

MAGLUMI[®] HE4 (CLIA)

USO PREVISTO

El kit es un inmunoensayo de quimioluminiscencia *in vitro* para la determinación cuantitativa de HE4 en suero y plasma humanos con el analizador para inmunoensayo de quimioluminiscencia completamente automático serie MAGLUMI (entre los que se encuentran Maglumi 600, Maglumi 800, Maglumi 1000, Maglumi 2000, Maglumi 2000 Plus, Maglumi 4000, Maglumi 4000 Plus, MAGLUMI X8, MAGLUMI X3 y MAGLUMI X6) y el sistema integrado de la serie Biolumi (se incluyen Biolumi CX8).

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

La proteína epididimal humana 4 (HE4) pertenece a la familia de proteínas ácidas séricas nucleares de 4 enlaces disulfuro (WFDC, whey acidic four-disulfide core) con supuestas propiedades de inhibición de tripsina. En esta familia de otras proteínas se encuentran Elafin, inhibidor de proteasas secretado por leucocitos (SLPI, secretory leukocyte protease inhibitor) y PS20 (WFDC1)¹. El gen HE4 codifica un peso molecular similar al de una proteína de 13 KDa con una longitud de 124 aminoácidos, aunque en su forma glicosilada madura la proteína se aproximó a 20 a 25 KD, y consta de un único péptido que contiene dos dominios WFDC².

El gen HE4 se determinó en primer lugar en el epitelio del epidídimo distal, e inicialmente, se pensaba que era un inhibidor de la proteasa asociado con la maduración de los espermatozoides³. Se observó que el HE4 es de baja expresión en epitelios respiratorios y de los tejidos reproductivos, como el tejido ovárico, pero de alta expresión en tejido de carcinoma ovárico^{4,5,6}. Además de la expresión a nivel celular, se ha detectado HE4 secretado en niveles elevados en el suero de pacientes con cáncer de ovario. En un estudio de control del cáncer que comparaba pacientes con cáncer de ovario con condiciones saludables y benignas, Hellström et al. encontraron que el HE4 detectó una sensibilidad del 67 % para el cáncer de ovario con un nivel específico de un 96 %⁷. En la evaluación posterior de la gran cantidad de biomarcadores de cáncer de ovario que se conocen, el HE4 mostró la mayor sensibilidad de cualquier marcador único, especialmente en la fase inicial de la enfermedad⁸.

Como un nuevo marcador tumoral, la expresión de HE4 suele ser muy baja, pero se detectó una expresión alta en tejidos de carcinoma ovárico y en el suero de pacientes con carcinoma ovárico en suero^{9,10}.

El uso de los valores del ensayo de HE4 es una ayuda en el seguimiento de la enfermedad en evolución o el tratamiento en pacientes con tumores malignos. No se pueden utilizar como base para el diagnóstico precoz o un diagnóstico definitivo de cáncer, y no deben utilizarse para la población general de detección del cáncer.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El ensayo de HE4 es un inmunoensayo de quimioluminiscencia sándwich.

La muestra (o calibrador o control, si corresponde), las microperlas magnéticas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-HE4 y el búfer se mezclan completamente y se incuban. El antígeno de HE4 presente en la muestra se une a las microperlas magnéticas recubiertas con anti-HE4. Después de la precipitación en un campo magnético, el sobrenadante se decanta y, luego, se realiza un ciclo de lavado. Después de eso, se agrega aminobutíletilisoluminol (ABEI) marcado con otro anticuerpo monoclonal y se incuba, para formar un sándwich de inmunocomplejos. Después de la precipitación en un campo magnético, se decanta el sobrenadante y, luego, se realiza otro ciclo de lavado. Posteriormente, se agregan los iniciadores 1 + 2 para iniciar una reacción quimioluminiscente. La señal luminosa se mide con un fotomultiplicador como unidades relativas de luz (RLU, relative light units), que es proporcional a la concentración de HE4 presente en la muestra (o calibrador o control, si corresponde)

COMPONENTES DEL KIT

Material proporcionado

Componentes	Contenido	100 pruebas (REF: 130201025M)	50 pruebas (REF: 130601025M)
Microperlas magnéticas	Microperlas magnéticas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-HE4 (ratón), con contenido de albúmina sérica bovina (BSA, bovine serum albumin), NaN ₃ (< 0,1 %).	2,5 ml	2,0 ml
Calibrador bajo	Con contenido de antígeno de HE4 (recombinante) y BSA, NaN ₃ (< 0,1 %).	1,0 ml	1,0 ml
Calibrador alto	Con contenido de antígeno de HE4 (recombinante) y BSA, NaN ₃ (< 0,1 %).	1,0 ml	1,0 ml
Búfer	Con contenido de BSA, NaN ₃ (< 0,1 %).	13,5 ml	8,0 ml
Marca de ABEI	Anticuerpo monoclonal anti-HE4 marcado con ABEI, con contenido de BSA, NaN ₃ (< 0,1 %).	23,5 ml	13,0 ml
Diluyente	0.9% NaCl.	15,0 ml	10,0 ml
Control 1	Con contenido de antígeno de HE4 (recombinante) y BSA, NaN ₃ (< 0,1 %).	2,0 ml	1,0 ml
Control 2	Con contenido de antígeno de HE4 (recombinante) y BSA, NaN ₃ (< 0,1 %).	2,0 ml	1,0 ml

Todos los reactivos se entregan listos para usarse.

Accesorios necesarios, pero no suministrados

Serie MAGLUMI y Biolumi:

Módulo de reacción	REF.: 630003
Iniciador 1 + 2	REF.: 130299004M, 130299027M
Concentrado para lavado	REF.: 130299005M
Comprobación de luz	REF.: 130299006M
Vaso de reacción	REF: 130105000101

Pida accesorios a Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., Ltd. (SNIBE) o a nuestros representantes autorizados.

CALIBRACIÓN

Trazabilidad: Este método se estandarizó de acuerdo con la sustancia de referencia interna de SNIBE.

La prueba de calibradores específicos de ensayo permite que los valores de RLU ajusten la curva principal asignada. Los resultados se determinan mediante una curva de calibración generada específicamente para el instrumento por calibración de dos puntos y una curva principal (10 calibraciones) proporcionada a través de un CHIP de identificación por radiofrecuencia (RFID, del inglés radio frequency identification) del reactivo.

Se recomienda recalibrar en las siguientes situaciones:

- Después de cada intercambio de lotes (Reactivo o Iniciador 1 + 2).
- Cada semana o cada vez que se utiliza un nuevo kit de reactivos (recomendado).
- Después de que se requiere mantenimiento de los instrumentos.
- Si los controles están fuera del rango esperado.

CONTROL DE CALIDAD

Siga los reglamentos gubernamentales o los requisitos de acreditación concernientes a la frecuencia de control de calidad.

El control de calidad interno solo es aplicable con el sistema MAGLUMI y Biolumi. Para obtener instrucciones de uso y el valor objetivo, consulte la **Información de control de calidad de HE4 (CLIA)**. El usuario debe evaluar los resultados con sus propios estándares y conocimientos.

Para información detallada sobre cómo ingresar los valores del control de calidad, consulte las Instrucciones de funcionamiento del analizador correspondiente.

Para supervisar el rendimiento del sistema y las tendencias del cuadro, se necesitan materiales de control de calidad disponibles comercialmente. Trate todas las muestras de control de calidad del mismo modo que las muestras del paciente. Se logra un nivel satisfactorio de rendimiento cuando los valores de análisis obtenidos se encuentran dentro del rango de control aceptable para el sistema o dentro de su rango, según lo determinado por un esquema de control de calidad interna del laboratorio adecuado. Si los resultados del control de calidad no entran dentro de los valores esperados o dentro de los valores establecidos del laboratorio, no informe los resultados. Realice las siguientes acciones:

- Verifique que los materiales no hayan caducado.
- Verifique que se haya realizado el mantenimiento necesario.
- Verifique que el ensayo se haya realizado de acuerdo con las instrucciones de uso.
- Vuelva a ejecutar el ensayo con nuevas muestras de control de calidad.
- Si es necesario, comuníquese con su distribuidor o proveedor de soporte técnico local para obtener asistencia.

PREPARACIÓN Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS

- Se puede utilizar para el ensayo suero obtenido con tubos de muestreo estándar o tubos que contengan gel de separación. Para las muestras de plasma, se verificó el anticoagulante EDTA-2K y podría aplicarse en el ensayo. El plasma en heparina no es adecuado para este ensayo. Extraiga la sangre asepticamente siguiendo las precauciones universales para la venopunción.
- Asegúrese de que la formación completa de coágulos en las muestras haya tenido lugar antes de la centrifugación. Algunas muestras de suero, en particular las de los pacientes que reciben tratamiento anticoagulante, podrían tener un tiempo de coagulación mayor.
- Si la muestra se centrifuga antes de que se complete la coagulación, la presencia de fibrina puede producir resultados erróneos. Las muestras deben estar libres de fibrina y otras partículas.
- No use muestras hemolizadas o con una marcada lipemia, ni tampoco muestras que contengan partículas o exhiban contaminación microbiana evidente. Inspeccione todas las muestras en busca de burbujas y elimínelas antes del análisis para obtener resultados óptimos.
- Evite congelar y descongelar las muestras reiteradamente. Las muestras pueden congelarse y descongelarse solo dos veces. Las muestras almacenadas deben mezclarse bien antes del uso (mezclador Vortex). Las muestras congeladas deben mezclarse **COMPLETAMENTE** después de la descongelación por agitación a BAJA velocidad.
- Las muestras centrifugadas con una capa lipídica en la parte superior deben trasladarse a un vaso de muestra o un tubo secundario. Se debe tener cuidado para transferir solo la muestra clarificada sin el material lipémico.
- Todas las muestras (muestras de pacientes y controles) deben analizarse en un plazo de dos horas después de colocarlas en el sistema MAGLUMI y Biolumi. Consulte el servicio de SNIBE para obtener información más detallada sobre las restricciones de almacenamiento de muestras.
- Las muestras extraídas del separador, las células o el coágulo pueden almacenarse hasta 72 horas a una temperatura de entre 2 y 8 °C, y almacenarse hasta 60 días congeladas a -20 °C o menos.
- Antes del envío de las muestras, se recomienda retirarlas del separador, los glóbulos rojos o el coágulo. Al enviarse, las muestras deben embalsarse y etiquetarse de conformidad con regulaciones estatales, federales e internacionales que abarquen el transporte de sustancias infecciosas y muestras clínicas. Las muestras deben enviarse congeladas.
- El volumen de muestra necesario para una sola determinación de HE4 es de 15 µl.

ADVERTENCIA Y PRECAUCIONES PARA LOS USUARIOS

IVD

- Para usarse en diagnóstico *in vitro*.
- Siga el prospecto cuidadosamente. La confiabilidad de los resultados del ensayo no se puede garantizar si existe alguna desviación respecto de las instrucciones de este prospecto.

Precauciones de seguridad

- **PRECAUCIÓN:** Este producto requiere la manipulación de muestras humanas. Se recomienda que todos los materiales de origen humano se consideren potencialmente infecciosos y que se manipulen de conformidad con lo dispuesto en 29 CFR 1910.1030 Exposición ocupacional a patógenos transmitidos por la sangre. Se debe usar el nivel de bioseguridad 2 u otras prácticas de bioseguridad adecuadas para materiales que contienen agentes infecciosos o que se sospecha que los contienen.
- Todas las muestras, los reactivos biológicos y los materiales utilizados en el ensayo deben considerarse potencialmente capaces de transmitir agentes infecciosos. Por lo tanto, deben desecharse de acuerdo con las prácticas de su institución. Deseche todos los materiales de manera segura y aceptable y en cumplimiento de los requisitos regulatorios imperantes.
- Este producto contiene azida de sodio. Los contenidos y recipientes deben desecharse en conformidad con todas las regulaciones locales, regionales y nacionales.
- Consulte las hojas de datos de seguridad que están disponibles a pedido.

Precauciones de manipulación

- No use kits de reactivos después de la fecha de caducidad.
- No intercambie los componentes de diferentes reactivos o lotes.
- Antes de cargar los kits de reactivos en el sistema por primera vez, los kits de reactivos se deben mezclar para volver a suspender las microperlas magnéticas que se asentaron durante el envío.
- Para obtener instrucciones sobre cómo mezclar microperlas magnéticas, consulte la sección Preparación del reactivo de este prospecto.
- Para evitar la contaminación, use guantes limpios cuando trabaje con un kit de reactivos y una muestra.
- En el transcurso del tiempo, los líquidos residuales pueden secarse en la superficie septal. Estos son, generalmente, sales secas que no tienen ningún efecto sobre la eficacia del ensayo.
- Para obtener un análisis detallado de las precauciones de manipulación durante el funcionamiento del sistema, consulte la información de servicio de SNIBE.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

- Sellado: Almacenamiento a una temperatura de entre 2 y 8 °C hasta la fecha de caducidad.
- Apertura a entre 2 y 8 °C: La estabilidad mínima es de seis semanas.
- En el sistema: La estabilidad mínima es de cuatro semanas.
- Para asegurar el mejor rendimiento del kit, se recomienda colocar los kits abiertos en el refrigerador después de la finalización de los trabajos de prueba intradía. Es posible seguir utilizando el kit después del periodo de apertura o en el sistema si los controles se encuentran dentro de los rangos esperados.
- Se debe mantener en posición vertical para el almacenamiento, a fin de facilitar la posterior resuspensión adecuada de las microperlas magnéticas.
- Se debe mantener alejado de la luz solar.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

Preparación del reactivo

- La resuspensión de las microperlas magnéticas se realiza de forma automática cuando el kit se carga correctamente, de modo que las microperlas

magnéticas se vuelvan a suspender totalmente de forma homogénea antes del uso.

- Para asegurar el desempeño adecuado del test, siga estrictamente las Instrucciones de funcionamiento del analizador correspondiente. Cada parámetro del test está identificado mediante un CHIP RFID en el kit del reactivo. Para más información, consulte las Instrucciones de funcionamiento del analizador correspondiente.

DILUCIÓN

Las muestras con concentraciones que estén por encima del rango de medición pueden diluirse automáticamente con los analizadores o de forma manual. La dilución recomendada es 1:9.

Después de la dilución manual, multiplique el resultado por el factor de dilución. Tras diluir con los analizadores, el software considera automáticamente la dilución para el cálculo de la concentración de la muestra.

La dilución automática de la muestra está disponible después de que se hayan establecido los ajustes de dilución en el software de usuario del analizador para inmunoensayo de quimioluminiscencia completamente automático serie MAGLUMI. Consulte las instrucciones de funcionamiento del analizador para inmunoensayo de quimioluminiscencia completamente automático serie MAGLUMI.

Efecto prozona de dosis alta

En el caso del ensayo de HE4, no se observó un efecto prozona de dosis alta cuando las muestras contenían hasta 50 000 pmol/l de HE4.

LIMITACIONES

- Se requiere una técnica hábil y el cumplimiento estricto de las instrucciones para obtener resultados confiables.
- La contaminación bacteriana o la inactivación por calor de las muestras pueden afectar los resultados del examen.
- Un resultado dentro del rango esperado no descarta la presencia de la enfermedad, y debe interpretarse junto con el cuadro clínico del paciente y otros procedimientos de diagnóstico.
- Los resultados de la prueba se notifican cuantitativamente. Sin embargo, el diagnóstico de una enfermedad no debe basarse en el resultado de una sola prueba, sino que debe determinarse en función de los hallazgos clínicos combinados con el criterio médico.
- Cualquier decisión terapéutica también debe tomarse caso por caso.
- Las muestras de los pacientes con anticuerpos humanos antirratón (HAMA, del inglés human anti-mouse antibodies) pueden mostrar un falso aumento o una falsa disminución de valores. Aunque se incorporan agentes neutralizantes de HAMA, las concentraciones de HAMA en suero extremadamente altas, en ocasiones, pueden influir en los resultados.

RESULTADOS

Cálculo de los resultados

El analizador calcula automáticamente la concentración en cada muestra mediante una curva de calibración que se genera con un procedimiento de curva principal de calibración de dos puntos. Los resultados se expresan en pmol/l. Para más información, consulte las Instrucciones de funcionamiento del analizador correspondiente.

Interpretación de los resultados

Los rangos esperados para el ensayo de HE4 se obtuvieron mediante la realización de pruebas en 356 mujeres aparentemente sanas en China. En este estudio, el 98 % de las mujeres aparentemente sanas presentaron valores de HE4 iguales o inferiores a 140 pmol/l.

Además, en este estudio, el 95 % de las mujeres premenopáusicas aparentemente sanas presentaron valores de HE4 iguales o inferiores a 70 pmol/l, y el 95 % de las mujeres posmenopáusicas aparentemente sanas presentaron valores de HE4 iguales o inferiores a 140 pmol/l.

Los resultados pueden diferir entre laboratorios debido a variaciones en la población y el método de prueba. Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango de referencia.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Precisión

La precisión del ensayo de HE4 se determinó como se describe en el documento EP5-A2 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, Clinical & Laboratory Standards Institute). Se probaron dos controles y tres grupos de suero humano con diferentes concentraciones de analito en duplicado en dos ejecuciones independientes por día durante 20 días de pruebas. El resultado se resume en la siguiente tabla:

Muestra	Media (pmol/l) (N = 80)	Dentro de la ejecución		Entre ejecuciones		Total	
		SD (pmol/l)	% de CV	SD (pmol/l)	% de CV	SD (pmol/l)	% de CV
Control 1	101	4,25	4,22	2,19	2,17	4,78	4,74
Control 2	503	19,2	3,81	3,04	0,605	19,4	3,86
Grupo de suero 1	21,2	1,26	5,95	0,74	3,47	1,46	6,89
Grupo de suero 2	151	7,34	4,87	0,67	0,444	7,56	5,01
Grupo de suero 3	1232	25,8	2,09	10,4	0,845	28,3	2,30

Límite de blanco (LoB)

El LoB del ensayo de HE4 es de 5,00 pmol/l.

Límite de detección (LoD)

El LoD del ensayo de HE4 es de 15,0 pmol/l.

Límite de cuantificación (LoQ)

Se define como la concentración de HE4 que puede medirse con un CV entre ensayos del 20 %. El LoQ del ensayo de HE4 es de 20,0 pmol/l.

Rango de medición

5,00-1500 pmol/l. (se define por el límite de blanco y el límite superior de la curva principal). Los valores que están por debajo del límite de blanco se observan como < 5,00 pmol/l. Los valores que están por encima del rango de medición se observan como > 1500 pmol/ml.

Linealidad

El ensayo es lineal entre 15,0 pmol/l y 1500 pmol/l, sobre la base de un estudio realizado con la orientación del documento EP6-A del CLSI. Se prepararon nueve niveles de muestras distribuidos uniformemente mediante la combinación de una muestra de suero que contenía 1650 pmol/l de HE4 con una muestra de suero que contenía 15,0 pmol/l de HE4. La media de recuperación de la muestra osciló entre el 90 % y el 110 %.

Comparación de métodos

Se realizaron pruebas a un total de 135 muestras en el rango de 21,147 a 1195,635 pmol/l mediante el ensayo de HE4 (y) y un inmunoensayo disponible comercialmente (x). Los datos de las regresiones lineales resultantes se resumen como: $y = 1,020x - 1,931$, $r^2 = 0,994$.

Especificidad analítica

Los datos de especificidad del ensayo se obtuvieron a través de la adición de estas sustancias a las muestras de suero con las concentraciones indicadas. La reactividad cruzada del ensayo demostró ser no detectable para Elafin ($\leq 54,5$ nmol/l), inhibidor de proteasas secretado por leucocitos (SLPI, secretory leukocyte protease inhibitor) ($\leq 20,8$ nmol/l).

Interferencia de fármacos

Los fármacos hasta las siguientes concentraciones no interfirieron con el ensayo:

Compuesto	Concentración (µg/ml)
Carboplatino	500
Cisplatino	165
Ciclofosfamida	500
Doxorrubicina	1,16
Metotrexato	45
Bleomicina	100
Citarabina	30
Tamoxifeno	60
Mitomicina C	75
Vinblastina	1,5
Paclitaxel	3,5
Fluorouracilo	500

Interferencia endógena

Las sustancias hasta las siguientes concentraciones no interfirieron con el ensayo:

- Bilirrubina 40 mg/dl
- Hemoglobina 2000 mg/dl
- Triglicérido 1000 mg/dl
- ANA 5 (S/CO)
- RF 1500 IU/ml
- HAMA 30 ng/ml

Nota: La concentración de ANA se mide con el kit de prueba de detección de ANA (ELISA) de EUROIMMUN.

REFERENCIAS

1. Bouchard D, Morisset D, Bourbonnais Y, et al. Proteins with whey-acidicprotein motifs and cancer. *Lancet Oncol* 2006;7:167-174.
2. Bingle L, Singleton V, Bingle CD. The putative ovarian tumour marker gene HE4 (WFDC2), is expressed in normal tissues and undergoes complex alternative splicing to yield multiple protein isoforms. *Oncogene* 2002;21:2768-2773.
3. Kirchoff C. Molecular characterization of epididymal proteins. *Rev Reprod* 1998;3:86-95.
4. Drapkin R, von Horsten HH, Lin Y, et al. Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res* 2005;65(6):2162-2169.
5. Hough CD, Sherman-Baust CA, Pizer ES, et al. Large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer. *Cancer Res* 2000;60:6281-6287.
6. Galgano MT, Hampton GM, Frierson HF, Jr. Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues. *Mod Pathol* 2006;19:847-853.
7. Hellstrom I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M, et al. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2003;63: 3695-3700.
8. Lu KH, Patterson AP, Wang L, et al. Selection of potential markers for epithelial ovarian cancer with gene expression arrays and recursive descent partition analysis. *Clin Cancer Res* 2004;10: 3291-3300.
9. Earle CC, Schrag D, Neville BA, et al. Effect of surgeon specialty on processes of care and outcomes for ovarian cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:172-180.
10. Bingle L, Cross SS, High AS, et al. WFDC2 (HE4): a potential role in the innate immunity of the oral cavity and respiratory tract and the development of adenocarcinomas of the lung. *Respiratory Research* 2006; 7, 61-70.



Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., Ltd.

No.23, Jinxu East Road, Pingshan District, 518122 Shenzhen, P.R. China

Tél.: +86-755-21536601 Fax: +86-755-28292740








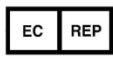






Shanghai International Holding Corp. GmbH (Europa)

Eiffestrasse 80, 20537 Hamburg, Germany

Tél.: +49-40-2513175 Fax: +49-40-255726

EXPLICACIÓN DE SÍMBOLOS

	Consulte las instrucciones de uso		Fabricante
	Límite de temperatura (Almacenar a una temperatura de entre 2 y 8 °C)		Fecha de caducidad
	Contiene suficiente para		Mantener alejado de la luz solar
	Este lado hacia arriba		Representante autorizado en la Comunidad Europea
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>		Componentes del kit
	Número de catálogo		Código de lote