

# Instrucciones de uso

## Kits y & ensayos biotecnológicos



hTAU total ELISA

N.º de pedido:

847-0108000101 96 reacciones



---

**Referencia de la publicación:** Manual\_hTAU total ELISA\_es\_rev14

---

Esta documentación describe el estado del producto en el momento de la publicación.

No se corresponde necesariamente con futuras versiones. ¡Puede sufrir cambios!

Su impresión y uso posterior están autorizados siempre que se indique la fuente.

© Copyright 2017, Analytik Jena AG, AJ Roboscreen GmbH

---

**Fabricante:**

AJ Roboscreen GmbH

Hohmannstraße 7

04129 Leipzig

Hecho en Alemania!

Tel. +49 341 989734 0

Fax +49 341 989734 199

---

**Distribución/Edición:**

Analytik Jena AG

Konrad-Zuse-Straße 1

07745 Jena · Alemania

[www.analytik-jena.com](http://www.analytik-jena.com)

[info@analytik-jena.com](mailto:info@analytik-jena.com)

## Índice

1	Introducción .....	2
1.1	Uso previsto .....	2
1.2	Garantía y asistencia técnica .....	2
1.3	Notas sobre el uso de estas instrucciones de uso.....	3
2	Precauciones de seguridad .....	4
3	Principio de la prueba.....	6
4	Evaluación del rendimiento .....	7
5	Componentes del kit.....	9
6	Preparación de los componentes.....	11
6.1	Solución tampón de lavado 1X.....	11
6.2	Patrones D3.1 - D3.6.....	11
6.3	Controles D7 y D8 .....	11
6.4	Conjugado de HRP .....	12
7	Almacenamiento y caducidad .....	13
8	Componentes no incluidos en el kit.....	13
9	Notas sobre el procedimiento .....	14
10	Recogida y almacenamiento de muestras .....	14
10.1	Recogida de muestras .....	15
10.2	Almacenamiento de las muestras .....	15
10.3	Dilución de las muestras .....	15
11	Procedimiento de la prueba .....	17
12	Análisis de los datos .....	18
12.1	Criterios de calidad del ensayo.....	18
12.2	Cálculo de la concentración de tau desconocida .....	18
13	Valores esperado.....	19

# 1 Introducción

## 1.1 Uso previsto

hTAU total ELISA es un inmunoensayo enzimático destinado a la determinación cuantitativa de la proteína tau total en el LCR humano para contribuir al diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (EA). El desarrollo de la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por tres etapas, según definición de los grupos de trabajo del Instituto Nacional sobre el Envejecimiento de los Estados Unidos:

- una etapa preclínica de la enfermedad,
- la etapa de deterioro cognitivo leve (DCL) debido a la EA y
- la etapa de demencia debida a la EA.

Tau muestra una especificidad y una sensibilidad de diagnóstico al menos comparables a las de otras pruebas diagnósticas disponibles para la enfermedad de Alzheimer.

## 1.2 Garantía y asistencia técnica

El fabricante garantiza el funcionamiento correcto del kit para las aplicaciones descritas en las instrucciones de uso (IDU). Durante el periodo de garantía, el kit hTAU total ELISA permite una recogida de datos precisa y reproducible con una sensibilidad superior. Las reclamaciones de garantía solo tendrán validez si se observan los principios generales de las prácticas correctas de laboratorio (PCL) y las recomendaciones del fabricante.

Para mejorar su aplicación y diseño, Analytik Jena AG se reserva el derecho de sustitución o modificación del producto. No dude en ponerse en contacto con el fabricante si tiene preguntas o problemas, o para solicitar asistencia técnica en relación con la cuantificación de la proteína tau total en el LCR.










## CONSULTE LAS INSTRUCCIONES DE USO

Este prospecto debe leerse cuidadosamente antes del uso. Las instrucciones que contiene deben seguirse como corresponde. La fiabilidad de los resultados no puede garantizarse en caso de cualquier desviación con respecto a las instrucciones del prospecto.

### 1.3 Notas sobre el uso de estas instrucciones de uso

Para facilitar la referencia y la orientación, las IDU usan los siguientes símbolos de advertencia e información, así como la metodología indicada:

	<b>REF</b> <b>Número de catálogo</b>
	<b>Contenido</b> <b>Contiene reactivos suficientes para &lt;N&gt; pruebas</b>
	<b>Condiciones de almacenamiento</b>
	<b>Consulte las instrucciones de uso</b>
	<b>Fecha de caducidad</b>
	<b>Fabricado por</b>
	<b>Para un solo uso</b>

En las IDU se emplean las siglas siguientes:

<b>EA</b>	Enfermedad de Alzheimer
<b>LCR</b>	Líquido cefalorraquídeo
<b>CV</b>	Coeficiente de variación
<b>ELISA</b>	Ensayo de inmunoadsorción enzimática
<b>PCL</b>	Prácticas correctas de laboratorio
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>TA</b>	Temperatura ambiente (18-25 °C)
<b>TMB</b>	Tetrametilbencidina

## 2 Precauciones de seguridad

---

Se recomienda la lectura detenida de este capítulo antes de hacer uso del kit para garantizar la seguridad del usuario y su correcta utilización.

Es necesario observar en todo momento las instrucciones de seguridad y la información adicional de estas IDU.

---

Lea y asegúrese de entender completamente las instrucciones de trabajo antes de llevar a cabo la prueba. Use la versión del kit más actual.

En caso de daños sustanciales en el paquete de la prueba, notifique por escrito al proveedor correspondiente en el plazo de una semana desde la recepción de la mercancía. Los componentes dañados no deben usarse para llevar a cabo el ensayo, pero deberán guardarse hasta la determinación final de los daños de transporte.

Observe las prácticas correctas de laboratorio y las regulaciones de seguridad. Utilice una bata de laboratorio, guantes de látex desechables y gafas de protección siempre que sea necesario.

Los reactivos de este kit que contienen sustancias peligrosas pueden causar irritaciones en los ojos y la piel. Vea las indicaciones incluidas bajo el epígrafe COMPONENTES DEL KIT y en las etiquetas. Las fichas de datos de seguridad están a su disposición previa solicitud.

Las sustancias químicas y los reactivos preparados o usados deberán desecharse como residuos peligrosos de acuerdo con las regulaciones nacionales respectivas.

El personal de limpieza deberá ser instruido por los expertos con respecto a los riesgos potenciales y el manejo apropiado de tales sustancias.

Evite todo contacto con la solución de parada. Puede causar irritaciones en la piel y quemaduras químicas.



**¡PARA UN SOLO USO!**  
ESTE KIT ESTÁ CONCEBIDO PARA UN SOLO USO!

**¡CUIDADO!**

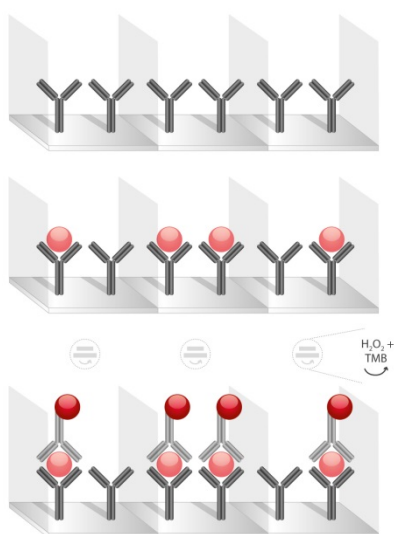
¡No ingiera los componentes del kit!

¡El kit solo debe ser manejado por personal cualificado en un laboratorio!

---

### 3 Principio de la prueba

Este kit funciona mediante un anticuerpo monoclonal inmovilizado sobre la superficie de una placa de microtitulación que reconoce específicamente los aminoácidos 160-180 de la proteína tau humana. La proteína tau de muestras, patrones y controles queda atrapada por este anticuerpo y a continuación se detecta mediante otro anticuerpo monoclonal dirigido contra tau y conjugado con peroxidasa de rábano que se une específicamente a los aminoácidos 100-120 de la proteína tau humana. La cantidad de anticuerpo conjugado unido se estima con el sustrato cromógeno tetrametilbencidina (TMB). La concentración de la proteína tau es proporcional a la densidad óptica obtenida.



1. Listo para usar: el anticuerpo de captura recubre los pocillos de la placa
2. Unión de la proteína tau humana al anticuerpo de captura
3. Detección de la proteína tau unida mediante un anticuerpo específico para la proteína tau humana conjugado con HRP



## 4 Evaluación del rendimiento

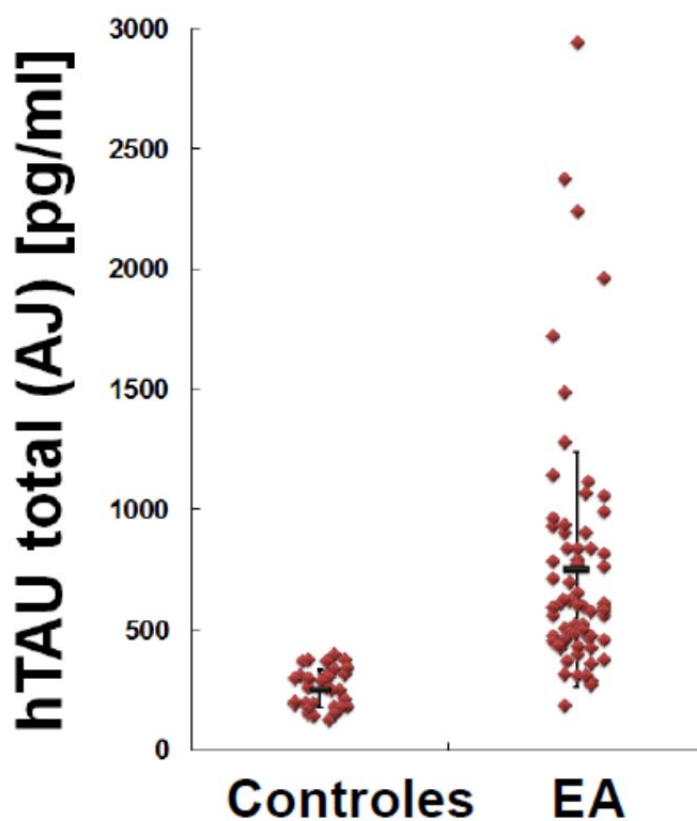
La tabla siguiente muestra datos típicos de curvas de calibración. ¡No usar para los cálculos!

Patrón	Tau (pg/ml)	DO <sub>media</sub>	DO/DO <sub>max</sub> (%)
D3.1	1000	3,073	100
D3.2	500	1,664	54,1
D3.3	250	0,747	24,3
D3.4	100	0,333	10,8
D3.5	50	0,245	7,8
D3.6	25	0,149	4,8










Esta tabla resume la sensibilidad y la especificidad en relación con determinados valores umbral.

<b>Sensibilidad analítica (límite de detección)</b>	25 pg/ml	Señal media del control negativo (blanco) + 3 DE
<b>Valor umbral</b>	399 pg/ml	Cada laboratorio debe establecer sus propios valores umbral.
<b>Sensibilidad clínica</b>	86 %	Pacientes de EA/DCL (n = 58)
<b>Especificidad clínica</b>	100 %	Controles (n = 42)




Verificación de diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) de concentración de la proteína tau (hTAU total ELISA) en muestras de LCR de pacientes de la enfermedad de Alzheimer ( $n = 58$ ) y de pacientes control ( $n = 42$ ).



## 5 Componentes del kit

Componente	 96	Descripción
Placa inmunológica <b>D1</b>	12 x 8	Tiras inmunológicas recubiertas con el anticuerpo contra tau, bloqueadas y estabilizadas. Listas para usar.
40X Tampón de lavado <b>D2</b>	1 x 50 ml	Tampón de lavado 40X que contiene PBS, detergente y proclin 300.
Patrones	6 x 3	Patrones de tau liofilizados (STD) para la preparación de una curva patrón de cuantificación de tau en muestras de líquido cefalorraquídeo desconocidas. Contiene PBS, proteína y proclin 300.
D3.1	 3	1000 pg de tau
D3.2	 3	500 pg de tau
D3.3	 3	250 pg de tau
D3.4	 3	100 pg de tau
D3.5	 3	50 pg de tau
D3.6	 3	25 pg de tau
Control negativo <b>D4</b>	 1 ml	Control negativo (BLANK), que contiene PBS, proteína, detergente y proclin 300. Listo.
Conjugado de HRP 15X <b>D5</b>	 1 ml	Anticuerpo monoclonal dirigido contra tau conjugado con peroxidasa de rábano, concentrado 15X, que contiene PBS, proteína, detergente y proclin 300.

## Componentes del kit

Component	 96	Description
Tampón de ensayo <b>D6</b>	50 ml	Tampón de dilución que contiene PBS, proteína, detergente y proclin 300. Listo para usar.
Control alto <b>D7</b>	 3	Control positivo (CTRL) con alta concentración de tau. Contiene PBS, proteína y proclin 300.
Control bajo <b>D8</b>	 3	Control positivo (CTRL) con baja concentración de tau. Contiene PBS, proteína y proclin 300.
Solución de tinción <b>D9</b>	20 ml	Solución de TMB/peróxido. Lista para usar.
Solución de parada <b>D10</b>	25 ml	Ácido sulfúrico 1 M. Listo para usar.
Cinta de sellado	2	
Instrucciones de uso	1	

## 6 Preparación de los componentes

### 6.1 Solución tampón de lavado 1X

Diluir el tampón de lavado 40X D2 con agua desionizada o bidestilada antes de la primera etapa de lavado del inmunoensayo.

Volumen de tampón de lavado 1X	Volumen de tampón de lavado 40X D2	Volumen de agua desionizada o
400 ml	10 ml	390 ml
600 ml	15 ml	585 ml
800 ml	20 ml	780 ml
1000 ml	25 ml	975 ml

### 6.2 Patrones D3.1 - D3.6

Añadir 1,0 ml del tampón de dilución D6 a cada uno de los viales de los patrones D3.1 - D3.6 y mezclar rápidamente, por ejemplo, en 2 s mediante un vórtex.

### 6.3 Controles D7 y D8

Añadir 1,0 ml del tampón de dilución D6 a los viales de los controles D7 y D8 y mezclar rápidamente, por ejemplo, en 2 s mediante un vórtex.

## 6.4 Conjugado de HRP

Diluir el conjugado de **HRP 15X D5** en una relación 1:15 con el tampón de dilución **D6**. Mezclar sacudiendo los tubos.

Número de tiras inmunológicas	Volumen de HRP 15X	Volumen de tampón de
1 - 4	0,3 ml	4,2 ml
5 - 8	0,6 ml	8,4 ml
9 - 12	0,9 ml	12,6 ml

## 7 Almacenamiento y caducidad

El kit se suministra a temperatura ambiente y debe almacenarse a  $6 \pm 4$  °C. Debe protegerse del calor y de la luz solar directa. En estas condiciones, el kit tiene una vida útil según se indica en la caja, durante la cual mantiene su resistencia y estabilidad. Los componentes preparados del kit tienen los siguientes periodos de caducidad:

Componente	Etapas de preparación	Caducidad
D1	Tiras inmunológicas recubiertas después de abrir la bolsa, retirar algunas tiras y volver a cerrar la bolsa.	A $6 \pm 4$ °C hasta 4 semanas.
D2	Solución de lavado lista para usar 1X.	A $6 \pm 4$ °C hasta 1 semana.
D3.1-D3.6	Patrones D3.1-D3.6 disueltos en D6.	A $6 \pm 4$ °C hasta 4 h.
D7, D8	Controles D7 y D8 disueltos en D6.	A $6 \pm 4$ °C hasta 4 h.
D5	Conjugado de HRP listo para usar diluido 1:15.	A $6 \pm 4$ °C hasta 4 h.

## 8 Componentes no incluidos en el kit

- Micropipetas calibradas con CV < 3 %, Volumen: 10-100 µl; 100-1000 µl.
- Micropipeta de 8 canales con depósito para reactivos.
- Agitador de placas de 100-1500 rpm, por ejemplo, Rotamax 120.
- Sistema automático o semiautomático de lavado de placas de ELISA.
- Agua bidestilada o desionizada.
- Toallas de papel, puntas de pipeta y temporizador.
- Lector de placas de ELISA para la lectura de la absorbancia.
- Tubos de polipropileno para la dilución de las muestras.

## 9 Notas sobre el procedimiento

Todo manejo incorrecto de las muestras, así como la modificación del procedimiento de la prueba pueden afectar a los resultados. Es necesario seguir rigurosamente las indicaciones referentes a volúmenes, tiempos de incubación, temperaturas y etapas de pretratamiento de acuerdo con estas instrucciones.

Asegúrese de que los reactivos, materiales y dispositivos requeridos se preparan para estar listos en el momento adecuado. Debe permitirse que la solución de tinción **D9** alcance la temperatura ambiente ( $21,5 \pm 3,5$  °C). Mezcle el tampón de ensayo **D6** y el conjugado de HRP 15X **D5** mediante un vórtex antes de su uso.

Evite la contaminación de los reactivos, pipetas y pocillos/tubos usando pipetas desechables diferentes para muestras y componentes diferentes. No intercambie las tapas. No reutilice ningún pocillo, tubo o reactivo.

Se recomienda hacer la prueba por duplicado y usar un esquema de pipeteo. La solución del conjugado de HRP 1x, la solución de tinción **D9** y la solución de parada **D10** deben transferirse a todos los pocillos mediante una micropipeta de 8 canales. El lavado debe llevarse a cabo con una micropipeta de 8 canales o un sistema lavador de placas de ELISA. Evite el secado o un estrés excesivo sobre los pocillos y controle el lavado exacto de todos ellos.

## 10 Recogida y almacenamiento de muestras

La Iniciativa para la Estandarización de Biomarcadores del Alzheimer proporciona las recomendaciones siguientes para los aspectos preanalíticos y analíticos de la determinación de biomarcadores de la EA en el LCR (Vanderstichele et al., Standardization of preanalytical aspects of cerebrospinal fluid biomarker testing for Alzheimer's disease diagnosis: a consensus paper from the Alzheimer's Biomarkers Standardization Initiative. *Alzheimers Dement.* 2012 Jan;8(1):65-73).



## 10.1 Recogida de muestras

Puede realizarse una punción lumbar en el cuerpo de las vértebras L3-L5 con el paciente sentado o tumbado. Usar una aguja de pequeño diámetro (0,7 mm y 22 G), preferentemente no traumática. Una aguja de pequeño calibre hará un orificio de menor tamaño en la duramadre, lo que facilitará la cicatrización, y al ser no traumática, se reducirá la probabilidad de contaminación sanguínea del LCR.

Cada laboratorio deberá usar solo un tipo de tubos de polipropileno. En ningún caso podrán usarse tubos de vidrio o poliestireno. Deberán usarse los tubos de menor volumen, que se llenarán hasta al menos el 50 % de su capacidad. Es importante registrar y validar cuidadosamente los detalles correspondientes a cada muestra almacenada, de manera que cualquier investigador que use las muestras conozca el historial exacto de las mismas.

La centrifugación solo se requiere en caso de muestras de aspecto hemorrágico. En este caso, se recomienda centrifugar rápidamente a 2000 x g durante 10 min a TA.

## 10.2 Almacenamiento de las muestras

Se recomienda congelar las muestras y almacenarlas a -80 °C para su conservación a largo plazo. Se recomienda limitar el número de ciclos de congelación/descongelación a un máximo de 1-2. Las muestras no deberán almacenarse durante más de 2 años.

---

### Nota

Usar tubos de propileno para la dilución del LCR o diluirlo directamente en la placa inmunológica **D1**.

---

## 10.3 Dilución de las muestras

Para una medición apropiada de la concentración de la proteína tau en el LCR, diluir la muestra con el tampón de ensayo **D6** en una relación 1:4 (1 parte de la muestra, por ejemplo, 25 µl y 3 partes de **D6**, por ejemplo, 75 µl) antes de comenzar la prueba. Se recomienda

usar solamente tubos de polipropileno conocidos y probados previamente o diluir directamente la muestra en la placa de ELISA mediante la transferencia de 75  $\mu$ l de **D6** y a continuación de 25  $\mu$ l de cada muestra a cada pocillo.

## 11 Procedimiento de la prueba

1. Pipetear 100  $\mu$ l de los **patrones, controles, blanco y muestras del paciente** prediluidas en cada pocillo. Alternativamente, transferir 75  $\mu$ l del tampón de ensayo **D6** y a continuación de 25  $\mu$ l de la **muestra del paciente** y mezclar pipeteando 2-3 veces.
2. Cubrir la placa con la tapa o papel de aluminio e incubarla en un agitador de placas a 150 rpm durante 2 h  $\pm$  10 min a TA.
3. Lavar la placa 5 veces con 300  $\mu$ l/pocillo de la **solución de lavado 1X** mediante un lavador de placas de ELISA automático.
4. Pipetear 100  $\mu$ l del conjugado de **HRP 1X** en cada pocillo.
5. Cubrir la placa con la tapa o papel de aluminio e incubarla durante 90 min  $\pm$  10 min a TA.
6. Lavar la placa 5 veces con 300  $\mu$ l/pocillo de la **solución de lavado 1X** mediante un lavador de placas de ELISA automático.

---

### Nota

Alternativamente, si el lavado es manual, desechar la solución de incubación. Retirar el exceso de solución después del lavado golpeando suavemente las tiras inmunológicas sobre una toalla de papel.

---

7. Pipetear 100  $\mu$ l de la **solución de tinción D9** en cada pocillo.
8. Incubar la placa a TA en oscuridad durante 30 min.
9. Detener la reacción del sustrato añadiendo 150  $\mu$ l de la **solución de parada D10** a cada pocillo. Mezclar brevemente el contenido agitando la placa suavemente dentro del lector.
10. Medir la densidad óptica con un fotómetro a 450 nm frente a una longitud de onda de referencia de 620 nm en un plazo de 15 min después de detener la reacción.

### Nota

En las muestras con una elevada concentración de la proteína tau, el colorante que se forma puede precipitar debido a la intensa tinción. Por consiguiente, se recomienda esperar unos 10 min antes de llevar a cabo la medición.

---

## 12 Análisis de los datos

### 12.1 Criterios de calidad del ensayo

- La  $DO_{450/620\text{ nm}}$  del control negativo D4 (BLANK) debe ser  $< 0,1$ .
- La concentración de los controles positivos D7 y D8 debe estar en el intervalo correspondiente al certificado específico del lote.
- La  $DO_{450/620\text{ nm}}$  del patrón D3.1 debe ser  $> 2,0$ .
- Calcular en cada caso el coeficiente  $R^2$  de la curva de calibración, que debe ser  $\geq 0,99$ .

### 12.2 Cálculo de la concentración de tau desconocida

Usar valores logarítmicos (LN) de las DO y las concentraciones de los patrones para su representación en el eje x (DO) y el eje y (concentración) de un diagrama lineal o para llevar a cabo un análisis de regresión lineal. Para este análisis de regresión tienen que usarse los valores logarítmicos de las DO medidas para las muestras, a lo que sigue su exponenciación para calcular la concentración en pg/ml o ng/ml.

---

### Nota

Después de la exponenciación, es necesario incluir el factor de dilución 4 para la estimación de la concentración real de tau en las muestras.

---

También puede usarse para la cuantificación un método automático llevado a cabo por un software lector corriente; se recomienda una logística de 4 o 5 parámetros o métodos logit-log. Típicamente, la curva de calibración muestra una parte lineal dentro de una meseta para el patrón de mayor concentración D3.1 (1000 pg/ml) y una meseta para el patrón de menor concentración D3.6 (25 pg/ml).

---

**Nota**

En las muestras medidas que presentan una DO inferior a la DO del patrón de menor concentración D3.6 sin opción para una medición más concentrada, la concentración de tau desconocida podría calcularse como  $\frac{1}{2}$  de esta concentración mínima = 12,5 pg/ml.

---

## 13 Valores esperado

---

**Nota**

La Sociedad Alemana para el Diagnóstico del LCR y Neuroquímica Clínica e. V., incluida en la Sociedad Alemana de Neurología, recomienda los siguientes intervalos de referencia:

**<50 años**

&lt;300 pg/ml

**51-70 años**

&lt;450 pg/ml

**>70 años**

&lt;500 pg/ml



**Sede central**

---

Analytik Jena AG  
Konrad-Zuse-Str. 1  
07745 Jena · Alemania

Phone +49 3641 77 70  
Fax +49 3641 77 9279  
info@analytik-jena.com  
www.analytik-jena.com

Figuras: Analytik Jena AG  
Puede sufrir cambios en diseño y volumen de entrega así como un desarrollo técnico posterior: