

APENDICE 8

Prueba de detección de anticuerpos por inmunofluorescencia (IFAT)

Reactivos

Solución salina tamponada con fosfatos (SSTF), pH 7,2

NaCl	8 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,88 g
KCl	0,2 g
Agua destilada	hasta llegar a 1 litro

(Es posible multiplicar por 10 la concentración de la fórmula arriba indicada para facilitar el almacenamiento prolongado de la solución.)

Solución salina tamponada con fosfatos/Tween al 0,05% (SSTF/T)

Solución salina tamponada con fosfatos	99,95 ml
Tween 20	0,05 ml

SSTF/T/leche en polvo al 2% (SSTF/T/L)

Solución de SSTF/T	100 ml
Leche desnatada en polvo	2,00 g

SSTF/glicerol al 10% (v/v)

SSTF	90,00 ml
Glicerol	10,00 ml

Los promastigotes cultivados de *L. donovani*, *L. infantum* o *L. chagasi* se lavan (x 3) con solución salina tamponada con fosfatos (SSTF), estéril, por centrifugación y suspensión repetida, preferentemente a 4°C. Con el sedimento final se prepara una nueva suspensión en SSTF a razón de 5×10^8 promastigotes/ml y se distribuyen inmediatamente 5 µl de suspensión celular en cada uno de los hoyos de los portaobjetos para IFAT (por ejemplo de Henley, Essex, Reino Unido). Los portaobjetos se dejan secar al aire, se envuelven en papel de seda, se colocan en bolsas de material plástico y se almacenan a -20°C. Se retiran del congelador y se llevan a la temperatura ambiente en un desecador.

Las muestras de suero se diluyen en solución salina tamponada con fosfatos/0,05% de Tween/2% de leche (SSTF/T/L). En cada hoyo se añaden diluciones de la muestra de suero, comenzando con una dilución de 1:50, y los portaobjetos se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Después de la incubación, se lavan (x 3) durante 10 minutos con solución salina tamponada con fosfatos/0,05% de Tween (SSTF/T); en cada hoyo se añaden 5 μ l de una dilución de 1:50 de conjugado de isotiocianato de fluoresceína con inmunoglobulina anticanina (FITC) en SSTF/T/L/1:10 000 de azul de Evans y los portaobjetos se incuban durante 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda. Después de la incubación se lavan (x 5) en SSTF y se dejan secar al aire en la oscuridad. Cada portaobjetos se monta en SSTF/glicerol y se examina en ur. cuarto oscuro con un microscopio por fluorescencia con aumento de 1000 X.