KIT EDUCATIVO

Kit de Introducción Práctica a la Inmunología mediante ELISA

TBED74-30

30 ESTUDIANTES | ★★★ AVANZADO

Experiencia docente con más de 1 módulo

Número de estudiantes

★★★ *Complejidad de la práctica*

© Tiaris Biosciences | v01.2026

Tiaris Biosciences
PT Rabanales 21, Edif Aldebarán
c/ Astrónoma Cecilia Payne s/n. Córdoba. España
info@tiarisbiosciences.com

CONTENIDOS

1 Introducción 4

1.1. Introducción a la inmunología 4

1.2. Técnica ELISA 5

2 Objetivos de la Práctica 6

3 Material incluido 6

4 Material requerido (*no incluido*) 7

5 Descripción de la Práctica de Laboratorio 7

5.1. ELISA I 8

5.2. ELISA II 8

5.3. ELISA III 9

5.4. Descripción del procedimiento del ELISA 10

6 Procedimiento experimental 10

6.1. Procedimiento experimental del ELISA I 10

6.2. Procedimiento experimental del ELISA II 14

6.3. Procedimiento experimental del ELISA III 17

1 INTRODUCCIÓN

1.1. INTRODUCCIÓN A LA INMUNOLOGÍA

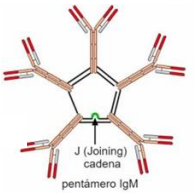
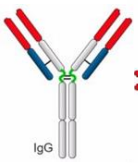
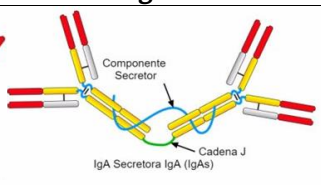
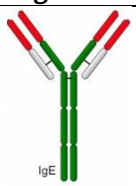
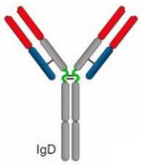
La inmunología es la rama de la biología y la medicina que estudia el sistema inmunitario y los mecanismos mediante los cuales el organismo reconoce y responde frente a agentes potencialmente perjudiciales, como virus, bacterias, hongos y parásitos. Asimismo, participa en la eliminación de células dañadas y en la vigilancia frente a determinadas alteraciones celulares.

El sistema inmunitario dispone de mecanismos de defensa innatos y adaptativos que actúan de forma coordinada. La respuesta inmunitaria adaptativa se caracteriza por su especificidad frente a determinados antígenos, definidos como moléculas o estructuras que pueden ser reconocidas por componentes del sistema inmunitario y, en determinadas circunstancias, desencadenar una respuesta inmune. Dentro de esta respuesta, la inmunidad humoral desempeña un papel fundamental y está mediada principalmente por los anticuerpos producidos por las células plasmáticas, que se originan a partir de los linfocitos B activados. Tras su activación, los linfocitos B proliferan y se diferencian en células plasmáticas productoras de anticuerpos específicos contra el antígeno y en células B de memoria, que permiten una respuesta más rápida y eficaz ante exposiciones posteriores al mismo antígeno. Los anticuerpos se unen específicamente a sus antígenos y contribuyen a la neutralización de agentes infecciosos y a su eliminación por otros mecanismos inmunitarios.

En los seres humanos se distinguen cinco clases de inmunoglobulinas o anticuerpos: IgM, IgG, IgA, IgE e IgD, cada una con características estructurales y funciones específicas (*Tabla 1*). La IgM suele ser la primera inmunoglobulina producida durante la respuesta primaria frente a un antígeno y, por ello, su detección puede aportar información sobre una exposición reciente. Sin embargo, su presencia no confirma por sí sola una infección aguda, ya que la interpretación depende del agente infeccioso, del momento de la toma de la muestra y de las características de la prueba utilizada.

La IgG es la inmunoglobulina más abundante en el suero humano y representa aproximadamente el 75 % de las inmunoglobulinas séricas totales. Aparece generalmente después de la IgM durante la respuesta primaria y puede persistir durante periodos prolongados, contribuyendo a la protección inmunitaria y a la memoria inmunológica. Su detección puede indicar una exposición previa a un antígeno, una infección pasada o una respuesta a la vacunación, aunque su significado depende del contexto clínico y del ensayo empleado. Los tiempos de aparición y persistencia de ambas inmunoglobulinas varían según el agente infeccioso y las características individuales.

Tabla 1. Características generales de las inmunoglobulinas.

	IgM	IgG	IgA	IgE	IgD
Estructura					
	Pentámero	Monómero	Dímero	Monómero	Mónomero
Cadena pesada	μ	γ	α	ξ	δ
Número de sitios de unión al antígeno	10	2	4	2	2
% en suero	6	80	13	0,002	1
Cruza la placenta	X	✓	X	X	X
Función	Respuesta primaria, primer anticuerpo que se produce	Inmunidad a largo plazo	Inmunidad de mucosas	Alergia y actividad antiparasítica Libera histaminas	Receptor de linfocitos B

El estudio de la interacción específica entre antígenos y anticuerpos constituye la base de numerosas técnicas de laboratorio, entre ellas el ELISA (*del inglés, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), que permite detectar y, en determinadas condiciones, cuantificar antígenos o anticuerpos en una muestra.

1.2. TÉCNICA ELISA

Los ensayos tipo ELISA son inmunoensayos bien conocidos y uno de los más utilizados en clínica para el seguimiento y detección de enfermedades debido a su alta especificidad, sensibilidad, precisión y trazabilidad. Estos ensayos son realizados generalmente en placas de 96 pocillos y permiten la detección y cuantificación de sustancias solubles como son péptidos, proteínas, anticuerpos y hormonas. La alta especificidad de un anticuerpo con la molécula diana a cuantificar (antígenos), es el elemento crucial de este tipo de ensayos. Finalmente, la detección está asociada a la medida de la actividad de una enzima reportera (generalmente la peroxidasa de rábano picante) tras ser incubada con su sustrato.

Esta reacción de la enzima reportera con su sustrato es una reacción colorimétrica. Cuando ocurre la unión entre la molécula objetivo y el anticuerpo, la enzima asociada, en presencia de su sustrato, cataliza una reacción que produce un cambio de color en la muestra. Este cambio es medible mediante un espectrofotómetro, permitiendo determinar de forma precisa la presencia y la cantidad de la molécula de interés.

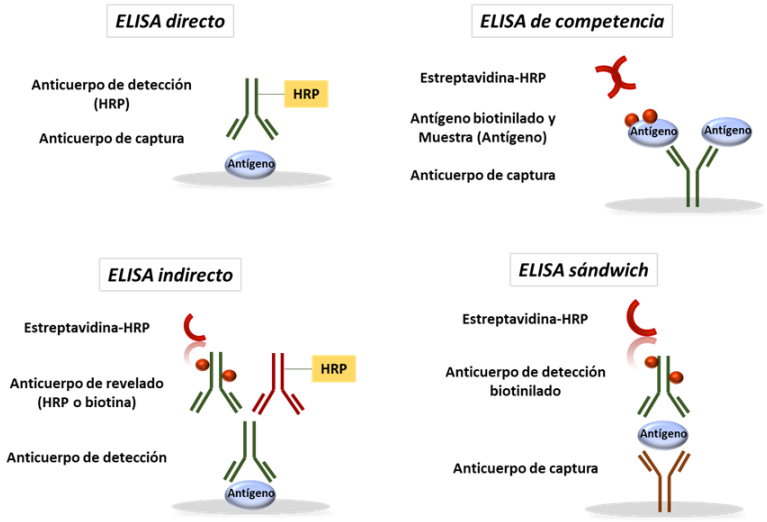


Figura 1. **Tipos de ELISA.** Algunos ELISA incluyen conjugados con biotina. La biotina y la estreptavidina tienen una afinidad elevada, por lo que existen conjugados que en lugar de ser anticuerpo secundario-HRP, emplean estreptavidina-HRP. HRP, del inglés horseradish peroxidase (peroxidasa de rábano picante).

Existen diferentes tipos de ELISA, entre los más utilizados se encuentran el ELISA directo, indirecto, tipo sándwich y competitivo (*Fig. 1*). Cada variante se emplea según el objetivo del análisis y el tipo de molécula que se desea detectar. El ELISA tipo sándwich se utiliza principalmente para la detección de antígenos, debido a su alta sensibilidad y especificidad basada en el reconocimiento simultáneo por dos anticuerpos. Por otro lado, para la detección de anticuerpos específicos en sueros de pacientes, como en el diagnóstico serológico del VIH, se emplea habitualmente el ELISA indirecto.

2 OBJETIVOS DE LA PRÁCTICA

Comprender y aplicar la técnica de ELISA como método inmunoenzimático empleado en el screening y detección cualitativa o cuantitativa de antígenos y anticuerpos, reconociendo sus fundamentos teóricos, principios de funcionamiento y utilidad en el diagnóstico serológico. Asimismo, desarrollar habilidades prácticas en la preparación de muestras, manejo de reactivos y ejecución correcta del procedimiento experimental, así como interpretar y analizar críticamente los resultados obtenidos, considerando la sensibilidad, especificidad, posibles fuentes de error y la importancia de las pruebas confirmatorias dentro del contexto clínico y epidemiológico.

3 MATERIAL INCLUIDO

El kit contiene reactivos suficientes para trabajar con 10 grupos de 3 estudiantes (30 estudiantes en total). El profesor decidirá qué tipo de ELISA se realizará, teniendo en cuenta que los reactivos incluidos permiten llevar a cabo un único tipo de ELISA para los 30 estudiantes.

Componentes	TBED74-30	Almacenaje
Placas de ELISA (Tiras 8 pocillos)	20 Tiras	25 °C
Tampón de Lavado y Dilución (1 L)	1 sobre	25 °C
Tampón de dilución de Muestras	30 mL	4 °C
Anticuerpo Primario, ELISA I y ELISA II (10x)	1 mL	-20 °C
Muestra infectada, ELISA I (10x) (*tapa naranja*)	0,1 mL	-20 °C
Muestras 1, 2 y 3 ELISA II (10x) (*tapa amarilla*)	2 x 0,1 mL	-20 °C
Muestras 4, 5 y 6 ELISA III (10x) (*tapa roja*)	2 x 0,1 mL	-20 °C
Control Positivo, ELISA I y ELISA II (10x) (*tapa verde*)	2 x 0,1 mL	-20 °C
Antígeno, ELISA III (10x)	1 mL[b]	-20 °C
Control Positivo, ELISA III (10x) (*tapa rosa*)	2 x 0,1 mL	-20 °C
Anticuerpo Secundario (anti IgG-HRP) (10x)	1 mL	-20 °C
Sustrato Peroxidasa (TMB, 3,3',5,5' - tetrametilbencidina)	10 mL	4 °C
Solución Stop (HCl 1M)	10 mL	25 °C

ATENCIÓN: Los reactivos incluidos en el kit no contienen material infeccioso.

4 MATERIAL REQUERIDO (*no suministrado*)

Para la ejecución de la práctica se requiere:

- Guantes de laboratorio
- Tubos de 1,5 mL
- Micropipetas P20-200 µL y P100-1000 µL
- Puntas para micropipetas
- Lámina metálica (papel aluminio)
- Agua destilada o desionizada
- Papel de filtro
- ***Opcional:*** Lector de placas (Absorbancia, λ=450 nm)

5 DESCRIPCIÓN DE LA PRÁCTICA DE LABORATORIO

En esta práctica pueden ser realizados tres tipos diferentes de ELISA con objetivos diferentes. En los ELISA I y ELISA II, se puede detectar el antígeno mediante un ELISA indirecto, mientras que en el ELISA III está dirigido a la detección de anticuerpo. Cada tipo de ELISA tiene su protocolo específico que será detallado en el apartado 6. El profesor definirá que tipo de ELISA va a desarrollar en clases.

5.1. ELISA TIPO I

El **ELISA I** es un **ELISA indirecto utilizado para la detección de antígenos**. A lo largo del protocolo, se simula la propagación de un agente infeccioso en una población, como puede ser el grupo de clase. Para ello, se parte de dos o tres personas infectadas, seleccionadas al azar, y los estudiantes intercambian muestras simulando una posible vía de transmisión de un agente infeccioso. Posteriormente, las muestras de cada estudiante se analizan mediante el ensayo ELISA y los resultados se utilizan para reconstruir la propagación de la infección en el grupo y, en algunos casos, identificar al individuo o los individuos inicialmente infectados.

Este ELISA permite introducir un análisis epidemiológico de una infección, como podrían ser la hepatitis A, la COVID-19 y la gripe (influenza), y analizar sus vías de transmisión. Por ejemplo, la hepatitis A se transmite principalmente por vía fecal-oral, mientras que la COVID-19 y la gripe se transmiten principalmente a través de partículas respiratorias. Asimismo, la actividad puede servir para abordar las infecciones de transmisión sexual, como el herpes genital y la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) transmitidos principalmente mediante relaciones sexuales.

5.2. ELISA II

El **ELISA II**, al igual que el ELISA I descrito anteriormente, se utiliza en esta actividad para la **detección de antígenos**. En este caso, no usaremos en enfoque epidemiológico, sino que, a partir de diferentes muestras, los estudiantes determinarán la presencia o no del antígeno diana evaluado por el ensayo.

El **ELISA II** permite enfocar la aplicabilidad del ELISA en el ámbito clínico, especialmente en el diagnóstico de enfermedades infecciosas mediante la detección de antígenos del propio agente infeccioso. ELISAs con similar diseño se emplean para detectar el antígeno NS1 del virus del dengue, lo que permite contribuir al diagnóstico de la infección durante su fase aguda. También existen inmunoensayos ELISA para detectar el antígeno p24 del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), así como antígenos de otros agentes infecciosos. Estas pruebas permiten identificar componentes del patógeno en una muestra del paciente y, dependiendo de la enfermedad y del momento de la infección, pueden contribuir a un diagnóstico temprano.

El **ELISA II** permite explicar algunos principios de detección inmunológica presentes en pruebas diagnósticas rápidas, como los test de embarazo, que detectan la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG), y determinadas pruebas de detección de la COVID-19 y la gripe (influenza). También permite introducir los fundamentos de los inmunoensayos utilizados para

detectar sustancias como drogas y contaminantes ambientales. Estas pruebas de inmunocromatografía de flujo lateral, se basan al igual que la técnica ELISA, en el reconocimiento específico entre antígenos y anticuerpos, y tienen la ventaja de detectar determinadas sustancias en una muestra y obtener resultados en pocos minutos.

5.3. ELISA III

El **ELISA III** es un ensayo inmunoenzimático indirecto que, en esta actividad, se utiliza para la **detección simulada de anticuerpos en muestras de pacientes**. Esta práctica permite introducir al alumnado en el uso de los ensayos inmunológicos en el estudio de la respuesta inmunitaria y comprender cómo el organismo reconoce a los agentes infecciosos (antígenos) y produce anticuerpos específicos frente a ellos.

En el ámbito médico, la detección de anticuerpos mediante ELISA se utiliza para contribuir al diagnóstico de determinadas infecciones, especialmente cuando la respuesta inmunitaria ya ha producido anticuerpos detectables en la sangre. A diferencia de los ensayos que identifican directamente componentes del agente infeccioso, estas pruebas detectan la respuesta del organismo frente a él. Por ello, pueden aportar información sobre una infección reciente o pasada, aunque la interpretación depende de la enfermedad, del tipo de anticuerpo detectado y del momento en que se recoge la muestra.

Una aplicación conocida es la detección de anticuerpos frente al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Históricamente, las pruebas de cribado del VIH se basaban en la detección de anticuerpos mediante técnicas como el ELISA. Actualmente, existen también pruebas que detectan simultáneamente anticuerpos y el antígeno viral p24, así como pruebas moleculares que detectan el material genético del virus. Los anticuerpos frente al VIH pueden tardar varias semanas en alcanzar niveles detectables, por lo que una prueba realizada demasiado pronto después de la exposición puede dar un resultado negativo pese a existir infección.

Otro ejemplo es el diagnóstico serológico del dengue, en el que los ensayos ELISA pueden detectar anticuerpos IgM asociados a una infección reciente. Asimismo, la detección de anticuerpos mediante ELISA se utiliza en el estudio de otras infecciones, como las hepatitis víricas, y en la evaluación de la respuesta inmunitaria tras determinadas infecciones o vacunaciones. No obstante, la presencia de anticuerpos no siempre indica una infección activa, ya que pueden persistir después de la recuperación o aparecer tras la vacunación.

5.4. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO DEL ELISA

En un primer paso los pocillos serán recubiertos con una dilución del antígeno. En el caso de los **ELISA I** y **II** el antígeno constituye la muestra a evaluar en el ensayo por lo cual la concentración del mismo se desconoce y se prevé que sea variable. En el **ELISA III**, el antígeno recubre todos los pocillos del ensayo a una misma concentración.

En un segundo paso, es añadido el anticuerpo primario, el cual es capaz de unirse de forma específica al antígeno. En el caso del **ELISA III**, esta sería la muestra, ya que este ELISA es para la detección de anticuerpos en suero producidos por la exposición del organismo a un agente infeccioso o antígeno.

Tras los lavados correspondientes para eliminar el material no unido, se añadirá un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante. Este anticuerpo secundario se unirá a los anticuerpos primarios fijados al antígeno, permitiendo la detección de la señal mediante la actividad de la enzima peroxidasa (*Fig. 2*).

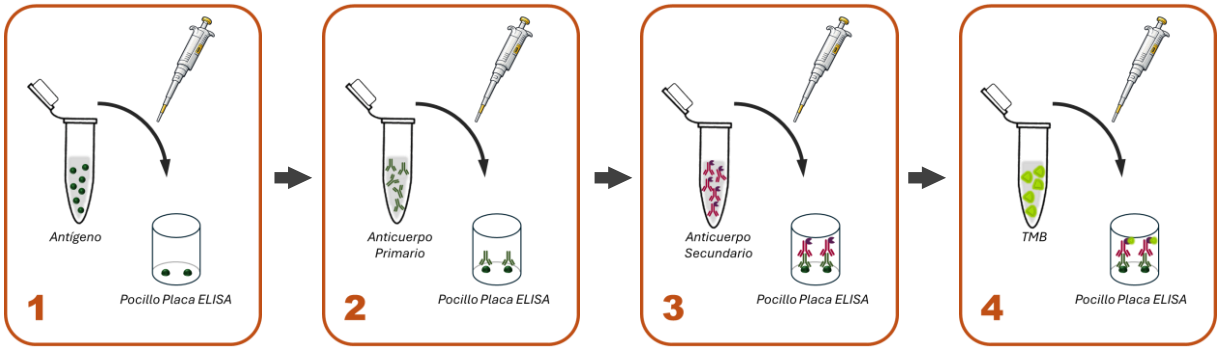


Figura 2. **Flujo de trabajo en la realización de un ELISA.**

La adición de TMB, sustrato de la peroxidasa, producirá un cambio de color a azul en aquellos pocillos donde la muestra sea positiva. En el caso de que la muestra sea negativa no se percibirá cambio de coloración. La intensidad de este color será proporcional a la cantidad del analito presentes en cada muestra: antígeno (ELISA I y II) o de anticuerpo (ELISA III). Para la detención de la reacción se emplea la Solución Stop que provoca que el color azul pase a ser amarillo, lo que permite una lectura más precisa de la reacción a una longitud de onda de 450nm.

6 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

6.1. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL DEL ELISA I

En el **ELISA I**, se simulará en el aula la transmisión y propagación de un agente infeccioso mediante el intercambio de líquidos corporales simulados. El profesor preparará dos o tres muestras

inicialmente positivas, en función del tamaño de la clase, procurando que los estudiantes desconozcan cuáles están infectadas. El resto de los estudiantes recibirán un vial con el tampón de dilución de muestras.

Cada estudiante recibirá una muestra y la intercambiará con otros compañeros siguiendo las instrucciones del profesor. Tras realizar dos o tres rondas de intercambio con diferentes estudiantes, analizará su muestra mediante ELISA para determinar si el resultado es positivo o negativo (*Fig. 3*).

A continuación, se recopilarán los resultados en una tabla que indique con qué compañeros ha intercambiado cada estudiante su muestra y el resultado obtenido: positivo (+), negativo (–) o dudoso (+/–). Para interpretar los resultados, se considerará positiva toda muestra cuya señal de coloración supere la del control negativo, aunque sea menos intensa que la del control positivo.

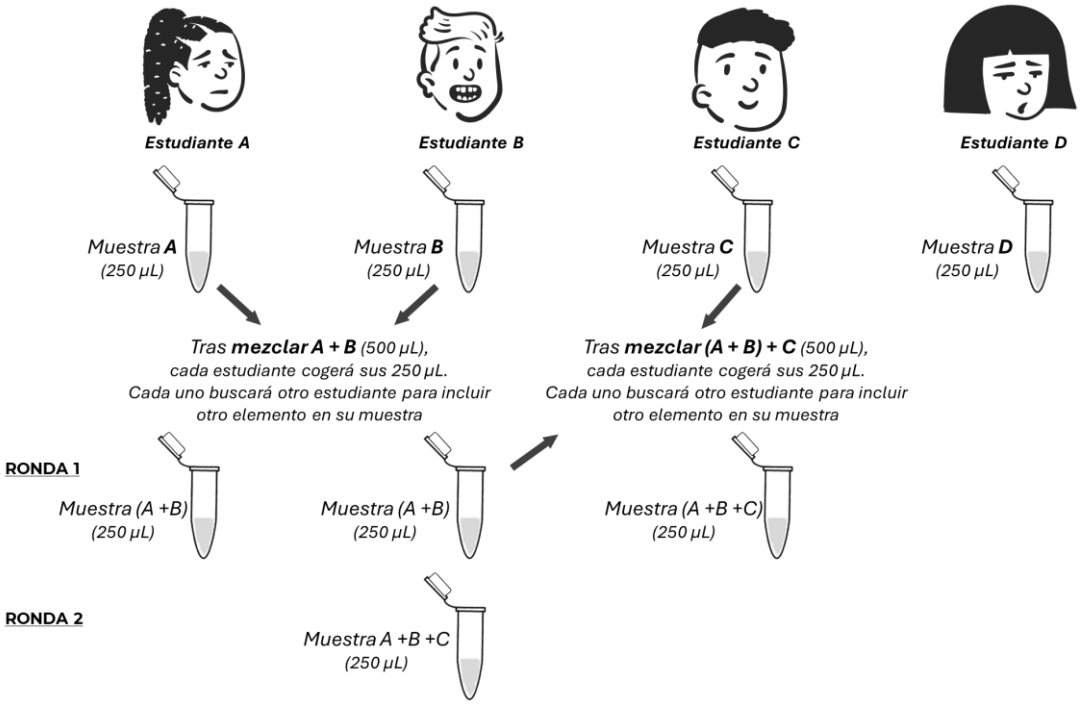


Figura 3. **Simulación de la propagación de un agente infeccioso mediante la mezcla de muestras.** En al menos 3 rondas de mezcla el estudiante dispondrá de su muestra, válida para el análisis epidemiológico de la infección mediante ELISA.

Los resultados dudosos deberán valorarse de acuerdo con los criterios establecidos para el ensayo, y en estos pueden incluirse aquellas muestras que los triplicados no posean una coloración similar.

Es probable que, al finalizar la actividad, se observe un número elevado de resultados positivos. Esto permitirá abrir un debate sobre cómo se propagan las enfermedades infecciosas, las diferentes vías de transmisión y la importancia de las medidas de prevención. Asimismo, se podrá

analizar cómo una infección puede extenderse a través de una red de contactos, incluso cuando las personas desconocen quién ha iniciado la cadena de transmisión.

En el ELISA I, la variable experimental es el antígeno que se desea detectar. Por ello, un control negativo adecuado consiste en pocillos en los que se omite el antígeno y se sustituye por el tampón de dilución de las muestras. Al finalizar el ensayo, estos pocillos deberían presentar una señal nula o muy baja. Si se observa coloración, esta puede deberse a uniones inespecíficas de los anticuerpos o a errores experimentales.

El control negativo permite evaluar la señal de fondo y ayuda a interpretar correctamente los resultados. Cuando el protocolo lo establece, la absorbancia de este control puede restarse a la de las muestras para corregir dicha señal.

Por otra parte, el control positivo consiste en una muestra que contiene el antígeno que se desea detectar y que, por tanto, debe generar una señal positiva. Su inclusión permite comprobar que el ensayo se ha realizado correctamente y que los reactivos funcionan según lo esperado. En muchos kits comerciales, este control se proporciona como referencia para validar los resultados.

6.1.1. REACTIVOS SUMINISTRADOS PARA EL DESARROLLO DEL ELISA I

El kit contiene reactivos suficientes para trabajar con 10 grupos de 3 estudiantes (30 estudiantes en total). Cada estudiante podrá analizar su propia muestra y cada grupo dispondrá de un control positivo y un control negativo.

Componentes	ELISA Tipo I	Almacenaje
Placas de ELISA (Tiras de 8 pocillos)	20 Tiras	25 ºC
Tampón de Lavado y Dilución (1 L)	1 sobre[a]	25 ºC
Tampón de dilución de Muestras	30 mL	4 ºC
Anticuerpo Primario, ELISA I y II (10x)	1 mL[b]	-20 ºC
Muestra infectada, ELISA I (*tapa naranja*)	0,1 mL[c]	-20 ºC
Control Positivo, ELISA I y II (10x) (*tapa verde*)	2 x 0,1 mL[d]	-20 ºC
Anticuerpo Secundario (anti IgG-HRP) (10x)	1 mL[e]	-20 ºC
Sustrato Peroxidasa (TMB, 3,3',5,5' - tetrametilbencidina)	10 mL	4 ºC
Solución Stop (HCl 1M)	10 mL	25 ºC

[a] Añadir el contenido del sobre en 1L de agua destilada, preferiblemente estéril.
[b] Añadir 9 mL del Tampón de Lavado y Dilución.
[c] Añadir 0,9 mL del Tampón de dilución de muestras.
[d] Añadir 0,9 mL del Tampón de dilución de muestras.
[e] Añadir 9 mL del Tampón de Lavado y Dilución.

6.1.2. PROTOCOLO ELISA I

1. Rotular con sus iniciales un tubo de una muestra desconocida dada por el profesor, la cuál será la muestra simulada de "líquido corporal" que deberá analizar.
2. Transferir el volumen completo de su muestra (250 µL), al tubo de otro estudiante. Mezclar por pipeteo y transferir el mismo volumen al tubo original. Anotar el nombre del estudiante con el cual ha mezclado su muestra. Repetir el proceso de 2- 3 veces según indique el profesor, no repetir nunca con los mismos estudiantes, intentar mezclar con estudiantes de otros grupos (*Fig. 3*).
3. Identificar las tiras como 1 y 2, rotulando también el grupo de trabajo al que pertenece.
4. Anotar en el cuaderno donde serán colocadas las muestras. Se sugiere la siguiente distribución:

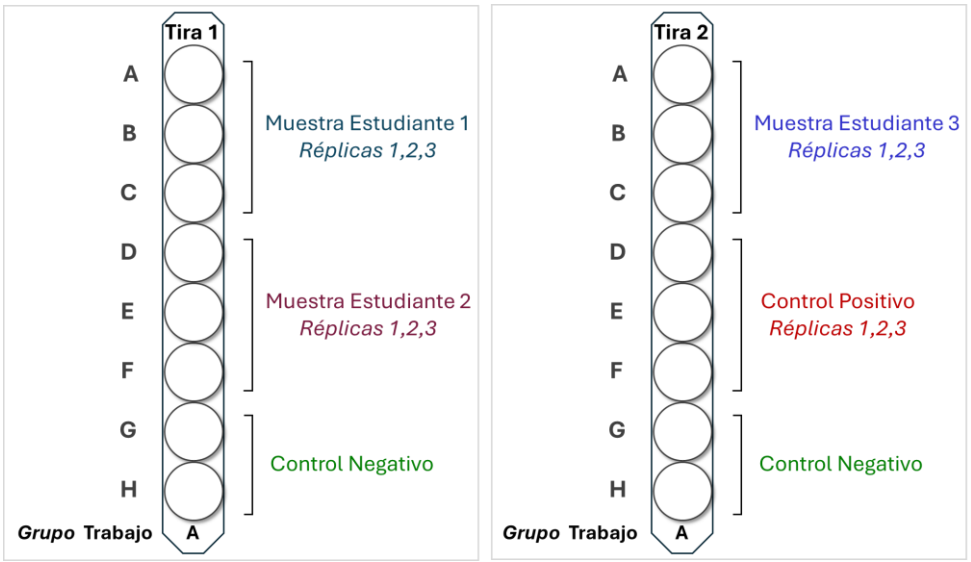


Figura 4. **Distribución recomendada de las muestras y controles en las tiras de pocillos suministradas.** Observar que las mismas van rotuladas con número de tira y grupo de trabajo.

5. Añadir en el pocillo indicado **50 µL de la muestra**. El control positivo del ensayo debe de ser entregado listo para usar por el profesor. El control negativo es el tampón de dilución de muestras. Dar pequeños golpecitos en la tira para asegurar que el contenido cubre todo el pocillo, evitando mezclar el contenido entre pocillos. Tapar con una lámina metálica e incubar durante 15-20 minutos a temperatura ambiente.

   El tiempo de incubación puede ser hasta de 1h a temperatura ambiente. En caso que desee detener aquí la práctica, incubar las tiras a 4°C durante toda la noche. Se sugiere que los coloque en el soporte para evitar se vuelquen.

6. Eliminar el contenido volteando las tiras. Para secar los pocillos dar varios golpes secos sobre papel de filtro.

7. Lavar 2 veces con **200 µL/pocillo del Tampón de Lavado y Dilución**. Eliminar el contenido volteando las tiras y secar sobre papel de filtro tras cada lavado.
8. Añadir a todos los pocillos **50 µL del Anticuerpo primario diluido** en tampón de lavado y dilución. Tapar con la lámina metálica e incubar durante 5 minutos. Eliminar el contenido volteando las tiras y secar sobre papel de filtro.
9. Lavar 2 veces con **200 µL/pocillo del Tampón de Lavado y Dilución**. Eliminar el contenido volteando las tiras y secar sobre papel de filtro tras cada lavado.
10. Añadir a todos los pocillos **50 µL del Anticuerpo secundario diluido**. Tapar con la lámina metálica e incubar durante 5 minutos. Eliminar el contenido volteando las tiras y secar sobre papel de filtro.
11. Lavar 2 veces con **200 µL/pocillo del Tampón de Lavado y Dilución**. Eliminar el contenido volteando las tiras y secar sobre papel de filtro tras cada lavado.
12. Añadir a todos los pocillos **50 µL del Sustrato Peroxidasa** e incubar a temperatura ambiente protegido de la luz. Esperar aparición de la coloración azul en el control positivo y en las muestras positivas. No exceder los 5 minutos de incubación. NO ELIMINAR EL COTENIDO DE LOS POCILLOS.
13. Añadir a todos los pocillos **50 µL de la Solución Stop**. Los pocillos con coloración azul pasarán a amarillo.
14. ***Opcional:*** Colocar cuidadosamente las tiras en el soporte de la placa y leer en un lector de placas a 450 nm.
15. Analizar los resultados obtenidos.

6.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL DEL ELISA II

En el **ELISA II**, al igual que en el ELISA I, la muestra experimental es el antígeno que se desea detectar. Por ello, el control negativo y el control positivo tendrían el mismo significado en ambos ELISA. De este modo, el control negativo consiste en pocillos en los que el antígeno se sustituye por el tampón de dilución de las muestras. Al finalizar el ensayo, estos pocillos deberían presentar una señal nula o muy baja. Si se observa coloración, esta puede deberse a uniones inespecíficas de los anticuerpos o a errores experimentales.

El control negativo permite evaluar la señal de fondo y ayuda a interpretar correctamente los resultados. Cuando el protocolo lo establece, la absorbancia de este control puede restarse a la de las muestras para corregir dicha señal.

Por otra parte, el control positivo consiste en una muestra que contiene el antígeno que se desea detectar y que, por tanto, debe generar una señal positiva. Su inclusión permite comprobar que el ensayo se ha realizado correctamente y que los reactivos funcionan según lo esperado.

En este ELISA, el profesor podría simular la detección del antígeno NS1 del virus del dengue en muestras de suero de pacientes humanos. De este modo, los estudiantes trabajarían con muestras de suero humano; el anticuerpo primario sería un anticuerpo anti-NS1 desarrollado en ratón y el anticuerpo secundario sería un anticuerpo anti-IgG de ratón desarrollado en conejo. Los anticuerpos primarios podrían ser monoclonales (reconocen un único epítopo del antígeno, en este caso, de la proteína NS1, por lo que presentan una elevada especificidad frente a dicho epítopo) o policlonales (constituyen una mezcla de anticuerpos diferentes que reconocen distintos epítopos de un mismo antígeno). Por otro lado, los anticuerpos secundarios suelen ser policlonales y reconocen las inmunoglobulinas de tipo IgG de la especie en la que se ha desarrollado el anticuerpo primario; generalmente, están conjugados con una enzima, como la peroxidasa de rábano picante (HRP), o con otros marcadores, como la biotina, que permiten la detección de la reacción inmunológica.

6.2.1. REACTIVOS SUMINISTRADOS PARA EL DESARROLLO DEL ELISA II

El kit contiene reactivos suficientes para trabajar con 10 grupos de 3 estudiantes (30 estudiantes en total). Cada estudiante podrá analizar una muestra entregada por el profesor y cada grupo dispondrá de un control positivo y un control negativo.

Componentes	**ELISA II**	**Almacenaje**
Placas de ELISA (Tiras de 8 pocillos)	20 Tiras	25 ºC
Tampón de Lavado y Dilución (1 L)	1 sobre[a]	25 ºC
Tampón de dilución de Muestras	30 mL	4 ºC
Anticuerpo Primario, ELISA I y II (10x)	1 mL[b]	-20 ºC
Muestras 1, 2 y 3 ELISA II (10x) (*tapa amarilla*)	2 x 0,1 mL[c]	-20 ºC
Control Positivo, ELISA I y II (10x) (*tapa verde*)	2 x 0,1 mL[d]	-20 ºC
Anticuerpo Secundario (anti IgG-HRP) (10x)	1 mL[e]	-20 ºC
Sustrato Peroxidasa (TMB, (3,3',5,5' - tetrametilbencidina))	10 mL	4 ºC
Solución Stop (HCl 1M)	10 mL	25 ºC

[a] Añadir el contenido del sobre en 1L de agua destilada, preferiblemente estéril.
[b] Añadir 9 mL del Tampón de Lavado y Dilución.
[c] Añadir 0,9 mL del Tampón de dilución de muestras.
[d] Añadir 0,9 mL del Tampón de dilución de muestras.
[e] Añadir 9 mL del Tampón de Lavado y Dilución.

6.2.2. PROTOCOLO ELISA II

1. Identificar las tiras como 1 y 2, rotulando también el grupo de trabajo al que pertenece.
2. Anotar en el cuaderno donde serán colocadas las muestras. Se sugiere la siguiente distribución:

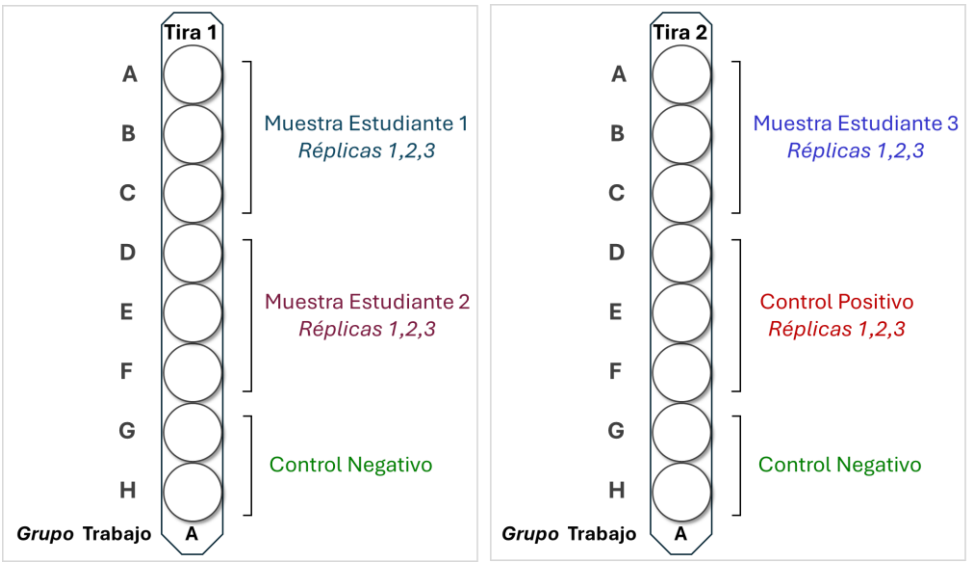


Figura 5. **Distribución recomendada de las muestras y controles en las tiras de pocillos suministradas.** Observar que las mismas van rotuladas con número de tira y grupo de trabajo.

3. Añadir en el pocillo indicado **50 µL de la muestra**. El control positivo del ensayo debe de ser entregado listo para usar por el profesor. El control negativo es el tampón de dilución de muestras. Dar pequeños golpecitos en la tira para asegurar que el contenido cubre todo el pocillo, evitando mezclar el contenido entre pocillos. Tapar con una lámina metálica e incubar durante 15-20 minutos a temperatura ambiente.

   El tiempo de incubación puede ser hasta de 1h a temperatura ambiente, en caso que desee hacer una pausa, incubar las tiras a 4°C durante toda la noche. Se sugiere que los coloque en el soporte para evitar que se mezcle el contenido entre pocillos o se vuelquen.

16. Eliminar el contenido volteando las tiras. Para secar los pocillos dar varios golpes secos sobre papel de filtro.
4. Lavar 2 veces con **200 µL/pocillo del Tampón de Lavado y Dilución**. Eliminar el contenido volteando las tiras y secar sobre papel de filtro tras cada lavado.
5. Añadir a todos los pocillos **50 µL del Anticuerpo primario diluido** en tampón de lavado y dilución. Tapar con la lámina metálica e incubar durante 5 minutos. Eliminar el contenido volteando las tiras y secar sobre papel de filtro.
6. Lavar 2 veces con **200 µL/pocillo del Tampón de Lavado y Dilución**. Eliminar el contenido volteando las tiras y secar sobre papel de filtro tras cada lavado.

7. Añadir a todos los pocillos **50 µL del Anticuerpo secundario diluido**. Tapar con la lámina metálica e incubar durante 5 minutos. Eliminar el contenido volteando las tiras y secar sobre papel de filtro.
8. Lavar 2 veces con **200 µL/pocillo del Tampón de Lavado y Dilución**. Eliminar el contenido volteando las tiras y secar sobre papel de filtro tras cada lavado.
9. Añadir a todos los pocillos **50 µL del Sustrato Peroxidasa** e incubar a temperatura ambiente protegido de la luz. Esperar aparición de la coloración azul en el control positivo y en las muestras positivas. No exceder los 5 minutos de incubación. NO ELIMINAR EL COTENIDO DE LOS POCILLOS.
10. Añadir a todos los pocillos **50 µL de la Solución Stop**. Los pocillos con coloración azul pasarán a amarillo.
11. ***Opcional:*** Colocar cuidadosamente las tiras en el soporte de la placa y leer en un lector de placas a 450 nm.
12. Analizar los resultados obtenidos.

6.3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL DEL ELISA III

En el **ELISA III**, a diferencia de los ELISA descritos anteriormente, se desea detectar anticuerpos específicos en una muestra de sangre o suero. De este modo, el control negativo consiste en pocillos en los que la muestra de suero se sustituye por el tampón de dilución de las muestras. Al finalizar el ensayo, estos pocillos deberían presentar una señal nula o muy baja. Si se observa coloración, esta puede deberse a uniones inespecíficas de los anticuerpos o a errores experimentales.

El control negativo permite evaluar la señal de fondo y ayuda a interpretar correctamente los resultados. Cuando el protocolo lo establece, la absorbancia de este control puede restarse de la de las muestras para corregir dicha señal.

Por otra parte, el control positivo consiste en un suero que contiene los anticuerpos que se desean detectar y que, por tanto, debe generar una señal positiva. Su inclusión permite comprobar que el ensayo se ha realizado correctamente y que los reactivos funcionan según lo esperado.

A través del ELISA III, el profesor puede simular la detección de anticuerpos en el suero de pacientes frente a distintos agentes infecciosos, como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). De este modo, se puede plantear que el antígeno de recubrimiento sea la proteína p24, una proteína de la cápside viral que constituye uno de los marcadores utilizados en las pruebas de

cuarta generación para el diagnóstico de la infección por el VIH. No obstante, es importante señalar que la detección del antígeno p24 permite identificar la infección en fases tempranas, incluso antes de que el organismo haya producido anticuerpos detectables, mientras que un ELISA III, tal como se plantea aquí, está diseñado para detectar anticuerpos específicos y no el antígeno p24 directamente.

El antígeno se añade en el primer paso del ELISA III, a la misma concentración en todos los pocillos, para permitir la captura de los anticuerpos específicos presentes en las muestras de suero.

Posteriormente, se añade el suero diluido de los pacientes, que, si han estado expuestos al virus, podría contener anticuerpos específicos frente a este antígeno. Finalmente, se utiliza un anticuerpo anti-IgG humana marcado con la enzima peroxidasa, que permite detectar los anticuerpos unidos al antígeno mediante una reacción colorimétrica.

6.3.1. REACTIVOS SUMINISTRADOS PARA EL DESARROLLO DEL ELISA TIPO III

El kit contiene reactivos suficientes para trabajar con 10 grupos de 3 estudiantes (30 estudiantes en total). Cada estudiante podrá analizar una muestra entregada por el profesor y cada grupo dispondrá de un control positivo y un control negativo.

Antes de comenzar el ELISA, se deben de hacer preparaciones previas indicadas en la Guía del profesor. Estas preparaciones pueden tener un tiempo medio de preparación de 1h.

Componentes	ELISA III	Almacenaje
Placas de ELISA (Tiras de 8 pocillos)	20 Tiras	25 ºC
Tampón de Lavado y Dilución (1 L)	1 sobre[a]	25 ºC
Tampón de dilución de Muestras	30 mL	4 ºC
Muestras 4, 5 y 6 ELISA III (10x) (*tapa roja*)	2 x 0,1 mL[b]	-20 ºC
Antígeno, ELISA III (10x)	1 mL[c]	-20 ºC
Control Positivo, ELISA III (10x) (*tapa rosa*)	2 x 0,1 mL[d]	-20 ºC
Anticuerpo Secundario (anti IgG-HRP) (10x)	1 mL[e]	-20 ºC
Sustrato Peroxidasa (TMB, (3,3',5,5' - tetrametilbencidina))	10 mL	4 ºC
Solución Stop (HCl 1M)	10 mL	25 ºC

[a] Añadir el contenido del sobre en 1L de agua destilada, preferiblemente estéril.
[b] Añadir 0,9 mL del Tampón de dilución de muestras.
[c] Añadir 9 mL del Tampón de Lavado y Dilución.
[c] Añadir 0,9 mL del Tampón de dilución de muestras.
[d] Añadir 0,9 mL del Tampón de dilución de muestras.
[e] Añadir 9 mL del Tampón de Lavado y Dilución.

6.3.2. PROTOCOLO ELISA III

1. Añadir en todos los pocillos **50 µL del Antígeno diluido**. Dar pequeños golpecitos en la tira para asegurar que el contenido cubre todo el pocillo, evitando mezclar el contenido entre pocillos. Tapar con una lámina metálica e incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
2. Eliminar el contenido volteando las tiras y secar sobre papel de filtro.
3. Lavar 2 veces con **200 µL/pocillo del Tampón de Lavado y Dilución**. Eliminar el contenido volteando las tiras y secar sobre papel de filtro tras cada lavado.
4. Identificar las tiras como 1 y 2, rotulando además el grupo de trabajo al que pertenece.
5. Anotar en el cuaderno donde serán colocadas las muestras. Se sugiere la siguiente distribución:

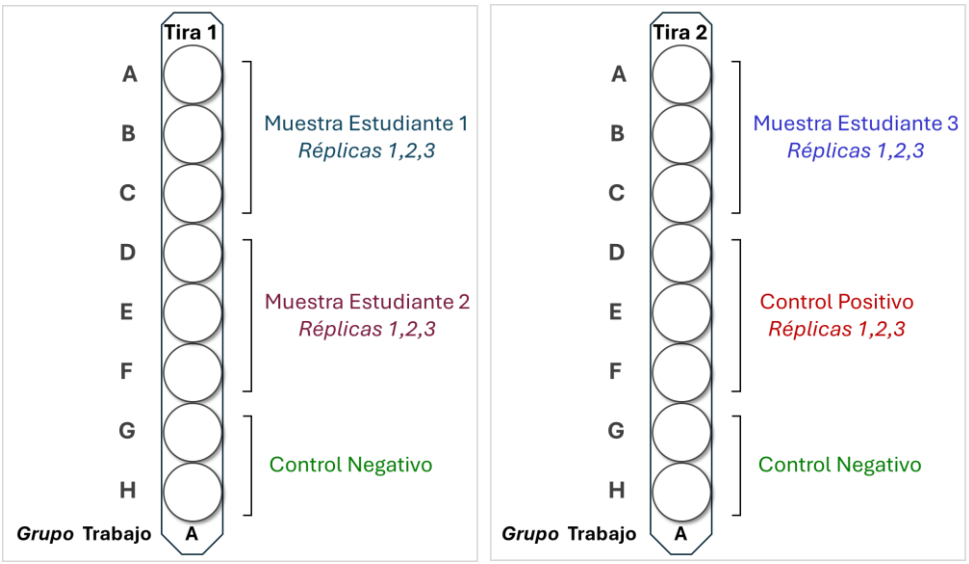


Figura 6. **Distribución recomendada de las muestras y controles en las tiras de pocillos suministradas.** Observar que las mismas van rotuladas con número de tira y grupo de trabajo.

6. Añadir en el pocillo indicado **50 µL de la muestra**. El control positivo del ensayo debe de ser entregado listo para usar por el profesor. El control negativo es el tampón de dilución de muestras. Tapar con una lámina metálica e incubar durante 15-20 minutos a temperatura ambiente.

   El tiempo de incubación puede ser hasta de 1h a temperatura ambiente, en caso que desee hacer una pausa, incubar las tiras a 4°C durante toda la noche. Se sugiere que los coloque en el soporte para evitar que se mezcle el contenido entre pocillos o se vuelquen.

7. Eliminar el contenido volteando las tiras. Para secar los pocillos dar varios golpes secos sobre papel de filtro.
8. Lavar 2 veces con **200 µL/pocillo del Tampón de Lavado y Dilución**. Eliminar el contenido volteando las tiras y secar sobre papel de filtro tras cada lavado.

9. Añadir a todos los pocillos **50 µL del Anticuerpo secundario diluido**. Tapar con la lámina metálica e incubar durante 5 minutos. Eliminar el contenido volteando las tiras y secar sobre papel de filtro.
10. Lavar 2 veces con **200 µL/pocillo del Tampón de Lavado y Dilución**. Eliminar el contenido volteando las tiras y secar sobre papel de filtro tras cada lavado.
11. Añadir a todos los pocillos **50 µL del Sustrato Peroxidasa** e incubar a temperatura ambiente protegido de la luz. Esperar aparición de la coloración azul en el control positivo y en las muestras positivas. No exceder los 5 minutos de incubación. NO ELIMINAR EL CONTENIDO DE LOS POCILLOS.
12. Añadir a todos los pocillos **50 µL de la Solución Stop**. Los pocillos con coloración azul pasarán a amarillo.
13. ***Opcional:*** Colocar cuidadosamente las tiras en el soporte de la placa y leer en un lector de placas a 450 nm.
14. Analizar los resultados obtenidos.