

PROTOCOLO DE ELISA PARA LA INMUNOGLOBULINA IgG

1er paso:

Se debe dibujar en el cuaderno concebido para el protocolo un cuadro donde se identifiquen los diferentes analitos que se insertaran en los pozos de las placas de recubrimiento y disoluciones:

Ej. placa de recubrimiento marcada con los líquidos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	St-1	St-1	B	B	708-s	708-s	708-1	708-1				
B	St-1	St-1	B	B	709-s	709-s	709-1	709-1				
C	St-1	St-1	B	B	710-s	710-s	710-1	710-1				
D	St-1	St-1	B	B	711-s	711-s	711-1	711-1				
E	St-2	St-2	C	C	712-s	712-s	712-1	712-1				
F	St-2	St-2	C	C	713-s	713-s	713-1	713-1				
G	St-2	St-2	C	C	714-s	714s	714-1	714-1				
H	St-2	St-2	C	C	715-s	715s	715-1	715-1				

Leyenda:

St -estándar

C-control

B- blanco (para los blancos se tomo buffer sin colorear)

Pozos numerados del 708-s al 715-s, son los sueros de los pacientes en estudio que deben montarse dobles.

Pozos numerados 708-1 al 715-1, son los líquidos cefalorraquídeos de estos mismos pacientes en estudio, montados doble.

2do paso

RECUBRIMIENTO DE LA PLACA DE RECUBRIMIENTO O LECTURA

Se deben diluir 18 microlitros del reactivo de recubrimiento madre anti IgG humano, en 14 ml de coating buffer, y de esta dilución se dispensan 180 microlitros en los pozos que se utilizaran de la placa que se llevará a leer al lector de Elisa, la cual tiene el fondo plano y está marcada en el borde lateral derecho con *NUNC MaxiSopor*.

En el ejemplo que se expone arriba en los pozos del 1-8 y de A-H

Se debe esperar 24 horas a que se fijen los IgG al fondo de la placa a una temperatura de 4°C.

[** La variante de utilizar los 64 pozos en su totalidad de la placa de recubrimiento se deben dispensar 30 microlitros del anti IgG humano en 14 ml de coating buffer, y de esta dilución se dispensan 180 microlitros en cada uno de pozos de la placa de recubrimiento.]

3er paso:

PREPARAR LA PLACA DE LAS DILUCIONES CON LA CURVA DE LOS ESTÁNDARES Y LOS CONTROLES

- Después de 24 horas de fijada la placa de recubrimiento con el anticuerpo se procede a lavar con agua corriente y destilada tres veces, y se escurre golpeándola sobre un superficie blanda cubierta con papel de filtro hasta que el fondo de los pozos quede libre de agua.
- Fijándonos en el esquema dibujado en el protocolo, en las filas A y E de las cuatro primeras columnas dispensar 100 microlitros de lo que se señala en el esquema.
- En el resto de las filas y hasta la columna 4, dispensar 200 microlitros de buffer coloreado; en el resto de los pozos de la columna 5 en adelante, donde están los sueros y los LCR, dispensar 80 microlitros de buffer sin colorear.
- Dispensar 100 microlitros de las cuatro primeras columnas de la fila B en la fila A, luego 100 microlitros de la fila A a la fila B, a continuación de la fila B 100 microlitros y dispensarlos en la fila C, de fila C tomar 100 microlitros y dispensarlos en la fila D, por último, tomar 100 microlitros de la fila D y desecharlos. Similar maniobra debe realizarse con las primeras cuatro columnas de las filas E, F, G y H.
- Se dispensan 100 microlitros de los que esta señalado en el esquema más 80 microlitros de buffer sin colorear (PBS); en el caso de los blancos son 180 microlitros total de buffer sin colorear (PBS).
- En los pozos de LCR se dispensan 100 microlitros directos; y para los sueros hay que diluir 25 microlitros del suero en 1125 microlitros de buffer coloreado (PBS), y de esta dilución es que se dispensa 100 microlitros en los pozos de los sueros.

Técnica que debe seguirse para la dilución de los sueros:

- En una gradilla porta balitas, se debe cazar las balitas que tiene el suero de los pacientes que se van a estudiar, frente a una balita vacía marcada con el mismo número de la balita que contiene el suero; en las balitas vacías se deben diluir 25 microlitros de los sueros de los pacientes con 1125 microlitros de buffer coloreado.

3er paso-B:

PREPARAR LA PLACA DE LAS DILUCIONES SIN LA CURVA

- Después de 24 horas de fijada la placa de recubrimiento con el anticuerpo se procede a lavar con agua corriente y destilada tres veces, y se escurre golpeándola sobre un superficie blanda cubierta con papel de filtro hasta que el fondo de los pozos quede libre de agua.
 - En este caso no se montan los controles, solo los **estándares, los blancos, el suero y el LCR**, según el esquema del protocolo dibujado en la libreta, en cuyo esquema no se incluyen los controles,
 - Se dispensan 100 microlitros de los que esta señalado en el esquema más 80 microlitros de buffer sin colorear (PBS); en el caso de los blancos son 180 microlitros total de buffer sin colorear (PBS).
 - En los pozos de LCR se dispensan 100 microlitros directos; y para los sueros hay que diluir 25 microlitros del suero en 1125 microlitros de buffer sin colorear (PBS), y de esta dilución es que se dispensa 100 microlitros en los pozos de los sueros.
 - **Técnica que debe seguirse para la dilución de los sueros:** En una gradilla porta balitas, se debe cazar las balas que tiene suero de los pacientes que se van a estudiar, frente a una balita vacía marcada con el mismo número de la balita que contiene el suero; en las balitas vacías se deben diluir 25 microlitros de los sueros de los pacientes con 1125 microlitros de buffer sin colorear.
-

4to Paso:

DILUCIONES DE LA CURVA

- Se dispensan 100 microlitros de la fila B de las cuatro primeras columnas a la fila A, después de la fila A, a la fila B 100 microlitros nuevamente, posteriormente de la fila B a la C 100 microlitros, y de la C a la D 100 microlitros, finalmente se descartan los últimos 100 microlitros.
 - Se dispensan 100 microlitros de la fila F de las cuatro primeras columnas a la fila E, después de la fila E, a la fila F nuevamente 100 microlitros, posteriormente de la fila B a la C 100 microlitros, y de la C a la D 100 microlitros, finalmente se descartan los últimos 100 microlitros.
-

5to Paso:

PREPARACIÓN DEFINITIVA LA PLACA DE RECUBRIMIENTO

Después de lavar la placa de recubrimiento donde se fijaron los anticuerpos IgG de tres a cuatro veces con agua corriente y destilada, y secarla mecánicamente, dispensar 160 microlitros de buffer estándar sin colorear (PBS) en todos los pozos, y añadir 80

microlitros del contenido de los pozos de la placa de las diluciones en los pozos de la placa de recubrimiento correspondientes según el esquema.

6to Paso:

PREPARAR EL CONJUGADO

- Se diluyen 3 microlitros del conjugado anticuerpo humano IgG marcado en con las siglas HRP tanto en la etiqueta del frasco como en la caja que lo contiene (anticuerpo humano IgG/HRP) en 14 ml de buffer sin colorear. (Otra dilución posible de utilizar es 10 microlitros del anticuerpo humano IgG/HRP en 40 ml del buffer sin colorear).

DISPENSAR EL CONJUGADO

- Luego se dispensan 160 microlitros del conjugado preparado en cada uno de los pozos de la placa de recubrimiento y se deja reposar durante una hora para el próximo paso.
-

6to Paso:

PREPARAR EL SUSTRATO

- En 20 ml de agua destilada se diluyen 2 ml del buffer citrato, se agrega 400 microlitros de OPD y al final se agregan 15 microlitros de agua oxigenada:

ORDEN DE MEZCLAR LOS PRODUCTOS EN LA PREPARACIÓN DEL SUSTRATO:

1. 1ro: 20 ml de agua destilada
2. 2do: 2 ml de buffer citrato
3. 3ro: 400 microlitros de OPD
4. 4to: 15 microlitros de agua oxigenada.

DISPENSAR EL SUSTRATO

- Del sustrato preparado se dispensan 160 microlitros en todos los pozos; esta maniobra se debe hacer a oscuras porque el OPD es sensible a la luz.
 - Luego se guarda en un lugar oscuro, (ej. Una gaveta) y se vigila en reposo hasta que comience a tomar color. Ese tiempo de espera hasta que comienza a tomar color, debe ser el tiempo estándar y debe incluirse en el protocolo.
-

7mo Paso:

DETENER LA REACCIÓN

Para detener la reacción se debe dispensar 80 microlitros de ácido clorhídrico o sulfúrico entre el 10 al 15 % de concentración en cada pozo de la placa de recubrimiento.

8vo Paso:

LEER EN EL EQUIPO DE ELISA

Una vez detenida la reacción con el ácido, debe proceder a leer la placa en el lector de Elisa con la mayor inmediatez posible para que los cambios de coloración asociados con la sensibilidad a la claridad del PBS, no afecten los resultados.

Posteriormente con los resultados, se debe calcular la curva de los estándares y en base a está los valores de la IgG en LCR y suero.

Soluciones que deben prepararse antes de comenzar o durante el momento de montar la prueba de ELISA:

Preparar el Estándar Buffer Fosfato (PBS o coating buffer):

- Se toman 9,55 gramos del Estándar Buffer Fosfato en polvo, y se diluyen en 1 litro de agua destilada, y se le agrega 4 ml de Tween.
- Esta dilución se divide en dos; a 300 ml se le añade una pequeña cantidad de fluoresceína en polvo (apenas una pizca) para darle color, obteniendo el coating buffer coloreado, y el resto, aproximadamente 700 ml no se modifica obteniendo el coating buffer básico sin colorear.

Preparar el Estándar Buffer Fosfato Diluido (coating buffer diluido):

- Se toman 5 ml de coating buffer básico (Estándar Buffer Fosfato) y se completa con 100 ml de agua destilada (95 ml de agua destilada).
- Esta es la solución donde se diluyen los anticuerpos humanos IgG, IgM e IgA y la albumina para cubrir las placas que se leerán en el ELISA.

Preparar la dilución de los anticuerpos de recubrimiento

- Diluir el anticuerpo IgG, IgA e IgM
- El IgA e IgM 1:2000 el IgG y albumina 1:4000

- Diluir 10 microlitros del anticuerpo y diluirlo en 20 ml de buffer estándar diluido para IgA e IgM.
- Diluir 10 microlitros del anticuerpo y diluirlo en 40 ml de buffer estándar diluido para IgA e IgM.

Estándar madre:

- Se diluyen 50 microlitros del *Estándar* en 2,5 ml de agua destilada (1:50) 1,89 g/l IgA; 0,671 g/l IgM.

Estándar 1 y 2:

- Estándar 1: Se diluyen 100 microlitros del *Estándar madre* en 900 microlitros del *coating buffer diluido coloreado*.
- Estándar 2: Se diluyen 500 ml del *Estándar 1* en 500 microlitros del *coating buffer diluido coloreado*.

Control matriz (madre):

- Se diluyen 50 microlitros del *Control* en 2,5 ml de agua destilada; (1:50).

Dilución del control:

- Diluir 25 microlitros en 1125 microlitros de buffer coloreado.

PRODUCTOS NECESARIOS PARA REALIZAR TODOS LOS PASOS DEL ELISA

- **Placa de recubrimiento:** placa que se recubre con los anticuerpos de recubrimiento IgG, IgA o IgM y se deja reposar por 24 horas, para luego añadirles las diluciones efectuadas en la placa de diluciones; al final se lee en el lector de Elisa; tiene el fondo plano marcado en el borde lateral derecho con *NUNC MaxiSopor*.
- **Placa de las diluciones:** es donde se diluyen los estándares, los controles, los sueros y los LCR de los pacientes con el buffer sin colorear para posteriormente pasarlos a la placa de recubrimiento preparada desde el día anterior con los anticuerpos de recubrimiento IgG, IgA o IgM dispensados desde el día anterior.
- **Anticuerpo de recubrimiento IgG, IgA IgM:** vienen en frascos de 2 ml; en el caso de la IgG, esta identificado tanto en la caja que lo contiene como en la etiqueta del frasco como **Polyclonal Rabbit Anti-Human IgG**.
- **Dilución del Anticuerpo de recubrimiento IgG:** De este reactivo en el caso de la IgG, se deben diluir 18 microlitros en 14 ml de coating buffer diluido, y de esta dilución se dispensan 180 microlitros en los pozos que se utilizaran de la placa de recubrimiento que luego se deja reposar por 24 horas para posteriormente añadirle las diluciones realizadas en las placas de las diluciones.

(Aclaración, estas son las proporciones que se están tomando en el protocolo que se sigue actualmente).

- **Estándar y Control:** Vienen ambos en la misma caja en frascos de 1ml (con la tapa blanca el estándar y roja el control); la caja que los contiene, se reconoce porque tiene el nombre del laboratorio que los produce, en este caso SIEMENS, y las siglas N/T Protein Control SL/H; N/T PROT y SL/H CONTROL; la etiqueta del frasco del **estándar** se identifica como: IN/PROT/STANDARD/SL, y la del **control** como: IN/PROT/CONTROL/SL/H.
- **Preparación del Control:** Se diluyen 50 microlitros del frasco del control en 2.5 ml de agua destilada (1:50), luego se toman 25 microlitros en 1125 microlitros de buffer coloreado.
- **Preparación de los Estándares:** Se diluyen 50 ml del estándar en 2,5 ml de agua destilada (1:50) (1,89 g/l IgA y 0,671 g/l IgM)
 - **Estándar 1:** diluir 100 microlitros del estándar en 900 microlitros de buffer diluido coloreado.
 - **Estándar 2:** diluir 500 microlitros del estándar 1 en 500 microlitros buffer diluido coloreado.
- **Conjugado:** Viene en frascos de 2 ml del conjugado anticuerpo humano IgG marcado en con las siglas HRP tanto en la etiqueta del frasco como en la caja que lo contiene (anticuerpo humano IgG/HRP)
- **Preparación del conjugado:** Se diluyen 3 microlitros del conjugado madre en 14 ml de buffer sin colorear. (Otra dilución posible de utilizar es 10 microlitros del anticuerpo humano IgG/HRP en 40 ml del buffer sin colorear).
 - Posteriormente a dispensar los *controles, estándar, blanco, LCR y sueros*, en la placa de recubrimiento proveniente de la placa de las diluciones, se espera una hora y se lava con agua corriente de 3 a 4 veces y se seca mecánicamente.
 - Luego en la placa de recubrimiento con los líquidos provenientes de la placa de las diluciones, se dispensan 160 microlitros del conjugado preparado en cada uno de los pozos y se deja reposar durante una hora para el próximo paso.
- **Buffer estándar (Estándar Buffer Fosfato (PBS), coating buffer o buffer estándar):** Se diluye 9,55 gramos de PBS en polvo en 1 litro de agua destilada más 4 ml de Tween; de ellos se dejan de 500 a 700 ml sin colorear, sería el buffer estándar sin colorear, y al resto se le añade una pizca de fluoresceína para preparar el buffer estándar coloreado.
- **Buffer diluido (Coating buffer diluido):** Se diluyen 5 ml de buffer estándar en 100 ml de agua destilada.

- **Sustrato:** (Se debe mantener el siguiente orden al dispensar los siguientes productos): en 20 ml de agua destilada se diluyen 2 ml de buffer citrato, después se añade 400 microlitros de OPD y por último 15 microlitros de agua oxigenada.
 - **Del sustrato se deben agregar:** 160 microlitros en cada pozo de la placa de recubrimiento, taparla y guardarla en la oscuridad hasta que comience a tomar color (aproximadamente entre 10 a 20 minutos).
 - **Solución de parada:** Para parar la reacción, Se debe agregar 80 microlitros de ácido sulfúrico o clorhídrico al 10-15 % en cada pozo, taparla y llevarla al lector de Elisa.
-

Cálculo para el reibergrama una vez que tenemos los valores de lectura del ELISA

Posteriormente, se deben introducir las cifras de los resultados de la lectura en la base de datos en que se encuentra en Excel, de los IgG tanto en líquido como en suero, se introducen las dos cifras que recoge la lectura, y al marcar enter, da al final el resultado promedio de las dos lecturas.

Ese resultado promedio de los anticuerpos IgG en LCR y suero, es el que se introduce en el programa de realizar el reibergrama.

La albumina en LCR y suero, se calcula mediante la técnica que se realiza en el laboratorio de terapia intensiva, y es la cifra que se introduce en el programa del reibergrama para realizarlo.