

ELISA para la detección cuantitativa y cualitativa de anticuerpos contra el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (anti-HBsAg o HBsAb)

Reactivos:

- HBsAg recombinante (rHBsAg-idic-ula).
- Anticuerpo contra IgG humana conjugado a peroxidasa (HRP-conjugated rabbit anti-human IgG).
- Kit de Tetrametilbenzidina (TMB).

Soluciones:

Buffer carbonato/bicarbonato:

- Carbonato de sodio 100mM, bicarbonato de sodio 100mM, pH 9,6.

Buffer de lavado:

- Tris 10 mM, NaCl 100 mM, Tween20 0,1%vv, pH 7,4.

Buffer de bloqueo:

- Buffer de lavado + Albúmina bovina 0,5%pv.

Sustrato:

- Solución 1.
- Solución 2.

Muestras:

- Solución calibradora de IgG humana anti-HBsAg 500 mIU/mL.
- Sueros controles positivos y negativos.
- Muestras problema.

Procedimiento:

- Sensibilizar o tapizar las placas de ELISA con 10 µg/mL de rHBsAg-idic-ula (100 µL por pozo) preparado en buffer carbonato. Incubar durante toda la noche a RT.
- Lavar la placa.
- Bloquear por 30 minutos con 100 µl de buffer de bloqueo.
- Colocar los sueros y calibradores (50 µL por pozo), incubar por 30 minutos.
- Lavar la placa.
- Agregar 50 µL del anticuerpo conjugado a peroxidasa (1:2000 en buffer de bloqueo), incubar por 30 minutos.
- Lavar la placa.
- Agregar 50 µL de sustrato solución 1.
- Incubar por 5 minutos en oscuridad.
- Agregar 50 µL de sustrato solución 2.
- Leer en espectrofotómetro a 570 nm.
- Realizar las determinaciones cuantitativas y cualitativas en las muestras problema.