

## 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

COMPONENTES	CONSERVACIÓN
<b>A Antígenos VIH (simulados)</b>	Nevera
<b>B Control Positivo (Anticuerpo primario)</b>	Nevera
<b>C Suero Donante 1 (simulado)</b>	Nevera
<b>D Suero Donante 2 (simulado)</b>	Nevera
<b>E Complejo Anti-IgG peroxidasa (Anticuerpo secundario)</b>	Nevera
<b>F Peróxido de Hidrógeno estabilizado</b>	Nevera
<b>G Ácido aminosalicílico</b>	Nevera
<b>H PBS concentrado</b>	Nevera
<b>Placas de Microtitulación</b>	Temperatura ambiente
<b>Pipetas pequeñas de transferencia</b>	Temperatura ambiente
<b>Microtubos 1.5 ml</b>	Temperatura ambiente
<b>Pipetas serológicas de 1ml</b>	Temperatura ambiente
<b>Tubos de 50 ml</b>	Temperatura ambiente

### **ESTE EXPERIMENTO NO CONTIENE VIRUS VIH O SUS COMPONENTES**

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

#### 2.1 Material requerido y no suministrado

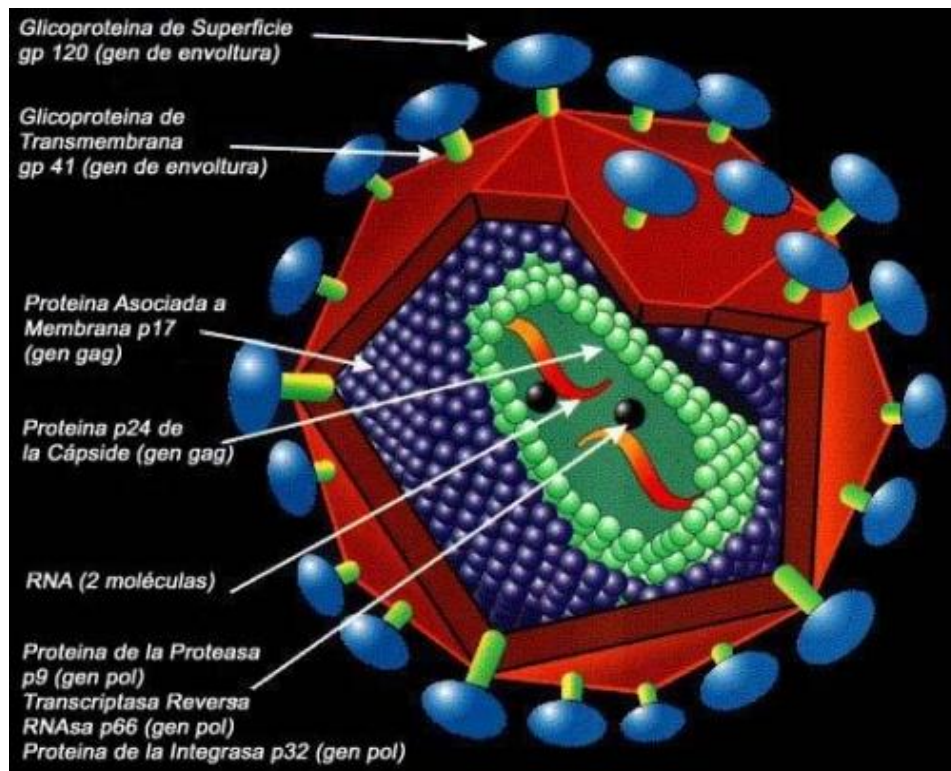
- Agua destilada
- Vasos.
- Estufa de cultivo 37°C.
- Micropipetas automáticas (100-1000 µl) y puntas.
- Guantes.
- Gafas.
- Aspiradores para las pipetas serológicas de 1 ml.

### 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 Glucoproteínas con 72 proyecciones externas. Contiene las proteínas víricas 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/mm<sup>3</sup>).

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, CRIXIVAN) 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

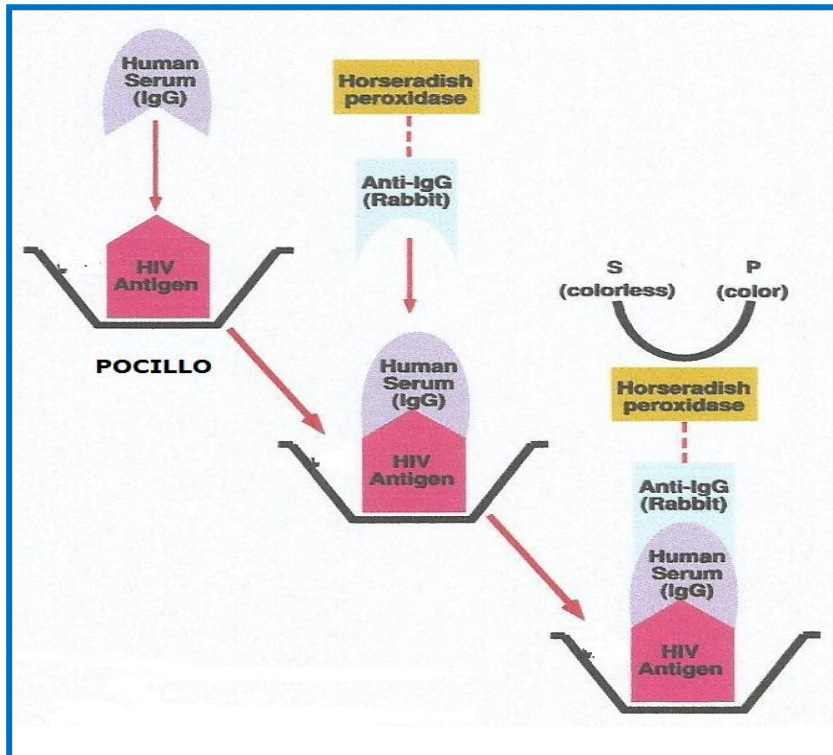
1. Utilizando sangre y derivados que hayan sido previamente analizados y estén libres del virus.
2. Recomendando a los usuarios de drogas inyectables utilizar una aguja y jeringa nueva en cada aplicación lavarlas y/o hervirlas.
3. Utilizando guantes de látex o poliuretano siempre que se maneje sangre 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 Enzimoimmunoensayos (ELISA) fueron originalmente desarrollados para la medición de anticuerpos. Estos inmunoensayos también se han adaptado para detectar con éxito muestras que contienen antígenos. **Este experimento de simulación de ELISA del VIH ha sido diseñado para detectar la IgG circulante de un paciente hipotético dirigido hacia el antígeno viral (VIH).** Los ELISA se realizan en placas de microtitulación que generalmente están hechos de poliestireno o cloruro de polivinilo. Las placas son algo transparente y contienen muchos pocillos pequeños, en los que se depositan muestras líquidas.



Los siguientes pasos son los básicos en la reacción del ELISA:

### PASO 1

Los antígenos son añadidos a los pocillos donde algunos permanecen adsorbidos a los pocillos por enlaces hidrófobos. Los antígenos pueden pertenecer de lisados enteros de VIH, proteínas específicas del VIH, o una mezcla de los dos. No hay especificidad involucrado con el proceso de adsorción a los pocillos, aunque algunas sustancias pueden exhibir una unión diferencial. En ciertos casos, los antígenos pueden unirse covalentemente al plástico usando luz UV.

### PASO 2

Los pocillos son lavados para eliminar los antígenos no unidos.

### PASO 3

Bloquear los sitios no ocupados en las paredes de los pocillos de plástico con proteínas, por lo general gelatina o albúmina de suero bovino.

### PASO 4

La infección por el VIH-1 hace que el individuo produzca una respuesta de anticuerpos que finalmente resulta en moléculas de IgG en el plasma que se unen a diferentes proteínas del VIH (o áreas diferentes o la misma proteína).

Si estos anticuerpos están presentes, como en una muestra de plasma de un paciente positivo VIH, entonces se unen a los antígenos adsorbidos en el pozo y permanecen allí después del lavado.

Si el anticuerpo (a partir de un paciente VIH positivo) permanece unido al antígeno en el pocillo, a continuación, el anticuerpo secundario se unirá a ese complejo y permanecerá unido después del lavado. Si el paciente es negativo para el VIH, no habrá anticuerpo primario para unirse con el antígeno y, a su vez, no se producirá

la unión de anticuerpo secundario. Los anticuerpos secundarios generalmente son obtenidos en conejos y cabras inmunizadas con IgG humanos. Los anticuerpos secundarios (anti VIH - IgG) se purifican y se unen covalentemente a la peroxidasa. Esta modificación no suele afectar a la especificidad de unión y afinidad del anticuerpo o de la actividad enzimática de la peroxidasa.

## **PASO 5**

Los pocillos son lavados para eliminar los anticuerpos secundarios no unidos.

## **PASO 6**

Después del lavado, se añade una solución que contiene peróxido de hidrógeno y aminosalicilato a cada pocillo. La peroxidasa posee una alta actividad catalítica. La solución de sustrato utilizada para la reacción de ELISA es casi incolora. La peroxidasa convierte el peróxido a  $H_2O + O_2$  utilizando el salicilato como el donante de hidrógeno. El salicilato oxidado es marrón y se puede observar fácilmente en los pocillos que contienen anti - VIH - 1 IgG (plasma positivo).

Diferentes inmunizaciones con el mismo antígeno en el mismo animal también pueden producir afinidades de unión variables. El uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra un único epítipo elimina esta variabilidad. Un Western blot de muestras de ELISA positivos se utiliza para confirmar la presencia de VIH en un paciente.

## 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.**

### 4.1 Precauciones

1. Llevar gafas y guantes de laboratorio 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. Lavarse las manos con jabón y agua después de haber trabajado en el laboratorio o utilizado reactivos o materiales biológicos.

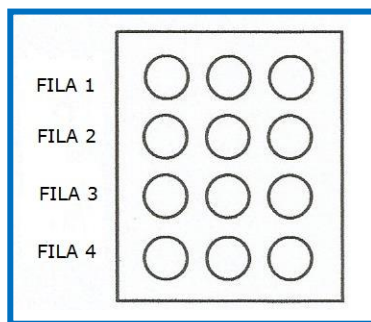
### 4.2 Preparaciones y consideraciones previas

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

## **INSTRUCCIONES GENERALES Y PROCEDIMIENTOS**

A) Marcar la placa de microtitulación: Colocar la placa verticalmente como se muestra en la figura. Marcar la placa con su número de grupo o iniciales y números de filas.





B) A cada grupo de estudiantes le corresponden 5 pipetas de transferencia, marcarlas como se indica:

- (-) negativo Fila 1.
- (+) positivo Fila 2.
- D1 Donante suero 1 Fila 3.
- D2 Donante suero 2 Fila 4.
- PBS Tampón fosfato salino.

### **INSTRUCCIONES PARA AÑADIR LÍQUIDOS Y LAVADO DE LOS POCILLOS**

A) Añadir los reactivos a los pocillos utilizando la misma pipeta de 1 ml. **LAVAR LA PIPETA a fondo** con agua destilada antes de utilizar la pipeta para agregar el siguiente reactivo.

B) Eliminación y lavado de líquidos.

Cuando se le indique en los procedimientos experimentales, eliminar los líquidos con la pipeta de transferencia debidamente marcada, y luego lavar los pocillos de la siguiente manera:

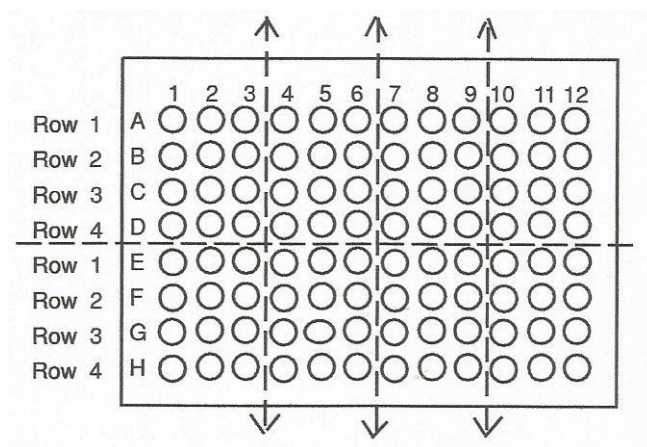
- Utilice la pipeta de transferencia con la marca "PBS", para añadir el tampón PBS a los pocillos en todas las filas. Añadir el tampón PBS hasta que cada pocillo está casi lleno. La capacidad de cada pocillo es de aproximadamente 0,2 ml. No permita que los líquidos se viertan en pocillos adyacentes.
- Con la pipeta de transferencia debidamente marcada, eliminar todo el líquido (tampón PBS) de los pocillos en cada fila. Deseche el líquido en el vaso de precipitados con la etiqueta "residuos".

### **TIEMPO APROXIMADO PARA LAS PREPARACIONES PREVIAS Y PROCESOS DEL EXPERIMENTO**

1. Las preparaciones previas de los reactivos y demás pueden tomar un tiempo de una hora o una hora y media.
2. El experimento por parte de los estudiantes puede llevar 1 hora.

## A) PREPARACIONES ANTES DEL DÍA DE LA PRÁCTICA

1) Tal y como se muestra en la figura orientar la placa de microtitulación.



2) Cortar por las líneas indicadas tal y como se muestra en la figura. Cada pieza tendrá 3 pocillos por 4 filas. Cada grupo de laboratorio recibirá una pieza.

3) Utilizando una pipeta de 1 ml dispensar cada uno de los componentes A-D directamente de los microtubos suministrados en este kit tal y como se indica en la Tabla de Preparación de los reactivos del experimento.

**Tabla de Preparación de los reactivos del experimento**

		<b>Marca</b>	<b>Volumen a dispensar a cada grupo</b>
<b>A</b>	Antígeno VIH	VIH	1.4 ml
<b>B</b>	Control positivo	+	0.4 ml
<b>C</b>	Suero Donante 1	DS1	0.4 ml
<b>D</b>	Suero Donante 2	DS2	0.4 ml
<b>E+PBS</b>	Conjugado Anti-IgG-peroxidasa	2ºAb	1.4 ml
<b>PBS+F+G</b>	Peroxidasa-substrato del enzima	Substrato	1.4 ml
<b>H+AGUA</b>	Tampón salino fosfato	PBS	25 ml

Los componentes A a D pueden ser dispensados el día de antes de la práctica y conservar en nevera. Si los componentes son dispensados el día de la práctica, dejar a temperatura ambiente

## B) PREPARACIONES EL DÍA DE LA PRÁCTICA

1. Añadir todo el contenido del PBS concentrado (H) a 270 ml de agua destilada. Mezclar.

2. Marcar este PBS diluido como "**PBS**".
3. Dispensar 25 ml en pequeños vasos para cada grupo.
4. Añadir 0,3 ml del "PBS" diluido al **Complejo Anti-IgG peroxidasa (Anticuerpo secundario) (E)**. Mezclar bien.
5. Añadir 15 ml del PBS diluido al tubo de 50 ml suministrado.
6. Pasar todo el contenido del tubo E preparado en el punto 4 al tubo que contiene 15 ml de PBS. Marcar el tubo como "**2º Ab**". Mezclar.
7. Dispensar 1,4 ml del conjugado Anti-IgG peroxidasa a cada grupo.

### C) PREPARACION DURANTE LA PRÁCTICA DEL SUBSTRATO-PEROXIDASA

#### **Prepararlo 15-30 minutos antes de la incubación.**

1. Añadir 13,5 ml del PBS diluido al segundo tubo de 50 ml suministrado.
2. Añadir el **Ácido aminosalicílico (G)** a los 13,5 ml de PBS. Mezclar por inversión y vortex. Normalmente suele quedar partículas sin disolver.
3. Luego añadir 1,5 ml **Peróxido de Hidrógeno estabilizado (F)**. Mezclar.
4. Dispensar 1,4 ml del substrato-peroxidasa a cada grupo

<b>CADA GRUPO DE TRABAJO RECIBIRÁ LOS SIGUIENTES COMPONENTES</b>	
1	Pieza de placa de microtitulación
1	Tubo marcado "VIH"
1	Tubo marcado "+"
1	Tubo marcado "DS1"
1	Tubo marcado "DS2"
1	Tubo marcado "2º Ab"
1	Pipeta de 1 ml (o micropipeta automática con puntas)
5	Pipetas de transferencia
1	Vaso conteniendo 16 ml de PBS
1	Vaso conteniendo aproximadamente 100 ml de agua destilada
1	Vaso vacío marcado como "residuos"
1	Tubo marcado como "Substrato" (antes de la última incubación)

## 5. PRÁCTICA

1. Añadir a los 12 pocillos **100 µl del antígeno viral "VIH"**.
2. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Eliminar todo el líquido (antígeno viral) con una pipeta de transferencia.
4. Lavar cada pocillo con PBS como se ha descrito (INSTRUCCIONES PARA AÑADIR LÍQUIDOS Y LAVADO DE LOS POCILLOS).  
*En laboratorios de investigación, tras este paso, todos los sitios en la placa de microtitulación se saturan con una solución de bloqueo que consiste en una mezcla de proteínas, tal como BSA. Hemos diseñado este experimento para eliminar este paso para ahorrar tiempo.*
5. Añadir los reactivos tal y como se indica a continuación:  
**Asegurarse de lavar convenientemente la pipeta de 1 ml antes de añadir un nuevo reactivo (pasos 1, 5, 9 y 13). Si utiliza una micropipeta automática, utilizar puntas nuevas para cada reactivo.**
  - **100 µl de PBS** a los 3 pocillos de la fila 1. **Control negativo.**
  - **100 µl de "+"** a los 3 pocillos de la fila 2. **Control positivo.**
  - **100 µl de DS1** a los 3 pocillos de la fila 3.
  - **100 µl de DS2** a los 3 pocillos de la fila 4.
6. Incubar a 37°C durante 15 minutos.
7. Eliminar todo el líquido de cada pocillo con la pipeta de transferencia marcada apropiadamente.
  - Pipeta transferencia (-) fila 1.
  - Pipeta transferencia (+) fila 2.
  - Pipeta transferencia D1 fila 3.
  - Pipeta transferencia D2 fila 4.
8. Lavar cada pocillo con PBS tal y como se ha descrito.
9. Añadir a los 12 pocillos **100 µl del conjugado Anti-IgG peroxidasa (2º Ab)**.
10. Incubar a 37°C durante 15 minutos.  
*En este momento usted puede obtener el sustrato que se utilizará en el paso 13. Dado que el sustrato se debe preparar justo antes de su uso, el instructor indicará el inicio de su preparación hacia el final de la incubación en el paso 10.*
11. Eliminar todo el líquido de cada pocillo con la pipeta de transferencia marcada apropiada.
12. Lavar cada pocillo con PBS tal y como se ha descrito.
13. Añadir a los 12 pocillos **100 µl del Substrato**
14. Incubar a 37°C durante 5 minutos.
15. Retire la placa para su análisis.
16. Si el color no está completamente desarrollado después de los 5 minutos.

Incubar a 37°C durante un periodo de tiempo mayor.

## 6. RESULTADOS Y PREGUNTAS DE ESTUDIO



El donante de suero 2 debería dar positivo para el VIH. El color debería ser similar al positivo control.

### **1. Describe el mecanismo del ELISA. ¿Por qué es necesario bloquear los sitios de unión no ocupados en los pocillos de la placa? ¿Por qué es importante tener un control positivo?**

Los antígenos absorbidos en los pocillos de la microplaca se unen a las IgG presentes en el suero de un paciente dado. La segunda IgG está conjugada a un marcador como la peroxidasa que produce productos coloreados a partir de ciertos substratos. Si los sitios no ocupados por los antígenos no son bloqueados, los anticuerpos primarios y secundarios no serán específicamente absorbidos produciendo falsos positivos. Un control positivo asegura que los reactivos y microplaca trabajan óptimamente.

### **2. ¿Por qué la aparición del SIDA puede tardar varios años?**

El VIH permanece como un provirus hasta que las células T son activadas por un antígeno específico.

### **3. ¿Por qué se busca la IgG Anti-VIH en lugar del propio virus?**

El VIH tiene una fase proviral. Durante las primeras fases de la enfermedad en la circulación las cantidades de virus presentes son muy pequeñas. Además, la tasa de mutación viral es demasiado alta para controlar de forma fiable una preparación dada de anticuerpos.

### **4. ¿Por qué la destrucción de las células T compromete a todo el sistema inmune? ¿Cómo se une el VIH a las células T?**

Las células T producen citoquinas que son requeridas para el crecimiento y maduración de diferentes células del sistema inmune como las células B, macrófagos y células citotóxicas. El VIH se une a la célula T gracias al reconocimiento y acoplamiento específico entre proteínas de la envoltura del virus (gp120 y gp41) y los receptores CD4 de las células T.

### **5. ¿Por qué hay tantas variantes inmunológicas del VIH?**

Por una alta tasa de error de la transcriptasa inversa.