

SIMULACIÓN DE LA DETECCIÓN DEL HIV POR ELISA

10 grupos de estudiantes

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de este experimento es aportar a los estudiantes el conocimiento de la biología molecular y la patogénesis del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Los conceptos experimentales y metodología implicados con el ELISA serán introducidos en el contexto del "screening" clínico de muestras de suero para anticuerpos del VIH.

2. COMPONENTES para 10 grupos de estudiantes

ESTE EXPERIMENTO NO CONTIENE VIRUS VIH O SUS COMPONENTES

COMPONENTES	CONSERVACIÓN
A ELISA Wash Buffer 10x	Nevera
B ELISA Dilution Buffer	Nevera
C Antígeno Liofilizado	Nevera
D Anticuerpo Primario Liofilizado	Nevera
E Anticuerpo Secundario Liofilizado	Nevera
F ABTS Liofilizado	Nevera
G ABTS Reaction Buffer	Nevera

2.1 Reactivos y material suministrado

Guarde todos los componentes a continuación a temperatura ambiente.

- Placas de microtitulación.
- Pipetas de transferencia.
- Tubos de microcentrífuga con tapa a presión.
- Tubos cónicos de 15 ml.

2.2 Material requerido y no suministrado

- Agua destilada
- Vasos.
- Guantes de laboratorio.
- Gafas de protección.
- Micropipetas automáticas (50 µl) y puntas (es recomendado su uso, ya que hace más fácil la práctica que utilizando las pipetas de 1 ml suministradas).

Todos los componentes están diseñados sólo para la investigación educativa. No deben ser utilizados para propósitos de diagnóstico o de drogas, ni ser administrados o consumidos por los seres humanos o animales.

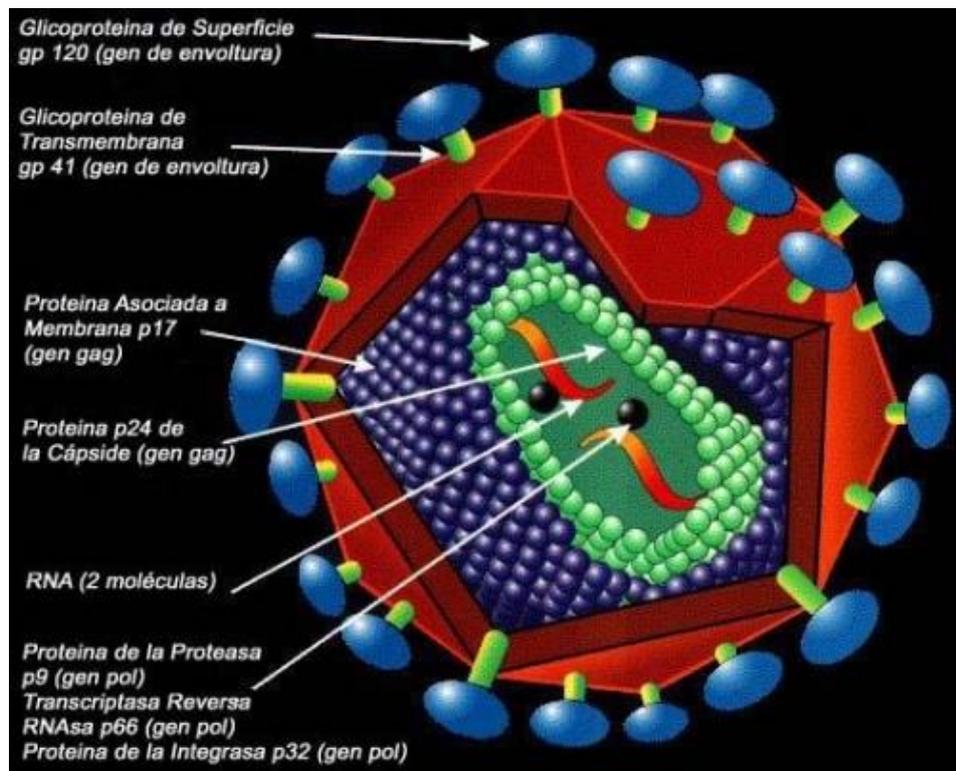
Se debe asegurar que todo el material de cristal utilizado esté limpio, seco y libre de residuos de jabón. Para mayor comodidad, se pueden comprar pipetas de transferencia desechables adicionales para los pasos de lavado y eliminación de líquidos.

3. INTRODUCCIÓN

El Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) es una enfermedad caracterizada por el deterioro progresivo del sistema inmune de un individuo. El deterioro inmunológico permite que los agentes infecciosos, como virus, bacterias, hongos y parásitos que invaden el cuerpo y se propaguen. Además, la incidencia de ciertos tipos de cáncer aumenta dramáticamente en estos pacientes debido a tener su sistema inmune comprometido. El SIDA es una seria amenaza para la salud humana y es un problema global. La investigación intensiva se está haciendo para avanzar en los métodos de detección, tratamiento clínico y la prevención.

SOBRE EL HIV

El **virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)** es un [lentivirus](#) (de la familia [Retroviridae](#)), causante del [síndrome de inmunodeficiencia adquirida \(sida\)](#).



Está formado por una partícula esférica de 80-100 nm con una estructura en dos capas:

- La envoltura es una bicapa lipídica derivada de la célula huésped donde se insertan las Glicoproteínas con 72 proyecciones externas. Contiene las proteínas virales Gp120, Gp41 y

Gp17

- La nucleocápside central o core en cuyo interior se encuentra el material genético y las enzimas necesarias para la replicación viral.

El genoma es un ARN de cadena única constituido por 2 hebras idénticas de polaridad positiva. Existen genes encargados de codificar los componentes de la partícula vírica (genes estructurales) y de regular la expresión de los mismos (genes reguladores). De los genes estructurales el gen GAG codifica las proteínas del core, el gen POL codifica fundamentalmente la Transcriptasa Inversa y la Proteasa y el gen ENV las proteínas de la envoltura vírica.

3.1 La enfermedad: SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida)

Es una enfermedad causada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La afección destruye el sistema inmunitario de forma gradual, lo cual hace que para el cuerpo sea más difícil combatir infecciones.

El SIDA es la sexta causa importante de muerte en personas entre 25 y 44 años de edad en los Estados Unidos, pero en 1995 ocupaba el número uno. Millones de personas alrededor del mundo viven con VIH/SIDA, incluso muchos niños menores de 15 años.

Las bacterias comunes, los hongos, los parásitos y los virus que generalmente no provocan enfermedades serias en personas con sistema inmunitario sano pueden provocar enfermedades mortales en las personas con SIDA.

Se ha encontrado el VIH en saliva, lágrimas, tejido del sistema nervioso, líquido cefalorraquídeo, sangre, semen (incluido el líquido preseminal, que es el líquido que sale antes de la eyaculación), flujo vaginal y leche materna. Sin embargo, se ha demostrado que sólo la sangre, el semen, los flujos vaginales y la leche materna transmiten la infección a otras personas.

Síntomas del SIDA

El SIDA comienza con una infección por VIH. Es posible que las personas infectadas con el VIH no presenten síntomas durante 10 años o más, pero pueden transmitir la infección a otros durante este período asintomático. Si la infección no se detecta y no se inicia el tratamiento, el sistema inmunitario se debilita gradualmente y se desarrolla el SIDA.

La infección aguda por VIH progresa con el tiempo (generalmente de unas pocas semanas a meses) a una [infección por VIH asintomática](#) (sin síntomas) y luego a infección sintomática temprana por VIH. Posteriormente, progresa a SIDA (infección por VIH avanzada con conteo de células T CD4 por debajo de 200 células/mm³).

Casi todas las personas infectadas con el VIH, de no recibir tratamiento, contraerán SIDA. Hay un pequeño grupo de pacientes en los que el SIDA se desarrolla muy lentamente o que nunca aparece. A estos individuos se los llama pacientes sin progresión de la enfermedad y muchos parecen tener una diferencia genética que impide que el virus cause daño a su sistema inmunitario.

Los síntomas del SIDA son principalmente el resultado de infecciones que normalmente no se desarrollan en personas con un sistema inmunitario sano. Éstas se llaman infecciones oportunistas. En las personas con SIDA, el VIH ha dañado el sistema inmunitario, por lo que son muy susceptibles a dichas infecciones oportunistas. Los síntomas comunes son:

- Escalofríos

- Fiebre
- Sarpullido
- Sudores (particularmente en la noche)
- Ganglios linfáticos inflamados
- Debilidad
- Pérdida de peso

Nota: Al principio, es posible que la infección con el VIH no produzca ningún síntoma. Sin embargo, algunas personas sí experimentan síntomas pseudogripales con fiebre, erupción cutánea, dolor de garganta e inflamación de los ganglios linfáticos, generalmente entre 2 y 4 semanas después de contraer el virus. Esto se denomina síndrome retroviral agudo. Algunas personas con infección por VIH permanecen por años sin síntomas entre el momento en que se exponen al virus y cuando desarrollan el SIDA.

Vías de transmisión del SIDA

El virus se puede diseminar (transmitir):

- A través del contacto sexual: incluido el sexo oral, vaginal y anal.
- A través de la sangre: vía transfusiones de sangre (ahora muy infrecuente) o por compartir agujas
- De la madre al hijo: una mujer embarazada puede transmitirle el virus a su feto a través de la circulación sanguínea compartida, o una madre lactante puede pasárselo a su bebé por medio de la leche materna.

Otros métodos de propagación del virus son infrecuentes y abarcan la lesión accidental con una aguja, inseminación artificial con semen donado infectado y trasplantes de órganos infectados.

La infección por VIH no se propaga por:

- Contacto casual como un abrazo
- Mosquitos
- Participación en deportes
- Tocar cosas que han sido tocadas con anterioridad por una persona infectada con el virus
- El SIDA no se transmite a una persona que DONA sangre u órganos. Las personas que donan órganos nunca entran en contacto directo con quienes los reciben. De la misma manera, alguien que dona sangre nunca tiene contacto con el que la recibe. En todos estos procedimientos se utilizan agujas e instrumentos estériles.
- Sin embargo, el VIH se puede transmitir a la persona que RECIBE sangre u órganos de un donante infectado. Para reducir este riesgo, los bancos de sangre y los programas de donación de órganos hacen exámenes minuciosos a los donantes, la sangre y los tejidos.

Entre las personas con mayor riesgo de contraer el VIH están:

- Drogadictos que comparten agujas para inyectarse drogas.
- Bebés nacidos de madres con VIH que no recibieron tratamiento contra el VIH durante el embarazo.
- Personas involucradas en relaciones sexuales sin protección, especialmente con individuos que tengan otros comportamientos de alto riesgo, que sean VIH positivos que tengan SIDA.
- Personas que recibieron transfusiones de sangre o hemoderivados entre 1977 y 1985 (antes de que las pruebas de detección para el virus se volvieran una práctica habitual).

- Los compañeros sexuales de personas que participan en actividades de alto riesgo (como el uso de drogas inyectables o el sexo anal).

Diagnóstico del SIDA

En la mayoría de los casos se usan técnicas **inmunoenzimáticas (EIA, ELISA) en una muestra de sangre**. En caso de que el resultado sea positivo, con la misma muestra de sangre extraída se realiza una técnica más específica para confirmar el resultado, siendo el Western Blot el método más empleado.

Además se realizan los contajes de linfocitos para saber la afectación del sistema inmune, y desde 1.995 se puso a punto una técnica, **la demostración de genoma vírico mediante técnicas de biología molecular (PCR)**, que permitía medir la cantidad de virus VIH en la sangre, lo que a su vez es un reflejo de la cantidad de virus que existen en todo el organismo.

Tratamiento del SIDA

En este momento, no existe cura para el SIDA. Sin embargo, se encuentran disponibles varios tratamientos que pueden ayudar a mantener los síntomas a raya y mejorar la calidad y duración de la vida de aquellas personas que ya han desarrollado síntomas.

Al aplicar la técnica PCR para VIH muestras de sangre congeladas desde 10 o más años antes, se vio que de las personas que tenían muy pocos virus (carga viral baja) apenas un 10% habían desarrollado SIDA, mientras que las personas que tenían gran cantidad de virus (carga viral alta) en sangre habían desarrollado SIDA y muerto en su mayoría.

Hasta 1.995 se disponía de una serie de fármacos denominados Inhibidores de la Transcriptasa Inversa Viral (RETROVIR, VIDEX, HIVID) que por separado o en combinación tenían un efecto poco potente y, además, transitorio sobre el virus VIH, logrando retrasar la aparición de SIDA en una persona infectada como máximo 2 años; si se usaban en fase de SIDA retrasaban la muerte en 1 ó 2 años.

Esto se debe a que el virus es capaz de hacerse resistente a estos fármacos porque está cambiando (mutando) cada vez que se reproduce (replica); como es lógico, aquellas personas que tienen gran cantidad de virus tienen mayor tasa de replicación (y de resistencia) y el pronóstico es peor que en el caso de que tengan pocos virus. Se vio también que con los anteriores fármacos se lograba como media dividir por 10 ó por 50 la cantidad de virus de la sangre, lo que, en una persona que tuviese, por ejemplo, 300.000 virus por mililitro, es una reducción insignificante e insuficiente para evitar la progresión a SIDA.

En 1.995-6 aparecieron, ya comercializados, una serie de fármacos denominados Inhibidores de la Proteasa Viral (NORVIR, INVIRASE, CRIVAN) que, en combinación con los anteriores, logran dividir la carga viral por 1.000 ó más; en algunos pacientes consiguen hacer desaparecer de la sangre a estos virus y, manteniendo el tratamiento varios años, pueden quizá eliminar por completo el virus del organismo.

La experiencia con dos años de uso es muy buena, con reducciones de mortalidad de más del 50%, recuperación de los linfocitos T4 perdidos y mejoría marcada de los síntomas de la enfermedad. Estos tratamientos son relativamente bien tolerados y se administran por boca (no necesitan inyectarse). Aunque estos tratamientos son muy caros (un Inhibidor de la Proteasa más dos Inhibidores de la Transcriptasa suponen al año más de 6000 euros), en España están cubiertos por la Seguridad Social y, sobre todo, las vidas salvadas y el ahorro que producen en gastos de hospitalización

compensan ampliamente su valor económico.

Prevención del SIDA

Por vía sexual

- Teniendo abstinencia sexual (no teniendo relaciones sexuales).
- Mediante la práctica del sexo seguro, es decir, sin penetración (besos, caricias, abrazos, autoerotismo o masturbación).
- Utilizando condón en cada relación sexual.

Por vía sanguínea

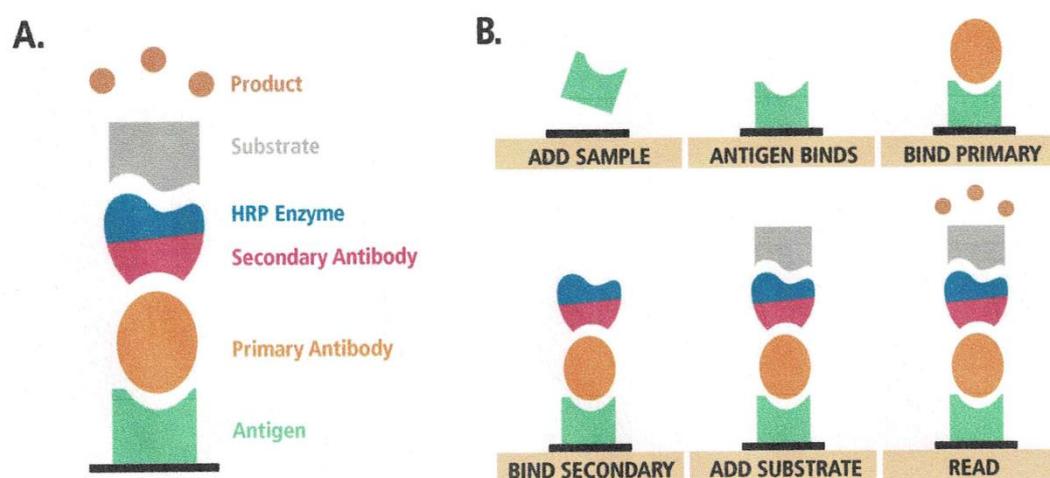
1. Utilizando sangre y derivados que hayan sido previamente analizados y estén libres del virus.
2. Recomendando a los usuarios de drogas inyectables utilizar una aguja y jeringa nueva en cada aplicación lavarlas y/o hervirlas.
3. Utilizando guantes de látex o poliuretano siempre que se maneje sangre o secreciones corporales.

Por vía perinatal

Ofreciendo la prueba de detección para el VIH al 100% de mujeres embarazadas, de manera gratuita, voluntaria y confidencial en los servicios de salud de todo el país.

3.2 Descripción de la simulación de la detección del VIH

Los ELISA se desarrollaron originalmente para medir la cantidad de anticuerpos en una solución, pero desde entonces se han adaptado para detectar muchos tipos diferentes de antígenos. Los ELISA tradicionales requieren dos anticuerpos. El primer anticuerpo, llamado "anticuerpo primario", reconoce el antígeno de interés. Por ejemplo, un ELISA que detecta el virus del VIH podría estar diseñado para usar un anticuerpo que reconozca una de las proteínas de la cubierta del virión. En un ELISA clínico de VIH, el ensayo determinará si los anticuerpos contra el VIH están presentes en las muestras de pacientes.



El "anticuerpo secundario" reconoce el anticuerpo primario: dado que nuestro anticuerpo primario es producido por células inmunes humanas, usaríamos un anticuerpo secundario que reconoce específicamente los anticuerpos humanos. El anticuerpo secundario está unido covalentemente a una enzima llamada peroxidasa de rábano picante (HRP) que

nos permite detectar la presencia del complejo anticuerpo-antígeno (Figura 3A). HRP tiene una alta actividad catalítica: sus tasas de renovación de sustrato superan los 106 por segundo, lo que nos permite detectar rápidamente incluso la menor cantidad de antígeno.

Para realizar un ELISA, las muestras se agregan a los pocillos y se permite que los antígenos se adsorban a la superficie a través de asociaciones hidrófobas (Figura 3B). En un ELISA de VIH, los antígenos serán proteínas virales preparadas con antelación.

Los ELISA a menudo se realizan en placas de microtitulación transparentes hechas de poliestireno o plásticos de cloruro de polivinilo. Los científicos agregan antígenos a los pozos y les permiten adherirse de manera no específica al plástico a través de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. Después de lavar cualquier exceso de líquido, los pocillos se "bloquean" con un tampón que contiene proteínas, lo que evita interacciones no específicas entre el anticuerpo y los pocillos de plástico.

A continuación, se agrega una muestra de paciente, o una muestra de control, a los pocillos y se deja incubar la mezcla por un corto tiempo. Si los anticuerpos anti-VIH están presentes en la muestra del paciente, reconocerán y se unirán a los antígenos del VIH. Después del período de incubación, los pocillos se lavan para eliminar cualquier anticuerpo primario que no se unió al antígeno.

Después del lavado, se agrega un anticuerpo secundario ligado a enzimas a los pocillos donde reconoce y se une al anticuerpo primario (si está presente). Es importante destacar que si no hubo un anticuerpo primario en la muestra del paciente, no habrá nada para que el anticuerpo secundario se una. Como antes, el exceso de anticuerpo se elimina de los pocillos lavando con tampón. Si el anticuerpo secundario se ha unido al anticuerpo primario, permanecerá en el pocillo.

Finalmente, se agrega a cada pocillo una solución transparente e incolora de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) y peróxido de hidrógeno. La enzima HRP en el anticuerpo secundario oxida ABTS en los pocillos donde está presente el complejo antígeno-anticuerpo, volviendo la solución de sustrato transparente azul-verde. Como cada enzima descompone muchas moléculas de sustrato, el ELISA puede detectar incluso la menor cantidad de antígeno. Si bien el cambio de color de claro a azul verdoso es detectable a simple vista, medir la absorbancia de la muestra a 405 nm proporciona un resultado cuantitativo.

4. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

El objetivo de este experimento es aportar a los estudiantes el conocimiento de la biología molecular y la patogénesis del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Los conceptos experimentales y metodología implicados con el ELISA serán introducidos en el contexto del "screening" clínico de muestras de suero para anticuerpos del VIH.

Este experimento replica un "screening clínico" para detectar anticuerpos contra el VIH en una muestra de sangre de un paciente simulado. Los estudiantes incubarán los antígenos preparados en una placa de microtitulación, se lavarán para eliminar la proteína no adsorbida y luego se incubarán con muestras de control y de pacientes. Si un paciente es positivo para el VIH, su sangre contendrá anticuerpos anti-VIH que pueden unirse a las proteínas en el pocillo. Luego se agrega un Anticuerpo secundario ligado a HRP para detectar anticuerpos primarios, si están presentes. Finalmente, se agrega sustrato a cada pocillo y se controla para determinar el estado del ensayo. Al concluir el experimento, los estudiantes proporcionarán un diagnóstico de VIH para cada paciente.

4.1 Precauciones

1. Se deben usar gafas y guantes de laboratorio de forma habitual mientras se trabaja.
2. **NO PIPETEAR CON LA BOCA**, utilizar los dispositivos adecuados.
3. Extremar las precauciones cuando se trabajan con equipos que utilizan conjuntamente calor y mezcla de reactivos.
4. Se deben lavar las manos con jabón y agua después de haber trabajado en el laboratorio o utilizado reactivos o materiales biológicos.

4.2 Libreta de laboratorio

Se debe anotar y registrar en el cuaderno de laboratorio o en una hoja de trabajo separada toda la información.

Antes de iniciar el Experimento:

- Leer atentamente la introducción y el protocolo. Utilizar esta información para formular una hipótesis para esta práctica.
- Predecir los resultados de la práctica.

Durante el Experimento:

- Registrar (dibuje) las observaciones o fotografiar los resultados obtenidos.

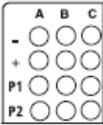
Después del Experimento:

- Formular una explicación a partir de los resultados obtenidos.
- Determinar qué se podría cambiar en la práctica si se repitiera.
- Escribir una nueva hipótesis que reflejaría el cambio propuesto.

5. PRÁCTICA

Realizando el ELISA

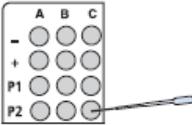
1. **LABEL** the microtiter plate.



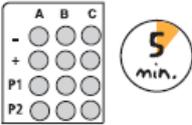
2. **LABEL** the transfer pipets.



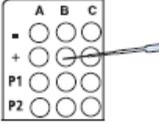
3. **ADD** 3 drops Ag to all 12 wells.



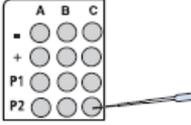
4. **INCUBATE** microtiter plate at room temp.



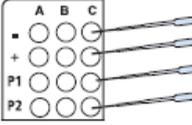
5. **REMOVE** liquid from wells.



6. **WASH** each well with wash buffer.



7. **REMOVE** all wash buffer using the pipet for each row.



8. **REPEAT** Steps 6 and 7.

1. ETIQUETAR los pocillos de la placa de microtitulación como se muestra.
2. ETIQUETAR las pipetas de transferencia como se describe en el cuadro a continuación. Estas 8 pipetas se usarán para agregar y eliminar líquido de los pozos.

Lavado - Tampón de lavado PBST 1x

Ag - Antígeno del VIH

(-) - Control negativo

(+) - Control Positivo

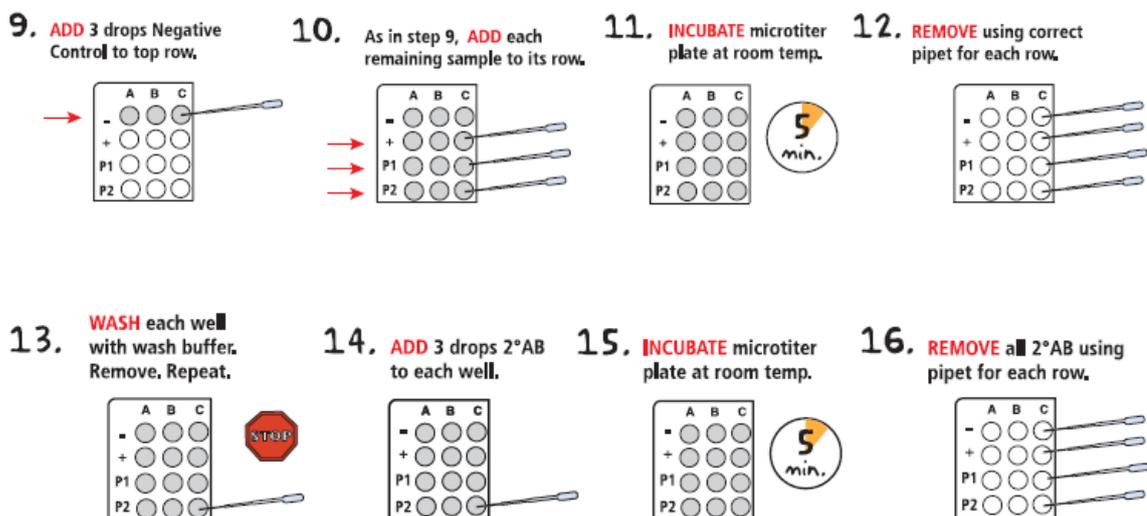
P1 - Muestra Paciente 1

P2 - Muestra Paciente 2

2°AB - Anticuerpo secundario

ABTS - Sustrato ABTS

- Usando la pipeta de transferencia "Ag" o una micropipeta, AGREGAR 3 gotas o 50 µl de Antígeno (Ag) a los 12 pocillos.
- INCUBAR la placa a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Usando la pipeta "Ag", RETIRAR todo el líquido de los pocillos.
- Usando la pipeta de transferencia "Lavado" LAVAR cada pocillo agregando buffer de lavado hasta que los pocillos estén casi llenos (~ 200 µl). No permita que el tampón se derrame a los pozos adyacentes.
- ELIMINAR todo el tampón de lavado utilizando la pipeta de transferencia designada para cada fila.
- REPETIR los pasos 6 y 7 para lavar los pocillos una vez más.



- Usando la pipeta de transferencia "(-)" o una micropipeta, AGREGAR 3 gotas o 50 µl del control negativo a los tres pocillos en la fila superior.
- Como en el paso 9, AGREGAR las muestras "(+)", "P1" y "P2" a los tres pocillos en las filas apropiadas, teniendo cuidado de usar las pipetas correctas o cambiando las puntas entre cada muestra.
- INCUBAR la placa a temperatura ambiente durante 5 minutos.

12. Usando la pipeta de transferencia correcta para cada fila, RETIRAR todos los anticuerpos primarios de cada pocillo.

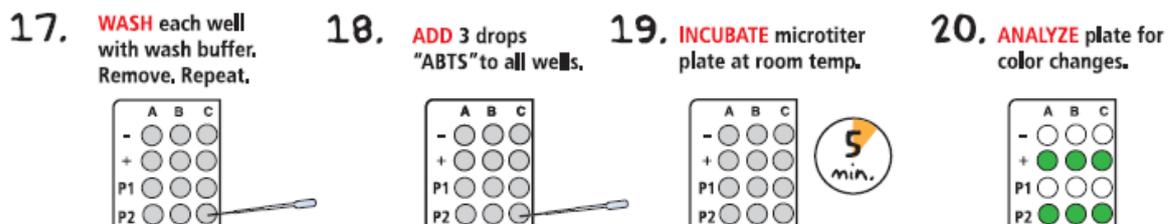
13. LAVAR cada pocillo dos veces con tampón de lavado nuevo. Entre lavados, RETIRAR todo el tampón de lavado de cada pocillo utilizando la pipeta de transferencia designada para cada fila.

PUNTO DE DETENCIÓN OPCIONAL: Para el almacenamiento durante la noche, AGREGAR 200 μ l de tampón de lavado a cada pocillo. Cubrir cuidadosamente las muestras y colocar la placa en la nevera (4°C). Cuando la práctica se reanude, durante el próximo período de laboratorio, se deberá retirar el tampón de lavado y continuar con el paso 14.

14. Usando la pipeta de transferencia marcada "2°AB" o una micropipeta, AGREGAR 3 gotas o 50 μ l del anticuerpo secundario a cada pocillo.

15. INCUBAR la placa a temperatura ambiente durante 5 minutos.

16. Usando la pipeta de transferencia etiquetada para cada fila, RETIRAR todos los anticuerpos secundarios de cada pocillo.



17. LAVAR cada pocillo dos veces con tampón de lavado nuevo. Entre lavados, RETIRAR todo el tampón de lavado utilizando pipeta de transferencia designado para cada fila.

18. Usando la pipeta de transferencia etiquetada "ABTS" o una micropipeta, AGREGAR 3 gotas o 50 μ l de sustrato ABTS a todos los pocillos.

19. INCUBAR la placa a temperatura ambiente durante 5 minutos.

20. ANALIZAR inmediatamente la placa para detectar cambios de color en el sustrato. Si el color no está completamente desarrollado, se puede dejar por un período de tiempo más largo.

6. PREGUNTAS DE LA PRÁCTICA

1. Describir el mecanismo del ELISA. ¿Por qué el ELISA es tan sensible? ¿Por qué es necesario bloquear los sitios de unión desocupados en los pocillos de microtitulación? ¿Por qué es importante tener un control positivo?

2. ¿Por qué se analizan los anticuerpos anti-VIH-1 en lugar del virus mismo?

3. ¿Por qué existen tantas variantes inmunológicas del VIH?

4. La eliminación de varios pasos en el ELISA podría lograrse si el anticuerpo primario se convirtiera en un conjugado enzimático. ¿Por qué esto generalmente no se hace? ¿Qué puede causar un falso positivo en un ELISA?

7. GUÍA DEL PROFESOR

DESCRIPCIÓN GENERAL DE LAS PREPARACIONES PRELABORATORIALES DEL PROFESOR

7.1 Consideraciones previas

Algunos de los componentes pueden prepararse con anticipación, dividirse en alícuotas y almacenarse en el refrigerador (4°C) hasta que se necesiten. Consultar la siguiente tabla para obtener información sobre la preparación avanzada de reactivos.

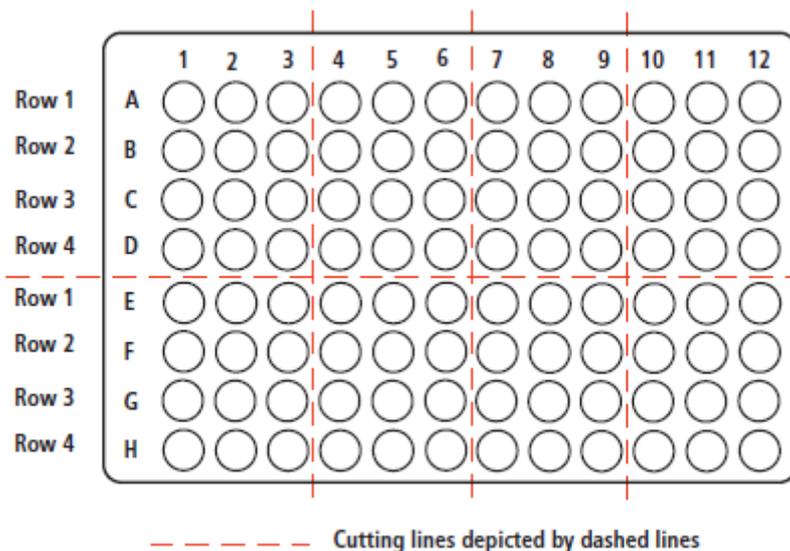
Component:	What to do:	When:
10X ELISA Wash Buffer (A)	Dilute to 1X solution and aliquot	Anytime before the experiment. Cover and store in the refrigerator.
ELISA Dilution Buffer (B)	Aliquot for negative control and patient samples	Anytime before the experiment. Store tubes in the refrigerator.
Whey Antigen (C)	Rehydrate and aliquot	Up to one week before performing the experiment.
Anti-Whey Primary Antibody (D)	Rehydrate and aliquot	Up to one week before performing the experiment.
Secondary Antibody (E)	Rehydrate and aliquot	Up to one day before performing the experiment.
ABTS Substrate (F)	Rehydrate and aliquot	Up to one week before performing the experiment.

 Red = Prepare immediately before module.  Yellow = Prepare shortly before module.  Green = Flexible / prepare up to a week before the module.

7.2 Preparaciones previas al laboratorio

Las preparaciones previas puede realizarlas el profesor o realizarse como otra clase práctica a realizar por los alumnos.

Preparación de las placas de microtitulación



1. Como se muestra en la figura, orientar la placa de microtitulación para que los números 1-12 estén en la parte superior y las letras A-H a la izquierda.
2. Cortar cada placa en las líneas punteadas como se muestra en la figura. Cada pieza contendrá 3 pocillos en un eje y 4 pocillos en el otro eje. Cada grupo de laboratorio recibirá una pieza.

Preparación del tampón de lavado

1. Agregar todo el Tampón de lavado ELISA 10x (A) a 180 ml de agua destilada y mezclar bien. Etiquetar como "Tampón de lavado".
2. Dispensar 18 ml en vasos pequeños para cada grupo de laboratorio.

Preparación del antígeno

1. Transferir 7 ml de tampón de dilución ELISA (B) a un tubo cónico de 15 ml. Etiquetar el tubo "Antígeno".
2. Retirar con cuidado el tapón del vial de antígeno liofilizado (C) y transferir aproximadamente 0,5 ml del Tampón de dilución ELISA del tubo en el paso 1. Cerrar el tapón y agitar suavemente el vial para mezclar.
3. Transferir todo el contenido del antígeno reconstituido al tubo de 15 ml del paso 1. Mezclar bien.
4. Etiquetar 10 tubos de microcentrífuga "Ag" y dispensar 650 µl en cada tubo.

Preparación de los controles y muestras de pacientes

1. Etiquetar 10 tubos de microcentrífuga "CTRL (-)" y 10 tubos como "P1". Dispensar 200 µl de tampón de dilución ELISA (B) en cada tubo.
2. Transferir 7 ml de tampón de dilución ELISA (B) a un tubo cónico de 15 ml. Etiquetar el tubo "1°AB".
3. Retirar con cuidado el tapón del vial de anticuerpo primario liofilizado (D) y transferir aproximadamente 0,5 ml del tampón de dilución ELISA del tubo en el paso 1. Cerrar el tapón y agitar suavemente el vial para mezclar.
4. Transferir todo el contenido del Anticuerpo primario reconstituido al tubo de 15 ml del paso 1. Mezclar bien.

5. Etiquetar 10 tubos de microcentrífuga "CTRL (+)" y 10 tubos como "P2". Dispensar 200 µl del anticuerpo primario en cada pocillo.

Preparación de anticuerpo secundario

NOTA: Prepárese el mismo día que sea necesario para el experimento.

1. Transferir 7 ml de tampón de dilución ELISA (B) a un tubo cónico de 15 ml. Etiquetar el tubo "2°AB".
2. Retirar con cuidado el tapón del vial del anticuerpo secundario liofilizado (E) y transferir aproximadamente 0,5 ml del tampón de dilución ELISA del tubo en el paso 1. Cerrar el tapón y agitar suavemente el vial para mezclar.
3. Transferir todo el contenido del Anticuerpo Secundario reconstituido al tubo de 15 ml del paso 1. Mezclar bien.
4. Etiquetar 10 tubos de microcentrífuga "2°AB". Dispensar 650 µl por tubo.

Preparación del sustrato ABTS

1. Transferir 10 ml de tampón de reacción ABTS (G) a un tubo cónico de 15 ml. Etiquetar el tubo "ABTS".
2. Retire con cuidado el tapón del vial de ABTS liofilizado (F) y transferir aproximadamente 0,5 ml del ABTS del tubo en el paso 1. Cerrar el tapón y agitar suavemente el vial para mezclar.
3. Transfiera todo el contenido de ABTS rehidratado al tubo cónico de 15 ml del paso 1. Mezclar bien.
4. Etiquetar 10 tubos de microcentrífuga como "ABTS". Dispense 650 µL por tubo.

Cada grupo de estudiantes de laboratorio debe recibir:

- 1 placa de microtitulación (3 x 4 pocillos)
- 1 tubo de microcentrífuga que contiene 650 µl de antígeno
- 1 tubo de microcentrífuga que contiene 650 µl de anticuerpo secundario
- 1 tubo de microcentrífuga que contiene 650 µl ABTS
- 1 tubo de microcentrífuga de 200 µl Control (-)
- 1 tubo de microcentrífuga que contiene 200 µL Control (+)
- 1 tubo de microcentrífuga que contiene 200 µl P1
- 1 tubo de microcentrífuga que contiene 200 µl P2
- 8 pipetas de transferencia
- 1 vaso de precipitados con 18 ml de tampón de lavado
- 1 vaso de precipitados vacío para residuos

8. EVITAR ERRORES COMUNES

1. Se debe recomendar a los estudiantes que tengan mucho cuidado al transferir soluciones dentro y fuera de los pocillos de la placa de microtitulación.
2. Utilizar únicamente pipetas limpias o debidamente etiquetadas.
3. No intentar vaciar los pocillos de microtitulación agitándolos. Esto a menudo resultará en la contaminación de pozos adyacentes.
4. Lavar los pocillos suave y lentamente, sin forzar.

9. RESULTADOS DE LA PRÁCTICA

El sustrato ABTS cambiará de color a verde oscuro en los pocillos que contengan un resultado positivo en el ELISA.

Los estudiantes primero deben confirmar que los resultados de las muestras de control son correctos. Los pocillos en la primera fila (CTRL -) no deberían tener cambio de color, mientras que los pocillos en la segunda fila (CTRL +) deberían ser de color verde oscuro.

Las muestras de los pacientes deben identificar al Paciente 2 como positivo para VIH, con los 3 pocillos mostrando un color verde oscuro similar a las muestras de control positivo.

