



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

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

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 pozos 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.

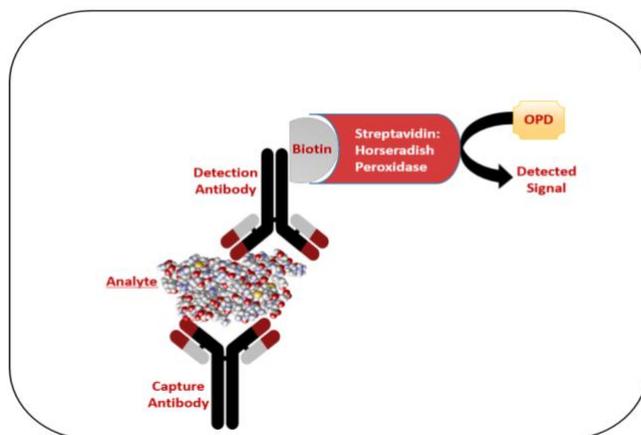


Figura.1: Modelo de la reacción antígeno-anticuerpo

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 CD5L (96 pozos por plato)*	1 plato
Micro-plato IGFBP3 (96 pozos por plato)*	1 plato
Micro-plato APOA4 (96 pozos por plato)*	1 plato
Estándar CD5L	1 vial
Estándar IGFBP3	1 vial
Estándar APOA4	1 vial
Anticuerpo de detección biotilado CD5L	1 vial
Anticuerpo de detección biotilado IGFBP3	1 vial
Anticuerpo de detección biotilado APOA4	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 las muestras de plasma de los pacientes. ¡NO LAVAR!

7. MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Agua desionizada ASTM Tipo II (ddH₂O).
- Reactivo de Tween 20 (T-20).
- Micropipetas de precisión, debidamente calibradas, que van desde 10 µl – 1000 µl con puntas desechables.
- Pipeta multicanal con capacidad para un volumen de rangos entre 100 - 200uL.
- Puntas de micropipetas de: 10 uL, 20 uL, 100 uL, 200 uL, and 1000 uL
- Cilindros graduados 1000 mL.

- Pipeta serologica descartable de 10 mL
- Microtubes (1.5mL).
- Tubos de centrifugas de 15 mL y 50 mL, descartables, de polietileno o polipropileno
- 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. Solución Salina Amortiguadora (TBS) tabla 1.

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

48 pozos o menos por placa por analito		49 pozos o más por placa por analito	
Paquete de Solución Salina (TBS)	Cantidad de agua desionizada	Paquete de Solución 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. Preparación 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 pozos o menos por placa por analito		49 pozos 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 para muestras, tabla 3.

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

48 pozos o menos por placa por analito		49 pozos 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 pozos o menos por placa por analito		49 pozos 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 catálogo Nro. P9187) y llévelas a temperatura ambiente (25 ± 2°C).

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

48 pozos o menos por placa por analito		49 pozos o más por placa por analito	
ddH ₂ O	20 mL	ddH ₂ 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 mostrada a continuación). 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

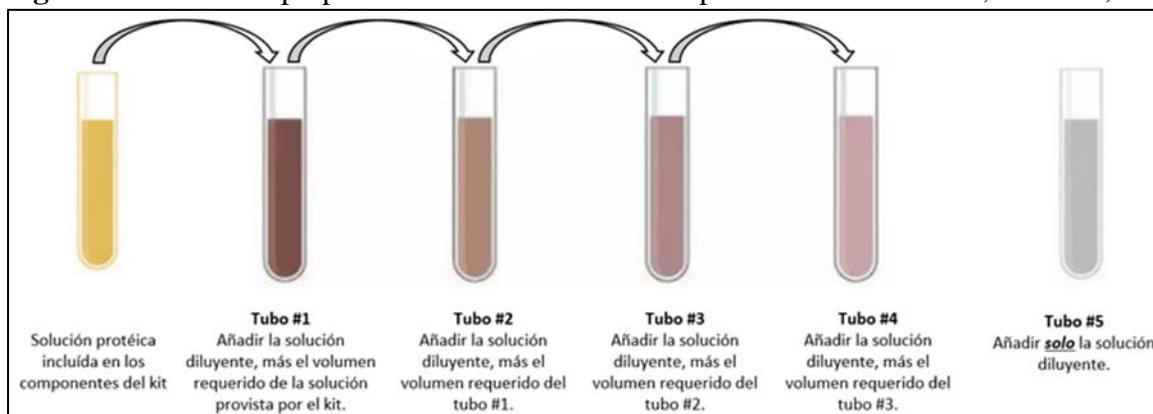


Tabla 6. Volúmenes para la preparación de soluciones estándar para CD5L, IGFBP3, APOA4

Número de tubo	Volumen de diluyente de muestra para agregar a cada tubo	Volumen de Solución de Proteína por añadir	Concentración teórica del analito
1 CD5L	990 μ L	10 μ L de proteína Std CD5L	100.00 ng/mL
2 CD5L	600 μ L	200 μ L tubo 1	25.00 ng/mL
3 CD5L	600 μ L	200 μ L tubo 2	6.25 ng/mL
4 CD5L	600 μ L	200 μ L tubo 3	1.60 ng/mL
5 CD5L blanco	300 μ L	0 μ L	0 ng/mL
1 IGFBP3	990 μ L	10 μ L de proteína Std IGFBP3	1000.00 ng/mL
2 IGFBP3	500 μ L	100 μ L tubo 1	167.00 ng/mL
3 IGFBP3	500 μ L	100 μ L tubo 2	27.80 ng/mL
4 IGFBP3	500 μ L	100 μ L tubo 3	4.63 ng/mL
5 IGFBP3 blanco	300 μ L	0 μ L	0 ng/mL
1 APOA4	990 μ L	10 μ L de proteína Std APOA4	150.00 ng/mL
2 APOA4	600 μ L	200 μ L tubo 1	37.50 ng/mL
3 APOA4	600 μ L	200 μ L tubo 2	9.37 ng/mL
4 APOA4	600 μ L	200 μ L tubo 3	2.34 ng/mL
5 APOA4 blanco	300 μ L	0 μ L	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 pozos o menos por placa o 49 pozos o más por placa.

Tabla 7. Preparación de anticuerpos de detección para cada analito

	48 pozos o menos por placa por analito		49 pozos 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 (rojo)	4950 µL	50 µL	9900 µL	100 µL
IGFBP3 (azul)	4950 µL	50 µL	9900 µL	100 µL
APOA4 (amarillo)	4950 µL	50 µL	9900 µL	100 µL

10.8. Preparación de Muestras de Pacientes

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°C a -24°C para mantener su integridad.

Después de que cada placa (CD5L, IGFBP3, APOA4) haya alcanzado la temperatura ambiente, retire la tapa de la placa de los pozos que vaya a utilizar y el resto de los pozos deben mantenerse tapados.

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 7 para realizar cada dilución.

Tabla 7. Preparación de anticuerpos de detección para cada analito

Analito	Cantidad de diluyente	Cantidad de plasma
CD5L (rojo)	995 μ L	5 μ L
IGFBP3 (azul)	245 μ L	5 μ L
APOA4 (amarillo)	1.245 mL	5 μ 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°C a -24°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, siga los siguientes pasos:

11.1.1. **Adición de estándar CD5L.** En la placa CD5L (**punto rojo**), agregue por duplicado 100 μ 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 μ 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 µL 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 µL 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 período 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 µL de TBS-T a cada pozo 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 µL a cada pozo 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 µL a cada pozo 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 µL a cada pozo 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 μL de TBS-T a cada pozo 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.

NOTE: antes de usar, verifique que no haya partículas suspendidas en la solución.

11.10.1. A cada placa (CD5L, IGFBP3, APOA4), agregue 100 μL de la solución de detección preparada en la sección 10.4 a cada pozo. Asegúrese de agitar la solución antes de agregarla a los pozos. 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 μL de TBS-T a cada pozo 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 μL de solución de sustrato de OPD (consulte la sección 10.5) a cada pozo.

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

11.15.1. **NOTA IMPORTANTE:** transcurridos 30 minutos de la incubación del sustrato, asegúrese de encender el espectrofotómetro para que esté listo antes de proceder con las lecturas de OD.

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 prevenir 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 hipérbolica o sigmoideal para cada analito. Este valor interpolado se multiplica por el factor de dilución de la muestra, dando el resultado final en ng/mL (tabla 8.). El programa sugerido para calcular las concentraciones es: GraphPad Prism última versión.

Tabla 8. Factores de dilución y curvas de cada analito

Analito	Curva de interpolación	Factor de dilución
CD5L (roja)	Hipérbola o Sigmoideal	1:200
IGFBP3 (azul)	Hipérbola o Sigmoideal	1:50
APOA4 (amarillo)	Hipérbola o sigmoideal	1:250

13. CRITERIOS DE ACEPTACION

Tabla 9. Los criterios de aceptación de Innovatio ND2 se describen en la siguiente

Analito	Parámetro	Criterio de aceptación
CD5L	Coefficiente de correlación (R^2)	≥ 0.95
	100.00, 25.00, 6.25, 1.56 ng/mL concentración de estándares proteicos	*Recobro de 80-120%
IGFBP3	Coefficiente de correlación (R^2)	≥ 0.95
	1,000.00, 166.70, 27.80, 4.63 ng/mL concentración de estándares proteicos	*Recobro de 80-120%
APOA4	Coefficiente de correlación (R^2)	≥ 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:

Anticuerpo	Numero de desviaciones estándares detectados
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

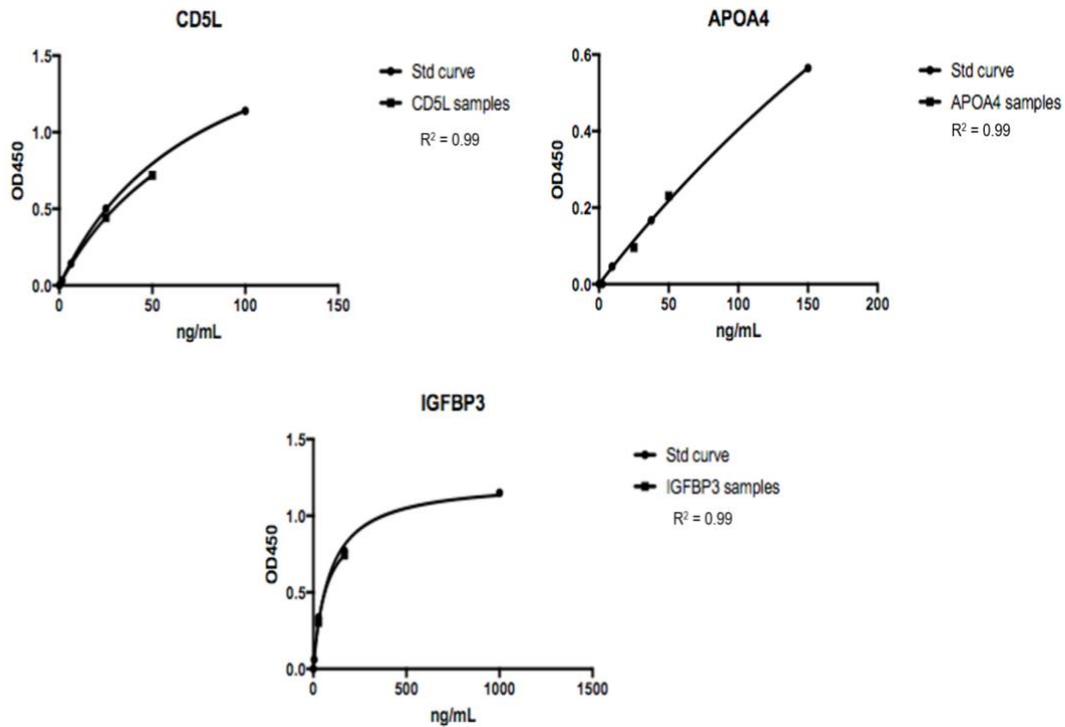
Al utilizar estos pares de anticuerpos para detectar cada analito independiente, se determinó la sensibilidad de la metodología mediante el uso de un gradiente de proteína recombinante en solución. De este modo se pudo establecer los valores:

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

17. LINEALIDAD

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.

Valor esperado para CD5LCD5L	Valor actual para CD5L	Valor esperado para IGFBP3	Valor actual para IGFBP3	Valor esperado para APOA4	Valor actual para APOA4
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.