

НАБІР ІФА ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ HE4

404-10, HE4 EIA

Каталог. №: 404-10

Кількість : 96

Виробник : Fujirebio Diagnostics,
Inc., (Швеція)

Методика від 09-2008



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

ПРИЗНАЧЕННЯ

Справжній набір HE4 EIA призначений для кількісного визначення пухлинного маркера HE4 в людській сироватці методом імуноферментного аналізу.

Даний набір може бути використаний для моніторингу відповіді на проведену терапію у пацієнток з інвазивними епітеліальними пухлинами яєчника. Серійні визначення HE4 у пацієнток повинні використовуватися в поєднанні з іншими клінічними методами, використовуваними для моніторингу раку яєчників.

Крім того, даний метод призначений для спільного використання з методом визначення ARCHITECT CA 125 II або CanAg CA125 EIA, з метою оцінки ризику наявності епітеліального раку яєчника у жінок в пре- чи постменопаузі, з виявленими утвореннями в малому тазу. Результати тестування повинні інтерпретуватися з урахуванням інших обстежень, у відповідності зі стандартними керівництвами з обстеження пацієнтів.

ВСТУП І ПОЯСНЕННЯ МЕТОДУ (Див. оригінал інструкції англ. мовою).

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Справжній набір є твердофазовим, неконкурентним методом, заснованим на прямій технології "сендвіч", з використанням двох мишачих моноклональних антитіл, 2H5 і 3D8, спрямованих проти двох епітопів в домені C-WFDC HE4. Калібратори, Контролі та зразки пацієнтів інкубуються разом з біотинильованими анти-HE4 моноклональними антитілами в покритих стрептавідином лунках мікропланшетів. HE4, що міститься в стандартах, контролях або зразках пацієнтів, адсорбується на покритих стрептавідином лунках мікропланшетів біотинильованими анти-HE4 моноклональними антитілами. Смужки потім промиваються і інкубуються з пероксидазою хрому, міченою анти-HE4 моноклональними антитілами 3D8. Після промивання в кожну лунку додається буферний субстрат/хромогенний реагент (перекис водню і 3,3', 5,5'-тетраметилбензидин), в результаті відбувається ферментативна реакція. У процесі реакції при присутності антигену розвивається блакитне забарвлення. Інтенсивність забарвлення пропорційна кількості антигену HE4 у зразку.

Інтенсивність забарвлення вимірюється на мікропланшетному рідері з фільтром 620 нм (або, що не обов'язково, при 405 нм після додавання стоп-розчину).

Стандартні криві будуються для кожного аналізу в координатах: оптична щільність проти концентрації для кожного стандарту. Концентрація HE4 в зразках пацієнта розраховується з калібрувальної кривої.

РЕАГЕНТИ

- Кожен набір містить реагенти для 96 тестів.
- Термін придатності набору проставлений назовні коробки.
- Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності.
- Не змішуйте реагенти з різних лотів і наборів.
- Зберігайте набір при 2-8 °C. Не заморожуйте.
- Стабільність розкритих реагентів наведена в таблиці нижче, за умови, що вони не були контаміновані, зберігалися в ретельно закритих оригінальних упаковках і зберігаються і використовуються, як описано. Негайно повертайте реагенти в холодильник (2-8 °C) після використання.

Компонент	Кількість	Зберігання і стабільність після першого використання
Мікропланшет	1 планшет	2-8 °C до закінчення терміну придатності

12x8 мікролунок, покритих Стрептавідином. Після розкриття негайно поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет з осушувачем і ретельно запечатайте пакет, зберігайте сухим.

HE4 Калібратор А	1 флакон х 8 мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
------------------	--------------------	---

Готовий до використання. Стандарт знаходиться в сольовому розчині фосфатного буфера з бичачим сироватковим альбуміном, інертним жовтим барвником і антимікробним консервантом, що не містить азиду натрію. Стандарт повинен також використовуватися для розведення зразків.

HE4 Калібратори В-Ф	5 флаконів х 1 мл, ліофілізовані	4 тижні при 2-8 °C 4 місяці при -20 °C і нижче
---------------------	--	---

Ліофілізовані калібратори містять людські HE4 в буферному сольовому розчині, що містить бичачий сироватковий альбумін, наповнювач, інертний жовтий барвник і антимікробний консервант, що не містить азиду натрію. Має бути відновлений з водою перед використанням. **ПРИМІТКА:** Точні концентрації HE4 є специфічними для кожного лоту і вказуються на етикетці кожного флакона.

Контролі HE4	2 флакона х 1 мл, ліофілізовані	4 тижні при 2-8 °C 4 місяці при -20 °C і нижче
--------------	---------------------------------------	---

Ліофілізовані контролі містять антиген HE4 в людській сироватці та антимікробний консервант, що не містить азиду натрію. Перед використанням повинні бути розчинені з дистильованою або деіонізованою водою.

Біотин Анти-HE4	1 флакон х 15 мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
-----------------	---------------------	---

Біотин Анти-HE4 моноклональне мишаче антитіло, ~ 1 мкг/мл. Містить буферний сольовий розчин (pH 7.2), бичачий сироватковий альбумін, блокуючі агенти, детергент, інертний червоний барвник і антимікробний консервант, що не містить азиду натрію. Готовий до використання.

Трейсер, HRP-мічений анти-HE4	1 флакон х 0.75 мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
-------------------------------	-----------------------	---

Сток-розчин кон'югату пероксидази хрому з анти-HE4 моноклональними мишачими антитілами, ~ 40 мкг/мл. Містить антимікробний консервант, що не містить азиду натрію. Перед використанням повинен бути змішаний з Розчинником Трейсера.

Розчинник для Трейсера	1 флакон х 15 мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
------------------------	---------------------	---

Забуферений фосфатом фізіологічний розчин (pH 7.2) з бичачим сироватковим альбуміном, блокуючими агентами, миючим засобом, інертним синім барвником і антимікробним консервантом, що не містить азиду натрію. Готовий до використання.

Субстрат ТМБ-HRP	1 флакон х 12 мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
------------------	---------------------	---

Містить забуферений розчин перекису водню і 3,3', 5,5' Тетраметилбензидин (ТМБ). Готовий до використання.

Сток-розчин	1 флакон х 15 мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
-------------	---------------------	---

Містить 0.12 М соляної кислоти. Готовий до використання.

Концентрат промивного буфера	1 флакон х 50 мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
------------------------------	---------------------	---

Містить ТРИС-НСІ сольовий розчин з ТВІН 20 і Germall II як консервант. Повинен бути розведений перед використанням в 25 разів водою.

Ознаки нестабільності

Розчин субстрату ТМБ повинен бути безбарвний або злегка блакитний. Блакитний колір свідчить про забруднення реагенту і розчин повинен бути викинутий.

ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Для використання в in-Vitro діагностиці:

- Дотримуйтесь інструкцій у листку-вкладиші. Надійність результатів аналізу не може бути гарантована, якщо є якісь відхилення від інструкції.
- Поводитися зі зразками пацієнтів як з потенційно інфекційними. З реагентами, що містять компоненти людського походження, та зі зразками людського походження рекомендується поводитися згідно зі Стандартом OSHA по роботі з патогенами (20). При роботі з матеріалами, що містять або потенційно містять інфекційні агенти, необхідно дотримуватися рівня безпеки 2 (21) або іншого відповідного рівня безпеки.
- Дотримуйтесь місцевих керівних принципів при утилізації всіх відходів.

Увага

Матеріали людського походження, використані при виробництві реагентів даного набору, були протестовані з негативними результатами на антитіла до ВІЛ 1 та 2, антитіла до ВГС і поверхневого антигену гепатиту В (HBsAg). Оскільки не існує методу, який повністю гарантує відсутність інфекційних захворювань, що передаються з кров'ю, то з усіма матеріалами людського походження необхідно поводитися як з потенційно інфекційно небезпечними.

ЗБІР І РОБОТА ЗІ ЗРАЗКАМИ

Набір розроблений для використання сироватки (включаючи сироватку, зібрану в сепараторні пробірки, SST). Можливість використання зразків плазми або інших біологічних рідин не була підтверджена для даного методу HE4 EIA. Зберіть кров з вени і дотримуйтесь інструкції виробника пробірок. При проведенні серії визначень необхідно виконувати тестування одного типу зразків. Сироватку можна зберігати при 2-8 °C протягом 3 днів до тестування. Для більш тривалого зберігання зразки необхідно заморозити при температурі -40 °C або нижче.

Перед тестуванням всі зразки повинні досягти кімнатної температури. РЕТЕЛЬНО перемішайте зразки, акуратно перевертаючи пробірки кілька разів перед аналізом. Зразки, що містять частки, повинні бути центрифуговані перед тестуванням на швидкості 10.000 x g на протязі 10 хвилин, для видалення часток, які можуть з'явитися при розморожуванні зразків.

ПРОЦЕДУРА

Необхідні матеріали, що не поставляються з набором

1. Мікропланшетний шейкер

Струшування має бути середнім або енергійним 700-900 коливань/хв.

2. Пристрій для промивання мікропланшета

Автоматичний промивальний пристрій з можливістю виконувати 1, 3 і 6 циклів промивання з мінімальним обсягом наповнення 350 мкл/лунку/цикл промивки.

Якщо не використовується автоматичний мікропланшетний вошер, можна застосувати Nunc Immuno-8 вошер для ручного промивання.

3. Мікропланшетний Рідер

З довжиною хвилі 620 нм і/або 405 нм і діапазоном абсорбції від 0 до 3.0.

4. Точні піпетки

З одноразовими пластиковими наконечниками для внесення мікрооб'ємів рідин. 8-канальна піпетка для внесення 100 мкл бажана, але не обов'язкова. Піпетки для дозування обсягів в мілілітрах.

5. Дистильована або деіонізована вода

Для розчинення стандартів HE4 і контролів HE4, для приготування розведеного буфера для промивок.

Примітки до методики

1. Повне розуміння даної інструкції необхідно для забезпечення належного використання набору HE4 EIA. Реагенти, що входять в комплект, призначені для використання як єдиний блок. Не змішуйте ідентичні реагенти з наборів, що мають різні номери партій. Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності, вказаного на зовнішній стороні набору.
2. Реагенти необхідно привести до кімнатної температури (20-25 °C) перед використанням. **Аналіз варто проводити тільки при температурах між 20-25 °C для отримання точних результатів.** Заморожені зразки повинні бути обережно, але ретельно перемішані перевертанням флаконів після відтавання.
3. Перш ніж приступити до піпетування калібраторів і невідомих зразків, доцільно позначити смужки, щоб мати можливість чітко визначити зразки під час і після аналізу.
4. Вимога ефективної і ретельної промивки для розділення зв'язаного і незв'язаного антигену і реагентів від зв'язаних твердо фазових комплексів антитіло-антиген є одним з найбільш важливих кроків в ІФА. **З метою забезпечення ефективного промивання переконайтеся, що всі лунки**

повністю заповнені до верхнього краю розчином для промивання протягом кожного циклу промивання, що промивний розчин розливають з необхідною швидкістю, що аспірація лунок між і після циклів промивання є повною і, що лунки порожні. Якщо є залишки рідин, інвертувати пластину і постукати нею по фільтрувальному паперу.

- Автоматичний вошер: Дотримуйтесь інструкцій виробника щодо належного очищення та обслуговування і проводьте необхідну кількість циклів промивання до і після кожної стадії інкубації. Пристрій для аспірації/промивання не слід залишати з Промивним Розчином протягом тривалого часу, так як голки можуть забитися через погане наповнення рідиною і аспірацію.

5. Субстрат TMB-HRP є дуже чутливим до забруднення. Для оптимальної стабільності TMB HRP-субстрату, залити необхідну кількість з флакона в ретельно промитий резервуар або одноразовий пластиковий лоток, щоб уникнути забруднення реагенту. Обов'язково використовуйте чисті одноразові пластикові піпетки (або наконечники).
6. Обов'язково використовуйте чисті одноразові пластикові наконечники піпеток і правильну точну техніку піпетування при роботі із зразками і реагентами. Не допускайте торкання піпеткою поверхні рідини, щоб уникнути перенесення забруднення. Належна техніка піпетування має особливе значення при поводженні зі зразками та розчином TMB-субстрату HRP.

Приготування реагентів	Стабільність приготовленого реагенту
------------------------	--------------------------------------

HE4 Калібратори В-F	4 тижні при 2-8 °C 3 місяці при -20 °C і нижче
---------------------	---

Додати рівно 1.0 мл дистильованої або деіонізованої води в кожну пробірку і обережно перемішати. Дати постояти не менше 15 хвилин для відновлення. **ПРИМІТКА:** Концентрації Контролів вказані на етикетках і повинні бути використані для розрахунку результатів.

Контролі HE4 1 і 2	4 тижні при 2-8 °C 4 місяці при -20 °C і нижче
--------------------	---

Додати рівно 1.0 мл дистильованої або деіонізованої води в кожну пробірку і обережно перемішати. Дати постояти не менше 15 хвилин для відновлення. **ПРИМІТКА:** Концентрації калібраторів вказані на етикетках і повинні бути використані для розрахунку результатів.

Промивний розчин	2 тижні при 2-25 °C в герметичному контейнері
------------------	--

Налійте 50 мл промивного концентрату в чисту посудину і розбавте в 25 разів додаванням 1200 мл дистильованої або деіонізованої води для отримання буферного розчину для промивання.

Робочий Розчин Трейсера	4 тижні при 2-8 °C в герметичному контейнері
-------------------------	---

Приготуйте потрібний об'єм Робочого Розчину Трейсера змішуванням 50 мкл Трейсера, HRP Анти-HE4 з 1 мл Розчинника Трейсера на смужку (див. таблицю нижче).

Кількість смужок	Трејсер, HRP Anti-HE4 (мкл)	Розчинник 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

Переконайтеся, що використовуються тільки чисті пластикові або скляні посудини для приготування Розчину Антитіл.

Альтернатива: Вилийте вміст Трейсера, HRP Anti-HE4 у флакон з Розчинником для Трейсера і акуратно перемішайте. Переконайтеся, що Трејсер, HRP Анти-HE4 повністю перелитий у флакон з Розчинником Трейсера.

ПРИМІТКА: Робочий Розчин Трейсера стабільний протягом 4-х

тижнів при 2-8 °С. Не готуйте більше Робочого Розчину Трейсера, ніж буде використано протягом цього періоду і переконайтеся, що він зберігається належним чином.

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Усі стандарти, контролю і зразки повинні аналізуватися в дублях. Калібрувальна крива повинна будуватися при кожній постановці аналізу. Перед використанням реагенти повинні бути приведені до кімнатної температури (20-25 °С).

1. Приготуйте Калібратори В-Ф, Контролі 1 і 2, Промивний Розчин і Робочий Розчин Трейсера. Дуже важливо використовувати чисті ємності. Чітко дотримуйтесь інструкції.
2. Закріпіть необхідну кількість мікросмужок в тримачі. (Помістіть невикористовувані смужки в пластиковий пакет з осушувачем і закрийте його). Промийте кожну смужку один раз розчином для промивання. Не промивайте більше смужок, чим збираєтеся використовувати протягом 30 хвилин.
3. Внесіть 25 мкл HE4 Калібраторів (CAL A, B, C, D, E і F), Контролів HE4 (C1, C2) і невідомих зразків (невідомі - Unk) в лунки у відповідності з наступною схемою:

	1	2	3	4	5 і т.д.
A	Кал. А	Кал. Е	Невід. 1		
B	Кал. А	Кал. Е	Невід. 1		
C	Кал. В	Кал. F	Невід. 2		
D	Кал. В	Кал. F	Невід. 2		
E	Кал. С	C1	І т.д.		
F	Кал. С	C1			
G	Кал. D	C2			
H	Кал. D	C2			

4. Додайте 100 мкл Біотину Анти-HE4 в кожну лунку, використовуючи точну піпетку на 100 мкл (або восьми канальну піпетку на 100 мкл). Уникайте дотику наконечників до поверхні рідини.
5. Інкубуйте пластину протягом 1 години (± 10 хв.) при кімнатній температурі (20-25 °С) з постійним потрушуванням.
6. Після першої інкубації видаліть рідину і промийте кожну смужку 3 рази, використовуючи процедуру промивання, описану в п.4.
7. Додайте 100 мкл Робочого розчину Трейсера в кожну лунку. Використовуйте ту ж техніку піпетування як і в пункті 4 вище.
8. Інкубуйте пластину протягом 1 години (± 5 хв.) при кімнатній температурі (20-25 °С) з постійним потрушуванням.
9. Після другої інкубації аспірувати і промити кожну смужку 6 разів, використовуючи процедуру промивання, описану в пункті 4.
10. Додайте 100 мкл субстрату ТМБ в кожну лунку, в тій же послідовності, як в п. 4. Розчин субстрату слід додавати по можливості швидко, щоб час між додаванням в першу і останню лунку не перевищував 5 хвилин.
11. Інкубуйте 30 хвилин (± 5 хвилин) при кімнатній температурі з постійним перемішуванням планшета на шейкері. Уникайте потрапляння прямого сонячного світла.
12. Негайно зчитайте оптичну щільність на рідері при 620 нм.

Альтернативний варіант

Якщо в лабораторії немає рідера з фільтром на 620 нм, оптична щільність може бути визначена як описано нижче:

Альт. 12. Додайте 100 мкл стоп-реагенту в кожну лунку і перемішайте. Після цього протягом 15 хвилин зчитайте оптичну щільність при 405 нм.

Діапазон вимірювання

HE4 EIA вимірює концентрації між 15 і 900 пМ. Якщо концентрація HE4 вище діапазону вимірювання, як очікується, рекомендується розбавляти зразки з Калібратором А перед аналізом (див. "Розрахунок результатів з розведеними зразками").

Контроль якості

Для контролю якості вимірювань повинні бути використані контролю HE4 1 і 2, що поставляються в наборі. Допустимий діапазон зазначений на флаконі кожного контролю.

Результати вимірювання HE4 даним методом вважаються достовірними, якщо:

- Середні значення дублів, отримані для контролів, потрапляють в діапазон допустимих значень.
- Коефіцієнт варіації (CV) дублів стандартів В-Ф і контролів не перевищує 15%.
- Різниця значень оптичної щільності дублів стандарту А (нуль) становить не більше 0.06 оптичних одиниць.

Якщо в ході дослідження отримані недостовірні результати для стандартів або контролів, необхідно повністю перевірити всі реагенти та обладнання, точність піпеток, правильність роботи рідера і вошера і повторити аналіз. Кожній лабораторії

рекомендується приготувати свої власні пули сироваток з різними рівнями, які можна використовувати для внутрішнього контролю якості досліджень.

Референсний матеріал

Оскільки немає єдиного довідкового матеріалу, доступного для HE4 антигену, значення CapAg HE4 калібратора визначаються з набором внутрішніх еталонів.

РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Якщо використовується мікропланшетний спектрофотометр з вбудованою програмою для розрахунку даних, створіть програму, яка використовує концентрацію, зазначену на етикетці кожного з HE4 калібраторів.

Для автоматичного розрахунку результатів HE4 рекомендується використовувати один з наступних методів:

- Метод кубічної кривої сплайна є підходящим методом. Калібратор А повинен бути включений в кривій зі значенням 0 пМ.
- Інтерполяція з оцінкою від точки до точки. Калібратор А повинен бути включений в кривій зі значенням 0 пМ.
- Метод квадратного рівняння кривої є підходящим методом. Калібратор А повинен бути включений в кривій зі значенням 0 пМ.

ПРИМІТКА: 4-параметрична або лінійна регресія не повинні використовуватися. Для ручної оцінки калібрувальна крива будується відкладенням значень абсорбції (A), отриманих для кожного HE4 калібратора проти відповідної концентрації HE4 (в пМ). Невідомі концентрації HE4 потім можуть бути визначені з калібрувальної кривої з використанням середнього значення абсорбції кожного зразка пацієнта.

Розрахунок результатів з розведеними зразками

Якщо зразки в первинному аналізі дають рівні HE4 вище, ніж 900 пМ, зразки необхідно розвести 1/10 і 1/100 з Калібратором А і повторити аналіз, щоб отримати точну концентрацію HE4. **ПРИМІТКА:** Зразок, використовуваний для розведення, також повинен бути проаналізований з метою визначення ендогенної концентрації HE4.

- Розведення 1/10: 50 мкл зразка + 450 мкл Калібратора А
- Розведення 1/100: 50 мкл розведення 1/10 + 450 мкл Калібратора А

Концентрація HE4 у вихідних зразках розраховується наступним чином:

- Розбавлення в 10 разів: 10 x Отримане значення
- Розбавлення в 100 разів: 100 x Отримане значення

Розрахунок ризику злоякісної пухлини яєчника (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm, ROMA) для оцінки ризику епітеліального раку яєчника у жінок в пре- та постменопаузі, при виявленні утворень у малому тазі

Розрахунок Прогностичного Індексу (PI)

Прогностичний Індекс (PI) розраховується для жінок в пременопаузі та постменопаузі роздільно, з використанням рівнянь (1) і (2), наведених нижче. Для розрахунку PI значення, отримані при тестуванні методом HE4 EIA і або методом ARCHITECT CA125 II, або методом CapAg CA125 EIA, підставляються в відповідне рівняння алгоритму, наведене нижче, залежно від менопаузального статусу жінки.

(1) Жінки в пременопаузі

Прогностичний Індекс (PI) = $-12.0 + 2.38 * \text{LN}[\text{HE4}] + 0.0626 * \text{LN}[\text{CA125}]$

(2) Жінки в постменопаузі

Прогностичний Індекс (PI) = $-8.09 + 1.04 * \text{LN}[\text{HE4}] + 0.732 * \text{LN}[\text{CA125}]$

Розрахунок показника ROMA

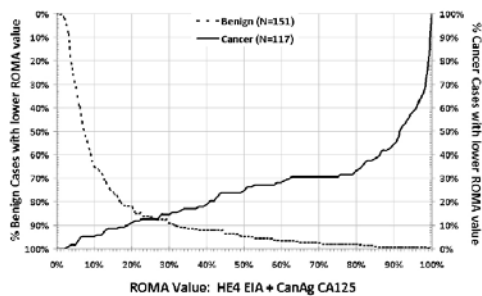
Для розрахунку значення показника (тобто, Передбачена Ймовірність), внесіть розраховане значення Прогностичного Індексу (PI) в наступне рівняння (3):

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

Приклад розрахунку значень PI і ROMA:

Менопаузальний статус	HE4 (пМ)	CA125 (Од/мл)	Розрахунок PI	PI	ROMA (%)
Пременопауза	37.5	74.9	$-12.0 + (2.38 * 3.624) + (0.0626 * 4.316)$	-3.10388	4.29
Пременопауза	386.6	21.8	$-12.0 + (2.38 * 5.957) + (0.0626 * 3.082)$	2.371517	91.5
Постменопауза	66.7	11.3	$-8.09 + (1.04 * 4.200) + (0.732 * 2.425)$	-1.94683	12.5
Постменопауза	383.1	22.7	$-8.09 + (1.04 * 5.948)$	0.381799	59.4

Мал. 4 Крива розподілу частот значень ROMA для жінок в постменопаузі. Комбінація методів HE4 EIA + CanAg CA125 EIA



Стратифікація ризику - групи високого та низького ризику

Алгоритм ризику злоякісної пухлини яєчника використаний для розподілу пацієнок за групами ризику виявлення епітеліального раку яєчника. При специфічності 75% для комбінації методів HE4 EIA + ARCHITECT CA125 II були використані наступні рівні:

Жінки в пременопаузі:

Значення ROMA \geq 13.1% = високий ризик виявлення епітеліального раку яєчника

Значення ROMA < 13.1% = низький ризик виявлення епітеліального раку яєчника

Жінки в постменопаузі

Значення ROMA \geq 27.7% = високий ризик виявлення епітеліального раку яєчника

Значення ROMA < 27.7% = низький ризик виявлення епітеліального раку яєчника

Стратифікація ризику всіх пацієнок, що мають аднексальні новоутворення, при використанні ROMA (специфічність 75%), наведена в таблиці 1, включаючи стратифікацію ризику окремо для пацієнок в пременопаузі та постменопаузі відповідно. Чутливість поділу пацієнок з епітеліальним раком яєчників I-IV стадій на групи високого та низького ризику виявлення епітеліального раку яєчників склала 94% при специфічності 75%, тобто 75% жінок з доброякісними утвореннями були віднесені до групи низького ризику. Прогностична цінність позитивного і негативного результатів склала 58% і 97%, відповідно.

Таблиця 1: Стратифікація ризику пацієнок, з виявленими утвореннями в малому тазу, при використанні комбінації методів HE4 EIA + ARCHITECT CA125 II для розрахунку значення ROMA.

Рівень cut-off при 75% специфічності для жінок в пременопаузі \geq 13.1%,
рівень cut-off при 75% специфічності для жінок в постменопаузі \geq 27.7%.

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

Не існує статистично достовірної різниці в чутливості і специфічності значень ROMA, розрахованих для комбінацій методів HE4 EIA + ARCHITECT CA125 II або CanAg CA125 EIA для диференціації між доброякісними захворюваннями та епітеліальним раком яєчників. При використанні комбінації методів HE4 EIA + ARCHITECT CA125 II чутливість стратифікації пацієнтів високої групи ризику з епітеліальним раком яєчників I-IV стадій склала 93%. Прогностична цінність позитивного і негативного результатів склала 57% і 97%, відповідно. **Необхідно відзначити, що рівні cut-off для поділу на групи високого та низького рівня при необхідній специфічності повинні відповідати методу, використовуваному для вимірювання концентрації CA125.**

Для комбінації методів HE4 EIA + CanAg CA125 були обрані такі рівні cut-off, що забезпечують специфічність 75%:

Жінки в пременопаузі

Значення ROMA \geq 12.5% = високий ризик виявлення епітеліального раку яєчника

Значення ROMA < 12.5% = низький ризик виявлення епітеліального раку яєчника

Жінки в постменопаузі

Значення ROMA \geq 14.4% = високий ризик виявлення епітеліального раку яєчника

Значення ROMA < 14.4% = низький ризик виявлення епітеліального раку яєчника

Помилково негативні результати і частка випадків епітеліального раку яєчників, розподілені в групу низького ризику серед пацієнтів, що мають аднексальні новоутворення, з використанням ROMA при рівні специфічності 75% представлені в таблиці 2. Стратифікація на групи високого та низького ризику при використанні алгоритму ROMA при рівні специфічності 75 % дала 6,2% помилково негативних результатів. Три відсотки всіх випадків, які потрапили до групи низького ризику, були представлені раком яєчників.

Таблиця 2: Хибно негативний рівень і частка випадків з раком яєчників серед усіх випадків, які потрапили до групи низького ризику серед пацієнтів, що мають аднексальні новоутворення, з використанням ROMA.

Рівень cut-off при 75% специфічності для жінок в пременопаузі < 13.1%, рівень cut-off при 75% специфічності для жінок в постменопаузі < 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%
Post-menopausal	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)

ТЕХНІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Відтворюваність

Загальна відтворюваність методу визначення HE4: CV < 15%. Дослідження були виконані згідно керівництва NCCLS EP5-A (22). Була протестована панель з 4 зразків сироваток, з використанням наборів двох лотів, в дублях, по два рази на день, протягом 20 днів. Дані цього дослідження наведені в таблиці нижче.*

Зразок	Лот набору	N	Середня конц. мкг/л	В аналізі SD, мкг/л	В аналізі CV, %	Між днями SD, мкг/л	Між днями 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

* Представницькі дані; результати в різних лабораторіях можуть відрізнятися від цих даних.

Межа визначення

Межа визначення методу HE4 EIA становить \leq 15 pM. Межа визначення (LoD) відповідає верхній межі 95% довірчого інтервалу і являє собою найменшу концентрацію антигену HE4, яка відмінна від нуля. Для визначення методу оцінки LoD було використано керівництво NCCLS, EP17-A (23). У проведеному дослідженні HE4 стандарт А (нуль) і 4 зразка сироватки здорових жінок були розведені до 5 pM буфером для розведення зразків і протестовані в 4 постановках по 24 повтору в кожній, в різні дні. LoD був розрахований таким чином:
LoD (pM) = 5.0 pM x (1.65 x SD0 + 1.65 x SD5) / (OD5 - OD0)
Розрахований межа визначення набору HE4 EIA склав < 2.5 pM.

функціональна чутливість

Функціональна чутливість методу HE4 EIA становить \leq 25 pM. Функціональна чутливість виражена як концентрація аналіту при якій CV становить 20%. Для визначення методу оцінки функціональної

чутливості було використано керівництво NCCLS, EP5-A2 (22). У проведеному дослідженні зразки були протестовані в 2 постановках по 4 повтору в кожній, в 20 різних днів, наборами двох лотів. Розрахована функціональна чутливість набору HE4 EIA склала < 5 рМ.

Відновлення

Середнє відновлення набору HE4 EIA становить $100 \pm 15\%$. У проведених дослідженнях зразки сироваток пацієнтів з відомими концентраціями HE4 були додані до нормальних зразків людської сироватки. Концентрації HE4 визначали з використанням даного методу HE4 EIA, а потім розраховували відсоток відновлення. Представницькі дані цього дослідження наведені в таблиці нижче*.

Зразок	Ендогенне значення, отримане даним методом, рМ	Доданий HE4 антиген, рМ	Значення HE4, отримане даним методом, рМ	Відновлення **, %
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

Середнє відновлення по чотирьох різного збагачення концентраціях, наведених вище, склало 97%.

*Представницькі дані; результати в різних лабораторіях можуть відрізнятись від цих даних.

**% Відновлення = Отримана концентрація HE4 (рМ)/Ендогенна концентрація HE4 (рМ) + доданий HE4 (рМ)

Хук-ефект

Ефект високих концентрацій (Хук-ефект) - це феномен, коли при дуже високих концентраціях аналіту зразок може читатися в межах діапазону вимірюваних значень методу. Для методу HE4 EIA, Хук-ефект не був виявлений до концентрації 300 000 рМ активного антигену HE4.

Лінійність розведення

У середньому лінійність розведення методу HE4 EIA склала $100 \pm 15\%$. Дослідження було проведене згідно керівництву NCCLS (CLSI), EP6-A (24). Зразки сироваток з підвищеними рівнями HE4 були розведені HE4 стандартом А (нуль). Концентрація HE4 була визначена для кожного розведення і був розрахований відсоток (%) відновлення. Представницькі дані цього дослідження наведені в таблиці нижче*.

Зразок	Кінцеве розведення	Отримане значення (рМ)	Очікуване значення (рМ)	Відновлення ** (%)
1	Без розведення	889.6	889.6	100
	1:1.25	720.0	711.7	101
	1:1.7	543.1	533.8	101
	1:2	450.6	444.8	101
	1:2.5	345.9	355.8	97.2
	1:5	183.6	177.9	103
	1:10	97.6	89.0	109
	1:20	49.1	44.5	110
	1:40	25.9	22.2	116
	2	Без розведення	697.0	697.0
1:1.25		544.9	557.6	97.7
1:1.7		429.8	418.2	103
1:2		361.1	348.5	104
1:2.5		275.9	278.8	99.0
1:5		134.5	139.4	96.5
1:10		74.4	69.7	107
1:20		39.1	34.9	112
1:40		21.0	17.4	120
3		Без розведення	680.2	680.2
	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

У середньому для представлених розведень трьох зразків відновлення = 101%

*Представницькі дані; результати в різних лабораторіях можуть відрізнятись від цих даних.

**% Відновлення = Отримана концентрація HE4 x коефіцієнт розведення/концентрація HE4 нерозведеного зразка.

Аналітична специфічність

У середньому аналітична специфічність методу HE4 EIA склала $100 \pm 15\%$. Були проведені порівняльні дослідження зразків, що містять сполуки, перераховані нижче, у зазначених концентраціях, і контрольних зразків сироваток. Для визначення методу оцінки інтерференції було використано керівництво NCCLS, EP7-A (25). Всі речовини в протестованих концентраціях не чинили впливу на результат аналізу.

Ендогенні речовини сироватки, які потенційно впливають на аналіз	Протестовані концентрації
Тригліцериди	30 мг/мл
Білірубін	0.2 мг/мл
Гемоглобін	10 мг/мл
Загальний білок	120 мг/мл

Хіміотерапевтичні потенційно впливаючі лікарські препарати	Протестовані концентрації
Карбоплатин	500 мкг/мл
Цисплатин	165 мкг/мл
Клотримазол	0.3 мкг/мл
Циклофосфамід	500 мкг/мл
Дексаметазон	10 мкг/мл
Доксорубіцин	1.16 мкг/мл
Лейковорин	2.68 мкг/мл
Мелфалан	2.8 мкг/мл
Метотрексат	45 мкг/мл
Паклітаксел	3.5 нг/мл

Потенційно впливаючі клінічні стани

Для додаткової оцінки специфічності методом HE4 EIA були протестовані зразки, що містять НАМА і ревматоїдний фактор (RF). У 5 зразках, що містять НАМА і в 5 зразках, що містять RF, був проаналізований % відновлення антигену HE4, доданого в кожен зразок в концентраціях приблизно 50 і 450 рМ. Загальні результати аналізу вилучення підсумовані в таблиці, наведеної нижче*.

Клінічні стани	Кількість зразків	Середнє відновлення, %
НАМА	5	101
RF	5	95

*Представницькі дані; результати в різних лабораторіях можуть відрізнятись від цих даних.

ГАРАНТІЯ

Будь-які зміни або модифікації процедури, не рекомендовані Fujirebio Діагностика, можуть вплинути на результати, і в цьому випадку Fujirebio Діагностика відмовляється від усіх гарантій, явних, припущених або передбачених законодавством, включаючи гарантії товарного стану та придатності для використання.



ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул. Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com