

## Apêndice 9

### ELISA para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*

#### Reagentes:

##### *Tampão de Ligação (TL)*

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,59 gr
NaHCO <sub>3</sub>	2,93 gr
NaN <sub>3</sub>	0,2 gr
Água destilada	até 1 litro

(Pode ser preparada numa concentração 10X superior à da receita anterior, para melhor armazenamento de longo prazo.)

##### *TL/leite em pó a 2 %*

TL	100 ml
Leite desnatado em pó (baixo teor de gordura)	2,00 gr

##### *Solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7.2*

NaCl	8 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 gr
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	2,88 gr
KCl	0,2 gr
Água destilada	1000 ml

(Pode ser preparada numa concentração 10X superior à da receita anterior, para melhor armazenamento de longo prazo.)

##### *PBS/Tween a 0,05 %*

Solução de PBS	99,95 ml
Tween 20	0,05 ml

*PBS/T/leite em pó a 2 % (PBS/T/M)*

Solução de PBST	100 ml
Leite desnatado em pó (baixo teor de gordura)	2,00 gr

*Tampão de fosfato em citrato, pH 5.5*

## Solução A

Ácido Cítrico	2,1 gr
Água destilada	até 100 ml

## Solução B

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	3,5 gr
Água destilada	até 100 ml

Adicionar 48,5 ml da Solução A á 51,5 ml da Solução B.

*Solução de substrato (para o conjugado de HRP peroxidase)*

Hydrocloreto de O-fenillenediamina (OPD)	0,040 gr
Tampão de fostato em citrato, pH 5.5	100 ml
Peróxido de hidrogênio (a 3 %)	30 µl

*Preparação do antígeno do ELISA*

A promastigotas de *L. donovani*, *L. infantum* ou *L. chagasi* são cultivada em meio líquido, e a promastigotas da fase log são coletada numa concentração de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/ml. As células sedimentadas são lavadas (3x), de preferência a 4 °C, com solução salina estéril tamponada com fosfato (PBS) e congeladas a -20 °C. O sedimento congelado é descongelado a temperatura ambiente e resuspendido em água destilada estéril, numa concentração de 1:40 (v/v). As células são rompidas mediante congelamento rápido em nitrogênio líquido e descongelamento em água a 37 °C (3x). Se possível, aplica-se ultra-som durante 15 segundos (5x). As células rompidas são centrifugadas em alta velocidade (por exemplo, 10.000 g), a 4 °C, durante 15 minutos, e o supernadante é armazenado congelado, a -20 °C, para uso como antígeno no ELISA.

### *Revestimento dos poços do ELISA*

São usadas placas de microtitulação de poliestireno ou similares, mas sempre as recomendadas especificamente para o ELISA. A diluição de antígeno utilizada no revestimento dos poços é determinada por um experimento em “tabuleiro de xadrez”, usando diferentes diluições do antígeno, contra controles positivos e negativos do soro, bem como várias diluições experimentais diferentes do conjugado. As diluições do antígeno são preparadas em tampão de carbonato para ligação, pH 9.6. Para revestir os poços, pipeta-se 100 µl de antígeno diluído nos poços, que são mantidos a 4 ° C até o dia seguinte. Os poços são lavados (3x) com PBS e bloqueados com tampão de ligação/leite em pó a 2 %, durante uma hora, a 37 ° C, sendo lavados novamente (3x) com PBS.

### *Realização do ELISA*

Preparar uma diluição 1:200 dos soros, em PBS/T/M. Fazer outras diluições, por exemplo, dobrando as diluições se for necessário determinar os títulos dos soros. Adicionar, imediatamente, a cada poço, 100 µl de conjugado das diluições dos soros para cada poço revestido de uma placa ELISA de 96 poços. As placas são incubadas por uma hora a 37° C numa câmara húmida e logo lavadas (3x) com PBS/T. Imediatamente a cada poço deve-se acrescentar 100 µl de conjugado de peroxidase de imunoglobulina G (H + L) anti-humana monoclonal, conjugada com peroxidase, purificada por afinidade, rotulada com peroxidase de raiz-forte (HRP) ou fosfatase alcalina (ALP) em diluição 1:1.000 ou 1:2.000 em PBS/T/M, e incubar a 37 ° C durante uma hora. A diluição ótima do conjugado é determinada mediante titulação em “tabuleiro de xadrez”. No caso de LV canina, utilizar conjugado de imunoglobulina G (H + L) anti-canina de coelho. Após incubação, lavar novamente (3x) as placas com PBS/T e adicionar 100 µl de solução de substrato. Deixar as placas descansar a temperatura ambiente, durante 15 minutos, em câmara escura, e depois sustar a reação adicionando 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5 M. Ler os resultados no leitor de placas do ELISA, usando um filtro de 492 nm, até 30 minutos após o fim da reação. Todas as placas devem incluir soros de controle negativo e positivo. Em geral, os testes são duplicados. As variações diárias nas condições do teste podem ser ajustadas com uma amostra positiva de referência, da seguinte maneira:

$$\frac{\text{densidade ótica da amostra do teste}}{\text{densidade ótica do positivo de referência}} \times 1.$$