KIT EDUCATIVO

ELISA de Detección del Virus de Epstein Barr

TBED76-24

| 24 ESTUDIANTES | ★★★ AVANZADO

Experiencia docente 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. Técnica ELISA 4

1.2. Virus de Epstein Barr 5

1.2.1. Descripción del virus de Epstein Barr 5

1.2.2. Pruebas clínicas para la detección del virus de Epstein Barr 6

2 Objetivos de la Práctica 7

3 Material incluido 8

4 Material requerido (*no incluido*) 8

5 Descripción de la Práctica de Laboratorio 9

5.1. Procedimiento experimental 9

1 INTRODUCCIÓN

1.1. TÉCNICA ELISA

Los ensayos tipo ELISA (del inglés, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 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, 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, a su vez, está acoplada a una reacción colorimétrica. Cuando ocurre la unión entre la molécula objetivo y el anticuerpo, la enzima asociada 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.

Existen diferentes tipos de ELISA, entre los más utilizados se encuentran el ELISA directo, indirecto, tipo sándwich y competitivo (*Figura 1*).

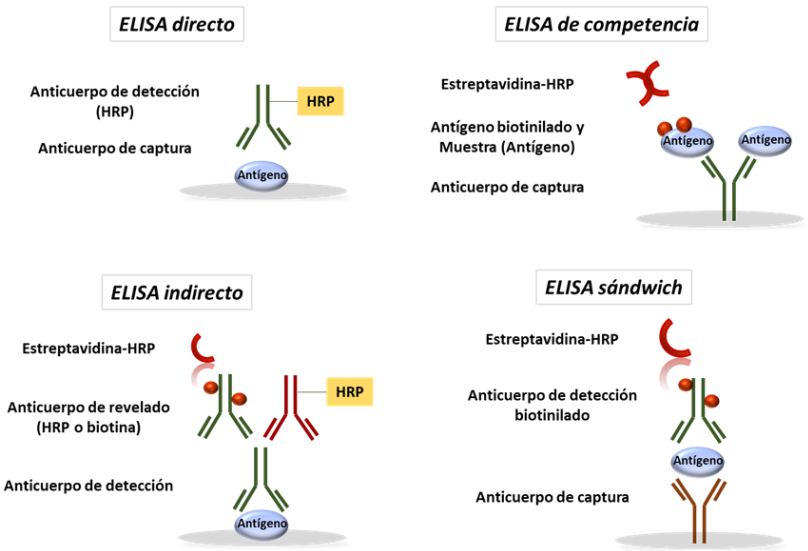


Figura 1. **Tipos de ELISA.** Algunos ELISA incluyen conjugados con biotina. La biotina y la estreptavidina tienen una afinidad elevada, por lo que existen conjugados que en lugar de ser anticuerpo secundario-HRP, emplean estreptavidina-HRP. HRP, del inglés horseradish peroxidase (peroxidasa de rábano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

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 EBV (virus de Epstein Barr), VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), entre otros, se emplea habitualmente el ELISA indirecto.

1.2. VIRUS DE EPSTEIN BARR

El virus de Epstein-Barr (VEB) pertenece a la familia Herpesviridae (herpesvirus humano tipo 4) y es uno de los virus más extendidos a nivel mundial. Su principal vía de transmisión es el contacto directo con la saliva de personas infectadas, especialmente mediante los besos o al compartir alimentos, bebidas y utensilios. También puede transmitirse, aunque con menor frecuencia, a través de la sangre y los trasplantes de órganos.

Atendiendo a la incidencia del EBV, se estima que aproximadamente el 90-95 % de la población adulta mundial ha estado infectada por este virus. La infección suele adquirirse durante la infancia, generalmente de forma asintomática, aunque cuando se produce durante la adolescencia o la edad adulta es más frecuente que aparezcan manifestaciones clínicas. Tras la infección, el virus permanece latente en el organismo durante toda la vida.

La principal enfermedad asociada al EBV es la mononucleosis infecciosa, conocida también como «enfermedad del beso». Además, se ha relacionado con el desarrollo de diversas neoplasias, entre ellas el linfoma de Burkitt, el linfoma de Hodgkin, algunos linfomas no Hodgkin y el carcinoma nasofaríngeo. También se asocia con determinados casos de carcinoma gástrico y trastornos linfoproliferativos, especialmente en personas inmunodeprimidas.

1.2.1. DESCRIPCIÓN DEL VIRUS DE EPSTEIN BARR

El EBV pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Gammaherpesvirinae*, género Linfocriptovirus. Se trata de un virus de ADN de doble cadena de 172 kilobases, rodeado por una cápside icosaédrica de aproximadamente 150-200 nanómetros; por fuera de la cápside aparecen proteínas globulares de origen viral denominadas tegumento y recubriendo la cápside hay una envoltura formada por numerosas glicoproteínas que son el medio de anclaje del virus a las células susceptibles (*Figura 2*).

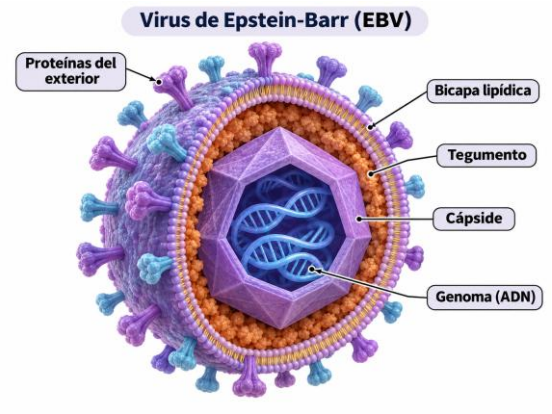


Figura 2. **Esquema del virus de Epstein Barr.**

Existen al menos dos tipos de EBV: el EBV-1 y el EBV-2 (también conocidos como tipos A y B). Se caracterizan, al igual que otros miembros de la familia *Herpesviridae*, por su capacidad de permanecer en estado latente en el interior del organismo humano y se diferencian en la secuencia de los genes que codifican los antígenos nucleares, en sus propiedades biológicas y en su distribución geográfica. El EBV-1 es el más predominante en el hemisferio occidental mientras que el EBV-2 es más frecuente en África.

1.2.2. PRUEBAS CLÍNICAS PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DE EPSTEIN BARR

En las pruebas inmunológicas basadas en anticuerpos, existen varios antígenos del virus Epstein Barr a los cuales van dirigidos los ensayos. Los antígenos usados para la detección del virus, indican en algunas ocasiones el tiempo de infección del paciente. Los antígenos más empleados son:

I. **Detección del antígeno de la cápsida viral** (*VCA*)

   En las etapas iniciales de la infección por el virus de Epstein-Barr, aparecen en el suero de los pacientes anticuerpos de tipo IgM dirigidos contra el antígeno de la cápside viral (anti-VCA IgM). Estos anticuerpos constituyen la primera respuesta del sistema inmunitario frente a la infección, por lo que permiten identificar una infección reciente o aguda. Generalmente, desaparecen entre las 4 y las 6 semanas posteriores al inicio de la infección.

   Posteriormente, durante la fase aguda, aparecen los anticuerpos de tipo IgG frente al antígeno de la cápside viral (anti-VCA IgG), cuyos niveles alcanzan su concentración máxima entre la segunda y la cuarta semana de infección. A diferencia de los IgM, los IgG representan una respuesta inmunitaria más duradera y permanecen en el organismo durante toda la vida del individuo, proporcionando evidencia de contacto con el virus, ya sea reciente o pasado.

   En resumen, los anticuerpos IgM indican una infección reciente, mientras que los IgG indican una respuesta inmunitaria más duradera que persiste tras la infección.

II. **Detección del Antígeno temprano** (*EA, Early Antigen*)

Los anticuerpos IgG anti-EA aparecen durante la fase aguda de la enfermedad y, por lo general, descienden hasta alcanzar niveles indetectables después de tres a seis meses. En muchas personas, la detección de anticuerpos frente al EA es un signo de infección activa. Sin embargo, el 20 % de las personas sanas pueden presentar anticuerpos contra el EA durante años.

III. **Detección del Antígeno nuclear del virus de Epstein-Barr** (*EBNA, Epstein-Barr Nuclear Antigen*)

Los anticuerpos frente al EBNA (determinados mediante la prueba estándar de inmunofluorescencia) no se detectan durante la fase aguda de la infección por el virus de Epstein-Barr. Por el contrario, aparecen lentamente entre 2 y 4 meses después del inicio de los síntomas y persisten durante el resto de la vida de la persona.

2 OBJETIVOS DE LA PRÁCTICA

Comprender y aplicar la técnica de ELISA como método inmunoenzimático utilizado en el screening y detección cualitativa o cuantitativa de anticuerpos frente al virus de Epstein Barr, 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 incluye reactivos para 24 estudiantes.

Componentes	TBED76-24	Almacenaje
Placas de ELISA (Tiras de 8 pocillos)	24 Tiras	25 °C
Tampón de Lavado y Dilución (1 L)	1 sobre	25 °C
Tampón de Dilución de Muestras	20 mL	4 °C
Antígeno Cápside Viral (VCA)	1,2 mL[a]	-20 °C
Control Positivo (anti EBV-IgG humana) (*tapa roja*)	3 x 110 µL[b]	-20 °C
Muestra 1 (*tapa naranja*)	0,2 mL[c]	-20 °C
Muestra 2 (*tapa verde*)	0,2 mL[c]	-20 °C
Muestra 3 (*tapa amarilla*)	0,2 mL[c]	-20 °C
Muestra 4 (*tapa rosa*)	0,2 mL[c]	-20 °C
Anticuerpo Secundario (anti IgG humana-HRP)	1,2 mL[a]	-20 °C
Sustrato Peroxidasa (TMB, (3,3',5,5' - tetrametilbencidina))	12 mL	4 °C
Solución Stop (HCl 1M)	12 mL	25 °C

[a] Añadir 10,8 mL del Tampón de Lavado y Dilución.

[b] Añadir 990 µL del Tampón de Dilución de Muestras.

[c] Añadir 1,8 mL del Tampón de Dilución de Muestras.

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

4 MATERIAL REQUERIDO (*no suministrado*)

Para la ejecución de la práctica se requiere:

- Guantes de laboratorio
- 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 se realizará un ELISA indirecto con el objetivo de determinar si una muestra contiene anticuerpos frente al virus de Epstein Barr en sueros humanos. La presencia de anticuerpos contra el EBV en una muestra humana no significa que el paciente esté enfermo ya que el virus puede permanecer de forma latente durante toda la vida.

Se desarrollará un ensayo simulado de ELISA indirecto en pocillos de placa de ELISA. Inicialmente se recubrirán los pocillos con un antígeno del virus Epstein Barr (Ej. Antígeno VCA) el cual es capaz de captar anticuerpos desarrollados en pacientes que tienen el virus en etapas tempranas de tipo IgM y pasadas, 2-4 semanas de tipo IgG. Posteriormente se añaden las muestras de pacientes, el control negativo y el control positivo. Si hay anticuerpos contra este antígeno del VEB, se quedarían unidos a la placa los anticuerpos de las muestras.

Posteriormente, tras los lavados correspondientes para eliminar el material no unido, se añadirá un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP), dirigido contra las inmunoglobulinas G humanas (anti-IgG humana). Este anticuerpo secundario se unirá a los anticuerpos primarios fijados al antígeno, permitiendo la detección de la señal mediante la actividad enzimática (*Figura 1. ELISA indirecto*).

A continuación, se incorporará el sustrato de la peroxidasa (HRP), que al ser catalizado por la enzima producirá un cambio de color a azul en aquellos pocillos donde la muestra sea positiva, en caso de que la muestra sea negativa no se percibirá cambio de coloración. La intensidad de este color será proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-EBV presentes en cada muestra. Esta reacción puede ser parada tras su incubación usando la Solución Stop, para posteriormente ser medida en un lector de placas a 450nm de longitud de onda.

Finalmente, la práctica permitirá comprender el funcionamiento del ELISA indirecto como técnica de screening serológica, así como su aplicación en el diagnóstico y estudio de la respuesta inmune frente a infecciones virales como el virus de Epstein Barr.

5.1. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. Añadir a 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 la lámina metálica e incubar durante 5 minutos.
2. Eliminar el contenido volteando las tiras y secar sobre papel de filtro.

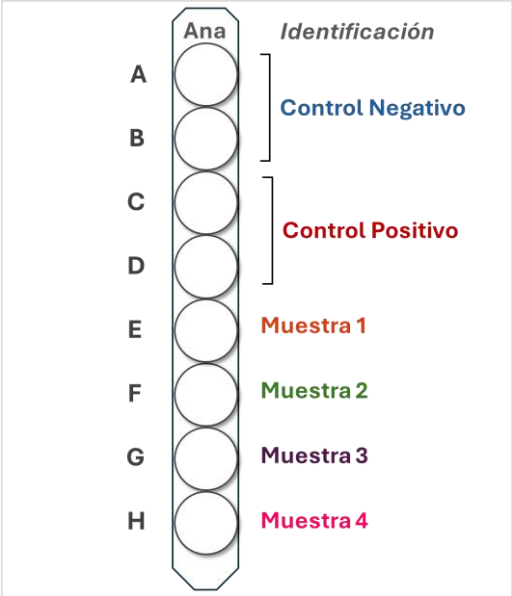


Evitar que, tras vaciar los pocillos, estos no se queden sin líquido durante mucho tiempo. En caso que no disponga del tampón del próximo paso, mantener los pocillos con el contenido hasta tanto disponga del componente del paso 3.

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. Anotar en el cuaderno la distribución de las muestras en los pocillos de la tira. Rotular el borde superior de la tira con una identificación del estudiante, que permita reconocer a quién pertenece y mantener la misma orientación durante todo el ensayo.

   Los controles serán analizados por duplicado, mientras que las muestras se analizarán cada una en un solo pocillo. Se sugiere la siguiente distribución:



5. Añadir **50 µL por pocillo de cada control y muestra**. Tapar con la lámina metálica e incubar durante 15-20 minutos. El control positivo y las 4 muestras del ensayo deben ser entregadas listas 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 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 y secar 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 Secundario Diluido**. 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 Sustrato Peroxidasa**. Esperar aparición de la coloración azul en el control positivo y en las muestras durante 5- 10 minutos protegida de la luz. NO ELIMINAR EL CONTENIDO DE LOS POCILLOS.
11. Añadir a todos los pocillos **50 µL de la Solución Stop**. Los pocillos con coloración azul pasarán a amarillo.

    No añadir la Solución Stop si el ELISA no será medido en un lector de placas. Anote los resultados de forma cualitativa en su cuaderno. Toda muestra que presente una coloración superior al control negativo, se considera positiva para el ELISA.

12. ***Opcional:*** Colocar cuidadosamente las tiras en el soporte de la placa y leer en un lector de placas a 450 nm. Analizar los resultados obtenidos.

