



# **INND2 – Human CD5L, IGFBP3 and APOA4 ELISA Kit**

Instrucciones para el uso:

Para la medición cuantitativa de CD5L, IGFBP3 y APOA4 en plasma.

# Tabla de Contenido

|                                                                                                |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Introducción .....</b>                                                                      | <b>3</b>  |
| <b>1. NOMBRE, INDICACIONES Y USOS .....</b>                                                    | <b>3</b>  |
| <b>2. RESUMEN DE LA PRUEBA.....</b>                                                            | <b>3</b>  |
| <b>3. PRINCIPIOS DEL ENSAYO.....</b>                                                           | <b>3</b>  |
| <b>Información General .....</b>                                                               | <b>4</b>  |
| <b>4. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES .....</b>                                                    | <b>4</b>  |
| <b>5. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD.....</b>                                                    | <b>5</b>  |
| <b>6. MATERIALES PROPORCIONADOS .....</b>                                                      | <b>5</b>  |
| <b>7. MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS.....</b>                                     | <b>5</b>  |
| <b>8. COLECCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LA MUESTRA .....</b>                                       | <b>6</b>  |
| <b>9. TÉCNICAS DE PIPETEO EFECTIVO PARA REALIZAR ESTA PRUEBA.....</b>                          | <b>6</b>  |
| <b>10. PREPARACIÓN DE ENSAYO.....</b>                                                          | <b>7</b>  |
| <b>10.1. Solucion Salina Amortiguadora (TBS) tabla 1. ....</b>                                 | <b>7</b>  |
| <b>10.2. Preparacion del TBS-T solución de lavado (TBS con 0.05% de Tween-20) tabla 2.....</b> | <b>7</b>  |
| <b>10.3. Preparación de la Solución Diluyente tabla 3. ....</b>                                | <b>7</b>  |
| <b>10.4. Preparación de la Solución de Detección (SA:HRP) tabla 4.....</b>                     | <b>8</b>  |
| <b>10.5. Preparación de la Solución de Sustrato tabla 5. ....</b>                              | <b>8</b>  |
| <b>10.6. Preparación de los Estandares Proteicos tabla 6. ....</b>                             | <b>9</b>  |
| <b>10.7. Preparación de la solución de anticuerpos de detección tabla 7. ....</b>              | <b>11</b> |
| <b>10.8. Preparación de Muestras de Pacientes .....</b>                                        | <b>11</b> |
| <b>11. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO .....</b>                                                       | <b>12</b> |
| <b>12. CÁLCULOS .....</b>                                                                      | <b>14</b> |
| <b>13. CRITERIOS DE ACEPTACION .....</b>                                                       | <b>15</b> |
| <b>14. RANGO DE DETECCIÓN.....</b>                                                             | <b>15</b> |
| <b>15. ESPECIFICIDAD.....</b>                                                                  | <b>15</b> |
| <b>16. SENSITIVIDAD .....</b>                                                                  | <b>16</b> |
| <b>17. LINEARIDAD.....</b>                                                                     | <b>16</b> |

# Introducción

## 1. NOMBRE, INDICACIONES Y USOS

Los componentes delineados a continuación formarán un inmunoensayo de fase sólida para el diagnóstico de Nefropatía o Daño Renal, en pacientes con Diabetes Tipo 2, así como identificación de riesgo de desarrollar Nefropatía en el tiempo, brindando incluso distintas clasificaciones de riesgo (Bajo, Medio y Alto). Esta prueba trabaja mediante la detección de tres biomarcadores (analitos) que correlacionan con esta condición. El ensayo está diseñado para ser usado por laboratorios clínicos con personal debidamente adiestrado.

## 2. RESUMEN DE LA PRUEBA

Cerca del 10% de pacientes diabéticos progresan a nefropatía diabética. Identificar la población de pacientes que progresará a esta condición es complejo, y actualmente se basa en indicadores clínicos como la filtración glomerular y medidas de albumina/creatinina. Estos indicadores permiten diagnosticar la condición tarde en su desarrollo, con pocas opciones para la prevención o mitigación. Esta prueba se ha desarrollado para predecir, con un mayor nivel de certeza, los pacientes que progresarán a ésta condición, permitiendo entonces una intervención temprana.

La prueba se basa en la detección de tres biomarcadores (analitos). La información sobre los niveles de estos tres biomarcadores se combina mediante un algoritmo, con valores de la filtración glomerular y medidas de albumina/creatinina, de esta forma generando un índice que permite evaluar el riesgo y/o diagnóstico de nefropatía diabética. La predicción de riesgo y/o diagnóstico permite intervenir con el paciente para mitigar y/o retrasar el desarrollo del daño renal.

## 3. PRINCIPIOS DEL ENSAYO

Esta prueba de ELISA utiliza anticuerpos monoclonales de alta especificidad para la detección de los niveles de tres biomarcadores indicativos de riesgo de daño renal en muestras de plasma de pacientes. Este ensayo utiliza la técnica de captura, donde se revisten placas con un anticuerpo monoclonal que atrapa de forma específica cada biomarcador (Figura 1). El espécimen de plasma del paciente, el cual contiene los biomarcadores, es añadido en tres placas diferentes, correspondiente a cada uno de los tres biomarcadores. Luego de un periodo de incubación, los pocillos de la placa se lavan, removiendo el plasma y reteniendo los biomarcadores “capturados” para su posterior detección. Seguido a estos pasos de “captura” y lavado, se añade un segundo anticuerpo monoclonal y se prosigue con otro paso de lavado. Este anticuerpo añadido es el anticuerpo de detección que reconoce otro epítipo (otra región) en el biomarcador. En el próximo paso se añade una enzima, “horseradish peroxidase” o HRP, que se enlaza al anticuerpo de detección. La enzima no enlazada se elimina por medio de un lavado y se añade el sustrato permitiendo entonces la detección. Para este último paso se utiliza un lector de microplacas (espectrofotómetro) a través del cual se obtiene una medida numérica de la intensidad del cambio

en color, producto de la reacción enzimática, y por consiguiente, una medida proporcional del nivel de cada biomarcador presente en el espécimen.

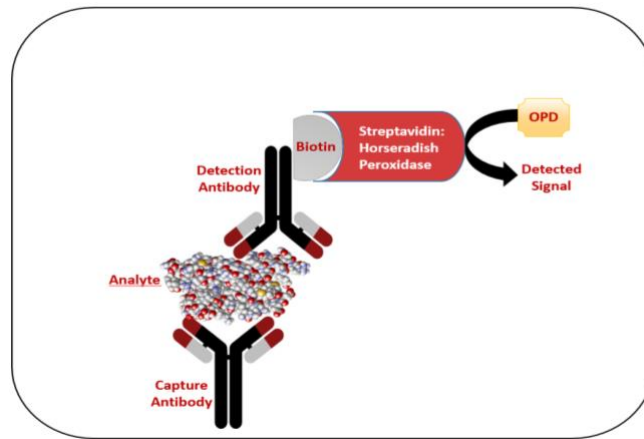


Figura.1: Modelo de la reacción antígeno-anticuerpo

## Información General

### 4. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- a. NO use componentes luego de pasada la fecha de caducidad.
- b. NO mezcle reactivos o componentes de este kit con reactivos o componentes de cualquier otro kit. Este kit está diseñado para funcionar correctamente según las instrucciones provistas.
- c. NO pipetee los reactivos con la boca.
- d. Todos los especímenes de plasma deben considerarse potencialmente infecciosos. Por lo tanto debe ejercer las precauciones de manipulación apropiadas.
- e. NO fume, coma o beba en áreas donde se están manejando especímenes o reactivos.
- f. Use técnicas asépticas al abrir y retirar los reactivos de los frascos y/o botellas.
- g. Mantenga la placa cubierta excepto cuando agregue reactivos, lave o tome lecturas. Utilice una cinta de sellado nueva entre cada paso.
- h. Los componentes del kit deben ser refrigerados en todo momento cuando no estén en uso.
- i. Mantenga los reactivos provistos en hielo durante los diferentes pasos del ensayo.

- j. Evite la creación de burbujas en la placa de ELISA al momento de hacer la lectura en el lector de placas ya que estas interfieren con la detección de la reacción.
- k. Asegúrese de utilizar los materiales según recomendados.

## 5. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Al ser recibido, almacene los componentes desde -18°C a -22°C.

## 6. MATERIALES PROPORCIONADOS

| Material                                                                            | Cantidad                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| Micro-plato <b>CD5L</b> (96 pozos por plato)*                                       | 1 plato                                  |
| Micro-plato <b>IGFBP3</b> (96 pozos por plato)*                                     | 1 plato                                  |
| Micro-plato <b>APOA4</b> (96 pozos por plato)*                                      | 1 plato                                  |
| Estándar <b>CD5L</b>                                                                | 1 vial                                   |
| Estándar <b>IGFBP3</b>                                                              | 1 vial                                   |
| Estándar <b>APOA4</b>                                                               | 1 vial                                   |
| Anticuerpo de detección biotilado <b>CD5L</b>                                       | 1 vial                                   |
| Anticuerpo de detección biotilado <b>IGFBP3</b>                                     | 1 vial                                   |
| Anticuerpo de detección biotilado <b>APOA4</b>                                      | 1 vial                                   |
| Diluyente de muestra                                                                | 1 vial                                   |
| Enzima de detecccion (estreptavidina y HRP)                                         | 1 vial                                   |
| Tabletas de o-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD) SIGMA, Núm. De catálogo: P9187 | 4 tabletas (2 color oro y 2 color plata) |
| Tris Buffer saline (TBS)                                                            | 2 bolsas                                 |

\* Las placas están listas para añadir los especímenes de los pacientes. ¡NO LAVAR!

## 7. MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Agua desionizada ASTM Tipo II (ddH<sub>2</sub>O).
- Reactivo de Tween 20 (T-20).
- Pipetas de precisión, debidamente calibradas, que van desde 10 µl – 1000 µl con puntas desechables.
- Pipeta multicanal con capacidad para un volumen de 200uL.
- Cilindros graduados de 550 o 1000 mL.
- Microtubos (1.5mL).
- Tubos de 15 mL y 50 mL.

- Botellas de 500 mL.
- Lector de microplacas con capacidad de lectura a 450 nm debidamente calibrado.
- Microcentrífuga.
- Agitador “vortex”.
- Reservorios de poliestireno para reactivos (Distribuidor: VWR, núm. de catálogo: 89094-656).

## 8. COLECCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LA MUESTRA

- Utilizando las técnicas de flebotomía correspondientes, obtenga un tubo de tapa violeta (plasma)
- Centrifugue la muestra para separar el plasma de las células rojas y blancas. Evite utilizar muestras hemolizadas.
- **Almacene los componentes desde -18°C a -22°C.**

## 9. TÉCNICAS DE PIPETEO EFECTIVO PARA REALIZAR ESTA PRUEBA

- Para asegurar la reproducibilidad de los resultados, las técnicas de pipeteo deben ser uniformes a través de la prueba. Por esta razón recomendamos lo siguiente:
- Antes de abrir las muestras o los estándares provistos, los tubos deben ser centrifugados a 2,000 x g, por 5 segundos. Esto evitara la perdida de muestra.
- Inserte el “tip” en la solución sin tocar el fondo del tubo. Trate de aspirar lo más cercano a la superficie posible sin aspirar aire ni crear burbujas.
- Cuando haya aspirado el volumen requerido, pause unos segundos antes de retirar el “tip” de la solución.
- Al momento de dispensar, hágalo lentamente hasta que expulse la burbuja final.
- Mezcle la muestra por pipeteo (de 6 a 7 veces) o “vortex” hasta que la solución este completamente homogénea. En caso de utilizar el “vortex”, deje reposar la solución por 20 segundos.
- Cuando se añadan las muestras a las fosas de la placa, evite tocar cualquier superficie.

## 10. PREPARACIÓN DE ENSAYO

### 10.1. Solucion Salina Amortiguadora (TBS) tabla 1.

**Tabla 1.** Preparación del paquete de solución salina (TBS) para dos casos diferentes.

| 48 pocillos o menos por placa por analito |                              | 49 pocillos o más por placa por analito |                              |
|-------------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------|
| Paquete de Solucion Salina (TBS)          | Cantidad de agua desionizada | Paquete de Solucion Salina (TBS)        | Cantidad de agua desionizada |
| 1 paquete                                 | 500 mL                       | 2 paquetes                              | 1000 mL                      |

**Nota:** La solución es estable durante **tres semanas** si se conserva en nevera (entre 2 °C y 5 °C). Mezcle bien. Evite la formación de espuma. Retire la solución del refrigerador y llévela a temperatura ambiente antes de usarla nuevamente. Verificar que no queden residuos, si los hubiera, homogeneizar o filtrar antes de utilizar.

### 10.2. Preparacion del TBS-T solución de lavado (TBS con 0.05% de Tween-20) tabla 2.

**Tabla 2.** Preparación del amortiguador de lavado TBS-T para dos casos diferentes.

| 48 pocillos o menos por placa por analito |          | 49 pocillos o más por placa por analito |          |
|-------------------------------------------|----------|-----------------------------------------|----------|
| TBS                                       | Tween-20 | TBS                                     | Tween-20 |
| 250 mL                                    | 0.125 mL | 500 mL                                  | 0.250 mL |

**Nota:** La solución es estable **24 horas** si se almacena en un refrigerador (2°C a 5°C). Mezcle bien. Evite la formación de espuma. Retire la solución del refrigerador y llévela a temperatura ambiente antes de usarla nuevamente. Verificar que no queden residuos, si los hubiera, homogeneizar antes de utilizar.

### 10.3. Preparación de la Solución Diluyente tabla 3.

**Tabla 3.** Preparación del diluyente de muestra para dos casos diferentes.

| 48 pocillos o menos por placa por analito |                                                  | 49 pocillos o más por placa por analito |                                                  |
|-------------------------------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------------|
| TBS-T                                     | Stabilcoat immunoassay stabilizer 5x concentrate | TBS-T                                   | Stabilcoat immunoassay stabilizer 5x concentrate |
| 250 mL                                    | 0.250 mL                                         | 500 mL                                  | 0.500 mL                                         |

**Nota:** La solución es estable **24 horas** si se almacena en un refrigerador (2°C a 5°C). Mezcle bien. Evite la formación de espuma. Retire la solución del refrigerador y llévela a

temperatura ambiente antes de usarla nuevamente. Verifique que no queden residuos, antes de usar.

#### 10.4. Preparación de la Solución de Detección (SA:HRP) tabla 4.

**Tabla 4.** Preparación de la Solución de Detección de muestra para dos casos diferentes.

| 48 pocillos o menos por placa por analito |                | 49 pocillos o más por placa por analito |                |
|-------------------------------------------|----------------|-----------------------------------------|----------------|
| SA: HRP Solution                          | Sample diluent | SA: HRP Solution                        | Sample diluent |
| 144 µL                                    | 14.256 mL      | 288 µL                                  | 28.512 mL      |

**Nota:** Descongelar en hielo o entre 2 °C y 5 °C para mantener su integridad. Preparar justo antes de usar. Mezcle bien. Evite la formación de espuma. Descarte cualquier sobrante de la solución.

#### 10.5. Preparación de la Solución de Sustrato tabla 5.

10.5.1. Dependiendo de la cantidad de pozos, tome una o dos tabletas envueltas en papel de aluminio dorado y plateado de la caja SIGMAFAST™ OPD (Sigma cat no. P9187) y llévelas a temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

**Tabla 5.** Preparación de la Solución de Sustrato para dos casos diferentes.

| 48 pocillos o menos por placa por analito    |           | 49 pocillos o más por placa por analito      |            |
|----------------------------------------------|-----------|----------------------------------------------|------------|
| ddH <sub>2</sub> O                           | 20 mL     | ddH <sub>2</sub> O                           | 40 mL      |
| Tableta envuelta en papel aluminio plateado  | 1 tableta | Tableta envuelta en papel aluminio plateado  | 2 tabletas |
| Tableta envuelta en papel de aluminio dorado | 1 tableta | Tableta envuelta en papel de aluminio dorado | 2 tabletas |

10.5.2. Asegúrese de que las tabletas se disuelvan antes de usar (es necesario Vortex).

10.5.3. La solución de sustrato debe usarse dentro de los 15 minutos posteriores a la mezcla.

10.5.4. Deseche cualquier solución no utilizada.

## 10.6. Preparación de los Estándares Proteicos tabla 6.

**NOTA:** Cada kit contiene 3 tubos de stocks de proteína estándar: CD5L (10 ug/mL), IGFBP3 (100 ug/mL) y APOA4 (15 ug/mL). **Los estándares de proteína son estables hasta por dos procesos de descongelación si se descongelan en hielo o entre 2 °C y 5 °C.** Después de su uso, deben llevarse a una temperatura de -16°C a -24°C para mantener su integridad.

10.6.1. Para cada analito, tome 5 tubos de 1.5 mL y etiquételos secuencialmente, un tubo será el control negativo (tubo #5).

10.6.2. Agregue los volúmenes de diluyente de muestra preparados en el paso 10.3, de acuerdo con la tabla 6. Al final, deben quedar 5 tubos por analito (CD5L, IGFBP3, APOA4). Mantenga los tubos separados por analito.

10.6.3. Diluya cada estándar de proteína de analito agregando 10 µL de la reserva de proteína estándar a los 990 µL de diluyente dispensada en el tubo #1 de cada analito (CD5L, IGFBP3, APOA4). Mezclar por vortex.

10.6.4. Prepare diluciones en serie de cada estándar de proteína siguiendo la tabla 6 y consultando la Figura 1.

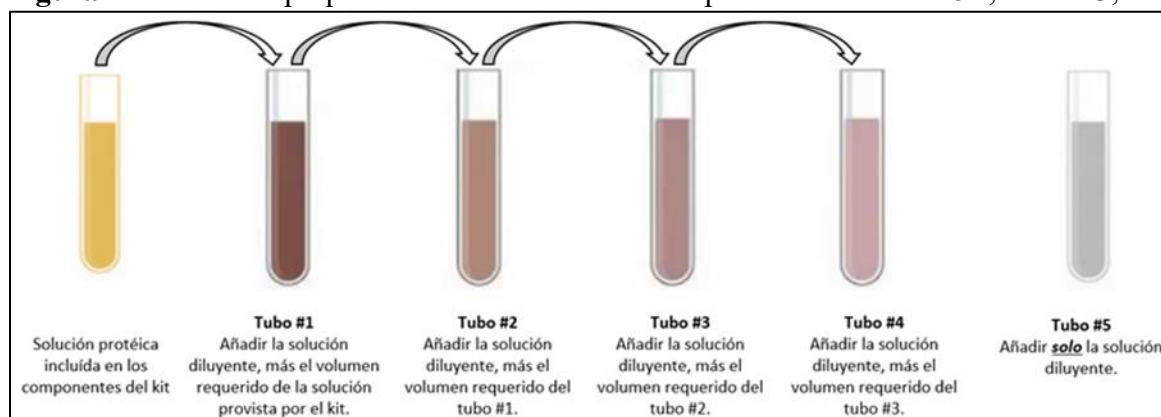
10.6.5. Transfiera el volumen indicado en la tabla 6 del Tubo #1 al Tubo #2. Mezclar por vortex.

10.6.6. Transfiera el volumen indicado en la tabla 6 del Tubo #2 al Tubo #3. Mezclar por vortex.

10.6.7. Transfiera el volumen indicado en la tabla 6 del Tubo #3 al Tubo #4. Mezclar por vortex.

10.6.8. Asegúrese de que no se hayan realizado transferencias al tubo #5, ya que este es el control negativo (punto cero) de la curva estándar.

**Figura 1.** Modelo de preparación de solución en serie para estándares CD5L, IGFBP3, APOA4



**Tabla 6.** Volúmenes para la preparación de soluciones estándar para CD5L, IGFBP3, APOA4

| Número de tubo  | Volumen de diluyente de muestra para agregar a cada tubo | Volumen de Solución de Proteína a añadir | Concentración teórica del analito |
|-----------------|----------------------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------|
| 1 CD5L          | 990 µL                                                   | 10 µL de proteína Std CD5L               | 100.00 ng/mL                      |
| 2 CD5L          | 600 µL                                                   | 200 µL tubo 1                            | 25.00 ng/mL                       |
| 3 CD5L          | 600 µL                                                   | 200 µL tubo 2                            | 6.25 ng/mL                        |
| 4 CD5L          | 600 µL                                                   | 200 µL tubo 3                            | 1.60 ng/mL                        |
| 5 CD5L blanco   | 300 µL                                                   | 0 µL                                     | 0 ng/mL                           |
| 1 IGFBP3        | 990 µL                                                   | 10 µL de proteína Std IGFBP3             | 1000.00 ng/mL                     |
| 2 IGFBP3        | 500 µL                                                   | 100 µL tubo 1                            | 167.00 ng/mL                      |
| 3 IGFBP3        | 500 µL                                                   | 100 µL tubo 2                            | 27.80 ng/mL                       |
| 4 IGFBP3        | 500 µL                                                   | 100 µL tubo 3                            | 4.63 ng/mL                        |
| 5 IGFBP3 blanco | 300 µL                                                   | 0 µL                                     | 0 ng/mL                           |
| 1 APOA4         | 990 µL                                                   | 10 µL de proteína Std APOA4              | 150.00 ng/mL                      |
| 2 APOA4         | 600 µL                                                   | 200 µL tubo 1                            | 37.50 ng/mL                       |
| 3 APOA4         | 600 µL                                                   | 200 µL tubo 2                            | 9.37 ng/mL                        |
| 4 APOA4         | 600 µL                                                   | 200 µL tubo 3                            | 2.34 ng/mL                        |
| 5 APOA4 blanco  | 300 µL                                                   | 0 µL                                     | 0 ng/mL                           |

### 10.7. Preparación de la solución de anticuerpos de detección tabla 7.

**Nota:** Cada kit contiene 3 tubos de stocks de anticuerpos de detección. Los anticuerpos de detección son estables hasta dos procesos de descongelación si se descongelan en hielo o entre 2 °C y 5 °C. Después de su uso, deben llevarse a una temperatura de -16°C a -24°C para mantener su integridad.

10.7.1. Etiquete tres tubos de centrifuga de 15 ml para identificar cada uno según su analito (CD5L, IGFBP3, APOA4).

10.7.2. El anticuerpo de detección que se usará para cada analito se prepara usando una dilución de 1:100 en el diluyente de la muestra.

10.7.3. Siga la tabla 7 para generar suficiente volumen para 48 pocillos o menos por placa o 49 pocillos o más por placa.

**Tabla 7.** Preparación de anticuerpos de detección para cada analito

|                           | 48 pocillos o menos por placa por analito |                                    | 49 pocillos o más por placa por analito |                                    |
|---------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------|
|                           | Volumen de diluyente de muestra           | Volumen de anticuerpo de detección | Volumen de diluyente de muestra         | Volumen de anticuerpo de detección |
| CD5L ( <b>rojo</b> )      | 4950 µL                                   | 50 µL                              | 9900 µL                                 | 100 µL                             |
| IGFBP3 ( <b>azul</b> )    | 4950 µL                                   | 50 µL                              | 9900 µL                                 | 100 µL                             |
| APOA4 ( <b>amarillo</b> ) | 4950 µL                                   | 50 µL                              | 9900 µL                                 | 100 µL                             |

### 10.8. Preparación de Muestras de Pacientes

10.8.1. Toda muestra de los pacientes debe ser preparada en tres diluciones distintas; una por cada analito (CD5L, IGFBP3, APOA4).

10.8.2. Tome 3 tubos por cada paciente e identifíquelos con respecto a su número de paciente y analito. Ver tabla 8 para realizar cada dilución.

Tabla 8. Preparación de Plasma de Pacientes

| Analito                   | Cantidad de diluyente | Cantidad de plasma |
|---------------------------|-----------------------|--------------------|
| CD5L ( <b>rojo</b> )      | 285 $\mu\text{L}$     | 15 $\mu\text{L}$   |
| IGFBP3 ( <b>azul</b> )    | 200 $\mu\text{L}$     | 50 $\mu\text{L}$   |
| APOA4 ( <b>amarillo</b> ) | 495 $\mu\text{L}$     | 5 $\mu\text{L}$    |

## 11. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

**Nota:** Cada kit contiene 3 placas, una para cada anticuerpo (CD5L, IGFBP3, APOA4); cada placa es estable hasta dos procesos de descongelación. Después de su uso, deben llevarse a una temperatura de  $-16^{\circ}\text{C}$  a  $-24^{\circ}\text{C}$  para mantener su integridad.

- Equilibrar todos los materiales y reactivos preparados a temperatura ambiente antes de su uso.
- Se recomienda ensayar todos los estándares en duplicado y las muestras sencillas.

11.1. Para la adición de estándares proteicos y control negativo.

11.1.1. **Adición de estándar CD5L.** En la placa CD5L (**punto rojo**), agregue por duplicado 100  $\mu\text{L}$  de cada uno de los estándares preparados en la sección 10.6 a los pozos apropiados.

11.1.2. **Adición de estándar IGFBP3.** En la placa IGFBP3 (**punto azul**), agregue por duplicado 100  $\mu\text{L}$  de cada uno de los estándares preparados en la sección 10.6 a los pozos apropiados.

11.1.3. **Adición de estándar APOA4.** En la placa APOA4 (**punto amarillo**), agregue por duplicado 100  $\mu\text{L}$  de cada uno de los estándares preparados en la sección 10.6 a los pozos apropiados.

11.2. Adición de muestras de pacientes

11.2.1. Añada de manera sencilla el plasma del paciente previamente diluido según la sección 10.8 para cada analito, añada 100  $\mu\text{L}$  de cada muestra en el pozo correspondiente en la placa.

- 11.3. Cubra cada placa con cinta de sellado e incube por **1 hora** a temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ).
- 11.4. Luego del periodo de incubación, remueva la cinta de sellado para microplacas y decante las soluciones de la placa(s) en un lugar apropiado.
- 11.5. Para lavar, añada 200  $\mu\text{L}$  de TBS-T a cada fosa y decante la solución. Repita el proceso un total de tres veces. Se recomienda el uso de una pipeta multicanal. Seque suavemente la placa con una toalla de papel limpia.
- 11.6. Adición de anticuerpos de detección.
- 11.6.1. **Adición de anticuerpos de detección de CD5L.** En la placa de CD5L (**punto rojo**), agregue 100  $\mu\text{L}$  a cada pocillo de la solución de detección de anticuerpos preparada en la sección 10.7.
- 11.6.2. **Adición de anticuerpos de detección de IGFBP3.** En la placa de IGFBP3 (**punto azul**), agregue 100  $\mu\text{L}$  a cada pocillo de la solución de detección de anticuerpos preparada en la sección 10.7.
- 11.6.3. **Adición de anticuerpos de detección de IGFBP3.** En la placa de IGFBP3 (**punto amarillo**), agregue 100  $\mu\text{L}$  a cada pocillo de la solución de detección de anticuerpos preparada en la sección 10.7.
- 11.7. Cubra cada placa con cinta de sellado e incube por **30 minutos** a temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ).
- 11.8. Luego del periodo de incubación, remueva la cinta de sellado para microplacas y decante las soluciones de la placa(s) en un lugar apropiado.
- 11.9. Para lavar, añada 200  $\mu\text{L}$  de TBS-T a cada pocillo y decante la solución. Repita el proceso un total de tres veces. Se recomienda el uso de una pipeta multicanal. Seque suavemente la placa con una toalla de papel limpia.
- 11.10. **Adición de la solución de detección.**
- 11.10.1. A cada placa (CD5L, IGFBP3, APOA4), agregue 100  $\mu\text{L}$  de la solución de detección preparada en la sección 10.4 a cada pocillo. Asegúrese de agitar la solución antes de agregarla a los pocillos. Pero evita hacer espuma.

11.11. Sellar la placa e incubar durante **30 minutos** a temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ), protegida de la luz directa.

11.12. Luego del periodo de incubación, remueva la cinta de sellado para microplacas y decante las soluciones de la placa(s) en un lugar apropiado.

11.13. Para lavar, añada 200  $\mu\text{L}$  de TBS-T a cada pocillo y decante la solución. Repita el proceso un total de tres veces. Se recomienda el uso de una pipeta multicanal. Seque suavemente la placa con una toalla de papel limpia.

#### 11.14. Adición de la solución de sustrato.

11.14.1. A cada placa (CD5L, IGFBP3, APOA4), agregue 100  $\mu\text{L}$  de solución de sustrato de OPD (consulte la sección 10.5) a cada pocillo.

11.15. Sellar la placa e incubar durante **1 hora** a temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ), protegida de la luz directa.

11.16. Después de la incubación, determine inmediatamente la densidad óptica (OD) de toda la placa utilizando un lector de microplacas ajustado a **450 nm**.

**Precaución:** La lectura de OD debe realizarse inmediatamente después de la incubación para evitar errores.

## 12. CÁLCULOS

Obtener la media de los OD de los estándares para poder construir la curva de calibración de cada analito. Se utiliza la metodología de sustracción de fondo (“conocida en la industria como: “método de sustracción en blanco”), únicamente para los resultados correspondientes a los analitos IGFBP3 y APOA4. No aplica para CD5L. Luego, se interpolan los datos de densidad óptica de los pacientes, utilizando la mejor curva (“best fit”) entre hiperbólica o sigmoidal para cada analito. Este valor interpolado se multiplica por el factor de dilución de la muestra, dando el resultado final en  $\text{ng/mL}$  (tabla 9.). El programa sugerido para calcular las concentraciones es: GraphPad Prism ultima versión.

**Tabla 9.** Factores de dilución y curvas de cada analito

| Analito                   | Curva de interpolación | Factor de dilución |
|---------------------------|------------------------|--------------------|
| CD5L ( <b>roja</b> )      | Hipérbola o Sigmoidal  | 1:20               |
| IGFBP3 ( <b>azul</b> )    | Hipérbola o Sigmoidal  | 1:5                |
| APOA4 ( <b>amarillo</b> ) | Hipérbola o sigmoidal  | 1:100              |

### 13. CRITERIOS DE ACEPTACION

**Tabla 10.** Los criterios de aceptación de Innovatio ND2 se describen en la siguiente

| Analito | Parámetro                                                                | Criterio de aceptación |
|---------|--------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| CD5L    | Coeficiente de correlación ( $R^2$ )                                     | $\geq 0.95$            |
|         | 100.00, 25.00, 6.25, 1.56 ng/mL concentración de estándares proteicos    | *Recobro de 80-120%    |
| IGFBP3  | Coeficiente de correlación ( $R^2$ )                                     | $\geq 0.95$            |
|         | 1000.00, 166.70, 27.80, 4.63 ng/mL concentración de estándares proteicos | *Recobro de 80-120%    |
| APOA4   | Coeficiente de correlación ( $R^2$ )                                     | $\geq 0.95$            |
|         | 150.00, 37.50, 9.37, 2.34 ng/mL concentración de estándares proteicos    | *Recobro de 80-120%    |

\*Porcentaje de recobro = concentración experimental del estándar / concentración teórica del estándar por cien. Ejemplo con estándar CD5L,  $(103 \text{ ng/mL} / 100 \text{ ng/mL}) \times 100 = 103\%$ .

### 14. RANGO DE DETECCIÓN

El rango de detección de este método analítico, es el intervalo entre la mayor y menor concentración del analito detectable por el ELISA. Los límites de detección y cuantificación para CD5L, IGFBP3 y APOA4 fueron determinados con una serie de diluciones estándares en un rango desde 1000 ng/mL a 1.6 ng/mL, incluyendo un valor de cero. Basado en los valores de entrada (estándar cero), el rango de detección fue establecido como:

| Analito | Rango de calibración |
|---------|----------------------|
| CD5L    | 1.6 – 100 ng/mL      |
| IGFBP3  | 4.6 – 1000 ng/mL     |
| APOA4   | 2.3 – 150 ng/mL      |

### 15. ESPECIFICIDAD

La especificidad de los anticuerpos utilizados en esta prueba, fue establecida por el HuProt™ Human Protein Array, de CDI Laboratories, Inc. En este análisis, cada anticuerpo fue probado en un array con más de 20,000 proteínas en la superficie, representando aproximadamente el 81% del proteoma humano. Para ser considerado específico, un anticuerpo debe reconocer su analito por

encima de todas las otras proteínas en el array. La intensidad de la señal de la interacción se mide a que por lo menos se encuentre 3 desviaciones estándares (SD) por encima de la próxima interacción. La tabla a continuación, enseña los valores obtenidos por cada uno de los anticuerpos en este kit:

| <b>Anticuerpo</b>              | <b>Numero de desviaciones estándares detectados</b> |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Anticuerpo de captura CD5L     | 123.15                                              |
| Anticuerpo de captura IGFBP3   | 134.66                                              |
| Anticuerpo de captura APOA4    | 140.60                                              |
| Anticuerpo de detección CD5L   | 132.87                                              |
| Anticuerpo de detección IGFBP3 | 133.70                                              |
| Anticuerpo de detección APOA4  | 49.42                                               |

## 16. SENSITIVIDAD

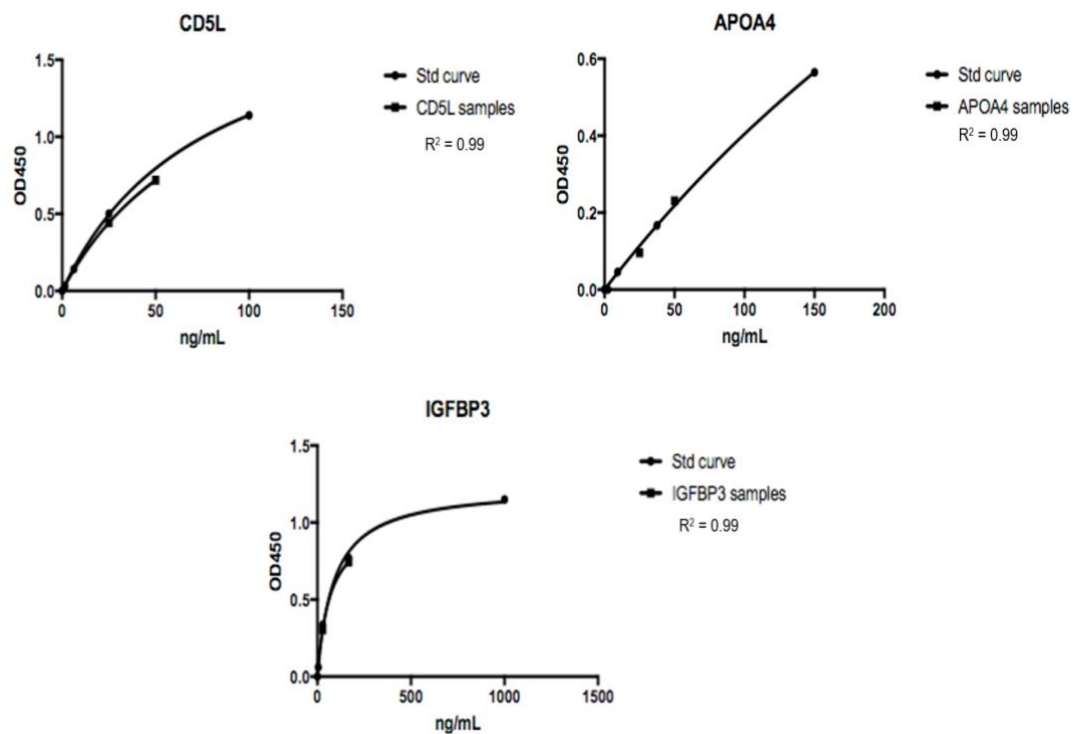
Al utilizar estos pares de anticuerpos para detectar cada analito independiente, se determinó la sensibilidad de la metodología mediante el uso de un gradiente de proteína recombinante en solución. De este modo se pudo establecer los valores:

| Analito | Sensitividad |
|---------|--------------|
| CD5L    | 0.8 ng/mL    |
| IGFBP3  | 2.3 ng/mL    |
| APOA4   | 1.15 ng/mL   |

## 17. LINEARIDAD

La linealidad establecida en esta prueba, es la habilidad de obtener resultados proporcionales a la concentración del analito en la muestra. Cada uno de los biomarcadores fue analizado mediante diluciones seriadas del analito y determinando la concentración de la muestra mediante regresión lineal, donde el valor obtenido fue comparado con el valor esperado. A continuación se encuentran las tablas y graficas obtenida durante el desarrollo de la prueba.

| <b>Valor esperado para CD5LCD5L</b> | <b>Valor actual para CD5L</b> | <b>Valor esperado para IGFBP3</b> | <b>Valor actual para IGFBP3</b> | <b>Valor esperado para APOA4</b> | <b>Valor actual para APOA4</b> |
|-------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| 50 ng/mL                            | 46.46                         | 166.7 ng/mL                       | 133.22                          | 50 ng/mL                         | 47.36                          |
| 25 ng/mL                            | 22.75                         | 27.8 ng/mL                        | 28.63                           | 25 ng/mL                         | 20.95                          |



## **18. POSIBLES CAUSAS DE RESULTADOS ATÍPICOS**

### **18.1. Poca o ninguna señal.**

- 18.1.1. Reactivos no están a temperatura ambiente.
- 18.1.2. Reactivos expirados
- 18.1.3. Diluciones preparadas incorrectamente.
- 18.1.4. Tiempo insuficiente de incubación tanto con el anticuerpo de captura, como el de detección. Por tanto, no fueron enlazados correctamente.
- 18.1.5. Fosas fueron raspadas con la pipeta.
- 18.1.6. Lectura del plato fue hecha a un largo de onda distinto al recomendado.

### **18.2. Demasiada señal o interferencia.**

- 18.2.1. No se lavó debidamente la placa.
- 18.2.2. Substrato fue expuesto por largo tiempo a la luz.
- 18.2.3. Demasiado tiempo de incubación.
- 18.2.4. Diluciones de la curva estándar no fueron correctamente preparadas.

### **18.3. Curva estándar no apta para cuantificar las muestras.**

- 18.3.1. Diluciones no fueron correctamente preparadas.
- 18.3.2. Insuficiente tiempo de incubación tanto con el anticuerpo de captura, como el de detección. Por tanto, no fueron enlazados correctamente.

### **18.4. Inconsistencia entre pruebas de pacientes o repeticiones del mismo paciente.**

- 18.4.1. Lavados insuficientes.
- 18.4.2. Inconsistencia en las temperaturas de incubación.
- 18.4.3. El plato no fue cubierto efectivamente.
- 18.4.4. Diluciones incorrectamente preparadas.
- 18.4.5. Reactivos de detección o anticuerpos secundarios perdieron efectividad.
- 18.4.6. Kit expirado.

### **18.5. Efecto de borde.**

- 18.5.1. Temperatura más alta de la recomendada ( $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) en el laboratorio.
- 18.5.2. La cinta de sellado no se adhirió uniformemente al plato.