



Concentración de anticuerpos usando una curva estándar

El kit de ELISA UDITEST-V2G® incluye como control positivo, un anticuerpo monoclonal humano IgG1 anti-RBD a una concentración conocida. Este anticuerpo se usa como referencia para el cálculo de concentración en nanogramos por mililitro (ng/mL) de anticuerpos anti-RBD en muestras de plasma/suero humanas.

1.1. Preparación de la curva estándar de anticuerpo anti-RBD.

a) Preparar el control positivo como se indica en el inserto del kit, agregando 300 µL de la **Solución Diluyente de Anticuerpos al Control Positivo**. Una vez diluido, el anticuerpo tendrá una concentración de 10,000 ng/mL.

b) A partir de la **Solución Control Positivo**, hacer diluciones seriadas como se indica en el diagrama de la Figura 1 de acuerdo con las cantidades referidas en la Tabla 1:

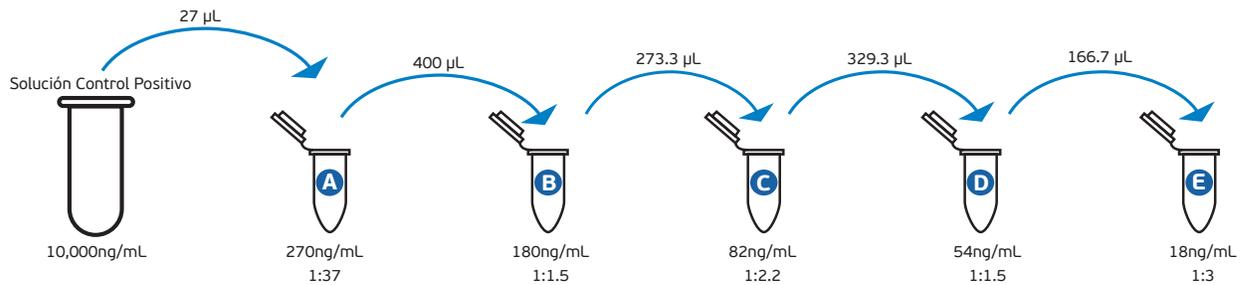


Figura 1. Diluciones seriadas del anticuerpo anti-RBD.

Tabla 1. Preparación de diluciones del anticuerpo anti-RBD

Tubo de dilución	Concentración (ng/mL)	Volumen de traslado (µL)	Diluyente (µL)	Factor de dilución realizado
A	270	27.0 de la solución original	973.0	1:37
B	180	400 de la solución A	200	1:1.5
C	82	273.3 de la solución B	326.7	1:2.2
D	54	329.3 de la solución C	170.7	1:1.5
E	18	166.7 de la solución D	333.3	1:3

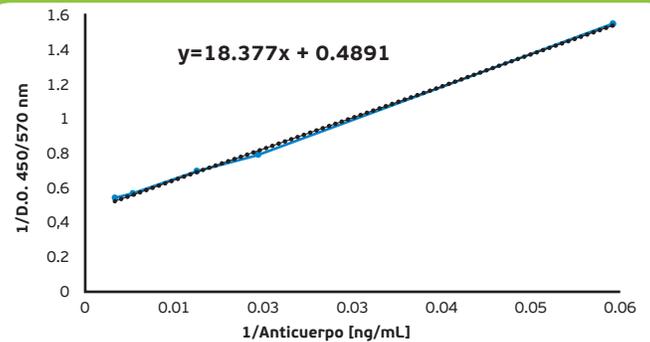


Figura 2. Gráfico del inverso de la densidad óptica (D.O.) y el inverso de las concentraciones del anticuerpo control. En este ejemplo el valor de la pendiente (m) es 18.377 y la ordenada al origen (b) de 0.4891.

c) Para facilitar el cálculo, se proporciona un archivo de Excel donde se deberán colocar las absorbancias obtenidas de la curva preparada en el inciso b) en las casillas marcadas en verde, en la sección "curva".

d) El archivo generará una gráfica del inverso de la D.O. 450/570 nm vs el inverso de la concentración de anticuerpo, que se ajusta a un modelo lineal como se muestra en la Figura 2.

e) Colocar el valor de la pendiente en la casilla verde marcada como "m value" y el valor de la ordenada al origen en la casilla verde marcada como "b value". Éstas servirán para el cálculo de la concentración de las muestras utilizando la ecuación de la recta de la gráfica de inversos (Figura 2).

1.2. Preparación de las muestras.

a) Seguir la preparación de las muestras como se indica en el inserto del kit UDITEST-V2G®.

b) Se recomienda diluir el suero/plasma en 1:100, 1:1000, 1:10 000.

c) La D.O. de las muestras deberá ser mayor 0.5 y dentro del intervalo de cuantificación de la linealidad de la curva).

d) Sustituir los valores de las muestras en el archivo Excel (casilla verde marcada, sección "muestras") para obtener la concentración de las muestras diluidas.

f) Para calcular la concentración final multiplicar por el factor de dilución de la muestra.

NOTA: En caso que la D.O. de las muestras esté fuera del intervalo lineal de la curva se sugiere realizar otras diluciones. La cantidad de control positivo es suficiente para realizar 2 curvas completas, si desea adquirir más producto, póngase en contacto con nosotros a través de nuestra página: <https://productos.udibi.com.mx/>.

SECCIÓN B

Titulación de muestras por el método de dilución

El kit de ELISA UDITEST-V2G® permite obtener el título de anticuerpos en muestras de suero/plasma por el método de diluciones y cálculo de la concentración efectiva al 50% (EC₅₀).

a) Preparar las muestras de acuerdo con el inserto del kit UDITEST-V2G®.

b) Se deben realizar diluciones de las muestras de suero/plasma en un intervalo de 1:30 a 1:65,610 (8 diluciones con factor 1:3) de acuerdo con la tabla 2, para obtener una curva sigmoidea completa.

Tubo de dilución	Dilución	Volumen de traslado (µL)	Diluyente(µL)
A	1:30	15 suero/plasma	435
B	1:90	150 dilución A	300
C	1:270	150 dilución B	300
D	1:810	150 dilución C	300
E	1:2,430	150 dilución D	300
F	1:7,290	150 dilución E	300
G	1:21,870	150 dilución F	300
H	1:65,610	150 dilución G	300

a) Colocar 100 µL de cada dilución en la placa del kit UDITEST-V2G®, se recomienda colocarlas por duplicado y seguir la ejecución de la metodología como se indica en el inserto.

b) Graficar los resultados de las D.O. (eje de las Y) resultantes de cada dilución (eje de las X). En la Figura 3 se presentan ejemplos de la titulación de muestras de sueros obtenidos de personas recuperadas de la infección de SARS-CoV-2 y muestras de personas vacunadas. c) Calcular la EC₅₀ manualmente o empleando un software estadístico adecuado.

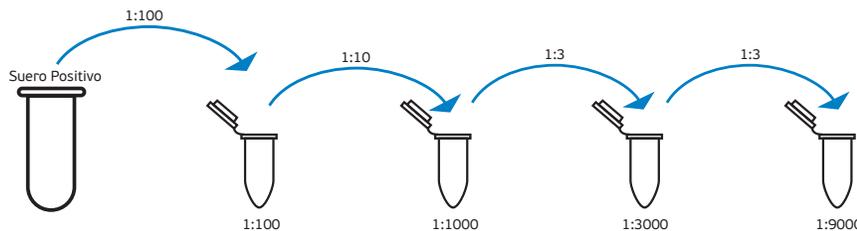
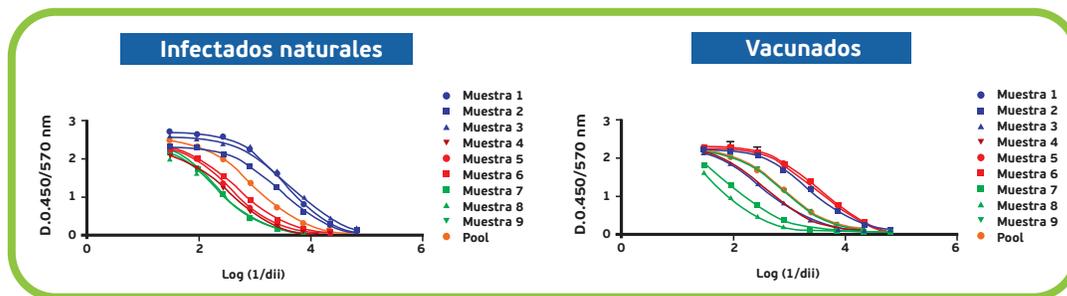


Figura 3. Curvas sigmoideas de la titulación de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 en muestras de suero obtenidas de individuos recuperados de la infección por SARS-CoV-2 o vacunados contra COVID-19.

IMPORTANTE

Se recomienda realizar al menos 5 diluciones (Diluciones sombreadas en gris en la Tabla 2) para obtener la EC₅₀ de cada muestra, como se indica en la Figura 4 :

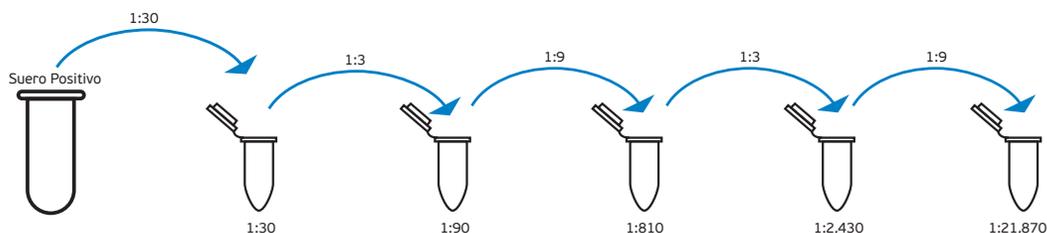


Figura 4. Diagrama de diluciones para sueros