



Titulación de reactivos en el ELISA IgM para el zika

Cuando se reciben nuevos reactivos, ya sea de los CDC o de fuentes comerciales, es posible que vengan con diluciones de trabajo sugeridas en el prospecto. **Estas diluciones se deben verificar de manera independiente en su laboratorio y se deben ajustar según resulte necesario.**

Antes de iniciar una prueba de detección en su laboratorio, verifique que cuenta con el tipo de placa de microtitulación que figura en las instrucciones (usar otro tipo de placas puede causar problemas), verifique que sus amortiguadores sean frescos y estén correctamente preparados (revise los pH), y verifique que ninguno de los reactivos comerciales (especialmente el TMB) esté vencido.

La mejor metodología es **hacer una prueba con los sueros de control únicamente** (es decir, sin muestras de capacidad) **y las diluciones sugeridas en el prospecto**. Los resultados deseables son aquellos en los que el control positivo tiene un DO 450 de aproximadamente 1,0 y el control negativo tiene un DO de aproximadamente 0,05-0,1. El negativo siempre debería ser inferior a 0,2; el positivo puede variar, pero siempre debe ser superior a 0,5.

Si los resultados se encuentran dentro de los límites deseables, no es necesario hacer ningún otro ajuste. Si la prueba inicial no arroja los resultados deseables, debe continuar con la titulación de reactivos.

Titule los reactivos de a uno en el siguiente orden: anticuerpo de sensibilización, conjugado, antígeno, control positivo.

Procedimiento de titulación

Titule los reactivos usando una serie de dilución, uno cada vez, en el siguiente orden: anticuerpo de sensibilización, conjugado, antígeno, control positivo.

Anticuerpo de sensibilización

Nota: El anticuerpo de cabra anti-IgM humano KPL catálogo #01-10-03 ha dado resultados consistentes durante años cuando se lo usa en una relación 1:2000; por lo tanto, no debería haber necesidad de titularlo.

Sin embargo, si es necesario, prepare 8 columnas para lo siguiente: En duplicado, control positivo en antígeno viral; control negativo en antígeno viral, control positivo en antígeno normal, control negativo en antígeno normal. Si va a usar otro anticuerpo de sensibilización que no está especificado más arriba, inicie la titulación con una dilución a 1:500 en amortiguador de sensibilización. Añada 150 µl de la dilución de inicio en los pocillos de arriba y diluya en serie bajando por la placa para lograr 6 diluciones dobles (75 ul/pocillo del pocillo anterior + 75 ul de amortiguador de sensibilización para lograr diluciones dobles). Haga el análisis ELISA siguiendo el protocolo y con las diluciones de trabajo sugeridas para el control positivo, el antígeno y el conjugado. Con los resultados, elija una dilución de anticuerpo de sensibilización que arroje un DO de entre 0,80 y 1,0 para el suero de control positivo en el antígeno viral, y uno que tenga un DO de alrededor de 0,1 para el suero de control negativo. El control positivo en el antígeno normal debe estar bastante por debajo del control positivo en el antígeno viral. Siempre use el control suero de **control negativo** a 1:400.

El **antígeno normal** siempre se debe usar con la misma dilución que el antígeno viral.

Conjugado

Con el anticuerpo de sensibilización en la dilución determinada más arriba, siga el protocolo con las diluciones de trabajo sugeridas para el control positivo y el antígeno. Prepare 8 columnas para lo siguiente: En duplicado, control positivo en antígeno viral, control positivo en antígeno normal, control negativo en antígeno viral, control negativo en antígeno normal. Prepare un conjugado en amortiguador de bloqueo en una dilución de trabajo 4 veces inferior a la dilución de trabajo sugerida. Si no hay directrices disponibles, use 1:500 como punto de partida. Añada 100 ul de dilución de inicio a los pocillos de más arriba. Añada 50 ul de amortiguador de bloqueo a todos los demás pocillos y diluya en serie bajando por la placa con diluciones dobles. Para la dilución de trabajo del conjugado, elija una que arroje un DO de entre 0,8 y 1,0 para el suero de control positivo en el antígeno viral, y uno que tenga un DO de alrededor de 0,1 para el suero de control negativo. El control positivo en el antígeno normal debe estar bastante por debajo del control positivo en el antígeno viral.

Antígeno

Con el anticuerpo de sensibilización y el conjugado con las diluciones especificadas más arriba, el control positivo usado con la dilución de trabajo sugerida y el control negativo en 1:400, siga el protocolo en el paso del antígeno. Prepare 8 columnas para lo siguiente: En duplicado, control positivo en antígeno viral; control negativo en antígeno viral, control positivo en antígeno normal, control negativo en antígeno normal. Prepare antígeno normal y viral en amortiguador de lavado con una

dilución 4 veces inferior a la dilución de trabajo sugerida para el antígeno viral. Coloque 100 ul del antígeno viral en el pocillo de arriba de dos columnas de control positivas y dos negativas, y coloque 100 ul del antígeno normal en el pocillo de arriba de dos columnas de control positivas y dos negativas. Añada 50 ul de amortiguador de lavado en los otros pocillos. Diluya en serie los antígenos virales y normales de arriba hacia abajo de la placa con diluciones dobles. Para la dilución de trabajo del antígeno, elija una que arroje un DO de entre 0,8 y 1,0 para el suero de control positivo en el antígeno viral, y uno que tenga un DO de alrededor de 0,1 para el control negativo. El control positivo en el antígeno negativo debe estar bastante por debajo del control positivo en el antígeno viral.

Control positivo

Si se usa *suero* de control positivo (como la muestra de un paciente), se puede titular para conservar existencia no diluida o se puede analizar con la misma dilución que los sueros de la prueba (1:400 en amortiguador de lavado). Si se utiliza control positivo de flavivirus quimérico, por lo general resulta útil al 1:3000, pero se puede titular de ser necesario. Siga el protocolo hasta la parte en que se añade el suero con todas las diluciones especificadas anteriormente de otros reactivos, para que el control positivo se pueda titular en duplicado en los antígenos viral y negativo. Inicie la serie de dilución de suero de control positivo en 1: 100 (inicio quimérico en 1:750). Añada 100 µl de anticuerpo diluido en los pocillos de arriba, 50 ul en los siguientes, y diluya en serie doble de arriba hacia abajo de la placa. Termine el procedimiento para determinar la dilución óptima según se especifica arriba.

Realice el control positivo por triplicado con el protocolo de diagnóstico estándar y las diluciones de reactivos especificadas arriba para verificar que el ensayo funcione correctamente.