

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|---|
| 1. НАЗНАЧЕНИЕ | 2 |
| 2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА | 3 |
| 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ | 3 |
| 4. СОСТАВ НАБОРА | 4 |
| 5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ | 5 |
| 6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ | 5 |
| 7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА | 5 |
| 8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА | 6 |
| 9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА | 7 |
| 10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ | 8 |

CONTENTS

| | |
|------------------------------------|----|
| 1. INTENDED USE | 9 |
| 2. SUMMARY AND EXPLANATION | 9 |
| 3. PRINCIPLE OF THE TEST | 10 |
| 4. WARNINGS AND PRECAUTIONS | 10 |
| 4. СОСТАВ НАБОРА | 11 |
| 6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE | 12 |
| 7. TEST PROCEDURE | 12 |
| 8. QUALITY CONTROL | 13 |
| 9. CALCULATION OF RESULTS | 14 |
| 10. EXPECTED VALUES | 15 |
| 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS | 15 |
| | 8 |

Инструкция составлена Руководителем службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикиным

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИГЕНА HE4 В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «HE4-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «HE4-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации антигена HE4 в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Онкомаркер HE4 представляет собой белок, ассоциированный с аденокарциномой яичников и некоторыми другими опухолями. Количественное определение антигена HE4 в сыворотке (плазме) крови используется для мониторинга больных с аденокарциномами яичников.

1.3. Антиген HE4 (согласно биохимической номенклатуре – белок WFDC2) – представитель белкового семейства WAP, в которое входят ингибиторы протеолитических ферментов, находящиеся в эпителиальных тканях. Точная молекулярная масса естественного белка WFDC2 варьирует в диапазоне 25–35 кДа. Продукция антигена HE4 повышается при аденокарциномах яичников различной гистологии. Кроме того, антиген HE4 обнаруживается в высокой концентрации в нормальных секретах (семенной и альвеолярной жидкости, отделяемом из половых органов, слюне)

1.4. Повышение концентрации антигена HE4 в сыворотке (плазме) крови наблюдается у большинства больных с аденокарциномами яичников – в том числе, на первой стадии и у пациенток с нормальным уровнем антигена CA125. Определение уровня антигена HE4 полезно для контроля эффективности лечения и слежения за течением аденокарцином яичников; вместе с тем, результаты измерения антигена HE4 всегда следует интерпретировать в комплексе с результатами других методов исследования и клиническими данными. Значимость определения антигена HE4 при опухолях другой локализации изучена недостаточно, есть указания на потенциальную пользу при мониторинге аденокарциномы легкого и поджелудочной железы.

1.5. Сочетанное определение уровня антигена HE4 и антигена CA125 позволяет улучшить чувствительность выявления злокачественных опухолей яичника. Для оценки суммарного риска рекомендуем использовать программное обеспечение, доступное по запросу в фирме «ХЕМА».

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение антигена HE4 основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуоферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышинные моноклональные к природному (естественному) антигену HE4 (получены ООО «ХЕМА»). В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, происходит связывание HE4, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата другого эпитопа мышинных моноклональных антител к нативному (природному) HE4 с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации антигена HE4 в исследуемом образце. Концентрацию антигена HE4 в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания антигена HE4 в калибровочных пробах.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность.

Перекрестная реакция мышинных моноклональных антител к нативному (природному) HE4 с другими аналитами приведена в таблице:

| Аналит | Перекрестная реакция, % |
|------------------------------|-------------------------|
| Антиген CA125 | менее 0,1 |
| Антигген CA19-9 | менее 0,1 |
| Антиген CA15-3 | менее 0,1 |
| Антиген CA72-4 | менее 0,1 |
| Карциноэмбриональный антиген | менее 0,1 |
| ПСА | менее 0,1 |

3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания HE4 в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «HE4-ИФА» не превышает 8,0 %.

3.3. Линейность.

Зависимость концентрации HE4 в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей HE4, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 25–1000 пмоль/л и составляет $\pm 10,0$ %.

3.4. Точность.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации HE4 предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 100 пмоль/л. Процент «открытия» составляет 90–110 %.

3.5. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая Набором «HE4-ИФА» концентрация HE4 в сыворотке (плазме) крови не превышает 10 пмоль/л.

4. СОСТАВ НАБОРА

| Код компонента | Символ | Наименование | Кол-во | Ед. | Описание |
|----------------|--------|--|--------|-----|--|
| 1 | P239Z | Планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию | 1 | шт. | - |
| 2 | C239Z | Калибровочные пробы на основе трис-буфера (рН 7.2-7.4), содержащие известные количества антигена HE4 - 0; 25; 100; 250; 500; 1000 пмоль/л , готовы к использованию (по 0.6 мл каждая) | 6 | шт. | прозрачные жидкости ярко-синего цвета (калибровочная проба 0 – прозрачная бесцветная жидкость) |
| 3 | Q239Z | Контрольные сыворотки на основе сыворотки крови человека с известным содержанием антигена HE4, готовы к использованию (0.6 мл) | 1 | шт. | прозрачная бесцветная жидкость и прозрачная бесцветная жидкость |
| 4 | T239Z | Конъюгат, готов к использованию (11 мл) | 1 | шт. | прозрачная жидкость красного цвета |
| 5 | R055Z | Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), готов к использованию (11 мл) | 1 | шт. | прозрачная бесцветная жидкость |
| 6 | S008Z | Концентрат отмывочного раствора, 21х-кратный (22 мл) | 1 | шт. | прозрачная бесцветная жидкость |
| 7 | R050Z | Стоп-реагент, готов к использованию (11 мл) | 1 | шт. | прозрачная бесцветная жидкость |
| 8 | N003 | Бумага для заклеивания планшета | 2 | шт. | - |
| 9 | K239I | Инструкция по применению Набора реагентов «HE4-ИФА» | 1 | шт. | - |
| 10 | K239Q | Паспорт контроля качества Набора реагентов «HE4-ИФА» | 1 | шт. | - |

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

5.2. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5,0 % раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

5.3. При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.4. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 20–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре ($+18\dots+25\text{ }^{\circ}\text{C}$) не менее 30 мин.

7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре $+2\dots+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 20 мл дистиллированной воды).

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «HE4-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 5 суток. Не допускается замораживание целого набора. .

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 исследуемых образцов, 6 калибровочных проб и 2 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений).

8.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- конъюгат, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольные сыворотки после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С не более 2 месяцев
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора.
- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 5 суток или при температуре +2...+8 °С не более 30 суток;

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

8.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизованную, мутную сыворотку (плазму) крови.

Замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается!

8.5. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

8.6. При использовании Набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации антигена HE4 в контрольной сыворотке.

8.7. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

| | |
|----|---|
| 1 | Поместите в рамку необходимое количество стрипов - исследуемые образцы в 2 повторах и 16 лунок для калибровочных проб и контрольной сыворотки. |
| 2 | Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 20 мкл калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внесите в дубликатах по 20 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови. Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 5–10 минут. |
| 3 | Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата. |
| 4 | Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 60 минут при температуре +37 °С . |
| 5 | По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз . При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п. 7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге. |
| 6 | Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина. Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2–3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25 °С) в течение 10–20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания. |
| 7 | Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента , при этом содержимое лунок окрашивается в яркий желтый цвет. |
| 8 | Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометраставляйте по калибровочной пробе С1. |
| 9 | Постройте в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс (x) – концентрация HE4 в калибровочных пробах (пмоль/л), ось ординат (y) – оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод. |
| 10 | Определите по калибровочному графику содержание HE4 в исследуемых образцах. |

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

10.1. Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами *GLP* (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

Примечание.

Значения концентраций HE4 в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (10 пмоль/л), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (1000 пмоль/л) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация HE4 ниже 10 пмоль/л или выше 1000 пмоль/л.

| Исследуемая группа | Единицы, пмоль/л | |
|--------------------|------------------|----------------|
| | Нижний предел | Верхний предел |
| Здоровые доноры | - | 150.0 |

По вопросам, касающимся качества Набора «HE4-ИФА», следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу:
105043, Москва, а/я 58, тел./факс: (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)

электронная почта: info@xema.ru; rqc@xema.ru

интернет: www.xema.ru; www.xema-medica.com

Руководитель службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикин

A solid-phase enzyme immunoassay for the quantitative determination of antigen HE4 in human blood serum or plasma

1. INTENDED USE

A solid-phase enzyme immunoassay for the quantitative determination of antigen HE4 in blood serum or plasma.

This kit is designed for measurement of antigen HE4 in blood serum or plasma. For possibility of use with other sample types, please, refer to Application Notes (on request). The kit contains reagents sufficient for 96 determinations and allows to analyze 40 unknown samples in duplicates.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

HE4 antigen is tumor marker associated with ovarian adenocarcinoma and, probably, with other adenocarcinomas. Serial measurement of HE4 antigen in serum (plasma) is used for monitoring of ovarian carcinoma.

Antigen HE4 (or WFDC2 protein) represents a wide family of WAP proteins, mostly containing serine protease inhibitors from epithelial tissues. However, WFDC2 itself does not show protease inhibitory activity and its biological role is now unclear. The exact MW of natural HE4 is not yet known, and may vary between 25 and 35 kDa. WFDC2 is a normal component of human secretions – seminal and alveolar fluids, vaginal mucus, saliva, but in blood this protein is mostly derived from tumor tissue, especially from ovarian adenocarcinoma. This elevation is observed in early stages of tumor progression (including 1st stage) and in the patients with normal levels of another marker of ovarian cancer – CA125. Concentration of WFDC2 (antigen HE4) may be also elevated in other localization of adenocarcinomas, eg lung and pancreatic.

Combined determination of serum HE4 and CA125, in conjunction with non-laboratory methods, enables to increase the sensitivity of early diagnosis of ovarian cancer. Combined risk of ovarian cancer may be calculated after determination of both parameters using special software available by request at XEMA company. Combined detection of HE4 and CA125 is also valuable for monitoring of treatment in ovarian carcinoma.

XEMA HE4 ELISA kit is a single step two-site immunoassay. To construct this assay, we use two high affinity antibodies and directed towards different epitope groups I and II of natural WFDC2 protein.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This test is based on two-site sandwich enzyme immunoassay principle. Tested specimen is placed into the microwells coated by specific murine monoclonal antibody to natural HE4-antibodies. Antigen from the specimen is captured by the antibodies coated onto the microwell surface. Second antibodies – murine monoclonal antibody to another epitope of natural HE4, labelled with peroxidase enzyme, are then added into the microwells. After washing procedure, the remaining enzymatic activity bound to the microwell surface is detected and quantified by addition of chromogen-substrate mixture, stop solution and photometry at 450 nm. Optical density in the microwell is directly related to the quantity of the measured analyte in the specimen.

4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

4.1. For professional use only.

4.2. This kit is intended for in vitro diagnostic use only.

4.3. INFECTION HAZARD: There is no available test methods that can absolutely assure that Hepatitis B and C viruses, HIV-1/2, or other infectious agents are not present in the reagents of this kit. All human products, including patient samples, should be considered potentially infectious. Handling and disposal should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guidelines or regulations.

4.4. Avoid contact with stop solution containing 5,0 % H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.

4.5. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents may give false results.

4.6. Do not use the kit beyond the expiration date.

4.7. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microplate readers.

4.8. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.

4.9. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guidelines or regulations.

4.10. Do not mix reagents from different lots.

4.11. Replace caps on reagents immediately. Do not swap caps.

4.12. Do not pipette reagents by mouth.

4.13. Specimens must not contain any AZIDE compounds – they inhibit activity of peroxidase.

4.14. Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from XEMA Co., Ltd.

4.15. The Safety Data Sheet fit the requirements of EU Guideline 91/155 EC.

4. СОСТАВ НАБОРА

| Symbol | Description | Qty | Units | Colour code | Stability of opened/ diluted components |
|--------|--|-----|-------|-------------------------------------|---|
| 1 | HE4 EIA strips, 8x12 wells | 1 | pcs | | until exp.date |
| 2 | HE4 EIA strips, 8x12 wells Calibrator set, 0.6 ml each. The set contains 6 calibrators: 0, 25; 100; 250; 500; 1000 pM | 6 | pcs | bright blue (C1 - colourless) | 2 months |
| 3 | Control sera (0.6 ml) | 2 | pcs | colourless and colourless | 2 months |
| 4 | Conjugate, 11 ml | 1 | pcs | red | until exp.date |
| 5 | Substrate solution, 11 ml | 1 | pcs | colourless | until exp.date |
| 6 | Washing solution concentrate 21x, 22 ml | 1 | pcs | colourless | Concentrate - until exp.date Diluted washing solution - 1 month at 2-8 °C or, 5 days at RT |
| 7 | Stop solution, 11 ml | 1 | pcs | colourless | until exp.date |
| 8 | Plate sealing tape | 2 | pcs | | N/A |
| 9 | Instruction HE4 EIA | 1 | pcs | | N/A |
| 10 | QC data sheet HE4 EIA | 1 | pcs | | N/A |

5.2. Equipment and material required but not provided

- Distilled or deionized water;
- Automatic or semiautomatic multichannel micropipettes, 100–250 µl, is useful but not essential;
- Calibrated micropipettes with variable volume, range volume 20–250 µl;
- Dry thermostat for 37 °C ±0.1 °C
- Calibrated microplate photometer with 450 nm wavelength and OD measuring range 0–3.0.

5.3. Storage and stability of the Kit

Store the whole kit at 2 to 8 °C upon receipt until the expiration date.

After opening the pouch keep unused microtiter wells TIGHTLY SEALED BY ADHESIVE TAPE (INCLUDED) to minimize exposure to moisture.

6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE.

This kit is intended for use with serum or plasma (ACD- or heparinized). Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided.

Specimens may be stored for up to 48 hours at 2-8 °C before testing. Freezing/thawing should be avoided.

7. TEST PROCEDURE**7.1. Reagent Preparation**

- All reagents (including unsealed microstrips) should be allowed to reach room temperature (+18 to +25 °C) before use.
- All reagents should be mixed by gentle inversion or vortexing prior to use. Avoid foam formation.
- It is recommended to spin down shortly the tubes with calibrators on low speed centrifuge.
- Prepare washing solution from the concentrate BUF WASH 21X by 21 dilutions in distilled water.

7.2. Procedural Note:

It is recommended that pipetting of all calibrators and samples should be completed within 3 minutes.

7.3. Assay flowchart

See the example of calibration graphic in Quality Control data sheet.

7.4. Alternative units:

7.5. Assay procedure

| | |
|----|---|
| 1 | Put the desired number of microstrips into the frame; allocate 16 wells for the calibrators CAL 1–6 and control samples CONTROL, CONTROL 2 and two wells for each unknown sample. DO NOT REMOVE ADHESIVE SEALING TAPE FROM UNUSED STRIPS. |
| 2 | Pipet 20 µl of calibrators CAL 1–6 and unknown samples into the wells. |
| 3 | Dispense 100 µl of CONJ HRP into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape. |
| 4 | Incubate 60 minutes at 37 °C . |
| 5 | Prepare washing solution by 21x dilution of washing solution concentrate (BUF WASH 21X) by distilled water. Wash the strips 5 times. |
| 6 | Dispense 100 µl of SUBS TMB into the wells |
| 7 | Incubate 10–20 minutes at +18...+25 °C |
| 8 | Dispense 100 µl of STOP into the wells. |
| 9 | Measure OD (optical density) at 450 nm. |
| 10 | Set photometer blank on first calibrator |
| 11 | Apply point-by-point method for data reduction. |
| 12 | Apply point-by-point method for data reduction. |

8. QUALITY CONTROL

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results.

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of *GLP* (Good Laboratory Practice) or other applicable federal, state, and local standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications.

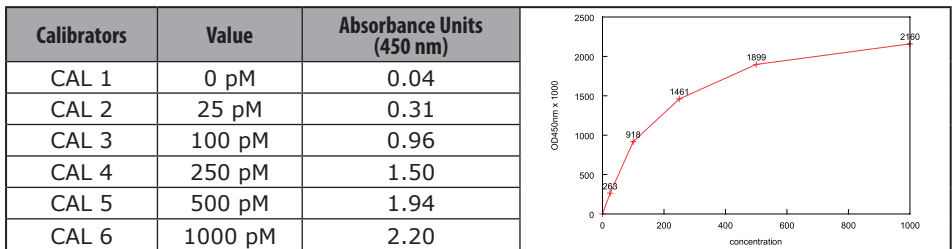
9. CALCULATION OF RESULTS

9.1. Calculate the mean absorbance values (OD450) for each pair of calibrators and samples.

9.2. Plot a calibration curve on graph paper: OD versus antigen HE4 concentration.

9.3. Determine the corresponding concentration of antigen HE4 in unknown samples from the calibration curve. Manual or computerized data reduction is applicable on this stage. Point-by-point or linear data reduction is recommended due to non-linear shape of curve.

9.4. Below is presented a typical example of a standard curve with the XEMA Co. Not for calculations!



10. EXPECTED VALUES

Therapeutical consequences should not be based on results of IVD methods alone – all available clinical and laboratory findings should be used by a physician to elaborate therapeutically measures. Each laboratory should establish its own normal range for HE4. Based on data obtained by XEMA, the following normal range is recommended (see below). NOTE: the patients that have received murine monoclonal antibodies for radioimaging or immunotherapy develop high titered anti-mouse antibodies (HAMA). The presence of these antibodies may cause false results in the present assay. Sera from HAMA positive patients should be treated with depleting adsorbents before assaying.

| Sex, age | Units, pM | |
|----------------|-------------|-------------|
| | Lower limit | Upper limit |
| Healthy donors | - | 150.0 |

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Analytical specificity / Cross reactivity

| Analyte | Cross-reactivity, % wt/wt |
|---------|---------------------------|
| CA125 | < 0,1 |
| CA19-9 | < 0,1 |
| CA15-3 | < 0,1 |
| CA72-4 | < 0,1 |
| CEA | < 0,1 |
| PSA | < 0,1 |

11.2. Analytical sensitivity

Sensitivity of the assay was assessed as being 10 pM.

11.4. Linearity

Linearity was checked by assaying dilution series of 5 samples with different antigen HE4 concentrations. Linearity percentages obtained ranged within 90 to 110 %.

11.5. Recovery

Recovery was estimated by assaying 5 mixed samples with known antigen HE4 concentrations. The recovery percentages ranged from 90 to 110 %.

