



Titulação de reagentes no ELISA IgM para zika

Quando novos reagentes são recebidos de fontes comerciais ou do CDC, eles podem vir com diluições de trabalho sugeridas no encarte da embalagem. **Essas diluições devem ser verificadas independentemente no seu laboratório, e as diluições de trabalho devem ser ajustadas conforme necessário.**

Antes de iniciar um teste no seu laboratório, certifique-se de que tem o tipo de microplaca que está listada nas instruções (usar placas diferentes pode causar problemas), e confirme que seus tampões são recém-criados e da forma correta (verifique os pH) e confirme que nenhum dos reagentes comerciais (especialmente o TMB) está vencido.

A melhor abordagem é **executar um teste usando somente os soros de controle** (isto é, sem amostras de proficiência) **usando as diluições sugeridas no encarte da embalagem.** Os resultados desejados são quando o controle positivo tem uma DO 450 de aproximadamente 1,0 e o controle negativo tem uma DO de aproximadamente 0,05 a 0,1. O negativo sempre deve ser menor que 0,2; o positivo provavelmente variará, mas deve ser >0,5.

Se os resultados estiverem na faixa desejada, não será necessário nenhum outro ajuste. Se o teste inicial não produzir os resultados desejados, você deverá prosseguir com a titulação dos reagentes.

Titule os reagentes um por vez, na seguinte ordem: anticorpo de revestimento, conjugado, antígeno, controle positivo.

Procedimento de titulação

Titule os reagentes usando uma série de diluição de um por vez, na seguinte ordem: anticorpo de revestimento, conjugado, antígeno, controle positivo.

Anticorpo de revestimento

Observação: o IgM anti-humano (cabra) KPL, catálogo nº #01-10-03, mostrou resultados consistentes por anos quando usado a 1:2000. Portanto, não deve ser necessário titulá-lo.

No entanto, se for necessário, prepare 8 colunas para o seguinte: Em duplicata, controle positivo em antígeno viral; controle negativo em antígeno viral; controle positivo em antígeno normal; controle negativo em

antígeno normal. Se você estiver usando um anticorpo de revestimento diferente do listado acima, titule a partir de uma diluição de 1:500 no tampão de revestimento. Adicione 150 µL da diluição inicial aos poços superiores e dilua em série para baixo na placa por 6 diluições duplas (75 µL dos poços anteriores + 75 µL de tampão de revestimento para obter 2 diluições duplas). Faça o teste ELISA de acordo com o protocolo usando diluições de trabalho sugeridas para o controle positivo, o antígeno e o conjugado. Usando os resultados, escolha uma diluição de anticorpo de revestimento de trabalho que produza uma leitura de DO entre 0,80 e 1,0 para o soro de controle positivo no antígeno viral, e uma que produza uma DO de cerca de 0,1 para o soro de controle negativo. O controle positivo do antígeno normal deve estar bem abaixo do controle positivo do antígeno viral. Sempre use o soro de **controle negativo** a 1:400. O **antígeno normal** sempre deve ser usado na mesma diluição que o antígeno viral.

Conjugado

Com o anticorpo de revestimento na mesma diluição determinada acima, siga o protocolo usando as diluições de trabalho sugeridas para o controle positivo e o antígeno. Prepare 8 colunas para o seguinte: Em duplicata, controle positivo ou antígeno viral; controle positivo em antígeno normal; controle negativo em antígeno viral; controle negativo em antígeno normal. Prepare o conjugado em tampão de bloqueio em uma diluição 4 vezes menor que a diluição de trabalho sugerida. Se não houver nenhuma orientação disponível, use 1:500 como ponto de partida. Adicione 100 µL da diluição inicial nos poços superiores. Adicione 50 µL de tampão de bloqueio a todos os outros poços e dilua serialmente para baixo na placa usando diluições duplas. Para a diluição de trabalho do conjugado, escolha uma que produza uma DO entre 0,8 e 1,0 para o controle positivo no antígeno viral e uma que produza uma DO de cerca de 0,1 para o controle negativo. O controle positivo do antígeno normal deve estar bem abaixo do controle positivo do antígeno viral.

Antígeno

Usando o anticorpo de revestimento e o conjugado nas diluições determinadas acima, o controle positivo usado na diluição de trabalho sugerida e o controle negativo a 1:400, siga o protocolo para a etapa do antígeno. Prepare 8 colunas para o seguinte: Em duplicata, controle positivo em antígeno viral; controle negativo em antígeno viral; controle positivo em antígeno normal; controle negativo em antígeno normal. Prepare o antígeno viral e normal em tampão de lavagem em uma diluição 4 vezes menor que a diluição de trabalho sugerida do antígeno viral. Coloque 100 µL do antígeno viral no poço superior de duas colunas de controle positivo e duas de controle negativo e coloque 100 µL do antígeno normal no poço superior de duas colunas de controle positivo e duas de controle negativo. Adicione 50 µL de tampão de lavagem nos outros poços. Dilua serialmente os antígenos viral e normal para baixo na placa usando diluições duplas. Para a diluição de trabalho do antígeno, escolha uma que produza uma leitura de DO entre 0,8 e 1,0 para o controle positivo no antígeno viral e uma que produza uma DO de cerca de 0,1 para o controle negativo. O controle positivo do antígeno negativo deve estar bem abaixo do controle positivo do antígeno viral.

Controle positivo

Se o *soro* de controle positivo estiver sendo usado (ex. uma amostra de paciente), poderá ser titulado para conservar o material não diluído ou poderá ser executado na mesma diluição que os soros de teste (1:400 em tampão de lavagem). Se o controle positivo do flavivírus quimérico estiver sendo usado, geralmente é útil a 1:3000, mas pode ser titulado se necessário. Prossiga com o protocolo para cima na etapa de adição de soro usando todas as diluições de outros reagentes determinadas anteriormente para que o controle positivo possa ser titulado nos antígenos viral e negativo em duplicata. Comece a série de diluições do *soro* de controle positivo em 1: 100 (início quimérico em 1:750). Adicione 100 µL de anticorpo diluído aos poços superiores, 50 µL aos outros poços, e dilua serialmente para baixo na placa usando diluições duplas. Termine o procedimento e determine a diluição ideal, conforme acima.

Execute o controle positivo em triplicata usando o protocolo de diagnóstico padrão e as diluições dos reagentes determinadas acima para assegurar que o teste seja feito corretamente.