

## APPENDICE 9

## Test ELISA

## Réactifs

*Tampon bicarbonate*

$\text{Na}_2\text{CO}_3$	1,59 g
$\text{NaHCO}_3$	2,93 g
$\text{NaN}_3$	0,2 g
Eau distillée	q.s.p. 1 l

(Il est possible de multiplier les concentrations par 10 pour faciliter la conservation).

*CB/poudre de lait 2 %*

CB	100 ml
Poudre de lait écrémé	2 g

*Tampon phosphate (PBS), pH 7,2*

$\text{NaCl}$	8 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,2 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12 \text{H}_2\text{O}$	2,88 g
$\text{KCl}$	0,2 g
Eau distillée	q.s.p. 1 l

(Il est possible de multiplier les concentrations par 10 pour faciliter la conservation à long terme).

*PBS/Tween 0,05 % (PBS/T)*

PBS	99,95 ml
Tween 20	0,05 ml

*PBS/T/poudre de lait 2 % (PBS/T/M)*

PBS/T	100 ml
Poudre de lait écrémé	2 g

*Tampon citrate-phosphate, pH 5,5*

## Solution A

Acide citrique	2,1 g
Eau distillée	q.s.p. 100 ml

## Solution B

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12 H <sub>2</sub> O	3,5 g
Eau distillée	q.s.p. 100 ml

Ajouter 48,5 ml de solution A à 51,5 ml de solution B.

*Solution substrat-chromogène (pour le conjugué à la peroxydase de raifort)*

Hydrochlorure d'orthophénylène-diamine (OPD)	0,04 g
Tampon citrate-phosphate	100 ml
Eau oxygénée à 30 vol. (peroxyde d'hydrogène à 3 %)	30 µl

*Préparation de l'antigène ELISA*

Les promastigotes de *L. donovani*, *L. infantum* ou *L. chagasi* sont obtenus par culture en milieu liquide puis recueillis à la concentration approximative de  $1 \times 10^6$  cellules/ml. Laver 3 fois le culot cellulaire, de préférence à 4°C avec du tampon phosphate (PBS) stérile, puis le congeler

à -20°C. Le dégeler ensuite à température ambiante et le remettre en suspension dans de l'eau distillée stérile (1:40 v/v). Lysér les cellules en les congelant rapidement dans l'azote liquide puis en les dégelant dans de l'eau à 37°C. Répéter l'opération 3 fois et, si possible, passer les cellules aux ultrasons 5 fois pendant 15 secondes. Les centrifuger ensuite à 4°C à grande vitesse (par ex. à 10 000 g) pendant 15 mn et conserver le surnageant à -20°C pour son utilisation ultérieure comme antigène ELISA.

### ***Sensibilisation des microplaques ELISA***

Utiliser des plaques de microtitration en polystyrène ou en matière similaire, spécialement conçues pour l'épreuve ELISA. Déterminer la dilution antigénique à utiliser pour la sensibilisation au moyen d'un titrage en damier faisant appel à différentes dilutions antigéniques par rapport à des sérums témoins positifs et négatifs et à diverses dilutions du conjugué. Déposer ensuite 100 µl d'antigène dilué dans le tampon bicarbonate 0,05 M, pH 9,6 dans chaque puits, puis laisser en contact pendant une nuit à 4°C. Laver trois fois les puits le lendemain avec le PBS puis les traiter avec la solution de blocage (tampon bicarbonaté avec 2% de lait) pendant une heure à 37°C et les laver de nouveau trois fois avec le PBS.

### ***Réalisation de l'épreuve ELISA***

Diluer les sérum au 1/200 dans le PBS/T/M. Poursuivre les dilutions, en les divisant par 2 par ex., si le titrage des sérums l'impose. Ajouter 100 µl de dilution dans chacune des 96 puits sensibilisés d'une plaque ELISA. Laisser les plaques incuber 1 heure à 37°C en chambre humide puis les laver 3 fois au PBS/T. Remplir immédiatement chaque puits avec 100 µl d'anti-immunoglobulines G (H+L) humaines monoclonales, purifiées par affinité et conjuguées à la peroxydase de raifort (HRP) ou à la phosphatase alcaline (ALP), diluées approximativement au 1/1 000 ou 1/2 000 dans le PBS/T/M et incubées 1 heure à 37°C. Déterminer la dilution optimale du conjugué au moyen d'un titrage en damier. Dans le cas de la LV canine, on utilise un conjugué d'anticorps de lapin anti-immunoglobulines G (H + L) de chien. Après incubation, laver de nouveau trois fois les plaques au PBS/T et ajouter 100 µl de substrat. Laisser les plaques 15 mn à température ambiante dans l'obscurité, puis stopper la réaction en ajoutant 50 µl d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5 M. Lire les résultats sur un lecteur ELISA à 492 nm dans la demi-heure suivant l'arrêt de la réaction. Toutes les plaques doivent comporter des sérums témoins positifs et négatifs et les tests sont normalement exécutés en double. Il est possible d'ajuster les conditions du test, qui varient d'un jour à l'autre, au moyen d'un échantillon de référence positif :

densité optique du sérum testé/densité optique de l'échantillon de référence positif