

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ HE4

404-10, HE4 EIA

Каталог. № : 404-10

Методика от 12-2014

Количество : 96

Производитель: **Fujirebio Diagnostics, Inc., (Швеция)**



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор HE4 EIA предназначен для количественного определения опухолевого маркера HE4 в человеческой сыворотке методом иммуноферментного анализа.

Данный набор может быть использован для мониторинга ответа на проводимую терапию у пациенток с инвазивными эпителиальными опухолями яичника. Серийные определения HE4 у пациенток должны использоваться в сочетании с другими клиническими методами, используемыми для мониторинга рака яичников.

Кроме того, данный метод предназначен для совместного использования с методом определения ARCHITECT CA 125 II или CanAg CA125 EIA, с целью оценки риска наличия эпителиального рака яичника у женщин в пре- или постменопаузальный период, с выявленными образованиями в малом тазу. Результаты тестирования должны интерпретироваться с учетом других обследований, в соответствии со стандартными руководствами по обследованию пациентов.

ВВЕДЕНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ МЕТОДА

Белок 4 эпидидимиса человека (HE4) принадлежит семейству сывороточных кислых белков, содержащих 4 дисульфидных связи в коровой части (WFDC), с предполагаемыми свойствами ингибитора трипсина. К этому семейству относятся такие белки, как SLP1 (секреторный лейкоцитарный ингибитор протеазы), элафин и PS20 (WFDC1) (1, 2). Ген HE4 кодирует белок массой 13 кДа, хотя молекулярная масса зрелого гликозилированного белка составляет приблизительно 20-25 кДа, состоящий из одного пептида, содержащего два WFDC домена (3). HE4 впервые был идентифицирован в эпителии эпидидимиса и первоначально были предсказаны его свойства как ингибитора протеаз, участвующего в созревании спермы (4, 5). Была показана экспрессия HE4 во многих нормальных тканях, включая эпителий респираторного тракта и репродуктивной системы, а также в тканях опухолей яичника (6-10). В дополнении к экспрессии на клеточном уровне, был показан высокий уровень секреции HE4 в кровотоке у пациенток при раке яичника. В исследовании методом случай-контроль при сравнении пациенток с раком яичника с большими доброкачественными заболеваниями и здоровыми женщинами, Hellström et al. Показали, что чувствительность HE4 для выявления рака яичников составляет 67% при специфичности 96% (11). При дальнейшем изучении многочисленных известных биомаркеров рака яичников, HE4 продемонстрировал наибольшую чувствительность для рака яичников, особенно на ранней стадии заболевания. Исследование показало, что комбинация определений HE4 и CA125 была наиболее точным предиктором присутствия злокачественного образования, чем любой из маркеров в отдельности, с чувствительностью 76% при специфичности of 95% (12).

Рак яичников стоит на четвертом месте среди наиболее частых причин смерти женщин от злокачественных заболеваний. В Европе смертность составляет 3.6 - 9.3 на 100.000 женщин (13). Симптомы рака яичников часто воспринимаются как проявления аднексита, не явно выражены и неспецифичны. Главная задача диагностических процедур при выявлении образования в малом тазу – это определение злокачественной или доброкачественной природы заболевания. Показано, что в США приблизительно 5 – 10 % женщин подвергаются хирургическому вмешательству по поводу предполагаемой злокачественной опухоли яичника в течение жизни, но только у 13 – 21 % этих женщин действительно выявляется рак яичников (14). Бюллетень Американкой Коллегии Акушеров и Гинекологов опубликовал в 2007 статью, где говорится, что “Период общей выживаемости женщин с опухолями яичников, проходящие лечение у врачей, специалистов-онкологов, с опытом лечения рака яичников, у онкогинекологов, значительно больше по сравнению с периодом выживаемости пациенток, больных раком яичников,

проходящих лечение у гинекологов” (15). Так как большая часть выявленных случаев образований в малом тазу доброкачественные, очень важно до проведения операции оценить риск присутствия злокачественной опухоли, для правильного выбора тактики лечения (15).

С 1988 года определение уровня CA125 в сыворотке, УЗИ обследование, а также СТ, MRI и СТ/PET являлись стандартами для определения является ли образование подозрительным на злокачественное (16). Хотя литература переполнена статьями с описаниями, какой из методов наиболее точен, комбинация физического осмотра, измерения CA125 и метода визуализации обладает максимальной положительной предсказательной ценностью (17-19). Для улучшения этой триады, у пациенток с образованиями в малом тазу может быть использовано определение HE4 в сочетании с определением ARCHITECT CA 125 II или CanAg CA125 EIA assay, с целью оценки риска эпителиального рака яичника. Результаты должны интерпретироваться в совокупности с результатами других обследований в соответствии со стандартными клиническими руководствами.

Кроме того, HE4 EIA может быть использован для мониторинга эффективности терапии при инвазивном эпителиальном раке яичников. Результаты должны быть использованы в сочетании с другими клиническими методами, используемыми для мониторинга рака яичников.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Настоящий набор является твердофазным, неконкурентным методом, основанным на прямой “сэндвич” технологии, с использованием двух типов моноклональных мышиных антител 2H5 и 3D8 к двум различным эпитопам C-WFDC домена молекулы HE4. Стандарты, контроли и образцы пациентов инкубируют вместе с биотинилированными анти-HE4 моноклональными антителами 2H5 в покрытых стрептавидином лунках микропланшета. В процессе инкубации HE4, содержащийся в стандартах, контролях или образцах пациентов, адсорбируется на покрытых стрептавидином ячейках микропланшета с биотинилированными анти-HE4 моноклональными антителами. Стрипы затем промываются и инкубируются с пероксидазой хрена, меченой анти-HE4 моноклональными антителами 3D8. После промывки в каждую ячейку добавляется буферный субстрат/хромогенный реагент (перекись водорода и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин), в результате происходит ферментативная реакция. В процессе реакции в присутствии антигена развивается голубая окраска. Интенсивность окраски пропорциональна количеству антигена HE4 в образце.

Интенсивность окраски измеряется на микропланшетном ридере с фильтром 620 нм (или, что необязательно, при 405 нм после добавления стоп-раствора).

Стандартные кривые строятся для каждого анализа в координатах: оптическая плотность против концентрации для каждого стандарта. Концентрация HE4 в образцах пациента рассчитывается по калибровочной кривой.

КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

- Каждый набор содержит реагенты для 96 тестов.
- Срок годности набора указан на упаковке.
- Не используйте набор после истечения срока годности.
- Не смешивайте реагенты из различных лотов.
- Храните набор при 2-8 °C. Не замораживать!
- Сроки хранения вскрытых реагентов при условии, что реагенты не были контаминированы, хранились в плотно закрытых оригинальных упаковках и использовались так, как описано в данной инструкции, указаны в таблице. Верните оставшиеся реагенты в холодильник на 2-8 °C немедленно после использования.

Компонент	Количество	Срок годности и хранение
Микропланшет	1 палочка 2-8°C	до истечения срока годности
12x8 микролунок, покрытых стрептавидином. После вскрытия немедленно верните неиспользованные стрипы в пакет с осушителем. Тщательно закройте пакет и храните сухим.		
Стандарт HE4 A	1x 8 мл	2-8°C до истечения срока годности

Готов к использованию. Стандарт находится в солевом растворе фосфатного буфера с бычьим сывороточным альбумином, инертным желтым красителем и антимикробным консервантом, не содержащим азиды натрия. Должен также использоваться для разведения образцов.

Стандарты HE4 B-F, 5 флаконов, лиофилизированные

Стабильность после растворения: 4 недели при 2-8 °C

4 месяца при -20 °C или ниже

HE4	B	1 x 1 мл
HE4	C	1 x 1 мл
HE4	D	1 x 1 мл
HE4	E	1 x 1 мл
HE4	F	1 x 1 мл

Лиофилизированные стандарты, содержат антиген HE4 в фосфатном буфере, с бычьим сывороточным альбумином, инертным желтым красителем и антиминокробным консервантом, не содержащим азида натрия. Перед использованием должны быть растворены в дистиллированной или деионизированной воде.

ЗАМЕЧАНИЕ: точные концентрации HE4 специфичны для каждого лота и указаны на этикетке каждого флакона.

Контроли HE4 2 флакона, лиофилизированные

Стабильность после растворения: 4 недели при 2-8 °C
4 месяца при -20 °C или ниже

HE4	контроль 1	1 x 1 мл
HE4	контроль 2	1 x 1 мл

Лиофилизированные контроли содержат антиген HE4 в человеческой сыворотке и антиминокробным консервантом, не содержащим азида натрия. Перед использованием должны быть растворены в дистиллированной или деионизированной воде.

Биотинилированные Анти - HE4 1 фл. 15 мл
2-8 °C до истечения срока годности

Биотин анти-HE4 моноклональные антитела мыши, ≈ 1 мкг/мл. Готовый к использованию солевой раствор фосфатного буфера (pH 7.2) с бычьим сывороточным альбумином, блокирующими агентами, детергентами, инертным красным красителем и антиминокробным консервантом, не содержащим азида натрия.

Трейсер 1 фл. 0.75 мл 2-8 °C до истечения срока годности

Стоковый раствор конъюгата пероксидазы хрена анти-HE4 моноклональных антител мыши, ≈ 40 мкг/мл. Содержит антиминокробный консервант, не содержащий азида натрия. Должен быть разбавлен перед использованием разбавителем трейсера.

Разбавитель трейсера 1 фл. 15 мл 2-8 °C до истечения срока годности

Готовый к использованию солевой раствор фосфатного буфера (pH 7.2) с бычьим сывороточным альбумином, блокирующими агентами, детергентами, голубым инертным красителем и антиминокробным консервантом, не содержащим азида натрия.

Субстрат ТМБ 1 фл. 12 мл 2-8 °C до истечения срока годности

Готов к использованию. Содержит забуференный раствор перекиси водорода и ТМБ.

Стоп-раствор 1 фл. 15 мл 2-8 °C до истечения срока годности

Готовая к использованию 0.12 M соляная кислота.

Концентрат буфера для промывок
1 фл. 50 мл 2-8 °C до истечения срока годности

Должен быть разведен перед использованием в 25 раз водой. Содержит ТРИС-HCl солевой раствор с ТВИН 20 и Germall II в качестве консерванта.

Признаки нестабильности

Раствор субстрата ТМБ должен быть бесцветный или слегка голубоватый. Голубой цвет свидетельствует о загрязнении реагента и раствор должен быть выброшен.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Только для диагностики In Vitro:

- Соблюдайте данную инструкцию. Достоверность результатов тестирования не может быть гарантирована, если анализ выполнен с какими-либо отклонениями от инструкции, прилагаемой к набору.

- Обращайтесь с пробами пациентов как с потенциально инфекционно опасными. С реагентами, содержащими компоненты человеческого происхождения и с образцами человеческого происхождения рекомендуется обращаться согласно Стандарту OSHA по работе с патогенами (20). При работе с материалами, содержащими или потенциально содержащими инфекционные агенты необходимо соблюдать уровень безопасности 2 (21) или другой соответствующий уровень безопасности.
- Следуйте принятым инструкциям при утилизации всех отработанных материалов.

Внимание:

Материалы человеческого происхождения, использованные при производстве реагентов данного набора, были протестированы с отрицательными результатами на антитела к HIV 1 и 2, антитела к HCV и поверхностному антигену гепатита В (HBsAg). Так как не существует метода, полностью гарантирующего отсутствия инфекционных заболеваний, передающихся с кровью, то со всеми материалами человеческого происхождения необходимо обращаться как с потенциально инфекционно опасными.

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Набор разработан для использования сыворотки (включая сыворотку, собранную в сепараторные пробирки, SST). Возможность использования образцов плазмы или других биологических жидкостей не была подтверждена для данного метода HE4 EIA. Соберите кровь из вены и следуйте инструкции производителя пробирок. При проведении серии определений необходимо выполнять тестирование одного типа образцов.

Сыворотку можно хранить при 2-8 °C в течение 3 дней до тестирования. Для более длительного хранения образцы необходимо заморозить при температуре -40 °C или ниже.

Перед тестированием все образцы должны достичь комнатной температуры. Тщательно перемешайте образцы, аккуратно переворачивая пробирки несколько раз перед анализом. Образцы, содержащие частицы должны быть центрифугированы перед тестированием на 10.000 x g в течении 10 минут, для удаления частиц, которые могут появиться при размораживании образцов.

ПРОЦЕДУРА

Требуемые материалы, не поставляемые с набором

- Шейкер для микропланшета**
Встряхивание должно быть средним или энергичным, около 700-1100 об/мин.
- Устройство для промывки плашек**
Автоматическое промывочное устройство с возможностью выполнять 1, 3 и 6 циклов промывки и с минимальным объемом заполнения 350 мкл/лунку/цикл промывки. Рекомендуется 8-канальная пипетка с одноразовыми пластиковыми наконечниками для заполнения 350 мкл, если не используется автоматический вошер.
- Микропланшетный ридер**
С длиной волны 620 нм и/или 405 нм и диапазоном считывания оптической плотности от 0 до 3.0.
- Точные пипетки**
С одноразовыми пластиковыми наконечниками для раскапывания микрообъемов жидкостей. 8-канальная пипетка для раскапывания 100 мкл желательна, но не обязательна.
- Дистиллированная или деионизированная вода**
Для растворения стандартов HE4 и контролей HE4, для приготовления разведенного буфера для промывок.

Замечания по протоколу анализа

- Для получения хороших результатов важно хорошо понимать настоящую методику и точно следовать ей. Реагенты, поставляемые с набором, представляют собой единое целое. Не смешивайте идентичные реагенты из наборов, имеющих разные номера лотов. Не используйте реагенты набора после истечения срока годности, напечатанного на внешней стороне коробки.
- Перед использованием реагенты должны быть доведены до комнатной температуры (20-25 °C). **Для получения точных результатов анализ следует проводить при температуре 20-25 °C.** Замороженные образцы после оттаивания должны быть медленно и аккуратно перемешаны вручную. Не использовать вортекс или сильное перемешивание образцов и контролей.
- Перед раскапыванием стандартов и образцов пациентов рекомендуется промаркировать стрипы для возможности их четкой идентификации в течение и после анализа.
- Необходима тщательная промывка стрипов. **Убедитесь в том, что каждая ячейка заполняется полностью, что аспирация жидкости между циклами и в конце полная, и что ячейки**

сухие. Если осталась часть жидкости, переверните плашку на фильтровальную бумагу и легко постучите по ней.

Автоматическая промывка: Следуйте инструкциям производителя прибора. Нельзя надолго оставлять промывающее устройство с промывочным раствором, так как иглы могут засориться и давать в дальнейшем неполную промывку.

5. Раствор субстрата ТМБ очень чувствителен к контаминации. Оптимально для сохранения стабильности реагента поместите необходимое количество реагента из флакона в чистый резервуар или одноразовую пластиковую ювету, для того чтобы избежать контаминации реагента. Во время работы с субстратом ТМБ убедитесь в том, что вы используете чистые одноразовые пластиковые наконечники.
6. Правильно используйте пипетки с наконечниками во время раскапывания образцов и реагентов. Избегайте прикосновения к стрипу или поверхности жидкости и переноса реагента из лунки в лунку. Это особенно важно при работе с субстратом ТМБ.

Приготовление реагентов	Стабильность приготовленного реагента
Стандарты HE4 В-F	4 недели при 2-8 °C 4 месяца при -20 °C или ниже

Внесите точно 1.0 мл дистиллированной или деионизированной воды в каждый флакон. Оставьте не меньше чем на 15 минут при комнатной температуре, для полного растворения, и тщательно перемешайте перед использованием.

Замечание: точные концентрации HE4 указаны на этикетке каждого флакона и должны быть использованы для расчета результатов.

Контроли HE4 1 и 2	4 недели при 2-8 °C 4 месяца при -20 °C или ниже
---------------------------	---

Внесите точно 1.0 мл дистиллированной или деионизированной воды в каждый флакон. Оставьте не меньше чем на 15 минут при комнатной температуре, для полного растворения, и тщательно перемешайте перед использованием.

Замечание: допустимые диапазоны концентрации HE4 указаны на этикетке каждого флакона.

Буфер для промывок	2 недели при 2-25 °C в герметичном контейнере
---------------------------	--

Налейте 50 мл буфера для промывок в чистый сосуд и разведите в 25 раз, добавив 1200 мл дистиллированной или деионизированной воды для получения готового буфера для промывок.

Рабочий раствор трейсера	4 недели при 2-8 °C
---------------------------------	---------------------

Приготовьте нужный объем рабочего раствора трейсера смешением 50 мкл раствора трейсера с 1 мл разбавителя трейсера на стрип (см. нижеприведенную таблицу и протокол).

Кол-во стрипов	Раствор трейсера (мкл)	Разбавитель трейсера (мл)
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

Удостоверьтесь, что используются только чистые пластиковые или стеклянные сосуды для приготовления рабочего раствора трейсера.

Другой вариант: Вылейте содержимое флакона с раствором трейсера во флакон с разбавителем трейсера и осторожно перемешайте. Убедитесь, что весь раствор трейсера перенесен во флакон с разбавителем трейсера.

ЗАМЕЧАНИЕ: Рабочий раствор трейсера стабилен 4 недели при хранении при 2-8 °C. Не готовьте его больше, чем требуется для анализов на этот период. Храните раствор правильно.

МЕТОДИКА

Проводите каждое измерение стандартов, контролей и проб пациентов в дублях. Стандартная кривая должна строиться для

каждого анализа. Все реагенты и образцы должны иметь комнатную температуру перед анализом (20-25 °C).

1. Начните с приготовления стандартов В-F, контролей 1 и 2, буфера для промывок и раствора антители. Очень важно использовать только чистые контейнеры. Тщательно соблюдайте данную инструкцию.
2. Закрепите требуемое количество микрострипов в держателе. (Верните неиспользуемые стрипы в пластиковый пакет и закройте его.) Промойте каждый стрип один раз промывочным раствором. Не промывайте больше стрипов, чем собираетесь использовать в течение 30 минут.
3. Добавьте 25 мкл стандартов HE4 (ст.), контролей (к) и образцов пациентов (обр.) в ячейки согласно следующей схеме:

	1	2	3	4	5 и т.д.
A	ст. А	ст. Е	обр. 1		
B	ст. А	ст. Е	обр. 1		
C	ст. В	ст. F	обр. 2		
D	ст. В	ст. F	обр. 2		
E	ст. С	К. 1	и т.д.		
F	ст. С	К. 1			
G	ст. D	К. 2			
H	ст. D	К. 2			

4. Добавьте 100 мкл раствора биотинилированных анти-HE4 в каждую ячейку, используя одно- или восьмиканальную пипетку на 100 мкл. Избегайте касания стрипов или поверхности жидкости.
5. Инкубируйте держатель со стрипами 1 час (± 10 минут) при комнатной температуре (20-28 °C) с постоянным перемешиванием планшета на шейкере для микропланшет.
6. После первой инкубации удалите жидкость и промойте каждый стрип 3 раза, как описано в п. 4 "Замечаний по протоколу анализа".
7. Добавьте в каждую ячейку по 100 мкл рабочего раствора трейсера, в той же последовательности, как в шаге 4.
8. Инкубируйте держатель со стрипами в течение 1 часа (± 5 мин.) при комнатной температуре (20-25 °C) с постоянным перемешиванием.
9. После второй инкубации удалите жидкость и промойте каждый стрип 6 раз, как описано в п.4 "Замечаний по протоколу анализа".
10. Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую ячейку, в той же последовательности, как в п.4. Раствор субстрата следует добавлять по возможности быстро, чтобы время между добавлением в первую и последнюю ячейку не превышало 5 минут.
11. Инкубируйте 30 минут (± 5 минут) при комнатной температуре с постоянным перемешиванием плашки на шейкере. Избегайте попадания прямого солнечного света.
12. Немедленно считайте оптическую плотность на ридере при 620 нм.

Альтернативный вариант

Если в лаборатории нет ридера с фильтром на 620 нм, оптическая плотность может быть определена, как описано в шаге 12 альт.

12 альт. Добавьте 100 мкл стоп-реагента в каждую ячейку и перемешайте. После этого в течение 15 минут считайте оптическую плотность при 405 нм.

Измеряемый диапазон

Данным методом HE4 EIA могут быть измерены концентрации в диапазоне от 15 до 900 пМ. Если концентрация HE4 в образце превышает измеряемый диапазон, образец необходимо развести стандартом «0» и перед тестированием (см. раздел "Расчет результатов для разведенных образцов").

Контроль качества

Для контроля качества измерений должны быть использованы контроли HE4 1 и 2, поставляемые в наборе. Допустимый диапазон указан на флаконе каждого контроля.

Результаты измерения HE4 данным методом считаются достоверными, если:

- Средние значения дублей, полученные для контролей, попадают в диапазон допустимых значений.
- Коэффициент вариации (CV) дублей стандартов В-F и контролей не превышает 15%.
- Разница значений оптической плотности дублей стандарта А (ноль) составляет не более 0.06 оптических единиц.

Если в ходе исследования получены недостоверные результаты для стандартов или контролей, необходимо полностью проверить все реагенты и оборудование, точность пипеток, правильность работы ридера и вошера и повторить анализ. Каждой лаборатории рекомендуется приготовить свои собственные пулы сыворток с

различными уровнями, которые можно использовать для внутреннего контроля качества исследований.

Референсные материалы

Так как не существует международного референсного стандарта для антигена HE4, значения калибраторов данного набора HE4 EIA были установлены по набору внутренних стандартов производителя.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Если используется ридер со встроенной программой обработки данных, по инструкции к ридеру создайте программу, используя концентрацию каждого стандарта HE4.

Для автоматического расчета результатов рекомендуется использовать следующие методы:

- Метод аппроксимации кубическим сплайном. Стандарт А (0 мкг/л) должен быть включен в калибровочную кривую со значением 0 пМ.
- Интерполяция от точки к точке. Стандарт А должен быть включен в калибровочную кривую со значением пМ.
- Квадратичная регрессия. Стандарт А должен быть включен в калибровочную кривую со значением 0 пМ.

Замечание: 4-параметрическая или линейная регрессия не должны использоваться в этом методе. Для ручных расчетов стандартная кривая строится откладыванием значений оптической плотности (А), полученных для каждого стандарта против соответствующих концентраций HE4 (в пМ) (см. рисунок ниже). Значения концентраций HE4 в образцах для каждого пациента находят по калибровочной кривой, используя оптическую плотность образца.

Расчет результатов с разбавлением образцов

Если образец дает значение HE4 больше 900 пМ, необходимо разбавить его в 10 или 100 раз нулевым стандартом.

- Разбавление в 10 раз = 50 мкл образца + 450 мкл стандарта А
- Разбавление в 100 раз = 50 мкл разбавленного в 10 раз образца + 450 мкл стандарта А

Концентрация HE4 в исходных образцах рассчитывается следующим образом:

- Разбавление в 10 раз: 10 x Полученное значение
- Разбавление в 100 раз: 100 x Полученное значение

Алгоритм расчета риска злокачественной опухоли яичника (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm, ROMA) для оценки риска эпителиального рака яичника у женщин в пре- и постменопаузе, при выявлении образований в малом тазу

Расчет прогностического индекса (ПИ)

Прогностический индекс (ПИ) рассчитывается для женщин в пременопаузе и постменопаузе отдельно, с использованием уравнений (1) и (2), приведенных ниже. Для расчета ПИ значения, полученные при тестировании методом HE4 EIA и либо методом ARCHITECT CA125 II, либо методом CanAg CA125 EIA, подставляются в соответствующее уравнение алгоритма, приведенное ниже, в зависимости от менопаузального статуса женщины.

(1) Женщины в пременопаузе
Прогностический индекс (ПИ) = $-12.0 + 2.38 \cdot \text{LN}[\text{HE4}] + 0.0626 \cdot \text{LN}[\text{CA125}]$

(2) Женщины в постменопаузе
Прогностический индекс (ПИ) = $-8.09 + 1.04 \cdot \text{LN}[\text{HE4}] + 0.732 \cdot \text{LN}[\text{CA125}]$

Расчет показателя ROMA

Для расчета значения показателя (т.е. Предсказанной вероятности), внесите рассчитанное значение Прогностического индекса (ПИ) в следующее уравнение (3):

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

Пример расчета значений ПИ и ROMA:

Менопаузальный статус	HE4 (pM)	CA125 (Ед/мл)	Расчет ПИ	ПИ	ROMA (%)
Пременопауза	37.5	74.9	$-12.0 + (2.38 \cdot 3.624) + (0.0626 \cdot 4.316)$	-3.10388	4.29
Пременопауза	386.6	21.8	$-12.0 + (2.38 \cdot 5.957) + (0.0626 \cdot 3.082)$	2.371517	91.5
Постменопауза	66.7	11.3	$-8.09 + (1.04 \cdot 4.200) + (0.732 \cdot 2.425)$	-1.94683	12.5
Постменопауза	383.1	22.7	$-8.09 + (1.04 \cdot 5.948) + (0.732 \cdot 3.122)$	0.381799	59.4

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

У пациенток с подтвержденным диагнозом рак яичника значения HE4 могут лежать в одном диапазоне со значениями, определяемыми у здоровых женщин. Отдельные гистологические типы рака яичника, такие как герминогенные и мукоидные, редко

экспрессируют HE4, следовательно, HE4 не может быть рекомендован для мониторинга пациенток с диагностированными герминогенными или мукоидными опухолями яичников (7). Кроме того, повышенные уровни антигена HE4 могут присутствовать у женщин, не страдающих злокачественными заболеваниями. Следовательно, уровень HE4 не может быть использован как абсолютное доказательство присутствия или отсутствия злокачественного заболевания и определение HE4 не должно быть использовано для скрининга рака. При постановке диагноза и мониторинге заболевания результаты тестирования должны интерпретироваться в совокупности с результатами других исследований и диагностических процедур, тест HE4 не должен заменять какую-либо установленную клиническую процедуру.

Алгоритм расчета риска злокачественной опухоли яичника не был доказан для следующих групп пациенток:

Женщины, уже проходившие курс лечения по поводу злокачественной опухоли

Женщины, проходящие курс химиотерапии

Пациентки младше 18 лет.

Ошибка в выполнении анализа HE4 EIA и/или измерения CA125, или ошибка в расчете результатов может привести к неправильной оценке риска и несоответствующему ведению больной. Особенно ложные низкие результаты анализа могут привести к определению пациентки в группу низкого риска наличия эпителиального рака яичников, что может привести к неспецифическому лечению. Использование результатов без согласования с другими лабораторными исследованиями, данными методов визуализации и клиническими оценками может быть рискованным.

Антитела к реагентам (человеческие анти-мышинные антитела, НАМА, или гетерофильные антитела), присутствующие в образцах сывороток пациенток, иногда могут влиять на результаты анализа, даже несмотря на то, что в буферы включены блокирующие агенты.

Тестирование должно выполняться при стандартной температуре, так как инкубации при температурах выше рекомендованной (20 - 25°C) могут привести к получению ложно отрицательных результатов.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Были оценены уровни HE4 у 1983 образцов, результаты приведены ниже:

Распределение уровней HE4					
Количество пациентов/уровень	0 - 150 pM	150.1 - 300 pM	300.1 - 500 pM	≥ 500pM	
ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫЕ ЖЕНЩИНЫ					
Пременопауза	423	416	4	0	3
Постменопауза	443	424	16	2	1
ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫЕ СОСТОЯНИЯ					
Беременность	22	21	1	0	0
Доброкачественные заболевания яичников	347	324	18	1	4
Другие доброкачественные заболевания	107	81	8	7	11
Гипертензия/застойная сердечная недостаточность	96	75	16	2	3
РАК					
Рак яичников	127	27	18	21	61
Рак молочной железы	46	40	4	2	0
Рак легких	50	28	16	6	0
Рак эндометрия	266	203	36	11	16
Рак ЖКТ	56	47	8	0	1

В данном исследовании у 94.4% здоровых женщин уровень HE4 был ниже 150 pM. Каждой лаборатории рекомендуется установить свой собственный диапазон для обследуемой популяции.

Мониторинг течения заболевания у пациенток с установленным диагнозом рак яичника

Эффективность использования HE4 EIA с целью мониторинга течения рака яичников оценивали у 80 пациенток. С этой целью сравнивали изменения концентрации HE4 в образцах сывороток с изменениями состояния больной. Всего было изучено 354 парных данных, в среднем по 4.4 для каждой пациентки. Положительное изменение уровня HE4 было определено как повышение значения не менее чем на 25% по сравнению с предыдущим результатом тестирования. Такое изменение учитывает и воспроизводимость метода, и биологические колебания. Для 60% (76 из 126) образцов сывороток пациенток с положительными изменениями наблюдалась корреляция с прогрессией заболевания. В 75% случаев (171 из 228) отсутствие значительных изменений уровня HE4 совпадало с отсутствием прогрессии. Общая согласованность составила 70% (247/354). В таблице ниже приведены данные в формате 2x2.

Изменение состояния по последовательным парам			
Повышение концентрации HE-4	прогрессия	Нет прогрессии	всего
> 25%	76	57	133
≤ 25%	50	171	221
всего	126	228	354

В таблице ниже приведено распределение по пациенткам. 93% (54/58) серий образцов сывороток пациенток с положительными изменениями коррелировали с прогрессией заболевания, тогда как для 32% (7/22) серий образцов, в которых не наблюдалось значительных изменений уровня HE4, наблюдалась корреляция с отсутствием прогрессии. Общая согласованность составила 76 % (61/80).

Изменение состояния по пациенткам			
Повышение концентрации HE-4	прогрессия	Нет прогрессии	всего
> 25%	54	15	69
≤ 25%	4	7	11
всего	58	22	80

Оценка риска у пациенток с образованиями в малом тазу

Эффективность использования HE4 EIA в комбинации с CA125, измеренным либо методом ARCHITECT CA125 II, либо методом CanAg CA125 EIA, для оценки риска наличия эпителиального рака яичника у пациенток с образованием в малом тазу определяли в проспективном двойном слепом клиническом многоцентровом исследовании. Был разработан алгоритм (ROMA, см. выше) для оценки риска эпителиального рака яичника. Алгоритм учитывает значения концентраций HE4 и CA125, а также менопаузальный статус пациентки. Алгоритм позволяет рассчитать вероятность обнаружения эпителиального рака яичника. В предполагаемое исследование были включены 502 пациентки и для них были определены вероятность рака яичника и возможность разделения на группы высокого и низкого риска на основании рассчитанного значения ROMA.

На рисунках ниже приведены кривые распределения частот значений ROMA для доброкачественных и злокачественных случаев, полученные с использованием описанного алгоритма: рис. 1 и 2 – для результатов исследований методами HE4 EIA и ARCHITECT CA125 II, рис. 3 и 4 – для результатов исследований методами HE4 EIA и CANAG CA125 EIA.

Рис. 1 Кривая распределения частот значений ROMA для женщин в пременопаузе. Комбинация методов HE4 EIA + ARCHITECT CA125 II

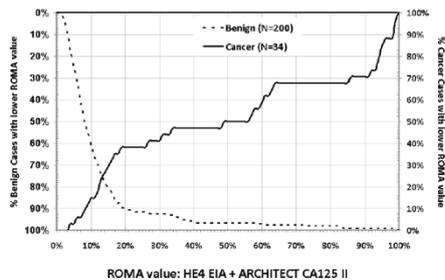


Рис. 2 Кривая распределения частот значений ROMA для женщин в постменопаузе. Комбинация методов HE4 EIA + ARCHITECT CA125 II

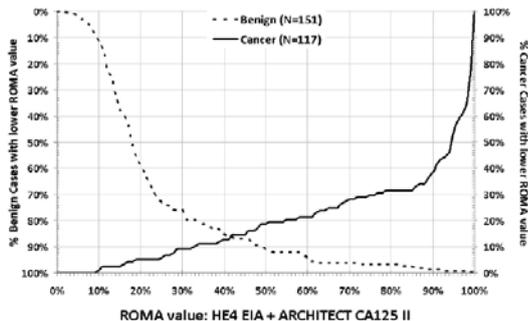


Рис. 3 Кривая распределения частот значений ROMA для женщин в пременопаузе. Комбинация методов HE4 EIA + CanAg CA125 II

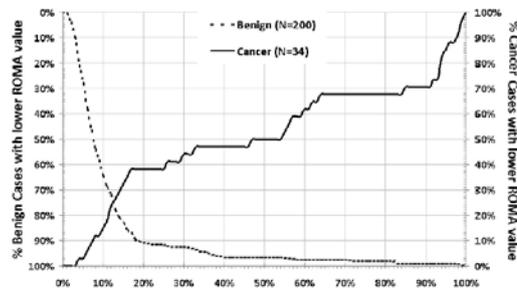
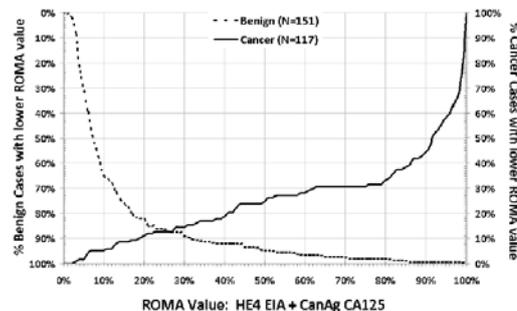


Рис. 4 Кривая распределения частот значений ROMA для женщин в постменопаузе. Комбинация методов HE4 EIA + CanAg CA125 II



Стратификация риска – группы высокого и низкого риска

Алгоритм риска злокачественной опухоли яичника использован для распределения пациенток по группам риска обнаружения эпителиального рака яичника. При специфичности 75% для комбинации методов HE4 EIA + ARCHITECT CA125 II были использованы следующие уровни:

Женщины в пременопаузе:

Значения ROMA ≥ 13.1% = высокий риск обнаружения эпителиального рака яичника

Значения ROMA < 13.1% = низкий риск обнаружения эпителиального рака яичника

Женщины в постменопаузе

Значения ROMA ≥ 27.7% = высокий риск обнаружения эпителиального рака яичника

Значения ROMA < 27.7% = низкий риск обнаружения эпителиального рака яичника

Стратификация риска всех пациенток, имеющих аднексальные новообразования, при использовании ROMA (специфичность 75%), приведена в таблице 1, включая стратификацию риска отдельно для пациенток в пременопаузе и постменопаузе соответственно. Чувствительность разделения пациенток с эпителиальным раком яичников I-IV стадий на группы высокого и низкого риска обнаружения эпителиального рака яичников составила 94% при специфичности 75%, т.е. 75% женщин с доброкачественными образованиями были отнесены к группе низкого риска.

Прогностическая ценность положительного и отрицательного результатов составила 58% и 97%, соответственно.

Таблица 1: Стратификация риска пациенток, с выявленными образованиями в малом тазу, при использовании комбинации методов HE4 EIA + ARCHITECT CA125 II для расчета значения ROMA. Уровень cut-off при 75% специфичности для женщин в пременопаузе ≥ 13.1%, уровень cut-off при 75% специфичности для женщин в постменопаузе ≥ 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* EOC	7/8 (88%)	35/39 (90%)	42/47 (89%)
Stage I – IV EOC	16/18 (89%)	105/111 (95%)	121/129 (94%)

*Stage I – IIb & Stage IIIC (Omentum negative, lymphnode positive) Epithelial Ovarian Cancer

Не существует статистически достоверной разницы в чувствительности и специфичности значений ROMA, рассчитанных

для комбинаций методов HE4 EIA + ARCHИТЕКТ CA125 II или CanAg CA125 EIA для дифференциации между доброкачественными заболеваниями и эпителиальным раком яичников. При использовании комбинации методов HE4 EIA + ARCHИТЕКТ CA125 II чувствительность стратификации пациентов высокой группы риска с эпителиальным раком яичников I-IV стадий составила 93%. Прогностическая ценность положительного и отрицательного результатов составила 57% и 97%, соответственно.

Необходимо отметить, что уровни cut-off для разделения на группы высокого и низкого уровня при необходимой специфичности должны соответствовать методу, используемому для измерения концентрации CA125.

Для комбинации методов HE4 EIA + CanAg CA125 были выбраны следующие уровни cut-off, обеспечивающие специфичность 75%:

Женщины в пременопаузе:

Значения ROMA \geq 12.5% = высокий риск обнаружения эпителиального рака яичника

Значения ROMA < 12.5% = низкий риск обнаружения эпителиального рака яичника

Женщины в постменопаузе

Значения ROMA \geq 14.4% = высокий риск обнаружения эпителиального рака яичника

Значения ROMA < 14.4% = низкий риск обнаружения эпителиального рака яичника

Ложно отрицательные результаты и доля случаев эпителиального рака яичников, распределенных в группу низкого риска среди пациентов, имеющих аднексальные новообразования, с использованием ROMA при уровне специфичности 75% представлены в таблице 2. Стратификация на группы высокого и низкого риска при использовании алгоритма ROMA при уровне специфичности 75% дала 6,2% ложно отрицательных результатов. Три процента всех случаев, попавших в группу низкого риска, были представлены раком яичников.

Таблица 2: Ложно отрицательный уровень и доля случаев с раком яичников среди всех случаев, попавших в группу низкого риска среди пациентов, имеющих аднексальные новообразования, с использованием ROMA.

Уровень cut-off при 75% специфичности для женщин в пременопаузе < 13.1%, уровень cut-off при 75% специфичности для женщин в постменопаузе < 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
Pre-menopausal	2	18	11.1%	2	149	1.3%
Postmenopausal	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)

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Воспроизводимость

Общая воспроизводимость метода определения HE4: CV < 15%. Исследования были выполнены согласно руководству NCCLS EP5-A (22). Была протестирована панель из 4 образцов сывороток, с использованием наборов двух лотов, в дублях, по два раза в день, в течение 20 дней. Данные этого исследования приведены в таблице ниже.*

образец	Лот набора	n	Средняя концентрация, рМ	SD (рМ) внутри серии	CV (%) внутри серии	Общее SD (рМ)	Общий 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

*Представительные данные; результаты в различных лабораториях могут отличаться от этих данных.

Предел определения

Предел определения метода HE4 EIA составляет \leq 15 рМ. Предел определения (LoD) соответствует верхнему пределу 95% доверительного интервала и представляет собой наименьшую концентрацию антигена HE4, которая отлична от нуля. Для определения метода оценки LoD было использовано руководство NCCLS, EP17-A (23). В проведенном исследовании HE4 стандарт А (ноль) и 4 образца сыворотки здоровых женщин были разведены до 5 рМ буфером для разведения образцов и протестированы в 4 постановках по 24 повтора в каждой, в разные дни. LoD был рассчитан следующим образом:

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

Рассчитанный предел определения набора HE4 EIA составил < 2.5 рМ.

Функциональная чувствительность

Функциональная чувствительность метода HE4 EIA составляет \leq 25 рМ. Функциональная чувствительность выражена как концентрация аналита при которой CV составляет 20%. Для определения метода оценки функциональной чувствительности было использовано руководство NCCLS, EP5-A2 (22). В проведенном исследовании образцы были протестированы в 2 постановках по 4 повтора в каждой, в 20 разных дней, наборами двух лотов.

Рассчитанная функциональная чувствительность набора HE4 EIA составила < 5 рМ.

Извлечение

Среднее извлечение набора HE4 EIA составляет $100 \pm 15\%$. В проведенных исследованиях образцы сывороток пациенток с известными концентрациями HE4 были добавлены к нормальным образцам человеческой сыворотки. Концентрации HE4 определяли с использованием данного метода HE4 EIA, а затем рассчитывали процент извлечения. Представительные данные этого исследования приведены в таблице ниже*.

Образец	Эндогенное значение, полученное данным методом, рМ	Добавленный HE4 антиген, рМ	Наблюдаемое значение HE4, полученное данным методом, рМ	Извлечение **, %
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

Среднее извлечение, по четырем различным обогащенным концентрациям, приведенным выше, составило 97%.

*Представительные данные; результаты в различных лабораториях могут отличаться от этих данных.

** % извлечения = наблюдаемая концентрация HE4 (рМ)/эндогенная концентрация HE4 (рМ) + добавленный HE4 (рМ)

Хук-эффект

Эффект высоких концентраций (Хук-эффект) – это феномен, когда при очень высоких концентрациях аналита образец может читаться в пределах диапазона измеряемых значений метода. Для метода HE4 EIA, Хук-эффект не был обнаружен до концентрации 300 000 рМ активного антигена HE4.

Линейность разведения

В среднем линейность разведения метода HE4 EIA составила $100 \pm 15\%$. Исследование было проведено согласно руководству NCCLS (CLSI), EP6-A (24). Образцы сывороток с повышенными уровнями HE4 были разведены HE4 стандартом А (ноль). Концентрация HE4 была определена для каждого разведения и был рассчитан процент

(%) извлечения. Представительные данные этого исследования приведены в таблице ниже*.

Образец	Конечное разведение	Полученное значение (рМ)	Ожидаемое значение (рМ)	Извлечение** (%)
1	Без разведения	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
2	Без разведения	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
3	Без разведения	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

В среднем для представленных разведений трех образцов извлечение = 101%

* - Представительные данные; результаты в различных лабораториях могут отличаться от этих данных.

** - % извлечения = полученная концентрация HE4 x коэффициент разведения / концентрация HE4 неразведенного образца.

Аналитическая специфичность

В среднем аналитическая специфичность метода HE4 EIA составила 100 ± 15%. Были проведены сравнительные исследования образцов, содержащих соединения, перечисленные ниже, в указанных концентрациях, и контрольных образцов сывороток. Для определения метода оценки интерференции было использовано руководство NCCLS, EP7-A (25). Все вещества в протестированных концентрациях не оказывали влияния на результат анализа.

Эндогенные потенциально влияющие вещества сыворотки	Протестированные концентрации
Триглицериды	30 мг/мл
Билирубин	0.2 мг/мл
Гемоглобин	10 мг/мл
Общий белок	120 мг/мл

Химиотерапевтические потенциально влияющие лекарственные препараты	Протестированные концентрации
Карбоплатин	500 мкг/мл
Цисплатин	165 мкг/мл
Клотримазол	0.3 мкг/мл
Циклофосфамид	500 мкг/мл
Дексаметазон	10 мкг/мл
Доксорубин	1.16 мкг/мл
Лейковорин	2.68 мкг/мл
Мелфалан	2.8 мкг/мл
Метотрексат	45 мкг/мл
Паклитаксел	3.5 нг/мл

Потенциально влияющие клинические состояния

Для дополнительной оценки специфичности, методом HE4 EIA были протестированы образцы, содержащие НАМА и ревматоидный фактор (RF). В 5 образцах, содержащих НАМА и в 5 образцах, содержащих RF, был проанализирован % извлечения антигена HE4, добавленного в каждый образец в концентрациях приблизительно 50 и 450 рМ. Общие результаты анализа извлечения суммированы в таблице, приведенной ниже.*

Клинические состояния	Кол-во образцов	Среднее извлечение, %
НАМА	5	101
RF	5	95

*Представительные данные; результаты в различных лабораториях могут отличаться от этих данных.

ГАРАНТИИ

Все характеристики набора, представленные в инструкции, получены при точном соблюдении процедуры метода, описанной в данной инструкции. Любые отклонения или изменения процедуры, не рекомендованные производителем, могут повлиять на результат, в этом случае производитель отрицает какие-либо гарантии, выраженные либо предполагаемые, или установленные законом, включая подразумеваемые гарантии годности для продажи и соответствия назначению.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул.Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИГЕНА HE4

Кат. N 404-10 - 96 тестов

ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

Подготавливайте компоненты непосредственно перед использованием. Соблюдайте условия промывок и инкубаций в соответствии с данной инструкцией. Для получения точных результатов проводите все этапы тестирования при температуре 20-25°C

Шаг	Флакон/Плешка	Действия																																							
1. Приготовить стандарты HE4	<input type="text" value="CAL"/> <input type="text" value="HE4"/> B, C, D, E, F	<p>Внесите точно 1.0 мл дистиллированной или деионизированной воды в каждый флакон. Оставьте не меньше чем на 15 минут при комнатной температуре, для полного растворения, и тщательно перемешайте перед использованием.</p> <p>Замечание: точные концентрации HE4 указаны на этикетке каждого флакона. Стабильность после растворения: 4 недели при 2-8°C.</p> <p>Развести 50 мл концентрата буфера для промывок в 1200 мл дистиллированной или деионизированной воды</p> <p>Смешать 50 мкл трейсера с 1 мл разбавителя трейсера на стрип, или в указанных пропорциях, в зависимости от количества используемых стрипов:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>№ стрипа</th> <th>Трейсер мкл</th> <th>Разбавитель трейсера, мл</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>	№ стрипа	Трейсер мкл	Разбавитель трейсера, мл	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
№ стрипа	Трейсер мкл		Разбавитель трейсера, мл																																						
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																																							
Приготовить контроли HE4	<input type="text" value="CONTROL"/> <input type="text" value="HE4"/> 1, 2																																								
Приготовить буфер для промывок	<input type="text" value="WASHBUF"/> <input type="text" value="25X"/>																																								
Приготовить рабочий раствор трейсера	<input type="text" value="CONJ"/> <input type="text" value="Anti-HE4"/>																																								
	<input type="text" value="DIL"/> <input type="text" value="CONJ"/>																																								
2. Промывка	<input type="text" value="MICROPLA"/>	Промыть каждую ячейку один раз буфером для промывок																																							
3. Добавить стандарты, контроли и образцы	<input type="text" value="CAL"/> <input type="text" value="HE4"/> A, B, C, D, E, F <input type="text" value="CONTROL"/> <input type="text" value="HE4"/> 1, 2, образцы	25 мкл в каждую ячейку																																							
4. Добавить биотин/анти-HE4	<input type="text" value="BIOTIN"/> <input type="text" value="Anti-HE4"/>	100 мкл в каждую ячейку																																							
5. Инкубация	<input type="text" value="MICROPLA"/>	1 час, встряхивая при комнатной температуре (20-25°C)																																							
6. Промывка	<input type="text" value="MICROPLA"/>	Промыть каждую ячейку 3 раза буфером для промывок																																							
7. Добавить рабочий раствор трейсера	Рабочий раствор трейсера	100 мкл в каждую ячейку																																							
8. Инкубация	<input type="text" value="MICROPLA"/>	1 час, встряхивая при комнатной температуре																																							
9. Промывка	<input type="text" value="MICROPLA"/>	Промыть каждую ячейку 6 раз буфером для промывок																																							
10. Добавление субстрата	<input type="text" value="SUBS"/> <input type="text" value="TMB"/>	100 мкл в каждую ячейку																																							
11. Инкубация	<input type="text" value="MICROPLA"/>	30 минут, встряхивая при комнатной температуре (20-25°C)																																							
12. Считывание	<input type="text" value="MICROPLA"/>	620 нм																																							
12a. Добавить стоп-раствор	<input type="text" value="STOP"/>	100 мкл в каждую ячейку																																							
13a. Перемешивание	<input type="text" value="MICROPLA"/>	1 мин, встряхивая при комнатной температуре (20-25°C)																																							
14a. Считывание	<input type="text" value="MICROPLA"/>	Считать при 405 нм в течение 15 минут																																							