

## Proteína epididimal humana 4 (CLIA)

### Información para pedidos

| Número de catálogo | Tamaño de paquete |
|--------------------|-------------------|
| HE4111             | 2 × 50 ensayos    |
| HE4112             | 2 × 100 ensayos   |

### Uso Previsto

El ensayo de HE4 serie CL es un inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA) para determinar de manera cuantitativa la proteína epididimal humana 4 (HE4) en plasma o suero humano. El ensayo de HE4 no se recomienda como procedimiento de análisis para detectar cáncer en la población general. Sin embargo, el ensayo de HE4 se considera como auxiliar en el monitoreo de recidiva o progresión de la enfermedad en pacientes con tumor maligno.

### Resumen

La proteína epididimal humana 4 (HE4), codificada por WFDC(2) es una proteína de secreción rica en cisteína ácida que pertenece a la familia de las proteínas ácidas séricas nucleares de cuatro enlaces disulfuro (WFDC). La WFDC(2) codifica una proteína de 13 kD; sin embargo, la forma madura de proteínas glucosiladas tiene un peso molecular de aproximadamente 25 kD.<sup>1-4</sup> La HE4 se detectó por primera vez en el epitelio del epidídimo distal y en el conducto deferente, la que se cree que tiene una función importante en el proceso de maduración del semen. La investigación en profundidad indica que la HE4 muestra una alta expresión en el epitelio del sistema reproductivo femenino y en la tráquea proximal, la glándula parótida, los túbulos contorneados distales, la hipófisis anterior, las glándulas mamarias, así como el epitelio colónico. También se encuentra en la tiroides, la próstata, las glándulas lagrimales, las glándulas exocrinas y el páncreas. Sin embargo, no se expresa en el tejido ovárico, el tejido gastrointestinal, el hígado, el bazo, los ganglios linfáticos, la musculatura, el tejido cerebral, el sistema linfático, el sistema hematopoyético y el sistema nervioso.<sup>5-7</sup> Los niveles altos de secreción se pueden encontrar en cáncer ovárico y en carcinoma endometrial.<sup>4</sup>

8

### Principio del ensayo

El ensayo de HE4 serie CL es un ensayo tipo sándwich de dos partes.

En la primera parte, se agregan a la cubeta de reacción micropartículas paramagnéticas de muestra recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-HE4 (ratón) y anticuerpo monoclonal anti-HE4 conjugado a la fosfatasa alcalina (ratón). Después de la incubación, el HE4 presente en la muestra se une tanto a las micropartículas recubiertas con anticuerpo anti-HE4 como al anticuerpo anti-HE4 conjugado a la fosfatasa alcalina para formar un complejo tipo sándwich. La micropartícula se captura magnéticamente y las otras sustancias sin unir se eliminan por lavado.

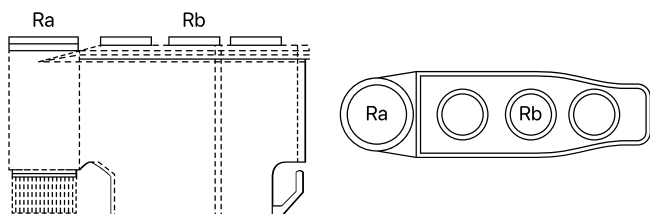
En el segundo paso, la solución de sustrato se añade al vaso de reacción. El anticuerpo anti-HE4 conjugado a la fosfatasa alcalina (ratón) cataliza la solución en el inmunocomplejo que queda en la micropartícula. La reacción quimioluminiscente resultante se mide como unidades de luz relativas (RLU) con el fotomultiplicador integrado en el sistema. La cantidad de HE4 presente en la muestra es proporcional a las unidades de luz (RLU) generadas durante la reacción. La concentración de HE4 puede calcularse con la curva de calibración.

### Componentes reactivos

|           |                                                                                                                         |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Ra</b> | Micropartículas paramagnéticas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-HE4 (ratón) en el búfer TRIS con conservante. |
| <b>Rb</b> | Anticuerpo monoclonal anti-HE4 conjugado a la fosfatasa alcalina (ratón) en el búfer MES con conservante.               |

La posición de cada componente reactivo se muestra en la siguiente figura (vista delantera por la izquierda y vista superior por la derecha):





## Almacenamiento y estabilidad

El kit de reactivos HE4 (CLIA) es estable sin abrir hasta la fecha de caducidad indicada si se almacena a 2-8 °C.

El kit de reactivos HE4 (CLIA) puede almacenarse en el analizador y usarse hasta 56 días después de abierto si se mantiene a 2-8 °C.

## Preparación del reactivo

Ra: Listo para su utilización

Rb: Listo para su utilización

## Materiales necesarios pero no suministrados

Analizador para inmunoensayo de quimioluminiscencia serie CL de Mindray.

Cat.No.HE4211: Calibradores de HE4: 1×1.2 ml para el calibrador C(0), 1×1.0 ml para cada calibrador C(1) y C(2).

Cat.No.TML331: Multicontrol II de marcador tumoral (L), 3×2.0 ml.

Cat.No.TMH331: Multicontrol II de marcador tumoral (H), 3×2.0 ml.

N.º cat. TML332: Multicontrol II de marcador tumoral (L), 6×2.0 ml.

Cat.No.TMH332: Multicontrol II de marcador tumoral (H), 6×2.0 ml.

Cat.No.WB411: Búfer de lavado, 1×10 l.

Cat.No.CS511: Solución de sustrato, 4×115 ml.

Cat.No.CS512: Solución de sustrato, 4×75 ml.

Cubeta de reacción.

## Instrumento aplicable

Analizador para inmunoensayo de quimioluminiscencia serie CL de Mindray

## Preparación y obtención de muestras

Para este ensayo, se recomiendan muestras de plasma EDTA, heparina sódica y heparina de litio y suero humano.

Obtenga todas las muestras de sangre siguiendo las precauciones rutinarias para la venopunción. Siga las recomendaciones del fabricante del tubo de extracción sanguínea para la centrifugación. Centrifugue las muestras cuando finalice la formación del coágulo.

Algunas muestras, en particular las de los pacientes que reciben terapia anticoagulante, podrían tener un tiempo de coagulación mayor. Antes del análisis, compruebe que la materia celular y fibrina residual se han eliminado.

Para lograr unos resultados óptimos, inspeccione todas las muestras para ver si hay burbujas. Elimine las burbujas con una pipeta antes del análisis. Las muestras se deben mezclar bien después de descongelarse. Las muestras descongeladas deben centrifugarse antes de usarse. Si la muestra se cubrió con una capa lipídica tras la centrifugación, debe transferirse a un tubo limpio antes del ensayo. No transfiera la capa lipídica. Manipule con cuidado para evitar la contaminación cruzada. No use las muestras muy hemodizadas. No use las muestras inactivadas con calor.

Las muestras se deben analizar con la mayor brevedad después de su obtención. Si el análisis no se realiza antes de las 24 horas, las muestras se deben almacenar a una temperatura máxima de 2-8 °C. Las muestras se mantendrán estables durante 7 días a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C, y durante 90 días a una temperatura de -20 °C.

Evite ciclos repetidos de congelación y descongelación. Se debe evitar someter las muestras a más de tres ciclos de congelación y descongelación.

## Procedimiento del ensayo

Para obtener resultados óptimos con este ensayo, los operadores deben leer detenidamente el manual de funcionamiento del sistema para informarse bien sobre las instrucciones de funcionamiento, el control y la conservación de las muestras, las precauciones de seguridad y el mantenimiento. Prepare también todos los materiales necesarios para el ensayo.

Antes de introducir el kit de reactivos HE4 (CLIA) en el analizador por primera vez, el frasco de reactivo sin abrir debe volcarse suavemente al menos 30 veces para volver a suspender las micropartículas que se han asentado durante el envío o almacenamiento.



Inspeccione visualmente el frasco para confirmar que las micropartículas están suspendidas. Si las micropartículas permanecen adheridas al frasco, continúe volcándolo hasta que se vuelvan a suspender por completo. Si las micropartículas no se suspenden, se recomienda no usar ese frasco de reactivo. Póngase en contacto con el servicio de atención al cliente de Mindray. No vuelque los frascos de reactivo abiertos.

Para este ensayo, se necesitan 5 µl de muestra para un único análisis. Este volumen no incluye el volumen muerto del contenedor de la muestra. Si se realizan más análisis de la misma muestra, se necesita un volumen adicional. Los operadores deben consultar el manual de funcionamiento del sistema y el requisito específico del ensayo para determinar el volumen mínimo de muestra.

## Calibración

El HE4 (CLIA) serie CL se ha estandarizado de acuerdo con un ensayo de HE4 comercial (CLIA).

La información específica de la curva de calibración principal del kit de reactivos de HE4 (CLIA) se registra en el código de barras bidimensional adherido al paquete de reactivos. Se utiliza junto con calibradores para calibrar el lote de reactivos específicos. Cuando realice la calibración, primero escanee la información de la curva de calibración principal del código de barras en el sistema y, a continuación, utilice los calibradores en los tres niveles. Antes de realizar ningún ensayo de HE4, es necesario obtener la curva de calibración válida. Se recomienda repetir la calibración cada 28 días, cuando se utilice un nuevo lote de reactivos o cuando los controles de calidad no se ajusten al intervalo de valores especificado. Para obtener instrucciones detalladas de la calibración, consulte el manual de funcionamiento del sistema.

## Control de calidad

Se recomienda que los controles de calidad se ejecuten cada 24 horas si las pruebas están en uso o después de cada calibración. La frecuencia del control de calidad se debe adaptar a los requisitos individuales de cada laboratorio. Los dos niveles de controles de calidad recomendados para este ensayo son multicontrol II de marcador tumoral (L) de Mindray y multicontrol II de marcador tumoral (H) de Mindray.

Los resultados de los controles de calidad deben ajustarse a los intervalos admisibles.

Si un control no se ajusta a su intervalo especificado, los resultados del ensayo correspondiente no serán válidos y las muestras deberán volver a analizarse. Podría ser necesario repetir la calibración. Inspeccione el sistema de ensayo consultando el manual de funcionamiento del sistema. Si los resultados de los controles de calidad siguen sin ajustarse al intervalo especificado, póngase en contacto con el servicio de atención al cliente de Mindray.

## Cálculo

El analizador calcula automáticamente la concentración de analitos de cada muestra a partir de la lectura del código de barras en la curva de calibración principal, y según el ajuste de la curva obtenida por la función logística de 4 parámetros (4PLC) con las unidades de luz relativas (RLU) generadas a partir de los calibradores de tres niveles de los valores de concentración definidos. Los resultados se muestran en la unidad de pmol/l.

## Dilución

Las muestras con concentraciones HE4 que exceden el límite superior se pueden diluir con el diluyente de muestra de Mindray. La dilución recomendada es de 1:20 (ya sea manual o automática mediante el analizador). La concentración de la muestra diluida debe ser >30 pmol/l. Después de la dilución manual, multiplique el resultado por el factor de dilución. Después de que los analizadores realizan la dilución automática, el sistema multiplica automáticamente el resultado por el factor de dilución cuando calcula la concentración de la muestra.

## Valores previstos

Un estudio extenso de una cohorte de 696 mujeres sanas determinó el intervalo de referencia del ensayo de HE4 serie CL.

| Edad (años) | N   | HE4 (pmol/l) |               |
|-------------|-----|--------------|---------------|
|             |     | Mediana      | Percentil 95° |
| <40         | 205 | 42.11        | 60.53         |
| 40-49       | 123 | 44.47        | 76.33         |
| 50-59       | 125 | 47.65        | 74.31         |
| 60-69       | 122 | 56.12        | 83.26         |
| >70         | 121 | 61.52        | 105.69        |

Por las diferencias de parámetros geográficos, raza, sexo y edad, es muy recomendable que cada laboratorio establezca su propio intervalo de referencia.



## Limitación

El límite superior de este ensayo es 1,500 pmol/l. Una muestra con una concentración de HE4 inferior al límite superior se puede determinar de manera cuantitativa, mientras que la muestra con una concentración mayor que el límite superior se notifica como >1,500 pmol/l.

La concentración de HE4 en una muestra concreta, determinada con ensayos de distintos fabricantes, puede variar debido a las diferencias en los métodos de ensayo, la calibración y la especificidad de los reactivos. Los resultados de los ensayos se usarán junto con otros datos, como síntomas, resultados de otras pruebas, historia clínica, etc.

Los anticuerpos heterófilos en suero o plasma pueden reaccionar con la inmunoglobulina en componentes reactivos para interferir en la prueba.<sup>9</sup> Las muestras de los individuos que han sido expuestos a anticuerpos monoclonales de ratón podrían contener anticuerpos humanos antirratón (HAMA). Estas muestras podrían dar valores erróneamente elevados o bajos con los kits de ensayo que utilizan anticuerpos monoclonales de ratón.<sup>10</sup>  
<sup>11</sup> Sin embargo, en este ensayo no se han observado interferencias evidentes de HAMA.

## Características de desempeño

### Intervalo posible

El intervalo de notificación se define por la sensibilidad analítica y el límite superior de la curva de calibración principal. El intervalo de notificación del kit de reactivos de HE4 (CLIA) es de 15-1,500 pmol/l (o el límite superior es de hasta 30,000 pmol/l para las muestras diluidas 20 veces).

### Límites inferiores de medición

El kit de reactivos de HE4 (CLIA) tiene un límite de espacio en blanco (LoB) de  $\leq 5$  pmol/l, un límite de detección (LoD) de  $\leq 15$  pmol/l y un límite de cuantificación (LoQ) de  $\leq 20$  pmol/l (con un total de error relativo admisible de  $\leq 30$  %).

### Especificidad

Concentraciones máximas de hemoglobina de 1,000 mg/dl, bilirrubina de 70 mg/dl, triglicéridos de 3,000 mg/dl y proteína total de 10.0 g/dl no interfieren en el ensayo de HE4 serie CL. Estas sustancias muestran interferencias inferiores al 10 % en las concentraciones indicadas.

No se observaron interferencias evidentes debido al factor reumatoideo hasta 1,500 IU/ml. Estas sustancias muestran interferencias inferiores al 15 % en las concentraciones indicadas.

Las pruebas de sustancias de interferencia se realizaron en 10 productos farmacéuticos de uso común. Estos compuestos mostraron menos de un 10 % de interferencia en el ensayo de HE4 serie CL en los niveles que se indican a continuación.

| Compuesto de prueba | Concentración de sustancias de interferencia |
|---------------------|----------------------------------------------|
| Carboplatino        | 500 µg/ml                                    |
| Cisplatino          | 165 µg/ml                                    |
| Clotrimazol         | 0.3 µg/ml                                    |
| Ciclofosfamida      | 500 µg/ml                                    |
| Doxorrubicina       | 1.16 µg/ml                                   |
| Metotrexato         | 45 µg/ml                                     |
| Paclitaxel          | 0.0035 µg/ml                                 |
| Dexametasona        | 10 µg/ml                                     |
| Folinato            | 2.68 µg/ml                                   |
| Melfalán            | 2.8 µg/ml                                    |

El calibrador C(0) de HE4 de Mindray se complementó con otros marcadores tumorales, tales como alfa-fetoproteína (AFP), antígeno de cáncer 125 (CA125), antígeno de cáncer 15-3 (CA15-3), antígeno carbohidrato 19-9 (CA19-9), antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno de cáncer 72-4 (CA72-4), enolasa neuroespecífica (NSE), fragmento de citoqueratina 19 (CYFRA 21-1), ferritina (FERR), antígeno carbohidrato 50, antígeno carbohidrato 242, ProGRP y antígeno de carcinoma de células escamosas (SCCA) en los niveles específicos indicados en la siguiente tabla. No se observó reactividad cruzada evidente, ya que todos los resultados fueron  $\leq 50.0$  pmol/l. Los resultados se indican en la tabla a continuación.



| Marcador tumoral | Concentración de reactante cruzado | Valor informado de HE4 (pmol/l) | Criterios de aceptación                   |
|------------------|------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------------|
| AFP              | 1,000 ng                           | 8.87                            | Valor informado de HE4 $\leq 50.0$ pmol/l |
| CA 125           | 1,000 U/ml                         | 2.39                            |                                           |
| CA 15-3          | 100 U/ml                           | 40.34                           |                                           |
| CA 19-9          | 1,000 U/ml                         | 0.24                            |                                           |
| CEA              | 1,000 ng                           | 5.10                            |                                           |
| CA72-4           | 300 U/ml                           | 18.50                           |                                           |
| NSE              | 350 ng                             | 2.21                            |                                           |
| CYFRA 21-1       | 500 ng                             | 11.67                           |                                           |
| FERR             | 1,000 ng                           | 11.67                           |                                           |
| CA50             | 500 U/ml                           | 29.84                           |                                           |
| CA242            | 200 U/ml                           | 4.88                            |                                           |
| ProGRP           | 5,000 pg                           | 2.93                            |                                           |
| SCCA             | 70 ng                              | 2.02                            |                                           |

## Gancho a altas dosis

Para el ensayo de HE4 serie CL, no se observó efecto gancho de dosis altas cuando se analizaron las muestras que contienen hasta aproximadamente 40,000 pmol/l de HE4.

## Exactitud

Para confirmar la exactitud de este ensayo, se realizó la prueba de recuperación con respecto al enriquecimiento de la muestra. Se enriquecieron dos muestras diferentes con niveles altos de HE4 en una muestra básica que presenta un nivel bajo de HE4 con una proporción de volumen de 1:9, respectivamente. Los resultados mostraron que este ensayo tuvo una recuperación media de  $100 \pm 15$  %. Los resultados se enumeran en la siguiente tabla.

| HE4 sin diluir (pmol/l)                   | HE4 enriquecida (pmol/l) | Recuperación media |
|-------------------------------------------|--------------------------|--------------------|
| Nivel bajo: 40.55<br>Nivel alto: 1,174.70 | 151.88                   | 98.23 %            |

## Precisión

El ensayo de HE4 serie CL está diseñado para que tenga una precisión del  $\leq 8$  % (en el CV del dispositivo).

La precisión se determinó siguiendo los estándares del protocolo EPS-A2(12) del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Se probaron dos niveles de controles de calidad en duplicado en dos series independientes por día, durante un total de 20 días, usando un único lote de reactivo y una curva de calibración. Los datos de precisión se resumen en la siguiente tabla.

| Muestra | Valor medio de HE4 (pmol/l) | En la ejecución del CV | Entre ejecución del CV | En el CV del dispositivo |
|---------|-----------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|
| 1       | 37.85                       | 2.74 %                 | 3.02 %                 | 3.78 %                   |
| 2       | 292.76                      | 3.15 %                 | 1.44 %                 | 1.82 %                   |

## Linealidad

Se mezcló una muestra de concentración alta de HE4 (aproximadamente 1,500 pmol/l) con una muestra de concentración baja ( $<15$  pmol/l) con diferentes proporciones, lo que genera una serie de diluciones. El HE4 de cada dilución se calculó usando el ensayo de HE4 serie CL de Mindray. Se demostró que la linealidad se ajustaba al intervalo de 15 pmol/l a 1,500 pmol/l; el coeficiente de correlación  $r$  es  $\geq 0.9900$ . Los datos de linealidad se resumen en la siguiente tabla.

| Concen-tración (pmol/l) | 1     | 2      | 3      | 4      | 5       | 6       |
|-------------------------|-------|--------|--------|--------|---------|---------|
| Valor previsto de HE4   | 14.39 | 333.69 | 663.85 | 994.01 | 1324.17 | 1604.33 |
| Valor medido de HE4     | 14.39 | 339.43 | 626.41 | 947.92 | 1354.71 | 1604.33 |

## Comparación de métodos

El ensayo de HE4 serie CL de Mindray se comparó con un kit de diagnóstico disponible comercialmente en un estudio de correlación. Los datos estadísticos obtenidos por el modo de cálculo Deming se muestran en la siguiente tabla.

| Intervalo de concentración (pmol/l) | Pendiente | Origen  | $r^2$  |
|-------------------------------------|-----------|---------|--------|
| 20~1,450                            | 0.9813    | -4.6367 | 0.9939 |



## Advertencias y precauciones

1. Exclusivo para uso diagnóstico in vitro.
2. Siga todas las reglas para manipular los reactivos de laboratorio y tome todas las precauciones de seguridad necesarias.
3. Debido a las diferencias de metodología y la especificidad de los anticuerpos, los resultados de los ensayos de la misma muestra pueden ser diferentes si se usan kits de reactivos de otros fabricantes en el sistema Mindray o si se usan kits de reactivos Mindray en otros sistemas.
4. No use kits de reactivos con la fecha de caducidad vencida.
5. No use reactivos mezclados de distintos lotes.
6. Mantenga el paquete de reactivos siempre en posición vertical para garantizar que no se pierdan micropartículas antes de su uso.
7. No se recomienda usar paquetes de reactivos abiertos más de 28 días.
8. La fiabilidad de los resultados del ensayo no se puede garantizar si no se siguen las instrucciones de este prospecto.
9. Los residuos de las reacciones y las muestras deben tratarse como riesgos biológicos potenciales. Las muestras y los residuos de las reacciones se manipularán conforme a las normativas y directrices locales.
10. La hoja de datos de seguridad de los materiales (MSDS) está disponible previa solicitud.

5. Bingle, L., V. Singleton, and C.D. Bingle, The putative ovarian tumor marker gene HE4 (WFDC2), is expressed in normal tissues and undergoes alternative splicing to yield multiple protein isoforms. *Oncogene* 2002; 21:2768-2773.
6. Hellström, I., et al., Detection of the HE4 protein in urine as a biomarker for ovarian neoplasms. *Cancer letters* 2010; 296: 43-48.
7. Hellström, I., and K.E. Hellström, Two new biomarkers, mesothelin and HE4, for diagnosis of ovarian carcinoma. *Expert opinion on medical diagnostics* 2011; 5:227-240.
8. Moore RG, Brown AK, Miller MC, et al. Utility of a novel serum tumor biomarker HE4 in patients with endometrioid adenocarcinoma of the uterus. *Gynecol Oncol* 2008; 110:196-201.
9. Boscatto LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. *Clin Chem* 1988; 34:27-33.
10. Kricka L. Interferences in immunoassays- still a threat. *Clin Chem* 2000; 46:1037-1038.
11. Björner J y otros. Immunometric assay interference: incidence and prevention. *Clin Chem* 2002; 48:613-621.
12. CLSI. EP5-A2: Vol. 24, No. 25, Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Method; Approved Guideline-Second Edition.

© 2018 Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd. Reservados todos los derechos.

**Fabricante:** Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd.

**Dirección:** Mindray Building, Keji 12th Road South, High-tech Industrial Park, Nanshan, Shenzhen, 518057 R.P. China

**Dirección de correo electrónico:** [service@mindray.com](mailto:service@mindray.com)

**Sitio web:** [www.mindray.com](http://www.mindray.com)

**Tel.:** +86-755-81888998

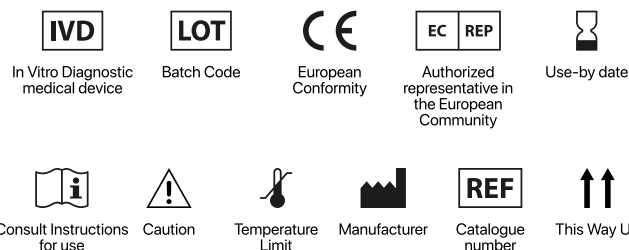
**Fax.:** +86-755-26582680

**Representante de la CE:** Shanghai International Holding Corp. GmbH (Europa)

**Dirección:** Eiffestraße 80, Hamburg 20537, Alemania

**Tel.:** 0049-40-2513175

**Fax.:** 0049-40-255726



## Referencias

1. Anastasi, E., et al., HE4 in the differential diagnosis of a pelvi mass: a case report. *International journal of molecular sciences* 2011; 12:627-632.
2. Anastasi, E., et al., Ovarian tumor marker HE4 is differently expressed during the phases of the menstrual cycle in healthy young women. *Tumor Biology* 2010; 31:411-415.
3. Anastasi, E., et al., HE4: a new potential early biomarker for the recurrence of ovarian cancer. *Tumor Biology* 2010; 31:113-119.
4. Hellström, I., et al., The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer research* 2003; 63:3695-3700.

