

fraxnoma

ECDTL2

Instrucciones de uso del kit de prueba

Versión 13
Emitida el 27 de septiembre de 2023

*Early*CDT[®]
LUNG

Índice

1. Uso previsto	3
2. Introducción y antecedentes de la prueba	3
3. Grupos de pacientes recomendados.....	4
4. Limitaciones de uso	4
5. Principio de la prueba	4
6. Reactivos y materiales proporcionados	5
7. Equipos, insumos y materiales necesarios pero no suministrados	8
8. Estabilidad y almacenamiento.....	9
9. Indicaciones de inestabilidad.....	9
10. Precauciones de seguridad	9
11. Recolección, manipulación y almacenamiento de muestras	10
12. Protocolo de ensayo	10
Paso 1: Preparación de reactivos y muestras.....	12
Paso 2: Control e incubación de muestras de pacientes	13
Paso 3: Adición secundaria de anticuerpos	15
Paso 4: Adición de sustrato	15
Paso 5: Adición de solución quelante.....	16
Paso 6: Medición espectrofotométrica	16
Paso 7: Cálculo de resultados de la prueba.....	16
13. Cálculo e interpretación de los resultados	17
14. Resumen de los resultados del estudio clínico	19
15. Trazabilidad metrológica.....	20
16. Metodología matemática	20
17. Intervalos de referencia	20
18. Características de la ejecución del ensayo	21
19. Resumen del método.....	25
20. Glosario de términos para EarlyCDT Lung	26
21. Glosario de símbolos	27
22. Bibliografía	28
23. Garantía	28
24. Asistencia técnica y servicio al cliente	28
26. Informe de incidentes graves	28
27. Historial de revisiones.....	29

1. Uso previsto

El kit de prueba EarlyCDT Lung está destinado a utilizarse como inmunoensayo para la detección in vitro de un panel de siete autoanticuerpos contra el cáncer de pulmón en humanos, con el fin de ayudar en la detección temprana del cáncer de pulmón en pacientes de alto riesgo y en la estratificación de riesgo de pacientes con nódulos pulmonares indeterminados identificados por tomografía computarizada (TC).

El kit de prueba EarlyCDT Lung está diseñado para uso profesional y los resultados analíticos deben ser interpretados por profesionales médicos en combinación con toda la demás información clínica disponible. La prueba está destinada para usarse con suero humano recolectado ya sea en un activador de coágulos o tubo de gel o plasma recolectado en tubos EDTA.

2. Introducción y antecedentes de la prueba

El cáncer de pulmón es una de las causas principales de todas las muertes relacionadas con el cáncer en todo el mundo, que afectan a millones de pacientes anualmente. El cáncer de pulmón es responsable del 13 % de los casos de cáncer y el 19 % de todas las muertes por cáncer en ambos géneros en todo el mundo¹. El tabaquismo es la causa predominante de cáncer de pulmón, sin embargo, los siguientes también son factores de riesgo:

- Edad
- Sexo
- Antecedentes de tabaquismo
- Enfisema/EPOC
- Antecedentes familiares de cáncer de pulmón en parientes de primer grado
- Exposición ambiental, al polvo, el asbesto y la radiación ionizante, incluido el gas radón

Los datos del National Lung Screening Trial² realizado en EE. UU. han demostrado que la detección más temprana a través de una prueba anual con tomografía computarizada de baja dosis (LDCT, por su sigla en inglés) reduce en un 20 % el índice de mortalidad por cáncer de pulmón. Por lo tanto, la detección más temprana salva vidas. Sin embargo, la prueba LDCT tiene desventajas, ya que el 96,4 % de las LDCT positivas son hallazgos benignos (falsos positivos)². También administra una dosis potencialmente dañina de radiación.

Las células tumorales expresan proteínas en formas alteradas o aumentadas en comparación con sus contrapartes normales (no malignas). Estos se conocen como antígenos asociados a tumores (AAT) y algunos se liberan en la circulación del paciente con cáncer. Varios investigadores han demostrado que el sistema inmune del paciente con cáncer a menudo reconoce el estado alterado (por ejemplo, mutación, sobreexpresión o glicosilación aberrante) de los AAT como no propio y monta una respuesta de anticuerpos contra ellos. Por lo tanto, esta respuesta de anticuerpos actúa como una señal in vivo amplificada temprana de la presencia de AAT (y, por lo tanto, tumores) en el cuerpo. Dichos anticuerpos se conocen como autoanticuerpos (AAc) ya que se elevan con las propias proteínas alteradas del huésped y son estas las que la prueba EarlyCDT Lung está diseñada para medir. Por lo tanto, los resultados de la prueba EarlyCDT Lung se pueden utilizar como una ayuda para la identificación temprana de la presencia de cáncer de pulmón. En los estudios de validación, la prueba EarlyCDT Lung ha demostrado una alta especificidad (>90 %)^{3, 4} y no es invasiva, ya que solo requiere la obtención de una muestra de sangre.

El ensayo se realiza siguiendo una serie de pasos manuales y automatizados en conjunto con el equipo de laboratorio que suele utilizarse para ejecutar las técnicas de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). La muestra diluida del paciente se carga en los pocillos de la placa de ensayo recubierta de antígeno y se incuba. Tras una serie de etapas de adición de reactivo, incubación y lavado, los autoanticuerpos unidos se detectan finalmente agregando un reactivo colorimétrico y la señal de densidad óptica (DO) resultante se mide con un lector de placas espectrofotométrico. El lector de placas exporta los datos de DO generados a un archivo de Excel para calcular el resultado de la prueba. En el kit se incluye un dispositivo USB que tiene una plantilla de Excel bloqueada. Los resultados se transfieren manualmente a la plantilla de Excel en la que el resultado de la prueba se genera automáticamente. El ensayo aplica umbrales de puntos de corte a los resultados cuantitativos para obtener una respuesta ordinal (negativa, moderada, alta) y como tal, es semi cuantitativa.

3. Grupos de pacientes recomendados

El kit de prueba EarlyCDT Lung se recomienda para uso en humanos con alto riesgo de cáncer de pulmón debido a una combinación de edad, sexo, antecedentes de tabaquismo y otros factores de riesgo tales como exposiciones ambientales (polvo, asbesto, sustancias radioactivas), personas con antecedentes de enfisema/EPOC o antecedentes familiares de cáncer de pulmón en un pariente de primer grado.

Las recomendaciones actuales de Freenome son las siguientes:

- Pacientes que tienen ≥ 50 años de edad con antecedentes de tabaquismo de al menos 20 paquetes (equivalente a fumar un paquete de cigarrillos por día durante 20 años).
- Pacientes que tienen entre 40 y 49 años de edad con antecedentes de fumar al menos 20 paquetes anuales y por lo menos un factor de riesgo adicional (consulte la sección de introducción).

El kit de prueba EarlyCDT Lung también se puede utilizar junto con técnicas de diagnóstico por imágenes para evaluar más a fondo el riesgo de cáncer de pulmón que se presenta cuando se han detectado nódulos pulmonares indeterminados pero no han sido diagnosticados como malignos.

4. Limitaciones de uso

Los pacientes con antecedentes de cáncer de cualquier tipo no deben realizar la prueba EarlyCDT Lung. La excepción a esta recomendación es para pacientes con antecedentes de carcinoma de células basales (CCB). Se realizó un estudio y los datos demostraron que el CCB no afecta el resultado de la prueba EarlyCDT Lung (datos archivados en Freenome).

El kit de prueba EarlyCDT Lung no se debe utilizar en pacientes con enfermedades que se sabe que dan como resultado un nivel elevado de proteína sérica total, por ejemplo mieloma, amiloidosis, gammapatía monoclonal de significado indeterminado (GMSI).

5. Principio de la prueba

Los pacientes con cáncer de pulmón pueden presentar una respuesta humoral a su enfermedad⁵⁻⁸ y los autoanticuerpos se han descrito hasta cuatro años antes del diagnóstico clínico en algunos casos⁹⁻¹¹. El kit de prueba EarlyCDT Lung de Freenome es para la detección in vitro de autoanticuerpos en un panel de siete antígenos de cáncer de pulmón (CAGE, GBU4-5, HuD, MAGE A4, NY-ESO-1, p53 y SOX2) que están presentes

desde las primeras etapas del cáncer de pulmón^{3,12}. A partir de las muestras de pacientes con cáncer de pulmón previas al diagnóstico tomadas del ensayo clínico UKCTOCS¹³, se demostró que los niveles de autoanticuerpos detectados por EarlyCDT Lung podrían elevarse hasta 9 años antes del diagnóstico clínico de cáncer de pulmón con un plazo medio de detección de 4 años.¹⁴

El kit de prueba EarlyCDT Lung se realiza como un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) indirecto. Los reactivos proporcionados se usan juntos para la medición del panel de los siete autoanticuerpos descritos anteriormente en hasta diez muestras de pacientes. Las placas se cubren previamente con antígenos asociados a tumores y una proteína de control (control VOL) a dos diluciones: 50 nm y 160 nm, ver figura 1. La muestra diluida del paciente se carga en los pocillos de la placa recubierta y se incuba. Se pueden procesar hasta cinco muestras de pacientes en cada placa suministrada. Después de una serie de etapas de adición, incubación y lavado de reactivos, los autoanticuerpos se detectan finalmente mediante la adición de un reactivo colorimétrico, y la señal resultante se mide usando un lector de placas espectrofotométrico.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
p53	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
SOX2	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
CAGE	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
NY-ESO-1	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
GBU4-5	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
MAGE A4	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
HuD	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
VOL control	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		50nM 160nM		50nM 160nM		50nM 160nM		50nM 160nM		50nM 160nM		50nM 160nM	

Figura 1: Disposición de la placa de microtitulación de EarlyCDT Lung. Una placa completa está recubierta con el mismo AAT, con alternancia entre las proteínas de 50nm y 160nm en cada pocillo. Los pocillos de la fila H están recubiertos con una proteína de control para permitir la corrección de una unión no específica.

6. Reactivos y materiales proporcionados

- Cada kit de prueba EarlyCDT Lung contiene los reactivos enumerados en la tabla 1, que son suficientes para un máximo de diez u ocho pruebas, según el uso:
 - Si ambas placas dentro de un kit se están utilizando al mismo tiempo, entonces se pueden procesar hasta diez muestras de pacientes en total:
 - Cinco muestras de pacientes en la placa 1 junto con el control A y cinco muestras de pacientes en la placa 2 junto con el control B
 - Si las placas del kit se están utilizando en diferentes ocasiones, se pueden procesar hasta ocho muestras de pacientes en total:
 - Cuatro muestras de pacientes en la placa 1, junto con Control A y Control B
 - Cuatro muestras de pacientes en la placa 2, junto con Control A y Control B

- Dado que las placas de microtitulación parcialmente usadas deben desecharse, el uso más eficiente de este kit se logra al procesar cuatro o diez muestras de pacientes al mismo tiempo.
- La fecha de vencimiento del kit se indica en la etiqueta situada en la parte externa de la caja.
- NO use el kit después de la fecha de vencimiento.
- NO use el kit si el precinto está roto al recibirlo y póngase en contacto con EarlyCDT@freenome.com para informar la situación.
- NO use ningún reactivo después de su fecha de vencimiento, ya sea que esté abierto o cerrado.
- NO mezcle reactivos de diferentes lotes de kits.

Tabla 1. Componentes ECDTL2 del kit de prueba EarlyCDT Lung

Número de parte	Componente	Cantidad	Almacenamiento y estabilidad después del primer uso
ECDTL2-SD	Diluyente de Muestras	1 x 27,5 ml	+2 a +8 °C durante 4 semanas
	Una solución salina tamponada con fosfato que contiene 0,1 % de caseína bovina y 0,05 % de ProClin 950.		
ECDTL2-SA	Anticuerpo secundario	1 x 0,27 ml	+2 a +8 °C durante 4 semanas (se refiere a las existencias no diluidas)
	Fracción de inmunoglobina purificada de antisuero de conejo a IgG humana conjugada con peroxidasa de rábano. Se suministra como una solución madre 100 x (aprox. 0,02 g/l) en una solución salina tamponada con fosfato con 0,1 % de caseína bovina.. Contiene 0,05 % Proclin 950.		
ECDTL2-AD	Diluyente de anticuerpo	1 x 27,5 ml	+2 a +8 °C durante 4 semanas
	Una solución salina tamponada con fosfato que contiene 0,1 % de caseína bovina y 0,05 % de ProClin 950.		
ECDTL2-WB	Tampón de lavado (20x)	1 x 55 ml	+2 a +8 °C durante 4 semanas (se refiere a las existencias no diluidas). Diluir antes de usar.
	Solución concentrada de solución salina tamponada con fosfato y Tween 20 al 2 %. Contiene 0,05 % de ProClin 950.		
ECDTL2-MTP	Placas de microtitulación de 96 pocillos	2 placas	Descartar después del primer uso
	Placas de poliestireno de 96 pocillos recubiertas con proteínas humanas recombinantes y caseína bovina. Se suministran secas en una bolsa de aluminio con desecante, estabilizador y conservante.		
ECDTL2-CA	Control A	2 x 1,8 ml	Descartar después del primer uso

	Un conjunto de fluidos humanos en un diluyente de muestra en una concentración de trabajo. Formulados para ser reactivos a antígenos p53, SOX2, CAGE y NY-ESO-1. La concentración relativa de inmunoglobulinas reactivas para cada antígeno (expresada en unidades relativas) viene en el prospecto específico del lote. Contiene 0,1 % Proclin 950. No es necesario volver a diluir.		
	Control B	2 x 1,8 ml	Descartar después del primer uso
ECDTL2-CB	Un conjunto de fluidos humanos en un diluyente de muestra en una concentración de trabajo. Formulados para ser reactivos a antígenos MAGE A4, GBU4-5 y HuD. La concentración relativa de inmunoglobulinas reactivas para cada antígeno (expresada en unidades relativas) viene en el prospecto específico del lote. Contiene 0,1 % Proclin 950. No es necesario volver a diluir.		
ECDTL2-SEAL	Tiras de sellado	4 tiras	Descartar después del primer uso
ECDTL2-SUB	Sustrato	1 x 27,5 ml	+2 a +8 °C durante 4 semanas No exponer a luz solar directa
	Sustrato para peroxidasa de rábano. Contiene una preparación lista para su uso de TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine). No es necesario volver a diluir.		
ECDTL2-SS	Solución quelante	1 x 27,5 ml	+2 a +8 °C durante 4 semanas
	Solución de fluoruro de sodio a 1 g/l. Se entrega listo para usar.		
ECDTL2-USB	Dispositivo USB	1x	+2 a +8 °C o a temperatura ambiente
	Contiene: instrucciones de uso (ECDTL2-IFU); prospecto específico para el lote (ECDT2-LSI), hoja de datos de seguridad de materiales, certificado de análisis y el software de cálculo de resultados para la prueba EarlyCDT Lung.		

7. Equipos, insumos y materiales necesarios pero no suministrados

Para llevar a cabo la prueba EarlyCDT Lung, se necesitan equipos, insumos y materiales adicionales, que no se suministran con el kit. Estos se enumeran en la tabla 2.

Tabla 2. Equipos, insumos y materiales necesarios pero no suministrados

Artículo	Descripción
1. Cilindro de medición graduado	<u>50 ml y 1000 ml</u> : para medir y preparar el tampón de lavado y solución de anticuerpos secundarios.
2. Agua desionizada	Para la preparación del tampón de lavado.
3. Tubo de 50 ml con tapa	Para uso durante la dilución de anticuerpos secundarios.
4. Pipetas	<u>20 µl</u> : para la preparación de muestras de pacientes. <u>Pipeta de 8 canales y 100 µl</u> : para dispensar anticuerpo secundario, sustrato y solución quelante en los pocillos de cada columna de la placa. <u>Atención: Freenome recomienda usar una pipeta electrónica multicanal de 50 - 1200µL si está disponible para dispensar los reactivos.</u> <u>100-1000 µl</u> : para la preparación de anticuerpos secundarios y la dispensación de muestras del paciente. <u>1-5 ml</u> : para muestras de pacientes y dilución de anticuerpos secundarios. Nota: * Todas las pipetas utilizadas deben guardarse y calibrarse para garantizar la precisión de la dispensación..
5. Puntas de pipeta	Adecuadas para dispensar con precisión mediante las pipetas mencionadas anteriormente.
6. Depósitos de reactivos	Se requieren 3 canales limpios, hasta 25 ml de capacidad, para contener el anticuerpo secundario, el sustrato o la solución TMB mientras se pipetea con una pipeta multicanal.
7. Agitador de placas de microtitulación	Con una órbita de agitación de 1,5 a 4,5 mm. Consulte la tabla 3 para saber la velocidad correcta que hay que utilizar en función de la órbita de agitación.
8. Lavadora de placa de microtitulación o botella de lavado	Una botella de lavado dispensadora capaz de contener 0,5 l de solución. O bien, una lavadora de placas automática capaz de realizar 4 ciclos de lavado consecutivos con un volumen de llenado de 300 µl/pocillo.
9. Temporizador	Para garantizar que los pasos de incubación se lleven a cabo de conformidad con el tiempo especificado en el protocolo del ensayo.
10. Papel absorbente	Para eliminar cualquier líquido residual de los pocillos después del lavado.
11. Lector de placas de microtitulación	Con una longitud de onda de lectura de 650 nm y un rango de funcionamiento mínimo de 0-3 OD. <u>Nota</u> : la prueba fue validada sobre un lector de placas Tecan Infinite M200.

12. PC con conexión USB y Microsoft Excel 2007 o posterior

Para calcular el resultado de la prueba mediante el dispositivo USB suministrado con el kit.

Nota: Si el laboratorio que lleve a cabo la prueba EarlyCDT Lung implementa cualquier automatización de equipos, dicha automatización debe ser validada según los procedimientos del sistema de gestión de la calidad.

Tabla 3. Velocidad de agitación en función de la órbita de agitación

Órbita de agitación (mm)	Velocidad (RPM)
1,5-2,0	600
2,5-3,0	500
3,5-4,5	400

8. Estabilidad y almacenamiento

El kit de prueba EarlyCDT Lung es estable hasta la fecha de vencimiento indicada en la etiqueta de la caja si los reactivos se almacenan según las recomendaciones, entre +2 y +8 °C.

Los reactivos del kit que estén sin abrir se deben almacenar como se indica en el envase del reactivo individual y permanecen estables tal como se suministraron hasta la fecha de vencimiento del kit. Una vez abierto, cada reactivo es estable durante el tiempo indicado en la tabla 1.

No se deberían usar los kits ni sus componentes que no hayan sido almacenados según las condiciones indicadas anteriormente.

9. Indicaciones de inestabilidad

El sustrato debe ser incoloro. Un color azul indica que el reactivo puede haberse contaminado y debería descartarse.

10. Precauciones de seguridad

Para uso en diagnóstico in vitro:

- Los productos sanguíneos son potencialmente infecciosos y deben manipularse, almacenarse y desecharse de acuerdo con las normas locales en materia de riesgo biológico.
- Los reactivos de control suministrados con este kit son de origen humano. Han sido probados y se ha comprobado que no son reactivos para anticuerpo del VIH-1/2, anticuerpo de la hepatitis C (VHC) y antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg). Dado que ningún método puede descartar por completo la presencia de patógenos transmitidos por la sangre, la manipulación y eliminación de los reactivos de control de este kit debe realizarse como si fueran potencialmente infecciosos.
- La hoja de datos de seguridad de materiales (HDSM) proporciona información detallada relacionada con la correcta eliminación, el manejo y los peligros que están asociados con el kit de prueba EarlyCDT Lung. La HDSM se proporciona en el dispositivo USB suministrado con el kit y también está disponible en Freenome (teléfono: +44 (0) 115 784 0501 o correo electrónico: EarlyCDT@freenome.com).

Los componentes siguientes: Anticuerpo secundario, tampón de lavado, muestra y diluyente del anticuerpo, Control A, Control B y placas de microvaloración de 96 pocillos se clasifican como sensibilizantes cutáneos (categoría 1A) y pueden provocar una reacción alérgica en la piel. Se debe utilizar equipo de protección personal (EPP) adecuado al manipular estos componentes. Para más información, consulte las Hojas de datos de seguridad suministradas.

11. Recolección, manipulación y almacenamiento de muestras

El kit de prueba EarlyCDT Lung está diseñado para usarse con suero o plasma humano, recolectado en uno de los siguientes tubos:

- Suero: ya sea activador de coágulos o tubos de gel.
- Plasma: recolectado mediante tubos EDTA.
- Nota: El plasma recolectado en tubos de heparina y citrato no debe usarse.

Recolecte sangre mediante venopunción o punción digital y procésela de acuerdo con las instrucciones del fabricante del tubo de recolección para separar el suero o el plasma del material celular y coagulado. Las muestras de sangre total deben almacenarse a temperatura ambiente (+18 a +25 °C) y procesarse dentro de cuatro días. Si las muestras de suero o plasma no serán analizadas inmediatamente, se pueden almacenar a cualquiera de las opciones: +2 a +8 °C durante 14 días o entre -25 °C y -15 °C o a -85 a 65 °C durante hasta 12 meses. Las muestras no deben someterse a más de 5 ciclos de congelación y descongelación. Lleve las muestras congeladas a temperatura ambiente y mezcle bien invirtiéndolas suavemente antes del análisis.

12. Protocolo de ensayo

Notas de ensayo y precauciones para leer ANTES de iniciar un ensayo con el kit de prueba EarlyCDT Lung



Asegúrese de que el ensayo se realice a +18 a +22 °C y de que todos los reactivos se encuentren a esta temperatura antes de su uso.



Cada etapa de incubación cronometrada debe realizarse exactamente durante el tiempo establecido. Tan pronto como se llena una placa, se debe iniciar un temporizador.



Todo el equipo utilizado debe mantenerse, calibrarse y validarse adecuadamente para garantizar el correcto funcionamiento.



Asegúrese de que los reactivos no se mezclen utilizando depósitos limpios para cada reactivo.



No use el kit si el precinto está roto al recibirlo.



No use ningún reactivo del kit si está dañado, parece tener pérdidas o está abierto.



No almacene reactivos en envases que no sean aquellos en los que fueron recibidos.



El kit de prueba EarlyCDT Lung ha sido desarrollado para el uso por parte de un técnico de laboratorio competente* en el ámbito de un laboratorio. Asegúrese de que comprende íntegramente el protocolo antes de comenzar un ensayo.



Deseche las soluciones, especialmente aquellas que contengan material biológico, de acuerdo con las normas locales de eliminación.



Compruebe el contenido del kit y compárelo con el listado incluido en la tabla 1 para confirmar que están presentes todos los componentes necesarios.



La información del paciente se puede ingresar en el software entregado con este dispositivo. Los usuarios deben asegurarse de que el hardware de la computadora que se use para ejecutar el software del kit disponga de las medidas de seguridad y acceso adecuadas para cumplir con los requisitos locales de protección de datos del paciente, en particular, el control del acceso de los usuarios, tanto físico como electrónico. El software del kit se puede utilizar sin necesidad de acceder a la red informática.



No se puede garantizar la confiabilidad de los resultados de los ensayos si hay alguna desviación del protocolo previsto en este documento.

Si el precinto está roto al momento de recibir el producto, el kit o los componentes se han almacenado fuera del rango indicado, o si los reactivos están dañados o tienen pérdidas, póngase en contacto con el servicio al cliente de Freenome por teléfono al +44 (0) 115 784 0501 o envíe un correo electrónico a EarlyCDT@freenome.com para obtener asistencia.

*Un técnico de laboratorio competente se define como un individuo que tiene experiencia en ejecutar ensayos ELISA, que está capacitado y es competente para llevar a cabo procedimientos generales de laboratorio, como preparar tampones y usar las pipetas y ser capaz de seguir meticulosamente las instrucciones.

Paso 1: Preparación de reactivos y muestras

 Lea las notas importantes a continuación asociadas con este paso.

- a) Registre el número de LOTE indicado en la etiqueta de la caja del kit y los números de identificación de sus muestras en la tabla 4 a continuación:

Número de LOTE del kit: _____ (esto será necesario si se usa el software de cálculo de resultados)

Tabla 4: ID de muestra

Placa 1	ID de muestra	Placa 2	ID de muestra
Muestra 1		Muestra 6	
Muestra 2		Muestra 7	
Muestra 3		Muestra 8	
Muestra 4		Muestra 9	
Muestra 5		Muestra 10	

- b) Retire todos los componentes de la caja del kit y deje que se equilibre a +18 a+22 °C durante al menos dos horas antes de usar.
- c) Dependiendo del número de placas que se usen en el ensayo, prepare los reactivos del ensayo y las muestras del paciente como se detalla en la tabla 5:

Tabla 5: Preparación de los reactivos del ensayo

Preparación	Ensayo de 1 placa (Máx. 4 muestras)	Ensayo de 2 placas (Máx. 10 muestras)
Tampón de lavado	Mezcle 25 ml de tampón de lavado (ECDTL2-WB) con 475 ml de agua desionizada	Mezcle 50 ml de tampón de lavado (ECDTL2-WB) con 950 ml de agua desionizada
Anticuerpo secundario	Mezcle 0,12 ml de anticuerpo concentrado (ECDTL2-SA) con 12 ml de diluyente de anticuerpo (ECDTL2-AD)	Mezcle 0,24 ml de anticuerpo concentrado (ECDTL2-SA) con 24 ml de diluyente de anticuerpo (ECDTL2-AD)
Muestra del paciente	Mezcle 20 µl de muestra del paciente con 2,2 ml de diluyente de muestra (ECDTL2-SD)	

- d) Retire una o ambas placas de microtitulación de sus bolsas de aluminio (número de parte: ECDTL2-MTP), dependiendo del número de muestras de pacientes



Paso 1. Notas importantes:

- Debido a la alta concentración de sal en el tampón de lavado suministrado, es posible que se genere una cristalización. Si esto sucede, simplemente caliéntelo antes de usar para volver a disolver las sales, ya sea colocando

la botella directamente en un baño de agua a 37 °C o sosteniendo la botella cerrada en agua tibia hasta que la cristalización ya no sea visible.

- Se recomienda centrifugar brevemente el vial del conjugado de anticuerpo secundario concentrado durante 5 segundos con una microcentrifuga o golpear el vial en el banco de pruebas para extraer cualquier contenido que pueda haber quedado atrapado en la tapa del vial durante el transporte.
- Diluir el conjugado de anticuerpos secundarios concentrado en un tubo de 50 ml y tapar. Mezclar por inversión 5 veces antes de usar.
- Invierta las muestras y los controles del paciente varias veces para mezclar antes de usar.
- Asegúrese de utilizar una punta de pipeta limpia para manipular cada muestra o control del paciente.
- Almacene los reactivos y las muestras diluidas a temperatura ambiente el día de uso; de lo contrario, almacénelos a +2 a +8 °C.
- Asegúrese de que las placas estén a temperatura ambiente antes de abrir la bolsa de aluminio.

Paso 2: Control e incubación de muestras de pacientes

- Asegúrese de que las placas estén orientadas para que el pocillo A1 esté en la esquina superior izquierda.
- Dependiendo de la cantidad de placas que se usen en su ensayo, agregue el control del kit y la muestra del paciente a la placa 1 y/o 2, de la siguiente manera:

Ensayo de 1 placa

- Siguiendo el diseño de la Placa en la figura 2 1 a continuación, eche 100 µl de Control A (tapa ROJA, número de parte: ECDTL2-CA) en cada pocillo de las columnas 1 y 2.
- Eche 100 µl de Control B (tapa AZUL, número de parte: ECDTL2-CB) en cada pocillo de las columnas 3 y 4.
- Eche 100 µl de muestra de paciente diluida 1 en cada pocillo de las columnas 5 y 6. REPITA la operación para las muestras de pacientes 2, 3 y 4 como se muestra para la Placa 1.
- Tan pronto como la placa se haya llenado, inicie un temporizador durante 90 minutos. Ir al paso c).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
p53	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
SOX2	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
CAGE	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
NY-ESO-1	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
GBU4-5	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
MAGE A4	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
HuD	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
VOL control	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		Control A		Control B		Specimen 1		Specimen 2		Specimen 3		Specimen 4	

Figura 2: Diseño de la placa cuando se utiliza una microplaca en un ensayo.

Ensayo de 2 placas

- i. Siguiendo el diseño de la Placa 1 en la figura 3 a continuación, eche 100 µl de Control A (tapa ROJA, número de parte: ECDTL2-CA) en cada pocillo de las columnas 1 y 2.
- ii. Eche 100 µl de muestra de paciente diluida 1 en cada pocillo de las columnas 3 y 4. REPITA la operación para las muestras de pacientes 2, 3, 4 y 5 como se muestra para la Placa 1.
- iii. Tan pronto como se haya llenado la Placa 1, inicie un temporizador durante 90 minutos.
- iv. Siguiendo el diseño de la Placa 2 en la figura 4 a continuación, eche 100 µl de Control B (tapa AZUL, número de parte: ECDTL2-CB) en cada pocillo de las columnas 1 y 2.
- v. Eche 100 µl de muestra de paciente diluida 6 en cada pocillo de las columnas 3 y 4. REPITA la operación para las muestras de pacientes 7, 8, 9 y 10 como se muestra para la Placa 2.
- vi. Tan pronto como se haya llenado la Placa 2, inicie otro temporizador durante 90 minutos. Ir al paso c).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
p53	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
SOX2	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
CAGE	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
NY-ESO-1	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
GBU4-5	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
MAGE A4	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
HuD	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
VOL control	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		Control A		Specimen 1		Specimen 2		Specimen 3		Specimen 4		Specimen 5	

Figura 3: Diseño de la placa 1 cuando ambas placas de microtitulación suministradas con un solo kit se utilizan al mismo tiempo.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
p53	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
SOX2	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
CAGE	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
NY-ESO-1	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
GBU4-5	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
MAGE A4	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
HuD	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
VOL control	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		Control B		Specimen 6		Specimen 7		Specimen 8		Specimen 9		Specimen 10	

Figura 4: Diseño de la placa 2 cuando ambas placas de microtitulación suministradas con un solo kit se utilizan al mismo tiempo.

- c) Una vez que las muestras de reactivos de control y muestras de paciente se hayan agregado a la(s) placa(s) de microtitulación, cubra cada placa con una película de sellado (número de parte: ECDDL2-SEAL); al hacerlo, procure que la película de sellado cubra adecuadamente todos los pocillos en la placa.
- d) Coloque la placa cubierta en un agitador de placa de microtitulación a la velocidad de agitación adecuada (consulte la tabla 3), incube durante un total de 90 minutos (según el temporizador ya iniciado) a +18 a+22 °C.
 - Si su agitador de placas no tiene una configuración de velocidad, use una velocidad de agitación "moderada", es posible que haya que ajustarla según sea necesario.

Paso 3: Adición secundaria de anticuerpos

- a) Retire con cuidado la película de sellado de cada placa y vacíe el contenido de los pocillos en un contenedor de residuos biológicos adecuado. Golpee ligeramente sobre papel absorbente para eliminar todo el líquido.
- b) Usando una botella dispensadora, llene todos los pocillos con tampón de lavado preparado y luego vacíelos en un contenedor de desechos biológicos adecuado. Golpee firmemente la placa sobre papel absorbente para eliminar todo el líquido de los pocillos.
 - REPITA todo este paso de lavado otras tres veces.
 - Si utiliza una lavadora de placas automática, ejecute un lavado de cuatro ciclos (300 µl/pocillo) usando el tampón de lavado suministrado con el kit.
- c) Usando una pipeta de 8 canales, dispense 100 µl de solución de trabajo de anticuerpo secundario en cada pocillo de la placa; dispense en cada columna secuencialmente (es decir, 1, 2, 3, 4, etc.).
- d) Tan pronto como una de las placas se haya llenado, inicie un temporizador durante 60 minutos.
- e) Cubra cada placa y colóquela en un agitador de placa. Incube durante 60 minutos (según el temporizador ya iniciado) a +18 a+22 °C a la velocidad de agitación adecuada

Paso 4: Adición de sustrato

⚠ Lea las notas importantes a continuación asociadas con este paso

- a) Retire con cuidado la película de sellado de cada placa y vacíe el contenido de los pocillos en un contenedor de residuos biológicos adecuado. Golpee ligeramente sobre papel absorbente para eliminar todo el líquido.
- b) Usando una botella dispensadora, llene todos los pocillos con tampón de lavado preparado y luego vacíelos en un contenedor de desechos biológicos adecuado. Golpee firmemente la placa sobre papel absorbente para eliminar todo el líquido de los pocillos.
 - REPITA todo este paso de lavado otras tres veces.
 - Si utiliza una lavadora de placas automática, ejecute un lavado de cuatro ciclos (300 µl/pocillo) usando el tampón de lavado suministrado con el kit.
- c) Usando una pipeta de 8 canales, dispense 100 µl de sustrato (número de parte: ECDDL2-SUB) en cada pocillo de la placa; dispense en cada columna secuencialmente (es decir, 1, 2, 3, 4, etc.).
- d) **Inmediatamente** después de dispensar el sustrato en los 96 pocillos de la primera placa, inicie un temporizador durante 15 minutos y deje incubar la placa a +18 a+22 °C en la oscuridad.
- e) Al final de la incubación de 15 minutos, golpee ligeramente el costado de la(s) placa(s) durante aproximadamente 10 segundos para asegurarse de que el color que se ha desarrollado dentro de cada pocillo sea homogéneo, es decir, que no haya aglutinación visible.



Paso 4. Notas importantes:

- Es muy importante que el sustrato no se deje incubar durante más de 15 minutos.
- Asegúrese de que la exposición a la luz sea lo más limitada posible durante la incubación de 15 minutos a +18 a +22°C.

Paso 5: Adición de solución quelante

- a) Agregue 100 µl de solución quelante (número de parte: ECDTL2-SS) a cada pocillo, en el mismo orden en que se agregó el sustrato.
 - Nota: no habrá un cambio de color visible cuando se agregue la solución quelante.
- b) La placa de microtitulación se puede leer inmediatamente después de agregar la solución de detención. Para leer la placa continúe con el Paso 6.
 - Nota: las placas se pueden dejar durante un máximo de 30 minutos a +18 a +22 °C antes de la lectura.

Paso 6: Medición espectrofotométrica



Lea las notas importantes a continuación asociadas con este paso.

- a) Inserte la primera placa de microtitulación en un lector de placas, asegurándose de que el pocillo A1 esté ubicado en la esquina superior izquierda.
- b) Mida espectrofotométricamente la densidad óptica de cada pocillo de la placa de microtitulación a una longitud de onda de 650nm.
- c) Exporte los valores de densidad óptica (DO) obtenidos a un archivo de Excel para el cálculo del resultado de la prueba.



Paso 6. Notas importantes:

- No lea la placa con una longitud de onda distinta de 650nm
- Si se requiere una longitud de onda de referencia, recomendamos usar 480nm

Paso 7: Cálculo de resultados de la prueba



Lea las notas importantes a continuación asociadas con este paso.

- a) Inserte el dispositivo USB (número de parte: ECDTL2-USB) en una PC y abra el archivo "Ensayo de 2 placas" o "Ensayo de 1 placa", dependiendo de cuántas placas se hayan procesado.
- b) Dentro de la pestaña "Paso 1. Entrada de datos", haga lo siguiente:
 - Ingrese el número de LOTE del kit en el campo "Introduzca el LOTE del kit" (vea la figura 5 [A]).
 - Ingrese la fecha del ensayo en el campo "Introduzca la fecha del ensayo" (consulte la figura 5 (A)).
 - Ingrese una identificación para cada muestra en el campo apropiado (vea la figura 5 [B]).
 - Ingrese los valores de DO del archivo de Excel generado en el paso 6 en los campos apropiados (vea la figura 5 [C]).
- c) Dentro de la pestaña "Paso 2. Información del paciente", ingrese toda la información relevante del paciente.
- d) Seleccione la pestaña "Paso 3a. Resultados", para ver el resultado de la prueba EarlyCDT Lung para cada paciente.

- e) Seleccione las pestañas "Paso 3b. Informe del paciente", para imprimir un informe de prueba para cada paciente.
- Para obtener información sobre lo que significa el resultado de la prueba, consulte la sección "Interpretación de resultados", tabla 6, dentro de estas instrucciones de uso, o bien consulte la información provista en el informe de prueba del paciente.

EarlyCDT[®]—Lung

ENTER KIT LOT: (A)

ENTER ASSAY DATE:

User input fields

Test Kit result calculation (ONE plate format)

Important: This test result calculation file should be used in accordance with Step 6 of the Assay protocol within the IFU.

Plate 1	Enter an ID for your sample:	PLATE 1											
Sample 1	<input type="text"/>												
Sample 2	<input type="text"/>												
Sample 3	<input type="text"/>												
Sample 4	<input type="text"/>												

Sample ID	Control A	Control B	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
p53	A					
SOX2	B					
CAGE	C					
NY-ESO-1	D					
GBU4-5	E					
MAGE A4	F					
HuD	G					
VDL	H					

Step 1. Data Input | Step 2. Patient Information | Step 3a. Results | Step 3b. Patient Report | Step 3b. Patient Report (nb) | Step 3b1. Patient Report 1

Figura 5. La página de inicio del software de cálculo de resultados del kit de prueba EarlyCDT Lung. (A) Se debe ingresar el número de LOTE del kit correcto para usar el software. (B) Se deben registrar las identificaciones de las muestras. (C) Los datos de DO exportados se ingresan en los campos relevantes.



Paso 7. Notas importantes:

- El software cargado en el dispositivo USB es específico para cada LOTE de kits de prueba EarlyCDT Lung. Por lo tanto, debe asegurarse de que se use el dispositivo USB que viene con el kit para calcular el resultado. Si no se utiliza el software correcto, se obtendrá un resultado de prueba incorrecto. El número de LOTE del kit se indica en la etiqueta ubicada en la parte externa de la caja del kit.

13. Cálculo e interpretación de los resultados

Para usar el kit de prueba EarlyCDT Lung no es necesario hacer cálculos manuales, ya que se automatizan dentro del software suministrado en la memoria USB dentro del kit.

El kit de prueba EarlyCDT Lung está diseñado para uso profesional y los resultados analíticos deben ser interpretados por profesionales médicos calificados en combinación con toda la demás información clínica disponible. Un resultado moderado o alto indica que el riesgo del paciente de tener cáncer de pulmón es mayor que el previsto para su sexo, edad, antecedentes de tabaquismo y otros factores de riesgo solamente. Los cálculos del aumento del riesgo después de un resultado positivo moderado o alto se tabulan al final del informe del paciente (el aumento es mayor después de un resultado positivo alto que de un resultado positivo moderado). Los cálculos se realizaron a partir de la adición de una

prueba de diagnóstico a un riesgo de referencia utilizando la razón de probabilidad de diagnóstico¹⁵. El mayor riesgo puede justificar una recomendación para realizar pruebas adicionales, que podrían incluir imágenes por TC. Un resultado negativo en la prueba indica que no ha cambiado el riesgo del paciente de tener cáncer de pulmón. Por lo tanto, sigue siendo aplicable todo cálculo del riesgo de cáncer de pulmón realizado antes de la prueba, únicamente en función de los factores de riesgo. En la Tabla 5, se proporciona una descripción de los resultados de las pruebas y los términos que pueden mostrarse dentro del software del kit.

Tabla 6: Descripción de los términos utilizados para los resultados de la prueba en el software del kit

Rango de aceptación de control de calidad

Los controles utilizados con el kit tienen un rango de aceptación que se define en el "Prospecto específico del lote" incluido en el dispositivo USB suministrado con el kit.

Resultado del control	Descripción
Control de calidad (QC) aprobado	Los datos de control se encuentran dentro del rango de aceptación.
Control de calidad (QC) rechazado	Los datos de control están fuera del rango de aceptación y la prueba debe repetirse. Esto puede deberse a una variedad de razones. Para obtener asistencia técnica, póngase en contacto con Freenome en la siguiente dirección: EarlyCDT@freenome.com

Resultado de la prueba	Descripción
Alto ("high")	Uno o más autoanticuerpos en el panel EarlyCDT Lung están por encima del valor de corte superior. El aumento del riesgo es por demás significativo y es probable que influya en el curso de tratamiento del paciente.
Moderado ("moderate")	Uno o más autoanticuerpos en el panel EarlyCDT Lung están por encima del valor de corte inferior, pero todos están por debajo del valor de corte superior. El aumento del riesgo es significativo y podría ser suficiente como para influir en el curso de tratamiento del paciente.
No se detectó ningún nivel significativo de autoanticuerpos ("no significant level of autoantibodies detected")	Todos los autoanticuerpos en el panel EarlyCDT Lung están por debajo del valor de corte menor. Nota: un resultado de prueba de "No se detectó ningún nivel significativo de autoanticuerpos" indica una menor probabilidad de cáncer de pulmón que un resultado positivo; sin embargo, eso no significa que el paciente no tenga o no vaya a desarrollar cáncer de pulmón en el futuro. Para ser elegible para la prueba, el paciente ya tiene un riesgo elevado de cáncer de pulmón según lo pronosticado mediante la edad, el sexo, los antecedentes de tabaquismo y otros factores de riesgo. Este resultado no descarta por completo la presencia de cáncer de pulmón ni cambia la influencia de estos factores en el riesgo del paciente.

Inválido ("invalid")

No se puede determinar un resultado para este autoanticuerpo. Todos los demás autoanticuerpos siguen siendo válidos. Si una placa o muestra particular no aprueba las verificaciones de control de calidad (QC), el resultado de la prueba para la(s) respectiva(s) muestra(s) del paciente será "Inválido" y se deberá repetir la prueba EarlyCDT Lung para esa(s) muestra(s). Para obtener asistencia técnica, póngase en contacto con Freenome en la siguiente dirección: EarlyCDT@freenome.com

14. Resumen de los resultados del estudio clínico

La prueba EarlyCDT Lung se validó clínicamente en cuatro estudios de control de casos separados, que abarcaron un total de 1153 pacientes con cáncer de pulmón y 937 controles normales⁴. Los casos y los controles se cotejaron según edad, sexo y antecedentes de tabaquismo. Se ha demostrado que la sensibilidad clínica y la especificidad de la actual prueba con dos estratos (negativo y positivo) de siete autoanticuerpos fueron del 35 % y del 91 %, respectivamente y los cocientes de probabilidad del diagnóstico también se calcularon: 3,81 en el caso del positivo (DLRp) y 0,72 en el negativo (DLRn). En un examen médico (1 % de prevalencia), la precisión fue del 90 %. El valor predictivo positivo (VPP) fue de un 3.7 % mientras que el valor predictivo negativo (VPN) fue del 99,3 %. En un contexto nodular (25 % tasa de malignidad), la precisión fue del 78 %. El VPP fue 55,3 % y el VPN, 80,6 %. También se calcularon las características semiológicas evaluando la positividad mediante tres estratos (negativo, positivo moderado y positivo elevado); la sensibilidad y la especificidad fueron del 14 %, del 94 % para los positivos moderados y del 21 % y 97 % para los positivos elevados. Los DLRp y DLRn fueron 2.1 y 8.7 y 0.9 y 0.8 respectivamente. En un escenario de examen médico (1 % de prevalencia) el VPP fue del 2,0 % para el nivel positivo moderado y de un 8,0 % para los positivos elevados. El VPN respectivo fue del 99,1 % y 99,2 % y la precisión, del 92,7 % y del 96,2 %. En el contexto nodular (25 % tasa de malignidad), el VPP fue del 40,6 % para el nivel moderado y del 70.9 % para los positivos elevados. El VPN respectivo fue del 76,4 % y del 78,7 % mientras que la precisión fue del 73,5 % y el 78,0 %.

Desde entonces, estas conclusiones han sido confirmadas en ocho grupos de pacientes que sumaron un total de 451 pacientes con cáncer de pulmón y 8831 pacientes normales en ámbitos del mundo real. También se demostró que la sensibilidad y especificidad del dispositivo es independiente del estadio o grado del cáncer de pulmón y se mantuvo para el estadio inicial y tardío del cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas.⁴

En una auditoría de los resultados clínicos de 1613 pacientes estadounidenses con alto riesgo de cáncer de pulmón, cuyo médico ordenó la prueba EarlyCDT Lung, el rendimiento (sensibilidad, especificidad y precisión general) fue consistente con los datos de validación. En la ronda de prevalencia, más del 50 % de los cánceres detectados por una prueba positiva fueron enfermedad en fase inicial¹⁶.

Una auditoría aparte del mismo grupo de pacientes identificó a 269 pacientes con nódulos pulmonares no calcificados identificados por un radiólogo dentro de los seis meses posteriores a la prueba EarlyCDT Lung. De este grupo, 52 pacientes tuvieron cáncer de pulmón, mientras que los nódulos identificados en los otros 217 pacientes fueron benignos. En general, una prueba EarlyCDT Lung positiva se asoció con un riesgo 2,2 veces mayor de cáncer de pulmón, y para los pacientes con nódulos de un tamaño que oscila entre 4 y 20 mm (los que tienen más probabilidades de curarse), el riesgo relativo de cáncer de pulmón fue 2,7 veces mayor¹⁴. También se demostró la aditividad a los modelos de riesgo basados en nódulos de Gould, Brock y Swensen de los nódulos de 4 a 20 mm.¹⁷

El kit de prueba EarlyCDT Lung se validó clínicamente frente a la prueba EarlyCDT PDL en dos estudios de control de casos, el primero con un total de 236 casos (C) y 236 controles normales (N), divididos en fases de instrucción (154C/154N) y validación (82C/82N) y un segundo estudio más amplio con un total de 366 casos de cáncer y 472 controles normales, también divididos en fases de instrucción (163C/163N) y validación (203C/309N) con el fin de confirmar la similaridad entre la PDL y el kit y para determinar los cortes de diagnóstico del kit. El kit EarlyCDT Lung se ejecutó de forma equivalente a la prueba EarlyCDT Lung PDL, con una concordancia superior al 90 %.

Hay un cambio significativo hacia la detección en etapa temprana con la prueba EarlyCDT Lung. A los dos años, el ensayo clínico ECLS en Escocia demostró una reducción significativa en la detección en etapa tardía en el grupo de intervención EarlyCDT Lung en relación con el grupo de Control (atención estándar)¹⁶. En el grupo de intervención, 33 de 56 (58,9%) cánceres de pulmón se diagnosticaron en estadio III/IV en relación con 52 de 71 (73,2%) en el grupo de control (37 % reducción en etapa tardía). El cociente de riesgo de la presentación en estadio III/IV fue de 0,64 (IC del 95%: 0,41 a 0,99).¹⁸

15. Trazabilidad metrológica

EarlyCDT es un ensayo funcional que genera valores absolutamente específicos del sistema de medición ELISA en particular. No se dispone de materiales de referencia externos con potencia asignada para los autoanticuerpos utilizados en EarlyCDT. Por lo tanto, no se puede asignar potencias absolutas a los materiales del calibrador del ensayo ni al resultado del ensayo en sí. Esto implica la imposibilidad de preparar materiales experimentales de concentración conocida para estudios de veracidad, recuperación o sesgo. Asimismo, no se dispone de un ensayo funcional alternativo de los títulos de los autoanticuerpos para efectuar una comparación directa con el ELISA EarlyCDT. En lugar de patrones de referencia externos, se ha empleado un sistema de calibración en relación con las muestras humanas cuyo contenido de anticuerpos correspondientes a cada analito medido por el dispositivo se ha determinado a ciencia cierta. Cada kit de prueba EarlyCDT Lung viene con controles de calidad que el usuario ejecuta junto con los sueros de los pacientes en cada uso. Estos controles (A y B) son muestras combinadas de sueros y fluidos pleurales formulados de modo tal que contengan niveles calificables de cada analito medidos por el dispositivo, con un rango de aceptación que se determina durante el control de calidad del lote. Los niveles de analito de los controles deben quedar comprendidos en ese rango en cada ejecución; de lo contrario, el resultado de la prueba no será válido. Si los controles quedan fuera del rango de aceptación, esto implica que el rendimiento del dispositivo no cumple con las especificaciones y se debe repetir el análisis.

16. Metodología matemática

Las DO brutas se corrigen primero en función de la unión no específica sustrayendo el resultado de VOL respectivo y luego se calibran contra unidades relativas (UR) a partir de curvas estándar predeterminadas específicas del antígeno. Las curvas estándar se formaron trazando las DO observadas frente a una serie de diluciones de fluidos calibradores y luego, ajustando modelos logísticos de cuatro parámetros por regresión no lineal. La conversión de las OD observadas en las UR predichas se calcula usando las fórmulas inversas de la curva estándar respectiva. A cada nuevo lote se le aplica una corrección de potencia. Dentro de cada lote, las curvas estándar permanecen fijas.

17. Intervalos de referencia

En el estado de enfermedad, se estima que los niveles de autoanticuerpos estén elevados en un antígeno, por lo menos, en una proporción de sujetos. La decisión sobre la

positividad de esta elevación no se toma en función de los rangos de referencia, sino más bien en relación con valores de corte optimizados específicos del antígeno. Por lo tanto, no se presentan rangos de referencia ni valores esperados en poblaciones normales o afectadas, para evitar confusiones en cuanto al significado de “positividad”.

18. Características de la ejecución del ensayo

Precisión y veracidad (sesgo)

En el caso de los analitos sin materiales de referencia certificados ni procedimientos de medición de referencia, no es posible demostrar la precisión ni la veracidad. Dado que no se dispone de normas externas o de materiales de referencia para el ensayo, estas características no se aplican y no se pueden determinar.

Precisión

Para determinar la precisión, se analizaron siete muestras de suero que contenían señales de autoanticuerpos positivas; el procedimiento se repitió seis veces en la misma placa y cada placa que se procesó dos veces al día (kits distintos) en seis días distintos. La repetibilidad de o precisión intraensayo de cada medición de autoanticuerpos se determinó en función de la variación entre las repeticiones de cada misma muestra en la misma placa (y por ende, en el mismo kit y el mismo día). Los coeficientes de variación (CV) para la precisión intraensayo, basados en la variación entre todas las repeticiones dentro del mismo día, y agrupados entre todas las placas durante los seis días, se muestran en la tabla 7.

La precisión intermedia o intraensayo se determinó en función de la variación entre los kits y las placas ejecutadas a lo largo de varios días, en las mismas muestras. Los CV, basados en la variación entre todas las repeticiones dentro del mismo día, se indican en la Tabla 8.

Se determinó la precisión de los controles A y B en cada lote y se suministra con cada kit.

Tabla 7: Precisión intraensayo

Autoanticuerpo	50 nM		160 nM	
	DO promedio	CV%	DO promedio	CV%
p53	1,116	10,3	1,735	3,1
SOX2	2,443	3,1	2,782	2,4
CAGE	2,133	4,9	1,568	11,7
NY-ESO-1	3,046	1,4	3,039	1,3
GBU4-5	1,133	7,9	1,462	3,4
MAGE A4	1,418	4,0	1,723	2,1
HuD	1,352	12,9	2,073	2,4

Tabla 8: Precisión interensayo

Autoanticuerpo	50 nM		160 nM	
	DO promedio	CV%	DO promedio	CV%
p53	1,116	13,1	1,735	4,2
SOX2	2,443	3,8	2,782	3,1
CAGE	2,133	5,1	1,568	12,4
NY-ESO-1	3,046	3,3	3,039	3,6

GBU4-5	1,133	11,5	1,462	5,1
MAGE A4	1,418	5,6	1,723	3,3
HuD	1,352	12,9	2,073	4,5

Rango de medición y límites de cuantificación

Se determinó que el rango de medición de los autoanticuerpos del dispositivo corresponde a casi el 7,5% del máximo de la curva del calibrador en los límites inferiores de cuantificación. Se determinó que los límites superiores de cuantificación rondaron el 92,5% del máximo de la curva del calibrador o una DO de 3,0, lo que fuera más bajo, en los 7 autoanticuerpos medidos por el dispositivo. Por otro lado, se determinó que los puntos de corte moderados y altos quedaron comprendidos dentro los límites de cuantificación en todos los anticuerpos que detecta el dispositivo. Sin embargo, la calibración depende de cada lote (véase la sección 16 “Metodología matemática” más arriba), al igual que los límites exactos de cuantificación y rango de medición. Por lo tanto, se calculan en cada lote y se entregan con cada kit.

Los resultados fuera de este rango se clasifican en el registro como valores por debajo o por encima del límite de cuantificación. De todos modos, estos valores se deben evaluar en los resultados de la prueba y se indican con la siguiente frase: “No se detectaron niveles significativos de autoanticuerpos” o “Alto”, respectivamente.

Sensibilidad analítica, límites de detección y límites de blanco

Dado que no materiales dispone de materiales de referencia independientes de concentración conocida de autoanticuerpos para este ensayo, no es posible evaluar la sensibilidad analítica.

Límite de detección (LD): concentración más baja de analito que se puede detectar de manera consistente, aunque no necesariamente cuantificar, en condiciones normales de laboratorio clínico, en muestras comunes.

Límite de blanco (LB): resultado de medición más alto observable según la probabilidad establecida para muestras en blanco.

Se determinaron el LD y LB de cada autoanticuerpo en cada concentración del antígeno correspondiente usado en la prueba, los cuales se indican en la tabla 9. Todos los valores se ubicaron sustancialmente por debajo de los valores de corte respectivos, también indicados

Tabla 9: Límites de detección y límites de blanco

Autoanticuerpo	Concentración de antígeno (nM)	LB (UR)	LD (UR)	Corte moderado (UR)	Corte alto (UR)
p53	50	0.88	1.51	3.58	4.652
	160	1.85	2.49	5.50	6.049
SOX2	50	0.87	1.51	6.62	6.785
	160	2.21	2.88	7.82	8.146
CAGE	50	0.65	1.32	4.46	4.570
	160	-0.54	0.13	3.73	4.181
NY-ESO-1	50	-1.25	-0.61	3.01	3.158
	160	-1.86	-1.26	2.40	3.252

GBU4-5	50	1.24	1.91	5.27	5.593
	160	-0.03	0.60	2.82	4.357
MAGE A4	160	1.22	2.05	4.94	5.101
HuD	160	4.42	4.96	8.43	9.703

Linealidad

Las muestras que se sabe que contienen altos niveles de autoanticuerpos específicos para uno o más de los antígenos del panel EarlyCDT Lung se diluyeron en serie en tampón de ensayo y se analizaron usando el protocolo EarlyCDT Lung descrito anteriormente. Suponiendo que la dilución más baja de las muestras sea del 100 %, la dilución prevista de la muestra se trazó frente a la dilución conocida. Los coeficientes de pendiente y de correlación (R^2) para la muestra de señal representativa se presentan en la tabla 10. Todos están dentro de la especificación con pendientes de entre 0,9 y 1,1 y coeficientes de correlación de $R^2 > 0,90$.

Tabla 10: Linealidad de la prueba EarlyCDT Lung a través de dilución

Auto anticuerpo	Placa	Antígeno a 50 nM			Antígeno a 160 nM		
		Interceptación	Gradiente	R^2	Interceptación	Gradiente	R^2
p53	Placa 1	-0,049	0,998	0,979	-0,033	1,000	0,991
p53	Placa 2	-0,036	1,018	0,994	0,030	1,015	0,987
SOX2	Placa 1	-0,040	1,001	0,987	-0,024	1,002	0,996
SOX2	Placa 2	-0,037	1,008	0,991	-0,022	1,004	0,997
CAGE	Placa 1	-0,061	1,000	0,969	0,024	0,962	0,997
CAGE	Placa 2	-0,059	0,996	0,969	0,048	0,940	0,992
NY-ESO-1	Placa 1	-0,066	0,995	0,962	-0,094	0,998	0,931
NY-ESO-1	Placa 2	-0,061	1,003	0,971	-0,100	0,998	0,923
GBU4-5	Placa 1	0,036	1,002	0,977	0,065	1,019	0,951
GBU4-5	Placa 2	0,004	1,006	0,999	-0,047	0,996	0,980
MAGE A4	Placa 1	-0,113	1,016	0,920	-0,115	1,008	0,911
MAGE A4	Placa 2	-0,106	1,023	0,935	-0,109	1,014	0,924
HuD	Placa 1	0,005	0,993	1,000	-0,022	0,995	0,994
HuD	Placa 2	-0,005	0,978	0,995	-0,015	0,996	0,997

Especificidad analítica, interferencias y reacciones cruzadas

Se evaluó el efecto de posibles sustancias interferentes en muestras de suero positivas para autoanticuerpos medidas en el kit de prueba EarlyCDT Lung. Los siguientes interferentes probados (tabla 11) no afectaron el rendimiento del ensayo, a menos que se indique lo contrario.

Tabla 11: Interferencias probadas en el kit de prueba EarlyCDT Lung

Interferente	Concentración de prueba interferente*	Resultado
Triglicéridos	3274 mg/dl	Sin efecto significativo $p < 0,01$
Proteína total	120 g/l	Efecto significativo ***
Bilirrubina (conjugada)	20 mg/dl	Sin efecto significativo $p < 0,01$
Bilirrubina (no conjugada)	20 mg/dl	Sin efecto significativo $p < 0,01$
Hemoglobina	500 mg/dl	Sin efecto significativo $p < 0,01$
Albuterol	0,4 µg/ml	Sin efecto significativo $p < 0,01$
Digoxina	6,09 ng/ml	Sin efecto significativo $p < 0,01$
Factor reumatoide	1:1**	Sin efecto significativo $p < 0,01$
Anticuerpos humanos antiratón	1:1**	Sin efecto significativo $p < 0,01$

* Las concentraciones de prueba interferentes son las recomendadas por CLSI EP7-A2¹⁵.

** Se añadió un volumen igual de suero positivo para RF o HAMA al suero positivo para autoanticuerpos medido en el kit de prueba EarlyCDT Lung.

*** El kit de prueba EarlyCDT Lung no se debe utilizar en pacientes que se sabe que tienen enfermedades que dan como resultado un nivel aumentado de proteína sérica total, por ejemplo mieloma, amiloidosis, gammapatía monoclonal de significado indeterminado (GMSI).

19. Resumen del método

- Equilibre el kit y todos los reactivos a una temperatura de +18 a +22°C (esto llevará al menos 2 horas).
- Prepare los reactivos.
- Dispense 100 µl de cada control relevante y de la muestra diluida del paciente en los pocillos de la(s) placa(s) de microtitulación como se describe.
- Cubra e incube a +18 a +22 °C durante 90 minutos con agitación .
- Lave cuatro veces.
- Agregue 100 µl de anticuerpo secundario a todos los pocillos de la placa de microtitulación.
- Cubra e incube a +18 a+22 °C durante 60 minutos con agitación
- Lave cuatro veces.
- Agregue 100 µl de sustrato a todos los pocillos de la placa de microtitulación.
- Incube a +18 a+22 °C en la oscuridad durante exactamente 15 minutos (sin agitación).
- Agregue 100 µl de solución quelante a todos los pocillos de la placa de microtitulación.
- Determine la densidad óptica de cada pocillo a una longitud de onda de 650 nm dentro de 30 minutos.
- Calcule los valores de autoanticuerpos usando el software provisto en el dispositivo USB.

20. Glosario de términos para EarlyCDT Lung

El glosario de términos utilizado en las Instrucciones de uso con sus definiciones se enumera en la tabla 12.

Tabla 12: Glosario de términos	
Término	Definición
Exactitud	El grado en que el resultado de una medición, el resultado de un cálculo o una especificación se ajusta al valor o resultado correcto.
Antígeno	Proteína inmunogénica u otra molécula.
Autoanticuerpo (AAc)	Anticuerpo producido en respuesta a un antígeno del huésped.
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas.
DO	Densidad óptica medida espectrofotométricamente.
Paquetes al año (cajetilla)	Veinte cigarrillos (es decir, un paquete/cajetilla) fumados todos los días durante un año.
PBS	Solución salina tamponada con fosfato.
Valor predictivo positivo	La probabilidad de que los sujetos con un resultado positivo de la prueba realmente tengan la enfermedad.
Prevalencia	La proporción de una población que presenta una enfermedad.
Sensibilidad	La proporción de personas que se sabe que tienen un estado patológico y cuya prueba da positivo.
Especificidad	La proporción de pacientes sanos que se sabe que no tienen un estado patológico y cuya prueba da negativo.

21. Glosario de símbolos



Fabricante
Indica el fabricante del dispositivo médico.



Consulte las instrucciones de uso
Indica la necesidad de que el usuario consulte las instrucciones de uso.



Utilizar antes de la fecha
Indica la fecha después de la cual el dispositivo médico no debe ser utilizado.



Número de catálogo
Indica el número de catálogo del fabricante para poder identificar el dispositivo médico.



Límite de temperatura
Indica los límites de temperatura a los que el dispositivo médico puede estar expuesto de forma segura.



Número de parte
Indica la identificación de un componente del kit de prueba.



Importador
Indica a la persona física o jurídica establecida en la Unión Europea que distribuye un dispositivo de un país tercero en el mercado de la Unión



Símbolo de peligro de irritación
Puede causar una reacción alérgica en la piel



Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
Indica que el dispositivo médico está destinado a ser utilizado como un dispositivo médico de diagnóstico in vitro.



Riesgos biológicos
Indica que hay riesgos biológicos potenciales asociados con el dispositivo médico.



Código de lote
Indica el código del lote del fabricante para poder identificar el lote o la partida.



No reutilizar
Indica que el dispositivo médico está destinado para un solo uso, o para uso en un solo paciente durante un único procedimiento.



Contiene suficiente para <n> pruebas
Indica el número total de pruebas IVD que se pueden realizar con los reactivos del kit IVD.



Representante autorizado en la comunidad europea
Indica el representante autorizado en la comunidad europea.



No exponer a la luz solar
Indica que el componente se debe proteger de las fuentes de luz.

22. Bibliografía

1. Stewart BW, Wild CP (Eds.), World Cancer Report 2014, WHO Press, Lyon.
2. The National Lung Screening Trial Research Team, N Engl J Med 2011; 365: 395-409.
3. Boyle, P. y otros., Ann Oncol 2011; 22: 383-9.
4. Chapman, C. J. y otros, Tumor Biol 2012; 33: 1319-26.
5. Chapman, C. J. y otros, Thorax 2007; 63, 228-233.
6. Desmetz, C. y otros, J Cell Mol Med 2011; 15, 2013-2024.
7. Tan, E. M. J Clin Invest 2001; 108, 1411-1415.
8. Kazarian, M. y Laird-Offringa, I. A. Mol Cancer 2011; 10, 33.
9. Zhong, L. y otros, J Thor Oncol 2006; 1, 513–519.
10. Trivers, G. E. y otros, Clin Cancer Res 1996; 2, 1767 – 1775.
11. Chapman, C. J. y otros, Clin Cancer Res 2010; 17, 1474-80.
12. Lam, S. y otros, Cancer Prev Res 2011; 4: 1126–34.
13. Jacobs IJ et al., Lancet. 2016 Mar 5; 387(10022): 945–956
14. Jett J et al., J Thor Oncol 2017 12:11 Supp 2 S2170 P2.13-013
15. Pepe, M.S. (2003) The Statistical Evaluation of Medical Tests for Classification and Prediction. OUP, Oxford.
16. Jett, J. R. y otros, Lung Cancer 2013; 83: 51-5.
17. Massion, P. P. y otros, J Thor Oncol 2017 Mar;12(3):578-584
18. Sullivan FM et al., Eur. Respir. J. 2021 Jan 14;57(1):2000670
19. Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI). Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline—Segunda edición. Documento EP7-A2 del CLSI, (ISBN 1-56238-584-4).

23. Garantía

Este producto está garantizado para funcionar como se describe en su etiquetado y documentación cuando se usa de conformidad con todas las instrucciones. Freenome Ltd. RENUNCIA A CUALQUIER GARANTÍA IMPLÍCITA DE COMERCIABILIDAD O IDONEIDAD PARA UN PROPÓSITO PARTICULAR, y en ningún caso Freenome Ltd. será responsable por daños consecuentes. La sustitución del producto o el reembolso del precio de compra es el único recurso disponible para el comprador.

24. Asistencia técnica y servicio al cliente

Para obtener asistencia técnica o hacer un pedido, llame a Freenome al +44 (0)115 784 0501, envíe un correo electrónico a EarlyCDT@freenome.com visite nuestro sitio web en www.earlycdt.com/.

25. Resumen de seguridad y rendimiento

El resumen de seguridad y rendimiento del dispositivo estará disponible en EUDAMED (enlace: portal web de EUDAMED) cuando el sistema funcione totalmente.

26. Informe de incidentes graves

En caso de producirse un incidente grave en relación con este dispositivo, se debe informar al Servicio de atención al cliente de Freenome por teléfono al +44 (0) 115-784-0501 o por correo electrónico a EarlyCDT@freenome.com. En los Estados miembros de la Unión Europea, los incidentes graves también deben notificarse a la autoridad competente (el departamento gubernamental encargado de los dispositivos médicos) del país. Consulte el sitio web de su gobierno para conocer más detalles sobre cómo comunicarse con la autoridad competente.

Por "incidente grave" se entiende cualquier incidente que provoque, pudiera haber provocado o podría provocar:

- la muerte de un paciente, usuario u otra persona,

- el deterioro grave temporal o permanente de la salud de un paciente, usuario u otra persona

27. Historial de revisiones

Código de la versión	Fecha	Resumen de cambios
V10	Sep 2021	Se actualizó según los requisitos del Reglamento (UE) 2017/746 IVD
V11	Dic 2021	Se actualizó según la sección de “Resumen de resultados de estudio clínico” para incluir las características semiológicas adicionales.
V12	Jul 2022	Se añadió un resumen de la ubicación de la seguridad y el rendimiento. Se actualizaron las velocidades de los agitadores. Se añadió más información sobre la composición del tampón en la Tabla 1. Se ha añadido la recomendación de utilizar una pipeta electrónica multicanal para la dispensación.
V13	Sept 2023	Sustitución de Oncimmune Ltd por Freenome Ltd y actualización del representante autorizado



Freenome Limited
MediCity – D6 Building
1 Thane Road,
Nottingham,
NG90 6BH, United
Kingdom

+44 (0)115 784 0501
earlycdt@freenome.com
www.earlycdt.com



qttec EuRep GmbH
Curtiusstraße 27,
23568 Lübeck
Alemania

+49 4 51 80 85 03 71
PRRC@qttec-
group.com
www.qttec-group.com

