

APENDICE 9

Prueba de inmunosorción enzimática (ELISA) para la detección de anticuerpos contra *Leishmania*

Reactivos

Solución tampón para revestimiento (STR)

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,93 g
NaN ₃	0,2 g
Agua destilada	hasta llegar a 1 litro

(Puede prepararse con una concentración de 10 x para facilitar el almacenamiento.)

STR/2% de leche en polvo

STR	100 ml
Leche desnatada en polvo	2,00 g

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

(Puede prepararse con una concentración de 10 x para facilitar el almacenamiento prolongado.)

SSTF/0,05% de Tween (SSTF/T)

SSTF	99,95 ml
Tween 20	0,05 ml

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

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

Tampón de citrato-fosfato, pH 5,5

Solución A

Acido cítrico	2,1 g
Agua destilada	hasta llegar a 100 ml

Solución B

Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	3,5 g
Agua destilada	hasta llegar a 100 ml

Añadir 48,5 ml de la solución A a 51,5 ml de la solución B.

Solución de sustrato (para el conjugado de peroxidasa de rábano rusticano)

Hidrocloruro de orto-fenilendiamina	0,040 g
Tampón de citrato-fosfato, pH 5,5	100 ml
Peróxido de hidrógeno (3%)	30 µl

Preparación del antígeno para la prueba ELISA

Los promastigotes de *L. donovani*, *L. infantum* o *L. chagasi* cultivados en un medio líquido se recogen en la fase logarítmica en una concentración de aproximadamente 1×10^6 células/ml. El sustrato celular se lava (x 3), preferentemente a 4°C, con solución salina tamponada con fosfatos (SSTF) y se congela a -20°C. El sustrato celular congelado se descongela a temperatura ambiente y con él se prepara una nueva suspensión en agua destilada a 1:40 (v/v). Las células se rompen mediante congelación rápida en nitrógeno líquido y descongelación en agua a 37°C (x 3) y, en lo posible, se someten a la acción de ultrasonidos durante 15 segundos (x 5). Las células rotas se centrifugan a alta velocidad (por ejemplo, 10 000 g) durante 15 minutos a 4°C, y el material sobrenadante se almacena congelado a -20°C para utilizar como antígeno de la prueba ELISA.

Revestimiento de los hoyos para la prueba ELISA

Se utilizan placas de microtitulación de poliestireno o placas semejantes, pero deben ser las recomendadas específicamente para ELISA. La dilución del antígeno utilizada para el revestimiento de los hoyos se determina mediante una titulación en damero utilizando diferentes diluciones del antígeno con sueros de control normales positivos y negativos y diferentes diluciones de prueba del conjugado. El antígeno se diluye en solución tampón de revestimiento de bicarbonato sódico 0,05 M con un pH de 9,6. Para revestir los hoyos, en cada uno se depositan 100 µl de antígeno diluido y se dejan a 4°C hasta el día siguiente. Los hoyos se lavan luego (x 3) con SSTF y se fijan con solución tampón de revestimiento/2% de leche en polvo durante una hora a 37°C, y se vuelven a lavar (x 3) con SSTF.

Realización de la prueba ELISA

Los sueros se diluyen a 1:200 en SSTF/T/L. Se efectúan diluciones ulteriores, por ejemplo duplicando la dilución si así lo requieren los títulos de los sueros. Se añaden 100 µl de diluciones de suero en cada uno de los hoyos revestidos con antígeno de una placa para ELISA de 96 hoyos. Las placas se incuban durante una hora a 37°C en una cámara húmeda y luego se lavan (x 3) con SSTF/T. Cada hoyo se llena inmediatamente con 100 µl de conjugado de inmunoglobulina G (H + L) antihumana monoclonal purificada por afinidad y peroxidasa, etiquetado con peroxidasa de rábano rústico o fosfatasa alcalina diluida a 1:1000 ó 1:2000 aproximadamente en SSTF/T/L; se incuban durante una hora a 37°C. La dilución óptima del conjugado se determina por titulación en damero. Para la LV canina se utiliza un conjugado de inmunoglobulina G (H + L) anticánina de conejo. Después de la incubación, las placas se vuelven a lavar (x 3) con SSTF/T y se añaden 100 µl de solución de sustrato. Las placas se dejan a temperatura ambiente durante 15 minutos en la oscuridad, después de lo cual se detiene la reacción añadiendo 50 µl de H₂SO₄ 2,5 M. Los resultados se leen en un lector de ELISA utilizando un filtro de 492 nm, no más de media hora después de haberse detenido la reacción. Todas las placas deben incluir sueros de control negativos y positivos. Las pruebas se realizan normalmente por duplicado. Las variaciones cotidianas de las condiciones de la prueba pueden ajustarse con una muestra de referencia positiva, de la siguiente manera:

(absorbencia de la muestra de prueba/absorbencia de la referencia positiva) x 1