

Instrucciones de uso

Kits y & ensayos biotecnológicos

phosphoTAU ELISA

N.º de pedido:

847-0108000104 96 reacciones



Referencia de la publicación: Manual_phosphoTAU ELISA _e_rev5

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

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 de lavado 1X	11
6.2	Patrones D3.1 - D3.6.....	11
6.3	Controles D7 y D8	11
6.4	Conjugado de 1X 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	16
12	Análisis de los datos	17
12.1	Criterios de calidad del ensayo.....	17
12.2	Cálculo de la concentración de tau fosforilada desconocida	17
13	Valores esperado.....	18

1 Introducción

1.1 Uso previsto

phosphoTAU ELISA es un inmunoensayo enzimático destinado a la determinación cuantitativa de la proteína tau fosforilada 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.

La proteína tau fosforilada en el LCR 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 phosphoTAU 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:

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

En las IDU se emplean las siglas siguientes:

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

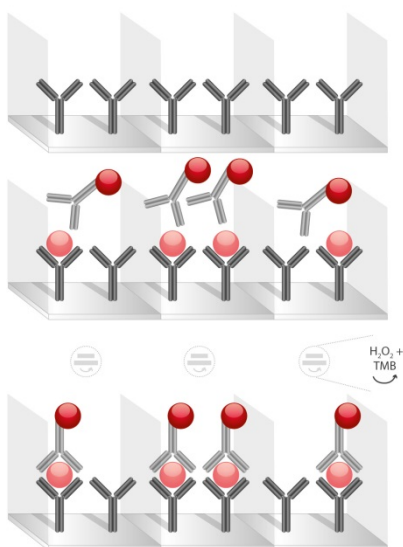
¡CUIDADO!

¡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 la proteína tau fosforilada. La proteína tau fosforilada de muestras, patrones y controles queda atrapada por este anticuerpo en presencia de otro anticuerpo monoclonal dirigido contra tau y conjugado con peroxidasa que se une específicamente a los aminoácidos 160-180 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 fosforilada es proporcional a la densidad óptica obtenida.



1. Listo para usar: el anticuerpo de captura recubre los pocillos de la placa
2. Unión del antígeno diana al anticuerpo de captura e incubación con un anticuerpo conjugado con HRP
3. Detección directa mediante el anticuerpo conjugado con HRP

4 Evaluación del rendimiento

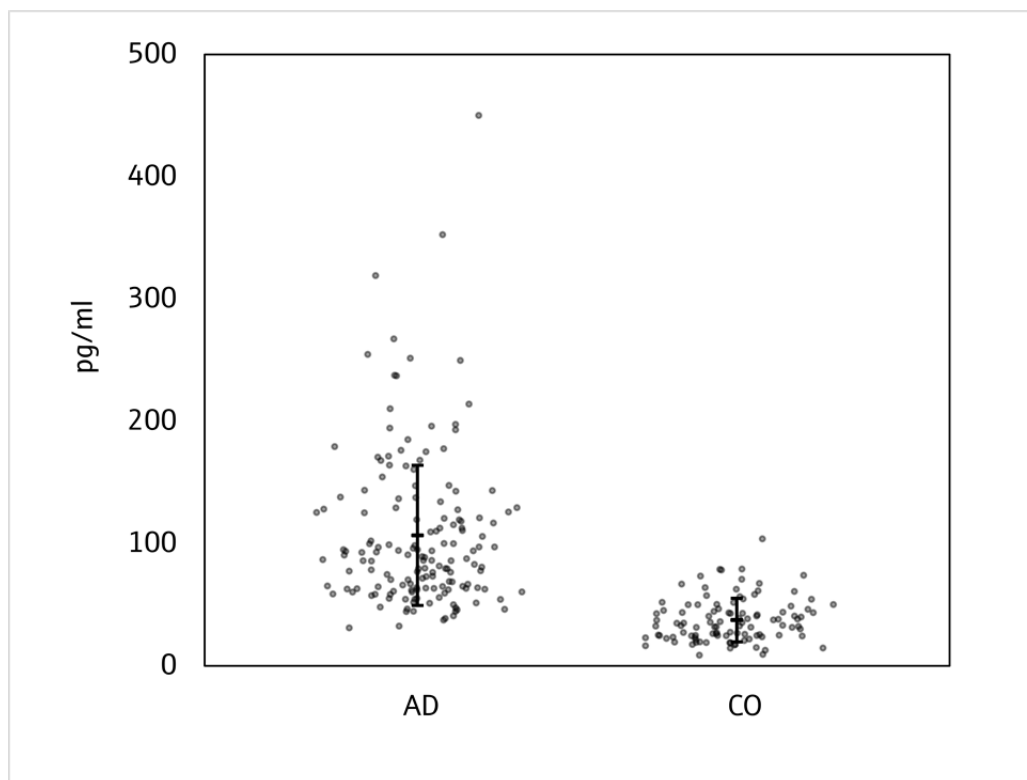
La tabla siguiente muestra datos típicos de curvas de calibración. ¡No usar para los cálculos!

Patrón	Tau fosforilada (pg/ml)	18 h incubarla (6 ± 4 °C)	
		DO _{media}	DO/DO _{max} (%)
D3.1	600	2,848	100
D3.2	200	0,759	26
D3.3	100	0,412	14
D3.4	50	0,231	8,1
D3.5	25	0,160	5,6
D3.6	5	0,092	3,2










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

Sensibilidad analítica límite de detección)	5 pg/mL	Señal media del control negativo (blanco) + 3 DE
Valor umbra	60 pg/mL	Cada laboratorio debe establecer sus propios valores umbral.
Sensibilidad clínica	82,2 %	Pacientes de EA/DCL (n=157)
Especificidad clínica	87,5 %	Controles (n=104)




Verificación de diferencias significativas ($p < 0,001$) de concentración de la proteína tau fosforilada (phosphoTAU ELISA) en muestras de LCR de pacientes de la enfermedad de Alzheimer (AD, $n = 157$) y de pacientes control (C, $n = 104$).



5 Componentes del kit

Componente	 96	Descripción
Placa inmunológica D1	12 x 8	Tiras inmunológicas recubiertas con el anticuerpo contra tau fosforilada, bloqueadas y estabilizadas. Listas para usar.
40X Tampón de lavado D2	1 x 50 ml	Tampón de lavado 40X que contiene PBS, detergente y proclin 300.
Patrones	6 x 3	Patrones de tau fosforilada (STD) para la preparación de una curva patrón de cuantificación de tau fosforilada en muestras de líquido cefalorraquídeo desconocidas. Contiene PBS, proteína y proclin 300.
D3.1	 3	600 pg de tau fosforilada
D3.2	 3	200 pg de tau fosforilada
D3.3	 3	100 pg de tau fosforilada
D3.4	 3	50 pg de tau fosforilada
D3.5	 3	25 pg de tau fosforilada
D3.6	 3	5 pg de tau fosforilada
Control negativo D4	 1 ml	Control negativo (BLANK), que contiene PBS, proteína, detergente y proclin 300. Listo.
conjugado de HRP 2X D5	 4 ml	Anticuerpo monoclonal dirigido contra tau conjugado con peroxidasa de rábano, concentrado 2X, que contiene TRIS, proteína, detergente y Kathon/Bronidox.

Componentes del kit

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

6 Preparación de los componentes

6.1 Solución 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 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 0,5 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 0,5 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 1X HRP

Diluir el conjugado de **HRP 2X D5** en una relación 1:2 con el tampón de dilución **D6**. Mezclar sacudiendo los tubos.

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

7 Almacenamiento y caducidad

El kit se suministra a temperatura ambiente y debe almacenarse a 6 ± 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 ± 4 °C hasta 4 semanas.
D2	Solución de lavado lista para usar 1X.	A 6 ± 4 °C hasta 1 semana.
D3.1-D3.6	Patrones D3.1-D3.6 disueltos en D6.	A 6 ± 4 °C hasta 4 h.
D7, D8	Controles D7 y D8 disueltos en D6.	A 6 ± 4 °C hasta 4 h.
D5	Conjugado de 1X HRP.	A 6 ± 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
- Mezclador vórtex
- 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 a 450 y 620 nm
- 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 2X 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

Las muestras con una DO superior a la DO del patrón de mayor concentración **D3.1** deberán diluirse más de 1:2 con el tampón de ensayo **D6**.

11 Procedimiento de la prueba

1. Pipetear 50 µl del conjugado de **HRP 1X** en cada pocillo.
2. Pipetear 50 µl de cada **patrón, control y muestra del paciente** en los pocillos respectivos de la placa y mezclar mediante un mezclador de placas (por ejemplo, 1 min a 700 rpm) o manualmente 2-3 veces con la punta de la pipeta.
3. Cubrir la placa con la tapa o papel de aluminio
4. Incubar la placa inmunológica durante 18 ± 1 h a 6 ± 4 °C.
5. Lavar la placa 5 veces con 300 µl/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.

6. Pipetear 100 µl de la **solución de tinción D9** en cada pocillo.
7. Incubar la placa a TA en oscuridad durante 30 min.
8. Detener la reacción del sustrato añadiendo 150 µl de la **solución de parada D10** a cada pocillo. Mezclar brevemente el contenido agitando la placa suavemente dentro del lector.
9. 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 15 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 debe ser $> 60\text{ pg/ml}$ y controles positivos D8 debe ser $< 60\text{ pg/ml}$
- 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 fosforilada 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.

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 (600 pg/ml) y una meseta para el patrón de menor concentración D3.6 (5 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 = 2,5 pg/ml.

13 Valores esperado

En una cohorte de 157 pacientes de EA pudo encontrarse un nivel de 107 pg/ml con un intervalo intercuartílico de 31-450 pg/ml, mientras que el nivel de la cohorte de control (n = 104) fue de 37 pg/ml con un intervalo intercuartílico de 9-104 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: