano. Se utilizaron tres lotes de kit diferentes en cada uno de los tres laboratorios. Para cada control se establecieron determinaciones triplicadas por cada ensayo en un total de 130 ensayos. La precisión intraserie y la precisión total de cada control se calcularon de acuerdo con el protocolo NCCLS EP-5A. La imprecisión intraserie para los tres sitios y lotes de kit mostraba un CV del 10% o inferior, con un CV de imprecisión total para todos los sitios y kits entre el 10 y el 17,7%.

Muestra control	Núm. de ensayos	Núm. de réplicas	Media (ng/mL)
Control 1	130	385	24,5
Control 2	131	390	9,8
Control 3	131	386	3,3
Suero 4	130	385	9,5

Muestra control	Precisión intraserie		Precisión total	
	S D	% CV	S D	% CV
Control 1	1,46	6,0	2,62	10,7
Control 2	0,69	7,0	1,03	10,4
Control 3	0,34	10,2	0,59	17,7
Suero 4	0,65	6,9	1,02	10,8

SENSIBILIDAD

La concentración de analito detectable mínima se determinó mediante la medición repetida de una muestra con dosis cero (diluyente de muestras). La media y la desviación estándar de la recuperación aparente de HER-2/neu se calculó para 230 determinaciones realizadas durante un periodo de 20 días entre tres lotes de kit diferentes y tres laboratorios distintos. Tras la adición de dos desviaciones estándar a la dosis media recuperada de HER-2/neu, la concentración detectable mínima se determinó en 1,5 ng de p105/mL sérica.

ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

Reactividad cruzada. El receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFr) es una molécula estrechamente relacionada con el receptor del factor de crecimiento de la proteína HER-2/neu, con una homología del 88% con el dominio intracelular y con una homología del 44% con el dominio extracelular. El ensayo ELISA HER-2/neu se excitó con EGFr a 850 ng/mL. Este material no produjo ningún efecto en el ensayo, lo que indica que los inmunoreactivos del dispositivo no producen reacción cruzada con el EGFr.

Sustancias interferentes. El anticuerpo humano anti-ratón (HAMA), que se encuentra en pocas casos en el suero humano, tiene la capacidad de unirse a los reactivos cruciales en los inmunoensayos, dando como

resultado señales positivas y negativas falsas. En el dispositivo se analizaron algunas muestras de suero con resultados de HAMA positivos conocidos, así como muestras con factor reumatoide positivo. Con estas muestras no se generaron señales falsas. Los reactivos del dispositivo se han formulado para que bloqueen cualquier reactividad falsa de este tipo.

Las mediciones de HER-2/neu sérica pueden realizarse mientras que los pacientes están ingiriendo vitaminas, fármacos de automedicación o recibiendo quimioterapia. Para probar la posibilidad de que estos agentes pudieran interferir en las determinaciones precisas de HER-2/neu, los interferentes exógenos potenciales se excitaron en suero de control positivo que contenía una concentración conocida de HER-2/neu y se analizaron en el ensayo subsecuentemente. Algunos constituyentes del suero comunes también se analizaron para conocer su potencial para actuar como interferentes endógenos. Ninguno de los compuestos analizado tuvo un efecto en la recuperación de analito. Ver la Tabla 3.

RANGO ANALÍTICO

El ensayo ELISA HER-2/neu tiene la capacidad de cuantificar con precisión los niveles de HER-2/neu sérica en muestras prediluidas, lo que proporciona una respuesta al ensayo que se encuentra en el rango de 1,5 a 35 ng de proteína p105 HER-2/neu por mL de suero. Las muestras que produzcan una señal que supere el límite superior del rango de la curva estándar (35 ng/mL) deben diluirse adicionalmente con diluyente de muestras y volver a analizarse. Asegurarse de corregir la recuperación obtenida de proteína HER-2/neu para las preparaciones de dilución superiores a la dilución habitual a 1:50.

TABLA 3. INTERFERENTES POTENCIALES DE ELISA

INTERFERENTES POTENCIALES	CONCENTRACIONES DE PRUEBAS	INTERFERENTES POTENCIALES	CONCENTRACIONES DE PRUEBAS
ENDÓGENOS		FÁRMACOS DE VENTA LIBRE, ETC.	
Triglicéridos (intralipina 20%)	3000,0 mg/dL	Acetaminofeno	200,0 µg/mL
Hemoglobina	1,0 g/dL	Aspirina	500,0 µg/mL
Inmunoglobulina (gammaglobulina)	6,0 g/dL	Ibuprofeno	400,0 µg/mL
Albumina	6,5 g/dL	Cafeína	100,0 µg/mL
Bilirrubina	25,0 mg/dL	AGENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS	
Heparina	0,46 mg/mL	Aminoglutetamida	398,0 µg/mL
EXÓGENOS		Bleomicina	0,16 U/mL
Vitamina A acetato trans-retinol	10,0 IU/mL	Cisplatina	173,0 µg/mL
Vitamina B1 tiamina	3,0 µg/mL	Doxorrubicina	51,8 µg/mL
Vitamina B2 riboflavina	3,4 µg/mL	Ciclofosfamida	800,0 µg/mL
Vitamina B6 peróxido HCL	4,0 µg/mL	Dietilestilbestrol	23,0 µg/mL
Vitamina B12	12,0 ng/mL	Estramustina	102,2 µg/mL
Vitamina C ácido ascórbico	30,0 µg/mL	Flutamida	10,0 µg/mL
Vitamina D2 ergocalciferol	0,8 IU/mL	5-Fluorouracil	1600,0 µg/mL
Vitamina E acetato de tocoferol	0,06 IU/mL	Lupron	15,0 µg/mL
Ácido fólico	0,8 µg/mL	Metotrexato	450,0 µg/mL
Niacina	40,0 µg/mL	Mitoxantrona	56,0 µg/mL
		Mitomicina C	73,0 µg/mL
		Megace	27,0 ng/mL
		Tamoxifeno	1,4 µg/mL
		Vincristina	4,88 µg/mL
		Vinblastina	16,3 µg/mL
		Herceptin (Trastuzumab)	500 µg/mL

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Al realizar los pasos de los inmunoensayos manuales, existe una posibilidad de medición errónea (recuperación de muestras) como resultado de la variación en el tiempo de incubación al que las muestras están sujetas en cada uno de los pasos de incubación. Todos los pocillos deberían permanecer esencialmente el mismo tiempo de incubación requerido para cada paso de reactivo. En concreto, cuando se añaden estándares, controles y muestras a los pocillos de la placa, el tiempo entre la adición de la primera muestra y la

última debería estar dentro de un intervalo máximo de tiempo de 15 minutos. Preparar todas las muestras por adelantado. Se recomienda encarecidamente el uso de dispositivos de pipeteo de varias puntas semiautomatizados con el fin de reducir los tiempos de estos procedimientos. Para evitar la contaminación cruzada, asegurarse de usar puntas nuevas para añadir cada muestra.

Los inmunoensayos que utilizan las configuraciones denominadas sandwich, como este dispositivo, están sujetos a interferencias y resultados falsos debidos a muestras que contienen agentes inmunoreactivos contra anticuerpos de ratón. El anticuerpo HAMA, el anticuerpo heterofílico y el factor reumatoide son los principales ejemplos de estos interferentes. Los fabricantes han tomado precauciones en la formulación de los reactivos incluidos en este dispositivo con el fin de reducir al mínimo o eliminar esas interferencias. No obstante, a la luz de esta posible interferencia, se debe tener cuidado al evaluar los resultados del ensayo que puedan ser incoherentes con el estado clínico general del paciente.

Es posible que una paciente con cáncer de mama confirmado tenga niveles de proteína HER-2/neu sérica dentro del rango de los niveles observados en individuos sanos. Ser precavido en la interpretación de los resultados de HER-2/neu. Los niveles de HER-2/neu sérica pueden no siempre indicar la presencia o ausencia de enfermedad maligna. El valor de HER-2/neu debe usarse como parte de una valoración clínica general que incluya pruebas diagnósticas y evaluación clínica adicionales.

Resolución de problemas

- Cada ensayo debe incluir los seis (6) estándares analizados por duplicado usando el protocolo descrito en Detalles del protocolo. Los tiempos de incubación o las temperaturas que difieren considerablemente de aquellos especificados pueden generar resultados erróneos.
- La forma de la curva estándar no es lineal y varía ligeramente de un ensayo a otro. Para la reducción de datos manualmente, aplicar los gráficos unidos por puntos. Si se está utilizando software ELISA, usar un algoritmo de cálculo de la curva cuadrática (polinómico de segundo orden).
- Los duplicados pobres, si van acompañados de valores elevados para el estándar cero, indican un lavado insuficiente. Si se han seguido exactamente todas las instrucciones de Detalles del protocolo, esos resultados indican la necesidad de realizar el mantenimiento del dispositivo de lavado. Además, evitar introducir burbujas en los pocillos al pipetear muestras y reactivos.
- El pocillo de sustrato blanco debería tener una lectura inferior o igual a 0,05 unidades de absorción. Una causa posible de valores superiores es la exposición a la luz del sustrato de trabajo, ya sea antes o durante el paso de incubación. Una vez preparado, el sustrato de trabajo debe usarse antes de 30 minutos.
- Una señal baja puede indicar 1) que la placa se haya secado entre los pasos. No permitir que se seque la placa. Añadir el siguiente reactivo inmediatamente después del lavado; o 2) que el lavado se haya realizado incorrectamente. Asegurarse de que el dispositivo de lavado de la placa de microtitulación se ha cebado correctamente con lavado de placas (consultar Detalles del protocolo).

Información de estabilidad y almacenamiento

Se ha analizado la estabilidad de todos los reactivos incluidos en el ensayo ELISA HER-2/neu. Los reactivos no deben usarse después de la fecha de caducidad indicada. Los reactivos del kit deben almacenarse a una temperatura entre 2 y 8°C, excepto el concentrado de lavado de placas, que se puede almacenar a temperatura ambiente. Las placas de ensayo deben almacenarse selladas en la bolsa de papel metalizado original y con paquete desecante. Una vez abierto, el dispositivo funcionará dentro de las especificaciones hasta 4 semanas (30 días) dentro de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

Servicio técnico

Tel: +1 617 492 3900 x502
 Correo electrónico: oncogenetech@wilex.com



WILEX Inc.
 Cambridge, MA 02140 USA



EMERGO EUROPE

Molenstraat 15
 2513 BH, The Hague
 The Netherlands
 Tel: +31 (0)70 345 8570
 Fax: +31 (0)70 346 7299

Aplicação

O ensaio HER-2/neu ELISA destina-se a medir quantitativamente a proteína HER-2/neu no soro de mulheres com cancro da mama metastático. A utilização do ensaio de imunoborção enzimática HER-2/neu ELISA está indicada para o acompanhamento e controlo de doentes com cancro da mama metastático cujo valor sérico inicial da HER-2/neu seja superior a 15 ng/mL. Os valores da HER-2/neu devem ser utilizados em conjunto com as informações obtidas em procedimentos clínicos e outros procedimentos de diagnóstico para o tratamento do cancro da mama metastático. A utilidade clínica da medição do nível sérico da HER-2/neu como indicador prognóstico de uma recaída precoce, bem como no tratamento de doentes submetidas a regimes de imunoterapia, ainda não está totalmente estabelecida.

PARA USO EM DIAGNÓSTICO IN VITRO

Princípio do método	ELISA do tipo sanduíche de fase sólida
Intervalo analítico	0 ng/mL a 35 ng/mL
Tipo de amostra	Soro humano
Volume da amostra de análise	10,0 microlitros
Sensibilidade	1,5 ng de p105/mL de soro

A compra deste conjunto autoriza a sua utilização nos termos das seguintes patentes: patentes dos EUA 5,401,638 e 5,604,107; patentes da OEP 0494135 e 0412116; patente canadiana 2,026,250-8

Índice

Aplicação	29	Procedimento do ensaio	31
Informação de base	29	Curva padrão da amostra	31
Princípio do ensaio	29	Avaliação dos resultados	31
Resumo do procedimento	29	Controlo de qualidade do ensaio	32
Traçabilidade dos padrões	29	Valores esperados	32
Materiais fornecidos	29	Características do desempenho não clínico	33
Expressões de segurança e aviso	30	Resolução de problemas	34
Materiais necessários, mas não fornecidos	30	Dados de estabilidade e conservação	34
Precauções e recomendações	30	Assistência técnica	34
Preparação das amostras	30	Referências	51
Protocolo detalhado	31	Explicação dos símbolos	53

Informação de base

O oncogene HER-2/neu, também referido como c-erbB-2, codifica uma proteína com um peso molecular de 185.000 Daltons (p185) e pertence a uma família de receptores do factor de crescimento epitelial estruturalmente relacionados com o receptor do factor de crescimento epidérmico humano [1]. A proteína HER-2/neu p185 de comprimento total é composta por um domínio citoplasmático com actividade da tirosina quinase, um domínio transmembranar e um domínio extracelular (ECD) que é libertado desde a superfície das células do cancro da mama [2,3]. Inúmeros estudos têm demonstrado que o ECD (domínio extracelular) libertado pela HER-2/neu é uma glicoproteína com um peso molecular entre 97 e 115 kDa, sendo designada por p105 [3,4]. O ECD pode ser quantificado com exactidão no soro através de um ensaio [4] que utilize anticorpos monoclonais [5] direccionados para os epitopos externos da proteína HER-2/neu. Muitas publicações demonstram que o ECD é libertado no sangue de indivíduos normais e que pode ser medido em níveis elevados nas mulheres com cancro da mama metastático [4,6–26]. Muitos destes estudos acerca da HER-2/neu sérica confirmaram os dados substanciais obtidos em estudos em tecidos, que indicam que o aumento da expressão da HER-2/neu é um marcador de mau prognóstico, de sobrevivência global mais curta e de agressividade biológica.

Estudos científicos recentes sugerem que a quantificação do ECD pode ter várias aplicações clínicas importantes, tais como o controlo das doentes com cancro da mama com metástases e o controlo de uma recaída precoce nas doentes com cancro da mama [6–10,12,15,17–20,22–26]. Estes relatórios demonstraram que 30–50% das mulheres com tumores HER-2/neu positivos no primeiro diagnóstico desenvolveram níveis elevados de HER-2/neu sérica com progressão para cancro da mama metastático [4,6–26]. Estes estudos também ilustraram que o controlo dos níveis do ECD sérico após a cirurgia está correlacionado com a evolução clínica da doença e que os níveis de HER-2/neu sérica aumentaram com a progressão da doença ou diminuíram com a resposta ao tratamento [12,15,19,20,25,26]. Vários relatórios também demonstram que podem ocorrer níveis elevados da HER-2/neu sérica em mulheres com cancro da mama metastático que

tiveram tumores mamários primários determinados como HER-2/neu negativos através de imunohistoquímica [6,11,18,21,27]. De acordo com vários estudos de imunohistoquímica e do soro, a proteína HER-2/neu tem uma sobreexpressão em muitos tumores de origem epitelial, incluindo os cancros do pulmão [28], próstata [29], pâncreas [30], cólon [31], estômago [32], ovários [33] e hepatocelular [34].

Foram concedidas patentes relacionadas com a quantificação e detecção do domínio ECD p105 (nos EUA, patente n.º 5,401,638; no Canadá, n.º 2,026,250-8 e na Europa n.º 0494135), bem como patentes relacionadas com a quantificação e detecção da molécula p185 de comprimento total (nos EUA, patente n.º 5,604,107 e na Europa, patente n.º 0412116). Outras patentes semelhantes ainda estão pendentes no Japão.

Princípio do ensaio

O HER-2/neu ELISA é um imunoenensaio enzimático do tipo sanduíche que utiliza um anticorpo monoclonal de rato para captura e outro anticorpo monoclonal de rato biotilado para detecção da proteína humana HER-2/neu. Tanto os reagentes de captura como os de detecção ligam-se especificamente ao domínio extracelular da proteína HER-2/neu. O anticorpo de captura encontra-se imobilizado na superfície interna dos poços da placa de microtitulação. Para efectuar a análise, um volume apropriado de amostra é incubado no poço revestido, por forma a permitir que o anticorpo de captura se ligue ao antigénio. O antigénio imobilizado é então estimulado pelo anti-soro detector. A quantidade de anticorpo detector ligado ao antigénio é medida através da ligação a um conjugado de estreptavidina/peroxidase de amoníaco, que depois catalisa a conversão do substrato cromogénico o-fenilenediamina (OPD) num produto colorido. O produto de reacção colorido é quantificado por meio de espectrofotometria e está relacionado com a quantidade de proteína HER-2/neu existente na amostra.

Para obter instruções, consulte as secções "Protocolo detalhado" e "Avaliação dos resultados" deste folheto.

Resumo do procedimento

Passos	Incubações
1. Adicionar amostras e padrões aos poços	3 horas, 37°C
2. Lavar	
3. Adicionar anticorpo detector aos poços	1 hora, 37°C
4. Lavar	
5. Adicionar anticorpo conjugado aos poços	30 minutos, TA*
6. Lavar	
7. Adicionar substrato aos poços	45 minutos, TA*
8. Adicionar solução de paragem aos poços	
9. Ler a placa a 490 nm	

*Temperatura ambiente

Traçabilidade dos padrões

O ensaio HER-2/neu ELISA foi desenvolvido e calibrado pela WILEX Inc., Cambridge MA, 02140, EUA.

Os padrões do HER-2/neu ELISA são calibrados com um material de reserva do calibrador principal mantido em Cambridge, MA, EUA. Este material é identificado como HER-2/neu Master Calibrator, lote R5345, e é composto por uma série de seis reagentes líquidos, variando entre zero e 35 ng/mL de proteína HER-2/neu p105. As determinações de massa do HER-2/neu Master Calibrator têm sido atribuídas com base no ensaio do material calibrador em comparação directa com três amostras de proteína HER-2/neu p105 altamente purificadas. Os equivalentes de massa (moles) das amostras purificadas foram determinados por análise quantitativa dos aminoácidos.

Materiais fornecidos

São fornecidos os seguintes componentes.

Placa de microtitulação — Placa de microtitulação previamente revestida, fornecida pronta a utilizar, com 96 poços (12 tiras de oito poços), em sacos de folha de alumínio com fecho, juntamente com um pacote de dessecante. Os poços estão revestidos com anticorpo monoclonal anti-proteína HER-2/neu.

HER-2/neu Standards — Seis (6) frascos individuais de HER-2/neu p105 recombinante. Os padrões são calibrados em ng/mL e rotulados com valores 50 vezes superiores à dosagem real. A atribuição destes valores de rótulo a uma curva padrão obvia à necessidade de corrigir a dose reportada para uma amostra diluída a 1:50 (soro a 2% em tampão). Consulte a secção "Avaliação dos resultados", para obter mais detalhes.

Padrão n.º	ng/mL	Volumes
6	35,0	1 mL
5	25,0	1 mL
4	15,0	1 mL
3	7,5	1 mL
2	2,5	1 mL
1	0,0	1 mL

Diluyente de amostras — Um (1) frasco contendo BSA (albumina sérica bovina) e azida de sódio a 0,09%.
 Anticorpo detector — Um (1) frasco fornecido pronto a utilizar, contendo anticorpo monoclonal de rato biotinilado anti-proteína HER-2/neu em PBS (solução salina tamponada com fosfato) 0,01 M (pH 7,4), estabilizador de proteínas e azida de sódio a 0,09%.

Diluyente de conjugado — Um (1) frasco contendo PBS 0,01 M (pH 7,4), BSA e cloroacetamida a 0,1%.
 Concentrado de conjugado — Um (1) frasco contendo estreptavidina/peroxidase de amorácia em tampão, numa concentração de 50X. Deve ser diluído para uma concentração de 1X com diluyente de conjugado para criar o conjugado de trabalho. Consulte a tabela 1.

Diluyente de substrato — Tampão de citrato 0,1 M (pH 5,0) e H₂O₂ (peróxido de hidrogénio) a 0,01%.
 Substrato — Um (1) frasco contendo comprimidos de OPD. Deve ser dissolvido no diluyente de substrato (1 comprimido/4 mL) para criar o substrato de trabalho. Consulte a tabela 1.

Solução de paragem — Um (1) frasco contendo H₂SO₄ (ácido sulfúrico) 2,5 N.
 Concentrado de lavagem da placa (20X) — Um (1) frasco. Dilua uma (1) parte de concentrado em 19 partes de água de alta qualidade, antes de utilizar.

Expressões de segurança e aviso



Nocivo!

R22 – Nocivo se for ingerido.

S28 – Após contacto com a pele, lavar imediata e abundantemente com água.

Contém azida de sódio

(Padrões, diluyente de amostras, anticorpo detector)

Nocivo!

R40 – Possível risco de efeitos irreversíveis.

R43 – Pode causar sensibilização por contacto com a pele.

S36/37 – Utilize vestuário e luvas de protecção adequados.

Contém diidrocloreto de orto-fenilenediamina

(Comprimidos de substrato)

Irritante!

R36/38 – Irritante para os olhos e pele.

S36/37/39 – Usar luvas e equipamento protector para a vista/face adequados.

S26 – Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um especialista.

Contém ácido sulfúrico

(Solução de paragem)

Irritante!

R43 – Pode causar sensibilização por contacto com a pele.

S24 – Evite o contacto com a pele.

S37 – Utilize luvas adequadas.

Contém cloroacetamida

(Diluyente de conjugado e concentrado de conjugado)

Materiais necessários, mas não fornecidos

- Incubadora de calor seco com capacidade para manter os 37°C
- Pipetas: pipetas de 2–20 µL, 20–200 µL e 200–1000 µL com pontas descartáveis
- Pipeta de precisão doseadora
- Unidade de lavagem automatizada da placa de microtitulação de 96 poços
- Tubos de cultura de 12 x 75 mm para preparação das amostras
- Agitador tipo vórtice
- Leitor de placas de microtitulação capaz de medir a absorvância num comprimento de onda de 490 nm em placas de 96 poços
- Cilindro graduado de 500 ou 1000 mL
- Depósitos dos reagentes
- Água desionizada
- Cobertura de plástico ou película adesiva para cobrir as placas
- Lixívia de uso doméstico líquida para inactivação das amostras clínicas e desinfecção da unidade de lavagem das placas
- Lenços de papel descartáveis

Controlos—Os controlos do HER-2/neu ELISA, compostos por p105 recombinante em diluyente de amostras, estão disponíveis através da WILEX Inc. Quando fizer uma encomenda, mencione a Ref^o 06489884 dos HER-2/neu ELISA Controls. Os controlos são diluídos a 1:50 antes da realização do ensaio. Cada um tem um volume de 0,5 mL. Conserve a uma temperatura de 2 a 8°C.

Precauções e recomendações

- Conserve os componentes a uma temperatura de 2 a 8°C. Não exponha os reagentes a uma luz excessivamente forte. Não congele os componentes do conjunto.
- Não utilize os reagentes do conjunto para além do prazo de validade.
- Utilize apenas os poços de microtitulação fornecidos com o conjunto.
- Lave todos os resíduos de detergente dos utensílios de vidro.
- Utilize água desionizada da mais alta qualidade.
- Não misture reagentes de diferentes conjuntos.
- Os tampões e os reagentes utilizados neste conjunto contêm azida de sódio ou cloroacetamida como conservantes. Deve ter-se o cuidado de evitar o contacto directo com estes reagentes.
- Não pipete com a boca nem ingira qualquer um dos reagentes.
- Não deve fumar, comer ou beber quando realizar o ensaio nem no local onde são manuseadas as amostras ou os reagentes.
- As amostras humanas podem estar contaminadas com agentes infecciosos. Não deve ingerir, respirar aerossóis ou expor feridas abertas. Utilize luvas de protecção e elimine as amostras biológicas da forma correcta.
- Não manuseie os comprimidos de substrato com os dedos nem permita o contacto com a pele, metal ou agentes oxidantes. Elimine as soluções que contenham OPD em conformidade com os regulamentos locais.
- Utilize luvas descartáveis e protecção ocular quando manusear a solução de paragem (ácido sulfúrico 2,5 N).
- Elimine todas as soluções de trabalho (solução de lavagem da placa, conjugado, substrato) no final de cada dia.
- Prepare novas soluções de trabalho para cada ensaio a realizar.

Preparação das amostras

Antes da realização do ensaio, é necessário preparar uma diluição inicial das amostras (e controlos) de 1:50 com o diluyente de amostras. Antes de efectuar a diluição, remova qualquer material floculante das amostras através de microcentrifugação. Identifique os tubos e adicione 0,98 mL de diluyente de amostras a cada um, seguido de 0,02 mL de amostra/controlo. Misture com suavidade, evitando a formação de espuma na amostra diluída. As amostras e os controlos diluídos podem ser conservados em tubos fechados durante uma semana no máximo, a uma temperatura de 2 a 8°C, e durante seis meses a uma temperatura de -20°C. Proteja-os da exposição à luz. Poderá ser necessário repetir o ensaio de algumas amostras com uma diluição mais elevada. Elimine qualquer amostra conservada a uma temperatura de 2 a 8°C que apresente sinais de contaminação. Volte a diluir a partir do soro.

Protocolo detalhado

PROCEDIMENTOS RECOMENDADOS

1. A adição dos reagentes deve ser efectuada pela ordem especificada.
2. Os seis (6) padrões e amostras de análise devem ser executados em duplicado.
3. Deixe os reagentes atingir a temperatura ambiente (15 a 30°C) antes de os utilizar.
4. Distribua apenas o suficiente de cada reagente de ensaio para o número de poços que pretende utilizar. Por cada tira de 8 poços, distribua 1 mL de anticorpo detector, conjugado, etc.
5. Prepare um esquema da placa para utilizar como guia, a fim de localizar os poços das amostras, padrões e controlos.
6. A transferência de amostras, padrões e controlos dos tubos de diluição para os poços pode ser simplificada utilizando pipetas multicanal semi-automatizadas. Contacte a assistência técnica para se informar acerca dos dispositivos recomendados.
7. Preparação da solução de lavagem da placa
 - a. Se o concentrado de lavagem da placa estiver frio, deixe-o atingir a temperatura ambiente (15 a 30°C) antes de o utilizar. Certifique-se de que todos os cristais estão dissolvidos. Se desejar, aqueça-o até 37°C e misture bem.
 - b. Dilua um (1) volume do concentrado de lavagem da placa com 19 volumes de água destilada ou desionizada. Misture bem. Esta solução é a solução de lavagem da placa. O volume total necessário dependerá do método ou instrumento de lavagem utilizado. É necessário aproximadamente 1 L desta solução para purgar uma unidade de lavagem automatizada e executar uma placa de microtitulação; são necessários cerca de 700 mL para cada placa de microtitulação quando se realiza uma lavagem manual.
 - c. A solução de lavagem da placa deve ser preparada todos os dias. Não conserve a solução de lavagem da placa.
8. Quando utilizar métodos manuais, tenha cuidado ao inverter a placa de microtitulação para efeitos de decantação ou absorção; pressione as patilhas laterais da estrutura para dentro, de modo a impedir que as tiras caiam.
9. A lavagem da placa de microtitulação é melhor realizada por uma unidade de lavagem de placas automatizada. O equipamento de lavagem das placas deve ser devidamente ajustado, limpo e mantido. Recomendam-se as unidades de lavagem automatizadas com 96 aberturas. Pode utilizar tiras fictícias de 8 poços para encher a parte não utilizada do suporte nos ensaios que utilizem uma placa parcial. Guarde e rotule as tiras previamente utilizadas para este efeito.
10. Defina o volume de enchimento em 300 µL/poço. Purgue o instrumento com solução de lavagem da placa. Para as unidades de lavagem com 96 aberturas, utilize duas lavagens de 3 ciclos. Após a primeira lavagem de 3 ciclos, rode a placa 180 graus e repita a lavagem. Se utilizar uma unidade de lavagem de tiras, realize um único ciclo de lavagem da placa e repita o procedimento cinco vezes.
11. Após a lavagem final, inverta a placa de microtitulação e bata numa superfície absorvente. Verifique visualmente se todos os poços estão vazios.

Procedimento do ensaio

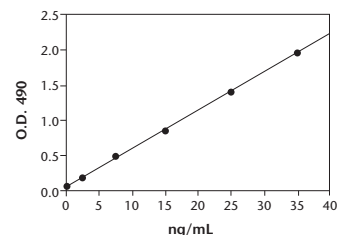
1. Retire a placa de microtitulação do saco. Com base no número de amostras a analisar e no número pretendido de determinações replicadas (recomendam-se amostras duplicadas), calcule o número de tiras necessárias. (Cada padrão requer dois poços; é necessário um poço para determinação do substrato branco.) Guarde as tiras não utilizadas dentro do saco com fecho com dessecante, a uma temperatura de 2 a 8°C (consulte a secção "Dados de estabilidade e conservação").
2. Dilua as amostras e os controlos com diluente de amostras, para uma concentração de 1:50 (2%).
3. Misture bem os padrões, controlos e amostras e adicione 100 µL aos poços de duplicados. Prepare um poço com 100 µL de diluente de amostras para utilizar como substrato branco. Prepare poços de duplicados para cada um dos controlos.
4. Cubra a placa (cobertura de plástico ou película adesiva). Incube durante 3 horas a uma temperatura de 37°C.
5. Com cuidado, retire a cobertura de plástico e lave a placa de microtitulação com solução de lavagem da placa.
6. Adicione 100 µL de anticorpo detector a todos os poços, excepto o poço do substrato branco. Cubra e incube a uma temperatura de 37°C durante 1 hora.
7. Durante a incubação com o anticorpo detector, prepare o conjugado de trabalho diluindo o concentrado de conjugado com o diluente de conjugado. Consulte a tabela 1 relativamente às quantidades a utilizar de acordo com o número de tiras a ser executado.

8. Lave a placa de microtitulação com solução de lavagem da placa.
9. Adicione 100 µL de conjugado de trabalho a todos os poços, excepto ao poço do substrato branco. Cubra e incube à temperatura ambiente (15 a 30°C) durante 30 minutos.
10. Durante a incubação com o conjugado de trabalho, prepare o substrato de trabalho dissolvendo os comprimidos de substrato em diluente de substrato. Consulte a tabela 1 relativamente às quantidades a utilizar de acordo com o número de tiras a ser executado. Agite no agitador de vórtice, para assegurar uma dissolução completa. Uma vez preparado, o substrato de trabalho deve ser utilizado num prazo máximo de 30 minutos. Evite a exposição à luz.
11. Lave a placa de microtitulação com a solução de lavagem da placa.
12. Incluindo o poço do substrato branco, adicione 100 µL de substrato de trabalho a todos os poços. Cubra com uma cobertura de plástico nova e incube a placa no escuro à temperatura ambiente (15 a 30°C), durante 45 minutos.
13. Adicione 100 µL de solução de paragem a cada poço, para parar a reacção.
14. Leia a absorvância a 490 nm num período de 30 minutos.

TABELA 1. ENSAIO DE HER-2/neu — PREPARAÇÃO DOS REAGENTES DO ENSAIO

N.º de tiras utilizadas	Concentrado de conj.	Diluente de conj.	Comprimidos de substrato	Diluente de substrato
1	20 µL	0,98 mL	1	4 mL
2	40 µL	1,96 mL	1	4 mL
3	60 µL	2,94 mL	1	4 mL
4	80 µL	3,92 mL	1	4 mL
5	100 µL	4,90 mL	2	8 mL
6	120 µL	5,88 mL	2	8 mL
7	140 µL	6,86 mL	2	8 mL
8	160 µL	7,84 mL	2	8 mL
9	180 µL	8,82 mL	3	12 mL
10	200 µL	9,80 mL	3	12 mL
11	220 µL	10,78 mL	3	12 mL
12	240 µL	11,76 mL	3	12 mL

Figura 1. Curva padrão da amostra



Avaliação dos resultados CONCENTRAÇÃO DOS PADRÕES

Os anticorpos utilizados neste ensaio reconhecem o domínio extracelular, de ligação aos ligandos, da proteína HER-2/neu [5]. Esta forma da HER-2/neu foi identificada com um peso molecular na ordem dos 105 kDa. Os padrões do conjunto são calibrados em nanogramas, tomam em consideração este peso molecular encontrado no soro e são preparados a partir de uma forma recombinante do fragmento de 105 kDa da HER-2/neu.

CONCENTRAÇÃO DOS DESCONHECIDOS

1. Faça a média dos valores de absorvância para cada diluição de padrão, controlo e amostra, por forma a obter as absorvâncias médias.
2. Em papel quadrículado, trace a absorvância média para cada padrão no eixo y e por oposição à concentração da proteína HER-2/neu (ng/mL) no eixo x e una os pontos.

- Determine a concentração da proteína HER-2/neu para cada diluição de amostra por interpolação com base na curva padrão. Existem pacotes de software (tais como SoftMax Pro™, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA; KC4™, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA) que podem simplificar este processo. Utilize um algoritmo de ajuste da curva quadrática (polinomial de segunda ordem).
- Nota: Não atribua poços de "branco" utilizando o software. Isso irá subtrair as leituras médias dos brancos dos restantes poços. Para efeitos de controlo da qualidade e de resolução de problemas, é útil poder examinar os valores de absorvância reportados para todos os poços, sem ajustes aplicados aos dados em bruto.
- Os resultados das amostras são expressos em nanogramas por mL, através da leitura directa com base nos valores da curva padrão (ng/mL), tal como designado nos frascos e na secção "Materiais fornecidos" deste folheto. Por razões de conveniência, não é necessária qualquer correcção matemática na diluição para amostras diluídas a 1:50, dado que a concentração real nas preparações padrão corresponde a 2% da dosagem indicada no rótulo (ou seja, foram previamente diluídas a 1:50).

DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS COM CONCENTRAÇÕES ELEVADAS

- Para as amostras que apresentam valores de absorvância (densidade óptica) para além dos limites da curva padrão, será necessário realizar outro ensaio com diluições mais elevadas.
- Para preparar outras diluições, comece sempre com uma diluição inicial de 1:50 (consulte a secção "Preparação das amostras") e, em seguida, faça diluições de 1:2 em série com diluente de amostras. Exemplo:

Diluição da amostra	Volume da diluição anterior	Volume de diluente de amostras
1:100	0,5 mL a 1:50	0,5 mL
1:200	0,5 mL a 1:100	0,5 mL
1:400	0,5 mL a 1:200	0,5 mL

- Se as amostras com diluições subsequentes produzirem valores < 0,3 para a densidade óptica (DO), deverão ser novamente analisadas utilizando menos material de diluição. O factor de correcção da diluição (consulte o passo 4 abaixo), quando multiplicado por resultados com valores de DO tão baixos, pode resultar numa estimativa erroneamente elevada da proteína HER-2/neu.
- Quaisquer resultados de amostras com diluições subsequentes implicarão a correcção dos valores obtidos com o ensaio para qualquer diluição além de 1:50. Exemplo:

Diluição da amostra	Factor de correcção da diluição (multiplicar resultado reportado por)
1:100	2
1:200	4
1:400	8

Controlo de qualidade do ensaio

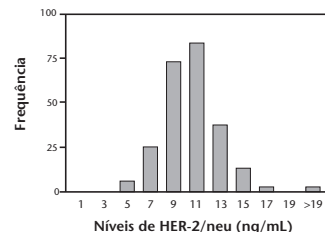
Recomenda-se que cada ensaio cumpra os seguintes parâmetros de desempenho.

- Examine os resultados dos controlos executados no ensaio para confirmar que as recuperações recaem dentro dos limites esperados (indicados no folheto do produto) para cada nível.
- Examine o intervalo dinâmico da curva padrão. O padrão de nível 1 deverá situar-se entre 0,04 e 0,09 de DO e o padrão de nível 6 deverá situar-se entre 1,5 e 2,4 de DO.
- Se utilizar software de ajuste da curva, verifique o cálculo de R². Este valor deverá situar-se entre 0,997 e 1,0. Se algum destes parâmetros não for cumprido, deverá considerar-se a repetição da análise das amostras através de outro ensaio.

Valores esperados INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

Como acontece com todas as análises, cada laboratório deverá estabelecer o seu próprio intervalo de referência. Numa população de 241 mulheres saudáveis, 95% dos valores da proteína HER-2/neu no soro foram determinados como sendo inferiores a 13,7 ng/mL. Não se verificou qualquer diferença significativa nos valores da HER-2/neu entre as mulheres nos períodos pré-menopausa e pós-menopausa. Com base nesta mesma população, o limite superior normal (média + 2 DP) foi de 14,7 ng/mL. A análise ROC confirma 15 ng/mL como o limite apropriado entre níveis normais e elevados da proteína HER-2/neu no soro. A distribuição dos níveis séricos da HER-2/neu para a totalidade da população (n = 241) é apresentada na figura 2.

Figura 2. Distribuição da proteína HER-2/neu no soro numa população de mulheres saudáveis.



CONTROLO DAS DOENTES COM CANCRO DA MAMA METASTÁTICO

A utilidade clínica do HER-2/neu ELISA no controlo longitudinal das doentes com cancro da mama metastático foi avaliada utilizando amostras de soro retrospectivas de doentes com cancro da mama em estágio avançado, abrangendo um período de 6 a 12 meses, em três instituições nos Estados Unidos da América. Cinquenta e seis doentes submetidas a tratamento, cujo nível inicial da oncoproteína HER-2/neu no soro era elevado (15 ng/mL ou superior), foram avaliadas quanto à correspondência entre as alterações nos seus níveis de HER-2/neu no soro e as alterações na respectiva evolução clínica da doença.

A tabela 2 apresenta uma análise dos resultados do estudo por cada consulta. Foram calculadas para cada doente as alterações no nível sérico da HER-2/neu de uma consulta para a outra. Estas alterações foram separadas em dois grupos: o Grupo I apresentava alterações na HER-2/neu sérica que estavam em paralelo com a evolução clínica da doença e o Grupo II apresentava alterações no nível da HER-2/neu sérica que não estavam em paralelo com a evolução clínica da doença. A evolução ou estado clínico foi determinado pelo médico. A correspondência entre as alterações na HER-2/neu e o estado clínico foi determinada da seguinte forma: um aumento de 20% ou superior em relação à consulta anterior reflectia a progressão da doença. Se o aumento era inferior a 20% em relação à consulta anterior, tal era indicativo de que a doença não tinha progredido durante o tratamento (incluindo doença em regressão ou estável). Os estados de regressão e de estabilidade foram consolidados, uma vez que ambos reflectem a eficácia de um tratamento actual. O critério dos 20% foi derivado com base na variabilidade longitudinal verificada em doentes normais (determinada com base nos níveis da HER-2/neu sérica em seis amostras consecutivas de 38 mulheres saudáveis).

TABELA 2. CORRESPONDÊNCIA ENTRE O ESTADO DA DOENÇA DAS DOENTES COM CANCRO DA MAMA METASTÁTICO E AS ALTERAÇÕES NOS NÍVEIS SÉRICOS DA HER-2/neu: POR CONSULTA

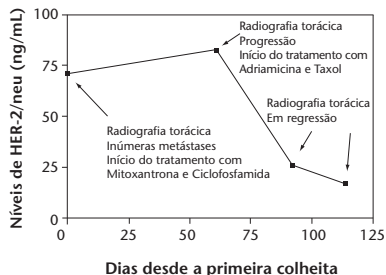
Alteração na HER-2/neu	Alteração no estado clínico		Total
	Progressão	Sem progressão	
Aumento ≥ 20%	52	33	85
Aumento < 20%	55	96	151
Total	107	129	236

Concordância = 62,7% (IC = 56,4 a 68,6%)

Valor preditivo: Ausência de progressão = 63,6% (IC = 55,7 a 70,8%)

Progressão = 61,2% (IC = 50,6 a 70,8%)

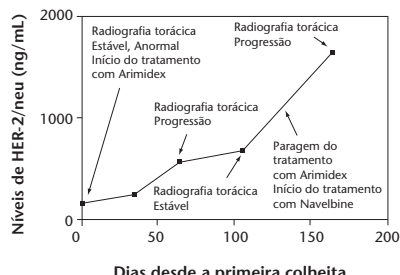
As figuras que se seguem mostram exemplos típicos de alterações verificadas ao longo do tempo nos níveis séricos da HER-2/neu relativamente a duas das 56 doentes com cancro da mama metastático que participaram no estudo clínico. A figura 3 mostra uma doente cuja doença está em regressão e a figura 4 mostra uma doente com doença progressiva.



Dias desde a primeira colheita

Figura 3. Controlo de uma doente, de 38 anos, com cancro da mama no Estádio IV, através do ensaio HER-2/neu ELISA.

As alterações longitudinais nos níveis séricos da HER-2/neu correlacionam-se com as alterações no estado da doença.



Dias desde a primeira colheita

Figura 4. Controlo de uma doente, de 74 anos, com cancro da mama no Estádio IV, através do ensaio HER-2/neu ELISA.

As alterações longitudinais nos níveis séricos da HER-2/neu correlacionam-se com as alterações no estado da doença.

Características do desempenho não clínico IMPRECIÇÃO

A imprecisão foi determinada pela análise de quatro amostras de controlo, consistindo em três controlos à base de tampão e uma mistura de soros humanos. Foram utilizados três lotes de conjuntos nos três laboratórios. Foram estabelecidas em 130 execuções as determinações em triplicado, por cada execução e para cada controlo. A precisão intra-execução e a precisão total foram calculadas para cada controlo com base no protocolo EP-5A do NCCLS. A imprecisão intra-execução das três instituições e dos três lotes de conjuntos foi igual ou inferior a 10% do CV, sendo que a imprecisão total de todos os conjuntos e instituições situava-se entre 10 e 17,7% do CV.

Amostra de controlo	N.º de execuções	N.º de replicados	Média (ng/mL)
Controlo 1	130	385	24,5
Controlo 2	131	390	9,8
Controlo 3	131	386	3,3
Soro 4	130	385	9,5

Amostra de controlo	Precisão intra-execução		Precisão total	
	Desv Padr	% CV	Desv Padr	% CV
Controlo 1	1,46	6,0	2,62	10,7
Controlo 2	0,69	7,0	1,03	10,4
Controlo 3	0,34	10,2	0,59	17,7
Soro 4	0,65	6,9	1,02	10,8

SENSIBILIDADE

A concentração mínima detectável do analito foi determinada por medições repetidas de uma amostra de dose zero (diluente de amostras). O desvio médio e o desvio padrão de uma aparente recuperação da HER-2/neu foram calculados para 230 determinações realizadas num período de 20 dias entre três lotes de conjuntos e três laboratórios. Após a adição de dois desvios padrão à dose de recuperação média da HER-2/neu, a concentração mínima detectável foi estabelecida em 1,5 ng de p105/mL de soro.

ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

Reactividade cruzada. O receptor do factor de crescimento epidérmico (EGFr) é uma molécula intimamente relacionada com o receptor do factor de crescimento da HER-2/neu, com uma homologia de 88% com o domínio intracelular e uma homologia de 44% com o domínio extracelular. Experimentámos o HER-2/neu ELISA com o EGFr a 850 ng/mL. Este material não produziu qualquer sinal durante o ensaio, indicando que os imunoreagentes do dispositivo não produzem qualquer reacção cruzada com o EGFr.

Substâncias interferentes. O anticorpo humano anti-murino (HAMA), encontrado em casos raros em soros humanos, tem o potencial para se ligar aos reagentes críticos de imunoenaios provocando falsos positivos ou falsos negativos. Várias amostras de soro HAMA-positivas conhecidas, bem como amostras positivas para

o factor reumatóide, foram analisadas com o dispositivo. Nenhum falso sinal foi gerado com estas amostras. Os reagentes do dispositivo foram formulados por forma a bloquear qualquer reactividade falsa.

Poderão efectuar-se medições da HER-2/neu sérica em simultâneo com a administração de vitaminas, fármacos de venda livre ou durante quimioterapia. Para testar a possibilidade de tais agentes interferirem na exactidão das determinações da HER-2/neu, potenciais interferentes exógenos foram maximizados num soro de controlo positivo, contendo uma concentração conhecida de HER-2/neu, e foram posteriormente analisados com o ensaio. Alguns constituintes comuns do soro também foram analisados quanto ao seu potencial para agir como interferentes endógenos. Nenhum dos compostos analisados teve efeito sobre a recuperação do analito. Consulte a tabela 3.

INTERVALO ANALÍTICO

O ensaio HER-2/neu ELISA consegue quantificar com exactidão os níveis séricos da HER-2/neu em amostras previamente diluídas, que proporcionam uma resposta do ensaio dentro do intervalo de 1,5 a 35 ng da proteína HER-2/neu p105 por cada mL de soro. As amostras que produzam um sinal superior ao limite superior do intervalo da curva padrão (35 ng/mL) devem ser subsequentemente diluídas com diluente de amostras e novamente analisadas com o ensaio. Certifique-se de que corrige a recuperação reportada da proteína HER-2/neu para preparações de diluição que sejam superiores à diluição rotineira de 1:50.

TABELA 3. POTENCIAIS INTERFERENTES NO ELISA

POTENCIAIS INTERFERENTES	CONCENTRAÇÕES DA ANÁLISE	POTENCIAIS INTERFERENTES	CONCENTRAÇÕES DA ANÁLISE
ENDÓGENOS		FÁRMACOS DE VENDA LIVRE, ETC.	
Triglicéridos (intralipina-20%)	3000,0 mg/dL	Acetaminofeno	200,0 µg/mL
Hemoglobina	1,0 g/dL	Aspirina	500,0 µg/mL
Imunoglobulina (gamaglobulina)	6,0 g/dL	Ibuprofeno	400,0 µg/mL
Albumina	6,5 g/dL	Cafeína	100,0 µg/mL
Bilirrubina	25,0 mg/dL		
Heparina	0,46 mg/mL		
EXÓGENO		AGENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS	
Vitamina A, acetato trans retinol	10,0 UI/mL	Aminoglutetamida	398,0 µg/mL
Vitamina B1, tiamina	3,0 µg/mL	Bleomicina	0,16 UI/mL
Vitamina B2, riboflavina	3,4 µg/mL	Cis-Platina	173,0 µg/mL
Vitamina B6, piridoxina HCL	4,0 µg/mL	Doxorubicina	51,8 µg/mL
Vitamina B12	12,0 ng/mL	Ciclofosfamida	800,0 µg/mL
Vitamina C, ácido ascórbico	30,0 µg/mL	Dietilstilbestero	23,0 µg/mL
Vitamina D2, ergocalciferol	0,8 UI/mL	Estramustina	102,2 µg/mL
Vitamina E, acetato de tocoferol	0,06 UI/mL	Flutamida	10,0 µg/mL
Ácido fólico	0,8 µg/mL	5-fluorouracil	1600,0 µg/mL
Niacina	40,0 µg/mL	Lupron	15,0 µg/mL
		Metotrexato	450,0 µg/mL
		Mitoxantrona	56,0 µg/mL
		Mitomincina C	73,0 µg/mL
		Megace	27,0 ng/mL
		Tamoxifen	1,4 µg/mL
		Vincristina	4,88 µg/mL
		Vinblastina	16,3 µg/mL
		Herceptin (Trastuzumab)	500 µg/mL

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Ao executar os vários passos dos imunoenaios manuais, existe a possibilidade de ocorrerem medições erróneas (recuperação das amostras) em resultado da variação no tempo de incubação a que as amostras são submetidas em cada uma das fases de incubação. Todos os poços devem receber essencialmente o mesmo tempo de incubação, necessário para cada um dos passos de reagente. Em particular, quando adicionar os padrões, os controlos e as amostras aos poços que estão na placa, o tempo entre a adição da primeira amostra e a adição da última deverá recair dentro de um período máximo de 15 minutos. Prepare todas as amostras com antecedência. A utilização das pipetas multiponta semi-automatizadas é altamente recomendada para encurtar os tempos destes procedimentos. Por forma a evitar a contaminação cruzada, certifique-se de que utiliza uma ponta diferente para cada adição de amostra.

Os imunoenaios que utilizam as chamadas configurações do tipo sanduíche, como é o caso deste dispositivo, estão sujeitos a interferências e a falsos resultados resultantes das amostras que contêm agentes imunoreactivos contra os anticorpos murinos. O HAMA, o anticorpo heterofílico e o factor reumatóide são os principais exemplos destes interferentes. O fabricante tomou as devidas precauções na formulação dos reagentes contidos neste dispositivo, por forma a minimizar ou eliminar tal interferência. Contudo, à luz desta possível interferência, deve tomar-se os devidos cuidados na avaliação dos resultados do ensaio que possam ser inconsistentes com o estado clínico global da doente.

É possível que uma doente com cancro da mama confirmado tenha níveis séricos da proteína HER-2/neu que recaiam dentro do intervalo dos níveis observados em indivíduos saudáveis. Tenha cautela ao interpretar os resultados da HER-2/neu. Os níveis séricos de HER-2/neu nem sempre indicarão a presença ou ausência de doença maligna. O valor da HER-2/neu deve ser utilizado como parte integrante de uma avaliação clínica global, que inclui outros meios de avaliação clínica e testes de diagnóstico.

Resolução de problemas

- Cada ensaio deve incluir os seis (6) padrões analisados em duplicado, utilizando o protocolo descrito na secção "Protocolo detalhado". Os tempos ou temperaturas de incubação que difiram significativamente daqueles especificados poderão originar resultados erróneos.
- A forma da curva padrão é não linear e varia ligeiramente de ensaio para ensaio. Para uma redução dos dados à mão, aplique gráficos ponto a ponto. Se utilizar software para ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA), aplique um algoritmo de ajuste da curva quadrática (polinomial de segunda ordem).
- Os duplicados de má qualidade, quando acompanhados por valores elevados para o padrão zero, indicam uma lavagem insuficiente. Se todas as instruções indicadas na secção "Protocolo detalhado" foram seguidas com exactidão, tais resultados indicam a necessidade de a unidade de lavagem ser submetida a procedimentos de manutenção. Além disso, evite introduzir bolhas nos poços quando pipetar as amostras e os reagentes.
- O poço do substrato branco deve ter uma leitura inferior ou igual a 0,05 unidades de absorbância. Uma possível causa de valores mais elevados é a exposição à luz do substrato de trabalho, antes ou durante a fase de incubação. O substrato de trabalho deve ser utilizado num período de 30 minutos após a preparação.
- Um sinal baixo pode indicar: 1) que a placa secou entre os vários passos. Não deixe que a placa seque. Adicione o reagente seguinte imediatamente após a lavagem; ou 2) que a lavagem não foi devidamente executada. Certifique-se de que a unidade de lavagem da placa de microtitulação foi devidamente purgada com a solução de lavagem da placa (consulte a secção "Protocolo detalhado").

Dados de estabilidade e conservação

Todos os reagentes incluídos no HER-2/neu ELISA foram testados quanto à sua estabilidade. Os reagentes não devem ser utilizados para além do prazo de validade indicado. Os reagentes do conjunto devem ser conservados a uma temperatura de 2 a 8°C, com a excepção do Concentrado de lavagem da placa, que pode ser conservado à temperatura ambiente. As placas de ensaio devem ser guardadas seladas dentro do saco de alumínio original, juntamente com o pacote de dessecante. Uma vez aberto, o dispositivo funcionará de acordo com as especificações até 4 semanas (30 dias), desde que esteja dentro do período de validade indicado no rótulo.

Assistência técnica

Tel.: +1 617 492 3900 x502
E-mail: oncogenetech@wilex.com



WILEX Inc.
Cambridge, MA 02140 USA



EMERGO EUROPE

Molenstraat 15
2513 BH, The Hague
The Netherlands
Tel: +31 (0)70 345 8570
Fax: +31 (0)70 346 7299

Tilsigtet anvendelse

HER-2/neu ELISA er beregnet til kvantitativ måling af HER-2/neu-protein i serum fra kvinder med metastatisk brystkræft. Brugen af HER-2/neu ELISA er indikeret til opfølgning og monitorering af patienter med metastatisk brystkræft, hvis første serumværdi af HER-2/neu er større end 15 ng/mL. HER-2/neu-værdierne skal anvendes sammen med informationer, der fås fra kliniske og andre diagnostiske procedurer i forbindelse med håndteringen af metastatisk brystkræft. Den kliniske nytteværdi af serummålingen af HER-2/neu som en prognoseindikator for tidlig genopståen og i håndteringen af patienter, der behandles med immunoterapi, er ikke blevet fuldt ud fastslået.

TIL IN VITRO-DIAGNOSTISERING

Metodeprincip	Fast fase sandwich-ELISA
Analytisk Interval	0 ng/mL til 35 ng/mL
Prøvetype	Human serum
Prøvetestvolumen	10,0 mikroliter
Sensitivitet	1,5 ng p105/mL serum
Køb af dette kit autoriserer brugen af det i henhold til følgende patenter: USA-patenter 5,401,638 og 5,604,107; EPO-patenter 0494135 og 0412116; Canadisk patent 2,026,250-8	

Indholdfortegnelse

Tilsigtet anvendelse	..34	Analyseprocedure	..36
Baggrund	..34	Prøves standardkurve	..37
Analysens princip	..35	Evaluering af resultater	..37
Opsummering af proceduren	..35	Analysens kvalitetskontrol	..37
Standarders sporbarhed	..35	Forventede værdier	..37
Medfølgende materialer	..35	Ikke-kliniske præstationskendetegn	..38
Sikkerheds- og advarselsætninger	..35	Fejlfinding	..39
Nødvendige materialer, der ikke følger med	..35	Stabilitets- og opbevaringsinformationer	..39
Forholdsregler og anbefalinger	..36	Teknisk support	..39
Klargøring af prøver	..36	Referencer	..51
Detaljeret protokol	..36	Symbolforklaring	..53

Baggrund

HER-2/neu-onkogenet, som også kaldes c-erbB-2, indkoder et protein med en molekylvægt på 185.000 Dalton (p185) og tilhører en familie af epitele vægffaktorreceptorer, der strukturelt er relaterede til den humane epidermale vægffaktorreceptor [1]. Proteinets p185 HER-2/neu består i sin fulde længde af et cytoplasmadomæne med tyrosinkinaseaktivitet, et transmembrandomæne og et ekstracellulært domæne (ECD), der afstødes fra brystkræftcellers overflade [2,3]. Mange undersøgelser har vist, at det afstødte ECD fra HER-2/neu er et glykoprotein med en molekylvægt mellem 97 og 115 kDa og betegnet p105 [3,4]. ECD'et kan nøjagtigt kvantificeres i serum med en analyse [4], som anvender monoklonale antistoffer [5], der dirigeres til de eksterne epitoper på HER-2/neu-proteinet. Mange publikationer viser, at ECD'et afstødes ind i normale personers blod, og det kan, når niveauerne er høje, måles hos kvinder med metastatisk brystkræft [4,6-26]. Mange af disse serumundersøgelser af HER-2/neu har bekræftet de væsentlige data fra undersøgelser af væv, der viser, at øget ekspressivitet af HER-2/neu er en markør for dårlig prognose, kortere samlet overlevelse og biologisk aggression.

Friske videnskabelige undersøgelser antyder, at kvantificering af ECD'et kan have flere vigtige kliniske anvendelsesformål, såsom monitorering af brystkræftpatienter med metastatisk sygdom og monitorering af brystkræftpatienter for at opdage hurtigt tilbagefald [6-10,12,15,17-20,22-26]. Disse rapporter har påvist, at 30-50% af kvinder med positive HER-2/neu-tumorer ved den første diagnose udvikler forhøjede serum-niveauer af HER-2/neu med progression til metastatisk brystkræft [4,6-26]. Disse undersøgelser har ligeledes vist, at monitorering af ECD-niveauer i serum efter en operation var i overensstemmelse med sygdommens kliniske forløb, og det blev observeret, at serum-niveauerne af HER-2/neu forøgedes sammen med sygdommens progression eller mindskedes, når der blev reageret på behandlingen [12,15,19,20,25,26]. Flere rapporter viser desuden, at høje serum-niveauer af HER-2/neu kan forekomme hos kvinder med metastatisk brystkræft med primære brysttumorer, der var HER-2/neu-negative via immunhistokemi [6,11,18,21,27]. Ifølge mange immunhistokemi- og serumundersøgelser udviser HER-2/neu-proteinet for stor ekspressivitet i mange tumorer af epitel oprindelse, inklusive kræft i lunger [28], prostata [29], pankreas [30], colon [31], mave [32], ovarier [33] og leverceller [34].

Patenter er blevet tildelt, der vedrører kvantificering og registrering af ECD's p105 domæne (i USA, patent nr. 5,401,638; i Canada nr. 2,026,250-8 og i Europa nr. 0494135) samt patenter, der vedrører kvantificering og registrering af p185 molekylet i fuld længde (i USA, patent nr. 5,604,107 og i Europa, patent nr. 0412116). Lignende patenter afventes i Japan.

Analysens princip

HER-2/neu ELISA er en sandwichenzymimmunanalyse, der udnytter et monoklonalt antistof fra mus til at indfange og et andet biotinholdigt monoklonalt antistof fra mus til at finde frem til human HER-2/neu-protein. Både capture- og detektorreagenser binder specifikt til det ekstracellulære domæne af HER-2/neu-proteinet. Capture-antistoffet er blevet immobiliseret på den indvendige overflade af mikrotiterpladers brønde. For at udføre testen inkuberes en passende prøveløsel i den overfladebelagte brønd, så antigenet kan bindes af capture-antistoffet. Det immobiliserede antigen reagerer dernæst sammen med detektorantiserummet. Den mængde detektorantistof, som antigenet binder, måles ved at binde det sammen med et streptavidin-/peberrodsperoxidasekonjugat, som dernæst katalyserer konversionen af kromogenisk substrat o-fenylendiamin (OPD, o-phenylendiamin) til et farvet produkt. Det farvede reaktionsprodukt kvantificeres via spektrofotometri og relateres til den mængde HER-2/neu-protein, der er i prøven.

For at få nærmere instruktioner, læs afsnittene Detaljeret protokol og Evaluering af resultater i denne vejledning.

Opsummering af proceduren

Trin	Inkubationer
1. Hæld prøver og standarder i brøndene	3 timer, 37° C
2. Vask	
3. Tilsæt detektorantistof til brøndene	1 time, 37° C
4. Vask	
5. Tilsæt konjugatantistof til brøndene	30 minutter, ST*
6. Vask	
7. Tilsæt substrat til brøndene	45 minutter, ST*
8. Tilsæt stopopløsning til brøndene	
9. Aflæs pladen ved 490 nm	

*Stuetemperatur

Standarders sporbarhed

HER-2/neu ELISA blev udviklet og kalibreret af WILEX Inc., Cambridge MA, 02140, USA.

HER-2/neu ELISA-standarderne er kalibreret mod et lagermateriale af masterkalibratore, der opretholdes i Cambridge MA. Dette materiale er identificeret som HER-2/neu masterkalibrator batch R5345, og det er en serie med 6 flydende reagenser, der går fra 0 til 35 ng/mL HER-2/neu p105-protein. Massebestemmelserne for HER-2/neu-masterkalibrator er blevet tildelt ud fra analysen af kalibrator materialet i direkte sammenligning med 3 meget rensede HER-2/neu p105-proteinprøver. De rensede prøvers masseækvivalenter (moler) blev fastsat ved hjælp af kvantitativ analyse af aminosyre.

Medfølgende materialer

Følgende komponenter medfølger.

Mikrotiterplade: Allerede coatet mikrotiterplade leveres klar til brug, med 96 brønde (12 strimLer à 8 stk.) i folie, lynlåslukkede poser med en pakke tørremiddel. Brøndene er coatede med monoklonalt anti-HER-2/neu-proteinantistof.

HER-2/neu-standarder: 6 stk. separate hætteglas med rekombinant HER-2/neu p105. Standarderne er kalibrerede i ng/mL og etiketterede med værdier, der er 50 gange større end den faktiske dosering i hætteglassene. Ved at tildele disse etiketværdier til en standardkurve undgår man behovet for at rette den rapporterede dosis for en 1:50 fortyndet prøve (2% serum i buffer). Læs Evaluering af resultater for nærmere oplysninger.

Standardnr.	ng/mL	Volumen
6	35,0	1 mL
5	25,0	1 mL
4	15,0	1 mL
3	7,5	1 mL
2	2,5	1 mL
1	0,0	1 mL

Prøvediluent: 1 stk. flaske, der indeholder BSA og 0,09% natriumazid.
Detektorantistof: 1 stk. flaske klar til brug, som indeholder biotinholdigt monoklonalt anti-HER-2/neu-proteinantistof fra mus i 0,01 M PBS (pH 7.4), proteinstabilisator og 0,09% natriumazid.
Konjugatdiluent: 1 stk. flaske, der indeholder 0,01 M PBS (pH 7.4), BSA og 0,1% kloracetamid.
Konjugatkoncentrat: 1 stk. hætteglas, der indeholder 50X streptavidin-/peberrodsperoxidase i buffer. Skal være fortyndet til 1X med konjugatdiluent for at danne arbejdskonjugat. Se Tabel 1.
Substratdiluent: 0,1 M citratbuffer (pH 5,0) og 0,01% H₂O₂ (hydrogenperoxid).
Substrat: 1 stk. hætteglas, der indeholder OPD-tabletter. Skal være opløst i substratdiluent (1 tablet/4 mL) for at danne et arbejdssubstrat. Se Tabel 1.
Stopopløsning: 1 stk. flaske, der indeholder 2,5 N H₂SO₄ (svovlsyre).
Pladevaskkoncentrat (20X): 1 stk. flaske. Fortynd 1 del koncentrat med 19 dele vand af bedste kvalitet før brug.

Sikkerheds- og advarselssætninger



Farlig!

R22 – Farlig ved indtagelse.

S28 – Efter kontakt med huden vaskes der straks med rigeligt vand.

Indeholder natriumazid

(Standarder, prøvediluent, detektorantistof)

Farlig!

R40 – Mulig fare for ikke reversible virkninger.

R43 – Kan forårsage sensibilisering ved kontakt med huden.

S36/37 – Brug særligt arbejdstøj og egnede beskyttelseshandsker.

Indeholder ortho-fenylendiaminhydroklorid

(Substratabletter)

Irritationsmiddel!

R36/38 – Irriterende for øjne og hud.

S36/37/39 – Brug særligt arbejdstøj, egnede beskyttelseshandsker og –briller/ansigtsskærm.

S26 – I tilfælde af kontakt med øjnene, skyl øjeblikkeligt med rigeligt vand og søg lægehjælp.

Indeholder svovlsyre

(Stopopløsning)

Irritationsmiddel!

R43 – Kan forårsage sensibilisering ved kontakt med huden.

S24 – Undgå kontakt med huden.

S37 – Brug egnede beskyttelseshandsker.

Indeholder kloroacetamid

(Konjugatdiluent og konjugatkoncentrat)

Nødvendige materialer, der ikke følger med

- Inkubator med tør varme, der kan holde en temperatur på 37° C
- Pipetter: 2–20 µL, 20–200 µL og 200–1000 µL pipetter med spidser til engangsbrug
- Præcisionsgentagende pipette
- Automatisk mikrotiterpladevasker med 96 brønde
- 12 x 75 mm kulturrør til klargøring af prøver
- Vortexmikser
- Mikrotiterpladelæser, der kan måle absorbans i plader med 96 brønde ved en bølgelængde, der er 490 nm
- 500- eller 1000-mL gradueret cylinder
- Reagensreservoirer
- Deioniseret vand
- Plasticfolie eller klæbende pladepakninger

- Flydende blegemiddel til husholdningsbrug til at inaktivere kliniske prøver og dekontaminere pladevaskeren
- Papiservietter til engangsbrug

Kontroller—HER-2/neu ELISA-kontroller består af rekombinant p105 i prøvediluent, som fås fra WILEX Inc. Henvis til HER-2/neu ELISA-kontroller, del nr. 06489884, når der bestilles. Kontroller der fortyndes 1:50 før analysen. Volumener er 0,5 mL i hver. Opbevares mellem 2–8° C.

Forholdsregler og anbefalinger

- Opbevar komponenterne ved 2–8° C. Reagenser må ikke udsættes for kraftigt lys. Ingen af kittets komponenter må dybfryses.
- Kittets reagenser må ikke anvendes efter udløbsdatoen.
- Anvend kun de mikrotiterbrønde, der følger med kittet.
- Skyl alle vaskemiddelrester af glasartikler.
- Benyt deioniseret vand af bedste kvalitet.
- Reagenser fra forskellige kit må ikke blandes.
- De buffere og reagenser, der anvendes i dette kit, indeholder enten natriumazid eller kloroacetamid som konserveringsmiddel. Pas på ikke at komme direkte i kontakt med disse reagenser.
- Ingen af reagenserne må pipetteres med munden eller indtages.
- Man må ikke ryge, spise eller drikke, mens analysen udføres, eller der hvor prøver eller reagenser håndteres.
- Prøver fra mennesker kan blive kontaminerede med inficerende stoffer. Må ikke indtages, kommes på åbne sår eller indåndes fra spraydåser. Brug beskyttelsehandsker og bortskaf biologiske prøver på korrekt vis.
- Substrattabletterne må ikke håndteres med fingrene eller komme i berøring med hud, metal eller oxiderende stoffer. Bortskaf opløsninger, der indeholder OPD, i henhold til de lokale regler.
- Brug engangshandsker og beskyttelsesbriller, mens der håndteres stopopløsning (2,5 N svovlsyre).
- Kassér alle arbejdsopløsninger (pladevask, konjugat, substrat), når hver arbejdsdag er omme.
- Klargør friske arbejdsopløsninger til hver efterfølgende analyse.

Klargøring af prøver

For prøver (og kontroller) skal der klargøres en startfortynding på 1:50 ind i prøvediluent, før der analyseres. Fjern eventuelt fugtet material fra prøverne ved hjælp af mikrocentrifugering, før der fortyndes. Sæt etiket på rørene og tilsæt 0,98 mL prøvediluent i hver, efterfulgt af 0,02 mL af prøve/kontrol. Bland forsigtigt og undgå skumdannelse på den fortyndede prøve. Fortyndede prøver og kontroller kan opbevares i rør med hætte på i op til 1 uge ved 2–8° C, og i 6 måneder ved –20° C. Må ikke udsættes for lys. Det kan være nødvendigt at analysere nogle prøver igen med større fortynding. Kassér alle prøver opbevaret ved 2–8° C, som udviser tegn på kontaminering. Fortynd igen fra serum.

Detaljeret protokol

ANBEFALEDE PROCEDURER

1. Tilsætning af reagenser skal gøres i den specificerede rækkefølge.
2. Alle 6 standarder og testprøver skal køres i duplikat.
3. Bring alle reagenser til ækvilibrium ved stuetemperatur (15–30° C) før brug.
4. Dispensér kun nok af hver analysereagens til det antal brønde, der anvendes. For hver strimmel med 8 brønde, dispenseres 1 mL detektorantistof, konjugat osv.
5. Udarbejd et pladekort, der kan bruges til at give overblik over placeringen af brønde med prøver, standarder og kontroller.
6. Man kan forenkles overførslen af prøver, standarder og kontroller fra fortyndingsrør til brønde ved at benytte halvautomatiske pipetter med flere kanaler. Teknisk service kan oplyse om anbefalede anordninger.
7. Klargøring af pladevask
 - a. Hvis konzentratet til pladevask er koldt, så giv det tid til at nå op på stuetemperatur (15–30° C), før det tages i brug. Se efter at alle krystaller er opløst. Hvis det ønskes, opvarm til 37° C og bland grundigt.
 - b. Fortynd 1 volumen pladevaskkonzentrat med 19 volumener af destilleret eller deioniseret vand. Bland grundigt. Denne opløsning er pladevask. Den samlede volumen, der skal bruges, afhænger af anvendt vaskemetode/-instrument. Der skal bruges ca. 1 L af denne opløsning til at opspæde en automatisk vasker og køre 1 mikrotiterplade. Der skal bruges ca. 700 mL til hver mikrotiterplade, når der vaskes manuelt.

c. Pladevask skal klargøres påny hver dag. Pladevask må ikke opbevares.

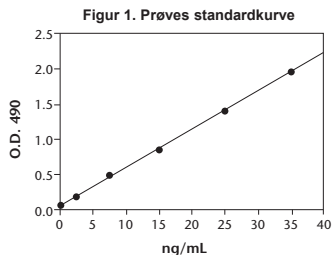
8. Når der bruges manuelle metoder, skal der passes på, mens mikrotiterpladen vendes om for at hælde ud eller farve. Tryk rammens sidefaner indad, så strimLerne ikke falder ud.
9. Vask af mikrotiterpladen gøres bedst med en automatisk pladevasker. Udstyr til pladevask skal justeres, rengøres og vedligeholdes på korrekt vis. Det anbefales at bruge automatiske vaskere med 96 porte. Der kan bruges falske strimLer med 8 brønde til at fylde den ubrugte del af analyseholderen ved hjælp af en delvis plade. Gem og sæt etiket på tidligere brugte strimLer med dette formål for øje.
10. Indstil påfyldningsvolumen til 300 µL/brønd. Opspæd instrumentet med pladevask. Vask med 3 cyklusser for vaskere med 96 porte. Efter første 3-cykluskvask, roteres pladen 180 grader, og processen gentages. Benyttes der en strimmelvasker, ud føres en enkelt vaskecyklus tværs over pladen, og der gentages 5 gange mere.
11. Efter sidste vask vendes mikrotiterpladen om, og den stryges imod en absorberende overflade. Kontrollér ved selvsyn, at alle brønde er tømte.

Analysesprocedure

1. Tag mikrotiterpladen ud af posen. Beregn det fornødne antal strimLer ud fra det antal prøver, der skal testes, og de ønskede replikafastsættelser (duplikater anbefales). (Der skal bruges 2 brønde til hver standard – den ene brønd skal bruges til fastsættelse af substrat-blankprøve.) Opbevar ubrugte strimLer i pose med lynlåslukning sammen med tørremiddel ved 2–8° C (læs Stabilitets- og opbevaringsinformationer).
2. Fortynd prøver og kontroller i forholdet 1:50 (2%) med prøvediluent.
3. Bland standarder, kontroller og prøver grundigt og tilsæt 100 µL til duplikatbrøndene. Disponér 1 brønd med 100 µL prøvediluent, som anvendes til substrat-blankprøve. Disponér duplikatbrønde til hver af kontrollerne.
4. Tildæk pladen (fødevarerfolie eller klæbende plasticdække). Inkubér i 3 timer ved 37° C.
5. Tag forsigtigt plasticdækket af og vask mikrotiterpladen med pladevask.
6. Hæld 100 µL detektorantistof i alle brønde, undtagen brønden til substrat-blankprøve. Tildæk og inkubér ved 37° C i 1 time.
7. Mens der inkuberes med detektorantistof, gøres arbejdskonjugat klar ved at fortynde konjugatkonzentratet med konjugatdiluent. Se Tabel 1 for de mængder, der skal bruges til det antal strimLer, der køres.
8. Vask mikrotiterpladen med pladevask.
9. Hæld 100 µL arbejdskonjugat i alle brønde, undtagen brønden med substrat-blankprøve. Tildæk og inkubér ved stuetemperatur (15–30° C) i 30 minutter.
10. Mens der inkuberes med arbejdskonjugat, gøres arbejdssubstrat klar, ved at substrattabletter opløses i substratdiluent. Se Tabel 1 for de mængder, der skal bruges til det antal strimLer, der køres. Hvirvles hurtigt rundt for at sikre fuldstændig opløsning. Når først det er klargjort, skal arbejdssubstrat anvendes inden for 30 minutter. Må ikke udsættes for lys.
11. Vask mikrotiterpladen med pladevask.
12. Hæld 100 µL arbejdssubstrat i alle brønde, også i brønden til substrat-blankprøve. Tildæk med et nyt plasticdække og inkubér pladen i mørke ved stuetemperatur (15–30° C) i 45 minutter.
13. Hæld 100 µL stopopløsning i hver brønd, så reaktionen standses.
14. Afslæs absorbans ved 490 nm inden for 30 minutter.

TABEL 1. HER-2/neu-ANALYSE: KLARGØRING AF ANALYSEREAGENSER

Antal brugte strimLer	Konj. konzentrat	Konj. diluent	Substrattabletter	Substratdiluent
1	20 µL	0,98 mL	1	4 mL
2	40 µL	1,96 mL	1	4 mL
3	60 µL	2,94 mL	1	4 mL
4	80 µL	3,92 mL	1	4 mL
5	100 µL	4,90 mL	2	8 mL
6	120 µL	5,88 mL	2	8 mL
7	140 µL	6,86 mL	2	8 mL
8	160 µL	7,84 mL	2	8 mL
9	180 µL	8,82 mL	3	12 mL
10	200 µL	9,80 mL	3	12 mL
11	220 µL	10,78 mL	3	12 mL
12	240 µL	11,76 mL	3	12 mL



Evaluering af resultater KONCENTRATION AF STANDARDER

De antistoffer, der bruges til denne analyse, genkender det ekstracellulære, ligandbindende domæne af HER-2/neu-protein [5]. Denne type HER-2/neu er blevet identificeret med en molekylvægt på eller tæt på 105 kDa. Kittets standarder er kalibrerede i nanogram, hvilket tager hensyn til denne molekylvægt, som findes i serum, og de er forberedt ud fra en rekombinant form af fragmentet 105 kDa i HER-2/neu.

KONCENTRATION AF UKENDTE STOFFER

1. Find absorbansværdiernes gennemsnit for hver standard, kontrol og prøve for at finde frem til de gennemsnitlige absorbanser.
2. Brug grafpapir til at plotte den gennemsnitlige absorbans for hver standard på y-akslen versus koncentrationen af HER-2/neu-protein (ng/mL) på x-akslen og forbind punkterne.
3. Fastslå koncentrationen af HER-2/neu-protein for hver prøvefortynding med interpolation fra standardkurven. Der findes softwarepakker (f.eks. SoftMax Pro™, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA; KC4™, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA), som kan forenkle denne proces. Benyt en kvadratisk kurvetilpasningsalgoritme (polynomium af anden orden).
4. Bemærk: Tildel ikke brønde med blankprøver ved hjælp af software. Derved bliver de gennemsnitlige blankprøveaflysninger trukket fra alle andre brønde. I forbindelse med kvalitetskontrol og fejlfinding er det nyttigt at kunne undersøge de absorbansværdier, der er rapporteret for alle brønde, uden at der foretages nogen justering af de rå data.
5. Resultater for prøver udtrykkes i nanogram pr. mL ved direkte aflæsning fra standardkurveværdierne (ng/mL), som er anført på hætteglassene og i afsnittet Medfølgende materialer, som findes i denne vejledning. For lethedens skyld behøves der ingen matematisk korrigeringsfaktor for fortyndingen for prøver, der er fortyndet i forholdet 1:50, da den aktuelle koncentration i standardpræparaterne er 2% af den dosering, der står på etiketten (dvs., de er allerede fortyndede med 1:50).

FORTYNDING AF PRØVER MED HØJE KONCENTRATIONER

1. I forbindelse med prøver, som giver værdier for absorbans (OD), der overskrider standardkurvens interval, vil efterfølgende analyse med større fortyndinger være påkrævet.
2. For at gøre ekstra fortyndinger klar, skal der altid begyndes med en startfortynding på 1:50 (læs Klargøring af prøver), og dernæst fortyndes der i serier i forholdet 1:2 ind i prøvediluent. Eksempel:

Prøvefortynding	Volumen af tidligere fortynding	Volumen af prøvediluent
1:100	0,5 mL af 1:50	0,5 mL
1:200	0,5 mL af 1:100	0,5 mL
1:400	0,5 mL af 1:200	0,5 mL

3. Hvis de ekstra fortyndede prøver frembringer OD-værdier < 0,3, skal de igen analyseres med mindre fortyndet materiale. Når fortyndingens korrigeringsfaktor (se Trin 4 herunder) ganges med resultaterne af en sådan lav OD-værdi, kan den resultere i en vurdering af HER-2/neu-protein, der er fejlagtigt høj.
4. Alle resultater fra ekstraordinært fortyndede prøver kræver korrigeringsfaktor af de værdier, der fås fra analyse af enhver fortynding over 1:50. Eksempel:

Prøvefortynding	Fortyndings korrigeringsfaktor (det rapporterede resultat skal ganges med)
1:100	2
1:200	4
1:400	8

Analysens kvalitetskontrol

Det anbefales, at hver analyse overholder følgende præstationsparametre.

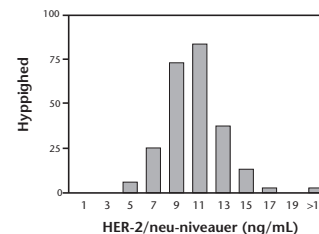
- Undersøg resultaterne af de kontroller, der køres i analysen for at bekræfte, at genopretningerne falder inden for de forventede områder (noteret på produktets indlægsseddel) for hvert niveau.
- Undersøg standardkurvens dynamiske interval. Niveau 1-standarder skal ligge mellem 0,04 til 0,09 OD og niveau 6-standarder skal ligge mellem 1,5 til 2,4 OD.
- Anvendes der software til kurvetilpasning, skal beregningen undersøges for R². Denne bør ligge mellem 0,997 og 1,0. Er der nogen af disse parametre, der ikke overholdes, skal det overvejes at gentage prøvetesten i en efterfølgende analyse.

Forventede værdier

SUNDE PERSONER

Hvert laboratorium skal fastsætte sit eget referenceinterval, som det gøres med alle test. I en population med 241 sunde kvinder fandt man, at 95% af serumværdierne af HER-2/neu-protein var mindre end 13,7 ng/mL. Der var ingen signifikant forskel i HER-2/neu-værdierne mellem kvinder før og efter menopause. Ud fra samme population lå den øvre grænse for normal (gennemsnit + 2SD) på 14,7 ng/mL. ROC-analysen bekræfter, at 15 ng/mL er den rette skæringslinje mellem normale og forhøjede serumniveauer af HER-2/neu-protein. Fordelingen af serumniveauer af HER-2/neu for hele populationen (n = 241) ses i Figur 2.

Figur 2. Fordeling af serum HER-2/neu-protein i en population af sunde kvinder.



MONITORERING AF PATIENTER MED METASTATISK BRYSTKRÆFT

Den kliniske nytteværdi af HER-2/neu ELISA blev evalueret i længdemæssig monitorering af patienter med metastatisk brystkræft ved hjælp af retrospektive serumprøver fra patienter med brystkræft i de sene stadier, hvilket omfattede en periode på 6 til 12 måneder og foregik på 3 hospitaler i USA. Der var 56 patienter i behandling, hvis første serumniveau af HER-2/neu-onkoprotein var forhøjet (15 ng/mL eller mere), og de blev evaluerede for overensstemmelse mellem ændringer i deres serumniveauer af HER-2/neu og forandringer, der indtraf i deres kliniske sygdomsforløb.

En analyse af undersøgelsens resultater fra konsultation til konsultation præsenteres i Tabel 2. Ændringerne i serumniveau af HER-2/neu fra den ene konsultation til den næste blev udregnet for hver patient. Disse ændringer blev delt i 2 grupper: Gruppe I havde ændringer i serum af HER-2/neu, der fulgte parallelt med det kliniske sygdomsforløb, og gruppe II havde ændringer i serum af HER-2/neu, der ikke fulgte parallelt med det kliniske sygdomsforløb. Lægen afgjorde det kliniske forløb eller status. Overensstemmelsen mellem ændringerne af HER-2/neu i forhold til klinisk status blev fundet på følgende måde: En stigning på 20% eller mere i forhold til foregående konsultation gav et billede af sygdommens progression. Hvis forandringen var mindre end en stigning på 20% i forhold til foregående konsultation, fortalte det, at sygdommen ikke var blevet mere fremskreden, mens behandlingen foregik (inklusive sygdom, der reagerede eller var stabil). Stabil og reagerende sygdom blev konsolideret, da begge viste den nuværende behandlings effektivitet. Kriteriet på 20% blev afledt af længdevariationen hos normale patienter (fastslået ud fra serumniveauet af HER-2/neu i 6 serieprøver fra hver af de 38 sunde kvinder).

TABEL 2. OVERENSSTEMMELSE MELLEM METASTATISKE BRYSTRKÆFTPATIENTERS SYGDOMSSTATUS OG ÆNDRINGER I SERUMNIVEAUER AF HER-2/neu: KONSULTATION FOR KONSULTATION

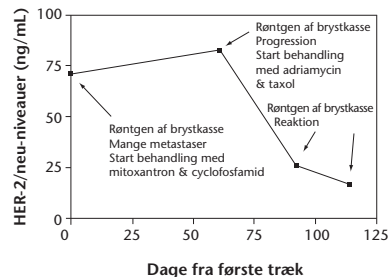
Ændring af HER-2/neu	Ændring af klinisk status		Total
	Progression	Ingen progression	
≥ 20% stigning	52	33	85
< 20% stigning	55	96	151
Total	107	129	236

Konkordans = 62,7% (CI = 56,4 til 68,6%)

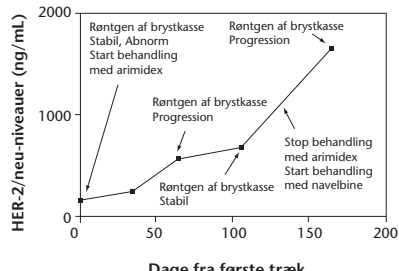
Forudsagt værdi: Manglende progression = 63,6% (CI = 55,7 til 70,8%)

Progression = 61,2% (CI = 50,6 til 70,8%)

Nedenstående tal viser typiske eksempler på gradvise forandringer af serumniveauer af HER-2/neu for 2 af de 56 metastatiske brystkræftpatienter fra den kliniske undersøgelse. Figur 3 viser en patient, hvor sygdommen reagerer, og Figur 4 viser en patient med en sygdom, der progressivt forværes.



Figur 3. Monitorering af en 38-årig stadie IV brystkræftpatient med HER-2/neu ELISA. Længdeforandringer i serumniveauer af HER-2/neu stemmer overens med forandringer i sygdommens status.



Figur 4. Monitorering af en 74-årig stadie IV brystkræftpatient med HER-2/neu ELISA. Længdeforandringer i serumniveauer af HER-2/neu stemmer overens med forandringer i sygdommens status.

Ikke-kliniske præstationskendetegn UNØJAGTIGHED

Unøjagtighed blev fastslået ved at teste 4 kontrolprøver, der bestod af 3 bufferbaserede kontroller og 1 human serumprøve. Der blev brugt kit med 3 forskellige batchnumre ved hvert af de 3 forskellige laboratorier. Der blev fundet frem til tredobbelte bestemmelser pr. kørsel for hver kontrol blandt 130 kørsler. For hver kontrol baseret på protokollen NCCLS EP-5A blev der udregnet inden for kørslen samt total nøjagtighed. Unøjagtighed inden for kørsel for 3 steder og kitbatch var på eller under 10% CV med total unøjagtighed på tværs af alle kit og steder mellem 10 og 17,7% CV.

Kontrolprøve	Antal kørsler	Antal replikater	Gennemsnit (ng/mL)
Kontrol 1	130	385	24,5
Kontrol 2	131	390	9,8
Kontrol 3	131	386	3,3
Serum 4	130	385	9,5

Kontrolprøve	Nøjagtighed inden for kørsel		Total nøjagtighed	
	Std. afv.	% CV	Std. afv.	% CV
Kontrol 1	1,46	6,0	2,62	10,7
Kontrol 2	0,69	7,0	1,03	10,4
Kontrol 3	0,34	10,2	0,59	17,7
Serum 4	0,65	6,9	1,02	10,8

SENSITIVITET

Minimal registrerbar koncentration af analysand blev fundet ved gentaget måling af en 0-dosisprøve (prøvediluent). Gennemsnitlig og standardafvigelse af tilsyneladende genopretning af HER-2/neu blev beregnet for 230 fastsættelser, der blev foretaget i løbet af 20 dage mellem kit med 3 forskellige batchnumre og på 3 forskellige laboratorier. Efter tilføjelse af 2 standardafvigelse til den gennemsnitlige genoprettede dosis af HER-2/neu, blev det fundet, at den minimale registrerbare koncentration var 1,5 ng ud af p105/mL serum.

ANALYTISK SPECIFICITET

Krydsreaktivitet. Epidermisk vækstfaktorreceptor (EGFr) er et molekyle med nære relationer til HER-2/neus vækstfaktorreceptor ved 88% homologi med det intracellulære domæne og 44% homologi med det ekstracellulære domæne. Vi provokerede HER-2/neu ELISA med EGFr ved 850 ng/mL. Dette materiale producerede intet signal i analysen, hvilket viste, at anordningens immunreagens ikke producerer nogen krydsreaktion med EGFr.

Interfererende stoffer. Humant anti-mus-antistof (HAMA), som i sjældne tilfælde findes i human serum, kan potentielt binde de kritiske reagenser i immunanalyser, hvilket udløser positive eller negative signaler, der er falske. Flere kendte HAMA-positive serumprøver samt reumatoidfaktorpositive prøver blev testede i anordningen. Ingen falske signaler blev frembragt med disse prøver. Anordningens reagenser er formulerede, så de blokerer for enhver form for falsk reaktivitet af denne type.

Serummålinger af HER-2/neu kan udføres, mens patienterne får vitaminer, håndkøbsmedicin eller behandles med kemoterapi. For at teste muligheden for at sådanne agenser kan gribe forstyrrende ind i nøjagtige fastsættelser af HER-2/neu, blev potentielt exogene interfererende stoffer tilsat en positiv kontrolserum med en kendt koncentration af HER-2/neu, som efterfølgende blev testet i analysen. Nogle almindelige bestanddele af serum blev ligeledes testede for deres potentiale til at fungere som endogene interfererende stoffer. Ingen af de testede forbindelser havde nogen indvirkning på analysandgenopretningen. Se Tabel 3.

ANALYTISK OMRÅDE

HER-2/neu ELISA kan nøjagtigt kvantificere serumniveauerne HER-2/neu i allerede fortyndede prøver, om giver en analysereaktion i intervallet fra 1,5 til 35 ng af p105 HER-2/neu-protein pr. mL serum. Prøver, der producerer et signal, der overskrider den øvre grænse for standardkurvens interval (35 ng/mL) skal fortyndes med mere prøvediluent og igen testes i analysen. Sørg endelig for at korrigere den rapporterede genopretning af HER-2/neu-protein for fortyndede præparater, der er mere end den rutinemæssige fortynding i forholdet 1:50.

TABEL 3. POTENTIELLE ELISA-INTERFERERENDE STOFFER

POTENTIELLE INTERFERERENDE STOFFER	TEST KONCENTRATIONER	POTENTIELLE INTERFERERENDE STOFFER	TEST KONCENTRATIONER
ENDOGENT		HÅNDKØBSMEDICIN OSV.	
Triglycerider (intralipin-20%)	3000,0 mg/dl	Acetaminophen	200,0 µg/mL
Hæmoglobin	1,0 g/dl	Aspirin	500,0 µg/mL
Immunoglobulin (gammaglobulin)	6,0 g/dl	Ibuprofen	400,0 µg/mL
Albumin	6,5 g/dl	Caffein	100,0 µg/mL
Bilirubin	25,0 mg/dL		
Heparin	0,46 mg/mL	KEMOTERAPEUTISKE AGENSER	
		Aminoglutethamid	398,0 µg/mL
EXOGENE		Bleomycin	0,16 U/mL
Vitamin A transretinolacetat	10,0 IU/mL	Cis-platin	173,0 µg/mL
Vitamin B1 aneurin	3,0 µg/mL	Doxorubicin	51,8 µg/mL
Vitamin B2 riboflavin	3,4 µg/mL	Cyclofosfamid	800,0 µg/mL
Vitamin B6 pyroxid HCL	4,0 µg/mL	Dietylstilbesterol	23,0 µg/mL
Vitamin B12	12,0 ng/mL	Estramustin	102,2 µg/mL
Vitamin C ascorbinsyre	30,0 µg/mL	Flutamid	10,0 µg/mL
Vitamin D2 ergocalciferol	0,8 IU/mL	5-fluorouracil	1600,0 µg/mL
Vitamin E tocoferolacetat	0,06 IU/mL	Lupron	15,0 µg/mL
Folinsyre	0,8 µg/mL	Methotrexat	450,0 µg/mL
Niacin	40,0 µg/mL	Mitoxantron	56,0 µg/mL
		Mitomycin C	73,0 µg/mL
		Megace	27,0 ng/mL
		Tamoxifen	1,4 µg/mL
		Vincristin	4,88 µg/mL
		Vinblastin	16,3 µg/mL
		Herceptin (Trastuzumab)	500 µg/mL

PROCEDURENS BEGRÆNSNINGER

Når trin udføres i manuelle immunanalyser, kan målingerne (prøvegenopretning) være forkerte som følge af variation af den inkubationstid, som prøverne udsættes for i hvert af inkubationens trin. Alle brønde skal have stort set samme inkubationstid, der kræves til hvert reagenstrin. Især skal tidsrummet mellem tilsætning af første og sidste prøve ligge inden for en tidshorisont på - højst - 15 minutter, når der tilsættes standarder, kontroller og prøver i pladens brønde. Klargør alle prøver på forhånd. Det anbefales i høj grad at anvende halvautomatiske pipetter med flere spidser, så tiden til at foretage disse procedurer afkortes. Sørg for at anvende nye spidser til hver prøvetilsætning, så krydskontaminering undgås.

Immunanalyser, der benytter såkaldte sandwichkonfigurationer, som denne anordning, udsættes for interferens og falske resultater, der kommer fra prøver, som indeholder immunreaktive agenser mod antistoffer fra mus. HAMA, heterofil antistof og rheumatoidfaktor er de umiddelbare eksempler på disse interfererende stoffer. Producenten har taget forholdsregler ved formuleringen af de reagenser, der findes i denne anordning, så denne interferens minimeres eller fjernes. Der skal imidlertid udvises omhu, når der evalueres analyseresultater, der kan være inkonsistente med patientens samlede kliniske status, set i lyset af, at denne form for interferens er en reel mulighed.

Det er muligt, at en patient med bekræftet brystkræft kan have serumniveauer af HER-2/neu-protein, der ligger inden for det interval, der ses hos sunde personer. Resultaterne af HER-2/neu skal fortolkes med forsigtighed. Serumniveauer af HER-2/neu indikerer ikke altid, om der forefindes malignant sygdom eller ikke. Værdien for HER-2/neu skal indgå i den samlede kliniske vurdering, som omfatter flere kliniske evalueringer og diagnosetest.

Fejlfinding

- Hver analyse skal omfatte 6 standarder, der er testede i duplikat ved hjælp af den protokol, der er beskrevet i afsnittet Detaljeret protokol. Inkubationstider eller -temperaturer, der adskiller sig væsentligt fra de specificerede, kan udløse forkerte resultater.
- Standardkurvens facon er ikke lineær og veksler en anelse fra analyse til analyse. Anvend punkt-til-punkt graftegning, når data reduceres manuelt. Hvis der benyttes ELISA-software, anvendes en kvadratisk kurvetilpasningsalgoritme (polynomium af anden orden).
- Dårlige duplikater viser utilstrækkelig vask, forudsat de følges af forhøjede værdier for 0-standard. Hvis alle instrukser i afsnittet Detaljeret protokol blev fulgt til punkt og prikke, viser sådanne resultater, at vaskeren skal vedligeholdes. Undgå ligeledes at der kommer bobler i brøndene, når prøver og reagenser tilsættes med pipette.
- Brønden med substrat-blankprøven skal aflæses med mindre end eller lig med 0,05 absorbansenheder. En mulig årsag til højere værdier er, at arbejdssubstratet er blevet udsat for lys - enten før eller i løbet af inkubationstrinnet. Arbejdssubstrat skal anvendes inden for 30 minutter fra klargøringen.
- Lav signal viser muligvis, 1) at pladen er blevet udtørret mellem trinene. Pladen må absolut ikke udtørre. Tilsæt næste reagens straks efter vask. Eller 2) at der er udført forkert vask. Sørg for at mikrotiterpladens vasker er blevet ordentligt opspædet med pladevask (læs Detaljeret protokol).

Stabilitets- og opbevaringsinformationer

Alle de reagenser, der følger med HER-2/neu ELISA, er blevet testede for stabilitet. Reagenser må ikke anvendes efter den anførte udløbsdato. Kittets reagenser skal opbevares ved 2–8° C, med undtagelse af pladevaskkoncentratet, som kan opbevares ved stuetemperatur. Analyseplader skal opbevares forseglede i den originale foliepose med en pakke tørrmiddel. Når den først er åbnet, vil anordningen fungere inden for specifikationerne i op til 4 uger (30 dage) inden for den udløbsdatoperiode, der er anført på etiketten.

Teknisk support

tf.: +1 617 492 3900 x502
e-mail: oncogetech@wilex.com



WILEX Inc.
Cambridge, MA 02140 USA



EMERGO EUROPE

Molenstraat 15
2513 BH, The Hague
The Netherlands
Tel: +31 (0)70 345 8570
Fax: +31 (0)70 346 7299

Anvendingsområden

HER-2/neu ELISA er avsett for kvantitativ måtning av HER-2/neu-protein i serum hos kvinner med metastatisk brystcancer. HER-2/neu ELISA anbefales ved oppfølging og monitorering av pasienter med metastatisk brystcancer, vars initiala HER-2/neu-værde i serum overstiger 15 ng/mL. HER-2/neu-værdene ska användas i kombination med annan klinisk information och andra diagnostiska procedurer vid behandling av metastatisk brystcancer. Den kliniska användningen av måtning av HER-2/neu i serum som en prognostisk indikator på tidiga recidiv, och vid behandling av pasienter i immunterapiregimer, är inte helt klarlagt.

FÖR IN VITRO-DIAGNOSTIK

Metodprincip	Solid Phase Sandwich ELISA
Analysintervall	0 ng/mL till 35 ng/mL
Provtyp	Humant serum
Provtestvolym	10,0 mikroliter
Känslighet	1,5 ng p105/mL serum
Inköp av detta kit ger licens för användning under följande patent: USA-patent 5,401,638 och 5,604,107; EPO-patent 0494135 och 0412116; kanadensiskt patent 2,026,250-8	

Innehåll

Anvendingsområden	39	Analysprocedur	41
Bakgrund	39	Provstandardkurva	42
Analysprincip	40	Utværdering av resultat	42
Procedursammenfatning	40	Kvalitetskontroll av analyse	42
Spårbarhet for standarder	40	Förväntade värden	42
Medføljende material	40	lcke-klinisk prestatandakaraktæristik	43
Sikkerhets- og varningsfraser	40	Felsøkning	44
Material som krævs men inte medfølger	40	Information om stabilitet og forværing	44
Førsigtighedsåtgærder og rekommendationer	41	Teknisk support	44
Proverberedning	41	Referenser	51
Detaljeret protokoll	41	Symbolforklæring	53

Bakgrund

HER-2/neu-onkogenen, som även kallas c-erbB-2-genen, kodar för ett protein med en molekylvikt på 185 000 Dalton (p185) och tillhör en familj epiteliala tillväxtfaktorreceptorer som är strukturellt besläktad med human epidermal tillväxtfaktorreceptor [1]. I sin fulla längd består p185 HER-2/neu-proteinet av en cytoplasmisk domän med tyrosinkinasaktivitet, en transmembran domän och en extracellulär domän (ECD) som frigörs från bröstcancercellernas yta [2,3]. Ett flertal studier har visat att det ECD som frigörs från HER-2/neu är ett glykoprotein med en molekylvikt på mellan 97 och 115 kDa och benämns p105 [3,4]. ECD kan kvantifieras exakt i serum med hjälp av en analys [4] där monoklonala antikroppar [5] riktas mot de yttre epitopena i HER-2/neu-proteinet. Ett flertal publikationer visar att ECD frigörs i blodet hos normala individer och att höga nivåer kan registreras hos kvinnor med metastatisk bröstcancer [4,6–26]. Många av dessa serum HER-2/neu-studier har bekräftat omfattande data från vävnadsstudier som har visat att förhöjda HER-2/neu-nivåer är en indikation på dålig prognos, kortare överlevnad och biologisk aggressivitet.

Nyare forskning tyder på att kvantifiering av ECD kan ha flera viktiga kliniska tillämpningar, exempelvis monitorering av bröstcancerpatienter med metastatisk sjukdom och monitorering av bröstcancerpatienter för att detektera tidiga recidiv [6–10,12,15,17–20,22–26]. Dessa rapporter har visat att 30–50 % av kvinnor med HER-2/neu-positiva tumörer vid primär diagnos, utvecklar förhöjda nivåer av serum HER-2/neu med progression till metastatisk bröstcancer [4,6–26]. Dessa studier har även visat att monitorering av serum ECD-nivåer post-kirurgiskt är korrelerat med det kliniska sjukdomsforloppet och att serum HER-2/neu-nivåerna höjdes vid sjukdomsprogression eller sänktes som svar på behandling [12,15,19,20,25,26]. Flera rapporter visar också att förhöjda nivåer av serum HER-2/neu kan förkomma hos kvinnor med metastatisk bröstcancer vars primära brösttumör var HER-2/neu-negativa vid immunhistokemi [6,11,18,21,27]. Enligt många immunhistokemiska studier och serumstudier är nivåerna av HER-2/neu-proteinet förhöjt i många tumörer av epitelialt ursprung, inklusive cancer i lunga [28], prostata [29], pankreas [30], colon [31], magen [32], ovarier [33] samt hepatocellulär cancer [34].

Patent har beviljats relaterade till kvantifiering och detektering av ECD p105-domänen (i USA, patentnr 5,401,638; i Kanada nr 2,026,250-8; och i Europa nr 0494135) samt patent relaterade till kvantifiering och detektering av p185-molekylens fulla längd (i USA, patentnr 5,604,107 och i Europa, patent nr 0412116). Liknande patent är sökta i Japan.

Analysprincip

HER-2/neu ELISA är en sandwich-enzymimmunanlys som använder en musmonoklonal antikropp för infångning och en annan biotinylerad musmonoklonal antikropp för detektering av humant HER-2/neu-protein. Både reagenserna för infångning och detektering binder specifikt till HER-2/neu-proteinets extracellulära domän. Den infångande antikroppen har fixerats invändigt i mikrotiterplattans brunnar. Vid teststillfället inkuberas en lämplig provvolym i den överdragna brunnen för att möjliggöra bindning av antigenen till den infångande antikroppen. Den fixerade antigenen reager sedan med detekteringsantiserum. Mängden detekterande antikroppar som har bundits till antigen mäts genom att det binds till ett streptavidin/pepparrottsperoxidaskonjugat, som sedan katalyserar omvandling av kromogena substrat o-fenylendiamin (OPD) till en färgad produkt. Den färgade reaktionsprodukten kvantifieras genom spektrofotometri och relateras till mängden HER-2/neu-protein i provet.

Instruktioner finns i avsnitten Detaljerat protokoll och Utvärdering av resultat i detta häfte.

Procedursammanfattning

Steg	Inkubationer
1. Placera prover och standarder i brunnarna	3 timmar, 37 °C
2. Tvätt	
3. Tillsätt detekterande antikropp i brunnarna	1 timme, 37 °C
4. Tvätt	
5. Tillsätt konjugerande antikropp i brunnarna	30 minuter, RT*
6. Tvätt	
7. Tillsätt substrat i brunnarna	45 minuter, RT*
8. Tillsätt stopplösning i brunnarna	
9. Avläs plattan vid 490 nm	

*Rumstemperatur

Spårbarhet för standarder

HER-2/neu ELISA har framställts och kalibrerats av WILEX Inc., Cambridge MA, 02140, USA.

HER-2/neu ELISA-standarderna är kalibrerade mot ett stammaterial för master-kalibrator som finns i Cambridge MA. Detta material har beteckningen HER-2/neu master-kalibratorlot R5345, och består av en serie med sex flytande reagenser, som omfattar intervallet 0 till 35 ng/mL HER-2/neu p105-protein. Massbestämningarna för HER-2/neu master-kalibrator har fastställts baserat på analys av kalibratormaterialet i direkt jämförelse med tre högrenade HER-2/neu p105-proteinprover. Massekvivalenter (mol) i de renade proverna fastställdes genom kvantitativ aminosyraanalys.

Medföljande material

Följande komponenter medföljer.

Mikrotiterplatta – Överdragen mikrotiterplatta som levereras klar att använda, med 96 brunnar (12 rader med 8 brunnar) i folie, återförslutbara påsar med ett torkmedelspack. Brunnarna är överdragna med monoklonala anti-HER-2/neu-proteinantikroppar.

HER-2/neu-standarder – Sex (6) separata ampuller med rekombinant HER-2/neu p105. Standarderna kalibreras i ng/mL och är märkta med värden som är 50-faldigt högre än den faktiska ampulldosen. Dessa märkningsvärden utgör en standardkurva vilket undanröjer behovet att korrigera den rapporterade dosen för ett 1:50-utspätt prov (2 % serum i buffert). Se Utvärdering av resultat för mer information.

Standardnr	ng/mL	Volym
6	35,0	1 mL
5	25,0	1 mL
4	15,0	1 mL
3	7,5	1 mL
2	2,5	1 mL
1	0,0	1 mL

Provspädningsmedel – En (1) flaska som innehåller BSA och 0,09 % natriumazid.

Detekterande antikropp – En (1) flaska, som levereras klar att använda, med biotinylerad musmonoklonal anti-HER-2/neu-proteinantikropp i 0,01 M PBS (pH 7,4), proteinstabiliserare och 0,09 % natriumazid.

Konjugatspädningsmedel – En (1) flaska med 0,01 M PBS (pH 7,4), BSA och 0,1 % kloracetamid.

Konjugatkoncentrat – En (1) flaska med 50X streptavidin/pepparrottsperoxidaskonjugat i buffert. Måste spädas till 1X med konjugatspädningsmedel för att bilda arbetskonjugat. Se tabell 1.

Substratspädningsmedel – 0,1 M citratbuffert (pH 5,0) och 0,01 % H₂O₂ (väteperoxid).

Substrat – En (1) flaska med OPD-tabletter. Måste lösas upp i substratspädningsmedel (1 tablet/4 mL) för att bilda arbetssubstrat. Se tabell 1.

Stopplösning – En (1) flaska med 2,5 N H₂SO₄ (svavelsyra).

Plattvättkoncentrat (20X) – En (1) flaska. Späd en (1) del koncentrat med 19 delar vatten av hög kvalitet före användning.

Säkerhets- och varningsfraser



Farligt!

R22 – Farligt vid förtäring.

S28 – Vid kontakt med huden tvätta genast med mycket vatten.

Innehåller natriumazid

(Standarder, provspädningsmedel, detekterande antikropp)

Farligt!

R40 – Möjlig risk för bestående hälsoskador.

R43 – Kan ge allergi vid hudkontakt.

S36/37 – Använd lämpliga skyddskläder och skyddshandskar.

Innehåller orto-fenylendiamin dihydrochlorit

(substrattabletter)

Irriterande!

R36/38 – Irriterar ögonen och huden.

S36/37/39 – Använd lämpliga skyddskläder, skyddshandskar samt skyddsglasögon eller ansiktsskydd.

S26 – Vid kontakt med ögonen, spola genast med mycket vatten och kontakta läkare.

Innehåller svavelsyra

(Stopplösning)

Irriterande!

R43 – Kan ge allergi vid hudkontakt.

S24 – Undvik kontakt med huden.

S37 – Använd lämpliga skyddshandskar.

Innehåller kloracetamid

(Konjugatspädningsmedel och konjugatkoncentrat)

Material som krävs men inte medföljer

- Torrvarmeinkubator med kapacitet att hålla en temperatur på 37 °C
- Pipetter: 2–20 µL-, 20–200 µL- och 200–1000 µL-pipetter med engångsspetsar
- Precisionspipett
- Automatiserad tvättare för 96-brunnars mikrotiterplattor
- 12 x 75 mm odlingsrör för provberedning
- Vortexblandare
- Avläsare för mikrotiterplattor med kapacitet att mäta absorbans i 96-brunnarsplattor vid en våglängd på 490 nm
- 500- eller 1 000 mL-mätcylinder
- Reagensbehållare
- Avjoniserat vatten
- Plastfilm eller självhäftande plattförseglare

- Flytande blekmedel för inaktivering av kliniska prover och sanering av plattvättare
- Engångshanddukar i papper

Kontroller – HER-2/neu ELISA-kontroller som består av rekombinant p105 i provspädningsmedel kan rekvireras från WILEX Inc. Referera till HER-2/neu ELISA-kontroller, artikelnr 06489884, vid beställning. Kontrollerna spåds i proportionerna 1:50 före analys. Volymerna är 0,5 mL per styck. Förvara vid 2–8 °C.

Försiktighetsåtgärder och rekommendationer

- Förvara komponenterna vid 2–8 °C. Utsätt inte reagenser för onödigt mycket ljus. Kitkomponenterna får ej frysas.
- Använd inte kitreagenserna efter utgångsdatumet.
- Använd endast de mikrotiterbrunnar som medföljer kitet.
- Skölj bort allt rengöringsmedel från glasytorna.
- Använd avjoniserat vatten av högsta kvalitet.
- Blanda inte reagenser från olika kit.
- De buffertar och reagenser som används i det här kitet innehåller antingen natriumazid eller kloracetamid som konserveringsmedel. Undvik direktkontakt med dessa reagenser.
- Använd aldrig munpipett till reagenserna.
- Förtär inte mat och dryck och rök inte under analysen eller i närheten av prover och reagenser.
- Provmaterial av humant ursprung kan vara kontaminerat med smittämnen. Aerosoler får ej förtäras, inandas eller komma i kontakt med öppna sår. Använd skyddshandskar och kassera biologiska prover enligt gällande riktlinjer.
- Vidrör inte substrattabletterna med fingrarna och undvik kontakt med huden, metall och oxidationsmedel. Kassera lösningar som innehåller OPD i enlighet med lokala bestämmelser.
- Använd engångshandskar och ögonskydd vid hantering av stopplösning (2,5 N svavelsyra).
- Kassera alla förbrukade lösningar (plattvätt, konjugat, substrat) vid arbetsdagens slut.
- Gör i ordning färska lösningar för varje analys.

Provberedning

Prover (och kontroller) måste initialt spådas med provspädningsmedel i proportionerna 1:50 före analysen. Avlägsna eventuellt flockningsmedel från proverna via mikrocentrifugering före spädningen. Förse provrören med etiketter och tillsätt 0,98 mL provspädningsmedel i vart och ett av rören, följt av 0,02 mL av prov/kontroll. Blanda försiktigt och undvik skumbildning i det utspädda provet. Utspädda prover och kontroller kan förvaras i förslutna rör i upp till en vecka vid 2–8 °C och i sex månader vid –20 °C. Skydda proverna från ljus. Omanalys av en del prover med högre spädning kan vara nödvändig. Kassera alla prover som har förvarats vid 2–8 °C om de visar tecken på kontamination. Späd igen från serum.

Detaljerat protokoll

REKOMMENDERADE PROCEDURER

1. Tillsats av reagenser måste ske i angiven ordning.
2. Alla sex (6) standarder och testprover ska köras dubbelt.
3. Låt alla reagenser anta rumstemperatur (15–30 °C) före användning.
4. Dispensera endast den mängd som krävs av varje analysreagens för det antal brunnar som används. För varje 8-brunnsrad dispenserar du 1 mL detekterande antikropp, konjugat, etc.
5. Upprätta ett schema över provernas, standardernas och kontrollbrunnarnas placering på plattan.
6. Överföringen av prover, standarder och kontroller från spädningsrör till brunnar kan underlättas med halvautomatiska flerkanalspipetter. Kontakta Teknisk service för information om rekommenderad utrustning.
7. Beredning av plattvätt
 - a. Om plattvättkoncentratet är kallt låter du det anta rumstemperatur (15–30 °C) före användning. Kontrollera att alla kristaller är upplösta. Värm till 37 °C, om så önskas, och blanda väl.
 - b. Späd en (1) del plattvättkoncentrat med 19 delar destillerat eller avjoniserat vatten. Blanda väl. Detta är plattvättlösningen. Den totala volym som krävs beror på vilken tvättmetod och vilket instrument som används. Omkring 1 L av denna lösning krävs för att fylla en automatiserad tvättare och köra en mikrotiterplatta; omkring 700 mL krävs för varje mikrotiterplatta vid manuell tvätt.
 - c. Ny plattvättlösning måste tillredas varje dag. Spara inte plattvättlösningen.

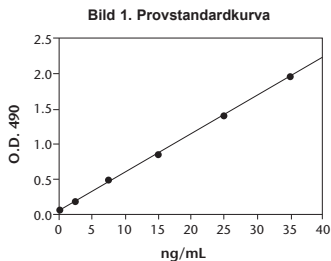
8. Vid manuella metoder är det viktigt att vara försiktig när mikrotiterplattan ska vändas för att dekantera eller blotta; tryck ramens sidoflikar inåt för att förhindra att raderna faller ur.
9. Tvättning av mikrotiterplattor utförs lämpligast i en automatiserad plattvättare. Utrustning för plattvätt måste justeras, rengöras och underhållas korrekt. Automatiserade tvättare med 96 portar rekommenderas. 8-brunnars dummyrader kan användas för att fylla den oanvända delen av hållaren vid analyser som endast använder delar av en platta. Spara och förse tidigare använda rader med etiketter för detta ändamål.
10. Ställ in fyllningsvolymen till 300 µL/brunn. Fyll instrumentet med plattvättlösning. I 96-portars tvättare ska två 3-cykeltvättare användas. Efter den första 3-cykeltvätten roterar du plattan 180 grader och uppberar. Om en radtvättare används utför du först en tvättcykel för hela plattan och uppberar den sedan fem gånger till.
11. Efter den sista tvätten vänder du mikrotiterplattan och stryker den mot en absorberande yta. Kontrollera att alla brunnar är tomma.

Analysprocedur

1. Avlägsna mikrotiterplattan från påsen. Beräkna hur många rader som behövs baserat på antalet prover som ska testas och hur många upprepade bestämningar som önskas (dubbletter rekommenderas). (För varje standard behövs två brunnar; en brunn behövs för substratkontroll.) Förvara oanvända rader i den återförslutbara påsen med torckmedel vid 2–8 °C (se Information om stabilitet och förvaring).
2. Späd prover och kontroller i proportionerna 1:50 (2 %) med provspädningsmedel.
3. Blanda standarderna, kontrollerna och proverna ordentligt och tillsätt 100 µL i dubbla brunnar. Gör i ordning en brunn med 100 µL provspädningsmedel som ska användas som substratkontroll. Gör i ordning dubbla brunnar för var och en av kontrollerna.
4. Täck över plattan (med plastfilm eller självhäftande plastöverdrag). Inkubera i 3 timmar vid 37 °C.
5. Avlägsna försiktigt plastöverdraget och tvätta mikrotiterplattan med plattvättlösning.
6. Tillsätt 100 µL detekterande antikropp i alla brunnar utom i brunnen med substratkontroll. Täck över och inkubera vid 37 °C i 1 timme.
7. Under inkuberingen med detekterande antikropp, tillreder du arbetskonjugat genom att späda konjugatkoncentratet med konjugatspädningsmedel. Se tabell 1 angående vilka kvantiteter som krävs för det antal rader som körs.
8. Tvätta mikrotiterplattan med plattvättlösning.
9. Tillsätt 100 µL arbetskonjugat i alla brunnar utom i brunnen med substratkontroll. Täck över och inkubera vid rumstemperatur (15–30 °C) i 30 minuter.
10. Under inkuberingen med arbetskonjugat, tillreder du arbetssubstratet genom att lösa upp substrattabletterna i substratspädningsmedlet. Se tabell 1 angående vilka kvantiteter som krävs för det antal rader som körs. Blanda kraftigt så att tabletterna löses helt. När arbetssubstratet är klart ska det användas inom 30 minuter. Skydda från ljus.
11. Tvätta mikrotiterplattan med plattvättlösning.
12. Tillsätt 100 µL arbetssubstrat i alla brunnar, inklusive brunnen med substratkontrollen. Täck med ett rent plastöverdrag och inkubera plattan i mörker vid rumstemperatur (15–30 °C) i 45 minuter.
13. Tillsätt 100 µL stopplösning i alla brunnar för att avbryta reaktionen.
14. Avläs absorptionsen vid 490 nm inom 30 minuter.

TABELL 1. HER-2/neu-ANALYS – BEREDNING AV ANALYSREAGENSER

Antal anv. rader	Konj.koncentrat	Konj.spädm	Substrattabletter	Substratspädningsmedel
1	20 µL	0,98 mL	1	4 mL
2	40 µL	1,96 mL	1	4 mL
3	60 µL	2,94 mL	1	4 mL
4	80 µL	3,92 mL	1	4 mL
5	100 µL	4,90 mL	2	8 mL
6	120 µL	5,88 mL	2	8 mL
7	140 µL	6,86 mL	2	8 mL
8	160 µL	7,84 mL	2	8 mL
9	180 µL	8,82 mL	3	12 mL
10	200 µL	9,80 mL	3	12 mL
11	220 µL	10,78 mL	3	12 mL
12	240 µL	11,76 mL	3	12 mL



Utvärdering av resultat

KONCENTRATION AV STANDARDER

De antikroppar som används i den här analysen känner igen den extracellulära ligand-bindningsdomänen i HER-2/neu-protein [5]. Denna form av HER-2/neu har identifierats med en molekylvikt på eller omkring 105 kDa. Standarderna i kitet kalibreras i nanogram, vilket tar hänsyn till molekylvikten i serum, och tillreds från en rekombinant form av 105 kDa-fragmentet i HER-2/neu.

KONCENTRATION AV OKÄNDA ÄMNE

- Beräkna medelabsorbsansvärden för varje standard-, kontroll- och provspädning för att få fram medelabsorbansen.
- Rita in medelabsorbansen för varje standard på ett millimeterpapper på y-axeln och koncentrationen av HER-2/neu-protein (ng/mL) på x-axeln och förbind punkterna.
- Fastställ koncentrationen av HER-2/neu-protein för varje provspädning genom interpolering från standardkurvan. Det finns programvaror (t ex SoftMax Pro™, Molecular Devices, Sunnyvale, CA USA; KC4™, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT USA) som kan användas för att förenkla denna process. Använd en kvadratisk kurvanpassningsalgoritm (andragradspolynom).
- OBS! Ange inte brunnar för blankprov med hjälp av programvara. Då subtraheras medelvärdet för blankprovsvälisningar från alla andra brunnar. Av kvalitetskontroll- och felsökningsskäl är det viktigt att kunna kontrollera de absorbsansvärden som rapporteras för alla brunnar utan att göra några justeringar av rådata.
- Resultat för prover uttrycks i nanogram per mL genom avläsningar direkt från standardkurvsvärdena (ng/mL) i enlighet med märkningarna på flaskorna och med informationen i avsnittet Medföljande material i detta häfte. Det krävs ingen matematisk spädningskorrektur för 1:50-spädda prover eftersom den faktiska koncentrationen i standardberedningarna är 2 % av den märkta dosen (dvs de är förspädda till 1:50).

SPÄDNING AV PROVER MED HÖGA KONCENTRATIONER

- För prover som ger absorbsansvärden (OD) som överskrider standardkurvens omfång kan ytterligare analyser med större spädning bli nödvändig.
- När du tillreder ytterligare spädningar ska du alltid börja med en initial 1:50-spädning (se Provbereitung) och sedan fortlöpande späda i proportionerna 1:2 i provspädningsmedel. Exempel:

Provspädning	Volym av tidigare spädning	Volym av provspädningsmedel
1:100	0,5 mL av 1:50	0,5 mL
1:200	0,5 mL av 1:100	0,5 mL
1:400	0,5 mL av 1:200	0,5 mL

- Om ytterligare utspädda prover ger OD-värden på < 0,3 måste de analyseras på nytt med svagare spädningar. Om spädningkorrektionsfaktor (se steg 4 nedan) multipliceras med resultatet från ett sådant lågt OD-värde kan det resultera i en felaktigt hög HER-2/neu-proteinuppskattning.
- Resultat från ytterligare utspädda prover kräver att värdena från analysen korrigeras inför varje ny spädning över 1:50. Exempel:

Provspädning	Spädningskorrektionsfaktor (multiplicera rapporterat resultat med)
1:100	2
1:200	4
1:400	8

Kvalitetskontroll av analys

Varje analys bör uppfylla följande prestandaparametrar.

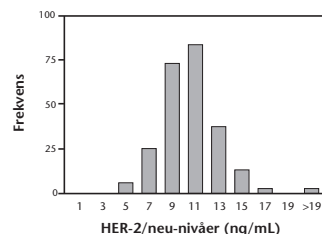
- Undersök resultaten för kontrollerna som har körts i analysen för att bekräfta att återvinningsgraden faller inom de förväntade intervallen (finns angivna i produktens bipacksedel) för varje nivå.
- Kontrollera standardkurvens dynamiska omfång. Nivå 1-standard ska hamna mellan 0,04 och 0,09 OD och Nivå 6-standard ska hamna mellan 1,5 och 2,4 OD.
- Om programvara för kurvanpassning används kontrollerar du beräkningen för R^2 . Den ska hamna mellan 0,997 och 1,0. Om någon av dessa parametrar inte uppfylls bör du överväga att upprepa testet i ännu en analys.

Förväntade värden

FRISKA INDIVIDER

Precis som vid alla andra tester bör varje laboratorium upprätta sitt eget referensintervall. I en population på 241 friska kvinnor befanns 95 % av serum HER-2/neu-proteinvärdena vara mindre än 13,7 ng/mL. Det fanns ingen signifikant skillnad i HER-2/neu-värdet mellan pre- och postmenopausala kvinnor. I samma population var den övre normalgränsen (medelvärde + 2SD) 14,7 ng/mL. Vid ROC-analyser har 15 ng/mL definierats som en lämpligt gränspunkt mellan normala och förhöjda serum HER-2/neu-proteinnivåer. Fördelningen av serum HER-2/neu-nivåer i hela populationen (n = 241) visas i bild 2.

Bild 2. Fördelning av serum HER-2/neu-protein i en population friska kvinnor.



MONITORERING AV PATIENTER MED METASTATISK BRÖSTCANCER

Den kliniska användningen av HER-2/neu ELISA i longitudinell monitorering av patienter med metastatisk bröstcancer utvärderades med hjälp av retrospektiva serumprover från patienter med långt framskriden bröstcancer, under en 6- till 12-månadersperiod, vid tre kliniska institutioner i USA. Femtiosex patienter under behandling vars initiala serum HER-2/neu-oncoproteinnivåer var förhöjda (15 ng/mL eller högre) utvärderades avseende korrespondens mellan förändringar i deras serum HER-2/neu-nivåer och förändringar i deras kliniska sjukdomsförlopp.

En analys av skillnader från ett besök till ett annat presenteras i tabell 2. Förändringarna i serum HER-2/neu-nivåerna mellan två besök beräknades för varje patient. Förändringarna indelades i två grupper: Grupp I hade förändringar i serum HER-2/neu som korrelerade med det kliniska sjukdomsförloppet och grupp II hade förändringar i serum HER-2/neu-nivån som inte korrelerade med det kliniska sjukdomsförloppet. Det kliniska förloppet eller statusen avgjordes av läkaren. Korrelationen mellan HER-2/neu-förändringar och klinisk status fastställdes enligt följande: En ökning på 20 % eller mer från föregående besök speglade sjukdomsprogression. Om ökningen var mindre än 20 % sedan föregående besök speglade detta avsaknad av sjukdomsprogression under pågående behandling (inklusive sjukdom som var stabil eller som gick tillbaka). Stabil sjukdom och sjukdom som gick tillbaka konsoliderades eftersom båda speglar den aktuella behandlingens effektivitet. Kriterienivån 20 % baserades på den longitudinella variabiliteten hos normala patienter (baserat på serum HER-2/neu-nivåer i sex seriella prover från vardera 38 friska kvinnor).

TABELL 2. KORRELATION MELLAN SJUKDOMSSTATUS HOS PATIENTER MED META-S-TATISK BRÖSTCANCER OCH FÖRÄNDRINGAR I SERUM HER-2/neu-NIVÅER: MELLAN TVÅ BESÖK

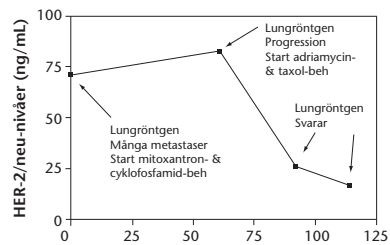
Förändringar i HER-2/neu	Förändringar i klinisk status		Totalt
	Progression	Ingen progression	
≥ 20 % ökning	52	33	85
< 20 % ökning	55	96	151
Totalt	107	129	236

Konkordans = 62,7 % (CI = 56,4 till 68,6 %)

Prediktionsvärde: Avsaknad av progress = 63,6 % (CI = 55,7 till 70,8 %)

Progression = 61,2 % (CI = 50,6 till 70,8 %)

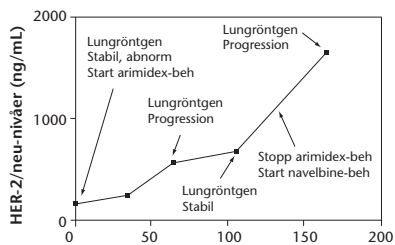
Följande bilder visar typiska exempel på förändringar i serum HER-2/neu-nivåer över tiden hos två av de 56 patienterna med metastatisk bröstcancer som ingick i den kliniska studien. Bild 3 visar en patient vars sjukdom svarar och bild 4 visar en patient med progressiv sjukdom.



Dagar sedan första provtagningen

Bild 3. Monitorering av en 38-årig patient med stadie IV bröstcancer med HER-2/neu ELISA.

Longitudinella förändringar i serum HER-2/neu-nivåerna korrelerar med förändringarna i sjukdomsstatus.



Dagar sedan första provtagningen

Bild 4. Monitorering av en 74-årig patient med stadie IV bröstcancer med HER-2/neu ELISA.

Longitudinella förändringar i serum HER-2/neu-nivåerna korrelerar med förändringarna i sjukdomsstatus.

Icke-klinisk prestatandakaraktäristik OPRECISION

Oprecisionen fastställdes genom testning av fyra kontrollprover bestående av tre buffertbaserade kontroller och en humanserumpool. Tre olika kitlot användes vid de tre olika laboratorierna. 130 körningar tripelbestämdes för varje enskild kontroll. Precision inom körning och total precision beräknades för varje kontroll baserat på NCCLS EP-5A-protokollet. Oprecision inom körning för de tre instituten och kitloten var lika med eller mindre än 10 % CV med en total oprecision för alla kit och institutioner på mellan 10 och 17,7 % CV.

Kontrollprov	Antal körningar	Antal replikat	Medel (ng/mL)
Kontroll 1	130	385	24,5
Kontroll 2	131	390	9,8
Kontroll 3	131	386	3,3
Serum 4	130	385	9,5

Kontrollprov	Precision inom körning		Total precision	
	Std.avvik.	% CV	Std.avvik.	% CV
Kontroll 1	1,46	6,0	2,62	10,7
Kontroll 2	0,69	7,0	1,03	10,4
Kontroll 3	0,34	10,2	0,59	17,7
Serum 4	0,65	6,9	1,02	10,8

KÄNSLIGHET

Minsta påvisbara koncentration av analyt fastställdes genom upprepade mätningar av ett nolldosprov (provspädningsmedel). Medelvärde och standardavvikelse för återvinning av HER-2/neu beräknades för 230 bestämningar utförda under en period på 20 dagar med tre olika kitlot och tre olika laboratorier. Efter tillägg av två standardavvikelser till medelåtervinningsdosen av HER-2/neu fastställdes den minsta påvisbara koncentrationen till 1,5 ng av p105/mL serum.

ANALYTISK SPECIFICITET

Korsreaktivitet. Epidermal tillväxtfaktorreceptor (EGFr) är en molekyl nära besläktad med HER-2/neu-tillväxtfaktorreceptorn vid 88 % homologi med den intracellulära domänen och 44 % homologi med den extracellulära domänen. Vi utmanade HER-2/neu ELISA med EGFr vid 850 ng/mL. Materialet producerade ingen signal i analysen vilket indikerar att immunreaktionen i utrustningen inte orsakade någon korsreaktion med EGFr.

Interfererande substanser. Human antimus-antikropp (HAMA), som i sällsynta fall förekommer i humant serum, har förmåga att binda till de kritiska reagenserna i immunanalyser, vilket orsakar felaktigt positiva eller negativa signaler. Flera kända HAMA-positiva serumprover samt reumafaktorpositiva prover testades i utrustningen. Inga falska signaler genererades med dessa prover. Utrustningsreagenserna har framställts för att blockera all sådan falsk reaktivitet.

Serum HER-2/neu-mätningar kan utföras även om patienterna tar vitaminer, receptfria läkemedel eller behandlas med kemoterapi. För att testa om sådana ämnen skulle kunna interferera med exakt HER-2/neu-bestämning, spetsades ett positivt kontrollserum, som innehöll en känd koncentration HER-2/neu, med potentiella exogena interferenser och testades sedan i analysen. Vissa vanliga serumbeståndsdelar testades också för deras potential att agera som endogena interferenser. Ingen av dessa föreningar hade någon effekt på analytåtervinning. Se tabell 3.

ANALYSINTERVALL

HER-2/neu ELISA kan utföra exakt kvantifiering av serum HER-2/neu-nivåer i förspädda prover, vilket gör metoden användbar i intervallet 1,5 till 35 ng av p105 HER-2/neu-protein per mL serum. Prover som producerar en signal som överskrider den övre gränsen av standardkurvens omfång (35 ng/mL) måste spädas ytterligare med provspädningsmedel och analyseras på nytt. Det är viktigt att korrigera den rapporterade återvinningen av HER-2/neu-protein för spädningsberedningar som överstiger rutinspädningen på 1:50.

TABELL 3. POTENTIELLA ELISA-INTERFERENSER

POTENTIELLA INTERFERENSER	TEST-KONCENTRATIONER	POTENTIELLA INTERFERENSER	TEST-KONCENTRATIONER
ENDOGENA			
RECEPTFRIA LÄKEMEDEL, ETC.			
Triglycerider (intralipin-20 %)	3 000,0 mg/dL	Paracetamol	200,0 µg/mL
Hemoglobin	1,0 g/dL	Acetylsalicylsyra	500,0 µg/mL
Immunglobulin (gammaglobulin)	6,0 g/dL	Ibuprofen	400,0 µg/mL
Albumin	6,5 g/dL	Koffein	100,0 µg/mL
Bilirubin	25,0 mg/dL		
Heparin	0,46 mg/mL		
KEMOTERAPEUTIKUM			
Vitamin A trans retinolacetat	10,0 IU/mL	Aminoglutetimid	398,0 µg/mL
Vitamin B1 tiamin	3,0 µg/mL	Bleomycin	0,16 U/mL
Vitamin B2 riboflavin	3,4 µg/mL	Cisplatin	173,0 µg/mL
Vitamin B6 pyridoxin HCL	4,0 µg/mL	Doxorubicin	51,8 µg/mL
Vitamin B12	12,0 ng/mL	Cyklofosfamid	800,0 µg/mL
Vitamin C askorbinsyra	30,0 µg/mL	Diethylstilbestrol	23,0 µg/mL
Vitamin D2 ergocalciferol	0,8 IU/mL	Estramustin	102,2 µg/mL
Vitamin E tokoferolacetat	0,06 IU/mL	Flutamid	10,0 µg/mL
Folsyra	0,8 µg/mL	5-fluorouracil	1 600,0 µg/mL
Niacin	40,0 µg/mL	Lupron	15,0 µg/mL
		Metotrexat	450,0 µg/mL
		Mitoxantron	56,0 µg/mL
		Mitomycin C	73,0 µg/mL
		Megace	27,0 ng/mL
		Tamoxifen	1,4 µg/mL
		Vinkristin	4,88 µg/mL
		Vinblastin	16,3 µg/mL
		Herceptin (Trastuzumab)	500 µg/mL

PROCEDURENS BEGRÄNSNINGAR

Vid manuella immunanalyser finns det en potentiell risk för felaktiga mätningar (provåtervinning) beroende på variationer i den inkuberingsstid som proverna är föremål för i de olika inkuberingsstegen. Alla brunnar ska i princip inkuberas lika länge – den tid som krävs för varje reagenssteg. Framför allt bör tiden mellan tillsatsen av det första provet och det sista inte vara längre än 15 minuter till tillsats av standarder, kontroller och prover i plattans brunnar. Gör i ordning alla prover i förväg. Användning av halvautomatiska flerkanalspipetter rekommenderas för att förkorta tiderna för dessa procedurer. För att förhindra korskontamination ska en ny spets användas för varje provtillsats.

Immunanalyser som använder så kallade sandwich-konfigurationer - som denna analys - är föremål för interferenser och falska resultat från prover som innehåller immunreaktiva ämnen mot musantikroppar. HAMA, heterofil antikropp, och reumafaktorer är de främsta exemplen på sådana interferenser. Åtgärder har vidtagits av tillverkaren vid framställningen av de reagenser som ingår i denna utrustning för att minimera eller eliminera sådan interferens. Dock ska sådana möjliga interferenser beaktas vid utvärdering av analysresultat som kanske är inkonsekventa i förhållande till patientens kliniska helhetsstatus.

Det är möjligt att en patient med diagnostiserad bröstcancer kan ha serum HER-2/neu-proteinnivåer som faller inom samma intervall som har observerats hos friska individer. Var noggrann vid tolkningen av HER-2/neu-resultat. Serum HER-2/neu-nivåer indikerar inte alltid närvaro eller frånvaro av malign sjukdom. HER-2/neu-värdet ska användas som en komponent i en klinisk helhetsbedömning som inkluderar ytterligare kliniska utvärderingstester och diagnostiska tester.

Felsökning

- Varje analys måste inkludera de sex (6) standarderna testade i dubletter med hjälp av protokollet som beskrivs i avsnittet Detaljerat protokoll. Inkuberingsstider eller temperaturer som avsevärt skiljer sig från de specificerade kan ge felaktiga resultat.
- Formen på standardkurvan är icke-linjär och varierar något från analys till analys. För manuell datareduktion använd punkt-till-punkt-diagram. Om du använder ELISA-programvara ska du använda en kvadratisk kurvanpassningsalgoritm (andragradspolynom).
- Skillnader inom dubblettvärden indikerar, tillsammans med förhöjda värden för nollstandard, otillräcklig tvätt. Om alla instruktioner i avsnittet Detaljerat protokoll har följts korrekt indikerar sådana resultat att det kan vara dags för underhållsarbete på tvättaren. Undvik också att tillföra bubblor i brunnarna när du pipetterar prover och reagenser.
- Värdet för brunnen med substratkontroll ska var mindre än eller lika med 0,05 absorbansenheter. En möjlig orsak till högre värden är att arbetssubstratet har utsatts för ljus antingen före eller under inkuberingssteget. Arbetssubstratet ska användas inom 30 minuter efter tillredning.
- Låg signal kan indikera 1) att plattan har torkat mellan stegen. Låt inte plattan torka ut. Tillsätt nästa reagens direkt efter tvätt; eller 2) att tvätten som utförts har varit otillräcklig. Kontrollera att mikroliter-plattvättaren har fyllts ordentligt med plattvättlösning (se Detaljerat protokoll).

Information om stabilitet och förvaring

Alla reagenser som ingår i HER-2/neu ELISA har testats avseende stabilitet. Reagenser ska inte användas efter det angivna utgångsdatumet. Kitreagenser ska förvaras vid 2–8 °C, med undantag för plattvätkoncentrat, som ska förvaras i rumstemperatur. Analysplattor ska förvaras förslutna i den ursprungliga foliepåsen med torkmedelspack. Efter öppnandet fungerar produkten inom ramen för specifikationerna i upp till 4 veckor (30 dagar) före utgångsdatumet som finns angivet på etiketten.

Teknisk support

Tel: +1 617 492 3900 x502
E-post: oncogetech@wilex.com



WILEX Inc.
Cambridge, MA 02140 USA



EMERGO EUROPE
Molenstraat 15
2513 BH, The Hague
The Netherlands
Tel: +31 (0)70 345 8570
Fax: +31 (0)70 346 7299

Προοριζόμενη χρήση

H ανάλυση HER-2/neu ELISA προορίζεται για την ποσοτική μέτρηση της πρωτεΐνης HER-2/neu στον ορό γυναικών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Η χρήση της ανάλυσης HER-2/neu ELISA ενδείκνυται για τον έλεγχο και την παρακολούθηση ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού των οποίων η αρχική τιμή HER-2/neu στον ορό είναι μεγαλύτερη από 15 ng/mL. Οι τιμές HER-2/neu πρέπει να χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με πληροφορίες διαθέσιμες από κλινικές και άλλες διαγνωστικές διαδικασίες της διαχείρισης του μεταστατικού καρκίνου του μαστού. Η κλινική χρησιμότητα της μέτρησης της HER-2/neu ορού ως προγνωστικού δείκτη για πρόωμη υποτροπή και στη διαχείριση ασθενών που υποβάλλονται σε αγωγή ανοσοθεραπείας δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως.

ΓΙΑ IN VITRO ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ

Αρχή της μεθόδου	Σάντουιτς στερεάς φάσης ELISA
Αναλυτικό εύρος τιμών	0 ng/mL έως 35 ng/mL
Τύπος δείγματος	Ανθρώπινος ορός
Όγκος δοκιμασίας δείγματος	10,0 microliters
Ευαισθησία	1,5 ng p105/mL ορού
Η αγορά του παρόντος kit επιτρέπει τη χρήση του με βάση τα ακόλουθα διπλώματα ευρεσιτεχνίας: Διπλ. ευρεσιτεχνίας ΗΠΑ 5.401.638 και 5.604.107, διπλ. ευρεσιτεχνίας ΕΡΟ 0494135 και 0412116, διπλώμα ευρεσιτεχνίας Καναδά 2.026.250-8	

Πίνακας περιεχομένων

Προοριζόμενη χρήση	44	Διαδικασία ανάλυσης	47
Υπόβαθρο	44	Πρότυπη καμπύλη δείγματος	47
Αρχή της ανάλυσης	45	Αξιολόγηση αποτελεσμάτων	47
Περίληψη της διαδικασίας	45	Έλεγχος ποιότητας ανάλυσης	48
Ιχνηλασιμότητα πύργων διαλυμάτων	45	Αναμενόμενες τιμές	48
Παρεχόμενα υλικά	45	Μη κλινικά χαρακτηριστικά απόδοσης	48
Φράσεις ασφάλειας και προειδοποίησης	45	Αντιμετώπιση προβλημάτων	50
Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται	46	Σταθερότητα και πληροφορίες φύλαξης	50
Προφυλάξεις και συστάσεις	46	Τεχνική υποστήριξη	50
Προετοιμασία δειγμάτων	46	Βιβλιογραφία	51
Λεπτομέρες πρωτόκολλο	46	Επεξήγηση των συμβόλων	53

Υπόβαθρο

Το ογκογονίδιο HER-2/neu, γνωστό και ως c-erbB-2, κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 185.000 Dalton (p185) και ανήκει σε μια οικογένεια υποδοχών επιθηλιακού αυξητικού παράγοντα με δομική συγγένεια προς τον ανθρώπινο υποδοχέα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα [1]. Η πρωτεΐνη πλήρους μήκους p185 HER-2/neu αποτελείται από μια κυτταροπλασματική περιοχή με δραστηριότητα τυροσινικής κίνησης, μια διαμεμβρανική περιοχή και μια εξωκυττάρια περιοχή (ECD) η οποία απορρέει από την επιφάνεια των κυττάρων του καρκίνου του μαστού [2,3]. Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι η απορρέουσα περιοχή ECD της HER-2/neu είναι μια γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος μεταξύ 97 και 115 kDa και είναι προσδιορισμένη p105 [3,4]. Η περιοχή ECD μπορεί να ποσοτικοποιηθεί επακριβώς στον ορό με μια ανάλυση [4] που χρησιμοποιεί μονοκλωνικά αντισώματα [5] τα οποία κατευθύνονται στους εξωτερικούς επιτόπους της πρωτεΐνης HER-2/neu. Σε διάφορες δημοσιεύσεις έχει δείξει ότι η περιοχή ECD εκρέει στο αίμα των φυσιολογικών ατόμων και μπορεί να μετρηθεί σε υψηλά επίπεδα στις γυναίκες με μεταστατικό καρκίνο του μαστού [4,6–26]. Πολλές από αυτές τις μελέτες HER-2/neu ορού έχουν καθιερωθεί σε μια ουσιαστική δεδομένα από μελέτες ιστών ότι η αυξημένη έκφραση της HER-2/neu είναι δείκτης κακής πρόγνωσης, βραχύτερης συνολικής επιβίωσης και βιολογικής επιθετικότητας.

Πρόσφατες επιστημονικές μελέτες δείχνουν ότι η ποσοτικοποίηση της ECD μπορεί να έχει διάφορες σημαντικές κλινικές εφαρμογές όπως είναι η παρακολούθηση ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού και η παρακολούθηση ασθενών με καρκίνο του μαστού για πρόωμη υποτροπή [6–10,12,15,17–20,22–26]. Οι εκθέσεις αυτές έχουν δείξει ότι 30–50% των γυναικών με όγκους θετικούς στην HER-2/neu κατά την αρχική διάγνωση εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα HER-2/neu ορού με εξέλιξη σε μεταστατικό καρκίνο του μαστού [4,6–26]. Οι μελέτες αυτές έχουν δείξει επίσης ότι η παρακολούθηση των επιπέδων ECD ορού, μετά από τη χειρουργική επέμβαση, συσχετίζεται με την κλινική πορεία της νόσου και ότι τα επίπεδα HER-2/neu ορού παρατηρήθηκε ότι αυξάνονται με την πρόοδο της νόσου ή μειώνονται με την απόκριση στη θεραπεία [12,15,19,20,25,26]. Διάφορες εκθέσεις δείχνουν επίσης ότι αυξημένα επίπεδα HER-2/neu ορού μπορεί να

εμφανιστούν σε γυναίκες με μεταστατικό καρκίνο του μαστού στις οποίες είχαν διαγνωστεί αρχικά όγκοι στο μαστό για τους οποίους είχε διαπιστωθεί ότι ήταν αρνητικοί στην HER-2/neu με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους [6,11,18,21,27]. Σύμφωνα με διάφορες μελέτες ανοσοϊστοχημείας και ορού, η πρωτεΐνη HER-2/neu υπερεκφράζεται σε διάφορους όγκους επιθηλιακής προέλευσης, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται ο καρκίνος του πνεύμονα [28], του προστάτη [29], του παγκρέατος [30], του κόλου [31], του στομάχου [32], των ωθηκών [33] και ο ηπατοκυτταρικός καρκίνος [34].

Έχουν κατοχυρωθεί διπλώματα ευρεσιτεχνίας τα οποία σχετίζονται με την ποσοτικοποίηση και την ανίχνευση της περιοχής ECD p105 (στις ΗΠΑ, αρ. διπλώματος ευρεσιτεχνίας 5.401.638, στον Καναδά αρ. διπλώματος ευρεσιτεχνίας 2.026.250 8 και στην Ευρώπη αρ. διπλώματος ευρεσιτεχνίας 0494135), καθώς και διπλώματα ευρεσιτεχνίας τα οποία σχετίζονται με την ποσοτικοποίηση και την ανίχνευση του πλήρους μήκους p185 μορίου (στις ΗΠΑ, αρ. διπλώματος ευρεσιτεχνίας 5.604.107 και στην Ευρώπη αρ. διπλώματος ευρεσιτεχνίας 0412116). Αντίστοιχα διπλώματα ευρεσιτεχνίας βρίσκονται στο στάδιο της έγκρισης στην Ιαπωνία.

Αρχή της ανάλυσης

Η HER-2/neu ELISA είναι μια ενζυμική ανοσοανάλυση τύπου σάντουιτς η οποία χρησιμοποιεί ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού για σύλληψη και ένα διαφορετικό βιοτινυλωμένο μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού για την ανίχνευση της ανθρώπινης πρωτεΐνης HER-2/neu. Τόσο τα αντιδραστήρια σύλληψης όσο και τα αντιδραστήρια-ανιχνευτές συνδέονται ειδικά με την εξωκυττάρια περιοχή της πρωτεΐνης HER-2/neu. Το αντίσωμα σύλληψης είναι ακινητοποιημένο στην εσωτερική επιφάνεια των φρεατίων της πλάκας μικροτιτλοδότησης. Για να εκτελέσετε τη δοκιμασία, ο κατάλληλος όγκος δείγματος επωάζεται στο επιστρωμένο φρεάτιο ώστε να επιτευχθεί σύνδεση του αντιγόνου από το αντίσωμα σύλληψης. Το ακινητοποιημένο αντιγόνο αντιδρά στη συνέχεια με τον αντιορό-ανιχνευτή. Η ποσότητα αντισώματος-ανιχνευτή που συνδέεται με το αντιγόνο μετράται με σύνδεση του αντισώματος με συζυγές σηματοδότησης με στρεπταβιδίνη/HRP, το οποίο κατόπιν καταλύει τη μετατροπή του χρωμογονικού υποστρώματος ο-φαινυλενοδιαμίνης (OPD) σε ένα κεχρωσμένο προϊόν. Το κεχρωσμένο προϊόν της αντίδρασης ποσοτικοποιείται φασματοφωτομετρικά και συσχετίζεται με την ποσότητα της πρωτεΐνης HER-2/neu στο δείγμα.

Για οδηγίες, δείτε τις ενότητες "Λεπτομερές πρωτόκολλο" και "Αξιολόγηση αποτελεσμάτων" του παρόντος φυλλαδίου.

Περιληψη της διαδικασίας

Βήματα	Επιπώσεις
1. Προσθήκη δειγμάτων και πρότυπων διαλυμάτων στα φρεάτια	3 ώρες, 37°C
2. Εκπλυση	
3. Προσθήκη αντισώματος-ανιχνευτή στα φρεάτια	1 ώρα, 37°C
4. Εκπλυση	
5. Προσθήκη συζυγούς αντισώματος στα φρεάτια	30 λεπτά, ΘΔ*
6. Εκπλυση	
7. Προσθήκη υποστρώματος στα φρεάτια	45 λεπτά, ΘΔ*
8. Προσθήκη διαλύματος αναστολής στα φρεάτια	
9. Ανάγνωση πλάκας στα 490 nm	

*Θερμοκρασία δωματίου

ΙΧΝΗΛΑΣΙΜΟΤΗΤΑ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

Η ανάλυση HER-2/neu ELISA αναπτύχθηκε και βαθμονομήθηκε από τη WILEX Inc., Cambridge MA, 02140, USA.

Τα πρότυπα διαλύματα HER-2/neu ELISA είναι βαθμονομημένα με βάση το πρότυπο υλικό αποθέματος βαθμονομητή που διατηρείται στο Cambridge MA. Το υλικό αυτό προσδιορίζεται ως HER-2/neu Master Calibrator αρ. παρτίδας R5345 και είναι μια σειρά έξι υγρών αντιδραστηρίων, με τιμές που εκτείνονται από μηδέν έως 35 ng/mL πρωτεΐνης HER-2/neu p105. Οι προσδιορισμοί μάζας για τον πρότυπο βαθμονομητή HER-2/neu Master Calibrator έχουν εκχωρηθεί με βάση την ανάλυση του υλικού του βαθμονομητή σε άμεση σύγκριση με τρία δείγματα πρωτεΐνης HER-2/neu p105 υψηλής καθαρότητας. Τα ισοδύναμα μάζας (γραμμομάρια) των καθαρωμένων δειγμάτων προσδιορίστηκαν με ποσοτική ανάλυση αμινοξέων.

Παρεχόμενα υλικά

Παρέχονται τα ακόλουθα συστατικά στοιχεία.

Πλάκα μικροτιτλοδότησης—Προεπιστρωμένη πλάκα μικροτιτλοδότησης η οποία παρέχεται έτοιμη για χρήση, με 96 φρεάτια (12 ταινίες των οχτώ) σε σακούλα με φερμουάρ, μαζί με ξηραντικό. Τα φρεάτια είναι επιστρωμένα με μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-πρωτεΐνης HER-2/neu.

Πρότυπα διαλύματα HER-2/neu—Εί (6) χωριστά φιαλίδια ανασυνδυασμένης HER-2/neu p105. Τα πρότυπα διαλύματα είναι βαθμονομημένα σε ng/mL και στις ετικέτες τους αναγράφονται τιμές που είναι κατά 50 φορές μεγαλύτερες από την πραγματική δόση του φιαλιδίου. Η εκχώρηση αυτών των τιμών σε μια πρότυπη καμπύλη εξαλείφει την ανάγκη διόρθωσης της αναφερόμενης δόσης για αραωμένο δείγμα 1:50 (2% ορός σε ρυθμιστικό διάλυμα). Για λεπτομέρειες, δείτε την ενότητα "Αξιολόγηση αποτελεσμάτων".

Αρ. πρότυπου διαλύματος	ng/mL	Όγκοι
6	35,0	1 mL
5	25,0	1 mL
4	15,0	1 mL
3	7,5	1 mL
2	2,5	1 mL
1	0,0	1 mL

Αραιωτικό δειγμάτων—Μία (1) φιάλη που περιέχει BSA και αζίδιο του νατρίου 0,09%.

Αντίσωμα-ανιχνευτής—Μία (1) φιάλη έτοιμη για χρήση, η οποία περιέχει σηματοδότη με βιοτίνη μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-πρωτεΐνης HER-2/neu ποντικού σε PBS 0,01 M (pH 7,4), σταθεροποιητή πρωτεΐνης και αζίδιο του νατρίου 0,09%.

Αραιωτικό συζυγούς—Μία (1) φιάλη που περιέχει PBS 0,01 M (pH 7,4), BSA και 0,1% χλωροακεταμίδη.

Συμπύκνωμα συζυγούς—Ένα (1) φιαλίδιο που περιέχει στρεπταβιδίνη/HRP 50X σε ρυθμιστικό διάλυμα. Πρέπει να αραιωθεί σε 1X με αραιωτικό συζυγούς για να δημιουργήσει συζυγές εργασίας. Βλ. Πίνακα 1.

Αραιωτικό υποστρώματος—Κιτρικό ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M (pH 5,0) και H₂O₂ 0,01% (υπεροξειδίου του υδρογόνου).

Υπόστρωμα—Ένα (1) φιαλίδιο που περιέχει δίσκια OPD. Πρέπει να διαλυθεί σε αραιωτικό υποστρώματος

(1 δίσκιο/4 mL) για δημιουργία υποστρώματος εργασίας. Βλ. Πίνακα 1.

Διάλυμα αναστολής—Μία (1) φιάλη που περιέχει H₂SO₄ (θειικό οξύ) 2,5 N.

Συμπύκνωμα έκπλυσης πλάκας (20X)—Μία (1) φιάλη. Αραιώνετε ένα (1) μέρος συμπυκνώματος σε 19 μέρη νερού υψηλής ποιότητας πριν από τη χρήση.

Φράσεις ασφάλειας και προειδοποίησης



Επιβλαβές!

R22 – Επιβλαβές αν καταποθεί.

S28 – Μετά από επαφή με το δέρμα, ξεπλύντε αμέσως με άφθονο νερό.

Περιέχει αζίδιο του νατρίου

(Πρότυπα διαλύματα, Αραιωτικό δειγμάτων, Αντίσωμα-ανιχνευτής)

Επιβλαβές!

R40 – Πιθανοί κίνδυνοι μη αναστρέψιμων επιδράσεων.

R43 – Μπορεί να προκαλέσει ευαισθητοποίηση με δερματική επαφή.

S36/37 – Να φοράτε κατάλληλα προστατευτικά ρούχα και γάντια.

Περιέχει διυδροχλωριώδη ορθο-φαινυλενοδιαμίνη.

(Δίσκια υποστρώματος)

Ερεθιστικό!

R36/38 – Ερεθιστικό για τα μάτια και το δέρμα.

S36/37/39 – Να φοράτε κατάλληλα προστατευτικά ρούχα, γάντια και εξαρτήματα προστασίας ματιών/προσώπου.

S26 – Σε περίπτωση επαφής με τα μάτια, ξεπλύντε αμέσως με άφθονο νερό και αναζητήστε ιατρική βοήθεια.

Περιέχει θειικό οξύ

(Διάλυμα αναστολής)

Ερεθιστικό!

R43 – Μπορεί να προκαλέσει ευαισθητοποίηση με δερματική επαφή.

S24 – Να αποφεύγετε την επαφή με το δέρμα.

S37 – Να φοράτε κατάλληλα γάντια.

Περιέχει χλωροακεταμίδη

(Αραιωτικό συζυγούς και Συμπύκνωμα συζυγούς)

Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

- Επωαστήρας ξηρής θερμότητας με δυνατότητα να διατηρεί θερμοκρασία 37°C
- Πιπέτορες: 2–20 μL, 20–200 μL και 200–1000 μL πιπέτορες με αναλώσιμα ρύγχη
- Επαναληπτικός πιπέτορας ακριβείας
- Αυτόματη συσκευή έκπλυσης πλάκας μικροπιτλοδότσης 96 φρεατίων
- Σωληνάρια καλλιέργειας 12 x 75 mm για προετοιμασία δειγμάτων
- Αναδευτήρας
- Αναγωγής πλάκας μικροπιτλοδότσης με δυνατότητα μέτρησης της απορροφητικότητας σε πλάκες των 96 φρεατίων σε μήκος κύματος 490 nm
- Διαβαθμισμένος κύλινδρος των 500 ή 1000 mL
- Δοχεία αντιδραστήριων
- Απιονισμένο νερό
- Πλαστικό περιτύλιγμα ή αυτοκόλλητα σφραγιστικά πλάκας
- Οικιακή χλωρίνη σε υγρή μορφή για απενεργοποίηση των κλινικών δειγμάτων και απολύμανση της συσκευής έκπλυσης της πλάκας
- Αναλώσιμες χαρτοπετσέτες

Μάρτυρες Οι μάρτυρες HER-2/neu ELISA που αποτελούνται από ανασυνδυασμένο p105 σε αραιωτικό δειγμάτων διατίθενται από τη WILEX Inc. Αναφέρετε τους μάρτυρες HER-2/neu ELISA, αρ. κατ. 06489884, για παραγγελία. Κάθε μάρτυρας έχει όγκο 0,5 mL. Φύλαξη σε θερμοκρασία 2–8°C.

Προφυλάξεις και συστάσεις

- Φυλάσσετε τα συστατικά στοιχεία σε θερμοκρασία 2–8°C. Τα αντιδραστήρια δεν πρέπει να εκτίθενται σε υπερβολικό φως. Μην καταψύχετε κανένα από τα συστατικά στοιχεία του kit.
- Μη χρησιμοποιείτε αντιδραστήρια του kit, των οποίων η ημερομηνία λήξης έχει παρέλθει.
- Χρησιμοποιείτε μόνο τα φρεάτια μικροπιτλοδότσης που παρέχονται με το kit.
- Ξεπλύνετε όλα τα υπολείμματα απορροπαντικού από τα γυάλινα είδη.
- Χρησιμοποιείτε απιονισμένο νερό βέλτιστης ποιότητας.
- Μην αναμειγνύετε αντιδραστήρια από διαφορετικά kit.
- Τα ρυθμιστικά διαλύματα και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στο παρόν kit περιέχουν αζίδιο του νατρίου ή χλωροακεταμίδη ως συντηρητικά. Θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή ώστε να αποφευχθεί η άμεση επαφή με αυτά τα αντιδραστήρια.
- Μη χρησιμοποιείτε το στόμα σας για να αναρροφήσετε με πιπέτα και μην καταπιείτε κανένα από τα αντιδραστήρια.
- Δεν πρέπει να καπνίζετε, να τρώτε ή να πίνετε όταν εκτελείτε την ανάλυση ή στα σημεία όπου πραγματοποιείται ο χειρισμός δειγμάτων ή αντιδραστήριων.
- Τα ανθρώπινα δείγματα μπορεί να έχουν μολυνθεί με μολυσματικούς παράγοντες. Μην καταπίνετε, μην εκθέτετε σε ανοικτές πληγές και μην εισπνέετε αερολύματα. Να φοράτε προστατευτικά γάντια και να απορρίπτετε τα βιολογικά δείγματα με τον κατάλληλο τρόπο.
- Μη χειρίζεστε τα δίσκια υποστρώματος με τα δάχτυλα και μην τα αφήνετε να έρχονται σε επαφή με το δέρμα, μέταλλα ή οξειδωτικούς παράγοντες. Απορρίπτετε τα διαλύματα που περιέχουν OPD σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς.
- Να φοράτε αναλώσιμα γάντια και προστατευτικά γυαλιά όταν χειρίζεστε το διάλυμα αναστολής (θεϊκό οξύ 2,5 N).
- Απορρίπτετε όλα τα διαλύματα εργασίας (έκπλυσης πλάκας, συζυγούς, υποστρώματος) στο τέλος κάθε ημέρας.
- Ετοιμάζετε νέα διαλύματα εργασίας για κάθε νέα ανάλυση.

Προετοιμασία δειγμάτων

Πριν από την ανάλυση, τα δείγματα (και οι μάρτυρες) πρέπει να αραιωθούν αρχικά σε αναλογία 1:50 με αραιωτικό δειγμάτων. Αφαιρέστε τυχόν υλικό κροκώδους που τυχόν υπάρχει στα δείγματα με μικροφυγοκέντρηση πριν από την αραιώση. Επικολλήστε ετικέτες στα σωληνάρια, προσθέστε 0,98 mL αραιωτικού δειγμάτων σε κάθε σωληνάριο και συνεχίστε με 0,02 mL δειγματος/μάρτυρα. Αναμείξτε απαλά και αποφύγετε τη δημιουργία αφρού στο αραιωμένο δείγμα. Τα αραιωμένα δείγματα και οι μάρτυρες μπορούν να αποθηκεύονται σε σωληνάρια με καπάκι για έως και μία εβδομάδα στους 2–8°C και για έξι μήνες στους –20°C. Μην επιτρέψετε την έκθεση στο φως. Μπορεί να απαιτηθεί νέα ανάλυση ορισμένων δειγμάτων σε υψηλότερη αραιώση. Απορρίψτε τα δείγματα που φυλάσσονται στους 2–8°C και εμφανίζουν ενδείξεις μόλυνσης. Αραιώστε πάλι από ορό.

Λεπτομερές πρωτόκολλο

Συνιστώμενες διαδικασίες

1. Η προσθήκη αντιδραστηρίων πρέπει να γίνει με την καθορισμένη σειρά.
2. Τα έξι (6) πρότυπα διαλύματα και τα δείγματα δοκιμασίας πρέπει να αναλυθούν εις διπλούν.
3. Αφήστε όλα τα αντιδραστήρια να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου (15–30°C) πριν από τη χρήση.
4. Τοποθετήστε την απαραίτητη ποσότητα αντιδραστηρίου που αντιστοιχεί στον αριθμό των φρεατίων που χρησιμοποιούνται. Για κάθε ταϊνιά 8 φρεατίων, τοποθετήστε 1 mL αντισώματος-ανιχνευτή, συζυγούς, κ.λπ.
5. Ετοιμάστε ένα χάρτη της πλάκας για να τον χρησιμοποιείτε ως οδηγό για τις θέσεις των φρεατίων με τα δείγματα, τα πρότυπα διαλύματα και τους μάρτυρες.
6. Η μεταφορά των δειγμάτων, πρότυπων διαλυμάτων και μαρτύρων από τα σωληνάρια αραιώσης στα φρεάτια μπορεί να απλοποιηθεί αν χρησιμοποιηθούν ημιαυτόματοι, πολυκαναλικοί πιπέτορες. Επικοινωνήστε με το Τμήμα Τεχνικής Εξυπηρέτησης για τα συνιστώμενα διαγνωστικά βοηθήματα.
7. Προετοιμασία του διαλύματος έκπλυσης πλάκας
 - α. Αν το συμπύκνωμα έκπλυσης πλάκας είναι κρύο, αφήστε το να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου (15–30°C) πριν από τη χρήση. Βεβαιωθείτε ότι έχουν διαλυθεί όλοι οι κρύσταλλοι. Αν θέλετε, μπορείτε να θερμάνετε στους 37°C και να αναμείξετε καλά.
 - β. Αραιώστε ένα (1) μέρος συμπυκνώματος έκπλυσης πλάκας με 19 μέρη αποσταγμένου ή απιονισμένου νερού. Αναμείξτε καλά. Αυτό είναι το διάλυμα έκπλυσης πλάκας. Ο συνολικός όγκος που απαιτείται εξαρτάται από τη μέθοδο και το όργανο πλύσης που χρησιμοποιούνται. Περίπου 1 L από αυτό το διάλυμα απαιτείται για την εκκίνηση μιας αυτόματης συσκευής έκπλυσης και την έκπλυση μιας πλάκας μικροπιτλοδότσης, ενώ απαιτούνται περίπου 700 mL για κάθε πλάκα μικροπιτλοδότσης όταν εκτελείται μη αυτόματη έκπλυση.
 - γ. Πρέπει να ετοιμάζεται νέο διάλυμα έκπλυσης πλάκας καθημερινά. Μη φυλάσσετε το διάλυμα έκπλυσης πλάκας.
8. Όταν χρησιμοποιείτε μη αυτόματες μεθόδους, να είστε προσεκτικοί όταν αναστρέψετε την πλάκα μικροπιτλοδότσης για έκχυση ή αποτύπωση. Πιέστε τις πλευρικές προεξοχές του πλάσιου προς τα μέσα για να μην πέσουν οι ταϊνίες.
9. Η έκπλυση της πλάκας μικροπιτλοδότσης εκτελείται καλύτερα με μια αυτόματη συσκευή έκπλυσης πλάκας. Ο εξοπλισμός έκπλυσης πλάκας πρέπει να ρυθμίζεται, να καθαρίζεται και να συντηρείται κατάλληλα. Συνιστώνται οι αυτόματες συσκευές έκπλυσης με 96 υποδοχές. Μπορείτε να χρησιμοποιείτε ψευδοταϊνίες των 8 φρεατίων για να συμπληρώσετε το αχρησιμοποίητο τμήμα της θήκης για αναλύσεις που χρησιμοποιούν πλάκα που δεν έχει γεμίσει ολόκληρη. Γ' αυτόν το σκοπό, κρατήστε και επικολλήστε ετικέτες σε ήδη χρησιμοποιημένες ταϊνίες.
10. Καθορίστε τον όγκο πλήρωσης σε 300 μL/φρεάτιο. Εκκινήστε το όργανο με διάλυμα έκπλυσης πλάκας. Για τις συσκευές έκπλυσης 96 υποδοχών, χρησιμοποιήστε εκπλύσεις 3 κύκλων. Μετά από την αρχική έκπλυση 3 κύκλων, περιστρέψτε την πλάκα κατά 180 μοίρες και επαναλάβετε. Αν χρησιμοποιείται συσκευή έκπλυσης ταϊνιών, εκτελέστε έναν κύκλο έκπλυσης σε ολόκληρη την πλάκα και επαναλάβετε πέντε ακόμη φορές.
11. Μετά από την τελική έκπλυση, αναστρέψτε την πλάκα μικροπιτλοδότσης και τριψίτε την πάνω σε μια απορροφητική επιφάνεια. Βεβαιωθείτε, με οπτικό έλεγχο, ότι όλα τα φρεάτια είναι άδεια.

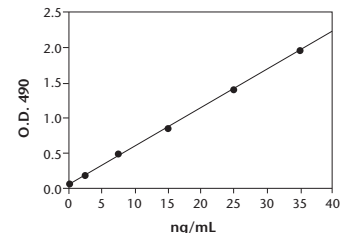
Διαδικασία ανάλυσης

- Αφαιρέστε την πλάκα μικροτιτλοδότησης από τη σακούλα. Από τον αριθμό των δειγμάτων που θα αναλυθούν και τους πολλαπλούς προσδιορισμούς που επιθυμείτε να εκτελεστούν (συνιστώνται οι προσδιορισμοί εις διπλούν), υπολογίστε τον αριθμό των ταινιών που απαιτούνται. (Κάθε πρότυπο διάλυμα χρειάζεται δύο φρεάτια, ενώ απαιτείται ένα φρεάτιο για τον προσδιορισμό τυφλού υποστρώματος.) Φυλάσσετε τις αχρησιμοποίητες ταινίες στη σακούλα με φερμουάρ, με ξηραντικό, στους 2–8°C (δείτε την ενότητα "Σταθερότητα και πληροφορίες φύλαξης").
- Αραιώστε τα δείγματα και τους μάρτυρες σε αναλογία 1:50 (2%) με αραιωτικό δειγμάτων.
- Αναμειξτε τα πρότυπα διαλύματα, τους μάρτυρες και τα δείγματα σχολαστικά και προσθέστε 100 μL στα διπλά φρεάτια. Ετοιμάστε ένα φρεάτιο με 100 μL αραιωτικού δειγμάτων για να χρησιμοποιηθεί ως τυφλό υπόστρωμα. Ετοιμάστε διπλά φρεάτια για καθέναν από τους μάρτυρες.
- Καλύψτε την πλάκα (με περιτύλιγμα τροφίμων ή αυτοκόλλητο πλαστικό κάλυμμα). Επώστε για 3 ώρες στους 37°C.
- Αφαιρέστε προσεκτικά το πλαστικό κάλυμμα και εκπλύντε την πλάκα μικροτιτλοδότησης με διάλυμα έκπλυσης πλάκας.
- Προσθέστε 100 μL αντισώματος-ανιχνευτή σε όλα τα φρεάτια εκτός από το φρεάτιο τυφλού υποστρώματος. Καλύψτε και επώστε στους 37°C για 1 ώρα.
- Κατά την επώση με αντίσωμα-ανιχνευτή, ετοιμάστε το συζυγές εργασίας αραιώνοντας το συμπύκνωμα συζυγούς με αραιωτικό συζυγούς. Συμβουλευτείτε τον Πίνακα 1 για τις ποσότητες που θα χρησιμοποιήσετε με βάση τον αριθμό ταινιών που αναλύονται.
- Εκπλύντε την πλάκα μικροτιτλοδότησης με διάλυμα έκπλυσης πλάκας.
- Προσθέστε 100 μL συζυγούς εργασίας σε όλα τα φρεάτια εκτός από το φρεάτιο τυφλού υποστρώματος. Καλύψτε και επώστε σε θερμοκρασία δωματίου (15–30°C) για 30 λεπτά.
- Κατά την επώση με συζυγές εργασίας, ετοιμάστε το υπόστρωμα εργασίας διαλύοντας δισκία υποστρώματος σε αραιωτικό υποστρώματος. Συμβουλευτείτε τον Πίνακα 1 για τις ποσότητες που θα χρησιμοποιήσετε με βάση τον αριθμό ταινιών που αναλύονται. Αναδεύστε καλά για να διασφαλίσετε πλήρη διάλυση. Μετά την ετοιμασία, το υπόστρωμα εργασίας πρέπει να χρησιμοποιηθεί εντός 30 λεπτών. Αποφύγετε την έκθεση στο φως.
- Εκπλύντε την πλάκα μικροτιτλοδότησης με διάλυμα έκπλυσης πλάκας.
- Προσθέστε 100 μL υποστρώματος εργασίας σε όλα τα φρεάτια, περιλαμβανομένου και του φρεατίου τυφλού υποστρώματος. Καλύψτε με νέο πλαστικό κάλυμμα και επώστε την πλάκα στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου (15–30°C) για 45 λεπτά.
- Προσθέστε 100 μL διαλύματος αναστολής σε κάθε φρεάτιο για να τερματίσετε την αντίδραση.
- Διαβάστε την απορροφητικότητα στα 490 nm εντός 30 λεπτών.

Πίνακας 1. Ανάλυση HER-2/neu—Προετοιμασία των αντιδραστηρίων της ανάλυσης

Αριθμός ταινιών που χρησιμοποιήθηκαν	Συμπύκνωμα συζυγούς	Αραιωτικό συζυγούς	Δισκία υποστρώματος	Αραιωτικό υποστρώματος
1	20 μL	0,98 mL	1	4 mL
2	40 μL	1,96 mL	1	4 mL
3	60 μL	2,94 mL	1	4 mL
4	80 μL	3,92 mL	1	4 mL
5	100 μL	4,90 mL	2	8 mL
6	120 μL	5,88 mL	2	8 mL
7	140 μL	6,86 mL	2	8 mL
8	160 μL	7,84 mL	2	8 mL
9	180 μL	8,82 mL	3	12 mL
10	200 μL	9,80 mL	3	12 mL
11	220 μL	10,78 mL	3	12 mL
12	240 μL	11,76 mL	3	12 mL

Σχήμα 1. Πρότυπη καμπύλη δείγματος



Αξιολόγηση αποτελεσμάτων

Συγκέντρωση πρότυπων διαλυμάτων

Τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση αναγνωρίζουν την εξωκυττάρια, συνδεδεμένη με το συνδεδεμένο πεπτιδίου της πρωτεΐνης HER-2/neu [5]. Αυτή η μορφή της HER-2/neu έχει αναγνωριστεί με μοριακό βάρος περίπου 105 kDa. Τα πρότυπα διαλύματα στο κιτ είναι βαθμονομημένα σε panogram, λαμβάνοντας υπόψη από το μοριακό βάρος που βρίσκεται στον ορό και παρασκευάζονται από μια ανασυνδυασμένη μορφή του τμήματος των 105 kDa της HER-2/neu.

Συγκέντρωση αγνώστων

- Υπολογίστε το μέσο όρο των τιμών της απορροφητικότητας για την αραιώση κάθε πρότυπου διαλύματος, μάρτυρα και δείγματος για να πάρετε τις μέσες τιμές απορροφητικότητας.
- Σε χαρτί γραφικών παραστάσεων, καταγράψτε τη μέση απορροφητικότητα για κάθε πρότυπο διάλυμα στον άξονα y σε σχέση με τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης HER-2/neu (ng/mL) στον άξονα x και ενώστε τα σημεία.
- Προσδιορίστε τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης HER-2/neu για κάθε αραιώση δείγματος με παρεμβολή από την πρότυπη καμπύλη. Υπάρχουν διαθέσιμα πακέτα λογισμικού (π.χ. SoftMax Pro™, Molecular Devices, Sunnyvale, CA USA – KC4™, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT USA) τα οποία μπορούν να απλοποιήσουν τη συγκεκριμένη διαδικασία. Χρησιμοποιήστε ένα δευτεροβάθμιο αλγόριθμο προσαρμογής καμπύλης (πολυωνυμική δεύτερου βαθμού).
- Σημειώστε: μην εκχωρείτε "τυφλά" φρεάτια χρησιμοποιώντας το λογισμικό. Με αυτόν τον τρόπο θα αποβούν οι μέσες τυφλές μετρήσεις από όλα τα άλλα φρεάτια. Είναι χρήσιμο, για λόγους ελέγχου ποιότητας και αντιμετώπισης προβλημάτων, να μπορείτε να επιβεβαιώσετε τις τιμές απορροφητικότητας που αναφέρονται για όλα τα φρεάτια χωρίς τις προσαρμογές που εφαρμόζονται στα μη επεξεργασμένα δεδομένα.
- Τα αποτελέσματα για τα δείγματα εκφράζονται σε panogram ανά mL με απευθείας ανάγνωση από τις τιμές της πρότυπης καμπύλης (ng/mL) όπως αυτές καθορίζονται στα φιαλίδια και στην ενότητα "Παρεχόμενα υλικά" του παρόντος φυλλαδίου. Για λόγους ευκολίας, δεν απαιτείται αριθμητική διόρθωση της αραιώσης για τα αραιωμένα δείγματα 1:50 εφόσον η πραγματική συγκέντρωση στα πρότυπα παρασκευάσματα είναι στο 2% της δόσης που αναγράφεται στην ετικέτα (δηλ. είναι ήδη αραιωμένα σε αναλογία 1:50).

Αραιώσεις δειγμάτων με υψηλές συγκεντρώσεις

- Για τα δείγματα που δίνουν τιμές απορροφητικότητας (OD) οι οποίες ξεπερνούν το εύρος τιμών της πρότυπης καμπύλης, θα χρειαστεί να επακολουθήσει νέα ανάλυση με υψηλότερη αραιώση.
- Για να ετοιμάσετε πρόσθετες αραιώσεις, να ξεκινάτε πάντοτε με αριφή αραιώση 1:50 (δείτε την ενότητα "Προετοιμασία δειγμάτων") και μετά να αραιώνετε διαδοχικά σε αναλογία 1:2 σε αραιωτικό δειγμάτων. Παράδειγμα:

Αραίωση δείγματος	Όγκος προηγούμενης αραιώσης	Όγκος αραιωτικού δειγμάτων
1:100	0,5 mL από 1:50	0,5 mL
1:200	0,5 mL από 1:100	0,5 mL
1:400	0,5 mL από 1:200	0,5 mL

- Αν τα δείγματα που έχουν αραιωθεί περαιτέρω δίνουν τιμές OD < 0,3, θα πρέπει να αναλυθούν πάλι με χρήση λιγότερο αραιωμένου υλικού. Ο διορθωτικός συντελεστής αραιώσης (βλ. Βήμα 4 παρακάτω), όταν πολλαπλασιαστεί με αποτελέσματα τόσο χαμηλών τιμών OD ενδέχεται να προκαλέσει εσφαλμένα υψηλή εκτίμηση της πρωτεΐνης HER-2/neu.

4. Στα αποτελέσματα από περαιτέρω αραιωμένα δείγματα θα χρειαστεί να γίνει διόρθωση των τιμών που λήφθηκαν από την ανάλυση για οποιαδήποτε αραιώση μεγαλύτερη από 1:50. Παράδειγμα:

Αραίωση δείγματος	(πολλαπλασιασμός του αναφερόμενου αποτελέσματος επί)
1:100	2
1:200	4
1:400	8

Έλεγχος ποιότητας ανάλυσης

Συνιστάται κάθε ανάλυση να ικανοποιεί τις ακόλουθες παραμέτρους απόδοσης.

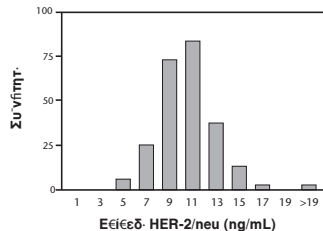
- Εξετάστε τα αποτελέσματα των μαρτύρων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση για να βεβαιωθείτε ότι οι ανακτήσεις βρίσκονται εντός του αναμενόμενου εύρους τιμών (αναφέρεται στο ένθετο του προϊόντος) για κάθε επίπεδο.
- Επιθεωρήστε το δυναμικό εύρος τιμών της πρότυπης καμπύλης. Το πρότυπο διάλυμα επιπέδου 1 πρέπει να βρίσκεται μεταξύ των τιμών 0,04 και 0,09 OD και το πρότυπο διάλυμα επιπέδου 6 πρέπει να βρίσκεται μεταξύ των τιμών 1,5 και 2,4 OD.
- Αν χρησιμοποιείται λογισμικό προσαρμογής καμπύλης, ελέγξτε τον υπολογισμό για το R². Η τιμή αυτή θα πρέπει να είναι μεταξύ 0,997 και 1,0. Αν δεν ικανοποιείται οποιαδήποτε από αυτές τις παραμέτρους, θα πρέπει να εξεταστεί το ενδεχόμενο να επαναληφθεί η δοκιμασία του δείγματος σε επόμενη ανάλυση.

Αναμενόμενες τιμές

Υγιή άτομα

Όπως συμβαίνει με όλες τις δοκιμασίες, κάθε εργαστήριο θα πρέπει να υπολογίσει το δικό του εύρος αναφοράς. Σε πληθυσμό 241 υγιών γυναικών, 95% των τιμών της πρωτεΐνης HER-2/neu στον ορό διαπιστώθηκε ότι ήταν μικρότερες από 13,7 ng/mL. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στις τιμές HER-2/neu μεταξύ προεμμηνοπαισιακών και μετεμμηνοπαισιακών γυναικών. Με βάση τον ίδιο πληθυσμό, το άνω όριο του φυσιολογικού (μέση τιμή + 2SD) ήταν 14,7 ng/mL. Η ανάλυση ROC επιβεβαιώνει ότι η τιμή 15 ng/mL είναι η κατάλληλη τιμή αναφοράς μεταξύ φυσιολογικών και αυξημένων επιπέδων πρωτεΐνης HER-2/neu ορού. Η κατανομή των επιπέδων HER-2/neu ορού για ολόκληρο τον πληθυσμό (n = 241) απεικονίζεται στο Σχήμα 2.

Σχήμα 2. Κατανομή της πρωτεΐνης HER-2/neu ορού σε πληθυσμό υγιών γυναικών.



Παρακολούθηση ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού

Η κλινική χρησιμότητα της ανάλυσης HER-2/neu ELISA στη μακροχρόνια παρακολούθηση ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού αξιολογήθηκε με χρήση αναδρομικών δειγμάτων ορού από ασθενείς με καρκίνο του μαστού τελικού σταδίου, τα οποία κάλυπταν περίοδο 6 έως 12 μηνών, σε τρία κλινικά σημεία στις Ηνωμένες Πολιτείες. Πενήντα έξι ασθενείς που υποβάλλονταν σε θεραπεία και των οποίων τα αρχικά επίπεδα της ογκοπρωτεΐνης HER-2/neu στον ορό ήταν αυξημένα (15 ng/mL ή περισσότερο) αξιολογήθηκαν για να αντιστοιχιστούν οι αλλαγές στα επίπεδα HER-2/neu ορού με τις αλλαγές στην κλινική πορεία της νόσου.

Μία "επίσκεψη προς επίσκεψη" ανάλυση των αποτελεσμάτων της μελέτης παρουσιάζεται στον Πίνακα 2. Οι αλλαγές στα επίπεδα HER-2/neu ορού από τη μία επίσκεψη στην άλλη υπολογίστηκαν για κάθε ασθενή. Οι αλλαγές αυτές χωρίστηκαν σε δύο ομάδες: Η Ομάδα I είχε αλλαγές στη HER-2/neu ορού που εξελίσσονταν παράλληλα προς την κλινική πορεία της νόσου, ενώ η Ομάδα II είχε αλλαγές στα επίπεδα HER-2/neu ορού που δεν εξελίσσονταν παράλληλα προς την κλινική πορεία της νόσου. Η κλινική πορεία ή η κατάσταση προσδιοριζόταν από τον ιατρό. Η αντιστοιχία των αλλαγών της HER-2/neu προς την κλινική

κατάσταση προσδιοριζόταν ως εξής: Αύξηση 20% ή μεγαλύτερη σε σχέση με την προηγούμενη επίσκεψη αντανάκλυσε την πρόοδο της νόσου. Αν η αλλαγή ήταν μικρότερη από αύξηση 20% σε σχέση με την προηγούμενη επίσκεψη, αυτό αντανάκλυσε έλλειψη πρόοδου της νόσου κατά τη θεραπεία (περιλαμβανομένης της απόκρισης στη θεραπεία ή της σταθερής νόσου). Οι ασθενείς που αποκρίθηκαν στη θεραπεία ή είχαν σταθερή κατάσταση της νόσου συγχωνεύθηκαν επειδή και οι δύο κατηγορίες δείχνουν ότι η εφαρμοζόμενη θεραπεία είναι αποτελεσματική. Το κριτήριο 20% προέκυψε από τη μακροχρόνια μεταβλητότητα στους φυσιολογικούς ασθενείς (καθορίστηκε από τα επίπεδα HER-2/neu ορού σε έξι διαδοχικά δείγματα 38 υγιών γυναικών).

Πίνακας 2. Αντιστοιχία κατάστασης νόσου ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού προς τις αλλαγές των επιπέδων HER-2/neu ορού: Επίσκεψη προς επίσκεψη

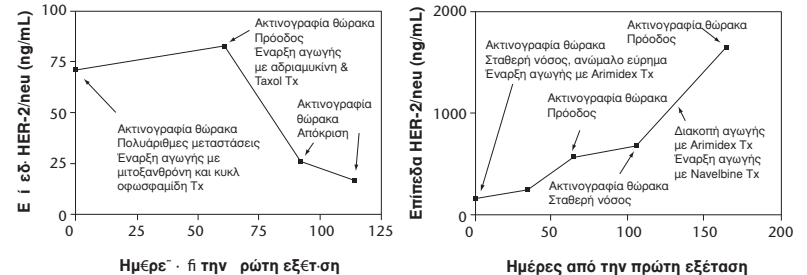
Αλλαγή στην κλινική κατάσταση	Αλλαγή στην HER-2/neu	Πρόοδος	Χωρίς πρόοδο	Σύνολο
≥ 20% αύξηση	52	33	85	
< 20% αύξηση	55	96	151	
Σύνολο	107	129	236	

Συμπτωτικότητα = 62,7% (CI = 56,4 έως 68,6%)

Τιμή πρόβλεψης: Έλλειψη πρόοδου = 63,6% (CI = 55,7 έως 70,8%)

Πρόοδος = 61,2% (CI = 50,6 έως 70,8%)

Στα σχήματα που ακολουθούν παρουσιάζονται τυπικά παραδείγματα αλλαγών στα επίπεδα HER-2/neu ορού με την πάροδο του χρόνου για δύο από τις 56 ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού από την κλινική μελέτη. Το Σχήμα 3 παρουσιάζει μία ασθενή που αποκρίνεται στη θεραπεία και το Σχήμα 4 παρουσιάζει μία ασθενή με προοδευτική εξέλιξη της νόσου.



Σχήμα 3. Παρακολούθηση 38χρονης ασθενούς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού σταδίου IV με την ανάλυση HER-2/neu ELISA. Οι μακροχρόνιες αλλαγές στα επίπεδα HER-2/neu ορού συσχετίζονται με τις αλλαγές στην κατάσταση της νόσου.

Σχήμα 4. Παρακολούθηση 74χρονης ασθενούς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού σταδίου IV με την ανάλυση HER-2/neu ELISA. Οι μακροχρόνιες αλλαγές στα επίπεδα HER-2/neu ορού συσχετίζονται με τις αλλαγές στην κατάσταση της νόσου.

Μη κλινικά χαρακτηριστικά απόδοσης

Ανακρίβεια

Η ανακρίβεια προσδιορίστηκε με τη δοκιμασία τεσσάρων δειγμάτων ελέγχου που αποτελούνταν από τρεις μάρτυρες με βάση ρυθμιστικό διάλυμα και από μία δεξαμενή ανθρώπινου ορού. Σε καθένα από τα τρία διαφορετικά εργαστήρια χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές παρτίδες κιτ. Τριπλοί προσδιορισμοί ανά ανάλυση για κάθε μάρτυρα εκτελέστηκαν σε 130 αναλύσεις. Η εντός της ανάλυσης και η συνολική ακρίβεια υπολογίστηκαν για κάθε μάρτυρα με βάση το πρωτόκολλο NCCLS EP-5A. Η εντός της ανάλυσης ανακρίβεια για τρία σημεία και παρτίδες kit ήταν 10% CV ή λιγότερο, με συνολική ανακρίβεια για όλα τα κιτ και τα σημεία μεταξύ 10 και 17,7% CV.

Δείγμα ελέγχου	Αρ. αναλύσεων	Αρ. αντιγράφων	Μέση τιμή (ng/mL)	
Μάρτυρας 1	130	385	24,5	
Μάρτυρας 2	131	390	9,8	
Μάρτυρας 3	131	386	3,3	
Ορός 4	130	385	9,5	
<u>Ακρίβεια εντός ανάλυσης</u>		<u>Συνολική ακρίβεια</u>		
	Τυπική απόκλιση	Τυπική απόκλιση		
Δείγμα ελέγχου	(Std Dev)	% CV	(Std Dev)	% CV
Μάρτυρας 1	1,46	6,0	2,62	10,7
Μάρτυρας 2	0,69	7,0	1,03	10,4
Μάρτυρας 3	0,34	10,2	0,59	17,7
Ορός 4	0,65	6,9	1,02	10,8

Ευαισθησία

Η ελάχιστη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας προσδιορίστηκε με επανειλημμένη μέτρηση ενός δείγματος μηδενικής δόσης (Αραιωτικό δειγμάτων). Η μέση και η τυπική απόκλιση της φαινόμενης ανάκτησης της HER-2/neu υπολογίστηκαν για 230 προσδιορισμούς σε μια χρονική περίοδο 20 ημερών μεταξύ τριών διαφορετικών παρτίδων kit και τριών διαφορετικών εργασιολογιών. Αφού προστέθηκαν δύο τυπικές αποκλίσεις στη μέση ανάκτηθείσα δόση της HER-2/neu, η ελάχιστη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση βρέθηκε ότι ήταν 1.5 ng της p105/mL ορού.

Αναλυτική ειδικότητα

Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα. Ο υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFr) είναι ένα μόριο που παρουσιάζει στενή συγγένεια με τον υποδοχέα αυξητικού παράγοντα HER-2/neu σε ομολογία 88% με την ενδοκυττάρια περιοχή και σε ομολογία 44% με την εξωκυττάρια περιοχή. Δοκίμασε την ανάλυση HER-2/neu ELISA με EGFr στα 850 ng/mL. Το υλικό αυτό δεν παρήγαγε σήμα στην ανάλυση, γεγονός που σημαίνει ότι τα ανοσοαντιδραστήρια στο διαγνωστικό βοήθημα δεν παράγουν διασταυρωτική αντίδραση με το EGFr.

Παραρροϊκές ουσίες. Το ανθρώπινο αντίσωμα έναντι πρωτεϊνών ποικίλου (HAMA), το οποίο εντοπίζεται σε σπάνιες περιπτώσεις στον ανθρώπινο ορό, έχει τη δυνατότητα να συνδέεται με τα κρίσιμα αντιδραστήρια σε ανοσοαναλύσεις, προκαλώντας ψευδώς θετικά ή αρνητικά σήματα. Διάφορα γνωστά δείγματα ορού θετικά σε HAMA καθώς και δείγματα θετικά σε ρευματοειδή παράγοντα δοκιμάστηκαν στο διαγνωστικό βοήθημα. Δεν παρατηρήθηκε παραγωγή ψευδών σημάτων με αυτά τα δείγματα. Τα αντιδραστήρια του διαγνωστικού βοηθήματος διαμορφώθηκαν με τέτοιον τρόπο ώστε να αποκλείουν αυτού του είδους την ψευδή αντιδραστικότητα.

Οι μετρήσεις HER-2/neu ορού μπορούν να εκτελούνται όταν οι ασθενείς παίρνουν βιταμίνες, φάρμακα που πωλούνται χωρίς συνταγή ή υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία. Για να ελεγχθεί η πιθανότητα να παρεμποδίζουν αυτοί οι παράγοντες τον ακριβή προσδιορισμό της HER-2/neu, ενδεχόμενες εξωγενείς παρεμποδίζουσες ουσίες τιτλοδοτήθηκαν σε θετικό ορό ελέγχου με γνωστή συγκέντρωση HER-2/neu και κατόπιν δοκιμάστηκαν στην ανάλυση. Ελεγχθηκαν επίσης ορισμένα κοινά συστατικά του ορού ως προς τη δυνατότητα που έχουν να δρουν ως ενδογενείς παρεμποδίζουσες ουσίες. Κανένα από τα συστατικά που δοκιμάστηκαν δεν επέδρασε στην ανάκτηση της αναλυόμενης ουσίας. Βλ. Πίνακα 3.

Αναλυτικό εύρος τιμών

Η ανάλυση HER-2/neu ELISA έχει τη δυνατότητα ακριβούς ποσοτικοποίησης των επιπέδων HER-2/neu ορού σε προαραιωμένα δείγματα, με αποτέλεσμα να παρατηρείται απόκλιση της ανάλυσης στο εύρος 1,5 έως 35 ng της πρωτεΐνης p105 HER-2/neu ανά mL ορού. Δείγματα τα οποία παράγουν σήμα που υπερβαίνει το άνω όριο του εύρους τιμών της πρότυπης καμπύλης (35 ng/mL) πρέπει να αραιωθούν περαιτέρω με αραιωτικό δειγμάτων και να αναλυθούν πάλι. Βεβαιωθείτε ότι έχετε διορθώσει την αναφερόμενη ανάκτηση της πρωτεΐνης HER-2/neu για αραιώσεις που είναι μεγαλύτερες από τη συνήθη αραιώση 1:50.

Πίνακας 3. Ενδεχόμενες παρεμποδίζουσες ουσίες για την ELISA

Ενδεχόμενες παρεμποδίζουσες ουσίες	Συγκεντρώσεις δοκιμασίας	Ενδεχόμενες παρεμποδίζουσες ουσίες	Συγκεντρώσεις δοκιμασίας
ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ			
Τριγλυκερίδια (intralipin-20%)	3000,0 mg/dL	Ακεταμινοφαίνη	200,0 µg/mL
Λιμοσφαίρινη	1,0 g/dL	Ασπιρίνη	500,0 µg/mL
Ανοσοσφαιρίνη (γάμμα σφαιρίνη)	6,0 g/dL	Ιβουπροφένη	400,0 µg/mL
Λευκωματίνη	6,5 g/dL	Καφεΐνη	100,0 µg/mL
Χολερυθρίνη	25,0 mg/dL		
Ηπαρίνη	0,46 mg/mL	ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	
ΕΞΩΓΕΝΕΙΣ			
Βιταμίνη A trans οξική ρετινόλη	10,0 IU/mL	Αμινογλουτεθαμίδη	398,0 µg/mL
Βιταμίνη B1 θειαμίνη	3,0 µg/mL	Βλεομικίνη	0,16 U/mL
Βιταμίνη B2 ριβοφλαβίνη	3,4 µg/mL	Σισπλατίνη	173,0 µg/mL
Βιταμίνη B6 HCL πυροξείδιο	4,0 µg/mL	Δοξορουβικίνη	51,8 µg/mL
Βιταμίνη B12	12,0 ng/mL	Κυκλοφωσφαμίδη	800,0 µg/mL
Βιταμίνη C ασκορβικό οξύ	30,0 µg/mL	Διαιβηλοστιλβιστερόλη	23,0 µg/mL
Βιταμίνη D2 εργοκαλιφερόλη	0,8 IU/mL	Εστραμουστίνη	102,2 µg/mL
Βιταμίνη E οξική τοκοφερόλη	0,06 IU/mL	Φλουταμίδη	10,0 µg/mL
Φυλλικό οξύ	0,8 µg/mL	5-Φθοριουρακίλη	1600,0 µg/mL
Νιασίνη	40,0 µg/mL	Lurron	15,0 µg/mL
		Μεθοτρεξάτη	450,0 µg/mL
		Μιτοξαντρόνη	56,0 µg/mL
		Μιτομυκίνη C	73,0 µg/mL
		Megace	27,0 ng/mL
		Ταιμοξifenίνη	1,4 µg/mL
		Βινκιστίνη	4,88 µg/mL
		Βινβλαστίνη	16,3 µg/mL
		Εροσπίτη	
		(Τραστοζουμάμπη)	500 µg/mL

Περιορισμοί της διαδικασίας

Κατά την εκτέλεση των βημάτων στις μη αυτόματες ανοσοαναλύσεις, υπάρχει το ενδεχόμενο εσφαλμένης μέτρησης (ανάκτηση δείγματος) λόγω των διαφορετικών χρόνων επώασης στην οποία υποβάλλονται τα δείγματα σε κάθε βήμα επώασης. Όλα τα φρεάτια πρέπει να υποβάλλονται ουσιαστικά στην ίδια διάρκεια επώασης που απαιτείται για κάθε βήμα αντιδραστήριου. Πιο συγκεκριμένα, κατά την προσθήκη προτύπων διαλυμάτων, μαρτύρων και δειγμάτων σε φρεάτια στην πλάκα, ο χρόνος μεταξύ της προσθήκης του πρώτου και του τελευταίου δείγματος πρέπει να είναι, το πολύ, 15 λεπτά. Ετοιμάστε όλα τα δείγματα προκαταβολικά. Η χρήση ημιαυτόματων πιπετόρων με πολλαπλά ρύχνη συστήματα με έμφαση για να συντομευθούν οι χρόνοι αυτών των διαδικασιών. Για να αποφευχθεί η διασταυρούμενη επιμόλυνση, βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε νέα ρύχνη για κάθε νέα προσθήκη δείγματος.

Οι ανοσοαναλύσεις που χρησιμοποιούν τις λεγόμενες διαμορφώσιμες σάντουιτς, όπως είναι το παρόν διαγνωστικό βοήθημα, υπόκεινται σε παρεμπόδιση και εμφανίζουν ψευδή αποτελέσματα τα οποία οφείλονται σε δείγματα που περιέχουν ανοσοαντιδραστικούς παράγοντες έναντι των αντισωμάτων ποικίλου. Το ΗΑΜΑ, το ετεροφιλικό αντίσωμα και ο ρευματοειδής παράγοντας είναι τα κύρια παραδείγματα παρεμποδίζουσων ουσιών. Έχουν ληφθεί προφυλικά μέτρα από την παρασκευάστρια εταιρεία κατά τη διαμόρφωση των αντιδραστηρίων που περιέχονται στο παρόν διαγνωστικό βοήθημα ώστε να ελαχιστοποιηθεί ή να εξαλειφθεί αυτή η παρεμπόδιση. Πάντως, θα πρέπει να δοθεί προσοχή κατά την αξιολόγηση αποτελεσμάτων της ανάλυσης που ενδέχεται να μην είναι συνεπή προς τη γενική κλινική κατάσταση της ασθενούς, λαμβάνοντας υπόψη την ενδεχόμενη παρεμπόδιση.

Είναι πιθανό μια ασθενής με επιβεβαιωμένο καρκίνο μαστού να έχει επίπεδα πρωτεΐνης HER-2/neu ορού εντός του εύρους τιμών που παρατηρούνται στα υγιή άτομα. Να είστε προσεκτικοί κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της HER-2/neu. Τα επίπεδα HER-2/neu ορού μπορεί να μη δηλώνουν πάντοτε την παρουσία ή την απουσία κακοήθους νόσου. Η τιμή της HER-2/neu πρέπει να χρησιμοποιείται ως τμήμα μιας συνολικής κλινικής αξιολόγησης που περιλαμβάνει πρόσθετη κλινική αξιολόγηση και διαγνωστικές δοκιμασίες.

Αντιμετώπιση προβλημάτων

- A. Κάθε ανάλυση πρέπει να περιλαμβάνει τα έξι (6) πρότυπα διαλύματα σε διπλή δοκιμασία με χρήση του πρωτοκόλλου που περιγράφεται στην ενότητα "Λεπτομερές πρωτόκολλο". Χρόνοι ή θερμοκρασίες επώασης που διαφέρουν σημαντικά από τις καθορισμένες αντίστοιχες τιμές μπορεί να προκαλέσουν εσφαλμένα αποτελέσματα.
- B. Η μορφή της πρότυπης καμπύλης είναι μη γραμμική και ποικίλλει ελαφρώς από ανάλυση σε ανάλυση. Για αναγωγή δεδομένων με το χέρι, δημιουργήστε τη γραφική παράσταση σημείο προς σημείο. Αν χρησιμοποιείτε λογισμικό ELISA, χρησιμοποιήστε ένα δευτεροβάθμιο αλγόριθμο προσαρμογής καμπύλης (πολυωνυμική δεύτερου βαθμού).
- Γ. Τα ανεπαρκή αντίγραφα, αν συνοδεύονται από αυξημένες τιμές για το μηδενικό πρότυπο, δείχνουν ανεπαρκή έκπλυση. Αν έχετε εφευρέσει με ακρίβεια όλες τις οδηγίες που αναφέρονται στην ενότητα "Λεπτομερές πρωτόκολλο", τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η συσκευή έκπλυσης χρειάζεται συντήρηση. Επίσης, αποφύγετε τη δημιουργία φυσαλίδων στα φρεάτια κατά την αναρρόφηση δείγμάτων και αντιδραστηρίων με πιπέτα.
- Δ. Το φρεάτιο τυφλού υποστρώματος πρέπει να δίνει 0,05 μονάδες απορροφητικότητας ή λιγότερο. Πιθανή αιτία υψηλότερων τιμών είναι η έκθεση του υποστρώματος εργασίας στο φως πριν ή κατά τη διάρκεια του βήματος επώασης. Το υπόστρωμα εργασίας πρέπει να χρησιμοποιηθεί εντός 30 λεπτών από την ώρα που θα παρασκευαστεί.
- Ε. Το χαμηλό σήμα μπορεί να σημαίνει ότι 1) η πλάκα έχει ξηρανθεί μεταξύ των βημάτων. Μην αφήνετε την πλάκα να ξηρανθεί. Προσθέστε το επόμενο αντιδραστήριο αμέσως μετά την έκπλυση, ή 2) έχει εκτελεστεί ακατάλληλη έκπλυση. Βεβαιωθείτε ότι η συσκευή έκπλυσης της πλάκας μικροτιτλοδότησης έχει ενεργοποιηθεί κατάλληλα με διάλυμα έκπλυσης πλάκας (δείτε την ενότητα "Λεπτομερές πρωτόκολλο").

Σταθερότητα και πληροφορίες φύλαξης

Όλα τα αντιδραστήρια που περιλαμβάνονται στην HER-2/neu ELISA έχουν ελεγχθεί για σταθερότητα. Τα αντιδραστήρια δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται όταν έχει παρέλθει η ημερομηνία λήξης τους. Τα αντιδραστήρια του κιτ πρέπει να φυλάσσονται στους 2–8°C, εκτός από το συμπύκνωμα έκπλυσης της πλάκας, το οποίο μπορεί να φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου. Οι πλάκες της ανάλυσης πρέπει να φυλάσσονται σφραγισμένες στην αρχική συσκευασία μαζί με το ξηραντικό. Αφού ανοιχτεί, το διαγνωστικό βοήθημα θα λειτουργεί εντός των προδιαγραφών για διάστημα 4 εβδομάδων (30 ημερών) εφόσον δεν έχει παρέλθει η ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα.

Τεχνική Υποστήριξη

Τηλ.: +1 617 492 3900 x502

e-mail: oncogenetech@wilex.com



WILEX Inc.
Cambridge, MA 02140 USA



EMERGO EUROPE

Molenstraat 15
2513 BH, The Hague
The Netherlands
Tel: +31 (0)70 345 8570
Fax: +31 (0)70 346 7299

References

1. Coussens L, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 1985;230:1132–1139.
2. Brandt-Rauf P, Pincus MR, Carney WP. The c-erbB-2 protein in oncogenesis: Molecular structure to molecular epidemiology. *Critical Reviews in Oncogenesis* 1994;5(2&3):313–329.
3. Zabrecky JR, et al. The extracellular domain of p185/neu is released from the surface of human breast carcinoma cells, SK-BR-3. *Journal of Biological Chemistry* 1991;266(3):1716–1720.
4. Carney WP, et al. Detection and quantitation of the human neu oncoprotein. *Journal of Tumor Marker Oncology* 1996;(2):53–72.
5. McKenzie SJ, et al. Generation and characterization of monoclonal antibodies specific for the human neu oncogene product, p185. *Oncogene* 1989;4:543–548.
6. Andersen TI, et al. Detection of c-erbB-2 related protein in sera from breast cancer patients. Relationship to erbB-2 gene amplification and c-erbB-2 protein. *Acta Oncologica* 1995;34(4):499–504.
7. Watanabe N, et al. Serum c-erbB-2 in breast cancer patients. *Acta Oncologica* 1994;33(8):901–904.
8. Molina R, et al. c-erbB-2 oncoprotein in the sera and tissue of patients with breast cancer. Utility in prognosis. *Anticancer Research* 1996;16(4B):2295–2300.
9. Molina R, et al. Utility of c-erbB-2 in tissue and in serum in the early diagnosis of recurrence in breast cancer patients: Comparison with carcinoembryonic antigen and CA 15.3. *British Journal of Cancer* 1996;74:1126–1131.
10. Molina R, et al. c-erbB-2 oncoprotein, CEA, and CA 15-3 in patients with breast cancer. *Breast Cancer Research & Treatment* 1998;51:109–119.
11. Fehm T, et al. The prognostic significance of c-erbB-2 serum protein in metastatic breast cancer. *Oncology* 1998;55:33–38.
12. Isola JJ, et al. Elevated erbB-2 oncoprotein levels in preoperative and follow-up serum samples define an aggressive disease course in patients with breast cancer. *Cancer* 1994;73(3):652–658.
13. Leitzel K, et al. Elevated serum c-erbB-2 antigen levels and decreased response to hormone therapy of breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 1995;13(5):1129–1135.
14. Hayes DF, et al. Elevated circulating c-neu oncogene product in patients with breast cancer. Abstract presented at the 12th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium, 1989. (December 8–9, 1989.)
15. Kath R, et al. The neu-oncogene product in serum and tissue of patients with breast carcinoma. *Annals of Oncology* 1993;4:585–590.
16. Yamauchi H, et al. Prediction of response to anti-estrogen therapy in advanced breast cancer patients by pre-treatment circulating levels of extracellular domain of the HER-2/neu protein. *Journal of Clinical Oncology* 1997;15(7):2518–2525.
17. Mercer DW, et al. HER-2/neu oncoprotein monitoring in sera of patients with breast cancer. *Clinical Chemistry*, Abstract #846, 1995;41(S6, part 2):S226.
18. Kandl H, et al. Soluble c-erbB-2 fragment in serum correlates with disease stage and predicts shortened survival in patients with early-stage and advanced breast cancer. *British Journal of Cancer* 1994;70(4):739–742.
19. Narita T, et al. c-erbB-2 protein in the sera of breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment* 1992;24:97–102.
20. Dia J, et al. Clinical utility of an automated serum HER-2/neu assay in monitoring patients with metastatic breast cancer. *Amer Assoc Clin Chem* 1998. Abstract #208.
21. Krainer M, et al. Tissue expression and serum levels of HER-2/neu in patients with breast cancer. *Oncology*, 1997;54:475–481.
22. Kynast B, et al. Determination of a fragment of the serum c-erbB-2 translational protein p185 in serum of breast cancer patients. *J. Cancer Res Clin Oncol* 1993;119:249–252.
23. Takaaski H, et al. Clinical significance of serum c-erbB-2 protein in patients with primary breast cancer. *Oncology Reports* 1997;4(2):349–352.
24. Klein B, et al. Soluble c-erbB-2 (p185) in breast cancer patients in relation to prognosis. *Oncology Reports* 1995;2(5):759–761.
25. Imoto S, et al. Serum c-erbB-2 levels in monitoring of operable breast cancer patients. *Jpn J Clin Oncol* 1999;29(7):336–339.
26. Willsher PC, et al. Prognostic significance of serum c-erbB-2 protein in breast cancer patients. *Breast Cancer Research & Treatment* 1996;40:251–255.
27. Titus K. Another ingredient added to HER-2 mix. *CAP Today*, Nov 1999.
28. Brandt-Rauf P, et al. Detection of increased amounts of the extracellular domain of the c-erbB-2 oncoprotein in serum during pulmonary carcinogenesis in humans. *Int Journal Cancer* 1994;56:383–386.
29. Myers RB, et al. Elevated serum levels of p105 erbB-2 in patients with advanced stage prostatic adenocarcinoma. *Int Journal Cancer* 1996;69(5):398–402.
30. Okada N, et al. Elevated serum c-erbB-2 protein levels in patients with pancreatic cancer: Correlation to metastasis and shorter survival. *Oncology* 1995;52:392–396.
31. Wu JT, Astill ME, Zhang P. Detection of the extracellular domain of c-erbB-2 oncoprotein in sera from patients with various carcinomas: Correlation with tumor markers. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 1993;7:31–40.
32. Chariyalertsak S, et al. Comparison of c-erbB-2 oncoprotein expression in tissue and serum of patients with stomach cancer. *Tumor Biol* 1994;15:294–303.
33. Meden H, et al. Prognostic significance of p105 (c-erbB-2, HER-2/neu) serum levels in patients with ovarian cancer. *Anti Cancer Research* 1997;17:757–760.
34. Luo J-C, et al. Serum c-erbB-2 oncoprotein in hepatocellular carcinogenesis. *Medical Science Research* 1993;21:305–307.

Bezpieczne stosowanie i ostrzeżenia



Produkt szkodliwy!

R22 – Działa szkodliwie po połknięciu.

S28 – Zanieczyszczoną skórę natychmiast przemyć dużą ilością wody.

Zawiera azydek sodu

(Wzorce, rozcieńczalnik do próbki, przeciwciało detekcyjne)

Produkt szkodliwy!

R40 – Możliwe ryzyko powstania nieodwracalnych zmian w stanie zdrowia człowieka.

R43 – Może powodować uczulenie w kontakcie ze skórą.

S36/S37 – Nosić odpowiednią odzież ochronną i odpowiednie rękawice ochronne.

Zawiera dichlorowodorek o-fenylenidiaminy

(Substrat w tabletkach)

Produkt drażniący!

R36/38 – Działa drażniąco na oczy i skórę.

S36/37/39 – Nosić odpowiednią odzież ochronną, rękawice i okulary lub osłonę twarzy.

S26 – Zanieczyszczone oczy przemyć natychmiast dużą ilością wody i zasięgnąć porady lekarza.

Zawiera kwas siarkowy

(Roztwór zatrzymujący reakcje)

Produkt drażniący!

R43 – Może powodować uczulenie w kontakcie ze skórą.

S24 – Unikać zanieczyszczenia skóry.

S37 – Nosić odpowiednie rękawice ochronne.

Zawiera chloroacetamid

(Rozcieńczalnik do koniugatu i koncentrat koniugatu)

Turvallisuus- ja varoituslausekkeet



Haitallinen!

R22 – Terveydelle haitallista nieltynä.

S28 – Roiskeet iholta huuhdeltava välittömästi runsaalla vesimäärällä.

Sisältää natriumatsidia

(Standardit, näytelaimenne, tunnistinvasta-aine)

Haitallinen!

R40 – Pysyvien vaurioiden vaara.

R43 – Ihokosketus voi aiheuttaa herkistymistä.

S36/37 – Käytettävä sopivaa suojavaatetusta ja suojakäsineitä.

Sisältää o-fenylenidiamiini-dihydrokloridia

(Substraattitabletit)

Ärsyttävä!

R36/38 – Ärsyttää silmiä ja ihoa.

S36/37/39 – Käytettävä sopivaa suojavaatetusta, suojakäsineitä ja silmien- tai kasvosuojainta.

S26 – Roiskeet silmistä huuhdeltava välittömästi runsaalla vedellä ja mentävä lääkäriin.

Sisältää rikkihappoa

(Pysäytysliuos)

Ärsyttävä!

R43 – Ihokosketus voi aiheuttaa herkistymistä.

S24 – Varottava kemikaalin joutumista iholle.

S37 – Käytettävä sopivia suojakäsineitä.

Sisältää klooriasetamidia

(Konjuogitu laimenne ja konjuogitu konsentraatti)

Explanation of Symbols

Explication des symboles

Erklärung der Symbole

Spiegazione dei simboli

Explicación de símbolos

Explicação dos símbolos

Symbolforklaring

Symbolförklaring

Επεξήγηση των συμβόλων

IVD

En: In vitro diagnostic device

Fr: Système diagnostique In vitro

De: Gerät für die In-vitro-Diagnose

It: Dispositivo per diagnostica in vitro

Es: Dispositivo para diagnóstico in vitro

Pt: Dispositivo para diagnóstico in vitro

Da: In vitro-diagnostisk enhed

Sv: Endast avsett för in vitro-diagnostik

El: In Vitro διαγνωστικό βιόθημα

REF

En: Catalog Number

Fr: Numéro de référence catalogue

De: Katalog-Nummer

It: Numero catalogo

Es: Número de referencia

Pt: Número de catálogo

Da: Kategorinummer

Sv: Katalognummer

El: Αριθμός καταλόγου



En: Manufacturer

Fr: Fabricant

De: Hersteller

It: Produttore

Es: Fabricante

Pt: Fabricante

Da: Producent

Sv: Tillverkare

El: Κατασκευαστής

EC REP

En: Authorized Representative

Fr: Représentant agréé

De: Autorisierter Vertreter

It: Rappresentante autorizzato

Es: Representante autorizado

Pt: Representante autorizado

Da: Autoriseret repræsentant

Sv: Auktoriserad representant

El: Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος



En: CE Mark

Fr: Marquage CE

De: CE-Kennzeichen

It: Marchio CE

Es: Símbolo de la CE

Pt: Marca CE

Da: CE-mærke

Sv: CE-märke

El: Σήμα CE



En: Temperature limitation (2°–8°C)

Fr: Limites de température (2°–8°C)

De: Temperaturgrenze (2 bis 8°C)

It: Limiti di temperatura (2°–8°C)

Es: Limitación de la temperatura (2°C–8°C)

Pt: Limites de temperatura (2°C–8°C)

Da: Temperaturbegrænsning (2°–8°C)

Sv: Förvaringstemperatur (2°–8°C)

El: Περιορισμός θερμοκρασίας (2°–8°C)



En: Temperature limitation (15°–27°C)

Fr: Limites de température (15°–27°C)

De: Temperaturgrenze (15 bis 27°C)

It: Limiti di temperatura (15°–27°C)

Es: Limitación de la temperatura (15°C–27°C)

Pt: Limites de temperatura (15°C–27°C)

Da: Temperaturbegrænsning (15°–27°C)

Sv: Förvaringstemperatur (15°–27°C)

El: Περιορισμός θερμοκρασίας (15°–27°C)

LOT

En: Batch code

Fr: Numéro de code du lot

De: Chargenbezeichnung

It: Codice lotto

Es: Código de lote

Pt: Código de lote

Da: Batchkode

Sv: Tillverkningskod

El: Κωδικός παρτίδας



En: Use by

Fr: Utiliser avant

De: Verwendbar bis

It: Usare entro

Es: Fecha de caducidad

Pt: Use até

Da: Brug af

Sv: Utgångsdatum

El: Χρήση έως



En: Microtiter Plate: 96 well plate pre-coated with monoclonal antibody. Serves as solid-phase capture surface for assay reaction steps.

Fr: Plaque de microtitration : plaque à 96 puits pré-enrobée d'anticorps monoclonal. Sert de surface de capture en phase solide pour les étapes de réaction du dosage.

De: Mikrotiterplatte: Platte mit 96 Testmulden, vorbeschichtet mit monoklonalem Antikörper. Dient als Festphasen- Capture-Fläche für die Reaktionsschritte des Tests.

It: Piastra di microtitolazione; piastra a 96 pozzetti pre- rivestita con anticorpo monoclonale. Serve come superficie di cattura in fase solida nelle fasi di reazione dei dosaggi.

Es: Placa de microtitulación : placa de 96 pocillos revestidos previamente con anticuerpo monoclonal. Se utiliza como superficie de captura de la fase sólida en los pasos reactivos del ensayo.

Pt: Placa de microtitulação: Placa de 96 poços previamente revestidos com anticorpo monoclonal. Serve como superfície de captura de fase sólida para os passos de reacção do ensaio.

Da: Mikrotiterplade: Plade med 96 brønde, der allerede er coatede med monoklonalt antistof. Fungerer som fastfaset captureoverflade til analysereaktionens trin.

Sv: Mikrotiterplatta: 96-brunnarsplatta överdragen med monoklonal antikropp. Fungerar som infångningsyta i fast fas (solid phase) i analysreaktionssteg.

El: Πλάκα μικροτιτλοδότησης: Πλάκα 96 φρεατίων προεπιτρωμένη με μονοκλωνικό αντίσωμα. Χρησιμοποιείται ως επιφάνεια σύλληψης στερεάς φάσης για τα βήματα αντίδρασης της ανάλυσης.

DILSPE

En: Sample Diluent: Reagent used to dilute specimens prior to assay.

Fr: Diluant d'échantillons : réactif utilisé pour diluer des spécimens avant le dosage.

De: Proben-Diluent: Reagenz zur Verdünnung der Proben vor dem Test.

It: Diluente campione: reagente utilizzato per diluire i campioni prima del dosaggio.

Es: Diluyente de muestras: reactivo usado para diluir especímenes antes del ensayo.

Pt: Diluente de amostras: Reagente utilizado para diluir amostras antes da realização do ensaio.

Da: Prøvediluent: Reagens der anvendes til at fortynde prøver før analysen.

Sv: Provsädningsmedel: Reagens som används för att späda prover före analys.

El: Αραιωτικό δειγμάτων: Αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται για την αραιώση δειγμάτων πριν από την ανάλυση.

STD 1-6

En: Standard 1-6: Six standards contain HER-2/neu in a dose range from 0 to 35 ng/mL in neutral buffer. Standards are used to calibrate each assay and determine levels of HER-2/neu in samples.

Fr: Standard 1-6 : six standards contenant de la protéine HER-2/neu dans une limite expérimentale comprise entre 0 et 35 ng/mL dans une solution tampon neutre. Les standards sont utilisés pour calibrer chaque dosage et déterminer les niveaux de HER-2/neu dans les échantillons.

De: Standard 1-6: Sechs Standards mit HER-2/neu in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 35 ng/mL in neutralem Puffer. Standards werden zur Kalibration jeden Tests und zur Bestimmung der HER-2/neu Konzentrationen in den Proben verwendet.

It: Standard 1-6: sei standard contengono HER-2/neu in un range di dosi da 0 a 35 ng/mL in soluzione tampone neutra. Gli standard sono utilizzati per calibrare ciascun dosaggio e determinare i livelli di HER-2/neu nei campioni.

Es: Estándar 1-6: seis estándares que contienen una dosis de HER-2/neu dentro del rango de 0 a 35 ng/mL en tampón neutro. Los estándares se usan para calibrar cada ensayo y para determinar los niveles de HER-2/neu en las muestras.

Pt: Padrões 1-6: Os seis padrões contêm HER-2/neu num intervalo de dosagem de 0 a 35 ng/mL, em tampão neutro. Os padrões são utilizados para calibrar cada ensaio e determinar os níveis de HER-2/neu nas amostras.

Da: Standard 1-6: Der er 6 standarder, som indeholder HER-2/neu i et dosisinterval fra 0 til 35 ng/mL i neutral buffer. Standarder benyttes til at kalibrere hver analyse og fastslå niveauerne af HER-2/neu i prøver.

Sv: Standard 1-6: Sex standarder innehåller HER-2/neu i doseringsintervall från 0 till 35 ng/mL i neutral buffert. Standarder används för att kalibrera varje analys och fastställa nivåer av HER-2/neu i prover.

El: Πρότυπο διάλυμα 1-6: Εξι πρότυπα διαλύματα περιέχουν HER-2/neu σε ένα εύρος δόσεων από 0 έως 35 ng/mL σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα. Τα πρότυπα διαλύματα χρησιμοποιούνται για τη βαθμονόμηση κάθε ανάλυσης και τον καθορισμό των επιπέδων HER-2/neu στα δείγματα.

DETab

- En: Detector Antibody: Mouse monoclonal antibody conjugated to biotin.
- Fr: Anticorps de détection : anticorps monoclonal de souris conjugué à de la biotine.
- De: Detektor-Antikörper: Monoklonaler Maus-Antikörper, konjugiert an Biotin.
- It: Anticorpo di rilevamento: anticorpo monoclonale murino coniugato alla biotina.
- Es: Anticuerpo de detección: anticuerpo monoclonal de ratón conjugado con biotina.
- Pt: Anticorpo detector: Anticorpo monoclonal de rato conjugado com biotina.
- Da: Detektorantistof: Monoklonalt antistof fra mus konjugeret til biotin.
- Sv: Detekterande antikropp: Musmonoklonal antikropp konjugerat till biotin.
- El: Αντισώμα-ανιχνευτής: Μονοκλωνικό αντισώμα ποντικού συζευγμένο με βιοτίνη.

CONJ 50x

- En: Conjugate Concentrate: Streptavidin-horse radish peroxidase at 50-fold concentration.
- Fr: Concentré de conjugué : streptavidine-peroxydase de raifort à une concentration 50 fois supérieure.
- De: Meerrettich-Konzentrat: Streptavidin-Meerrettichperoxidase in 50-facher Konzentration.
- It: Concentrato coniugato: streptavidina-perossidasi del rafano a una concentrazione di 50 volte.
- Es: Concentrado conjugado: estreptavidina-peroxidasa de rábano rusticano con una concentración 50 veces mayor.
- Pt: Concentrado de conjugado: Estreptavidina/peroxidase de amorácia numa concentração de 50 vezes.
- Da: Konjugatkoncentrat: Streptavidin-peberrodspoxidase ved 50X koncentration.
- Sv: Konjugatkoncentrat: Streptavidin/pepparrotspoxidase med 50-faldig koncentration.
- El: Συμπύκνωμα συζυγούς: Στρεπταβιδίνη-HRP σε 50πλάσια συγκέντρωση.

DILCONJ

- En: Conjugate Diluent: Neutral buffer used to dilute Conjugate Concentrate from 50X to 1X working concentration.
- Fr: Diluant de conjugué : solution tampon neutre utilisée pour diluer du concentré de conjugué à une concentration de travail de 50X à 1X.
- De: Konjugat-Diluent: Neutraler Puffer zur Verdünnung des Konjugat-Konzentrats von 50X auf Arbeitskonzentration 1X.

- It: Diluente coniugato: soluzione tampone neutra utilizzata per diluire concentrato coniugato da 50 volte a 1 volta la concentrazione di lavoro.
- Es: Diluyente conjugado: tampón neutro utilizado para diluir concentrado conjugado de la concentración de trabajo de 50X a 1X.
- Pt: Diluente de conjugado: Tampão neutro utilizado para diluir o concentrado de conjugado, alterando uma concentração de 50X para uma concentração de trabalho de 1X.
- Da: Konjugatdiluent: Neutral buffer der bruges til at fortynde konjugatkoncentrat fra 50X til 1X arbejdskoncentrationen.
- Sv: Konjugatspädningsmedel: Neutral buffert som används för att späda konjugatkoncentrat från 50X till 1X arbetskoncentration.
- El: Αραιωτικό συζυγούς: Ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται για την αραίωση του συμπυκνώματος συζυγούς από συγκέντρωση εργασίας 50X σε 1X.

SUBS

- En: Substrate: Tablets containing 2 mg each of ortho-phenylenediamine.
- Fr: Substrat : tablettes contenant 2 mg chacune d'ortho-phénylènediamine.
- De: Substrat: Tabletten mit je 2 mg ortho-Phenylendiamin.
- It: Substrato: compresse contenenti 2 mg ciascuna di orto-fenilendiamina.
- Es: Sustrato: pastillas con un contenido de 2 mg de ortofenilendiamina cada una.
- Pt: Substrato: Comprimidos contendo 2 mg de orto-fenilendiamina.
- Da: Substrat: Tabletter, der hver indeholder 2 mg ortho-fenylendiamin.
- Sv: Substrat: Tabletter som vardera innehåller 2 mg orto-fenylendiamin.
- El: Υπόστρωμα: Δισκία που περιέχουν 2 mg ορθο-φαιλυλενοδιαμίνης το καθένα.

DILSUBS

- En: Substrate Diluent: Buffer used to dissolve Substrate Tablets.
- Fr: Diluant de substrat : solution tampon utilisée pour dissoudre les tablettes de substrat.
- De: Substrat-Diluent: Puffer zum Auflösen der Substrat-Tabletten.
- It: Diluente substrato: soluzione tampone utilizzata per disciogliere compresse di substrato.
- Es: Diluyente de sustrato: tampón usado para disolver pastillas de sustrato.
- Pt: Diluente de substrato: Tampão utilizado para dissolver comprimidos de substrato.
- Da: Substratdiluent: Buffer, der bruges til at opløse substrattabletter.

- Sv: Substratspänningsmedel: Buffert som används för att lösa substrattabletter.
- El: Αραιωτικό υποστρώματος: Ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται για την αραίωση δισκίων υποστρώματος.

WASHBUF 20x

- En: Platewash Concentrate: Solution used to wash microtiter plate between steps. Dilute to 1X working concentration prior to use.
- Fr: Concentré de lavage de plaque : solution utilisée pour laver la plaque de microtitration entre les différentes étapes. Diluer à une concentration de travail 1X avant utilisation.
- De: Plattenwaschkonzentrat. Lösung von Waschen der Mikrotiterplatte zwischen den einzelnen Schritten. Vor Gebrauch auf Arbeitskonzentration 1X verdünnen.
- It: Concentrato di lavaggio piastre: soluzione utilizzata per lavare la piastra di microtitolazione tra le fasi. Diluire a 1 volta la concentrazione di lavoro prima dell'utilizzo.
- Es: Concentrado de lavado de placas: solución usada para lavar la placa de microtitulación entre un paso y otro. Diluir la concentración de trabajo a 1X antes de utilizarla.
- Pt: Concentrado de lavagem da placa: Solução utilizada para lavar a placa de microtitulação entre os vários passos. Dilua para uma concentração de trabalho de 1X antes de utilizar.
- Da: Pladevaskkoncentrat: Opløsning der bruges til at vaske mikrotiterplader mellem hvert trin. Fortynd til 1X arbejdskoncentrationen før brug.
- Sv: Plattvättkoncentrat: Lösning som används för att tvätta mikrotiterplattan mellan stegen. Späd till 1X arbetskoncentration före användning.
- El: Συμπύκνωμα έκπλυσης πλάκας: Διάλυμα που χρησιμοποιείται για την έκπλυση της πλάκας μικροτιτλοδότησης μεταξύ βημάτων. Αραιώστε σε συγκέντρωση εργασίας 1X πριν από τη χρήση.

STOP

- En: Stop Solution: Reagent containing 2.5 N H₂SO₄ used to stop the enzymatic turnover of Substrate.
- Fr: Solution d'arrêt : réactif contenant 2,5 N d'H₂SO₄ utilisé pour stopper la transformation enzymatique du substrat.
- De: Stopplösung: Reagenz enthält 2,5 N H₂SO₄, zum Stoppen der enzymatischen Umwandlung des Substrats.
- It: Soluzione di arresto: reagente contenente 2,5 N di H₂SO₄ utilizzato per arrestare il ricambio enzimatico del substrato.

- Es: Solución de interrupción: reactivo con un contenido de 2,5 N H₂SO₄ que se usa para interrumpir la transformación enzimática del sustrato.
- Pt: Solução de paragem: Reagente contendo H₂SO₄ 2,5 N utilizado para parar a alteração enzimática do substrato.
- Da: Stopopløsning: Reagens, der indeholder 2,5 N H₂SO₄, som bruges til at standse substratets enzymatiske omsætning.
- Sv: Stopplösning: Reagens som innehåller 2,5 N H₂SO₄ som används för att avbryta den enzymatiska substratomvandlingen.
- El: Διάλυμα αναστολής: Αντιδραστήριο που περιέχει H₂SO₄ 2,5 N και χρησιμοποιείται για την αναστολή της ενζυμικής μετατροπής του υποστρώματος.

Technical Support

For technical assistance,
please contact WILEX Inc.

tel: +1 617 492 3900 x502

fax: +1 617 492 3905

email: oncogenetech@wilex.com

www.oncogene.com

WILEX

IFU-10-7096
REV 030111

OncogeneScience

WILEX Inc.
Cambridge, MA 02140 USA