



## HE4 EIA

Prod. No. 404-10

Naudojimo instrukcijos

2008-09

Imunofermentinio tyrimo rinkinys

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 epiteliniu 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 glikosliuzuotoje formoje baltymas yra apie 20-25 kD, ir susideda iš vienos baltymo grandinės, turinčios du WFDC domenų (3). Pirmąkart HE4 buvo identifikuotas distalinio antsklidžio 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 reprodukcinį audinių bei kiaušidžių vėžio audinių epitelyje. (6-10). Be ekspresijos ląsteliniame lygmenyje, aukštos išskiriamos HE4 koncentracijos buvo aptiktos kiaušidžių vėžiu sergančių pacienčių serume. Atlikus atvejo/kontrolės studiją, lyginant kiaušidžių vėžiu sergančius pacientus su sveikais ir nepiktybinėmis formomis sergančiais jautrumu prie 96% specifškumo (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% specifškumu (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

onkologineologai, 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 mikrojuostelėse. Dėl biotiniuoto Anti-HE4 MAb, inkubacijos metu HE4, esantis kalibratoriuose ar mėginiuose, yra adsorbuojamas į streptavidinu padengtas mikrojuosteles. 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 sukuriama 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
<b>MICROPLA</b> Streptavidino mikroplokštelė	1 plokštelė	2–8°C iki galiojimo datos pabaigos, nurodytos ant plokštelių

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

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

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 iširtos 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 pradėdami 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, dozuojantys tūrį mikrolitrais. Nereikalaujama, bet rekomenduojama turėti 8 kanalų dozatorių su vienkartiniais plastikiniais antgaliais, dozuojančiais po 100 µL. Dozatoriai, tūrį dozuojantys 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 pradėdami dozuoti kalibratorius ir pacientų mėginius, patartina pasižymėti juosteles, kad tyrimo metu ir po jo mėginys būtų lengvai identifikuojamas.
4. Vienas iš svarbiausių reikalavimų EIA tyrime – 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 visi 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 vienkartinis 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.

<b>Reagentų paruošimas</b>	<b>Paruošto reagento stabilumas</b>
<b>HE4 kalibratoriai B-F</b>	4 savaitės prie 2–8°C 4 mėnesiai prie -20°C ar šalčiau
Įlašinkite 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.	
<b>HE4 1 ir 2 kontrolės</b>	4 savaitės prie 2–8°C 4 mėnesiai prie -20°C ar šalčiau
Įlašinkite 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.	
<b>Praplovimo tirpalas</b>	2 savaitės prie 2–25°C uždarytame konteineryje
Įlašinkite 50 mL praplovimo koncentrato į švarų konteinerį ir atskieskite 25-gubai pridėdami 1200 mL distiliuoto ar dejonizuoto vandens, kad gautumėte buferizuotą praplovimo tirpalą.	
<b>Nešėjo tirpalas</b>	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 kontenerius. 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 30 min.
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 A	Cal E	1 <sup>er</sup> Inc				
B	Cal A	Cal E	1 <sup>er</sup> Inc				
C	Cal B	Cal F	2 <sup>eme</sup> Inc				
D	Cal B	Cal F	2 <sup>eme</sup> Inc				
E	Cal C	C1					
F	Cal C	C1					
G	Cal D	C2					
H	Cal D	C2					

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  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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 antigeniui, 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-parametų linijiniai progresijos vertinimo metodai neturi būti naudojami. Atliekant rankinį įvertinimą, Kalibracijos kreivė yra sudaroma kiekvieno HE4 kalibratoriaus gautas absorbcijos (A) vertes atidedant prieš atitinkamą HE4 koncentraciją pM verte.

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

### Skieštų mėginių rezultatų apskaičiavimas

Jei pradiniam tyrimo 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 laikotarpyje ar po jo.

#### (1) Moteris prieš menopauzę

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

#### (2) Moteris 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 Būseną	HE4 (pM)	CA125 (U/mL)	PI apskaičiavimas	PI	ROMA (%)
Prieš menopauzę	37,5	74,9	$-12,0 + (2,38 \cdot 3,624) + (0,0626 \cdot 4,316)$	-3,10388	4,29
Prieš menopauzę	386,6	21,8	$-12,0 + (2,38 \cdot 5,957) + (0,0626 \cdot 3,082)$	2,371517	91,5
Po menopauzės	66,7	11,3	$-8,09 + (1,04 \cdot 4,200) + (0,732 \cdot 2,425)$	-1,94683	12,5
Po menopauzės	383,1	22,7	$-8,09 + (1,04 \cdot 5,948) + (0,732 \cdot 3,122)$	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:

<b>HE4 tyrimo verčių pasiskirstymas</b>					
	<b>Subjektų skaičius</b>	<b>0 – 150 pM</b>	<b>150.1 – 300 pM</b>	<b>300.1- 500 pM</b>	<b>&gt; 500 pM</b>
<b>AKIVAIZDŽIAI SVEIKI</b>					
Moterys (prieš menopauzę)	76	72	3	0	1
Moterys (po menopauzės)	103	97	5	0	1
<b>GERYBINĖ BŪKLĖ</b>					
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
<b>Vėžys</b>					
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.

<b>Ligos būklės pakitimas nuoseklioje porose</b>			
<b>HE-4 koncentracijos padidėjimas</b>	<b>Progresija</b>	<b>Jokios progresijos</b>	<b>Iš viso</b>
>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.

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

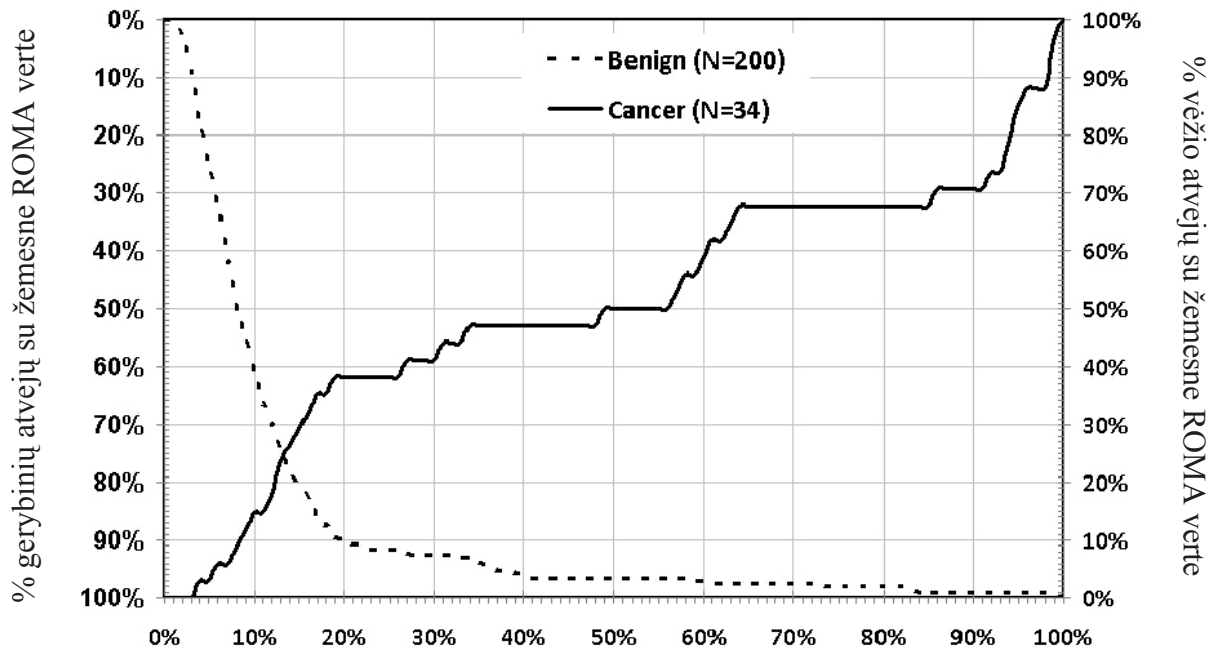
### **Pacienčių su dariniais apatinėje pilvo dalyje, rizikos įvertinimas**

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.

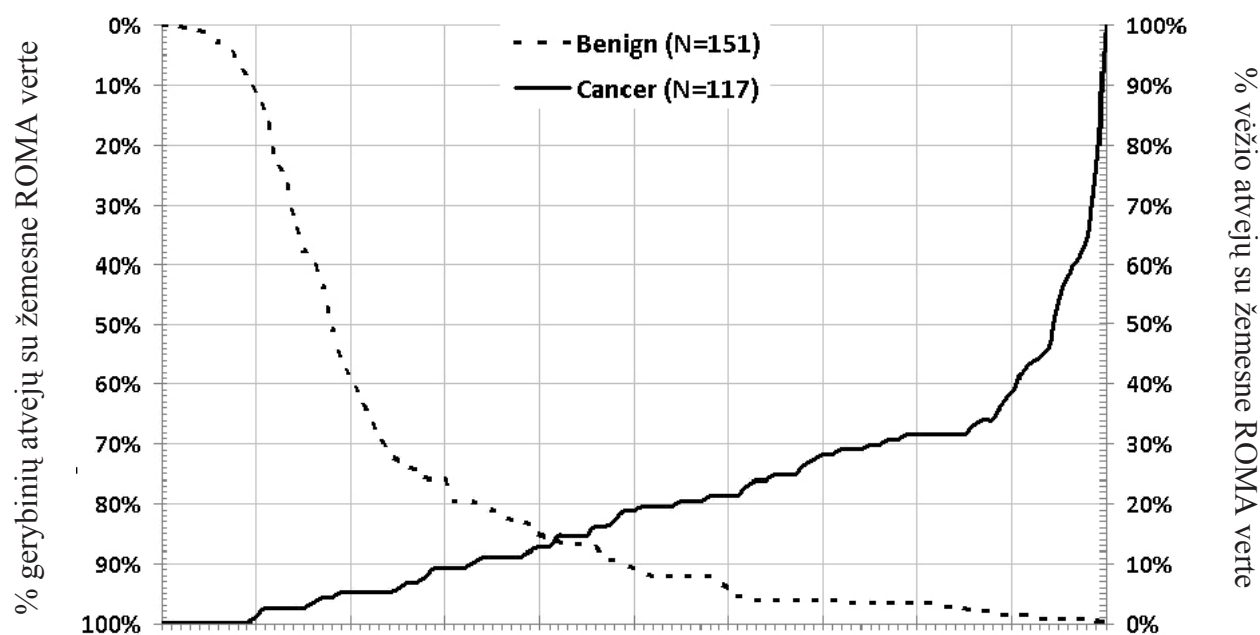
**Pav. 1** Augantis ROMA verčių pasiskirstymo dažnis moterims prieš menopauzę. HE4 EIA + ARCHITECT CA125 II tyrimų kombinacija.



Benign – gerybiniai atvejai  
Cancer - vėžys

**ROMA vertė: HE4 EIA + ARCHITECT CA125 II**

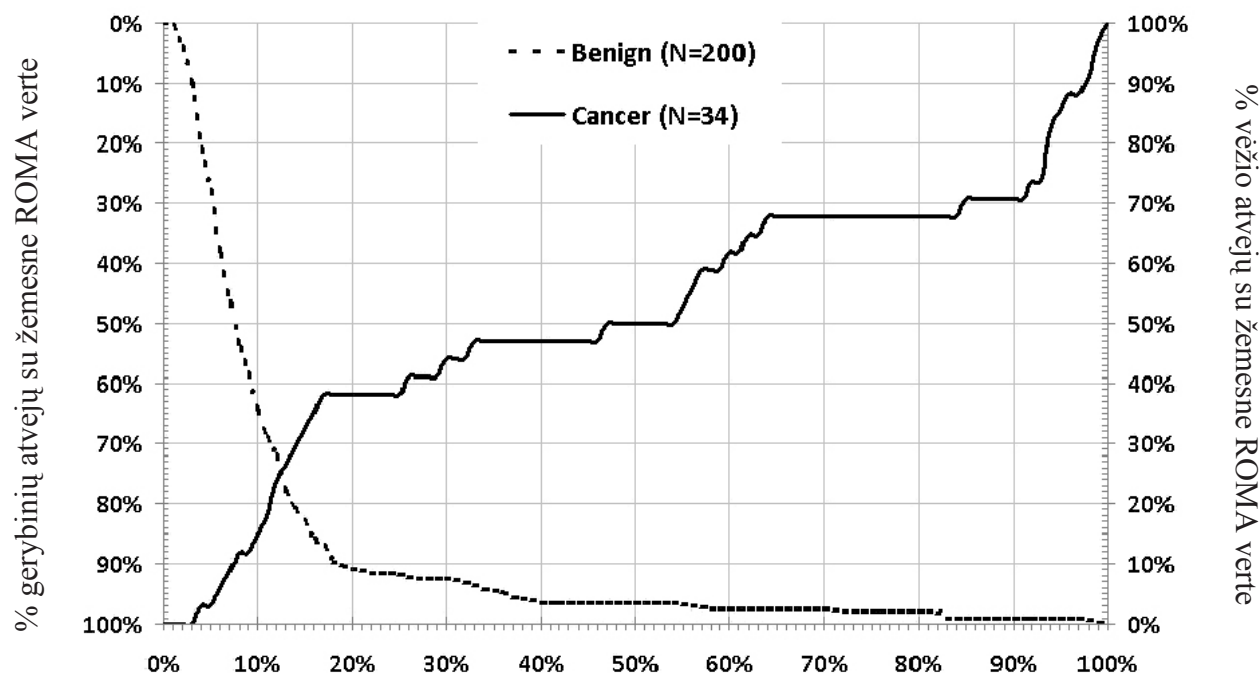
**Pav. 2** Augantis ROMA verčių pasiskirstymo dažnis moterims **po menopauzės**. HE4 EIA + ARCHITECT CA125 II tyrimų kombinacija.



Benign – gerybiniai atvejai  
 Cancer - vėžys

**ROMA vertė: HE4 EIA + ARCHITECT CA125 II**

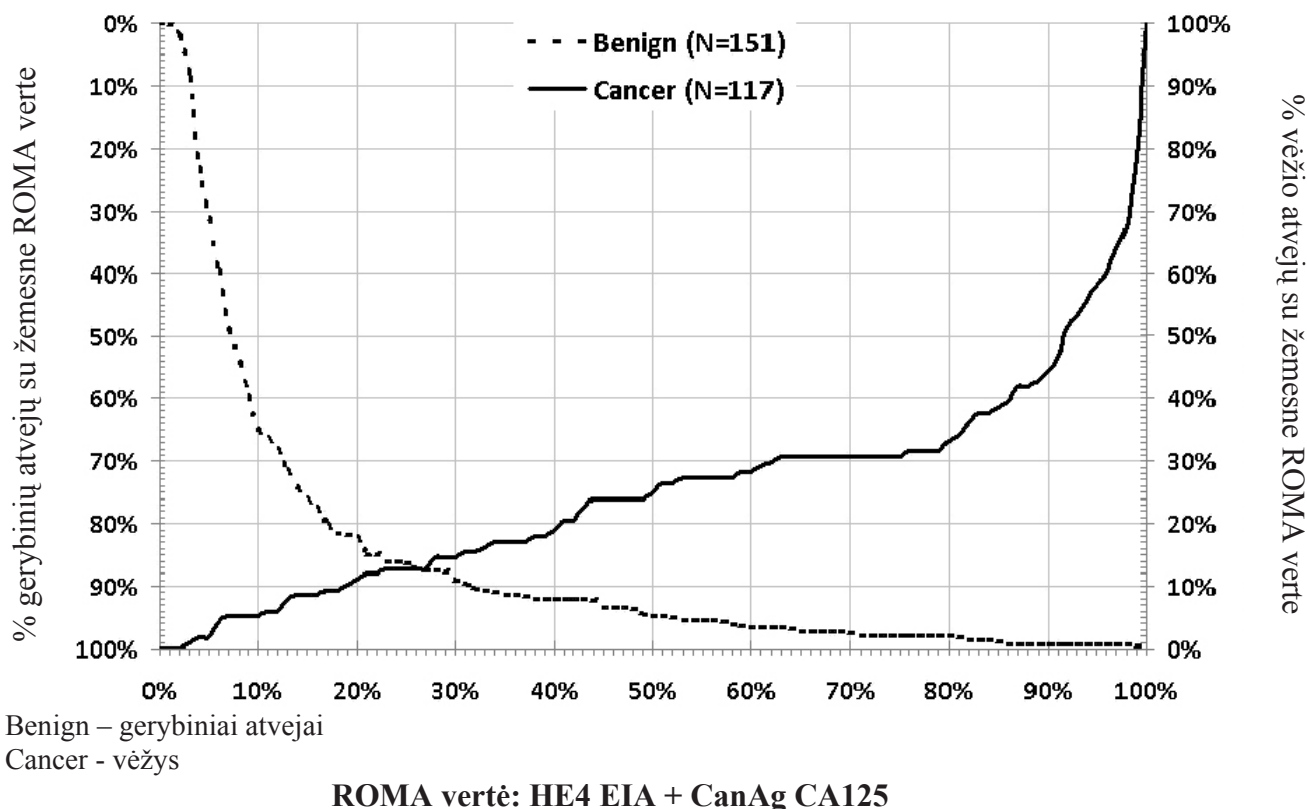
**Pav. 3** Augantis ROMA verčių pasiskirstymo dažnis moterims **prieš menopauzę**. HE4 EIA + CanAg CA125 EIA kombinacija



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.



#### **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 prognozinių 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  $\geq 27.7\%$ .

	<b>Moterys prieš menopauzę</b> n = 234	<b>Moterys po menopauzės</b> n = 268	<b>Moterys prieš menopauzę ir po jos</b> n = 502
<b>Stadija I – IV EOC ir LMP kartu</b>	26/34 (76%)	108/117 (92%)	134/151 (89%)
<b>Žemas piktybiškumo potencialas</b>	10/16 (63%)	3/6 (50%)	13/22 (59%)
<b>Stadija I-II EOC</b>	6/7 (86%)	24/28 (86%)	30/35 (86%)
<b>Stadija I – IIICa EOC</b>	7/8 (88%)	35/39 (90%)	42/47 (89%)
<b>Stadija I – IV EOC</b>	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 prognozines 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  $< 27.7\%$ .

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

<sup>a</sup> Žemo piktybiškumo potencialo augliai (ŽPP) neįtraukti; <sup>b</sup>KNR= klaidingai neigiami/(teisingai teigiami + klaidingai neigiami); <sup>c</sup>klaidingai 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  $\leq 15$  pM. Aptikimo riba (LoD) atitinka viršutinę ribą su 95% pasiklovimo 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:

$$\text{LoD (pM)} = 5.0 \text{ pM} \times (1.65 \times \text{SD0} + 1.65 \times \text{SD5}) / (\text{OD5} - \text{OD0})$$

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

### Funkcinis jautrumas

HE4 EIA tyrimo funkcinis jautrumas yra  $\leq 25$  pM. Funkcinis jautrumas yra išreiškiamas kaip analizės 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** %
<b>1</b>	<b>44.6</b>	<b>15</b>	<b>60.6</b>	<b>102</b>
		<b>75</b>	<b>96.0</b>	<b>89</b>
		<b>350</b>	<b>397</b>	<b>96</b>
		<b>650</b>	<b>686</b>	<b>96</b>
<b>2</b>	<b>41.1</b>	<b>15</b>	<b>55.7</b>	<b>99</b>
		<b>75</b>	<b>95.2</b>	<b>91</b>
		<b>350</b>	<b>400</b>	<b>98</b>
		<b>650</b>	<b>657</b>	<b>93</b>
<b>3</b>	<b>40.6</b>	<b>15</b>	<b>54.0</b>	<b>97</b>
		<b>75</b>	<b>95.1</b>	<b>91</b>
		<b>350</b>	<b>403</b>	<b>99</b>
		<b>650</b>	<b>680</b>	<b>96</b>
<b>4</b>	<b>46.6</b>	<b>15</b>	<b>63.3</b>	<b>103</b>
		<b>75</b>	<b>106</b>	<b>97</b>
		<b>350</b>	<b>410</b>	<b>99</b>
		<b>650</b>	<b>645</b>	<b>90</b>
<b>5</b>	<b>40.2</b>	<b>15</b>	<b>56.5</b>	<b>102</b>
		<b>75</b>	<b>102</b>	<b>98</b>
		<b>350</b>	<b>402</b>	<b>99</b>
		<b>650</b>	<b>676</b>	<b>96</b>

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 nuskaitomi dinaminėse tyrimo ribose. HE4 EIA kablo efektas nebuvo pastebėtas su mėginiais, turinčiais iki 300 000 pM HE4 natyvaus antigeno.

### Skiedimo linijiškumas

HE4 EIA tyrimo vidutinis skiedimo linijiškumas 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** (%)
<b>1</b>	<b>Neskiestas</b>	<b>889.6</b>	<b>889.6</b>	<b>100</b>
	<b>1:1.25</b>	<b>720.0</b>	<b>711.7</b>	<b>101</b>
	<b>1:1.7</b>	<b>543.1</b>	<b>533.8</b>	<b>101</b>
	<b>1:2</b>	<b>450.6</b>	<b>444.8</b>	<b>101</b>
	<b>1:2.5</b>	<b>345.9</b>	<b>355.8</b>	<b>97.2</b>
	<b>1:5</b>	<b>183.6</b>	<b>177.9</b>	<b>103</b>
	<b>1:10</b>	<b>97.6</b>	<b>89.0</b>	<b>109</b>
	<b>1:20</b>	<b>49.1</b>	<b>44.5</b>	<b>110</b>
	<b>1:40</b>	<b>25.9</b>	<b>22.2</b>	<b>116</b>
	<b>2</b>	<b>Neskiestas</b>	<b>697.0</b>	<b>697.0</b>
<b>1:1.25</b>		<b>544.9</b>	<b>557.6</b>	<b>97.7</b>
<b>1:1.7</b>		<b>429.8</b>	<b>418.2</b>	<b>103</b>
<b>1:2</b>		<b>361.1</b>	<b>348.5</b>	<b>104</b>
<b>1:2.5</b>		<b>275.9</b>	<b>278.8</b>	<b>99.0</b>
<b>1:5</b>		<b>134.5</b>	<b>139.4</b>	<b>96.5</b>
<b>1:10</b>		<b>74.4</b>	<b>69.7</b>	<b>107</b>
<b>1:20</b>		<b>39.1</b>	<b>34.9</b>	<b>112</b>
<b>1:40</b>		<b>21.0</b>	<b>17.4</b>	<b>120</b>
<b>3</b>		<b>Neskiestas</b>	<b>680.2</b>	<b>680.2</b>
	<b>1:1.25</b>	<b>499.7</b>	<b>544.2</b>	<b>91.8</b>
	<b>1:1.7</b>	<b>354.4</b>	<b>408.1</b>	<b>86.8</b>
	<b>1:2</b>	<b>296.7</b>	<b>340.1</b>	<b>87.2</b>
	<b>1:2.5</b>	<b>247.2</b>	<b>272.1</b>	<b>90.9</b>
	<b>1:5</b>	<b>124.9</b>	<b>136.0</b>	<b>91.8</b>
	<b>1:10</b>	<b>61.7</b>	<b>68.0</b>	<b>90.7</b>
	<b>1:20</b>	<b>34.6</b>	<b>34.0</b>	<b>102</b>
	<b>1:40</b>	<b>18.4</b>	<b>17.0</b>	<b>109</b>

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.

<b>Endogeninio serumo interferencijos</b>	<b>Tyrimo koncentracija</b>
Trigliceridai	30 mg/mL
Bilirubinas	0.2 mg/mL
Hemoglobinas	10 mg/mL
Bendras baltymas	120 mg/mL
<b>Chemoterapinių vaistų interferencijos</b>	<b>Tyrimo koncentracija</b>
Karboplatinas	500 µg/mL
Cisplatinas	165 µg/mL
Klotrimazolas	0.3 µg/mL
Ciklofosfamidai	500 µg/mL
Deksametazonas	10 µg/mL
Doksorubicinas	1.16 µg/mL
Leukovorinas	2.68 µg/mL
Melfalanas	2.8 µg/mL
Metotreksatas	45 µg/mL
Paklitakselis	3.5 ng/mL

### Potencialiai interferuojančios klinikinės sąlygos

HE4 EIA tyrimas buvo vertinamas naudojant mėginius su HAMA ir reumatoidiniu faktoriu (RF) 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.\*

<b>Klinikinė būklė</b>	<b>Mėginių skaičius</b>	<b>Vidutinis % atstatymas</b>
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 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;108:402-408.34 13.
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 tikslus rezultatus, tyrimas turi būti atliekamas 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 15 min. PASTABA: tiksliai 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 50 µL nešėjo, HRP Anti-HE4 su 1 mL nešėjo skiediklio vienai juostelei:																																							
		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Juostelių skaičius</th> <th>Nešėjas, HRP Anti-HE4 (µL)</th> <th>Nešėjo skiediklis (mL)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>50</td><td>1</td></tr> <tr><td>2</td><td>100</td><td>2</td></tr> <tr><td>3</td><td>150</td><td>3</td></tr> <tr><td>4</td><td>200</td><td>4</td></tr> <tr><td>5</td><td>250</td><td>5</td></tr> <tr><td>6</td><td>300</td><td>6</td></tr> <tr><td>7</td><td>350</td><td>7</td></tr> <tr><td>8</td><td>400</td><td>8</td></tr> <tr><td>9</td><td>450</td><td>9</td></tr> <tr><td>10</td><td>500</td><td>10</td></tr> <tr><td>11</td><td>550</td><td>11</td></tr> <tr><td>12</td><td>600</td><td>12</td></tr> </tbody> </table>	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	25 µL į kiekvieną šulinėlį																																							
4. Pridėkite Biotin Anti-HE4	BIOTIN Anti-HE4	100 µL 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 tirpalą	TRACER WORKING SOLUTION	100 µL 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	100 µL į kiekvieną šulinėlį																																							
11. Inkubuokite	MICROPLA	30 min. purtymo prie 20–25°C																																							
12. Nuskaitykite absorbciją	MICROPLA	620 nm																																							
Alt.12 Pridėkite Stop tirpalą	STOP	100 µL į kiekvieną šulinėlį																																							
Alt.13 Sumaišykite	MICROPLA	Leiskite susimaišyti prie 20–25°C																																							
Alt.14 Nuskaitykite absorbciją	MICROPLA	Nuskaitykite prie 405 nm per 15 min.																																							



---

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