



## MAC-ELISA para el zika

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades

**Este documento ha sido modificado a partir de la Autorización de uso de emergencia (laboratorios de los EE. UU.) para incluir materiales que utilizan laboratorios que no son estadounidenses. Los laboratorios de los EE. UU. deben consultar el protocolo oficial de la EUA suministrado por la Red de Laboratorios de Respuesta**

**Instrucciones de uso**

# Índice

<b>Introducción.....</b>	<b>3</b>
<b>Especímenes.....</b>	<b>5</b>
<b>Equipos e insumos.....</b>	<b>6</b>
<b>Formulaciones.....</b>	<b>8</b>
<b>Control de calidad.....</b>	<b>9</b>
<b>Algoritmo de pruebas.....</b>	<b>11</b>
<b>Prueba MAC-ELISA para el zika.....</b>	<b>12</b>
<b>Interpretación de los resultados de la prueba.....</b>	<b>16</b>
<b>Limitaciones de la prueba.....</b>	<b>18</b>
<b>Características de desempeño.....</b>	<b>20</b>
<b>Contacto.....</b>	<b>24</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>24</b>

## **Introducción**

### **PROPÓSITO**

Este documento describe el uso del ensayo de inmunoabsorción enzimática (MAC-ELISA) de anticuerpos IgM de captura para la detección presunta de anticuerpos contra el virus del Zika en personas que cumplen con los requisitos clínicos o epidemiológicos de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) para las pruebas del virus del Zika.

Esta prueba solo debe utilizarse según se describe en las directrices de los CDC para hacer pruebas de diagnóstico del virus del Zika y conforme a la autorización de uso de emergencia (EUA, por sus siglas en inglés) de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés). Visite el sitio web de los CDC para ver las directrices vigentes para los laboratorios: <http://www.cdc.gov/zika/state-labs/index.html>. Los laboratorios internacionales no se rigen por estas restricciones.

### **USO PREVISTO**

MAC-ELISA para el Zika, de los CDC, ha sido concebido para utilizarse en la detección cualitativa de anticuerpos IgM contra el virus del Zika en suero o líquido cefalorraquídeo (LCR) de seres humanos que se envía junto con una muestra de suero del paciente, recogida de personas que cumplen con los requisitos clínicos de los CDC para el virus del Zika (p. ej., antecedentes de signos y síntomas clínicos asociados a una infección por el virus del Zika) o los requisitos epidemiológicos de los CDC relacionados con el virus del Zika (p. ej., historial reciente de viajes a regiones geográficas durante un período de transmisión activa del virus del Zika u otros requisitos epidemiológicos que pueden indicarse para las pruebas del virus del Zika como parte de una respuesta de salud pública. El ensayo tiene el objetivo de ser utilizado en laboratorios calificados designados por los CDC, como parte de un algoritmo de múltiples pruebas.

Los resultados del ensayo son para la posible identificación de anticuerpos IgM contra el virus del Zika. Los resultados positivos y equívocos no son definitivos para diagnosticar una infección por el virus del Zika. Los resultados falsos positivos son posibles en pacientes con historial previo de infección por otros flavivirus. La confirmación de los resultados que indican la existencia de anticuerpos IgM contra al virus del Zika en especímenes equívocos o presuntos positivos requiere pruebas adicionales realizadas por los CDC o por laboratorios calificados, designados por los CDC, previa consulta con los CDC, utilizando el algoritmo proporcionado por esta entidad. Los laboratorios tienen la obligación de reportar los

resultados positivos a las autoridades de salud pública que correspondan. En los Estados Unidos y sus territorios, los laboratorios calificados, designados por los CDC, deben reportar a los CDC los resultados equívocos y presuntos positivos.

Los resultados de esta prueba no pueden utilizarse como la única fuente en la que basar las decisiones relacionadas con el manejo de los pacientes, y además deben combinarse con las observaciones clínicas, el historial clínico del paciente, la información epidemiológica y otras pruebas de laboratorio. Los niveles de IgM para el Zika durante el curso de la enfermedad no están bien caracterizados. Los niveles de IgM son variables aunque normalmente arrojan un resultado positivo a partir del cuarto día aproximadamente después del comienzo de los síntomas y durante 12 semanas o más después de la infección inicial.

Los resultados negativos no descartan la posibilidad de que haya infección por el virus del Zika, ya sea pasada o actual. Los resultados negativos pueden obtenerse en especímenes recogidos antes del día cuatro después de la aparición de los síntomas o después del cierre de la ventana de IgM detectable.

El MAC-ELISA para el zika ha sido diseñado para ser utilizado por el personal de laboratorio capacitado, que sea competente en la realización e interpretación de inmunoensayos en laboratorios calificados, designados por los CDC. En el caso de los laboratorios de los EE. UU., la prueba MAC-ELISA para el zika solo debe utilizarse conforme a la EUA de la FDA. Aquellos que están fuera de los Estados Unidos no se rigen por las restricciones de la EUA y pueden usar este protocolo a modo de guía.

## **LIMITACIONES AL USO DEL PROTOCOLO**

El ensayo MAC-ELISA que aquí se describe no ha sido probado extensamente con especímenes clínicos. No se permiten modificaciones de estos ensayos (es decir, el uso de plataformas o químicas diferentes de las que se describen). Estos ensayos no deben publicarse sin el consentimiento explícito de los CDC.

## **PRINCIPIO DEL ENSAYO**

Las pruebas que detectan la inmunoglobulina M (IgM) específica del virus ofrecen grandes ventajas porque detectan los anticuerpos que se generan durante los primeros días después de la aparición de los síntomas clínicos en una infección inicial, obviando la necesidad de especímenes en la fase de convalecencia en muchos casos. La captura de IgM es el mejor enfoque en la detección de IgM porque es sencillo, sensible y aplicable a muestras de suero

y líquido cefalorraquídeo (LCR) de una variedad de especies animales (p. ej., seres humanos, equina, aviar).

El ensayo de inmunoabsorción enzimática (MAC-ELISA) de anticuerpos IgM de captura representa una alternativa útil a la inmunofluorescencia para la documentación de una respuesta serológica. El ELISA es menos subjetivo que la inmunofluorescencia, y se pueden procesar un gran número de muestras. Los anticuerpos IgM (los anticuerpos de captura) están recubiertos en placas de 96 pocillos. A continuación y de manera secuencial, se agrega el suero del paciente y luego el antígeno viral no infeccioso conocido. La presencia del antígeno se detecta mediante el uso de un anticuerpo antiviral conjugado a una enzima. Un resultado colorimétrico es generado por la interacción de la enzima y un sustrato cromogénico. Este cambio en la colorimetría se detecta a través de un espectrofotómetro (lector de ELISA).

## **Especímenes**

### **ESPECÍMENES ACEPTABLES**

- Suero de seres humanos en fase aguda y convaleciente  
NOTA: El suero debería recolectarse en un tubo con separador para suero. El tubo se debe centrifugar y el suero se debe decantar antes del envío para evitar hemólisis.
- Especímenes de líquido cefalorraquídeo (LCR)  
El LCR solo puede someterse a pruebas cuando se envía junto con el espécimen de suero de un paciente.

### **MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LOS ESPECÍMENES**

Almacene todos los especímenes de diagnóstico a 2-8 °C, antes de hacerles las pruebas, y a ≤ -20 °C, después de haber completado todas las pruebas anticipadas. Evite congelar y descongelar reiteradas veces.

Las muestras de los pacientes se deben inactivar con calor durante 30 minutos a baño María a una temperatura de 56 °C. Si existe la posibilidad de que la muestra contenga el virus del chikunguña, la inactivación debería prolongarse a 2 horas.

## SEGURIDAD/PRECAUCIONES

Se recomienda a los laboratorios realizar una evaluación de riesgos al hacer nuevas pruebas; y las precauciones de seguridad deberían basarse en la evaluación de riesgos del laboratorio. Si hay posibilidad de que se trate de infección por el virus del chikunguña, los trabajadores del laboratorio deberían reconocer que este virus produce altos niveles de viremia y el suero de casos sospechosos del virus del chikunguña debería tratarse como potencialmente infeccioso incluso para los procedimientos serológicos. Consulte las directrices de los CDC para laboratorios de salud pública estatales y locales: <http://www.cdc.gov/zika/state-labs/index.html>. Consulte la publicación Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) («Bioseguridad en los laboratorios microbiológicos y biomédicos») para obtener más información sobre bioseguridad relacionada con estos virus y las prácticas de bioseguridad del laboratorio.

Este procedimiento debe completarse bajo condiciones de seguridad específicas para laboratorios que consideran la posible naturaleza infecciosa de los especímenes de suero involucrados. Después de la inactivación por calor, se recomienda, como mínimo, que estos procedimientos se lleven a cabo en centros BSL-2 y aplicando las prácticas BSL-3. A fin de garantizar la seguridad del personal del laboratorio, manipule todas las muestras dentro de un gabinete de seguridad biológica (BSC) Clase II (o superior).

**DESCARGO DE RESPONSABILIDAD:** Los nombres de los proveedores o fabricantes se proporcionan como ejemplos de fuentes de productos adecuadas. El uso de nombres comerciales es con fines de identificación solamente y no implica la aprobación por parte de los CDC ni del Departamento de Salud y Servicios Humanos.

### Equipos e insumos

#### MATERIALES PROPORCIONADOS POR LOS CDC

NOTA: Estos materiales los proporcionarán los CDC, Ft. Collins, CO. Para solicitar estos reactivos, envíe un correo electrónico a la Dra. Barbara Johnson a [bmk8@cdc.gov](mailto:bmk8@cdc.gov). Los laboratorios de la OPS deben contactar con sus laboratorios de referencia nacionales o con la OPS para recibir asistencia.

- **Antígeno normal:** Antígeno normal Vero E6 liofilizado o antígeno normal COS-1.

- **Antígeno del zika:** Antígeno Vero E6 liofilizado para el virus del Zika (inactivado) preparado para usar en el ELISA IgM para el zika o el antígeno del zika no infeccioso producido en COS-1.
- **Control positivo de IgM para flavivirus:** Anticuerpo monoclonal quimérico, específico para flavivirus, liofilizado.
  - **Anticuerpo de detección conjugado:** Anticuerpo monoclonal 6B6C-1 conjugado a peroxidasa de rábano picante. Disponible en los CDC mediante acuerdo especial. Las fuentes comerciales son estas:
- Hennessy Research, catálogo #DC153-100 (para usar específicamente con el antígeno Vero E6) o
- InBios Internacional,
  - Artículo 500510: 6B6C-1/HRP conjugado (sin diluir), 50 uL
  - Artículo 500510D: 6B6C-1/HRP conjugado (1/100 diluido a partir de la existencia), 1 mL

Los controles positivo y negativo de la prueba deben realizarse al mismo tiempo que todas las muestras de la prueba.

## **MATERIALES NECESARIOS PERO QUE NO SE PROPORCIONAN**

NOTA: Para los materiales que deben diluirse/titularse, ver **Formulaciones** a continuación.

- Anticuerpo de cabra anti-IgM humano (Kirkegaard and Perry Laboratories, catálogo #01-10-03)
- Agua desionizada
- Ácido clorhídrico (para ajustar el pH del amortiguador de sensibilización)
- Carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ); (disponible a partir de múltiples fuentes comerciales, p. ej. Sigma, Thermo Fisher, etc.)
- Bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ); (disponible a partir de múltiples fuentes comerciales, p. ej., Sigma, Thermo Fisher, etc.)
- Amortiguador de fosfato salino (PBS); (disponible a partir de múltiples fuentes comerciales, p. ej. Sigma, Thermo Fisher, etc.)
- Tween 20 (disponible a partir de múltiples fuentes comerciales, p. ej. Sigma, Thermo Fisher, etc.)
- Leche en polvo descremada (disponible a partir de múltiples fuentes comerciales, p. ej. Sigma, Thermo Fisher, etc.)

- Ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>); (disponible a partir de múltiples fuentes comerciales, p. ej., Sigma, Thermo Fisher)
  - Placas de 96 recipientes con fondo plano Immulon II HB, Dynatech Technologies, catálogo #3455 (disponible a partir de múltiples fuentes comerciales, p. ej. Sigma, Thermo Fisher, etc.)
- NOTA: Esta es la única placa de 96 recipientes aprobada para esta prueba.
- Sustrato mejorado K-Blue TMB (base de tetrametilbencidina 3,3', 5, 5'; Neogen Corp, catálogo #308175)
  - Suero humano normal; con resultado negativo para anticuerpos para el virus del Zika
  - Solución de parada TMB (KPL) O 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

## EQUIPOS E INSUMOS

- Lavador de microplacas
- Lector de microplaca con filtro de 450 nm
- Gabinete de bioseguridad (BSC)
- Incubadora configurada a 37 °C
- Pipetas simples y multicanales (canal simple de 100 µL y/o 200 µL, 12 canales de 100 µL y/o 200 µL)
- Puntas de pipetas para los pipeteadores de la lista
- Reservorios de reactivos
- Cronómetro
- Botellas mezcladoras de reactivos; botellas de vidrio estériles de 1 L; Gibco u otro proveedor
- Tubos de microcentrífuga para diluir el suero del paciente; comprar estéril o para autoclave y dejar enfriar antes de usar; Corning u otro proveedor
- Bandejas para pesar componentes químicos secos, resistentes a productos químicos
- Marcador permanente

## Formulaciones

NOTA: Las diluciones proporcionadas representan el punto de partida para la titulación. Los laboratorios deben determinar la dilución óptima para su laboratorio en particular. Más información en Estandarización de pruebas en la página 15.



- Amortiguador de sensibilización: amortiguador de carbonato/bicarbonato, pH 9,6  
1,59 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 2,93 g NaHCO<sub>3</sub> diluido en 1 litro de agua.
- Amortiguador de lavado: Amortiguador fosfato salino (PBS); 0,05 % Tween 20, pH 7,2.  
El PBS está disponible en polvo en varias fuentes comerciales
- Amortiguador de bloqueo: PBS/ 5 % de leche/ 0,5 % Tween 20
- Solución de parada: 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Anticuerpo de detección conjugado: El conjugado de los CDC puede diluirse hasta 1:5000 en el amortiguador de bloqueo
- Control positivo de IgM contra el flavivirus: Control positivo de IgM contra el flavivirus diluido hasta 1:3000 en el amortiguador de lavado
- Antígeno zika Vero E6: diluido hasta 1:160 en amortiguador de lavado; antígeno zika COS-1 hasta 1:800 en amortiguador de lavado
- Antígeno Normal Vero E6: diluido hasta 1:160 en amortiguador de lavado; antígeno normal COS-1 hasta 1:800 en amortiguador de lavado
- Anticuerpo de cabra anti-IgM humano: diluido a 1:2000 en amortiguador de sensibilización (el ajuste puede ser obligatorio)
- Suero del paciente: diluido a 1:400 en el amortiguador de lavado (no requiere ajuste)
- Control negativo: sueros humanos normales diluidos a 1:400 (no requiere titulación)
  - Los nuevos lotes de sueros humanos normales deben someterse a pruebas siguiendo este protocolo, como si fueran muestras experimentales. Si la DO en el antígeno viral NO es 2 veces mayor a la DO en el antígeno normal, se puede presumir que es negativo.

## Control de calidad

### CONSIDERACIONES GENERALES

- El personal debe estar familiarizado con el protocolo y los instrumentos que se utilizan.
- Use batas desechables limpias, que no hayan sido usadas previamente, y guantes nuevos sin polvo durante la manipulación y la titulación del reactivo del ensayo. Cámbiese los guantes cada vez que sospeche que pueden estar contaminados.
- Almacene todos los reactivos con las temperaturas adecuadas (ver los prospectos de los productos). No use los reactivos que estén vencidos.
- Mantenga los tubos de los reactivos tapados lo más que pueda.

- Use puntas de pipetas con barrera para aerosoles (filtros) solamente.
- Deseche toda la basura todos los días.

## CONTROLES DEL ENSAYO

Los controles del ensayo deberían realizarse al mismo tiempo que todas las muestras de la prueba.

Controles de anticuerpos:

- Control positivo: Control positivo de IgM contra el flavivirus.
- Control negativo: Suero humano normal.

Determinación de antecedentes:

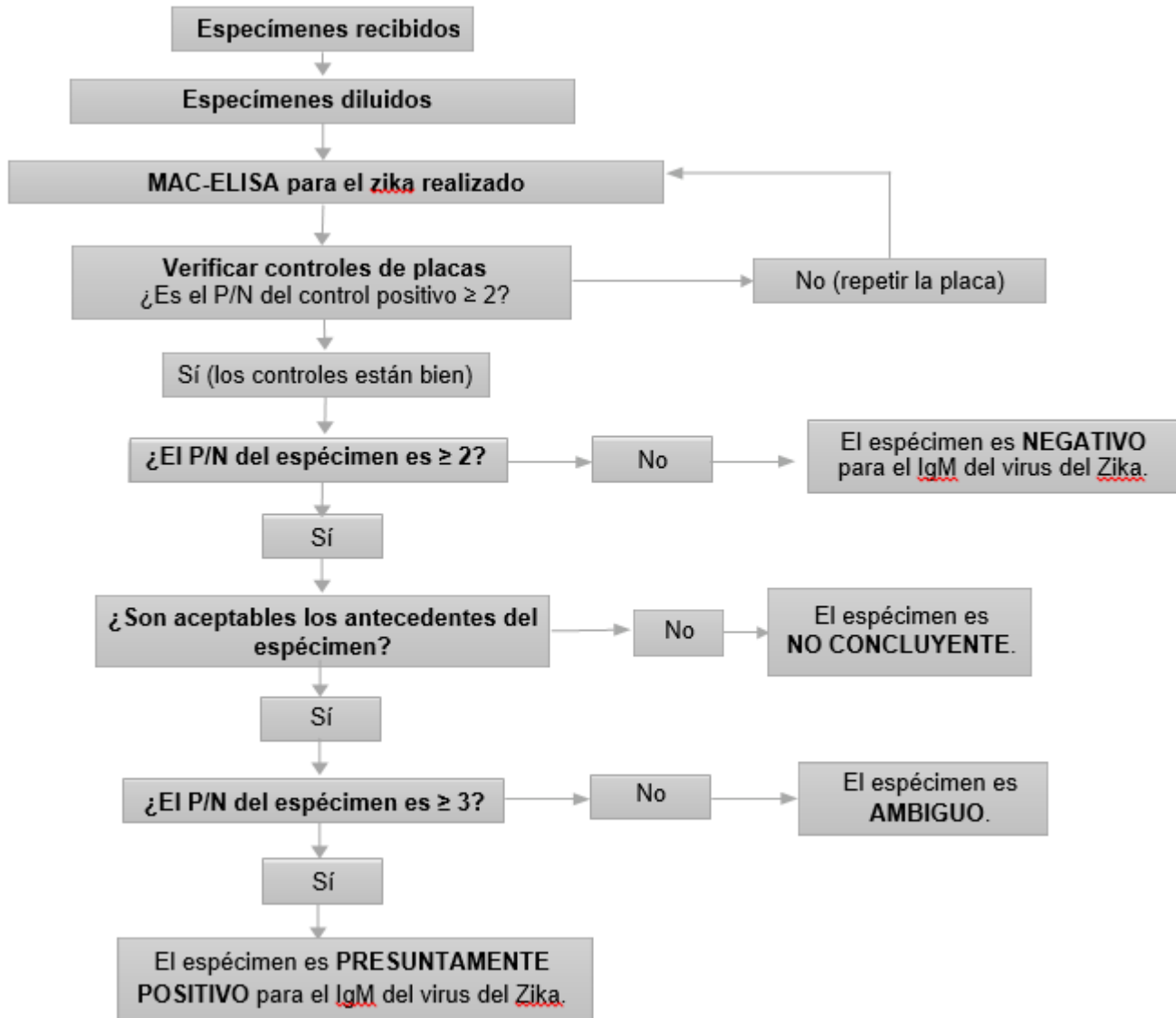
- El espécimen reaccionó con el antígeno Normal Vero E6 (para medir la señal de antecedentes generada por la muestra).

Tabla 1: Resumen de los controles positivos y negativos

Cálculo	Relación	Resultado
Control positivo P/N	DO media del suero del control positivo reaccionado con el antígeno Zika Vero E6 (P)	< 2 La placa NO ES válida
	DO media del suero del control negativo reaccionado con el antígeno Zika Vero E6 (N)	≥2 La placa ES válida
Antecedentes del espécimen P/N (para especímenes con el espécimen P/N ≥ 2 ver Figura 1)	DO media del espécimen reaccionado con el antígeno Zika Vero E6 (P)	< 2 El espécimen es no concluyente
	DO media del espécimen reaccionado con el antígeno Normal Vero E6	≥2 El espécimen puede interpretarse según el algoritmo de pruebas

## Algoritmo de pruebas

Figura 1: Resumen de la interpretación de los resultados de la prueba



Siga los requisitos de medidas e informes específicos descritos en la Tabla 2.

## Prueba MAC-ELISA para el zika

### NOTAS SOBRE EL PROCEDIMIENTO ELISA:

- Las placas pueden protegerse y almacenarse a 2-8 °C hasta una semana. (Ver Paso 2: proteger las placas, a continuación).
- Los sueros de control sin diluir pueden almacenarse a 2-8 °C hasta 2 semanas.
- Los antígenos virales y Normal Vero E6 reconstituidos sin diluir pueden almacenarse a  $\leq -20$  °C por tiempo indefinido.
- Los sueros de control y de la prueba pueden diluirse en las diluciones de trabajo y refrigerarse un día antes de ser usados.
- Los antígenos y el conjugado deben diluirse en las diluciones de trabajo inmediatamente antes de usarlos.

**NOTA:** EL SIGUIENTE PROCEDIMIENTO INCLUYE INFORMACIÓN SOBRE EL CONTROL DE CALIDAD Y LA INTERPRETACIÓN. CADA ESPÉCIMEN DE SUERO ES SOMETIDO A PRUEBAS EN TRIPLICADO EN LOS ANTÍGENOS VIRALES Y NORMAL VERO E6. SE PUEDEN ANALIZAR OCHO (8) ESPÉCIMENES POR PLACA. DEBIDO AL VOLUMEN LIMITADO, LOS ESPÉCIMENES DE LCR POR LO GENERAL SE ANALIZAN POR SEPARADO SOLAMENTE.

#### 1. PREPARACIÓN DE LA PLACA:

Determine el número de placas ELISA que se necesitan. Con un marcador permanente de punta fina, enumere y etiquete las placas de 96 pocillos. Identifique la ubicación de cada espécimen clínico (M1-M8) usando una plantilla correspondiente (ver Figura 2).

*Para que el momento de incorporación del reactivo sea consistente, procese las placas según el orden en que fueron numeradas durante todos los pasos del procedimiento.*

Las placas deben conservarse en un entorno cerrado y húmedo durante todos los tiempos de incubación, salvo en el paso de protección. Para este fin se puede utilizar una bolsa Ziploc grande que contenga una toalla de papel humedecida.

#### 2. PROTECCIÓN DE LAS PLACAS:

- Diluya el anticuerpo de cabra anti-IgM humano a 1:2000 en un amortiguador de sensibilización, pH 9,6.
- Proteja los 60 pocillos internos de la placa de 96 pocillos con 75  $\mu$ L por pocillo de anticuerpo de cabra anti-IgM humano diluido. Deje vacías las filas/columnas exteriores (ver Fig. 2).

- Incubar a **2-8 °C toda la noche**. Las placas deben permanecer a 2-8 °C hasta que se necesiten para hacer las pruebas, hasta una semana.
3. BLOQUEO DE LAS PLACAS:
    - Después de la incubación nocturna, retire los anticuerpos de sensibilización.
    - Deje secar las placas sobre toallas de papel u otro material absorbente.
    - Bloquee las placas con un amortiguador de lavado de 200 µL por pocillo.
    - Deje incubar a temperatura ambiente por 30 minutos.
  4. LAVADO DE LAS PLACAS:
    - Lave los pocillos 5 veces con un amortiguador de lavado usando una lavadora de placas automática.
    - Los pocillos deben llenarse hasta arriba en cada ciclo (es decir, 300 µL).
  5. INCORPORACIÓN DE MUESTRAS/CONTROLES:
    - Diluya el suero del paciente a 1:400 en el amortiguador de lavado.
    - Agregue 50 µL por pocillo de suero diluido del paciente (S) a un bloque de 6 pocillos o LCR sin diluir a dos pocillos solamente. El LCR será analizado por separado contra los antígenos virales y Normal Vero E6.

NOTA: El LCR se puede diluir hasta un máximo de 1:5 en amortiguador de lavado si es necesario para obtener volumen suficiente para la prueba.

    - Agregue 50 µL de control positivo de IgM para flavivirus (Ref), diluido en un amortiguador de lavado, según una titulación previamente determinada.
    - Diluya control de suero humano negativo (N) 1:400 en un amortiguador de lavado.
    - Agregue 50 µL de control de suero humano negativo (N) diluido (1:400 en un amortiguador de lavado) a un bloque de 6 pocillos.
    - Incube las placas por **1 hora a 37 °C** en una cámara humidificada.
  6. LAVADO DE LAS PLACAS:
    - Lave los pocillos 5 veces con un amortiguador de lavado usando una lavadora de placas automática.
    - Los pocillos deberían llenarse hasta arriba en cada ciclo.
  7. INCORPORACIÓN DE ANTÍGENO:
    - Diluya antígeno de **zika** en un amortiguador de lavado de acuerdo con una titulación determinada anteriormente.
    - Diluya antígeno **Normal** en un amortiguador de lavado a la misma concentración que el antígeno de **zika**.

- Agregue 50  $\mu\text{L}$  por pocillo de antígeno **Zika** Vero E6 diluido a los tres pocillos de la izquierda de cada bloque de suero (ver Fig. 2).
  - Agregue 50  $\mu\text{L}$  por pocillo de antígeno **Normal** diluido a los tres pocillos de la derecha de cada bloque (ver Fig. 2).
  - Incube las placas **toda la noche a 2-8 °C** en una cámara humidificada.
8. LAVADO DE LAS PLACAS:
- Lave los pocillos 5 veces con un amortiguador de lavado usando una lavadora de placas automática.
  - Los pocillos deberían llenarse hasta arriba en cada ciclo.
9. INCORPORACIÓN DE CONJUGADO:
- Diluya anticuerpo monoclonal conjugado de peroxidasa de rábano picante en el amortiguador de acuerdo con una titulación determinada previamente.
  - Agregue 50  $\mu\text{L}$  por pocillo de anticuerpo monoclonal conjugado de peroxidasa de rábano picante diluido.
  - Incube las placas por **1 hora a 37 °C** en una cámara humidificada.
10. Encienda el lector de placas para que se caliente
11. Saque el TMB-ELISA del refrigerador.
12. LAVADO DE LAS PLACAS:
- Lave **5 veces** los pocillos con amortiguador de lavado con un lavaplatos automático.
  - Gire las placas 180° en el lavador, luego de la primera serie de 5 ciclos. Esto permite lograr resultados consistentes.
  - Los pocillos se deben llenar hasta arriba cada ciclo.
13. INCORPORACIÓN DEL SUSTRATO:
- Con la placa a temperatura ambiente (20-25 °C), agregue 75  $\mu\text{L}$  por pocillo de sustrato de TMB a todos los pocillos.
  - Cubra las placas inmediatamente para que no entre luz. Deje incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
  - Aparecerá un color azul en los pocillos que den positivo en anticuerpos.
14. INCORPORACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE PARADA:
- Agregue 75  $\mu\text{L}$  por pocillo de la solución de parada KPL TMB a todos los pocillos, incluidas las filas exteriores de pocillos de la placa O agregue 50  $\mu\text{L}$  de 1N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a todos los pocillos.

NOTA: El lector de placas debe estar en cero en los pocillos A1, B1, C1 and D1.

- Los pocillos que estaban en azul ahora cambiarán a color amarillo.
- Deje reposar las placas a temperatura ambiente por 1 minuto.
- Lea las placas en un lector de placas de microtitulación con un filtro de 450 nm.

Figura 2: Disposición de las placas para 8 muestras y controles

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO
B	VACÍO	Antígeno viral	Antígeno normal	Antígeno viral	Antígeno normal	Antígeno viral	Antígeno normal	Antígeno viral	Antígeno normal	Antígeno viral	Antígeno normal	VACÍO
C	VACÍO	Antígeno viral	Antígeno normal	Antígeno viral	Antígeno normal	Antígeno viral	Antígeno normal	Antígeno viral	Antígeno normal	Antígeno viral	Antígeno normal	VACÍO
D	VACÍO	Antígeno viral	Antígeno normal	Antígeno viral	Antígeno normal	Antígeno viral	Antígeno normal	Antígeno viral	Antígeno normal	Antígeno viral	Antígeno normal	VACÍO
E	VACÍO	Antígeno viral	Antígeno normal	Antígeno viral	Antígeno normal	Antígeno viral	Antígeno normal	Antígeno viral	Antígeno normal	Antígeno viral	Antígeno normal	VACÍO
F	VACÍO	Antígeno viral	Antígeno normal	Antígeno viral	Antígeno normal	Antígeno viral	Antígeno normal	Antígeno viral	Antígeno normal	Antígeno viral	Antígeno normal	VACÍO
G	VACÍO	Antígeno viral	Antígeno normal	Antígeno viral	Antígeno normal	Antígeno viral	Antígeno normal	Antígeno viral	Antígeno normal	Antígeno viral	Antígeno normal	VACÍO
H	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO

## ESTANDARIZACIÓN DE PRUEBAS

El MAC-ELISA debe estar estandarizado y validado antes de su uso en el laboratorio y la reestandarización se debe hacer periódicamente. Esto debe ocurrir cuando se introducen nuevos números de lote y, como mínimo, una vez al año. Se recomienda que la densidad óptica mínima del suero de control positivo reaccionado con el antígeno Zika Vero E6 se establezca en 1,0 aproximadamente. El suero de control normal que reaccionó con el antígeno Zika Vero E6 debería ser < 0,2 (esto varía). La estandarización de reactivos se consigue normalmente a través de titulación, siempre

comparando las densidades ópticas de los reactivos cuando reaccionan con el antígeno viral y Normal Vero E6. La estandarización y la reestandarización se pueden confirmar con paneles de verificación de pruebas.

## Interpretación de los resultados de la prueba

### DETERMINACIÓN DE LA VALIDEZ DE LA PRUEBA

Antes de poder calcular los resultados de cada espécimen clínico, la prueba debe determinarse como **válida**. Para que una prueba sea válida, la siguiente proporción debe ser igual o superior a 2,0. **Este es el P/N del control positivo.**

DO media del control positivo IgM para flavivirus reaccionado con el antígeno Zika Vero E6 (P)

DO media del control negativo reaccionado con el antígeno Zika Vero E6 (N)

Se debe determinar la validez de la prueba para cada placa. Solo se pueden determinar los resultados de los especímenes clínicos si la prueba es válida. Si la prueba no es válida, se debe repetir la placa. Si el P/N del control positivo sigue fallando después de una repetición, es probable que uno o más reactivos o parámetros de la prueba tengan un error y, por tanto, se deberá solucionar.

### DETERMINACIÓN DEL P/N DEL ESPÉCIMEN

Para determinar si los especímenes clínicos (M1-M8) contienen IgM del virus del Zika (lo que indicaría infecciones recientes con dicho virus) se debe calcular lo siguiente:

DO media del espécimen de la prueba reaccionada con el antígeno Zika Vero E6 (P)

DO media del suero humano normal reaccionado con el antígeno Zika Vero E6 (N)

Este es el P/N del espécimen de la prueba.

Todos los especímenes cuyo P/N sea  $< 2$ , se informan como **negativos**. No se requieren más análisis. Ver Tabla 2 a continuación.

### EVALUACIÓN DE LOS ANTECEDENTES DEL ESPÉCIMEN

Para cada espécimen con un P/N de espécimen  $\geq 2$ , se debe determinar si se han generado antecedentes no específicos.



El valor de P (media de la muestra de la prueba reaccionada con el antígeno Zika Vero E6) de la muestra de la prueba debe ser igual o superior a dos (2) veces la DO media de la muestra de la prueba reaccionada con el antígeno Normal Vero E6. Si no se cumple este requisito, se generan antecedentes no específicos y el resultado **SE DEBE** informar como **no concluyente**. Los especímenes no concluyentes se deben volver a someter a pruebas. Si una nueva prueba ofrece también resultados no concluyentes, envíe el espécimen para un análisis más amplio y/o solicite la recogida de suero adicional para su análisis. Si se cumplen los requisitos, proceda a interpretar los resultados del espécimen.

## **ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS POSITIVOS Y EQUÍVOCOS**

Todos los valores P/N del espécimen de la prueba iguales o mayores que 3,0 se deben reportar como presuntos positivos de IgM (ver tabla a continuación), siempre que reúnan los requisitos que aparecen arriba. En el caso de que un LCR agudo en una etapa temprana o un suero sea negativo en esta prueba, se debe solicitar una muestra de suero convaleciente y someterla a pruebas antes de que se reporte que el paciente no tiene evidencia serológica de infección viral reciente. Si no se somete a pruebas un espécimen convaleciente, un resultado negativo puede reflejar la prueba de un espécimen en fase aguda obtenida antes de que los anticuerpos hayan aumentado a niveles detectables.

Los valores P/N comprendidos entre 2,0 y 3,0 se deben considerar **equivocos**. Se deberán realizar más pruebas para determinar el estado de estos especímenes (ver Tabla 2 a continuación).

Se debe destacar que el valor P/N de un espécimen en la dilución del examen médico de 1:400 no indica que la concentración de anticuerpos sea absoluta, es decir, el valor P/N no es cuantitativo.

Tabla 2: Interpretación de los resultados del MAC-ELISA para el zika

P/N del espécimen de la prueba	Interpretación	Informe	Acción
< 2	Negativo	Ninguna evidencia reciente detectada de infección por el virus del Zika.	Reportar los resultados. Si se trata de un espécimen en fase aguda temprana, consultar las instrucciones de interpretación más arriba.
$2 \leq P/N < 3$	Equívoco	Los resultados del MAC-ELISA para el zika fueron equívocos por la presencia de anticuerpos contra el virus del Zika.	Enviar informe a los CDC junto con el espécimen para las pruebas de confirmación.
$\geq 3$	Presunto positivo	Evidencia serológica de posible infección reciente por el virus del Zika identificada. Se requieren pruebas adicionales.	Enviar informe a los CDC junto con el espécimen para las pruebas de confirmación.

Todos los resultados positivos se deben reportar a los CDC a través de ArboNET.

Para obtener información sobre el algoritmo de pruebas del Zika, consulte las directrices de los CDC para laboratorios de salud pública locales y estatales:

<http://www.cdc.gov/zika/state-labs/index.html>

Para ver instrucciones de derivación de especímenes, visite:

<http://www.cdc.gov/zika/hc-providers/diagnostic.html>

## Limitaciones de la prueba

La interpretación de los resultados del MAC-ELISA para el zika debe tener en cuenta la posibilidad de resultados falsos negativos y falsos positivos. Puede haber resultados falsos negativos si:

- La toma de muestras se realizó antes de que la IgM alcanzara niveles detectables (normalmente unos 4 días después de la aparición de síntomas).

- La toma de muestras se realizó después de que los IgM descendieran por debajo de los niveles detectables (normalmente unas 12 semanas después de la aparición de síntomas).
- No haber seguido los procedimientos de ensayo autorizados.

La causa más habitual de resultados falsos positivos es la reactividad cruzada con IgM específica de otros flavivirus como el virus del dengue. Solo se han realizado evaluaciones limitadas de reactividad cruzada con flavivirus o arbovirus. No se ha evaluado la reactividad cruzada con el factor reumatoide. Los datos clínicos indican la posibilidad de reactividad cruzada con anticuerpos contra el virus del dengue. Es necesario realizar pruebas de seguimiento para descartar resultados falsos positivos. La confirmación de la presencia de IgM contra el Zika requiere pruebas de los CDC o de un laboratorio designado por los CDC. El método estándar de referencia para la confirmación de la presencia de anticuerpos contra el zika es la Prueba de Neutralización para la Reducción de Placas (PRNT, por sus siglas en inglés).

Todas las pruebas del zika deben hacerse siguiendo las directrices del laboratorio emitidas por los CDC y sus algoritmos de pruebas: <http://www.cdc.gov/zika/state-labs/index.html>.

Los resultados negativos no descartan la infección por el virus del Zika y no deben utilizarse como base única para la decisión de manejo/tratamiento de un paciente. Todos los resultados deben ser interpretados por un profesional capacitado junto con la revisión del historial y los signos y síntomas del paciente.

Esta prueba es para el uso diagnóstico *in vitro* bajo la Autorización de Uso de Emergencia de la FDA únicamente, y está limitada a laboratorios cualificados designados por los CDC. Los laboratorios internacionales no se rigen por las restricciones de la EUA de la FDA.

Todos los especímenes deben ser manipulados como si fueran infecciosos. Se deben emplear las precauciones de bioseguridad apropiadas, incluyendo un equipo de protección personal, cuando se manipulen materiales de especímenes.

Una toma de muestra correcta, el almacenamiento y el transporte apropiados de los especímenes son fundamentales para obtener resultados correctos.

El desempeño solo se ha establecido con los tipos de especímenes que se enumeran en el Uso previsto. No se aceptan otros tipos de especímenes para su uso en este ensayo.

Cabe destacar que a partir de abril del 2016, a cualquier paciente cuyas muestras arrojen resultados positivos en la PRINT (p. ej., >=10) tanto para el virus del Zika como para el virus del dengue ahora se lo clasifica como que tiene una infección por “flavivirus”. El virus de la infección solo se especifica si un resultado es positivo y el otro es negativo. La anterior diferencia desglosada en 4 para identificar la infección demostró ser incorrecta en un número de casos y ahora se usa para el diagnóstico del virus del Zika únicamente.

## Características de desempeño

### Reactividad cruzada

#### Reactividad cruzada del flavivirus

Se seleccionaron sueros conocidos del depósito de los CDC para evaluar la reactividad cruzada del MAC-ELISA para el zika. No se observó reactividad cruzada entre el MAC-ELISA para el zika y otros flavivirus que no fueran el dengue.

Tabla 3: Resumen de reactividad cruzada de los flavivirus

Flavivirus	Descripción del espécimen	Especímenes analizados	Negativo en MAC-ELISA para el zika
VNO	Sueros de casos confirmados del Virus del Nilo Occidental	4	4 (100 %)
SLE	Sueros de casos confirmados de encefalitis de San Luis	1	1 (100 %)
VFA	Sueros de personas vacunadas contra el virus de la fiebre amarilla	4	4 (100 %)
JEV	Sueros de personas vacunadas contra el virus de la encefalitis japonesa	2*	2 (100 %)

\*Dos sueros del grupo de receptores de la vacuna contra la FA procedían de personas que también se vacunaron contra la EJ, por tanto, este es un subconjunto de los especímenes de la línea superior.

El virus del dengue no estaba incluido dentro de la evaluación de reactividad cruzada. Los datos de pruebas clínicas que se muestran a continuación demuestran una importante reactividad cruzada del MAC-ELISA para el zika a los anticuerpos IgM contra el virus del dengue.

Reactividad cruzada a los no flavivirus

No se ha llevado a cabo ningún estudio experimental con el MAC-ELISA para el zika para determinar la reactividad cruzada con el IgM contra los no flavivirus. Sin embargo, la literatura (Martin, et al., 2000) indica que solo se espera una reactividad cruzada mínima con IgM contra los alfavirus y los bunyavirus.

Los arbovirus se describieron en un principio en tres grupos con base en importantes diferencias serológicas caracterizadas con técnicas serológicas tempranas y crudas. Estas descripciones se mantienen: Los virus del grupo A son ahora alfavirus, los del grupo B son flavivirus y los del grupo C, bunyavirus. A medida que los métodos serológicos han evolucionado, las distinciones serológicas que originariamente definieron los grupos exponen que no se espera una reactividad cruzada entre grupos en inmunoensayos.

## **Desempeño clínico**

Desempeño con especímenes de los EE. UU. enviados a los CDC, Ft. Collins, del 2015 a la actualidad

En el período de enero del 2015 al 13 de febrero del 2016, se hicieron el ensayo CDC MAC-ELISA y la prueba CDC PRNT para el zika a 167 especímenes de sueros y a 2 especímenes de LCR.

Resumen del desempeño clínico con los sueros

De los 167 registros de pruebas de sueros, un subgrupo era de especímenes combinados de sangre en serie. De ellas, solo se incluyeron las primeras muestras de sangre positivas o equívocas de IgM. Si ambas muestras de sangre en serie eran negativas, solo se incluía la primera. El conjunto de datos resultantes utilizado en este análisis es de 161 sueros. En la Tabla 4 se muestra un resumen de los resultados de estos sueros. Cuarenta y cuatro de estos registros de pruebas indicaron que procedían de mujeres embarazadas. En la Tabla 5 se muestra un resumen de datos del subgrupo de sueros procedentes de mujeres embarazadas.

Tabla 4: Datos de los sueros enviados a los CDC Ft. Collins para pruebas del 2015 a la actualidad

		Resultados de la PRNT			
		Zika	flavivirus	dengue	negativo
MAC-ELISA para el zika	positivo	45	16	23	9
	equivoco	1	0	9	13
	negativo	0	0	6	39

Acuerdo porcentual positivo (solo positivos de zika definitivos en la PRNT):  $45/46 = 97,8 \%$  (95 % CI: 88,7 % - 99,6 %)

Acuerdo porcentual negativo:  $45/99 = 45,5 \%$  (95 % CI: 36,0 % - 55,3 %)

Tabla 5: Datos de los sueros de mujeres embarazadas enviados a los CDC Ft. Collins para pruebas del 2015 a la actualidad

		Resultados de la PRNT			
		Zika	flavivirus	dengue	negativo
MAC-ELISA para el zika	positivo	3	2	1	3
	equivoco	0	0	2	8
	negativo	0	0	1	24

Acuerdo porcentual positivo (solo positivos de zika definitivos en la PRNT):  $3/3 = 100 \%$  (95 % CI: 43,9 % - 100 %)

Acuerdo porcentual negativo:  $25/39 = 64,1 \%$  (95 % CI: 48,4 % - 77,3 %)

## Resumen de datos de LCR

Ambas muestras de LCR sometidas a pruebas por los CDC dieron resultados positivos para la infección por el virus del Zika, tanto en el MAC-ELISA para el zika como en la PRNT. Los resultados de LCR coincidieron con las pruebas de sueros combinados.

Evaluación de desempeño con infecciones del zika primarias y secundarias, estado de Yap, Micronesia, 2007

El CDC MAC-ELISA para el zika se incluyó en una serie de métodos inmunológicos de flavivirus CDC MAC-ELISA y PRNT para la evaluación de los especímenes de sueros combinados de 11 casos de virus del Zika identificados en el brote de zika en el estado de

Yap, Micronesia, en el 2007 (Lanciotti, et al., 2008). En el momento de este brote, el MAC-ELISA para el zika utilizó sacarosa-acetona extraída del antígeno del cerebro de un ratón lactante. Cuatro de los 11 casos son infecciones de flavivirus primarias, mientras que siete son posibles infecciones de flavivirus secundarias.

De los sueros combinados recogidos y evaluados en la publicación, todos excepto un paciente tenían al menos un espécimen de suero dentro de nuestra ventana declarado de  $\geq 4$  días posteriores a la aparición de los síntomas y  $< 12$  semanas posteriores a la aparición de los síntomas. Incluimos en nuestro análisis el espécimen de suero más reciente de cada uno de los 10 casos restantes dentro de la ventana que declaramos.

Los resultados de MAC-ELISA para el zika de estos especímenes se comparan con sus resultados en la Prueba de Neutralización para la Reducción de Placas (PRNT), las pruebas inmunológicas de flavivirus de estándar de referencia.

Tabla 6: Resumen de los resultados del MAC-ELISA para el zika y de la PRNT de flavivirus de los primeros especímenes, dentro del marco, para infecciones primarias y secundarias del zika en el estado de Yap, Micronesia, 2007

	Caso	Especímen	Días posteriores a la aparición de los síntomas	MAC-ELISA para el zika	PRNT (7 flavivirus)
Infecciones primarias	822	822a	5	23,2	Zika
	830	830b	21	16,3	Zika
	849	849b	18	18,2	Zika
	862	862a	6	25,4	Zika
Infecciones secundarias probables	817	817b	19	8,1	flavivirus
	833	833b	19	3,1	Zika
	844	844b	16	12,7	dengue
	955	955b	14	10,9	flavivirus
	968	Ningún espécimen dentro de la ventana declarada			
	839	839b	20	17,2	Zika
	847	847a	5	0,94	fiebre amarilla

		Resultados de la PRNT (7 flavivirus)			
		Zika	flavivirus	dengue	fiebre amarilla
MAC-ELISA para el zika	Positivo	6	2	1	0
	Negativo	0	0	0	1

Infecciones primarias:

Los 4 casos identificados como infecciones primarias dieron resultados positivos en el MAC-ELISA para el zika en su espécimen de suero inicial dentro de la ventana. Estos 4 especímenes también dieron resultados positivos en la PRNT para la infección por el virus del Zika.

Infecciones secundarias (probables):

De los seis casos con especímenes de suero dentro de la ventana, cinco dieron resultados positivos en los especímenes de suero más tempranos dentro de la ventana del MAC-ELISA para el zika. Dos de ellos (833b y 839b) dieron un resultado claramente positivo de la infección por el virus del Zika en la PRNT. Otros dos especímenes (817b y 955b) dieron resultados mayores en la PRNT del virus del Zika que de cualquier otro flavivirus probado. Sin embargo, estos resultados no fueron 4 veces superiores a todos los demás resultados, de manera que se interpretaron como positivos para flavivirus en la PRNT. Las muestras restantes arrojaron un resultado positivo en el MAC-ELISA para el zika y resultados 4 veces mayores en la PRNT para dengue que para zika, la única muestra en la que la PRNT no coincidió con la del MAC-ELISA para el zika.

La muestra 847a, tomada el día 5, dio negativo en el MAC-ELISA para el zika y dio positivo para el virus de la fiebre amarilla en la PRNT. No se observó ningún efecto de neutralización del zika en la PRNT. Es decir que los resultados del MAC-ELISA para zika y los de la PRNT para este espécimen coinciden.

## Contacto

Puede dirigir sus preguntas o comentarios acerca de este procedimiento a [ajj1@cdc.gov](mailto:ajj1@cdc.gov)

## Referencias

Johnson, AJ, Martin, DA, Karabatsos, N y Roehrig, JT. Detection of antiarboviral immunoglobulin G by using a monoclonal antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clinical Microbiology, 38:1827-1831, 2000.



Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, and Winn Jr. WC , (Eds). *Diagnosis of Infections caused by Viruses, Chlamydia, Rickettsia*, Diagnostic Microbiology, 4th Edition, JB Lippicott Co: 956-1074, 1992.

Lanciotti, RS, O.L. Kosoy, J.J. Laven, J.O. Velez, A.J. Lambert, A.J. Johnson, S.M. Stanfield, y M.R. Duffy. *Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007*. Emerg Infect Dis. 2008 (Aug); 14(8): 1232-1239.

Monath, TP, Nystrom, RR, Bailey, RE, Calisher, CH, y Muth, DJ: *Immunoglobulin M antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of St. Louis encephalitis*. Journal of Clinical Microbiology 20:784-790, 1984.

Martin, DA., Muth, DA., Brown, T., Karabatsos, N., and Roehrig, JT. Standardization of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assays (MAC-ELISA) for routine diagnosis of arboviral infections. Journal of Clinical Microbiology 38:1823-1826, 2000.

Tsai, TH: *Arboviruses*, In Rose NR, Marcario EC, Fahey JL, Friedman H, y Penn GM, (Eds): Manual of Clinical Laboratory Immunology, 4th Edition, American Society for Microbiology: 606- 618, 1976.

Idioma inglés, versión accesible: <http://www.cdc.gov/zika/pdfs/non-eua-zika-mac-elisa-protocol.pdf>