

DECLARATION OF CONFORMITY

We, Fujirebio Diagnostics AB hereby declare that HE4 EIA, Prod. No. 404-10, complies with the In Vitro Medical Device Directive 98/79/EC and its relevant transposition into the national laws of the member states in which the device is intended to be placed on the market, using Annex III as the conformance assessment procedure.

Signed:.....

Date effective:.....080215.....

FOR INFORMATION ONLY.
WHEN PERFORMING
THE ASSAY ALWAYS REFER
TO PACKAGE INSERT
SUPPLIED
WITH THE KIT



HE4 EIA

REF

404-10

IVD



Instructions for use. 2008-09

- DE Wenden Sie sich bitten an die deutsche Niederlassung um die geltende Gebrauchsanweisung zu erhalten.
- ES Por favor contacte con su distribuidor para una versión válida de "Instrucciones de uso" en español
- IT Contattare il proprio Distributore per ottenere la versione ufficiale della traduzione in lingua Italiana delle Istruzioni per l'Uso

- FR Pour une version certifiée de la Notice en Français, veuillez contacter votre Distributeur.
- DK Kontakt venligst den danske distributør for gældende version af dansk brugsanvisning.
- GR Παρακαλούμε όπως επικοινωνήσετε με τον προμηθευτή σας για την έγκυρη απόδοση στα Ελληνικά των οδηγιών χρήσης
- SE Vänligen kontakta Er distributör för gällande version av bruksanvisning på svenska.

GB EXPLANATION OF SYMBOLS
DE BEDEUTUNG DER SYMBOLE
ES EXPLICACIÓN DE SÍMBOLOS
IT SIGNIFICATO DEI SIMBOLI
FR EXPLICATION DES SYMBOLES
NL PICTOGRAMMEN
DK SYMBOLFORKLARING
CS VYSVĚTLENÍ SYMBOLŮ
GR ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ ΤΩΝ ΣΥΜΒΟΛΩΝ
PT INTERPRETAÇÃO DE SÍMBOLOS
HU JELMAGYARÁZAT
SE SYMBOLFÖRKLARING
PL INTERPRETACJA SYMBOLI
LT SIMBOLIŲ PAAIŠKINIMAI
RU ОБОЗНАЧЕНИЯ



Use By/Verwendbar bis/
Fecha de caducidad/
Utilizzare entro/Utiliser jusque/
Houdbaar tot/Holdbar til/
Ποιζιτελνέ do/Ημερομηνία λήξης/
Prazo de validade/Felhasználható
Bäst före datum/Użyty przed/
Sunaudoti iki/Использовать до

LOT

Batch code/
Chargenbezeichnung/
Codigo de lote/
Codice del lotto/Code du lot/
Lot nummer/Lotnummer/
Číslo šarže/Αριθμός Παρτίδας/
Código do lote/Sarzzszám
Lotnummer/Kod partii/Partijos
koda/Номер лота



Date of manufacture/
Herstellungsdatum/
Fecha de fabricación/
Data di fabbricazione/
Date de fabrication/
Produktie datum/Produktionsdato/
Datum výroby/Ημερομηνία
Παραγωγής/Data de fabrico/
Gyártás időpontja/Tillverkningsdatum/
Data produkcji/Pagaminimo data/
Дата производства

REF

Catalogue number/Bestellnummer/
Número de catálogo/
Numero di catalogo/Référence du
catalogue/Catalogus nummer/Katalog-
nummer/Katalogové číslo/
Αριθμός καταλόγου/
Referência de catálogo/
Katalógusszám/Produktnummer/
Numer katalogowy/Katalogo numeris/
Номер по каталогу



Manufacturer/Hersteller/Fabricante/
Fabbricante/Fabricant/Fabrikant/
Producent/Výrobce/Κτασκευαστής/
Fabricante/Gyártó/Tillverkare/
Producent/Gamintojas/
Производитель



Contains sufficient for <96> tests/
Inhalt ausreichend für <96> Prüfungen/
Contenido suficiente para <96>
ensayos/Contenuto sufficiente per
"96" saggi/Contenu suffisant pour
"96" tests/Inhoud voldoende voor "96"
testen/Indeholder tilstrækkeligt
til "96" test/Lze použit pro <96> testů/
Περιεχόμενο επαρκές για «96»
εξετάσεις/Conteúdo suficiente para
"96" ensaios/A doboz tartalma <96>
vizsgálat elvégzéséhez elegendő/
Innehåller tillräckligt till "96" antal tester/
Wystarczy na wykonanie <96> testów/
Turinys skirtas atlikti <96> tyrimus
/Содержит достаточные количества
для «96» определений

IVD

In Vitro Diagnostic Medical Device/
In Vitro Diagnostikum/Producto sani-
tario para diagnóstico in vitro/
Dispositivo medico-diagnostico in vitro/
Dispositif médical de diagnostic in vitro/
Medisch hulpmiddel voor in-vitro
diagnostiek/Medicinsk udstyr til in
vitro-diagnostik/In Vitro diagnostický
zdravotnický prostředek /
In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό
προϊόν/Dispositivo médico para
diagnóstico in vitro/In vitro
diagnosztikum/Endast för in vitro-
diagnostik/Wyrób do diagnostyki In
Vitro/In Vitro Diagnostinė Medicinos
Priemonė/Только для диагностики
In Vitro



Temperature limitation/
Temperaturbegrenzung/
Limite de temperatura/
Limiti di temperatura/
Limites de température/
Temperatuurlimit/
Temperaturbegrænsning/
Teplotní rozmezí od do/
Περιορισμοί θερμοκρασίας/
Limites de temperatura/
Hőmérsékletartomány/
Temperaturbegränsning/
Przestrzegać zakresu temperatury/
Temperatūriniai apribojimai/
Температурный режим



Consult Instructions for Use/
Gebrauchsanweisung beachten/
Consulte las instrucciones de uso/
Consultare le istruzioni per l'uso/
Consulter les instructions d'utilisation/
Raadpleeg de gebruiksaanwijzing/
Se brugsanvisning/Viz návod k
použití/Συμβουλευτείτε τις οδηγίες
χρήσης/Consulte as instruções de
utilização/Nézzze meg a Használati
utasítást/Se bruksanvisning/Sprawdź
w instrukcji obsługi/Dėl naudojimo
žiūrėkite instrukcijas/
Обратитесь к инструкции по
применению



Biological risks/Biogefährdung/
Riesgo biológico/Rischio biologico/
Risques biologiques/Biologisch
risico/Biologisk fare/
Biologicky nebezpečné
Βιολογικοί κίνδυνοι/Risco biológico
Biológiai kockázat/Biologisk risk/
Ryzyko biologiczne/Biologinis pavojus/
Биологическая опасность

CONT

Contents of kit/Inhalt/Contenido/
Contenido/Contenu/Inndhold/
ανιδραστήρια/Kit innehåll/
Rinkinio turinys/
Компоненты набора

ORIG **MOU**

From mouse/der Maus/de ratón/
Murino/De souris/Mus/απο ποντίκι/
Från mus/Pelès kilmès/
Мышиного происхождения

ORIG **HUM**

Human/Human/Humano/
Origine Umana/Humaine/Human
δείγματα αναφοράς/Human/
Žmogaus kilmės/
Человеческого происхождения

HE4 EIA

Instructions for use

**Enzyme immunometric assay kit
For 96 determinations**

INTENDED USE

The HE4 EIA is an enzyme immunometric assay for the quantitative determination of HE4 in human serum. The assay is to be used as an aid in monitoring response to therapy for patients with invasive epithelial ovarian cancer. Serial testing for patient HE4 assay values should be used in conjunction with other clinical methods used for monitoring ovarian cancer.

It is further intended to be used in conjunction with either ARCHITECT CA 125 II or CanAg CA125 EIA as an aid in estimating the risk of epithelial ovarian cancer in premenopausal and postmenopausal women presenting with pelvic mass. The results must be interpreted in conjunction with other methods in accordance with standard clinical management guidelines.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE ASSAY

Human epididymis protein 4 (HE4) belongs to the family of whey acidic four-disulfide core (WFDC) proteins with suspected trypsin inhibitor properties. Other proteins in this family include SLPI, Elafin, and PS20 (WFDC1) (1, 2). The HE4 gene codes for a 13kD protein, although in its mature glycosylated form the protein is approximately 20-25 kD, and consists of a single peptide containing two WFDC domains (3). HE4 was first identified in the epithelium of the distal epididymis and originally predicted to be a protease inhibitor involved in sperm maturation (4, 5). HE4 has since been reported to be expressed in several normal tissues including epithelia of respiratory and reproductive tissues and also in ovarian cancer tissue (6-10). In addition to expression on a cellular level, secreted HE4 has been detected in high levels in the serum of ovarian cancer patients. In a case/control study comparing patients with ovarian cancer to healthy and benign conditions, Hellström et al. found that HE4 detected ovarian cancer with 67% sensitivity at a specificity level of 96% (11). In a subsequent study evaluating numerous known biomarkers for ovarian cancer, HE4 showed the highest sensitivity for the detection of ovarian cancer, particularly in early stage disease. In this study, the combination of HE4 and CA 125 was a more accurate predictor of malignancy than either marker alone, with a sensitivity of 76% and a specificity of 95% (12).

Ovarian cancer is the fourth most common cause of cancer-related death in women worldwide. In Europe, the mortality rate range is from 3.6 to 9.3 per 100.000 women

(13). The symptoms of ovarian cancer are related to the presence of adnexal masses and are often vague and unspecific. The primary goal of diagnostic evaluation of an adnexal mass is to determine whether it is benign or malignant. It is estimated that 5 to 10 percent of women in the United States will undergo a surgical procedure for a suspected ovarian neoplasm during their lifetime, and 13 to 21 percent of these women will be found to have an ovarian malignancy (14). The American College of Obstetricians and Gynecologists Practice Bulletin published in 2007 states the following "Women with ovarian cancer whose care is managed by physicians who have advanced training and expertise in the treatment of women with ovarian cancer, such as gynecologic oncologists, have improved overall survival rates compared with those treated without such collaboration." (15). Since the majority of adnexal masses are benign, it is important to determine preoperatively whether a patient is at high risk for ovarian malignancy, in order to ensure proper management (15). Since the initial report in 1988, clinical impression, serum CA125 and ultrasound along with CT scan, MRI and CT/PET have been the standards in the determination of whether an adnexal mass is suspicious for malignancy (16). Although the literature is replete with papers describing which modality is the more accurate, the combination of physical examination, CA125 and imaging affords the highest positive predictive value (17-19). To improve the triage of patients presenting with pelvic mass, the HE4 EIA may be used in conjunction with either the ARCHITECT CA 125 II or CanAg CA125 EIA assay as an aid in estimating the risk that the patient is harboring epithelial ovarian cancer. The results must be interpreted in conjunction with other methods in accordance with standard clinical management guidelines. An additional use of the HE4 EIA is as an aid in monitoring response to therapy for patients with invasive epithelial ovarian cancer. The results should be used in conjunction with other clinical methods used for monitoring ovarian cancer.

PRINCIPLE OF THE TEST

The HE4 EIA is a solid-phase, non-competitive immunoassay based upon the direct sandwich technique using two mouse monoclonal antibodies, 2H5 and 3D8, directed against two epitopes in the C-WFDC domain of HE4. Calibrators, controls and patient samples are incubated together with biotinylated Anti-HE4 monoclonal antibody (MAb) 2H5 in streptavidin coated microstrips. HE4 present in calibrators or samples is adsorbed to the streptavidin coated microstrips by the biotinylated Anti-HE4 MAb during the incubation. The strips are then washed and incubated with HRP labeled Anti-HE4 MAb 3D8. After washing, buffered Substrate/Chromogen reagent (hydrogen peroxide and 3, 3', 5, 5' tetra-methyl-benzidine) is added to each well and the enzyme reaction is allowed to proceed. During the enzyme reaction a blue color will develop if antigen is present. The intensity of the color is proportionate to the amount of HE4 present in the samples. The color intensity is determined in a microplate spectrophotometer at 620 nm (or optionally at 405 nm

after addition of Stop Solution).

Calibration curves are constructed for each assay by plotting absorbance value versus the concentration for each calibrator. The HE4 concentrations of patient samples are then read from the calibration curve.

REAGENTS

- Each HE4 EIA kit contains reagents for 96 tests.
- The expiry date of the kit is stated on the label on the outside of the kit box.
- Do not use the kit beyond the expiry date.
- Do not mix reagents from different kit lots.
- Store the kit at 2–8°C. Do not freeze.
- Opened reagents are stable according to the table below provided they are not contaminated, stored in resealed original containers and handled as prescribed. Return to 2–8°C immediately after use.

Component	Quantity	Storage and stability after first use
-----------	----------	---------------------------------------

MICROPLA

Streptavidin Microplate	1 Plate	2–8°C until expiry date stated on the plate
--------------------------------	---------	---

12 x 8 breakable wells coated with streptavidin. After opening, immediately return unused strips to the aluminium pouch, containing desiccant. Reseal carefully to keep dry.

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

HE4 Calibrator A	1 x 8 mL	2–8°C until expiry date stated on the vial
-------------------------	----------	--

Phosphate buffered salt solution containing bovine serum albumin, an inert yellow dye, and a non-azide antimicrobial preservative. Ready for use. Should also be used for dilution of samples.

Component	Quantity	Storage and stability after first use			
HE4 Calibrators B-F	5 vials, lyophilized	Stability after reconstitution 4 weeks at 2-8°C 4 months at -20°C or below			
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>HE4</td><td>B</td></tr></table>	CAL	HE4	B	1 x 1 mL	
CAL	HE4	B			
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>HE4</td><td>C</td></tr></table>	CAL	HE4	C	1 x 1 mL	
CAL	HE4	C			
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>HE4</td><td>D</td></tr></table>	CAL	HE4	D	1 x 1 mL	
CAL	HE4	D			
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>HE4</td><td>E</td></tr></table>	CAL	HE4	E	1 x 1 mL	
CAL	HE4	E			
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>HE4</td><td>F</td></tr></table>	CAL	HE4	F	1 x 1 mL	
CAL	HE4	F			

The lyophilized calibrators contain HE4 antigen in a phosphate buffered salt solution containing bovine serum albumin, an inert yellow dye, and a non-azide antimicrobial preservative. To be reconstituted with distilled or deionized water before use.

NOTE: The exact HE4 concentration is lot specific and is indicated on the label of each vial.

HE4 Controls	2 vials, lyophilized	Stability after reconstitution 4 weeks at 2-8°C 4 months at -20°C or below			
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>HE4</td><td>1</td></tr></table>	CONTROL	HE4	1	1 x 1 mL	
CONTROL	HE4	1			
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>HE4</td><td>2</td></tr></table>	CONTROL	HE4	2	1 x 1 mL	
CONTROL	HE4	2			

The lyophilized controls contain HE4 antigen in a human serum matrix and a non-azide antimicrobial preservative. To be reconstituted with distilled or deionized water before use.

<table><tr><td>BIOTIN</td><td>Anti-HE4</td></tr></table>	BIOTIN	Anti-HE4		
BIOTIN	Anti-HE4			
Biotin Anti-HE4	1 x 15 mL	2–8°C until expiry date stated on the vial		

Biotin Anti-HE4 monoclonal antibody from mouse, approximately 1 µg/mL. Contains phosphate buffered saline (pH 7.2), bovine serum albumin, blocking agents, detergent, an inert red dye, and a non-azide antimicrobial preservative. Ready for use.

Component	Quantity	Storage and stability after first use
-----------	----------	---------------------------------------

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

Tracer, HRP Anti-HE4	1 x 0.75 mL	2–8°C until expiry date stated on the vial
-----------------------------	-------------	---

Stock Solution of HRP Anti-HE4 monoclonal antibody from mouse, approximately 40 µg/mL. Contains non-azide antimicrobial preservatives. To be diluted with Tracer Diluent prior to use.

DIL	CONJ
-----	------

Tracer Diluent	1 x 15 mL	2–8°C until expiry date stated on the vial
-----------------------	-----------	---

Phosphate buffered saline (pH 7.2) with bovine serum albumin, blocking agents, detergents, an inert blue dye, and a non-azide antimicrobial preservative. Ready for use.

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

TMB HRP-Substrate	1 x 12 mL	2–8°C until expiry date stated on the vial
--------------------------	-----------	---

Contains buffered hydrogen peroxide and 3, 3', 5, 5' tetra-methylbenzidine (TMB). Ready for use.

STOP

Stop Solution	1 x 15 mL	2–8°C until expiry date stated on the vial
----------------------	-----------	---

Contains 0.12 M hydrochloric acid. Ready for use.

Component	Quantity	Storage and stability after first use		
<table><tr><td>WASHBUF</td><td>25X</td></tr></table>	WASHBUF	25X		
WASHBUF	25X			
Wash Concentrate	1 x 50 mL	2–8°C until expiry date stated on the bottle		

A Tris-HCl buffered salt solution with Tween 20. Contains Germall II as preservative. To be diluted with distilled or deionized water 25 times before use.

Indications of instability

The TMB HRP-Substrate should be colorless or slightly bluish. A blue color indicates that the reagent has been contaminated and should be discarded.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For In Vitro Diagnostic Use:

- Follow the instructions in the Package insert. Reliability of assay results cannot be guaranteed if there are any deviations from the instructions in this package insert.
- Handle all patient specimens as potentially infectious. It is recommended that human source reagent and human specimens be handled in accordance with the OSHA Standard on Bloodborne pathogens (20). Biosafety level 2 (21) or other appropriate biosafety practices should be used for material that contain or are suspected of containing infectious agents.
- Follow local guidelines for disposal of all waste material.

Caution

Material used in the preparation of human source reagent has been tested and found to be Non-Reactive for HIV 1 and 2 Antibody, HCV Antibody and Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg). Since no method can completely rule out the presence of blood borne diseases, the handling and disposal of human source reagents from this product should be made as if they were potentially infectious.

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

The HE4 EIA is intended for use with serum (including serum collected in separator tubes (SST)). Plasma and other body fluids have not been validated for use with the HE4 EIA. Collect blood by venipuncture and follow the tube manufacturer's processing instructions for collection tubes. When serial specimens are being evaluated, the same type of specimen should be used throughout the study.

Serum can be stored at 2–8°C for 3 days before being tested. For longer periods store samples at -40°C or colder.

Bring frozen samples to room temperature and mix **THOROUGHLY** by gently inverting multiple times before analysis. Samples that contain gross particulates should be centrifuged at 10.000 x g for 10 minutes prior to use to eliminate any particulate matter that may have developed from the thawing process.

PROCEDURE

Materials required but not supplied with the kit

1. Microplate shaker

Shaking should be medium to vigorous, approximately 700-1100 oscillations/min.

2. Microplate washer

Automatic plate washer capable of performing 1, 3 and 6 washing cycles, and with a minimal fill volume of 350 µL/well/washcycle.

An 8-channel pipette with disposable plastic tips for delivery of 350 µL is recommended if an automatic microplate washer is not used.

3. Microplate spectrophotometer

With a wavelength of 620 nm and/or 405 nm, and an absorbance range of 0 to 3.0.

4. Precision pipettes

With disposable plastic tips for dispensing microliter volumes. An 8-channel pipette or dispenser pipette with disposable plastic tips for delivery of 100 µL is recommended but not required. Pipettes for dispensing milliliter volumes.

5. Distilled or deionized water

For reconstitution of HE4 Calibrators, HE4 Controls and for preparation of diluted Wash Solution.

Procedural notes

1. A thorough understanding of this package insert is necessary to ensure proper use of the HE4 EIA kit. The reagents supplied with the kit are intended for use as an integral unit. Do not mix identical reagents from kits having different lot numbers. Do not use the kit reagents after the expiry date printed on the outside of the kit box.
2. Reagents should be allowed to reach room temperature (20–25°C) prior to use. Frozen specimens must be gently but thoroughly mixed after thawing. **The assay should only be performed at temperatures between 20–25°C to obtain accurate results.**

3. Before starting to pipette calibrators and patient specimens it is advisable to mark the strips to be able to clearly identify the samples during and after the assay.
4. The requirement for efficient and thorough washing for separation of bound and unbound antigen and reagents from the solid-phase bound antibody-antigen complexes is one of the most important steps in an EIA. **In order to ensure efficient washing make sure that all wells are completely filled to the top edge with wash solution during each wash cycle, that wash solution is dispensed at a good flow rate, that the aspiration of the wells between and after the wash cycles is complete and that the wells are empty. If there is liquid left, invert the plate and tap it carefully against absorbent paper.**
- Automatic strip washer: Follow the manufacturer's instructions for cleaning and maintenance diligently and wash the required number of wash cycles prior to and after each incubation step. The aspiration/wash device should not be left standing with the Wash Solution for long periods, as the needles may get clogged resulting in poor liquid delivery and aspiration.
5. The TMB HRP-Substrate is very sensitive to contamination. For optimal stability of the TMB HRP-Substrate, pour the required amount from the vial into a carefully cleaned reservoir or preferably a disposable plastic tray to avoid contamination of the reagent. Be sure to use clean disposable plastic pipette tips (or dispenser pipette tip).
6. Be sure to use clean disposable plastic pipette tips and a proper precision pipetting technique when handling samples and reagents. Do not allow the pipette tip to touch the surface of the liquid in order to avoid carry-over. A diligent pipetting technique is of particular importance when handling the samples and the TMB HRP-Substrate solution.

Preparation of reagents	Stability of prepared reagent
HE4 Calibrators B-F	4 weeks at 2–8°C 4 months at -20°C or below

Add exactly 1.0 mL of distilled or deionized water to each vial. Allow to stand for at least 15 minutes to reconstitute and mix gently before use. NOTE: The concentration of the calibrators is stated on the labels and should be used for calculation of results.

Preparation of reagents	Stability of prepared reagent
HE4 Controls 1 and 2	4 weeks at 2–8°C 4 months at -20°C or below

Add exactly 1.0 mL of distilled or deionized water to each vial and mix gently. Allow to stand for at least 15 minutes to reconstitute and mix gently before use. NOTE: The ranges of the controls are stated on the labels.

Wash Solution	2 weeks at 2–25°C in a sealed container
----------------------	---

Pour the 50 mL Wash Concentrate into a clean container and dilute 25-fold by adding 1200 mL of distilled or deionized water to give a buffered Wash Solution.

Tracer Working Solution	4 weeks at 2–8 °C in a sealed container
--------------------------------	---

Prepare the required quantity of Tracer working solution by mixing 50 µL of Tracer, HRP Anti-HE4 with 1 mL of Tracer Diluent per strip (see table below):

No. of Strips	Tracer, HRP Anti-HE4 (µL)	Tracer Diluent (mL)
1	50	1
2	100	2
3	150	3
4	200	4
5	250	5
6	300	6
7	350	7
8	400	8
9	450	9
10	500	10
11	550	11
12	600	12

Be sure to use a clean plastic or glass tube for preparation of Tracer working solution.

Alternative: Pour the contents of the Tracer, HRP Anti-HE4 into the vial of Tracer Diluent and mix gently. Make sure that the entire content of the Tracer, HRP Anti-

HE4 vial is transferred to the vial of Tracer Diluent.

NOTE: The Tracer working solution is stable for 4 weeks at 2–8°C. Do not prepare more Tracer working solution than will be used within this period and make sure that it is stored properly.

ASSAY PROCEDURE

Perform each determination in duplicate for both calibrators, controls and unknown specimens. A calibration curve should be run with each assay. All reagents and specimens must be brought to room temperature (20–25°C) before use.

1. Start preparing Calibrators B-F, Controls 1 and 2, Wash Solution and Tracer working solution. It is important to use clean containers. Follow the instructions carefully.
2. Transfer the required number of microplate strips to a strip frame. (Immediately return the remaining strips to the aluminum pouch containing desiccant and reseal carefully). Wash each strip once with the Wash Solution. Do not wash more strips than can be handled within 30 min.
3. Pipette 25 µL of each of the HE4 Calibrators (CAL A, B, C, D, E and F), HE4 Controls (C1, C2) and unknown specimens (Unk) into the strip wells according to the following scheme:

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

4. Add 100 µL of Biotin Anti-HE4 to each well using a 100 µL precision pipette (or an 8-channel 100 µL precision pipette). Do not allow the pipette tip to touch the surface of the liquid in order to avoid carry-over.

5. Incubate the plate for 1 hour ($\pm$ 10 min) at room temperature (20-25°C), constantly shaking the plate using a microplate shaker.
6. After the first incubation aspirate and wash each strip 3 times using the wash procedure described in Procedural notes, item 4.
7. Add 100 μ L of Tracer working solution to each well. Use the same pipetting procedure as in item 4 above.
8. Incubate the frame for 1 hour ($\pm$ 5 min) at room temperature (20–25°C) with constant shaking.
9. After the second incubation aspirate and wash each strip 6 times, using the wash procedure described in Procedural notes, item 4.
10. Add 100 μ L of TMB HRP-Substrate to each well using the same pipetting technique as described in item 4 above.
The TMB HRP-Substrate should be added to the wells as quickly as possible and the time between addition to the first and last well should not exceed 5 min.
11. Incubate for 30 min ($\pm$ 5 min) at room temperature (20–25°C) with constant shaking. Avoid exposure to direct sunlight.
12. Immediately read the absorbance at 620 nm in a microplate spectrophotometer.

Option

If the laboratory does not have access to a microplate reader capable of reading at 620 nm, the absorbance can be determined as described in the alternative item 12 below:

- Alt. 12. Add 100 μ L of Stop Solution, mix and read the absorbance at 405 nm in a microplate spectrophotometer within 15 min after addition of Stop Solution.

Measurement range

The HE4 EIA measures concentrations between 15 and 900 pM. If HE4 concentrations above the measuring range are expected, it is recommended that samples be diluted with HE4 Calibrator A prior to analysis (see "Calculation of results with diluted samples").

Quality control

HE4 Control 1 and 2 should be used for validation of each assay series. Ranges of expected results are indicated on the vial labels.

The HE4 assay results should be considered valid if:

- The mean values of control duplicates are within the specified ranges.
- The duplicate replicates of calibrators B-F and controls do not exceed a CV of 15%.
- The duplicate replicates of calibrator A (zero) are not more than 0.06 OD units different from each other.

If an assay results in invalid calibrator or control results, a complete check of reagents, accuracy of pipettes, plate washer and reader performance should be made and the analysis repeated. Each laboratory may also prepare its own serum pools at different levels, which can be used as internal controls in order to assure the precision of the assay.

Reference material

Since no common reference material is available for HE4 antigen, HE4 EIA Calibrator values are assigned against a set of in-house reference standards.

CALCULATION OF RESULTS

If a microplate spectrophotometer with built-in data calculation program is used, refer to the manual for the spectrophotometer and create a program using the concentration stated on the label of each of the HE4 Calibrators.

For automatic calculation of HE4 results it is recommended to use either of the following methods:

- Cubic spline curve fit method. Calibrator A should be included in the curve with the value 0 pM.
- Interpolation with point-to-point evaluation. Calibrator A should be included in the curve with the value 0 pM.
- Quadratic curve fit method. Calibrator A should be included in the curve with the value 0 pM.

NOTE: 4-parametric or Linear regression evaluation methods should not be used. For manual evaluation, a calibration curve is constructed by plotting the absorbance (A) values obtained for each HE4 Calibrator against the corresponding HE4 concentration (in pM).

The unknown HE4 concentrations can then be read from the calibration curve using the mean absorbance value of each patient specimen.

Calculation of results with diluted samples

If samples in an initial analysis give HE4 levels higher than 900 pM the samples should be diluted 1/10 and 1/100 with HE4 Calibrator A to obtain the accurate HE4 concentration of the samples.

- 1/10 dilution = 50 μ L of specimen + 450 μ L of HE4 Calibrator A
- 1/100 dilution = 50 μ L of 1/10 dilution + 450 μ L of HE4 Calibrator A

The HE4 concentration of the undiluted sample is then calculated as:

- Dilution 1/10: 10 x measured value
- Dilution 1/100: 100 x measured value

Risk of Ovarian Malignancy Algorithm (ROMA) for estimating the risk of epithelial ovarian cancer in premenopausal and postmenopausal women presenting with pelvic mass

Calculation of Predictive Index

A Predictive Index (PI) is calculated for premenopausal and postmenopausal women separately using the equations (1) and (2) below. To calculate the PI, the assay values obtained from the HE4 EIA and either the ARCHITECT CA125 II or CanAg CA125 EIA assays, respectively, are inserted into the applicable equation of the algorithm below, depending on the menopausal status of the woman.

(1) Premenopausal woman

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

(2) Postmenopausal woman

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

Calculation of ROMA value

To calculate the ROMA value (i.e. Predictive Probability), insert the calculated value for Predictive Index into equation (3):

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

The examples below can be used in order to validate calculations of PI and ROMA value:

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

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Patients with confirmed ovarian cancer may have HE4 assay values in the same range as healthy women. Certain histological types of ovarian cancer e.g. mucinous or germ cell tumors, rarely express HE4, therefore HE4 is not recommended for monitoring of patients with known mucinous or germ cell ovarian cancer (7). Conversely, elevated levels of HE4 antigen may be present in individuals with non-malignant disease. Therefore, the level of HE4 cannot be used as absolute evidence for the presence or absence of malignant disease and the HE4 test should not be

Protocol Sheet

HE4 EIA REF 404-10

Prepare the components directly before use. Use wash and incubation conditions according to the Instructions.

Note. The assay should only be performed at temperatures between 20-25°C to obtain accurate results.

Step	Vial/Plate	Procedure																																							
1. Prepare HE4 Calibrators	<table><tr><td>CAL</td><td>HE4</td></tr></table> B, C, D, E, F	CAL	HE4	Add 1 mL of distilled or deionised water to each vial and mix gently. Allow to stand for at least 15 minutes. NOTE: The exact concentration of each calibrator is stated on the label. Reconstituted stability: 4 weeks at 2-8°C.																																					
CAL	HE4																																								
Prepare HE4 Controls	<table><tr><td>CONTROL</td><td>HE4</td></tr></table> 1, 2	CONTROL	HE4																																						
CONTROL	HE4																																								
Prepare Wash Solution	<table><tr><td>WASHBUF</td><td>25X</td></tr></table>	WASHBUF	25X																																						
WASHBUF	25X																																								
Prepare Tracer working solution	<table><tr><td>CONJ</td><td>Anti-HE4</td></tr><tr><td>DIL</td><td>CONJ</td></tr></table>	CONJ	Anti-HE4	DIL	CONJ																																				
CONJ	Anti-HE4																																								
DIL	CONJ																																								
		Mix 50 µL of Tracer, HRP Anti-HE4 with 1mL of Tracer Diluent per strip:																																							
		<table><tr><th>No. of Strips</th><th>Tracer, HRP Anti-HE4 (µL)</th><th>Tracer Diluent (mL)</th></tr><tr><td>1</td><td>50</td><td>1</td></tr><tr><td>2</td><td>100</td><td>2</td></tr><tr><td>3</td><td>150</td><td>3</td></tr><tr><td>4</td><td>200</td><td>4</td></tr><tr><td>5</td><td>250</td><td>5</td></tr><tr><td>6</td><td>300</td><td>6</td></tr><tr><td>7</td><td>350</td><td>7</td></tr><tr><td>8</td><td>400</td><td>8</td></tr><tr><td>9</td><td>450</td><td>9</td></tr><tr><td>10</td><td>500</td><td>10</td></tr><tr><td>11</td><td>550</td><td>11</td></tr><tr><td>12</td><td>600</td><td>12</td></tr></table>	No. of Strips	Tracer, HRP Anti-HE4 (µL)	Tracer Diluent (mL)	1	50	1	2	100	2	3	150	3	4	200	4	5	250	5	6	300	6	7	350	7	8	400	8	9	450	9	10	500	10	11	550	11	12	600	12
No. of Strips	Tracer, HRP Anti-HE4 (µL)	Tracer Diluent (mL)																																							
1	50	1																																							
2	100	2																																							
3	150	3																																							
4	200	4																																							
5	250	5																																							
6	300	6																																							
7	350	7																																							
8	400	8																																							
9	450	9																																							
10	500	10																																							
11	550	11																																							
12	600	12																																							

2. Wash	MICROPLA	Wash each well once with Wash Solution. Use manual or automatic washer.
3. Add calibrators, controls and samples	CAL HE4 A, B, C, D, E, F CONTROL HE4 1, 2	25 μ L in each well
4. Add Biotin Anti-HE4	BIOTIN Anti-HE4	100 μ L in each well
5. Incubate	MICROPLA	1 hour shaking at 20–25°C
6. Wash	MICROPLA	Wash each well three times with Wash Solution Use manual or automatic washer.
7. Add Tracer working solution	TRACER WORKING SOLUTION	100 μ L in each well
8. Incubate	MICROPLA	1 hour shaking at 20–25°C
9. Wash	MICROPLA	Wash each well six times with Wash Solution. Use manual or automatic washer.
10. Add TMB HRP-Substrate	SUBS TMB	100 μ L in each well
11. Incubate	MICROPLA	30 min shaking at 20–25°C
12. Read absorbance	MICROPLA	620 nm
Alt.12 Add Stop Solution	STOP	100 μ L in each well
Alt.13 Mix	MICROPLA	Allow to mix at 20–25°C
Alt.14 Read absorbance	MICROPLA	Read at 405 nm within 15 min

used in cancer screening. The results of the test should be interpreted only in conjunction with other investigations and procedures in the diagnosis of disease and the management of patients, and the HE4 test should not replace any established clinical examination.

The risk of ovarian malignancy algorithm has not been validated for the following patient groups: patients previously treated for malignancy, patients currently being treated with chemotherapy and patients < 18 years of age. The form of the mathematical function referred to as the Risk of Ovarian Malignancy Algorithm (ROMA), depends on the premenopausal or postmenopausal status of a woman. The premenopausal or postmenopausal status must be based on ovarian function determined with information available from clinical evaluation and medical history. The ROMA value does not include age, family history, clinical findings, or imaging results and should be interpreted in conjunction with these parameters.

Failure of the HE4 EIA and/or the CA125 assay to perform as indicated, or error in the calculation of results could lead to inaccurate risk assessment and improper management of the patient. Specifically, a falsely low result of the assay(s) could result in a determination that the patient is at lower risk of having epithelial ovarian cancer, which could triage the patient to a less specialized level of care. Use of the assay results without consideration of the other laboratory findings, imaging studies, and clinical assessment could therefore pose a risk.

Anti-reagent antibodies (human anti-mouse antibody (HAMA) or heterophilic antibodies) in the patient sample may occasionally interfere with the assay, even though specific blocking agents are included in the buffers. **The assay must be performed in a temperature controlled environment since incubation at temperatures above the recommended temperature range 20 - 25°C may give false low results.**

EXPECTED VALUES

The distribution of HE4 levels determined in 1147 specimens is shown in the table below:

Distribution of HE4 Assay Values					
	Number of subjects	0 - 150 pM	150.1 - 300 pM	300.1 - 500 pM	> 500 pM
APPARENTLY HEALTHY					
Females (Premenopausal)	76	72	3	0	1
Females (Postmenopausal)	103	97	5	0	1
BENIGN CONDITIONS					
Pregnancy	22	21	1	0	0
Benign Gynecological Disease	347	324	18	1	4
Other Benign Disease	108	82	8	7	11
Hypertension/Cong. Heart Failure	96	75	16	2	3
CANCER					
Ovarian Cancer	127	27	18	21	61
Breast Cancer	46	40	4	2	0
Lung Cancer	50	29	15	6	0
Endometrial Cancer	116	86	15	4	11
Gastrointestinal Cancer	56	47	8	0	1

In this study 94.4% of the healthy female subjects had a HE4 assay value at or below 150 pM. It is recommended that each laboratory establish its own reference value for the population of interest.

Monitoring of Disease status in Patients Diagnosed with Ovarian Cancer

The effectiveness of the HE4 EIA as an aid in monitoring of disease status in ovarian cancer patients was determined by assessing changes in HE4 levels in serial serum samples from 80 patients compared to changes in disease status. A study involving a total of 354 pairs of observations was undertaken with an average number of 4.4 observations per patient. A positive change in HE4 was defined as an increase in the value that was at least 25% greater than the previous value of the test. This level of change takes into account the variability of the assay and the biological variability. Sixty percent (60%) or 76/126 of the patient samples with a positive change correlated with the disease progression while seventy-five percent (75%) or 171/228 of the patient serial samples with no significant change in HE4 value correlated with no progression. The total concordance was seventy percent (70% or 247/354). The following table presents the data in a 2 x 2 format.

Change in Disease State per Sequential Pair

Increase in HE-4 concentration	Progression	No Progression	Total
>25%	76	57	133
≤ 25%	50	171	221
Total	126	228	354

The following table shows the distribution per patient. Ninety-three percent (93%) or 54/58 of the per patient serum sets with a positive change correlated with the disease progression while Thirty-two percent (32%) or 7/22 of serum sets showing no significant change in HE4 value correlated with no progression. The total concordance in this study was seventy-six percent (76 %) or 61/80.

Change in Disease State per Patient

Increase in HE-4 concentration	Progression	No Progression	Total
>25%	54	15	69
≤ 25%	4	7	11
Total	58	22	80

Risk estimation in patients presenting with pelvic mass

The effectiveness of HE4 EIA in combination with CA125 determined either with the ARCHITECT CA125 II assay or the CanAg CA125 EIA for risk estimation for epithelial ovarian cancer of patients presenting with pelvic mass was determined in a prospective, multi-center, double blind clinical trial. An algorithm (ROMA, see page 17) was developed for estimation of the risk of epithelial ovarian cancer. The algorithm takes into account the HE4 and CA125 values as well as the menopausal status of the patient. The algorithm calculates a predictive probability of finding epithelial ovarian cancer on surgery. In the prospective study a total of 502 patients were included and the predictive probability for ovarian cancer as well as the ability for separation into a low and a high risk group based on ROMA values was determined.

The cumulative frequency distribution of the ROMA values for benign and ovarian cancer cases including tumors of low malignant potential (LMP) respectively using the algorithm is shown in Figures 1 and 2 for the HE4 EIA and ARCHITECT CA125 II assay combination and in Figures 3 and 4 for the HE4 EIA and CanAg CA125 EIA combination. The frequency distribution graphs illustrate the distribution of patients with benign disease and epithelial ovarian cancer (including LMP) at different ROMA value cut-points.

Fig. 1 Cumulative frequency distribution of ROMA values for **premenopausal** women. HE4 EIA + ARCHITECT CA125 II assay combination

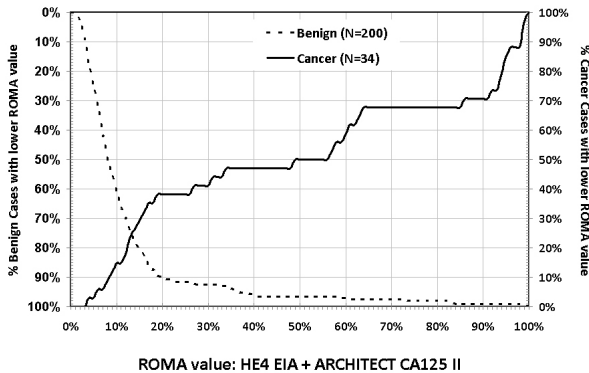


Fig. 2 Cumulative frequency distribution of ROMA values for **postmenopausal** women. HE4 EIA + ARCHITECT CA125 II assay combination

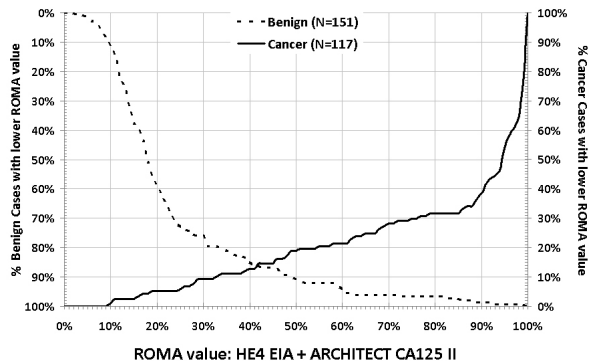


Fig. 3 Cumulative frequency distribution of ROMA values for **premenopausal** women. HE4 EIA + CanAg CA125 EIA combination

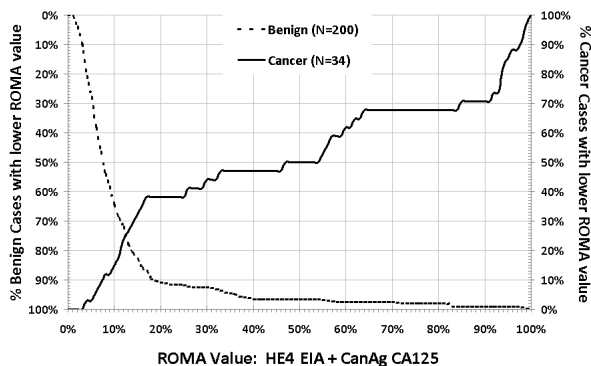
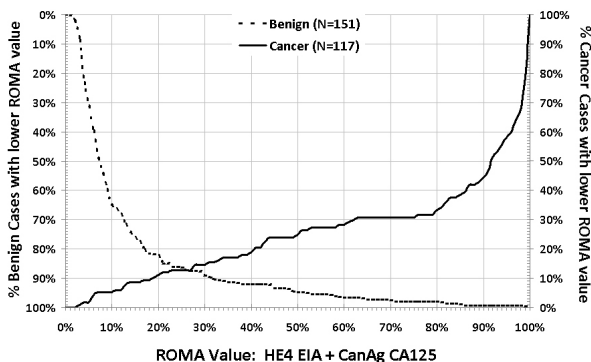


Fig. 4 Cumulative frequency distribution of ROMA values for **postmenopausal** women. HE4 EIA + CanAg CA125 EIA combination



Stratification into low risk and high risk groups

The risk of ovarian malignancy algorithm was used to stratify women into risk groups for finding epithelial ovarian cancer. The following cut-points were used in order to provide a specificity level of 75% for the HE4 EIA and ARCHITECT CA125 II assay combination:

Premenopausal women

ROMA value $\geq 13.1\%$ = High risk of finding epithelial ovarian cancer

ROMA value $< 13.1\%$ = Low risk of finding epithelial ovarian cancer

Postmenopausal women

ROMA value $\geq 27.7\%$ = High risk of finding epithelial ovarian cancer

ROMA value $< 27.7\%$ = Low risk of finding epithelial ovarian cancer

The risk stratification into high risk of harboring epithelial ovarian cancer of all patients presenting with adnexal mass using the ROMA values at 75% specificity level is shown in Table 1 including the risk stratification obtained for the separate premenopausal and postmenopausal patient groups respectively. The sensitivity for stratifying patients with epithelial ovarian cancer stage I-IV into the high risk group was 94% and the specificity was 75%, such that 75% of women with benign pelvic mass were classified into the low risk group. The positive and negative predictive values were 58 % and 97% respectively.

Table 1: Risk stratification into high risk of harboring Epithelial Ovarian Cancer (EOC) in patients presenting with adnexal mass using the HE4 EIA and ARCHITECT CA125 II assay combination to calculate ROMA value.

Premenopausal cut-point for stratification into high risk group at 75% specificity level $\geq 13.1\%$,

Postmenopausal cut-point for stratification into high risk group at 75% specificity level $\geq 27.7\%$.

	Premenopausal Women n = 234	Postmenopausal Women n = 268	Pre- & Postmenopausal Women Combined n = 502
Stage I – IV EOC & LMP combined	26/34 (76%)	108/117 (92%)	134/151 (89%)
Low Malignant Potential	10/16 (63%)	3/6 (50%)	13/22 (59%)
Stage I-II EOC	6/7 (86%)	24/28 (86%)	30/35 (86%)
Stage I – IIIC^a EOC	7/8 (88%)	35/39 (90%)	42/47 (89%)
Stage I – IV EOC	16/18 (89%)	105/111 (95%)	121/129 (94%)

^aStage I – IIIB & Stage IIIC (Omentum negative, lymphnode positive) Epithelial Ovarian Cancer

There were no statistically significant differences in the sensitivity and specificity of the ROMA value using ARCHITECT CA125 II or CanAg CA125 EIA values to differentiate between benign diseases and epithelial ovarian cancer. Using the CanAg CA125 EIA + HE4 EIA assay combination, the sensitivity for stratifying patients with epithelial ovarian cancer stage I-IV into the high risk group was 93%. The positive and negative predictive values were 57 % and 97% respectively. **It should be noted that different cut-points for risk stratification into high and low risk groups must be selected based upon which CA125 assay is used.**

The following cut-points were used in order to provide a specificity level of 75% for the CanAg CA125 EIA + HE4 EIA assay combination:

Premenopausal women

ROMA value $\geq 12.5\%$ = High risk of finding epithelial ovarian cancer

ROMA value $< 12.5\%$ = Low risk of finding epithelial ovarian cancer

Postmenopausal women

ROMA value $\geq 14.4\%$ = High risk of finding epithelial ovarian cancer

ROMA value $< 14.4\%$ = Low risk of finding epithelial ovarian cancer

The False Negative Rates and percentage of epithelial ovarian cancer stratified into low risk of harboring epithelial ovarian cancer in patients presenting with adnexal mass using the ROMA value at 75 % specificity level is shown in Table 2. Stratification into low and high risk group of harboring epithelial ovarian cancer using the

ROMA algorithm at 75 % specificity level resulted in an overall False Negative Rate of 6.2%. Three (3) percent of all cases stratified into the low risk group represented epithelial ovarian cancer.

Table 2: False Negative Rate (FNR) and percentage of Epithelial Ovarian Cancers for all cases stratified into low risk group in patients presenting with adnexal mass using the ROMA value.

Premenopausal cut-point for stratification into low risk group at 75% specificity level < 13.1%, postmenopausal cut-point for stratification into low risk group at 75% specificity level < 27.7%.

Epithelial Ovarian Cancer ^a	False Negative Rate (FNR)			Percentage of cancers in Low Risk Group		
	False Negative Cancers	Total Cancers	FNR ^b	False Negative Cancers	True Positive Benign	(%) ^c
Preme-nopausal	2	18	11.1%	2	149	1.3%
Postme-nopausal	6	111	5.4%	6	113	5.0%
All patients	8	129	6.2%	8	262	3.0%

^aTumors of Low Malignant Potential (LMP) not included; ^bFNR = False Negative/(True Positive + False Negative); ^c False Negative/(True Negative + False Negative)

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision

The HE4 assay precision is $\leq 15\%$ total CV. A study was performed as described per the National Committee for Clinical Laboratory Standards NCCLS (CLSI) guideline EP5-A2 (22). A panel of four serum samples was assayed, using two lots of reagents, in replicates of two, at two separate times per day for 20 days. Data from this study is summarized below.*

Sample	Reagent lot	n	Mean conc. (pM)	Within-run SD (pM)	Within-run CV %	Total SD (pM)	Total CV %
1	1	80	50.3	0.81	1.6	2.34	4.7
	2	80	48.0	0.69	1.4	2.17	4.5
2	1	80	75.3	1.81	2.4	2.96	3.9
	2	80	72.4	1.73	2.4	4.70	6.5
3	1	80	255	5.68	2.2	12.0	4.7
	2	80	242	5.21	2.2	12.8	5.3
4	1	80	407	6.22	1.5	14.5	3.6
	2	80	385	8.71	2.3	21.6	5.6

*Representative data; results in individual laboratories may vary from these data.

Detection limit

The limit of detection of the HE4 EIA assay is ≤ 15 pM. The limit of detection (LoD) corresponds to the upper limit of the 95% confidence interval and represents the lowest concentration of HE4 antigen that can be distinguished from zero. The NCCLS guideline EP17-A (23) was used to design the LoD experiments. A study was conducted where HE4 Calibrator A (zero) and 4 samples from healthy subjects diluted to 5 pM with Sample Diluent was tested in replicates of 24 per run in 4 runs on two separate days. The LoD was calculated as follows:

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

The Limit of Detection of the HE4 EIA Kit was calculated to be < 2.5 pM.

Functional sensitivity

The functional sensitivity of the HE4 EIA assay is ≤ 25 pM. The functional sensitivity is expressed as the concentration of an analyte at which the CV is 20%. The NCCLS guideline EP5-A2 (22) was used to design the experiments for determination of functional sensitivity. A study was conducted where a five member sensitivity panel was tested in replicates of 4 in 2 runs on twenty separate days with two lots of reagents. The functional sensitivity determined for the HE4 EIA was found to be < 5 pM.

Recovery

The HE4 EIA assay mean recovery is $100 \pm 15\%$. A study was performed where dilutions of a patient sample with known concentrations of HE4 were added to normal human serum samples. The concentration of HE4 was determined using the HE4 EIA assay and the resulting percent recovery was calculated. Representative data from this study is summarized in the table below*.

Sample	Endogenous Assay Value (pM)	HE4 Antigen Added (pM)	Observed HE4 Assay Value (pM)	Percent Recovery** %
1	44.6	15	60.6	102
		75	96.0	89
		350	397	96
		650	686	96
2	41.1	15	55.7	99
		75	95.2	91
		350	400	98
		650	657	93
3	40.6	15	54.0	97
		75	95.1	91
		350	403	99
		650	680	96
4	46.6	15	63.3	103
		75	106	97
		350	410	99
		650	645	90
5	40.2	15	56.5	102
		75	102	98
		350	402	99
		650	676	96

The average recovery across the four separate spiked concentrations shown above was found to be 97%.

*Representative data; results in individual laboratories may vary from these data.

**% Recovery = Observed HE4 Concentration (pM) / Endogenous HE4 Conc. (pM) + HE4 Added (pM)

High Dose Hook

High dose hook is a phenomenon whereby very high level specimens may read within the dynamic range of the assay. For the HE4 EIA, no high dose hook effect was observed for samples containing up to 300 000 pM HE4 native antigen.

Dilution Linearity

The HE4 EIA assay mean dilution linearity is $100 \pm 15\%$. A study was conducted for the HE4 EIA modeled after the NCCLS (CLSI) guideline EP6-A (24). Serum samples with elevated HE4 values were diluted with HE4 Calibrator A (zero). The HE4 concentration was determined for each dilution and the percent (%) recovery was calculated. Representative data from this study is summarized in the table below*.

Sample	Final Dilution Factor	Obtained Value (pM)	Expected Value (pM)	Percent Recovery** (%)
1	Undiluted	889.6	889.6	100
	1:1.25	720.0	711.7	101
	1:1.7	543.1	533.8	101
	1:2	450.6	444.8	101
	1:2.5	345.9	355.8	97.2
	1:5	183.6	177.9	103
	1:10	97.6	89.0	109
	1:20	49.1	44.5	110
	1:40	25.9	22.2	116
2	Undiluted	697.0	697.0	100
	1:1.25	544.9	557.6	97.7
	1:1.7	429.8	418.2	103
	1:2	361.1	348.5	104
	1:2.5	275.9	278.8	99.0
	1:5	134.5	139.4	96.5
	1:10	74.4	69.7	107
	1:20	39.1	34.9	112
	1:40	21.0	17.4	120
3	Undiluted	680.2	680.2	100
	1:1.25	499.7	544.2	91.8
	1:1.7	354.4	408.1	86.8
	1:2	296.7	340.1	87.2
	1:2.5	247.2	272.1	90.9
	1:5	124.9	136.0	91.8
	1:10	61.7	68.0	90.7
	1:20	34.6	34.0	102
	1:40	18.4	17.0	109

Average recovery across the three diluted samples shown above = 101%

*Representative data; results in individual laboratories may vary from these data.

**% Recovery= HE4 Concentration obtained x Dilution factor / Undiluted HE4 Concentration.

Analytical Specificity

The HE4 EIA assay mean assay specificity is $100 \pm 15\%$. Recovery studies were performed to compare sera containing the following compounds at the indicated concentrations with control sera. The NCCLS guideline EP7-A (25) was used to design the interference experiments. The following substances and concentrations were tested and found not to interfere with the test.

Endogenous serum interferences	Test Concentration
Triglycerides	30 mg/mL
Billirubin	0.2 mg/mL
Hemoglobin	10 mg/mL
Total Protein	120 mg/mL

Chemotherapeutic drug interferences	Test Concentration
Carboplatin	500 µg/mL
Cisplatin	165 µg/mL
Clotrimazole	0.3 µg/mL
Cyclophosphamide	500 µg/mL
Dexamethasone	10 µg/mL
Doxorubicin	1.16 µg/mL
Leucovorin	2.68 µg/mL
Melphalan	2.8 µg/mL
Methotrexate	45 µg/mL
Paclitaxel	3.5 ng/mL

Potentially interfering clinical conditions

The HE4 EIA assay was evaluated using specimens with HAMA and Rheumatoid Factor (RF) to further assess the assay specificity. Five specimens positive for HAMA and five specimens positive for RF were evaluated for % recovery with HE4 antigen spiked into each specimen at approximately 50 and 450 pM. Mean recovery results are summarized in the following table.*

Clinical condition	Number of specimens	Mean % recovery
HAMA	5	101
RF	5	95

*Representative data; results in individual laboratories may vary from these data.

WARRANTY

The performance data presented here were obtained using the assay procedure indicated. Any change or modification of the procedure not recommended by Fujirebio Diagnostics may affect the results, in which event Fujirebio Diagnostics disclaims all warranties expressed, implied or statutory including the implied warranty of merchantability and fitness for use.

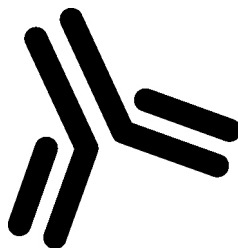
REFERENCES

1. Israeli O, Goldring-Avram A, Rienstein S, Ben-Baruch G, Korach J, Goldman B, Friedman E. In silico chromosomal clustering of genes displaying altered expression patterns in ovarian cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;160:35-42.
2. Bouchard D, Morisset D, Bourbonnais Y, Tremblay GM. Proteins with whey-acidic-protein motifs and cancer. *Lancet Oncol* 2006;7:167-174.
3. Bingle L, Singleton V, Bingle CD. The putative ovarian tumour marker gene HE4 (wfdc2), is expressed in normal tissues and undergoes complex alternative splicing to yield multiple protein isoforms. *Oncogene* 2002;21:2768-2773.
4. Kirchhoff C, Habben I, Ivell R, et al. A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular protease inhibitors. *Biol Reprod* 1991;45:350-357.
5. Kirchhoff C. Molecular characterization of epididymal proteins. *Rev Reprod* 1998;3:86-95.
6. Galgano MT, Hampton GM, Frierson HF Jr. Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues. *Mod Pathol* 2006;19:847-853.
7. Drapkin R, von Horsten HH, Lin Y, Mok SC, Crum CP, Welch WR, Hecht JL. Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res* 2005;65:2162-2169.
8. Hough CD, Sherman-Baust CA, Pizer ES, Montz FJ, Im DD, Rosenshein NB, Cho KR, Riggins GJ, Morin PJ. Large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer. *Cancer Res* 2000;60:6281-6287.
9. Schummer M, Ng WV, Bumgarner RE, Nelson PS, Schummer B, Bednarski DW, Hassell L, Baldwin RL, Karlan BY, Hood L. Comparative hybridization of an array of 21,500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas. *Gene* 1999;238:375-385.
10. Gilks CB, Vanderhyden BC, et al. Distinction between serous tumors of low malignant potential and serous carcinomas based on global mRNA expression profiling. *Gynecol Oncol* 2005;96:684-694.
11. Hellstrom I, Raycraft J, et al. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian cancer. *Cancer Res* 2003;63:3695-3700.
12. Moore RM, Brown AK, Miller MC, et al. The use of multiple novel tumor markers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol* 2008;108:402-408.

13. Bray F, Loos AH, Tognazzo S, La Vecchia C. Ovarian cancer in Europe: Cross-sectional trends in incidence and mortality in 28 countries, 1953-2000. *Int J Cancer* 2005;113(6):977-90.
14. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. Ovarian Cancer: Screening, treatment and follow-up. *Gynecol Oncol* 1994;55:S4-14.
15. ACOG Practice Bulletin. Clinical Management Guideline for Obstetrician-Gynecologists. Management of Adnexal Masses. *Obstet Gynecol* 2007;110:201-213.
16. Finkler NJ, Benacerraf B, Lavin PT, Wojciechowski C, Knapp RC. Comparison of serum CA 125, clinical impression and ultrasound in the preoperative evaluation of ovarian masses. *Obstet Gynecol* 1988;72:659-64.
17. Maggino T, Gadducci A, D'Addario V, et al. Prospective Multicenter Study on CA 125 in postmenopausal pelvic masses. *Gynecol Oncol* 1994;54:117-123.
18. Roman LD, Muderspach LI, Stein SM, et al. Pelvic Examination, Tumor marker level, and Gray-Scale and Doppler Sonography in the prediction of pelvic cancer. *Obstet Gynecol* 1997;89:493-500.
19. DePriest PD, Shenson D, Fried A, et al. A morphology index based on sonographic findings in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1993;51:7-11.
20. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Exposure to Blood Borne Pathogens.
21. US Department of Health and Human Services: Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories: 4th Edition Washington DC: US Government Printing Office May, 1999.
22. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI), Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline – Second Edition. EP5-A2 (2004).
23. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI), Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline. EP17-A (2004).
24. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI), Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. EP6-A.
25. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI), Interference Testing in Clinical Chemistry, Approved Guideline, EP7-A.



Fujirebio Diagnostics AB
Majnabbeterminalen
SE-414 55 Göteborg
Sweden
Phone + 46 31 85 70 30
Fax + 46 31 85 70 40
info@fdab.com
www.fdab.com



HE4 EIA

Prod. No. 404-10

Naudojimo instrukcijos

Imunofermentinio tyrimo rinkinys

2008-09

Skirta 96 nustatymams

PASKIRTIS

HE4 EIA yra imunofermentinis tyrimas, skirtas kiekybiniam HE4 nustatymui žmogaus serume. Tyrimas yra skirtas naudoti kaip pagalbinė priemonė stebint atsaką į terapiją pacientams, sergantiems invaziniu epitelinio kiaušidžių vėžiu. Paciento serijinio tyrimo dėl HE4 vertės turi būti vertinamos kartu su kitais klinikiniais metodais, naudojamais kiaušidžių vėžio monitoringe.

Dar jis yra naudojamas kartu su ARCHITECT CA 125 II ar CanAg CA125 EIA kaip pagalbinė priemonė nustatant epitelinio kiaušidžių vėžio riziką moterims, turinčioms darinius apatinėje pilvo dalyje prieš menopauzę ir po menopauzės. Rezultatai turi būti interpretuojami kartu su kitais metodais pagal standartines klinikinio gydymo gaires.

SANTRAUKA IR TYRIMO PAAIŠKINIMAS

Human epididymis baltymas 4 (HE4) priklauso išrūgų rūgštinės keturi-sulfido (WFDC) baltymų šeimai su įtariamomis tripsino inhibitoriaus savybėmis. Kiti šios šeimos baltymai: SLPI, Elafinas ir PS20 (WFDC1) (1, 2). HE4 genas koduoja 13kD baltymą, nors savo galutinėje glikosлізуotoje formoje baltymas yra apie 20-25 kD, ir susideda iš vienos baltymo grandinės, turinčios du WFDC domenų (3). Pirmąkart HE4 buvo identifikuotas distalinio antskaidžio epitelyje ir pagal kilmę buvo nustatytas kaip proteazės inhibitorius, dalyvaujantis spermatozoidų brendime (4, 5). Šiandien yra nustatyta, kad HE4 yra ekspresuojamas keliuose normaliuose audiniuose, įskaitant kvėpavimo ir reprodukcinę audinių bei kiaušidžių vėžio audinių epitelyje. (6-10). Be ekspresijos ląsteliniame lygmenyje, aukštos išskiriamos HE4 koncentracijos buvo aptiktos kiaušidžių vėžiu sergančių pacientų serume. Atlikus atvejo/kontrolės studiją, lyginant kiaušidžių vėžiu sergančius pacientus su sveikais ir nepiktybinėmis formomis sergančiais jautrumu prie 96% specifiškumo (11). Tolimesniame tyrime, kurio metu buvo nustatomi žinomi kiaušidžių vėžio biožymenys, HE4 parodė didžiausią kiaušidžių vėžio aptikimo jautrumą, ypatingai ankstyvojoje ligos stadijoje. Šioje studijoje, HE4 ir CA 125 kombinacija buvo tikslesnis piktybinių pakitimų prediktorius nei vienas šių žymenų, naudojamų atskirai, su 76% jautrumu ir 95% specifiškumu (12).

Kiaušidžių vėžys yra ketvirtoje vietoje visame pasaulyje pagal moterų mirties atvejus, sukeltus vėžio. Mirštamumas Europoje – nuo 3.6 iki 9.3 tenka 100.000 moterų (13). Kiaušidžių vėžio simptomai yra susiję su cistų buvimu ir dažnai yra neapibrėžti bei nespecifiniai. Pirminis cistos diagnostinio įvertinimo tikslas yra nustatyti, ar ji yra piktybinė ar gerybinė. Nustatyta, kad 5 – 10 procentų moterų Jungtinėse Valstijose yra operuojamos dėl įtariamų kiaušidžių neoplazmos, o 13 – 21 procentas šių moterų yra nustatomi piktybiniai

kiaušidžių pakitimai (14). Amerikos akušerių ir ginekologų praktikos koledžo 2007m. išleistame biuletenyje rašoma: “Kiaušidžių vėžiu sergančių moterų, prižiūrėtų gydytojų su papildoma kvalifikacija ir kompetencija kiaušidžių vėžio gydyme, tokių kaip onkoginekologai, išgyvenamumas yra daug didesnis nei pacienčių, kurios nebuvo gydomos pasitelkiant tokį bendradarbiavimą” (15). Kadangi dauguma cistų yra piktybinės, yra labai svarbu operatyviai nustatyti, ar pacientui yra didelė kiaušidžių piktybiškumo rizika, kad užtikrinti tinkamą gydymą (15). Nuo pirminės ataskaitos 1988m., klinikiniai simptomai, serumo CA125 bei ultragarsas kartu su CT skenavimu, MRI ir CT/PET yra standartai nustatant cistos piktybiškumą (16). Nors literatūroje yra gausu informacijos apie tai, kuris modalumas yra tikslesnis, fizinės apžiūros, CA125 ir vaizdo kombinacija suteikia aukščiausią numanomąją vertę (17-19). Pacientų su cistomis gydymo skubumo nustatymui HE4 EIA galima naudoti kartu su ARCHITECT CA 125 II ar CanAg CA125 EIA tyrimais kaip pagalbinę priemonę nustatant kiaušidžių epitelio vėžio riziką pacientei. Rezultatai turi būti interpretuojami kartu su kitais metodais pagal standartines klinikinio gydymo gaires. Papildomas HE4 EIA naudojimas yra pagalbinė priemonė stebint atsaką į terapiją pacientams, sergantiems invaziniu epiteliniu kiaušidžių vėžiu. Rezultatai turi būti vertinami kartu su kitais klinikiniais metodais, naudojamais kiaušidžių vėžio monitoringe.

TYRIMO PRINCIPAS

HE4 EIA yra kietos fazės, nekonkurencinis imunofermentinis tyrimas, pagrįstas sumuštinio technologija, naudojant du pelės monokloninius antikūnus: 2H5 ir 3D8, nukreiptus prieš du epitopus HE4 C-WFDC srityje. Kalibratoriai, kontrolės ir pacientų mėginiai yra inkubuojami kartu su biotiniuotu Anti-HE4 monokloniniu antikūnu (MAb) 2H5, esančiu streptavidinu padengtose mikrokuostelėse. Dėl biotiniuoto Anti-HE4 MAb, inkubacijos metu HE4, esantis kalibratoriuose ar mėginiuose, yra adsorbuojamas į streptavidinu padengtas mikrokuosteles. Tada juostelės yra plaunamos ir inkubuojamos HRP žymėtu Anti-HE4 MAb 3D8. Po praplovimo, buferizuotas substratas/chromogeninis reagentas (vandenilio peroksidas ir 3, 3', 5, 5' tetra-metil-benzidinas) yra įdedamas į kiekvieną šulinėlį ir tada prasideda fermentų reakcija. Fermentų reakcijos metu atsiradusi mėlyna spalva reiškia, kad antigenas yra. Spalvos intensyvumas yra proporcingas mėginyje esančio HE4 kiekiui. Spalvos intensyvumas yra nustatomas mikroplokštelių spektrofotometru ties 620 nm (ar prie 405 nm po Stop tirpalo įdėjimo).

Kalibracijos kreivės sukuriamos kiekvienam tyrimui, absorbcijos vertę palyginant su kiekvieno kalibratoriaus koncentracija. Paciento mėginio HE4 koncentracija yra skaitomos iš kalibravimo kreivės.

REAGENTAI

- Kiekvienas HE4 EIA rinkinys yra sudarytas iš reagentų, skirtų 96 tyrimams.
- Rinkinio galiojimo data yra nurodyta etiketėje, esančioje išorinėje dėžutės pusėje.
- Nenaudokite rinkinio pasibaigus jo galiojimo datai.
- Nemaišykite skirtingų serijų reagentų.
- Rinkinį laikykite prie 2–8°C. Neužšaldykite.
- Atidaryti reagentai yra stabilūs ir neužteršti, jei yra laikomi sąlygomis, nurodytomis žemiau esančioje lentelėje. Reagentai turi būti laikomi savo originaliose pakuotėse ir naudojami kaip nurodyta. Po naudojimo, nedelsiant grąžinkite reagentus į 2-8°C temperatūrą.

Komponentas	Kiekis	Laikymas ir stabilumas po pirmo naudojimo
-------------	--------	---

MICROPLA

Streptavidino mikroplokštelė	1 plokštelė	2—8°C iki galiojimo datos pabaigos, nurodytos ant plokštelės
-------------------------------------	-------------	--

12 x 8 dūžtančių šulinėlių, padengtų streptavidinu. Po atidarymo, nepanaudotas juosteles nedelsiant įdėkite į aliuminio pakuotę su desikantu. Kruopščiai uždarykite, kad pakuotė išliktų sausa.

CAL	HE4	A	
HE4 Kalibratorius A		1 x 8 mL	2—8°C iki galiojimo datos pabaigos, nurodytos ant buteliuko

Fosfato buferizuotas druskos tirpalas, sudėtyje turintis jaučio serumo albumino, inertiško geltono dažo ir beazidžio antimikrobinio konservanto. Paruoštas naudoti. Taip pat gali būti naudojamas mėginių skiedimui.

HE4 Kalibratoriai B-F	5 buteliukai, liofilizuoti	Stabilumas po ištirpinimo 4 savaitės prie 2-8°C 4 mėnesiai prie -20°C ar žemesnės
------------------------------	----------------------------	---

CAL	HE4	B	1 x 1 mL
CAL	HE4	C	1 x 1 mL
CAL	HE4	D	1 x 1 mL
CAL	HE4	E	1 x 1 mL
CAL	HE4	F	1 x 1 mL

Liofilizuoti kalibratoriai sudėtyje turi HE4 antigeną fosfato buferizuotame druskos tirpale, kurio sudėtyje yra jaučio serumo albumino, inertiško geltono dažo ir beazidžio antimikrobinio konservanto. Prieš naudojimą tirpinamas distiliuotame ar dejonizuotame vandenyje.

PASTABA: tiksli HE4 koncentracija yra specifinė serijai ir yra nurodoma ant kiekvieno buteliuko etiketės.

HE4 kontrolės	2 buteliukai, liofilizuoti	Stabilumas po ištirpinimo 4 savaitės prie 2-8°C 4 mėnesiai prie -20°C ar šalčiau
----------------------	----------------------------	--

CONTROL	HE4	1	1 x 1 mL
CONTROL	HE4	2	1 x 1 mL

Liofilizuotos kontrolės sudėtyje yra HE4 antigeno žmogaus serumo matricoje ir beazidžio antimikrobinio konservanto. Prieš naudojimą tirpinamas distiliuotame ar dejonizuotame vandenyje.

BIOTIN Anti-HE4

Biotinas Anti-HE4	1 x 15 mL	2—8°C iki galiojimo datos pabaigos, nurodytos ant buteliuko
--------------------------	-----------	---

Biotin Anti-HE4 monokloninis antikūnas iš pelės, apie 1 µg/mL. Sudėtyje turi fosfato buferizuoto tirpalo (pH 7.2), jaučio serumo albumino, blokuojančių agentų, detergento, inertiško raudono dažo, ir beazidžio antimikrobinio konservanto. Paruoštas naudoti.

Komponentas	Kiekis	Laikymas ir stabilumas po pirmo naudojimo
-------------	--------	---

CONJ Anti-HE4
Nešėjas, HRP Anti-HE4

1 x 0.75 mL

2—8°C iki galiojimo datos pabaigos, nurodytos ant buteliuko

HRP Anti-HE4 monokloninio pelės antikūno tirpalas, apie 40 µg/mL. Sudėtyje turi beazidžių antimikrobinių konservantų. Prieš naudojimą atskiedžiamas nešėjo tirpalu (*Tracer Diluent*).

DIL CONJ
Nešėjo skiediklis

1 x 15 mL

2—8°C iki galiojimo datos pabaigos, nurodytos ant buteliuko

Fosfato buferizuotas tirpalas (pH 7.2) su jaučio serumo albuminu, blokuojančiais agentais, detergentais, inertišku mėlynu dažu ir beazidžiu antimikrobiniu konservantu. Paruoštas naudoti.

SUBS TMB
TMB HRP-Substratas

1 x 12 mL

2—8°C iki galiojimo datos pabaigos, nurodytos ant buteliuko

Sudėtyje turi buferizuoto vandenilio peroksido ir 3, 3', 5, 5' tetra-metilbenzidino (TMB). Paruoštas naudoti.

STOP

Stop tirpalas

1 x 15 mL

2—8°C iki galiojimo datos pabaigos, nurodytos ant buteliuko

Sudėtyje turi 0.12 M hidrochlorido rūgšties. Paruoštas naudoti.

WASHBUF 25X
Praplovimo koncentratas

1 x 50 mL

2—8°C iki galiojimo datos pabaigos, nurodytos ant butelio

Tris-HCl buferizuotas druskos tirpalas su Tween 20. Sudėtyje yra Germall II kaip konservantas. Prieš naudojimą 25 kartus skiedžiamas distiliuotu ar dejonizuotu vandeniu.

Nestabilumo indikacijos

TMB HRP-Substratas turi būti bespalvis arba švelniai mėlyvas. Mėlyna spalva indikuoja apie reagento užterštumą. Reagento naudoti nebegalima.

ĮSPĖJIMAI IR ATSARGUMO PRIEMONĖS

In Vitro diagnostiniam naudojimui:

- Laikykitės instrukcijų, pateikiamų pakuotės aprašyme. Tyrimo rezultatų patikimumas negali būti garantuotas, jei nebus laikomasi instrukcijų, pateikiamų pakuotės aprašyme.
- Visus pacientų mėginius laikykite potencialiai infekciškais. Žmogaus kilmės reagentus ir žmogaus mėginius rekomenduojama naudoti laikantis OSHA standarto dėl kraujo kilmės patogenų (20). Biologinio saugumo lygis - 2 (21) ar bet kurios kitos atitinkamos biologinio saugumo priemonės turi būti naudojamos medžiagoms, kurios gali turėti infekcinių agentų.
- Dėl atliekų išmetimo laikykitės vietinių nurodymų.

Įspėjimas

Medžiagos, naudotos ruošiant žmogaus kilmės reagentus, buvo ištirtos ir nustatyta, kad jos yra nereaktyvios su ŽIV 1 ir 2 antikūnais, ŽCV antikūnu ir Hepatito B paviršiaus antigenu

(HBsAg). Kadangi joks metodas negali visiškai užtikrinti kraujo kilmės ligų nebuvimo, šio produkto žmogaus kilmės reagentus reikia naudoti ir utilizuoti kaip potencialiai infekcinius.

MĖGINIŲ SURINKIMAS IR NAUDOJIMAS

HE4 EIA yra skirtas naudoti su serumu (įskaitant serumą, surinktą atskyrimo mėgintuvėliuose (SST)). Plazma ar kiti kūno skysčiai nėra patvirtinti naudojimui su HE4 EIA. Kraują surinkite venos punkcijos būdu, laikydamiesi gamintojo pateikiamų instrukcijų dėl mėgintuvėlių naudojimo. Jei yra vertinami serijiniai mėginiai, visos studijos metu turi būti naudojamas to paties tipo mėginys. Prieš atliekant tyrimą, serumas gali būti laikomas prie 2—8°C iki 3 dienų. Jei norite laikyti ilgesnį periodą – mėginius laikykite prie -40°C ar šalčiau.

Mėginius įneškite į kambario temperatūrą ir prieš pradedant tyrimą KRUOPŠČIAI išmaišykite keletą kartų švelniai apversdami. Mėginiai, turintys didelių kietųjų dalelių, turi būti centrifuguojami prie 10.000 x g 10 minučių prieš naudojimą tam, kad visos dalelės, atsiradusios atšilimo metu, būtų eliminuotos.

PROCEDŪRA

Reikalingos, bet su rinkiniu netiekiamos medžiagos

1. Mikroplokštelių purtyklė

Purtymas turėtų būti vidutinis - stiprus, apie 700-1100 virpesių/min.

2. Mikroplokštelių plovyklė

Automatinė lėkštelių plovyklė, atliekanti 1, 3 ir 6 plovimo ciklus su minimaliu 350 µL/šulinėlio/plovimo cikle užpildymo tūriu.

Jei nėra naudojama automatinė mikroplokštelių plovyklė, rekomenduojama naudoti 8 kanalų dozatorių su vienkartiniais plastikiniais antgaliais, dozuojančiais po 350 µL.

3. Mikroplokštelių spektrofotometras

Bangos ilgis – 620 nm ir/ar 405 nm, absorbcijos ribos 0 – 3.0.

4. Tikslūs dozatoriai

Su vienkartiniais plastikiniais antgaliais, dozuojančiais turį mikrolitrais. Nereikalaujama, bet rekomenduojama turėti 8 kanalų dozatorių su vienkartiniais plastikiniais antgaliais, dozuojančiais po 100 µL. Dozatoriai, turį dozuojančiais mililitrais.

5. Distiliuotas ar dejonizuotas vanduo

HE4 kalibratorių, HE4 kontrolių ir skiesto praplovimo tirpalo atskiedimui.

Procedūros pastabos

1. Norint tinkamai naudoti HE4 EIA rinkinį, yra būtina atidžiai perskaityti šį pakuotės aprašymą. Reagentai, tiekiami kartu su šiuo rinkiniu, yra naudojami kaip neatskiriama rinkinio dalis. Nemaišykite reagentų iš skirtingų rinkinių su skirtingais serijų numeriais. Nenaudokite reagentų pasibaigus jų galiojimo datai, atspausdintai ant išorinės rinkinio dėžutės pusės.

2. Prieš naudojimą reagentams leiskite sušilti iki kambario temperatūros (20–25°C). Užšalę mėginiai po atšildymo turi būti sumaišomi švelniai bet kruopščiai. Tam, kad gauti tikslius rezultatus, tyrimas turi būti atliekamas prie 20—25°C temperatūros.

3. Prieš pradedant dozuoti kalibratorius ir pacientų mėginius, patartina pasižymėti juosteles, kad tyrimo metu ir po jo mėginys būtų lengvai identifikuojamas.

4. Vienas iš svarbiausių reikalavimų EIA tyrimo – veiksmingas ir kruopštus praplovimas susirišusiems ir nesusirišusiems antigenams bei reagentams iš kietos fazės susirišti su antikūnų – antigenų kompleksais. **Praplovimo veiksmingumo užtikrinimui, kiekvieno**

plovimo ciklo metu, įsitikinkite, kad ysi šulinėliai yra iki galo pripildyti praplovimo tirpalu, kad tirpalas buvo dozuotas tinkama srove, kad aspiracija tarp plovimo ciklų ir po jų yra tinkama ir šulinėliai yra tušti. Jei šulinėliuose yra likę skysčio, kruopščiai išsausinkite jį sugeriamuoju popieriumi.

- Automatinė juostelių plovyklė: laikydamiesi gamintojo pateikiamų instrukcijų dėl valymo ir palaikymo, paleiskite reikiamą praplovimų ciklų skaičių prieš ir po kiekvieno inkubacijos etapo. Aspiracijos/plovimo įtaisas neturėtų ilgą laiką stovėti kairėje su praplovimo tirpalu, kadangi gali greitai užsikimšti adatos, o to pasekoje – prastas skysčio padavimas bei aspiracija.

5. TMB HRP substratas yra labai jautrus užterštumui. Optimalaus TMB HRP substrato išlaikymui, reikiamą kiekį įpilkite į kruopščiai išvalytą rezervuarą arba vienkartinį plastikinį padėklą, kad išvengtumėte reagento užteršimo. Naudokite tik švarų vienkartinį plastikinį dozatoriaus antgalį.

6. Dirbant su reagentais ir mėginiais naudokite tik švarius vienkartinius plastikinius dozatorių antgalius ir tinkamą tikslią dozavimo technologiją. Neleiskite, kad dozatoriaus antgalis prisiliestų prie skysčio paviršiaus ir taip būtų išvengta užkrato pernešimo. Kruopštaus dozavimo technologija yra labai svarbi dirbant su mėginiais ir TMB HRP substrato tirpalu.

Reagentų paruošimas

HE4 kalibratoriai B-F

Paruošto reagento stabilumas

4 savaitės prie 2–8°C

4 mėnesiai prie -20°C ar šalčiau

Ilašinkite tiksliai 1.0 mL distiliuoto ar dejonizuoto vandens į kiekvieną buteliuką. Leiskite pabūti mažiausiai 15 minučių iki skiedimo, o prieš naudojimą – švelniai sumaišykite. PASTABA: kalibratorių koncentracija yra pateikiama ant etikečių ir turi būti įtraukta į rezultatų apskaičiavimus.

Reagentų paruošimas

HE4 1 ir 2 kontrolės

Paruošto reagento stabilumas

4 savaitės prie 2–8°C

4 mėnesiai prie -20°C ar šalčiau

Ilašinkite tiksliai 1.0 mL distiliuoto ar dejonizuoto vandens į kiekvieną buteliuką. Leiskite pabūti mažiausiai 15 minučių iki skiedimo, o prieš naudojimą – švelniai sumaišykite.

PASTABA: kontrolių ribos yra pateiktos ant etikečių.

Praplovimo tirpalas

2 savaitės prie 2–25°C uždarytame konteineryje

Ilašinkite 50 mL praplovimo koncentrato į švarų konteinerį ir atskieskite 25-gubai pridėdami 1200 mL distiliuoto ar dejonizuoto vandens, kad gautumėte buferizuotą praplovimo tirpalą.

Nešėjo tirpalas

4 savaitės prie 2–8 °C uždarytame konteineryje

Paruoškite reikalingą nešėjo tirpalo kiekį sumaišant 50 µL nešėjo, HRP Anti-HE4 su 1 mL nešėjo skiediklio vienai juostelei (žiūrėkite žemiau esančią lentelę):

Juostelių skaičius	Nešėjas, HRP Anti-HE4 (μL)	Nešėjo tirpalas(mL)
1	50	1
2	100	2
3	150	3
4	200	4
5	250	5
6	300	6
7	350	7
8	400	8
9	450	9
10	500	10
11	550	11
12	600	12

Nešėjo tirpalo paruošimui naudokite tik švarius plastikinius mėgintuvėlius.

Alternatyva: Nešėjo, HRP Anti-HE4 turinį supilkite į nešėjo skiediklio buteliuką ir švelniai išmaišykite. Įsitikinkite, kad visas nešėjo, HRP Anti-HE4 turinys pateko į nešėjo skiediklio buteliuką.

PASTABA: nešėjo darbinis tirpalas yra stabilus 4 savaites prie 2–8°C. Nepasiruoškite tirpalo daugiau nei sunaudosite per šį laiko tarpą.

TYRIMO PROCEDŪRA

Kiekvieną nustatymą atlikite dvigubu pakartojimu su abiem kalibratoriais, kontrolėmis ir nežinomais mėginiais. Kiekvieno tyrimo metu turi būti brėžiama kalibracijos kreivė. Prieš naudojimą visi mėginiai ir reagentai turi būti įnešti į kambario temperatūrą (20—25°C).

1. Paruoškite kalibratorius B-F, kontroles 1 ir 2, praplovimo tirpalą ir nešėjo darbinį tirpalą. Labai svarbu naudoti tik švarius konteinerius. Atidžiai laikykitės instrukcijų.

2. Reikiamą juostelių kiekį įkelkite į juostelių rėmelį (likusias juosteles nedelsiant gražinkite į aliuminio pakuotę su desikantu ir kruopščiai uždarykite). Kiekvieną juostelę vieną kartą perplaukite su praplovimo tirpalu. Neplaukite tokio juostelių kiekio, kurio nebūtų galima apdoroti per 30min.

3. Dozuokite 25 μL kiekvieno HE4 kalibratoriaus (CAL A, B, C, D, E ir F), HE4 kontrolių (C1, C2) nežinomų mėginių (Unk) į juostelių šulinėlius pagal šią schemą:

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

4. Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite 100 µL Biotin Anti-HE4 naudodamiesi 100 µL tikslumo dozatoriumi (ar 8 kanalų 100 µL tikslumo dozatoriumi). Neleiskite, kad dozatoriaus antgalis prisiliestų prie skysčio paviršiaus ir taip būtų išvengta užkrato pernešimo.
5. Lėkštelę inkubuokite 1 valandą ($\pm$ 10 min) kambario temperatūroje (20-25°C), nepertraukiamai purtant lėkštelę ant mikrolėkštelių purtyklės.
6. Po pirmojo inkubavimo kiekvieną juostelę aspiruokite ir praplaukite 3 kartus naudodami praplovimo procedūrą, pateikiamą skyriaus "Procedūros pastabos" 4 punkte.
7. Įlašinkite 100 µL nešėjo darbinio tirpalo į kiekvieną šulinėlį. Naudokite skyriaus "Procedūros pastabos" 4 punkte aprašomą dozavimo procedūrą.
8. Rėmelį inkubuokite 1 valandą ($\pm$ 5 min) kambario temperatūroje (20–25°C) esant pastoviam purtymui.
9. Po antrojo inkubavimo kiekvieną juostelę aspiruokite ir praplaukite 6 kartus naudodami praplovimo procedūrą, pateikiamą skyriaus "Procedūros pastabos" 4 punkte.
10. Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite 100 µL TMB HRP substrato naudodamiesi skyriaus "Procedūros pastabos" 4 punkte aprašoma dozavimo procedūra. TMB HRP substratas turi patekti į šulinėlius kaip įmanoma greičiau, o laikas tarp įlašinimo į pirmąjį ir paskutinįjį šulinėlius, negali būti ilgesnis nei 5 minutės.
11. Inkubuokite 30 min. ($\pm$ 5 min.) kambario temperatūroje (20–25°C) esant pastoviam purtymui. Venkite tiesioginės saulės šviesos.
12. Nedelsiant nuskaitykite absorbciją prie 620 nm mikrolėkštelių spektrofotometru.

Galimybė

Jei laboratorijoje nėra mikrolėkštelių skaitytuvo, galinčio nuskaityti prie 620 nm, absorbcija gali būti nustatoma kaip aprašyta 12 punkte:

12. Alternatyva - įlašinkite 100 µL Stop tirpalo, išmaišykite ir nuskaitykite absorbciją prie 405 nm mikrolėkštelių spektrofotometru per 15 minučių po Stop tirpalo įdėjimo.

Matavimo ribos

HE4 EIA matuoja koncentracijas nuo 15 iki 900 pM. Jei HE4 koncentracija viršija numatytąją ribą, prieš tyrimą rekomenduojama mėginius praskiesti HE4 kalibratoriumi (žr. "Skiestų mėginių rezultatų apskaičiavimas").

Kokybės kontrolė

HE4 kontrolės 1 ir 2 turi būti naudojamos kiekvienos tyrimo serijos patvirtinimui. Tikėtinų rezultatų ribos yra pateiktos ant buteliukų etikečių.

HE4 tyrimo rezultatai turi būti laikomi teisingais, jei:

- Kontrolės dublikatų vidutinės vertės yra nurodytose ribose.
- Kalibratorių B-F ir kontrolių dublikatų pakartojimo CV neviršija 15%.
- Kalibratoriaus A (nulinio) dublikato pakartojimų skirtumas nėra didesnis nei 0.06 OD vienetų.

Jei tyrimo kalibratoriaus ar kontrolės rezultatai yra klaidingi, būtina patikrinti reagentus, dozatorių tikslumą, lėkštelių plovėjo ir skaitytuvo veiksmingumą bei pakartoti tyrimą. Kiekviena laboratorija gali pasiruošti savo skirtingų lygių serumo mišinius, kurie gali būti naudojami kaip vidinės kontrolės, kad užtikrinti tyrimo preciziškumą.

Referentinė medžiaga

Kadangi nėra jokių bendrų referentinių medžiagų HE4 antigenui, HE4 EIA kalibratoriaus vertės yra pasirenkamos pagal vidinius referentinius standartus.

REZULTATŲ APSKAIČIAVIMAS

Jei yra naudojamas spektrofotometras yra su įdiegta duomenų apskaičiavimo programa, pagal spektrofotometro naudojimo instrukcijas sukurkite programą naudojant koncentracijas, pateikiamas ant kiekvieno HE4 kalibratoriaus buteliuko etiketės.

Automatiniam HE4 rezultatų apskaičiavimui rekomenduojama naudoti vieną šių metodų:

- Kubinio lanko kreivės (*cubic spline curve*) metodas. Kalibratorius A turi būti įtrauktas į kreivę su 0 pM verte.
- Interpoliacija su “taškas prie taško” (*point-to-point*) vertinimu. Kalibratorius A turi būti įtrauktas į kreivę su 0 pM verte.
- Kvadratinės kreivės (*quadratic curve*) metodas. Kalibratorius A turi būti įtrauktas į kreivę su 0 pM verte.

PASTABA: 4-parametrų linijiniai progresijos vertinimo metodai neturi būti naudojami. Atliekant rankinį įvertinimą, Kalibracijos kreivė yra sudaroma kiekvieno HE4 kalibratoriaus gautas absorbcijos (A) vertės atidedant prieš atitinkamą HE4 koncentraciją pM vertę.

Tada nežinomos HE4 koncentracijos gali būti nuskaitomos iš Kalibracijos kreivės naudojant kiekvieno paciento vidutinę absorbcijos vertę.

Skieštų mėginių rezultatų apskaičiavimas

Jei pradiniam tyime mėginiai rodo HE4 lygį didesnę nei 900 pM, mėginiai turi būti skiedžiami santykiu 1/10 ir 1/100 su HE4 kalibratoriumi A, kad gautumėte tikslią HE4 koncentraciją mėginiuose.

- 1/10 skiedimas = 50 µL mėginio + 450 µL HE4 kalibratoriaus A

- 1/100 skiedimas = 50 µL su 1/10 skiedimu + 450 µL HE4 kalibratoriaus A

Neskiesto mėginio HE4 koncentracija yra apskaičiuojama šitaip:

- Skiedimas 1/10: 10 x išmatuota vertė

- Skiedimas 1/100: 100 x išmatuota vertė

Kiaušidžių navikų rizikos algoritmas (ROMA), skirtas kiaušidžių epitelinio vėžio rizikos nustatymui moterims su dariniais apatinėje pilvo dalyje prieš menopauzę ir po jos.

Prognozinio indekso apskaičiavimas

Prognozinis indeksas (PI) yra skaičiuojamas skirtingai moterims prieš menopauzę ir moterims po menopauzės naudojant lygtis (1) ir (2), pateikiamas žemiau. Norint apskaičiuoti PI, tyrimo vertės, gautos iš HE4 EIA ir ARCHITECT CA125 II arba CanAg CA125 EIA tyrimų, atitinkamai, yra įstatomos į žemiau pateikiamo algoritmo atitinkamą lygtį, priklausomai nuo to, ar moteris yra prieš menopauzės laikotarpį ar po jo.

(1) Moterys prieš menopauzę

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

(2) Moterys po menopauzės

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

ROMA vertės apskaičiavimas

Norėdami apskaičiuoti ROMA vertę (t.y. prognozinę tikimybę), apskaičiuotą prognozinio indekso vertę įrašykite į lygtį (3):

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

Žemiau pateikiami pavyzdžiai gali būti naudojami PI ir ROMA verčių patvirtinimui:

Menopauzės Būsena	HE4 (pM)	CA125 (U/mL)	PI apskaičiavimas	PI	ROMA (%)
Prieš menopauzę	37.5	74.9	- $12.0+(2.38*3.624)$ $+(0.0626*4.316)$	-3.10388	4.29
Prieš menopauzę	386.6	21.8	- $12.0+(2.38*5.957)$ $+(0.0626*3.082)$	2.371517	91.5
Po menopauzės	66.7	11.3	- $8.09+(1.04*4.200)$ $+(0.732*2.425)$	-1.94683	12.5
Po menopauzės	383.1	22.7	- $8.09+(1.04*5.948)$ $+(0.732*3.122)$	0.381799	59.4

PROCEDŪROS APRIBOJIMAI

Pacienčių, kurioms yra patvirtintas kiaušidžių vėžys, HE4 tyrimo vertė gali visiškai nesiskirti nuo sveikų moterų. Tam tikri kiaušidžių vėžio, t.y. mucino ar germinių ląstelių auglių, histologiniai tipai retai ekspresuoja HE4, todėl nėra rekomenduojama stebėti HE4 pacientėms su žinomu mucino ar germinių ląstelių vėžiu (7). Kita vertus, padidėjęs HE4 antigeno lygis gali pasireikšti asmenims su nepiktybiniu susirgimu. Todėl HE4 negali būti naudojamas kaip absoliutus piktybinio susirgimo buvimo ar nebuvimo įrodymas. HE4 tyrimas negali būti naudojamas vėžio skryninge. Tyrimo rezultatai turi būti interpretuojami tik kartu su kitais susirgimo diagnozavimo tyrimais ir procedūromis bei atsižvelgiant į paciento gydymą. HE4 tyrimas negali pakeisti nustatytų klinikinių tyrimų.

Kiaušidžių piktybinių navikų algoritmas nėra patvirtintas šioms pacientų grupėms: pacientai, anksčiau gydyti nuo piktybinių navikų, pacientai gydomi chemoterapija ir pacientai < 18 metų. Matematinė funkcija, vadinama kiaušidžių navikų rizikos algoritmu (ROMA), priklauso nuo iki menopauzinės ar po menopauzinės moters būklės. Menopauzinė būklė turi būti grindžiama kiaušidžių funkcijos įvertinimu, atliktu atsižvelgiant į klinikinį įvertinimą bei medicinos istoriją. Į ROMA vertę nėra įtraukiamas amžius, šeimos istorija, klinikinės išvados ar echoskopijos rezultatai. Ši vertė turi būti vertinama kartu su aukščiau minėtais parametrais. Nepavykus atlikti HE4 EIA ir/ar CA125 tyrimą kaip nurodyta, ar rezultatų apskaičiavime atsiradus klaidai, rizikos įvertinimas bus netikslus, o pacientei bus paskirtas netinkamas gydymas. Specifiškai, klaidingai žemas tyrimo rezultatas gali būti interpretuojamas, kad pacientė yra mažesnės kiaušidžių epitelinio vėžio susirgimo rizikos grupėje, taip pacientei suteikiant mažiau specializuotą medicininę priežiūrą. Tyrimo rezultatų naudojimas neatsižvelgiant į kitas laboratorines išvadas, echoskopijos tyrimą bei klinikinį įvertinimą, gali sukelti pavojų.

Anti-reagento antikūnai (žmogaus anti-pelės antikūnas (HAMA) ar heterofiliniai antikūnai), esantys pacientės mėginyje, gali interferuoti su tyrimu, nepaisant to, kad buferiuose yra įdėta specifinio blokuojančių agentų. Tyrimas turi būti atliekamas reguliuojamos temperatūros patalpoje, kadangi inkubacija, atliekama aukštesnėje temperatūroje nei rekomenduojama (20 - 25°C), gali sukelti klaidingai žemus rezultatus.

TIKĖTINOS VERTĖS

HE4 lygių pasiskirstymas 1147 mėginiuose yra pavaizduotas žemiau esančioje lentelėje:

HE4 tyrimo verčių pasiskirstymas					
	Subjektų skaičius	0 – 150 pM	150.1 – 300 pM	300.1- 500 pM	> 500 pM
AKIVAIZDŽIAI SVEIKI					
Moterys (prieš menopauzę)	76	72	3	0	1
Moterys (po menopauzės)	103	97	5	0	1
GERYBINĖ BŪKLĖ					
Nėštumas	22	21	1	0	0
Gerybinis ginekologinis susirgimas	347	324	18	1	4
Kiti gerybiniai susirgimai	108	82	8	7	11
Hipertenzija/Kong. Širdies nepakankamumas	96	75	16	2	3
Vėžys					
Kiaušidžių vėžys	127	27	18	21	61
Krūties vėžys	46	40	4	2	0
Plaučių vėžys	50	29	15	6	0
Endometriumo vėžys	116	86	15	4	11
Virškinamojo trakto vėžys	56	47	8	0	1

Šioje studijoje 94.4% sveikų moterų HE4 tyrimo vertė buvo 150 pM ar žemiau. Kiekvienai laboratorijai yra rekomenduojama pasitvirtinti savo referentinę populiacijos vertę.

Pacienčių, sergančių kiaušidžių vėžiu, ligos būklės stebėjimas

HE4 EIA, kaip pagalbinės pacienčių, sergančių kiaušidžių vėžiu, ligos būklės stebėjimo priemonės, efektyvumas buvo nustatytas įvertinant HE lygio pakitimus serijiniuose serumo mėginiuose, surinktuose iš 80, palyginti su ligos būklės pasikeitimu. Studijoje buvo naudojamos 354 stebėjimų poros su vidutiniu 4.4 paciento stebėjimų skaičiumi. HE4 teigiamas pasikeitimas buvo charakterizuojamas kaip vertės, kuri buvo mažiausiai 25% didesnė nei prieš tai buvusi tyrimo vertė, padidėjimas. Vertinant šį lygio pakitimą, yra atsižvelgiama į tyrimo kintamumą ir biologinį kintamumą. Šešiasdešimt procentų (60%) arba 76/126 pacienčių mėginių su teigiamu pasikeitimu, koreliavo su ligos progresija, o septyniasdešimt penki procentai (75%) arba 171/228 pacienčių serijinių mėginių be jokių žymių HE4 vertės pakitimų, su progresija nekoreliavo. Bendras atitikimas studijoje buvo septyniasdešimt procentų (70% arba 247/354). Žemiau esančioje lentelėje duomenys yra pateikiami 2 x 2 formatu.

Ligos būklės pakitimas nuoseklioje porose			
HE-4 koncentracijos padidėjimas	Progresija	Jokios progresijos	Iš viso
>25%	76	57	133
≤ 25%	50	171	221
Iš viso	126	228	354

Žemiau pateikiamoje lentelėje pasiskirstymas yra pateikiamas pacientės atžvilgiu. Devyniasdešimt trys procentai (93%) arba 54/58 paciento serumo rinkinių su teigiamu

pakitimu koreliavo su ligos progresija, o trisdešimt du procentai (32%) arba 7/22 paciento serumo rinkinių be jokio žymesnio HE4 vertės pakitimo, su progresija nekoreliavo. Bendras atitikimas studijoje buvo septyniasdešimt šeši procentai (76 %) arba 61/80.

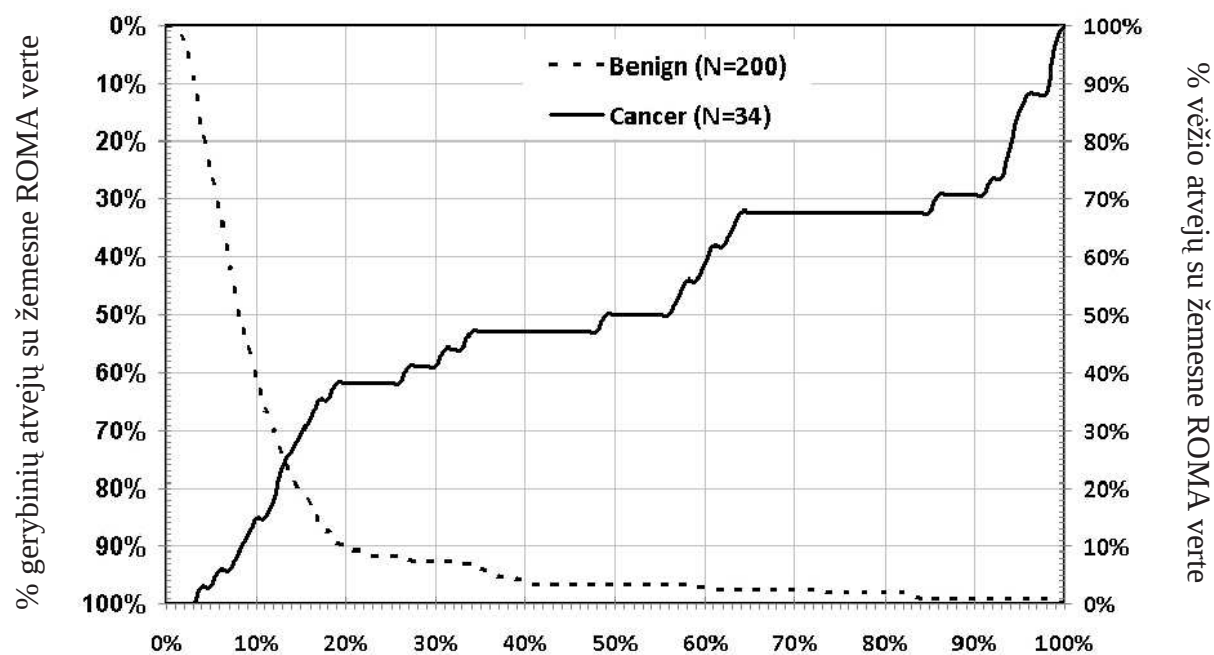
Ligos būklės pakitimas pacientei			
HE-4 koncentracijos padidėjimas	Progresija	Jokios progresijos	Iš viso
>25%	54	15	69
≤25%	4	7	11
Iš viso	58	22	80

Pacienčių su dariniais apatinėje pilvo dalyje, rizikos įvertinimas

HE4 EIA efektyvumas naudojant su CA125, atliktu su ARCHITECT CA125 II tyrimu arba CanAg CA125 EIA, dėl epitelinio kiaušidžių vėžio rizikos įvertinimo pacientėms su dariniais apatinėje pilvo dalyje, buvo vertinamas atliekant perspektyvinį klinikinį bandymą keliuose centruose vienu metu, dalyviams vienas apie kitą nežinant it vertinimą atliekant dvigubu pakartojimu. Algoritmas (ROMA) buvo sukurtas epitelinio kiaušidžių vėžio rizikai įvertinti. Algoritme yra įtrauktos HE4 ir CA125 vertės bei pacientės menopauzės statusas. Algoritmo pagalba yra apskaičiuojama prognozinė galimybė dėl epitelinio kiaušidžių vėžio aptikimo operacijos metu. Perspektyviojoje studijoje iš viso dalyvavo 502 pacientės. Studijos metu buvo nustatyta prognozinė epitelinio kiaušidžių vėžio galimybė ir remiantis ROMA vertėmis buvo atskirtos dvi – aukštos ir žemos – rizikos grupės.

Augantis ROMA verčių pasiskirstymo dažnis gerybiniais ir kiaušidžių vėžio atvejais, įskaitant žemo piktybiškumo potencialo auglius (LMP), atitinkamai naudojant algoritmą, yra pavaizduotas 1 ir 2 paveikslėliuose. Lentelėse 1 ir 2 vaizduojama HE4 EIA ir ARCHITECT CA125 II tyrimų kombinacija, lentelėse 3 ir 4 - HE4 EIA ir CanAg CA125 EIA kombinacija. Pasiskirstymo dažnio grafos iliustruoja pacientų su gerybiniais susirgimais ir epiteliniu kiaušidžių vėžio (įskaitant LMP) pasiskirstymą ties skirtingais ROMA verčių taškais.

Pav. 1 Augantis ROMA verčių pasiskirstymo dažnis moterims **prieš menopauzę**. HE4 EIA + ARCHITECT CA125 II tyrimų kombinacija.

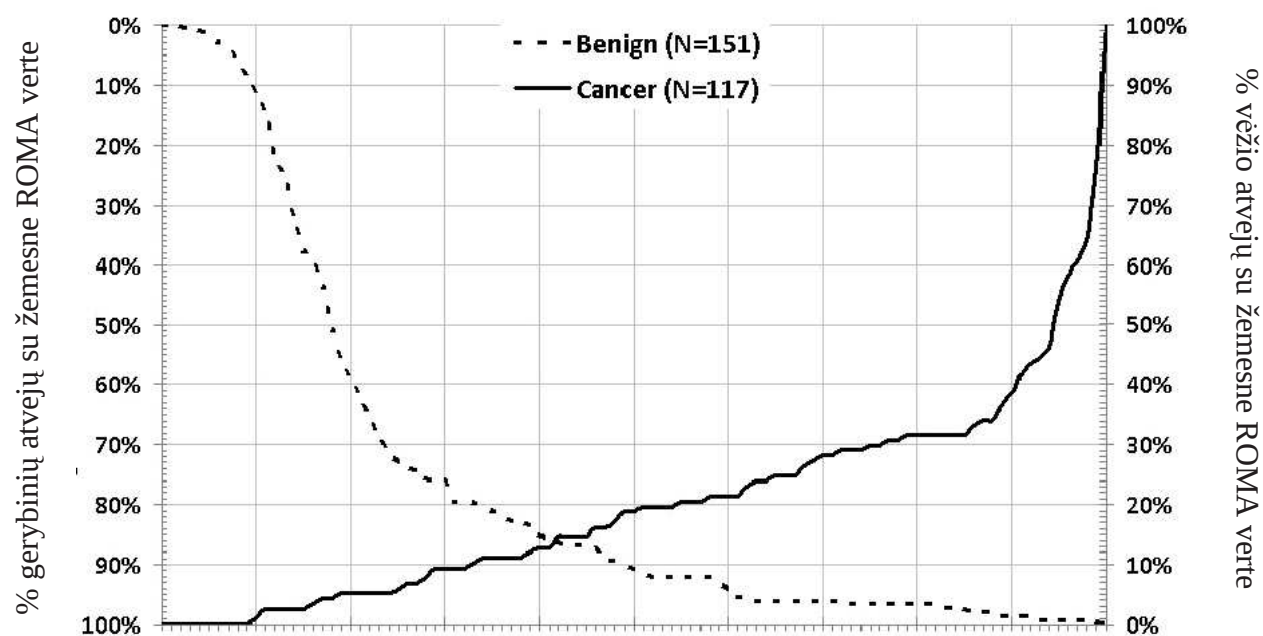


Benign – gerybiniai atvejai

Cancer - vėžys

ROMA vertė: HE4 EIA + ARCHITECT CA125 II

Pav. 2 Augantis ROMA verčių pasiskirstymo dažnis moterims **po menopauzės**. HE4 EIA + ARCHITECT CA125 II tyrimų kombinacija.

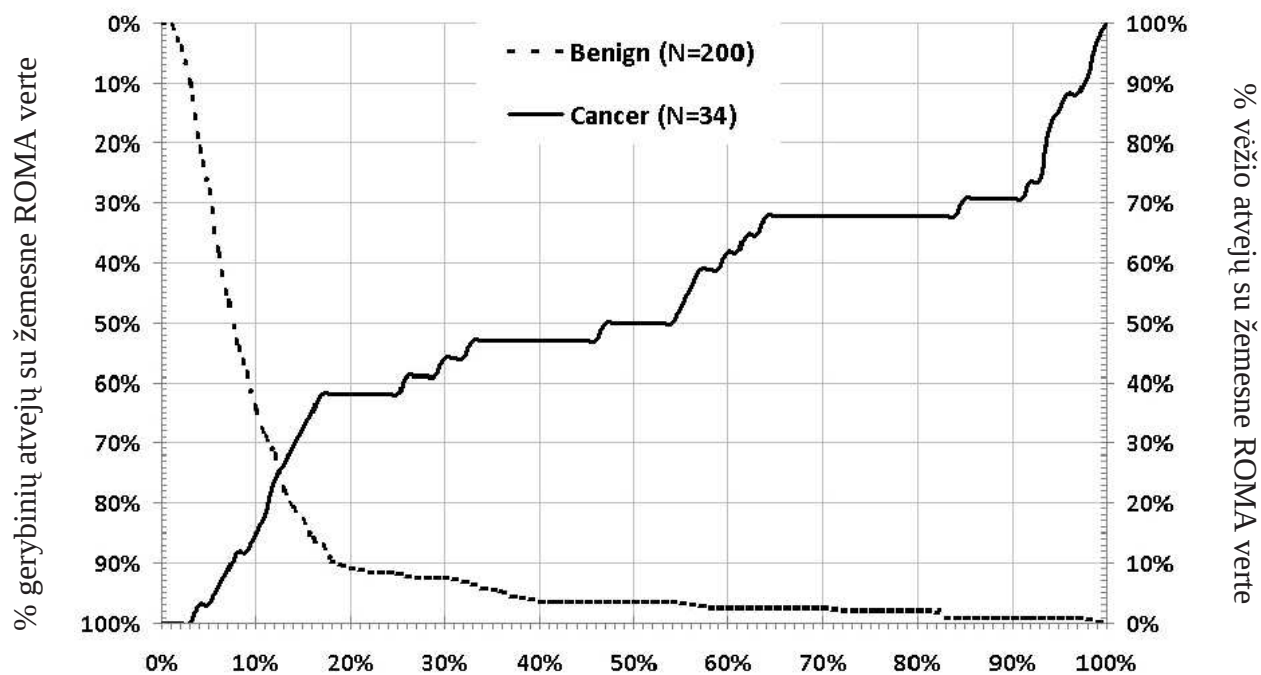


Benign – gerybiniai atvejai

Cancer - vėžys

ROMA vertė: HE4 EIA + ARCHITECT CA125 II

Pav. 3 Augantis ROMA verčių pasiskirstymo dažnis moterims **prieš menopauzę**. HE4 EIA + CanAg CA125 EIA kombinacija

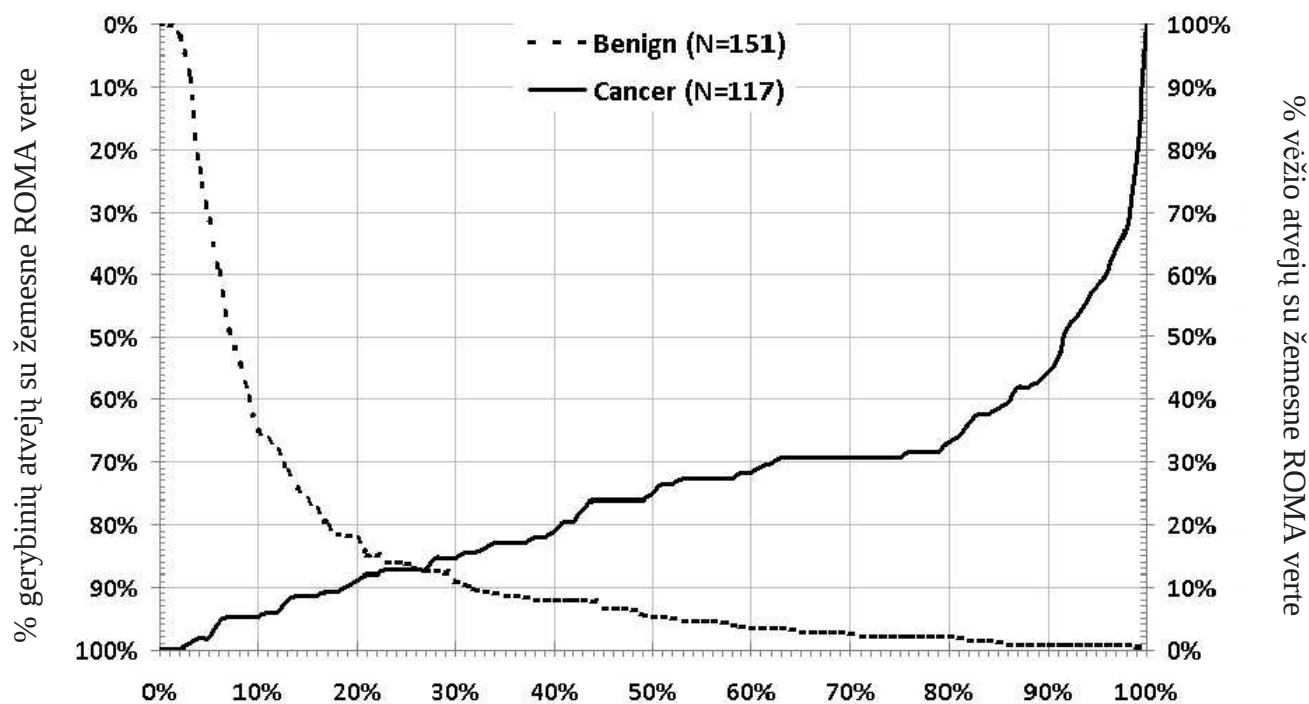


Benign – gerybiniai atvejai

Cancer - vėžys

ROMA vertė: HE4 EIA + CanAg CA125

Fig. 4 Augantis ROMA verčių pasiskirstymo dažnis moterims **po menopauzės**. HE4 EIA + CanAg CA125 EIA kombinacija.



Benign – gerybiniai atvejai

Cancer - vėžys

ROMA vertė: HE4 EIA + CanAg CA125

Stratifikacija į žemos ir aukštos rizikos grupes

Kiaušidžių piktybinių darinių algoritmas buvo naudojamas skirstant moteris į rizikos grupes, kad būtų galima aptikti kiaušidžių epitelinį vėžį. Žemiau pateikti slenkstiniai taškai buvo naudojami tam, kad numatyti 75% specifiškumo lygį HE4 EIA ir ARCHITECT CA125 II tyrimų kombinacijai:

Moterys prieš menopauzę

ROMA vertė $\geq 13.1\%$ = aukšta epitelinio kiaušidžių vėžio rizika

ROMA vertė $< 13.1\%$ = žema epitelinio kiaušidžių vėžio rizika

Moterys po menopauzės

ROMA vertė $\geq 27.7\%$ = aukšta epitelinio kiaušidžių vėžio rizika

ROMA vertė $< 27.7\%$ = aukšta epitelinio kiaušidžių vėžio rizika

Rizikos skirstymas į didelę riziką dėl epitelinio kiaušidžių vėžio pacientėms su cistomis naudojant ROMA vertes prie 75% specifiškumo, yra pateikiamas 1 lentelėje, įskaitant rizikos paskirstymą, atliktą atskiroms prieš menopauzės ir po menopauzės pacienčių grupėms. Pacienčių su I-IV stadijos epiteliniu kiaušidžių vėžiu stratifikavimo į aukštos rizikos grupę jautrumas buvo 94%, specifiškumas - 75%, o 75% moterų su gerybiniais dubens srities dariniais buvo klasifikuotos kaip žemos rizikos grupė.. Teigiama ir neigiama prognozinės vertės atitinkamai buvo 58 % ir 97%.

1 lentelė: epitelinio kiaušidžių vėžio (*Epithelial Ovarian Cancer (EOC)*) rizikos stratifikavimas į aukštą ir žemą pacientėms su cistomis, naudojant HE4 EIA ir ARCHITECT CA125 II tyrimų kombinaciją, kad apskaičiuoti ROMA vertę.

Stratifikavimo į priešmenopauzinę aukštos rizikos grupę slenkstinis taškas prie 75%, specifiškumo lygis - $\geq 13.1\%$,

Stratifikavimo į pomenopauzinę aukštos rizikos grupę slenkstinis taškas prie 75%, specifiškumo lygis $\geq 27.7\%$.

	Moterys prieš menopauzę n = 234	Moterys po menopauzės n = 268	Moterys prieš menopauzę ir po jos n = 502
Stadija I – IV EOC ir LMP kartu	26/34 (76%)	108/117 (92%)	134/151 (89%)
Žemas piktybiškumo potencialas	10/16 (63%)	3/6 (50%)	13/22 (59%)
Stadija I-II EOC	6/7 (86%)	24/28 (86%)	30/35 (86%)
Stadija I – IIICa EOC	7/8 (88%)	35/39 (90%)	42/47 (89%)
Stadija I – IV EOC	16/18 (89%)	105/111 (95%)	121/129 (94%)

A I – IIIb stadijos ir IIIC stadijos (Omentum neigiamas, limfinių mazgų – teigiamas) epitelinis kiaušidžių vėžys

Nėra jokių statistiškai svarbių jautrumo ir specifiškumo skirtumų tarp ROMA vertės, naudojant ARCHITECT CA125 II ar CanAg CA 125 EIA vertės diferencijuojant gerybinius susirgimus ir epitelinį kiaušidžių vėžį. Naudojant CanAg CA 125 EIA + HE4 EIA tyrimų kombinaciją, pacienčių, sergančių I-IV stadijos epiteliniu kiaušidžių vėžiu, stratifikavimo į aukštos rizikos grupę jautrumas buvo 93%. Teigiamos ir neigiamos prognozinės vertės

atitinkamai buvo 57% ir 97%. **Reikia pažymėti, kad skirtingi slenkstiniai taškai rizikos stratifikacijoje į aukštą ir žemą grupes, turi remtis naudojamu CA 125 tyrimu.**

Žemiau pateikiami slenkstiniai taškai buvo naudojami tam, kad išgauti 75% specifiškumo lygį CanAg CA 125 EIA + HE4 EIA tyrimų kombinacijai:

Moterys prieš menopauzę

ROMA vertė $\geq 12.5\%$ = aukšta epitelinio kiaušidžių vėžio aptikimo rizika

ROMA vertė $< 12.5\%$ = žema epitelinio kiaušidžių vėžio aptikimo rizika

Moterys po menopauzės

ROMA vertė $\geq 14.4\%$ = aukšta epitelinio kiaušidžių vėžio aptikimo rizika

ROMA vertė $< 14.4\%$ = žema epitelinio kiaušidžių vėžio aptikimo rizika

Klaidingai neigiami rodikliai ir procentas epitelinio kiaušidžių vėžio, stratifikuojamo į žemos rizikos grupę pacientėms su cistomis, naudojant ROMA vertę ties 75% specifiškumo, yra pateikiami 2 lentelėje. Stratifikavimo į aukštos ir žemos rizikos grupes naudojant ROMA algoritmą prie 75% specifiškumo lygio, rezultate klaidingai neigiamų rodiklių buvo 6.2%. Trys (3) procentai visų atvejų, stratifikuotų į žemos rizikos grupę, atskleidė epitelinio kiaušidžių vėžio buvimą.

2 lentelė. Klaidingai neigiami rodikliai (FNR) ir epitelinio kiaušidžių vėžio procentas tarp visų atvejų, stratifikuotų į žemą rizikos grupę pacientėms su cistomis, naudojant ROMA vertę. Prieš menopauzinis slenkstinis taškas stratifikacijai į žemos rizikos grupę ties 75% specifiškumo lygiu $< 13.1\%$, po menopauzinis slenkstinis taškas stratifikacijai į žemos rizikos grupę ties 75% specifiškumo lygiu $< 27.7\%$.

Epitelinis kiaušidžių vėžys ^a	Klaidingai neigiami rodikliai (KNR)			Vėžio procentas žemos rizikos grupėje		
	Klaidingai neigiamas vėžys	Vėžys iš viso	KNR ^b	Klaidingai neigiamas vėžys	Teisingas teigiamas gerybiškumas	(%) ^c
Prieš menopauzę	2	18	11.1%	2	149	1.3%
Po menopauzės	6	111	5.4%	6	113	5.0%
Visos pacientės	8	129	6.2%	8	262	3.0%

^a Žemo piktybiškumo potencialo augliai (ŽPP) neįtraukti; ^bKNR= klaidingai neigiami/(teisingai teigiami + klaidingai neigiami); ^cklaidingai neigiami/(teisingai neigiami + klaidingai neigiami)

ATLIKIMO CHARAKTERISTIKA

Preciziškumas

HE4 tyrimo preciziškumas yra $\leq 15\%$ bendro CV. Atlikta studija buvo atlikta pagal NCCLS (CLSI) direktyvas EP5-A2 (22). Keturių serumų panelis buvo tiriamas 20 dienų naudojant dviejų serijų reagentus dvigubu pakartojimu dviem skirtingais laikais. Šios studijos apibendrinti duomenys yra pateikiami žemiau.*

Mėginys	Reagento serija	n	Vidutinė koncentracija (pM)	Tyrimo ribose SD (pM)	Tyrimo ribose CV%	Iš viso SD (pM)	Iš viso CV%
1	1	80	50.3	0.81	1.6	2.34	4.7
	2	80	48.0	0.69	1.4	2.17	4.5
2	1	80	75.3	1.81	2.4	2.96	3.9
	2	80	72.4	1.73	2.4	4.70	6.5
3	1	80	255	5.68	2.4	12.0	4.7
	2	80	242	5.21	2.2	12.8	5.3
4	1	80	407	6.22	1.5	14.5	3.6
	2	80	385	8.71	2.3	21.6	5.6

*Pavyzdiniai duomenys; individualiose laboratorijose rezultatai gali skirtis nuo šių duomenų.

Aptikimo riba

HE4 EIA tyrimo aptikimo riba yra ≤ 15 pM. Aptikimo riba (LoD) atitinka viršutinę ribą su 95% pasiklivimo intervalu ir rodo žemiausią HE4 antigeno koncentraciją, kuri gali būti atskiriama nuo nulio. NCCLS direktyva EP17-A (23) buvo naudojama atliekant LoD eksperimentus. Tyrimas buvo atliekamas kai HE4 kalibratorius A (nulis) ir 4 sveikų subjektų mėginiai, skiesti 5 pM mėginio skiedikliu (Sample Diluent) buvo tiriami 24 pakartojimais tyrimo serijoje atliekant 4 tyrimų serijas dviem skirtingomis dienomis. LoD buvo apskaičiuota šitaip:

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

Apskaičiuota, kad HE4 EIA rinkinio aptikimo riba yra < 2.5 pM.

Funkcinis jautrumas

HE4 EIA tyrimo funkcinis jautrumas yra ≤ 25 pM. Funkcinis jautrumas yra išreiškiamas kaip analitės koncentracija, prie kurios CV yra 20%. NCCLS direktyva EP5-A2 (22) buvo naudojama atliekant eksperimentus funkcinio jautrumo nustatymui. Tyrimas buvo atliekamas penkių narių jautrumo panelį 20 dienų tiriant 4 pakartojimais 2 tyrimų serijose dviem skirtingomis dienomis su dviem reagentų serijomis. Nustatyta, kad HE4 EIA funkcinis jautrumas yra < 5 pM.

Atstatymas

Vidutinis HE4 EIA tyrimo atstatymas yra $100 \pm 15\%$. Studija buvo atlikta į sveiko žmogaus serumo mėginius įdėjus pacientų mėginių su žinoma HE4 koncentracija, skiedinių. HE4 koncentracija buvo nustatyta naudojant HE4 EIA tyrimą, taip apskaičiuojant atstatymo procentą. Šios studijos apibendrinti duomenys yra pateikiami žemiau.*

Mėginys	Endogeninio tyrimo vertė (pM)	HE4 antigenas įdėtas (pM)	Gauta HE4 tyrimo vertė (pM)	Atstatymo procentas** %
1	44.6	15	60.6	102
		75	96.0	89
		350	397	96
		650	686	96
2	41.1	15	55.7	99
		75	95.2	91
		350	400	98
		650	657	93
3	40.6	15	54.0	97
		75	95.1	91
		350	403	99
		650	680	96
4	46.6	15	63.3	103
		75	106	97
		350	410	99
		650	645	90
5	40.2	15	56.5	102
		75	102	98
		350	402	99
		650	676	96

Nustatyta, kad vidutinis atstatymas tarp keturių atskirų aukščiau pavaizduotų koncentracijų, yra 97%.

*Pavyzdiniai duomenys; individualiose laboratorijose rezultatai gali skirtis nuo šių duomenų.

**% Atstatymas = gauta HE4 koncentracija (pM)/endogeninis HE4 konc. (pM) + HE4 pridėta (pM)

Aukštos koncentracijos kablo efektas

Aukštos koncentracijos kablo efektas yra fenomenas, kai labai aukštų koncentracijų mėginiai gali būti nuskaityti dinaminėse tyrimo ribose. HE4 EIA kablo efektas nebuvo pastebėtas su mėginiais, turinčiais iki 300 000 pM HE4 natyvaus antigeno.

Skiedimo linijškumas

HE4 EIA tyrimo vidutinis skiedimo linijškumas yra $100 \pm 15\%$. Studija buvo atlikta formuojant HE4 EIA pagal NCCLS (CLSI) direktyvą EP6-A (24). Serumo mėginiai su padidintomis HE4 vertėmis buvo skiedžiami su HE4 kalibratoriumi A (nulis). HE4 koncentracija buvo nustatyta kiekvienam skiedimui ir buvo apskaičiuotas atstatymo procentas (%). Šios studijos apibendrinti duomenys yra pateikiami žemiau.*

Mėginys	Galutinis skiedimo faktorius	Gauta vertė (pM)	Tikėtina vertė (pM)	Atstatymo procentas** (%)
1	Neskiestas	889.6	889.6	100
	1:1.25	720.0	711.7	101
	1:1.7	543.1	533.8	101
	1:2	450.6	444.8	101
	1:2.5	345.9	355.8	97.2
	1:5	183.6	177.9	103
	1:10	97.6	89.0	109
	1:20	49.1	44.5	110
	1:40	25.9	22.2	116
2	Neskiestas	697.0	697.0	100
	1:1.25	544.9	557.6	97.7
	1:1.7	429.8	418.2	103
	1:2	361.1	348.5	104
	1:2.5	275.9	278.8	99.0
	1:5	134.5	139.4	96.5
	1:10	74.4	69.7	107
	1:20	39.1	34.9	112
	1:40	21.0	17.4	120
3	Neskiestas	680.2	680.2	100
	1:1.25	499.7	544.2	91.8
	1:1.7	354.4	408.1	86.8
	1:2	296.7	340.1	87.2

	1:2.5	247.2	272.1	90.9
	1:5	124.9	136.0	91.8
	1:10	61.7	68.0	90.7
	1:20	34.6	34.0	102
	1:40	18.4	17.0	109

Vidutinis atstatymas tarp trijų skiestų mėginių = 101%

*Pavyzdiniai duomenys; individualiose laboratorijose rezultatai gali skirtis nuo šių duomenų.

**% Atstatymas= HE4 gauta koncentracija x skiedimo faktorius / neskiesta HE4 koncentracija.

Analitinis specifiškumas

HE4 EIA tyrimo vidutinis specifiškumas yra $100 \pm 15\%$. Atstatymo studijos buvo atliekamos lyginant serumą su žemiau išvardintais tam tikrų koncentracijų junginiais su kontroliniu serumu. NCCLS direktyva EP7-A (25) buvo naudojama atliekant interferencijos eksperimentus. Žemiau pateikiamos medžiagos ir koncentracijos buvo tirtos dėl interferencijos su tyrimu. Nustatyta, kad jos su tyrimu neinterferuoja.

Endogeninio serumo interferencijos

Trigliceridai
Bilirubinas
Hemoglobinas
Bendras baltymas

Tyrimo koncentracija

30 mg/mL
0.2 mg/mL
10 mg/mL
120 mg/mL

Chemoterapinių vaistų interferencijos

Karboplatinas
Cisplatinas
Klotrimazolas
Ciklofosfamidą
Deksametazonas
Doksorubicinas
Leukovorinas
Melfalanas
Metotreksatas
Paklitakselis

Tyrimo koncentracija

500 µg/mL
165 µg/mL
0.3 µg/mL
500 µg/mL
10 µg/mL
1.16 µg/mL
2.68 µg/mL
2.8 µg/mL
45 µg/mL
3.5 ng/mL

Potencialiai interferuojančios klinikinės sąlygos

HE4 EIA tyrimas buvo vertinamas naudojant mėginius su HAMA ir reumatoidiniu faktoriumi (PF) dėl išsamesnio tyrimo specifiškumo. Penki HAMA teigiami mėginiai ir penki RF teigiami mėginiai buvo įvertinti dėl % atstatymo su HE4 antigenu, įdėtu į kiekvieną mėginį po 50-450 pM. Vidutiniai apibendrinti atstatymo rezultatai yra pateikiami žemiau esančioje lentelėje.*

Klinikinė būklė	Mėginių skaičius	Vidutinis % atstatymas
HAMA	5	101
RF	5	95

*Pavyzdiniai duomenys; individualiose laboratorijose rezultatai gali skirtis nuo šių duomenų.

LITERATŪROS NUORODOS

1. Israeli O, Goldring-Aviram A, Rienstein S, Ben-Baruch G, Korach J, Gold man B, Friedman E. In silico chromosomal clustering of genes display- ing altered expression patterns in ovarian cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;160:35-42.
2. Bouchard D, Morisset D, Bourbonnais Y, Tremblay GM. Proteins with whey- acidic-protein motifs and cancer. *Lancet Oncol* 2006;7:167-174.
3. Bingle L, Singleton V, Bingle CD. The putative ovarian tumour marker gene HE4 (wfdc2), is expressed in normal tissues and undergoes complex alter- native splicing to yield multiple protein isoforms. *Oncogene* 2002;21:2768- 2773.
4. Kirchhoff C, Habben I, Ivell R, et al. A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular protease inhibitors. *Biol Reprod* 1991;45:350-357.
5. Kirchhoff C. Molecular characterization of epididymal proteins. *Rev Reprod* 1998;3:86-95.
6. Galgano MT, Hampton GM, Frierson HF Jr. Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues. *Mod Pathol* 2006;19:847-853.
7. Drapkin R, von Horsten HH, Lin Y, Mok SC, Crum CP, Welch WR, Hecht JL. Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res* 2005;65:2162-2169.
8. Hough CD, Sherman-Baust CA, Pizer ES, Montz FJ, Im DD, Rosenshein NB, Cho KR, Riggins GJ, Morin PJ. Large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer. *Cancer Res* 2000;60:6281-6287.
9. Schummer M, Ng WV, Bumgarner RE, Nelson PS, Schummer B, Bednarski DW, Hassell L, Baldwin RL, Karlan BY, Hood L. Comparative hybridization of an array of 21,500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overex pressed in ovarian carcinomas. *Gene* 1999;238:375-385.
10. Gilks CB, Vanderhyden BC, et al. Distinction between serous tumors of low malignant potential and serous carcinomas based on global mRNA expres- sion profiling. *Gynecol Oncol* 2005;96:684-694.
11. Hellstrom I, Raycraft J, et al. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian cancer. *Cancer Res* 2003;63:3695-3700.
12. Moore RM, Brown AK, Miller MC, et al. The use of multiple novel tumor markers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol* 2008;108:402-408.34

13. Bray F, Loos AH, Tognazzo S, La Vecchia C. Ovarian cancer in Europe: Cross-sectional trends in incidence and mortality in 28 countries, 1953- 2000. *Int J Cancer* 2005;113(6):977-90.
14. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. Ovarian Cancer: Screening, treatment and follow-up. *Gynecol Oncol* 1994;55:S4-14.
15. ACOG Practice Bulletin. Clinical Management Guideline for Obstetrician- Gynecologists. Management of Adnexal Masses. *Obstet Gynecol* 2007;110:201-213.
16. Finkler NJ, Benacerraf B, Lavin PT, Wojciechowski C, Knapp RC. Comparison of serum CA 125, clinical impression and ultrasound in the preoperative evaluation of ovarian masses. *Obstet Gynecol* 1988;72:659-64.
17. Maggino T, Gadducci A, D'Addario V, et al. Prospective Multicenter Study on CA 125 in postmenopausal pelvic masses. *Gynecol Oncol* 1994;54:117-123.
18. Roman LD, Muderspach LI, Stein SM, et al. Pelvic Examination, Tumor marker level, and Gray-Scale and Doppler Sonography in the prediction of pelvic cancer. *Obstet Gynecol* 1997;89:493-500.
19. DePriest PD, Shenson D, Fried A, et al. A morphology index based on sonographic findings in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1993;51:7-11.
20. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Exposure to Blood Borne Pathogens.
21. US Department of Health and Human Services: Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories: 4th Edition Washington DC: US Government Printing Office May, 1999.
22. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI), Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline – Second Edition. EP5-A2 (2004).
23. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI), Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline. EP17-A (2004).
24. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI), Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. EP6-A.
25. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI), Interference Testing in Clinical Chemistry, Approved Guideline, EP7-A.

Protokolas HE4 EIA_{REF} 404-10

Visus komponentus pasiruoškite iškart prieš naudojimą. Praplovimo ir inkubacijos sąlygos turi atitikti nurodytas instrukcijoje. **Pastaba: norint gauti tikslūs rezultatus, tyrimas turi būti atliekamas 20–25°C.**

Buteliukams 20–25°C.

Etapas		Buteliukas/lėkštelė	Procedūra																																							
1.	Paruoškite HE4 kalibratorius	CAL HE4 B, C, D, E, F	Į kiekvieną buteliuką įlašinkite 1mL distiliuoto ar dejonizuoto vandens ir švelniai išmaišykite. Leiskite pastovėti mažiausiai 15min. PASTABA: tiksli kiekvieno kalibratoriaus koncentracija yra nurodyta etiketėje. Stabilumas atskiedus: 4 savaitės prie 2-8°C.																																							
	Paruoškite HE4 kontroles	CONTROL HE4 1, 2																																								
	Paruoškite plovimo tirpalą	WASHBUF 25X																																								
	Paruoškite nešėjo tirpalą	CONJ Anti-HE4 DIL CONJ	Sumaišykite 50μL nešėjo, HRP Anti-HE4 su 1mL nešėjo skiediklio vienai juostelei:																																							
			<table> <tr> <th>Juostelių skaičius</th> <th>Nešėjas, HRP Anti- HE4 (μL)</th> <th>Nešėjo skiediklis (mL)</th> </tr> <tr><td>1</td><td>50</td><td>1</td></tr> <tr><td>2</td><td>100</td><td>2</td></tr> <tr><td>3</td><td>150</td><td>3</td></tr> <tr><td>4</td><td>200</td><td>4</td></tr> <tr><td>5</td><td>250</td><td>5</td></tr> <tr><td>6</td><td>300</td><td>6</td></tr> <tr><td>7</td><td>350</td><td>7</td></tr> <tr><td>8</td><td>400</td><td>8</td></tr> <tr><td>9</td><td>450</td><td>9</td></tr> <tr><td>10</td><td>500</td><td>10</td></tr> <tr><td>11</td><td>550</td><td>11</td></tr> <tr><td>12</td><td>600</td><td>12</td></tr> </table>	Juostelių skaičius	Nešėjas, HRP Anti- HE4 (μL)	Nešėjo skiediklis (mL)	1	50	1	2	100	2	3	150	3	4	200	4	5	250	5	6	300	6	7	350	7	8	400	8	9	450	9	10	500	10	11	550	11	12	600	12
Juostelių skaičius	Nešėjas, HRP Anti- HE4 (μL)	Nešėjo skiediklis (mL)																																								
1	50	1																																								
2	100	2																																								
3	150	3																																								
4	200	4																																								
5	250	5																																								
6	300	6																																								
7	350	7																																								
8	400	8																																								
9	450	9																																								
10	500	10																																								
11	550	11																																								
12	600	12																																								
2.	Plovimas	MICROPLA	Kiekvieną šulinėlį gerai išplaukite plovimo tirpalu. Naudokite rankinę arba automatinę plovyklę.																																							
3.	Pridėkite kalibratorių, kontrolių ir mėginių	CAL HE4 A, B, C, D, E, F CONTROL HE4 1, 2	25μL į kiekvieną šulinėlį																																							
4.	Pridėkite Biotin Anti-HE4	BIOTIN Anti-HE4	100μL į kiekvieną šulinėlį																																							
5.	Inkubuokite	MICROPLA	1 val. purtymo prie 20–25°C																																							
6.	Plovimas	MICROPLA	Kiekvieną šulinėlį plovimo tirpalu plaukite tris kartus. Naudokite																																							

			rankinę arba automatinę plovyklę.
7.	Pridėkite nešėjo tirpalo	TRACER WORKING SOLUTION	100μL į kiekvieną šulinėlį
8.	Inkubuokite	MICROPLA	1 val. purtymo prie 20–25°C
9.	Plovimas	MICROPLA	Kiekvieną šulinėlį plovimo tirpalu plaukite šešis kartus. Naudokite rankinę arba automatinę plovyklę.
10.	Pridėkite TMB HRP-substrato	SUBS TMB	100μL į kiekvieną šulinėlį
11.	Inkubuokite	MICROPLA	30 min. purtymo prie 20–25°C
12.	Nuskaitykite absorbciją	MICROPLA	620nm

Alt. 12.	Pridėkite Stop tirpalo	STOP	100μL į kiekvieną šulinėlį
Alt. 13.	Sumaišykite	MICROPLA	Leiskite susimaišyti prie 20–25°C
Alt. 14.		MICROPLA	Nuskaitykite prie 405 nm per 15 min.



MATERIAL SAFETY DATA SHEET

1. Product and company identification

Product: **HE4 EIA**

Product No: **404-10**

Manufacturer: Fujirebio Diagnostics AB
Elof Lindälvs gata 13
SE-414 58 Gothenburg, Sweden
www.fdab.com, info@fdab.com

For information call: +46 31 85 70 30 or Fax: +46 31 85 70 40

In case of emergency, please contact Fujirebio Diagnostics AB at tel: +46 31 85 70 30

2. Hazards identification

Classification: None of the kit components of the HE4 EIA kit may be classified as hazardous due to the low concentration of hazardous ingredients.

Both Kit control 1 and Kit control 2 contain human serum and must be handled as a potentially infectious substance following Universal Precautions requirements in OSHA Standard 1910.1030, Bloodborne Pathogens.

Symbol according to EN 980:2008, Biological risks.



Special hazards: Contains human sourced and/or potentially infectious components.

3. Composition / Information on Ingredients

No single component of the kit contains a hazardous ingredient in an amount that requires labelling. The content in the components of ingredients listed as hazardous are given below:

Kit component	Substance /Mixture	Hazardous ingredient	Weight %	CAS No
Stop Solution	Substance	hydrochloric acid	<1%	7647-01-0

Additional information: The Kit Controls contain human sourced and/or potentially infectious components.

4. First aid measures

Inhalation: Remove victim from source of exposure. If breathing is difficult, administer oxygen.

Skin exposure: In case of contact, wash with plenty of soap and water. Seek medical attention if irritation develops.

Eyes: Hold eyelids open and flush with a steady, gentle stream of water for at least 15 minutes. Seek immediate medical attention.

Ingestion: Give 2-3 glasses of water to drink and do not induce vomiting. Seek immediate medical attention.

5. Fire fighting measures

Use extinguishing media appropriate to surrounding materials. No special equipment or procedures are required.

6. Accidental release measures

Absorb spills of reagents and patient samples with absorbent paper, taking care not to spread the material. Clean spill area with a freshly made 0.5 % sodium hypochlorite (bleach) solution. Discard all materials used to absorb spill and disinfect area into biohazard waste collection for proper disposal. Avoid contact with eyes and skin.

7. Handling and storage

Handling: Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics in laboratory areas. Do not pipette patient samples or reagents by mouth. Avoid splashing or aerosol formation. Use all reagents in accordance with the relevant package insert. Avoid high temperatures during transport.

Storage: Store all reagents as directed in the relevant package insert.

8. Exposure controls and personal protection

Engineering controls: None required

Follow universal precautions. Wear appropriate personal protective equipment when working with reagents or patient specimens, including lab coats, disposable gloves and eye protection. Avoid hand/mouth contact.

Wash hands as soon as possible after handling reagents or patient specimens.

9. Physical and chemical properties

Physical state of the Kit Controls: cream colored, odorless, solid, lyophilized material.

Physical state of the Stop Solution: clear colored, liquid, odorless, basic physical properties as water

10. Stability and reactivity

The reagents in the kit are stable under the storage conditions described in the package insert. Hazardous decomposition will not occur. There are no known strong incompatibilities.

11. Toxicological information

The components of this kit are mixtures. Toxicological studies have not been performed on this mixture. Based on the composition of the components, these materials are believed to be non-toxic.

12. Ecological information

The components of this kit are mixtures. Ecological studies have not been performed on this mixture. Based on the composition of the components, these materials are not believed to be an ecological hazard.

13. Disposal considerations

Dispose as an infectious waste in accordance with all federal, state and local regulations.

14. Transport information

No limitations apply

15. Regulatory information

This product is classified and labelled in accordance with EEC directives directive 2001/58/EC and 99/45/EC as modified by 1907/2006 and 453/2010.

U.S Regulations: This product is evaluated in accordance with 29 CFR 1910.1200.

Canadian Regulations: This product has been classified according to the hazard criteria of the Canadian regulation, the Controlled Products Regulations, and the MSDS contains all the information required by the Controlled Products Regulations.

16. Other information

The information contained herein is accurate to the best of our knowledge. Fujirebio Diagnostics AB makes no warranty of any kind, express or implied, concerning the safe use of this material in your process or in combination with other substances.

End of Safety Data Sheet