

## APENDICE 7

### Prueba de aglutinación directa

**Organismo:** Promastigotes cultivados *in vitro* de (una cepa local de)  
*L. donovani/L. infantum/L. chagasi*

#### Reactivos:

- Solución de Locke:

Glucosa	0,25% (p/v)
Cloruro de sodio	0,9% (p/v)
Cloruro potásico	0,04% (p/v)
Cloruro cálcico	0,02% (p/v)
Bicarbonato de sodio	0,02% (p/v)
  
- Solución salina con citrato trisódico:

Cloruro de sodio	8,77 g
Agua destilada	hasta obtener 1000 ml
Ajustar el pH a 7,4 añadiendo citrato trisódico 0,056 M (16,46 g/1000 ml).	
  
- Diluyente: Utilizar solución salina al citrato trisódico con un pH de 7,4, con 1% (v/v) de suero fetal de ternera inactivado por acción térmica \* y 2-mercaptoetanol 0,1 M (0,2 M para los perros).

**Nota \*** El suero fetal de ternera puede sustituirse en el diluyente por 0,2% de gelatina. Añadir la gelatina a la solución salina con citrato trisódico hasta obtener una concentración final de 0,2% (p/v), calentar a 56 °C durante 10 minutos para disolver la gelatina, dejar enfriar a temperatura ambiente y luego añadir el 2-mercaptoetanol.

#### Preparación del antígeno:

1. Recoger los promastigotes por centrifugación a 4000 g durante 10 minutos a 4°C.
2. Lavar (x5) mediante suspensión repetida en solución de Locke fría y centrifugar a 3200 g durante 10 minutos a 4°C.
3. Preparar una solución de tripsina (0,4% p/v de medio de cultivo de Difco, 1:250 de tripsina) en solución de Locke; ajustar el pH a 7,7.

4. Añadir la solución de tripsina a los promastigotes obtenidos por centrifugación, a razón de 1 volumen de promastigotes por 20 volúmenes de solución de tripsina.
5. Mezclar bien para obtener una nueva suspensión de promastigotes, luego incubar a 37°C durante 45 min.
6. Centrifugar la suspensión a 3200 g durante 10 min., luego lavar (x5) como en (2).
7. Volver a suspender el sedimento en solución de Locke fría, hasta obtener una concentración de aproximadamente  $2 \times 10^8$  células/ml.
8. Añadir un volumen igual de formaldehído al 2% en solución de Locke fría. Dejar a 4°C hasta el día siguiente.
9. Centrifugar a 3200 g durante 10 min. a 4°C. Lavar el sedimento en solución salina fría al citrato trisódico. Volver a suspender hasta obtener la misma concentración que en (8).
10. Añadir azul de Coomassie hasta obtener una concentración final de 0,1% (p/v). Dejar durante 90 min., agitando a una velocidad moderada en un batidor magnético.
11. Centrifugar a 3200 g durante 10 min. y lavar el sedimento (x2) en solución salina al citrato trisódico.
12. Volver a suspender en solución salina al citrato trisódico con 0,4% de formaldehído hasta obtener el mismo volumen que en (10).
13. Almacenar a 4°C, protegido de la luz. **NO CONGELAR.**

#### **Procedimiento para efectuar la prueba de aglutinación directa (DAT)**

1. **Utilizar placas para microtitulación** con hoyos en forma de «V», **no** de «U». Preparar las placas de microtitulación: numerar las placas, llenar el formulario correspondiente con el número de placa, la fecha y el código de la muestra.
2. Diluir el suero por examinar a 1/100 con la solución salina al citrato trisódico/suero fetal de ternera/2-mercaptoetanol. Incubar a 37°C durante 30 min.
3. En una placa de microtitulación de 12 filas, depositar con una pipeta 50 µl de diluyente en todos los hoyos salvo en el segundo.
4. En el segundo hoyo, depositar con una pipeta 100 µl de la dilución al 1/100 del suero por examinar (véase el punto 1).

5. Transferir 50 µl del hoyo 2 al 3, mezclar y luego transferir 50 µl del hoyo 3 al 4. Continuar esta operación en la totalidad de la placa y desechar los 50 µl extraídos del hoyo 12 al final.
6. Incorporar sistemáticamente sueros testigo positivos y negativos en hoyos separados.
7. Batir suavemente la preparación de antígenos para que se forme una nueva suspensión de los organismos; depositar luego con una pipeta 50 µl en el hoyo 1 (sin suero de control). A continuación introducir con una pipeta 50 µl de antígeno en el hoyo 12; 50 µl de antígeno en el hoyo 11, y así sucesivamente hasta que todos los hoyos hayan recibido antígeno.
8. Cubrir la placa con una tapa o una película de plástico, agitarla en el sentido de giro de las agujas del reloj y en sentido contrario durante 60 segundos e incubar hasta el día siguiente a temperatura ambiente en posición horizontal, protegida de posibles golpes. Evitar cuidadosamente que el contenido de un hoyo pase accidentalmente a otro.

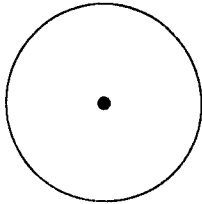
**Lectura de la prueba.** Colocar la placa de microtitulación sobre una hoja de papel blanco, o sobre una caja de color claro, y examinar la placa desde arriba. La placa debe someterse por separado al examen de dos lectores.

**Punto terminal.** Este se toma en el último hoyo donde se observe aglutinación, es decir en el anterior a aquél en que se observe claramente una mancha azul con bordes netos, como un «botón», en el fondo del hoyo, igual al que se observa en el hoyo de control sin suero (hoyo 1).

Suele considerarse que un título  $\geq 1/3200$  significa un resultado positivo para la LV humana (para la LV canina se utilizan a veces valores más bajos).

Las placas de microtitulación pueden volver a utilizarse después de haberse efectuado la prueba, a condición de que se laven bien con dodecil sulfato de sodio, se enjuaguen suficientemente con agua destilada y se dejen secar al aire. En lo posible, es mejor utilizar placas nuevas.

**Figura:**



**NEGATIVO:**

Punto azul oscuro, del mismo tamaño que el antígeno control

**POSITIVO:**

Tamaño de la aglutinación mas grande que la del antígeno control (Desde un velo difuso hasta el tamaño de un punto)

