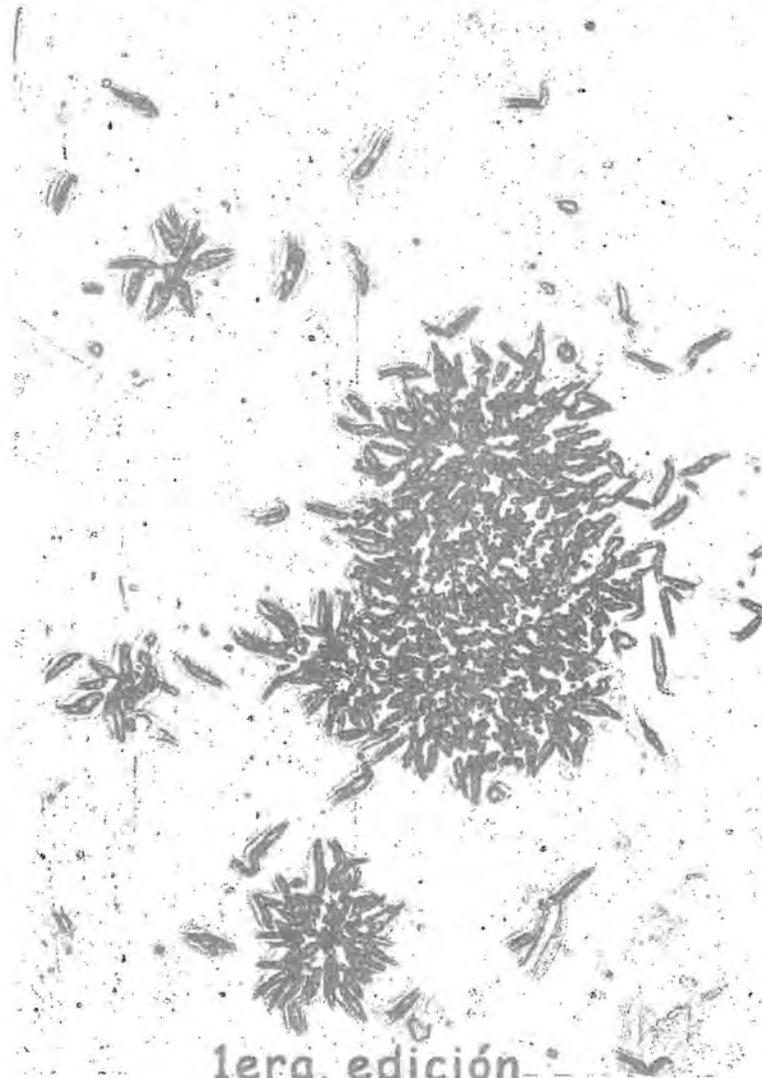


ADMINISTRACION NACIONAL DE LABORATORIOS E
INSTITUTOS DE SALUD "DR. CARLOS G. MALBRAN"

INSTITUTO NACIONAL DE PARASITOLOGIA
"DR. MARIO FATALA CHABEN"

Diagnóstico en Parasitosis

MANUAL DE LABORATORIO



1era. edición

1999

INDICE

	página
Autoridades	
Colaboradores	
1 - TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO	1
Extendidos hemáticos	1
Métodos de concentración de Strout	4
Microhematocrito	5
Nuevo método para la detección de <i>T. cruzi</i>	6
Xenodiagnóstico	6
Biopsia para histopatología y detección de Leishmania	9
Cultivo para diagnóstico	10
Inoculación en hamster para el diagnóstico de Leishmania	14
Técnicas para el diagnóstico de enteroparásitos	20
Técnicas para el diagnóstico de otros protozoarios de interés sanitario	30
2 - TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO INMUNOSEROLÓGICO E INMUNOCELULAR	36
Hemoaglutinación indirecta cuantitativa (HAI) para el diagnóstico de la infección por <i>T. cruzi</i>	36
Inmunofluorescencia indirecta cuantitativa (IFI) para el diagnóstico de la infección por <i>T. cruzi</i>	37
Inmunoensayo enzimático (IEE), ELISA, para el diagnóstico de la infección	42
Test de ISAGA (Detección de IgM) para el diagnóstico de la infección por <i>Toxoplasma aondii</i>	47
Preparación de antígenos para el inmunodiagnóstico de la toxoplasmosis	53
Doble difusión arco 5 (DD5) para el diagnóstico de la infección por <i>Echinococcus granulosus</i>	55
Inmunoensayo enzimático (ELISA) para el diagnóstico de la infección por <i>E. granulosus</i>	57
Western blot para el diagnóstico de la infección por <i>E. granulosus</i>	59
ELISA de captura para la detección de complejo inmune circulante para el diagnóstico de la infección por <i>E. granulosus</i>	64
Dor ELISA para detección de antígeno circulante para el diagnóstico de la infección por <i>E. granulosus</i>	66
Inmunoensayo enzimático (ELISA) para el diagnóstico de la infección por <i>Toxocara</i>	69

Western blot para el diagnóstico de la infección por <i>Toxocara</i>	73
Inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de la infección por <i>Toxocara</i>	75
Inmunoensayo enzimático (ELISA) para el diagnóstico de la infección por <i>Trichinella spiralis</i>	78
Reacción intradérmica de Montenegro para el diagnóstico de la infección por Leishmania	80
Test de microelisa para el diagnóstico de <i>Fasciola hepática</i>	81
Test de ELISA para el diagnóstico de <i>Fasciola hepática</i>	84
3- CONTROL DE CALIDAD DEL DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA INFECCIÓN POR <i>T. CRUZI</i>	87
4. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE USO CORRIENTE	93
Soluciones utilizadas en el diagnóstico de Leishmaniasis	93
Soluciones utilizadas en el diagnóstico de enteroparasitosis y otras protozoosis de interés sanitario	97
Soluciones utilizadas en el diagnóstico de hidatidosis, triquinosis y toxocariasis	107

MINISTERIO DE SALUD Y ACCION SOCIAL
Dr. Alberto Mazza

SECRETARIA DE PROGRAMAS DE SALUD
Dr. Víctor H. Marínez

SUBSECRETARIA DE ATENCION COMUNITARIA
Dra. Dora Vilar de Saráchaga

**ADMINISTRACION NACIONAL DE LABORATORIOS
E INSTITUTOS DE SALUD**
"Dr. Carlos G. Malbrán" (ANLIS)
Dra. Elsa L. Segura

INSTITUTO NACIONAL DE PARASITOLOGIA
"Dr. Mario Fatała Chabén" (INP)
Dr. Andrés M. Ruiz

Diagnóstico en Parasitosis

MANUAL DE LABORATORIO

Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatała Chabén" (ANLIS)

Primera Edición, 1999.

Editores: Manuel Alvarez, Andrés M. Ruiz.

Compaginación e impresión: Raúl Conforti

Diseño de tapa: Claudía Nose

COLABORADORES:

MANUEL ALVAREZ, Médico Parasitólogo Diplomado en Salud Pública (Universidad de Buenos Aires).

Director Asistente Técnico del INP.

JAQUELINE BÚA, Doctora en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires). Jefa de Servicio de Investigación del INP. Miembro de la Carrera del Investigador del CONICET.

ESTELA N. CURA, Bioquímica y Farmacéutica (Universidad de Córdoba), Centro Nacional de Control de Calidad de Biológicos (ANLIS)

ANA M. DE RISSIO, Bioquímica (Universidad de Buenos Aires). Jefa del Departamento de Diagnóstico del INP.

MÓNICA I. ESTEVA, Bioquímica (Universidad de Buenos Aires). Jefa del Departamento de Investigación del INP.

EDUARDO GUARNERA, Doctor en Medicina. (Universidad de Buenos Aires). Jefe del Departamento de Parasitología Sanitaria del INP.

LILIANA LATAPIÉ, Licenciada en Química (Universidad de Morón, Prov. de Bs. As.). Profesional del Departamento de Parasitología Sanitaria del INP.

CONCEPCION LUNA. Doctora en Ciencias Veterinarias (Universidad del Nordeste). Profesional del Departamento Patología. Clínica y Tratamiento del INP.

NORA MALAGRINO, Técnica del Departamento de Investigación del INP.

MIRIAM MARTÍN GARCÍA. Bioquímica (Universidad de Córdoba). A cargo del Servicio de Inmunoserología del INP.

VIVIANA MOLINA. Bioquímica (Universidad de Buenos Aires). Jefa del Servicio de Desarrollo de Reactivos del INP.

ANALÍA C. PEREZ. Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires). Profesional de la Unidad de Epidemiología del INDIECH (hasta 1989).

ADA M. ROSENSTEIN DE CAMPANINI. Bioquímica y Farmacéutica (Universidad de Buenos Aires). Unidad Dirección Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos G. Malbrán".

ANDRES M. RUIZ. Doctor en Ciencias Químicas (Universidad de Buenos Aires). Director del INP. Miembro de la Carrera del Investigador del CONICET.

OSCAR DANIEL SALOMON. Doctor en Ciencias biológicas (Universidad de Buenos Aires). Director a cargo del Centro Nacional de Diagnóstico e Investigación de Endemoepidemia (CENDIE). Miembro de la Carrera del Investigador del CONICET.

ELSA L. SEGURA. Doctora en Bioquímica y Farmacia (Universidad de Buenos Aires). Directora Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos G. Malbrán" (ANLIS).

GRACIELA SANTILLÁN. Bioquímica (Universidad de Buenos Aires). Jefa del Servicio de Inmunología del INP.

ANGEL SINAGRA. Médico Veterinario (Universidad de La Plata). Jefe del Servicio de Patología del INP.

1 - TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

EXTENDIDOS HEMÁTICOS

Materiales: Algodón

Lancetas estériles

Toallas de papel, papel de filtro o pañuelos de papel Tisú.

Portaobjetos.

Etanol.

Lápiz de grafito.

Procedimiento:

1 - Tomar la mano izquierda del paciente, con la palma hacia arriba y sujetar el dedo anular (en lactantes puede usarse el dedo gordo del pie). Nunca debe hacerse la toma de muestra en el pulgar, ni en adultos ni en niños.

2 - Limpiar el dedo con una torunda de algodón empapada en alcohol, frotando enérgicamente, para eliminar la suciedad y la grasa del mismo. Secar el dedo con el pañuelo de papel, con movimientos enérgicos para estimular la circulación sanguínea.

3 - Con una lanceta estéril hacer la punción en la cara lateral del dedo (nunca en la yema), presionando el extremo del mismo y con golpe seco se punza hasta suficiente profundidad de la lanceta (tope de la lanceta) para que la sangre vierta libremente con suave presión.

4 - Presionar ligeramente el dedo y descartar la primera gota de sangre limpiando la zona con papel de filtro o pañuelo de papel. Presionar nuevamente el dedo y colocar la gota de sangre en el centro de un portaobjetos (esta gota servirá para realizar el extendido

hemático); en el otro extremo de la lámina de vidrio se realizará la gota gruesa.

Frotis en sangre

5 - Con otro portaobjetos limpio (extensor) y de borde liso contactar en forma inclinada (aproximadamente 45°) la gota de sangre y dejar que la sangre se extienda por el borde de éste.

6 - Deslizar con firmeza el extensor y realizar un frotis de sangre en uno de los extremos del portaobjetos y secar rápidamente al aire.

Gota gruesa

7 - En la mitad libre del portaobjetos en el que se realizó el extendido, colocar una nueva muestra de sangre de mayor volumen, en el centro de ésta mitad.

8 - Sin retirar el portaobjetos de la superficie del dedo del paciente realizar movimientos circulares y en espiral agrandando el diámetro de la muestra (aproximadamente 2 cm) durante 1 a 2 minutos para desfibrinar y concentrar los posibles parásitos.

9 - Dejar secar la gota gruesa en posición.

10 - Una vez seca la muestra se procede a su identificación con el lápiz de grafito. No utilizar bolígrafo, ni tinta, ni marcador de fibra sobre la parte gruesa del extendido.

NOTA:

1 -La gota gruesa se puede realizar, efectuando movimientos circulares, en la gota de sangre con el borde de otro portaobjetos o con la lanceta usada en la punción.

2 -Se aconseja dejar secar perfectamente bien la muestra para evitar que la muestra se desprenda durante la coloración.

3 -Recuerde siempre que una buena coloración requerirá que la muestra esté seca, lo cual no significa "reseca". Si no puede observar las muestras inmediatamente guardelas ya coloreadas.

4 -Estas muestras se examinan para la búsqueda de los siguientes parásitos: Plasmodio, Microfilarias, Trypanosoma, Leishmania.

Gota en fresco o extensión sanguínea húmeda

Materiales: Lanceta
Torundas de algodón
Portaobjetos
Cubreobjetos
Solución fisiológica
Etanol
Guantes.

Procedimiento:

- 1 - Realizar una punción con lanceta teniendo en cuenta las mismas consideraciones que para la toma de gota gruesa y extendido hemático.
- 2 - Recoger la primera gota de sangre que aparezca directamente en el centro de] portaobjetos.
- 3 - Agregar una gota de igual tamaño de solución fisiológica.
- 4 - Mezclar la sangre y la solución fisiológica usando una esquina del cubreobjetos.
Cubrir con éste la preparación.
- 5 - Examinar todo el preparado con 10X y 40X.

NOTA: Estas preparaciones se utilizan para la detección de microfilarias y tripanosomas. El primer signo de la presencia de estos parásitos vivos es un movimiento rápido en los glóbulos rojos. Con esto se demuestra la existencia de parasitemia por lo cual son necesarias examinar muestras coloreadas para confirmar la especie de que se trata.

COLORACIÓN DE GIEMSA

Materiales: Bandeja con varillas de vidrio horizontales. Bloque de madera con ranuras para obtener portaobjetos. Probetas de 10 ml, 25 ml, 50 ml. Papel de filtro. Metanol. Colorante de Giemsa

Técnica: 1 - Realizar una dilución 1/10 o 2/10 del colorante de Giemsa con agua destilada. 2 - Homogeneizar y filtrar. 3- Fijar los extendidos e improntas con metanol durante un minuto. 4 - Cubrir los preparados con la solución colorante diluida y filtrada. Dejarlos por 20 minutos. 5- Lavar con agua corriente, dejar secar y observar por inmersión a 100x.

MÉTODO DE CONCENTRACIÓN DE STROUT

Materiales Microscopio común
 Jeringas de 10 ml
 Agujas estériles 25/8
 Tubos de centrifuga
 Centrífuga de mesa
 Portaobjetos
 Cubreobjetos 22 x 22 mm
 Ansas microbiológicas

Procedimiento:

- 2- Extraer 10 ml de sangre venosa, sin anticoagulante.
- 3- Dejar coagular y retraer el coágulo espontáneamente.
- 4- Separar el suero.
- 5- Centrifugar este suero a 160 G (800 rpm) durante 2 minutos para descartar los glóbulos rojos que pudieran quedar pues interfieren en la lectura.
- 6- Centrifugar nuevamente el sobrenadante a 300-600 G (2000-2500 rpm) durante 10 minutos.
- 7- Separar el sobrenadante (suero) y guardarlo para estudios serológicos.
- 8- Observar el sedimento obtenido en el punto 5 entre porta y cubreobjeto en el microscopio con objetivos 20x o 40x de aumento; es aconsejable observar cuidadosamente varias preparaciones (seis a ocho), en busca de formas móviles del parásito.

NOTA: Este procedimiento permite aprovechar en una única extracción de sangre, el suero para practicar el inmunodiagnóstico y el sedimento donde se efectúa la búsqueda del *Trypanosoma cruzi*. Es una técnica simple y de buena sensibilidad en casos agudos de Enfermedad de Chagas y en el seguimiento de congénitos.

MICROHEMATOCRITO

Materiales: Capilares heparinizados para microhematocrito

Portaobjetos

Cubreobjetos

Lancetas

Etanol

Algodón

Papel de filtro o pañuelos de papel

Metanol

Giemsa

Procedimiento

- 1 - Recoger la sangre en los capilares para microhematocrito.
- 2 - Tapar el extremo inferior del capilar con masilla, plastilina o jabón.
- 3 - Centrifugar a 1000-1500 r.p.m. durante 3 a 5 minutos.
- 4 - Fracturar el capilar en el límite de la capa leucocitaria
- 5 - Depositar sobre un portaobjetos la capa de leucocitos y plasma y cubrir con un cubreobjetos.
- 6 - Examinar al microscopio con 10x y 40x recorriendo íntegramente la preparación.

NOTA: Se aconseja efectuar un mínimo de 8 microhematocritos por paciente.

NUEVO MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE *T. CRUZI*

Para el nuevo "micrométodo" se utiliza un tubo Eppendorf de 1.5 ml de capacidad, al que se le agrega una gota de heparina más 0.5 ml de sangre venosa, se mezcla por inversión y se centrifuga durante dos minutos a 3.000 rpm. Se toma una gota de la interfase, rica en glóbulos blancos, y se observa entre porta y cubreobjeto al microscopio con 400 aumentos. Se aconseja realizar como mínimo cuatro preparados por muestra a estudiar.

La eficiencia de los métodos parasitológicos está dada por la elección adecuada del mismo y la dedicada observación microscópica del observador. Como es sabido, la detección precoz de la infección chagásica en recién nacidos es de relevante importancia para asegurar el éxito terapéutico, por lo cual debe disponerse de métodos parasitológicos sencillos que utilicen poco volúmen de sangre debido a la población que va dirigida, de fácil y rápida ejecución, sensibles y que permitan cumplir con las Normas de Bioseguridad en el Laboratorio. El nuevo método cumple con estos requisitos. Cabe destacar, en la aplicación de este tipo de método, que la disminución de la sensibilidad está asociada a la edad del paciente.

XENODIAGNÓSTICO

Materiales:

Insectario. La necesidad de disponer de grandes cantidades de ninfas biológicamente constantes obliga a disponer de un criadero de insectos. Para asegurar la ausencia de infección, los insectos son alimentados sobre aves, animales no infectables con *T. cruzi*.

Cajas especiales para insectos según modelo de Schenone.

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Mario Fatsia Chabén"

Brazaletes para sujetar las cajas de xenodiagnóstico.

Microscopio.

Estufa a 30° C con 60% de humedad.

Vidrio de reloj.

Portaobjetos y cubreobjetos de 22 x 22.

Mechero de Bunsen.

Pinzas de disección con punta curva.

Guantes de cirugía.

Máscara de protección.

Solución fisiológica en frasco gotero.

Procedimiento:

- 1 - El *Triatoma infestans* a utilizar debe tener un ayuno previo no menor de 10 días. Es aconsejable emplear la especie de triatomino responsable de la transmisión en la región.
- 2 - En cada xenodiagnóstico para adultos se deben emplear 4 cajas conteniendo 10 ninfas de 3° estadio cada una. Para bebés y niños hasta 5 años; una caja con 10 ninfas.
- 3 - Rotular las cajas indicando nombre del paciente y fecha de aplicación.
- 4 - Aplicar las cajas durante 30 minutos sobre la piel desnuda del brazo, antebrazo o pierna del paciente en reposo e inmóvil.
- 5 - Realizar la observación de los insectos empleados en cada xenodiagnóstico por exámen del contenido intestinal de las ninfas a los 30 y 60 días posteriores a la aplicación de las cajas.

El contenido intestinal se obtiene por 3 métodos distintos:

- a) Por compresión: Comprimir suavemente con las pinzas el abdomen de cada insecto a fin de obtener una gota de materia fecal. Con las 10 ninfas de cada caja efectuar un "pool" de sus contenidos intestinales, sobre un vidrio de reloj, con algunas gotas de solución fisiológica.
- b) Por disección: Obtener la ampolla rectal del insecto mediante tracción, con una pinza de

punta fina. Puede ser en forma individual o en "pool".

c) Por licuados: Licuar los insectos de cada caja, previa suspensión en solución fisiológica y centrifugar a 2000 G durante 30 minutos para obtener los tripanosomas en el sedimento.

De los tres métodos, el más simple es el que se realiza por compresión, por lo que se lo usa rutinariamente.

NOTA: Observar, entre porta y cubreobjetos, una gota de la suspensión obtenida por cualquiera de los métodos antes mencionados, con un objetivo de 20x o 40x de aumento. El xenodiagnóstico es el método parasitológico más sensible para el reconocimiento de la Enfermedad de Chagas aguda (100% de sensibilidad), aventajando a todos los demás métodos directos. En la etapa crónica sólo permite detectar parasitológicamente menos del 50% de los infectados.

Los aspectos negativos del xenodiagnóstico son: mantenimiento de un insectario, elevado número de insectos (sobre todo en la etapa crónica), inversión considerable de tiempo para la lectura, demora en la obtención de resultados, etc. No obstante sigue siendo de indicación en los siguientes casos:

a) Casos agudos: En la etapa preserológica, con antecedentes clínico-epidemiológicos y cuando los demás métodos parasitológicos directos efectuados reiteradamente resulten negativos. La demora de los resultados podrá obviarse realizando la observación parcial y periódica de los insectos (2 a los 7 días, 2 a los 14 días, etc.). Deberá tenerse en cuenta que la búsqueda de parásitos circulantes por cualquiera de los métodos parasitológicos se realizará luego de un período de 5 a 7 días de producido el contacto infectante.

b) Facilita y certifica el reconocimiento de casos de infección chagásica producidos por vía transplacentaria, accidente transfusional, transplante de órganos y accidentes de laboratorio.

BIOPSIA PARA HISTOPATOLOGIA Y DETECCIÓN DE LEISHMANIA

Materiales y Reactivos:

- Sacabocado (punch) diámetro 4 mm estéril.
- Equipo de pequeña cirugía (tijeras y pinzas iris atraumáticas)
- Gasa estéril
- Láminas portaobjeto.
- Frascos o bolsa con formol al 10%
- Xilocaína al 2% sin epinefrina.
- Jeringa para inyectar la xilocaina
- Guantes
- Percloruro de hierro
- Aplicadores estériles
- Alcohol 70%

Procedimiento:

- 1 - Desinfectar el borde de la lesión con alcohol.
- 2 - El sitio para tomar la biopsia deber ser uno de los dos bordes más prominentes pero que tenga menos costra o infección agregada.
- 3 - Inyectar 0,5 a 1,0 ml de xilocaína sin epinefrina en la dermis cerca de donde se tomará la biopsia.
- 4 - Tomar la biopsia insertando el sacabocado en el borde de la lesión, teniendo cuidado de que incluya tanto borde de la úlcera como piel sana. El sacabocado se rota varias veces.
5. Retirar el sacabocado y cortar la base del cilindro de piel que se obtiene, sin maltratar la biopsia.
6. Colocar la biopsia sobre una gasa y limpiar el exceso de sangre.
7. Hacer impresiones de la biopsia sobre un portaobjeto. Se deja secar y se procesa igual que el examen directo (frotis).

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Mario Fatala Chabén"

8. Colocar la biopsia dentro de formol 10%. No olvidar identificar claramente el frasco con los datos del paciente.
9. Para detener la hemorragia que a veces se produce, aplicar percloruro de hierro en el sitio donde se obtuvo la biopsia.

CULTIVO PARA DIAGNÓSTICO

Cultivo de biopsia

Materiales: Además de los materiales mencionados para ser utilizados en biopsia para histopatología, se necesitan:

- Triturador de tejido estéril
- Jeringa de tuberculina
- Tres tubos con medio de Senejkie
- PBS + Antibiótico.

Procedimiento:

- 1 - Se toma una biopsia con sacabocado de igual forma a la descrita anteriormente.
- 2 - Al retirar el cilindro de piel obtenido con el sacabocado, se coloca inmediatamente en un tubo que contenga 1 ml. de PBS + antibiótico. Se guarda así el tejido en la heladera durante aproximadamente dieciocho a veinticuatro horas para que el antibiótico actúe sobre la flora bacteriana normal de la piel.
- 3 - Cambiar el tejido a PBS + antibiótico fresco durante dos horas.
- 4 - Transferir el tejido a un triturador estéril, utilizando técnica aséptica. Se tritura el tejido durante un minuto.
- 5 - Con la jeringa de tuberculina se recoge cuidadosamente la suspensión obtenida.

6 - Se inoculan 0,2 ml de suspensión en cada tubo con medio de Senekjie. Estos deben mantenerse en incubadora a una temperatura entre 24 v 27° C.

7 - Se inoculan intradérmicamente en la nariz de dos hámsters, cada uno con 0,1 ml. de la suspensión.

Hemocultivo

El hemocultivo, como método de diagnóstico parasitológico en la Enfermedad de Chagas, es una técnica más sencilla que el xenodiagnóstico y puede efectuarse en un laboratorio que realice bacteriología de rutina. La sensibilidad en los casos agudos, es equivalente a la del xenodiagnóstico.

- Materiales**
- Estufa de cultivo regulable a 28-30° C
 - Centrífuga con cabezal para tubos de 15 ml y 50 ml
 - Tubos de ensayo, preferentemente con tapa a rosca y contratapa de teflón.
 - Microcopio óptico
 - Tubos de centrifuga con tapa esterilizables
 - Jeringas estériles de 20 ml
 - Agujas hipodérmicas estériles 25/8
 - Pipetas automáticas
 - Erlenmeyers estériles de 250 ml
 - Portaobjetos de no más de 1.2 mm de espesor
 - Cubreobjetos de 22 x 22mm
 - Gradillas para tubos de ensayo
 - Medios de Cultivo (BHI al 10 % con suero fetal bovino)
 - Anticoagulante (heparina)

Técnica

Extracción de sangre:

Se realiza por punción venosa previa esterilización del campo con antiséptico y utilizando como anticoagulante heparina en una concentración de 0.1 ml para 10 ml de sangre.

Siembra de material:

Poner a temperatura ambiente los medios de cultivo guardados en heladera.

Sembrar la sangre colocando en forma estéril 1 ml de sangre total a cada tubo de medio de cultivo. Por cada paciente utilizar 10-20 tubos de acuerdo al volumen de sangre que se ha podido obtener.

Incubación:

Guardar el material sembrado en estufa de cultivo a 27-30°C hasta el momento de la observación. Agitar cada 24-48 horas.

Lectura:

Hacer la lectura de los tubos de cultivo semanalmente a partir del décimo día.

a) En fresco entre porta y cubreobjeto y b) Previa coloración con Giemsa.

Para la lectura:

a) Extraer el material con una pipeta Pasteur o con un ansa bacteriológica barriando la superficie de la interfase que se observa entre el medio y los glóbulos sedimentados.

b) Colocar una gota de este material entre porta y cubreobjeto. Colocar otra gota de este material, realizando un extendido con el mismo ansa, en otro portaobjeto limpio; fijarlo con alcohol metílico 3 minutos y colorear con Giemsa.

c) Observar en microscopio.

Subcultivos:

A los 15 días repicar a ciegas los cultivos en medio fresco, para acelerar la adaptación de los parásitos al medio, pasando 0.5 ml del cultivo previamente agitado, al medio de repique.

Resultados:

Se da como positivo el hemocultivo cuando aparecen formas móviles en la preparación en fresco o formas típicas coloreadas con Giemsa (elementos celulares aislados o en acúmulos con citoplasma azul claro, núcleo y cinetoplasto de color rojo). La positividad se observa alrededor del mes, los casos negativos se observarán hasta los tres meses, al cabo de este tiempo, se debe efectuar el centrifugado de todo el material y leer el sedimento antes de dar el informe final.

Cultivo de *P. falciparum*

Los estadios de plasmodium que se desarrollan en el hospedador vertebrado son los estadios del ciclo exoeritrocítico y los del ciclo eritrocítico, a los cuales nos referiremos. Estas formas asexuales pueden ser utilizadas para la producción de antígenos una vez que han sido aisladas del organismo y adaptadas las condiciones de cultivo. Trager y Jensen en el año 1976 lograron desarrollar un sistema de cultivo continuo "*in vitro*" para las formas asexuales de *P. falciparum*, pero se ha tenido poco éxito con otras especies. Este método consiste en establecer una capa de glóbulos rojos frescos capaces de resistir infección de los parásitos, suplida diariamente de medio frasco para permitir el desarrollo. Se deben establecer subcultivos cuando los niveles de parasitemia son altos. Este sistema se realiza en placas de Petri y requiere de una atmósfera pobre de oxígeno. Las placas de Petri se incuban a temperaturas de 37°C para su desarrollo. Una observación interesante es que mientras en la naturaleza los mecanismos de desarrollo del ciclo eritrocítico, respetan una cronobiología estricta, esa sincronía, se pierde en los cultivos "*in vitro*" observándose entonces al mismo tiempo la presencia de anillos, trofozoitos, esquizontes maduros y raramente la presencia de gametocitos. Estos no desarrollan bien en cultivo "*in vitro*" y suelen ser el índice de un cultivo deteriorado por falta de nutrientes o viejo.

INOCULACIÓN EN HAMSTER PARA EL DIAGNOSTICO DE LEISHMANIA

1. Tomar un aspirado como se describe anteriormente.
2. Anestesiar el hámster con éter. Limpiar con alcohol el área donde se va a inocular el hámster (nariz, dorso de la pata.)
3. Introducir la jeringa de tuberculina con el aspirado, intradérmicamente, e inocular el líquido.
4. Marcar el hámster y registrar los datos.
5. Revisar los hámster semanalmente, registrando: pérdida de pelo, inflamación, nódulos, costras, tamaño y apariencia de la lesión, aparición de metástasis en cola o patas.
6. Periódicamente hacer un frotis de la lesión.

DIGESTIÓN ARTIFICIAL PARA LA DETECCIÓN DE TRICHINELLA SPIRALIS

Procesar el material a digerir

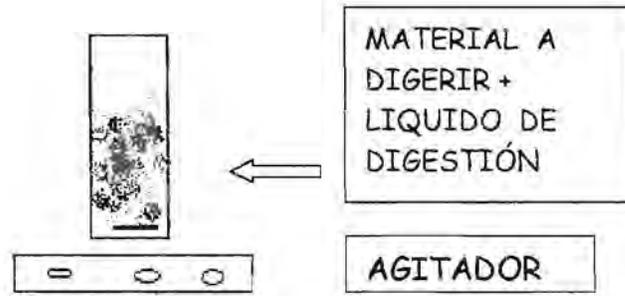


Cada 100gr. de Tejido
digerir en 1 lt. de fluido gástrico



1% Pepsina 1:10000
1%CL H v/v
H₂O destilada
precalentada a 37°

Agitación permanente a 37° C
3 - 4 horas



Volcar a probeta o ampolla
Dejar sedimentar 15' a 20'



Aspirar el fluido sin mover el sedimento



Agregar Sc fisiológica y dejar sedimentar 15' a 20'
Remover el Sobrenadante



Repetir el paso de lavado hasta clarificar el precipitado



Contar el nº de larvas en un volumen conocido

Nº de larvas / gr. de material

DETECCIÓN DEL ADN DEL *T. CRUZI* POR LA TÉCNICA DE PCR (REACCIÓN EN CADENA POR LA ENZIMA ADN POLIMERASA)

Esta técnica permite la replicación de ADN in vitro, involucra la síntesis de millones de copias de un segmento específico de ADN. La reacción consiste en ciclos repetitivos de desnaturalización, hibridación de dos primers oligonucleótidos específicos y extensión del ADN por la enzima ADN polimerasa. Luego de varios ciclos el producto final es una acumulación exponencial de fragmentos de ADN, que pueden ser visualizados en un gel de agarosa con bromuro de etidio, lo que asegura una sensibilidad superior a cualquier técnica parasitológica, ya que posibilita la detección del parásito, aún habiendo sólo un 25 % del ADN de un solo organismo, en una muestra sanguínea de un paciente infectado.

Para esta técnica se utilizan primers o iniciadores de la síntesis de ADN, 121 y 122 (Gomes, ML et al. Exp. Parasitol. 1998 Jan, 88(1):28-33), que amplifican un ADN de kinetoplasto de 330 pares de bases (bp).

Las muestras de sangre son conservadas con Guanidina 6 M y EDTA 0.2 M pH 8.00 al 50

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Mario Fatała Chabén"

% facilitando de este modo la conservación de las muestras extraídas en el campo. Las muestras se conservan a 4 grados. La extracción de ADN se realiza por los métodos convencionales.

La reacción de PCR se realiza en un volumen de 25 microlitros, con 200 μM dNTPs, 20-50 pmoles de cada primer, el buffer standard para PCR y 2.5 U de enzima Taq Polimerasa.

La visualización se efectúa por Bromuro de Etidio en gel de agarosa al 3% con 1/5 del material amplificado.

Materiales

Reactivos para la extracción de ADN de muestras de sangre humana

Guanidina 6 M, EDTA 0.2 M pH 8.0

Fenol equilibrado

Cloroformo: alcohol isoamílico = 24:1

Fenol - Cloroformo: alcohol isoamílico= 1:1

TE: Tris -HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8

Acetato de sodio 3 M, pH 5,2

Etanol Absoluto y 70 % Etanol.

Fenol equilibrado:

El Fenol se equilibra con Tris 1 M pH=8 esterilizado + beta-mercaptoetanol (optativo) 0,2 %. Se hace una mezcla 1:1 Fenol:Tris luego se centrifuga, se descarta la fase acuosa y se repite una vez más este proceso. Se deja durante toda la noche con Tris 0.1 M pH8 a 4 °C. El pH final debe ser aproximadamente 7.6. Antes de usar el fenol se retira el Tris.

Reactivos para la reacción de PCR:

Agua pura filtrada , 18 Ohm.

Taq polimerasa 2.5 - 5 U

Primers que codifican para un ADN de kinetoplasto del *T. cruzi*.

121 5' - AAATAATGTACGGG(T/G)GAGATGCATGA - 3' 44 pm

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Mario Fatała Chabén"

122 5' - GGTTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA - 3' 44 pm

dNTP (deoxynucleosido trifosfato) 200 μ M c/u

buffer 10 x (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCL pH 9.0,)

mM MgCl₂, 3.5 mM

Reactivos para la electroforesis en gel de Agarosa:

Agarosa

Buffer de corrida TAE: 0.04 M Tris-acetato, 0.002 M EDTA, pH 8.00

Sol. de siembra : Azul de Bromofenol 0,25%, Glicerol 30 %)

Procedimiento:

Extracción de ADN de muestras de sangre:

- 1 - Sangre / Guanidina-EDTA (6M-0.2M) pH 8 (1 : 1)
- 2 - Hervir 15 minutos en baño de María, dejar enfriar.
- 3 - Trasvasar 200 μ l de la muestra a un tubo eppendorf y agregarle 200 μ l de una mezcla 1: 1 de fenol/cloroformo-alc.isoamílico (24:1). Agitar bien antes de agregar a cada muestra.
- 4 - El fenol esta previamente equilibrado con TRIS 1M pH 8.
- 5 - Vortexear 5 seg. , centrifugar 10 minutos a 14000 rpm a temp. amb.
- 6 -Congelar a -70°C 10 minutos. Descongelar a 55 °C 10 minutos para disminuir la interfase.
- 7 - Centrifugar 10 minutos a 14 000 rpm.
- 8 - Trasvasar la fase acuosa a otro tubo. (tubo 2)
- 9 - Agregar 150ml de agua a la fase orgánica (tubo1), vortexear y centrifugar 10 minutos.
- 10 -Repetir el proceso de congelado y descongelado para reducir la interfase.
- 11 -Centrifugar 10 minutos a 14000rpm
- 12 -Transferir la nueva fase acuosa del tubo 1 adicionándola a la del tubo2.
- 13 -Agregar un volumen igual al total de la fase acuosa extraída de cloroformo-alc. isoamílico (24:1)

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Mario Fatale Chabén"

- 14 -Vortexear y centrifugar 10 minutos a 14000 rpm.
- 15 -Separar la fase acuosa y transferirla al tubo 3
- 16 -Agregar 10% de acetato de Na. del volúmen obtenido y tres volúmenes de etanol absoluto frio. Agitar suavemente por inversión y dejar precipitar durante 1 hora a 20°C.
- 17 -Centrifugar 20 minutos a 14000 rpm en centrifuga refrigerada.
- 18 -Descartar el sobrenadante, lavar el pellet con alcohol al 70%, centrifugar 10 minutos.
- 19 -Extraer el sobrenadante y secar el pellet.
- 20 - Resuspender en 50 µl de agua. Llevar a 37°C hasta la disolución del ADN obtenido.

NOTA: Trabajar en lugar aireado. Todo el material en contacto con Fenol debe ser aislado para descartarlo adecuadamente. El Fenol es Tóxico en contacto con la piel y por ingestión además provoca quemaduras.

Reacción de PCR

ADN:1/10 del ADN humano aislado
H₂O pura estéril 8.75 µl
Buffer Taq. 10x 2.5 µl
MgCl₂ 25 mM 3.5 µl
dNTP (2mM) 2.5 µl
Primers (20 mM) 2.5 µl c/u
ADN Taq. Polimerasa 0.25 µl
ADN Humano 2.5 µl
Volumen Total 25 µl

Perfil de amplificación:

Inicio	94 °C	4 minutos
	68 °C	2 minutos
Desnaturalización	94 °C	1 minuto

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS – I.N.P. "Dr. Mario Fatała Chabén"

Hibridación primer	68 °C	1 minuto
Extensión	73°C	1 minuto
Extensión final	73°C	10 minutos
Mantenimiento	4°C	

Nro de ciclos : 30

Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR

- 1- Preparar un gel de agarosa 3% en buffer TAE 0.5 x
- 2- Enfriar hasta 60°C y agregar bromuro de etidio, 0.5 µg/ml
- 3- Colocar el gel de agarosa en la cuba de electroforesis hasta que solidifique.
- 4- Sembrar 10 µl del producto de la amplificación y 2 µl de colorante de corrida. Evite la contaminación de las calles durante la siembra.
- 5- Correr a 150 volts durante 20 minutos.
- 6- Visualizar los productos de PCR mediante un trans-iluminador con luz ultravioleta.

TÉCNICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENTEROPARASITOS

Métodos de recolección

Recolección seriada de materia fecal

Materiales: Frasco de boca ancha con tapa a rosca.
Solución salina formolada al 5%

Procedimiento:

- 1 - Recolectar una muestra de materia fecal recién emitida del tamaño de una cucharita de

café, en un recipiente limpio y seco, evitando la contaminación con orina (**no** de inodoro).

NOTA: En pacientes en edad pediátrica que usan pañales las muestras deben tomarse de las nalgas nunca del pañal.

- 2 - Colocar la muestra recogida en el frasco con solución salina formolada al 5%.
- 3 - Proceder de la misma manera durante 6 días seguidos o en un lapso no mayor de 15 días siempre respetando un total de 6 muestras una vez al día.
- 4 - Durante el período de recolección tener el frasco a resguardo del calor, a temperatura ambiente o en heladera (4°C) si fuera necesario.
- 5 - Una vez efectuada la recolección enviar el frasco al laboratorio debidamente identificado.

NOTA: Se recomienda realizar la recolección en zonas con partes blandas, moco, pus o sangre, si los hay.
No ingerir durante las mismas sustancias opacas para exámenes de rayos X.

Recolección de materia fecal para examen directo o fresco

Materiales: Frasco de boca ancha con tapa a rosca
Solución Ringer o fisiológica

Procedimiento:

- 1 - Recolectar una muestra de materia fecal recién emitida del tamaño de una cucharita de café, en un recipiente limpio, seco y evitando la contaminación con orina (**no** del inodoro).

NOTA: En pacientes en edad pediátrica que usan pañales las muestras deben tomarse de las nalgas, nunca del pañal.

- 2 - Colocar la muestra recogida en el frasco con solución fisiológica.
- 3-Enviar el frasco al laboratorio lo más pronto posible, en un lapso no mayor de 3 horas.

Recolección en PVA

Materiales: Frasco de boca ancha
Solución fijadora de alcohol polivinílico

Procedimiento:

- 1 - Las muestras fecales deberán recolectarse en recipientes limpios de boca ancha y no deberán estar contaminadas con agua u orina.
- 2 - Colocar aproximadamente 1/2 a 1 cucharada de muestra líquida o una cantidad del tamaño de una uva si la muestra de materia fecal es forada en un frasco con 7 a 9 ml de PVA.
- 3 - Mezclar bien la muestra y el PVA. Mantener a temperatura ambiente hasta su exámen.
- 4 - Los trofozoitos, quistes, huevos y larvas en él fijados de PVA permanecen un período de semanas o meses antes del procesamiento.

Instrucciones para la recolección:

Recolectar 3 muestras separadas de heces en días alternando (una muestra cada 2 días)

Ej.: lunes, miércoles y viernes.

Los frascos que contienen el PVA serán numerados 1,2 y 3.

Después de recolectar la última muestra (3er. día), enviar los frascos al laboratorio.

NOTA:La solución de PVA contiene una gran cantidad de mercurio por razones de seguridad y protección del paciente, rotular cada frasco con la palabra VENENO.

Recolección de muestras de la zona perianal

Hisopado o Escobillado Anal:

Materiales: 5 ó 6 hisopos o gasas (de 10 x 10 cm)
Frasco de boca ancha con tapa a rosca.
Solución salina formolada al 5%

Procedimiento:

- 1 - Realizar la toma de muestra por la mañana al despertar al paciente previo a que defaque o realice su higiene.
- 2 - Separar las nalgas del paciente y frotar suavemente con el hisopo o gasa sobre la superficie y en los pliegues perianales, colocando esta en el frasco con solución salina formolada al 5%.
- 3 - Repetir esta operación en días consecutivos con los hisopos o gasas restantes.
- 4-Una vez efectuada la recolección enviar la muestra al laboratorio para su exámen.

Test de Graham-Garaguso o método de la cinta adhesiva transparente:

- Materiales:** 5 ó 6 portaobjetos con cinta adhesiva transparente (tipo cinta scotch), de 2 cm de ancho colocada a lo ancho de los mismos.
Bajalenguas de madera o cuchara de plástico.

Procedimiento:

- 1 - Realizar la toma de muestra por la mañana al despertar el paciente, previo a que defaque o efectúe su higiene.
- 2 - Despegar la cinta adhesiva transparente del portaobjetos y enrollarla en el extremo del mango de la cuchara o en el depresor lingual con la parte engomada hacia afuera.
- 3 - Separar las nalgas del paciente y hacer presión con el extremo de la cuchara cubierto con la cinta en la zona perianal.
- 4 - Colocar nuevamente la cinta con la parte adhesiva sobre el portaobjetos.
- 5 - Repetir esta operación durante 4 ó 5 días más con los portaobjetos restantes.
- 6 - Una vez efectuada la recolección, enviar las muestras al laboratorio para su exámen.

NOTA: Este método de recolección se realiza en pacientes de edad pediátrica.

Técnicas de procesamiento

Método de Teleman modificado

Materiales: Solución salina formolada al 5%
Gasas
Embudos
Tubos de centrífuga
Pipetas Pasteur
Portaobjetos
Cubreobjetos
Varillas de vidrio
Éter
Solución de lugol

Procedimiento:

- 1- Homogeneizar con varilla de vidrio las heces fijadas en solución formolada.
- 2 - Filtrar a través de un embudo con una doble gasa en tubo de centrífuga.
- 3 - Agregar aproximadamente 2 ml de éter
- 4 - Centrifugar a 1000 - 1500 r.p.m. durante 3 a 5 minutos
- 5 - Eliminar con golpe seco el sobrenadante.
- 6 - Tomar con pipeta Pasteur una pequeña cantidad del sedimento y colocar en portaobjetos.
- 7-Agregar una gota de lugol y sellar con un cubreobjetos.

Método de flotación de Willis

Materiales: Frascos cilíndricos de 2,5 cm de diámetro y de 50 ml aproximadamente de capacidad.

Solución salina sobresaturada

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Mario Fatała Chabén"

Varillas de vidrio

Portaobjetos

Cubreobjetos

Procedimiento:

- 1- Colocar en el frasco una muestra de materia fecal del tamaño de un garbanzo o cubrir el fondo del mismo con un volumen de muestra previamente homogeneizada.
- 2- Llenar hasta la cuarta parte del frasco con solución salina sobresaturada y mezclar con varilla de vidrio hasta obtener una solución muy fina.
- 3- Colocar un portaobjetos sobre el borde superior del frasco y completar con la misma solución hasta que la película superficial haga contacto con el portaobjetos.

NOTA: Dilución final aproximadamente 1:10

- 4-Dejar la solución en estas condiciones de 10 minutos a una hora. Tiempo óptimo: 20 minutos.
- 5-Levantar rápida y verticalmente el portaobjetos, invirtiéndolo y colocar un cubreobjetos.
- 6-Observar al microscopio con bajo aumento (10x)

Método de recuento de huevos de Stoll

Materiales: Erlenmeyer de /Stoll
Solución de hidróxido de sodio 0.1 N
Varillas de vidrio
Tapones de caucho
Perlas de vidrio
Portaobjetos
Cubreobjetos de 22 x 40 mm

Procedimiento:

- 1 - Llenar el matraz de Stoll con la solución de NaOH 0.1 N hasta la marca inferior (56 ml).
- 2 - Añadir usando una varilla de vidrio una cantidad suficiente de heces, previamente homogeneizadas, hasta la marca superior (60 ml).
- 3 - Añadir 4 a 6 perlas de vidrio y cerrar el erlenmeyer con tapón de caucho.
- 4 - Agitar de arriba hacia abajo, durante 1 minuto.
- 5 - Tomar con pipeta graduada 0.15 ml del centro de la suspensión.
- 6 - Colocar la muestra en un portaobjetos y cubrir con un cubreobjetos de 22 x 40 mm
- 7 - Contar el número de huevos usando un objetivo de 10x y aplicar la siguiente

fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de huevos contados} \times 100 \times \text{FC} = \text{N}^{\circ} \text{ de huevos/Gr. de MF}$$

FC. Factor de corrección que depende de la consistencia de la materia fecal (MF) y será:

- 1 para MF sólidas
- 2 para MF normales o semisólidas
- 4 para MF diarreicas

NOTA:

- 1 - Es conveniente observar más de una preparación
- 2 - Generalmente se utiliza el factor de corrección (FC) igual a 4 y, a que se consideran heces diarreicas debido a la dilución por la solución conservadora y a la homogeneización realizada.

Métodos de coloración para microsporidios

Coloración tricrómica modificada:

- Materiales:
- Metanol
 - colorante Tricrómico modificado
 - alcohol ácido
 - etanol 95°
 - etanol absoluto

xilol

portaobjetos

aceite de inmersión

Procedimiento:

- 1 - Extender el material a colorear sobre portaobjetos y dejar secar.
- 2 - Fijar con Metanol y dejar hasta evaporación y secado.
- 3 - Teñir con el colorante Tricrómico modificado durante 90 minutos.
- 4 - Lavar con alcohol ácido por 10 seg.
- 5 - Enjuagar con alcohol 95° unos segundos.
- 6 - Colocar en alcohol 95° por 5 minutos.
- 7 - Sumergir en alcohol absoluto durante 10 minutos.
- 8 - Aclarar con xilol por 10 minutos.
- 9 - Dejar secar y observar por inmersión.

Resultados: Los esporos tienen un tamaño aproximado de 1.5 x 0.9 µm ovoides, refráctiles cuya pared se tiñe de color rojo rosáceo brillante. El contenido celular de algunos esporos no se tiñen y aparece transparente. Las bacterias y restos fecales se tiñen de color verde. Las levaduras aparecen color rojo intenso y de mayor tamaño.

Técnicas de coloración de amebas y otros protozoarios

Coloración tricrómica:

- 1 - Realizar un frotis de MF reciente que sin dejar secar se fijará con fijador de Sechaudinn o un frotis de MF conservada en PVA
- 2 - Colocar en etanol 70° durante 5 minutos.
- 3 - Colocar en etanol 70° con iodo de DAntoni durante 2 a 5 minutos.
- 4 - Colocar en etanol 70° durante 5 minutos. Repetir una vez más de 2 a 5 minutos.
- 5 - Colocar en colorante tricrómico durante 10 minutos.
- 6 - Colocar en etanol 90° acidificado con ACH al 1 % durante 3 segundos.

7 - Humedecer en etanol absoluto.

8 - Colocar en etanol absoluto durante 2 a 5 minutos. Realizar 2 nuevos cambios.

9 - Colocar en xilol o tolueno durante 2 a 5 minutos.

Resultado: La cromatina del núcleo toma una coloración rojiza, el citoplasma adquiere una coloración verde azulada, sobre un fondo verde.

Técnica de Bailenger:

1 - Depositar una gota de la suspensión de heces sobre un portaobjeto

2 - Mezclar con el ángulo de un portaobjeto una cantidad muy pequeña de reactivo tomado con una pipeta Pasteur muy finamente estirada.

3 - Colocar el cubreobjetos

4-Examinar con cuidado por inmersión (es necesario que haya muy poco líquido bajo el cubreobjetos).

Resultado: La coloración es inmediata. La rapidez con la cual alcanza su punto óptimo depende de la cantidad de reactivo que se ha utilizado. Con una muy pequeña cantidad se obtiene una coloración progresiva de mejor calidad.

La identificación de las amebas coloreadas es posible aún al cabo de varios días en las preparaciones selladas con barniz de uñas (o de una cola celulósica). Los quistes también se colorean tan bien como las formas vegetativas. Los citoplasma y los cristaloides se colorean en rojo, las estructuras nucleares resaltan en negro.

Los detalles citoplasmáticos aparecen con una finura comparable a la que se obtiene con las técnicas muy complicadas.

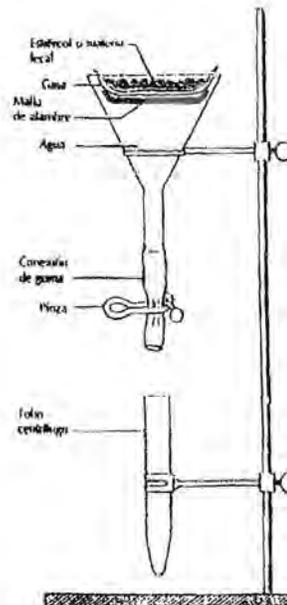
Técnica de Baermann para el diagnóstico de *Strongyloides stercoralis*

Esta técnica se utiliza para el hallazgo de larvas de *Strongyloides stercoralis* cuando su presencia en las heces es escasa. Es condición utilizar muestras frescas (sin conservador); y que las larvas presenten una movilidad considerable, ya que la técnica se fundamenta en la migración de las mismas desde la materia fecal hacia el agua tibia donde se concentran.

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Mario Fatała Chabén"

Desarrollo:

I - Armar el aparato según el esquema:



- 2 - Llenar el embudo con agua a una temperatura aproximada a los 45°C.
- 3 - Colocar sobre el embudo un colador o malla metálica, tapizado de 1 ó 2 capas de gasa o papel tipo tisú, que quede en contacto con el agua (no sumergido).
- 4 - Agregar la muestra de materia fecal sobre la gasa y dejar en reposo durante 2 a 3 horas.
- 5 - Abrir la pinza y recoger en un tubo de centrífuga 5 a 10 ml del sedimento acumulado.
- 6 - Centrifugar el tubo durante aproximadamente 5 minutos a 1500 r.p.m.
- 7 - Descartar el sobrenadante y buscar las larvas en el sedimento, con microscopio de luz.

Procesamiento de muestras en fijador de Schaudinn

Materiales: Fijador de Schaudinn
varilla de vidrio o palillo aplacador
portaobjetos
placas de petri.

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Marlo Fatała Chabén"

Procedimiento:

- 1 - Con muestras fecales recientes (exámen en fresco) realizar extendidos con una varilla de vidrio o palillo aplacador como para un extendido hemático o en zigzag.
- 2 - Evitar que la muestra se seque. Colocar el frotis sobre un soporte con la cara con la extensión hacia abajo, en el interior de una placa de petri y verter el fijador, cuidando de evitar la formación de burbujas de aire sobre el portaobjetos.
- 3 - Dejar actuar el fijador 30 segundos a 1 hora a temperatura ambiente (la extensión puede permanecer en el fijador incluso hasta 2 días, en caso necesario) ó 10 segundos en estufa a 50-60 °C.
- 4- Retirar el portaobjetos de la cápsula de petri. Escurrir el exceso de líquido tocando el borde del portaobjetos con papel secante.
- 5- Colocar los frotis en solución de alcohol iodado y proseguir a partir del paso 3 de la técnica de coloración tricrómico.

TÉCNICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE OTROS PROTOZOARIOS DE INTERÉS SANITARIO

Recolección de muestras de vías respiratorias

Materiales: Frasco de boca ancha con tapa a rosca
Solución de lugol u otro desinfectante

Procedimiento:

- 1 - Realizar una higiene bucal del paciente con una solución de lugol u otro desinfectante, seguido de un enjuague, para evitar una contaminación bucal de la muestra.
- 2 - Recolectar el material de la expectoración en un recipiente limpio y seco.

NOTA: Para *Pneumocystis carinii* es necesario obtener la muestra de esputo inducido con nebulizador ultrasónico.

Métodos de coloración para *Pneumocystis carinii*

Coloración rápida de metenamina-plata de Gomori-Grocott.

Materiales:

- solución de ácido crómico al 5%
- solución de bisulfito de sodio al 1 %
- solución de trabajo de metenamina-plata
- solución de cloruro de oro al 2%
- solución de tiosulfato de sodio al 2%
- solución de verde luz
- etanol 95°
- etanol absoluto
- xilol
- agua destilada
- portaobjetos
- jarras de coplin
- aceite de inmersión
- cubreobjetos
- bálsamo de Canadá

Procedimiento:

- 1 - Realizar un extendido en portaobjetos con el material a teñir y dejar secar al aire.
- 2 - Fijar con etanol absoluto durante 5 minutos o hasta evaporación del mismo.
- 3 - Colocar en bañomaría a 40°C una jarra de Coplin con solución de ácido crómico al 5% con las preparaciones ya fijadas durante 2 minutos, paralelamente, colocar otra jarra con solución de trabajo de metenamina-plata.

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Mario Fatała Chabén"

- 6 - Sumergir en bisulfito de sodio al 1% durante 30 segundos.
- 7 - Enjuagar en agua corriente durante 15 minutos.
- 8 - Enjuagar 4 veces con agua destilada.
- 9 - Sumergir los extendidos en la solución de metenamina-plata (cuya temperatura era de 48°C) durante 2 minutos.
- 10 - Pasar la jarra a baño de 56°C durante 25 a 30 minutos (controlar al microscopio óptico la intensidad de coloración: pardo oscuro preparaciones control, retirando las mismas sumergidas en agua destilada y dejando las muestras restantes en la solución de metenamina-plata en el baño).
- 11 - Enjuagar 4 veces las preparaciones en agua destilada.
- 12 - Contrastar con cloruro de oro al 0.2% durante 1 minuto.
- 13 - Enjuagar 2 veces en agua destilada.
- 14 - Sumergir en solución de trisulfato de sodio al 2% durante 1 minuto.
- 15 - Lavar en agua corriente durante 15 segundos.
- 16 - Contrastar con solución de verde luz durante 30 segundos.
- 17 - Enjuagar con agua destilada.
- 18 - Deshidratar con etanol 95° por un minuto y con etanol 100° durante 1 minuto.
- 19 - Aclarar con xilol.

Resultados: *Pneumocystis carinii* tendrá una pared ligeramente teñida, normalmente de color pardusco o grisáceo, casi transparente. Frecuentemente se observan las estructuras descritas como paréntesis teñidas en negro. El mucus será de color pardo grisáceo a gris oscuro. Los hongos están claramente recortados en negro, las zonas internas del micelio y las hifas, color rosáceo y el fondo color verde pálido.

Coloración de azul de toluidina o

- Materiales:
- etanol absoluto
 - reactivo de sulfatación
 - solución de azul de toluidina

etanol 95°
xilol
portaobjetos
jarras de inmersión
cubreobjetos
bálsamo de Canadá

Procedimiento:

- 1 - Extender el material a colorear en portaobjetos y dejar secar.
- 2 - Fijar con etanol absoluto hasta evaporación.
- 3 - Sumergir los preparados en el reactivo de sulfatación en una jarra de Coplin durante 5 minutos.
- 4 - Lavar con agua corriente durante 3 minutos.
- 5 - Colorear con solución de azul de toluidina en jarra de Coplin durante 5 minutos.
- 6 - Lavar con etanol 95° durante 10 segundos.
- 7 - Aclarar con xilol durante 10 minutos.
- 8 - Secar y observar con inmersión.

Resultados: Los quistes de *Pneumocystis carinii* se visualizan de color violáceo con forma navicular e irregular.

Coloración de Gram-Weigert

Materiales: metanol
solución de eosina
solución de cristal violeta
solución de iodo gram
aceite de anilina-xilol
xilol

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Mario Fatała Chabén"

portaobjetos
aceite de inmersión
cubreobjetos
bálsamo de Canadá

Procedimiento:

- 1 - Extender el material a colorear sobre portaobjetos y dejar secar.
- 2 - Fijar con metanol y dejar hasta evaporación y secado.
- 3 - Colorear con eosina entre 10 y 15 minutos.
- 4 - Lavar con agua destilada.
- 5 - Colorear con cristal violeta durante 5 minutos.
- 6 - Enjuagar con solución de lodo Gram y luego cubrir con la misma durante 5 minutos.
- 7 - Enjuagar con agua destilada.
- 8 - Secar con papel secante.
- 9 - Secar completamente al aire.
- 10 - Decolorar con aceite de anilina-xilol, agitando suavemente el portaobjetos hasta que no salga color púrpura.
- 11 - Enjuagar con xilol.
- 12 - Secar y observar por inmersión.

Resultados: Los quistes de *Pneumocystis carinii* se tiñen de color azul oscuro irregularmente.

Aspirado del borde de la lesión para el diagnóstico de Leishmania

Materiales: Gasa estéril
Alcohol 70%
Solución fisiológica con antibiótico (penicilina/estreptomina)

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Mario Fatała Chabèn"

Jeringas de 1 ml. con agujas 26G x 3/8 (para tuberculina)

Mechero

Tubos con medio de Senekie (Séneca)

Procedimiento:

1. Desinfectar los bordes de la lesión con alcohol 70%.
2. Poner en una jeringa de tuberculina 0,1 ml de solución fisiológica o PBS + antibiótico.
3. Elegir el borde más inflamado, insertar la jeringa de tuberculina desde la piel sana del borde externo hacia la lesión en forma paralela a la superficie de la piel sin alcanzar el cráter para evitar la contaminación de la muestra. **sin empujar el émbolo.**
4. Girar la aguja dentro de la piel para aflojar un poco el tejido y obtener linfa.
5. Retirar lentamente la aguja, al tiempo que se succiona con mucho cuidado. Tratar de no aspirar sangre.
6. Utilizando una rigurosa técnica aséptica, sembrar la muestra obtenida por aspirado en un tubo de cultivo con medio de Senekie. Flamear la boca del tubo y cerrar ajustando la tapa.
7. Hacer otros aspirados de igual forma en diversos sitios del borde de la lesión. Usualmente se toman cuatro aspirados.
8. Los tubos de cultivo ya sembrados deben protegerse de temperaturas altas por encima de 26° C, pero no deben guardarse en heladera ya que los parásitos no crecen.
9. Los tubos de cultivo se observan después del cuarto día con microscopio invertido para ver si hay Leishmanias creciendo. En su defecto, entre el séptimo y décimo día se toma con asa una pequeña muestra, la cual se observa entre porta y cubreobjetos, buscando promastigotes.

2 - TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO INMUNOSEROLÓGICO E INMUNOCELULAR

HEMOAGLUTINACIÓN INDIRECTA CUANTITATIVA (HAI) PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *T. cruzi*

Materiales: Policubetas de poliestireno de 96 pocillos en U.

Micropipetas automáticas de 25 μ l.

Microdiluidores para 25 μ l o pipetas automáticas multicanal.

Reactivos: Glóbulos rojos de carnero o pollo, estabilizados con formol y sensibilizados con antígeno. En caso de presentarse liofilizado, se debe resuspender en la solución estabilizadora 2 horas antes de su uso, mezclando por inversión cada 30 minutos.

Solución salina estabilizadora (SSE).

Sueros testigo reactivo y no reactivo.

Procedimiento:

1 - Colocar 25 μ l. de SSE en todos de los pocillos de la policubeta.

2 - Colocar 25 μ l. de cada muestra de los sueros, testigos y problemas, en la primera fila (A) de la policubeta (dilución inicial 1/2). Inactivar los sueros problema previamente a 56°C durante 30 minutos, por razones de seguridad.

3 - Colocar los microdiluidores en los 12 pocillos de la fila A, rotándolos no menos de 15 veces y pasándolos progresivamente a las filas subsiguientes (B,C,D, etc.), efectuando cada vez el mismo número de rotaciones, se completan así las diluciones dobles (1/4, 1/8, etc). Es necesario controlar la carga del microdiluidor al comenzar y terminar las diluciones, en un papel absorbente calibrador.

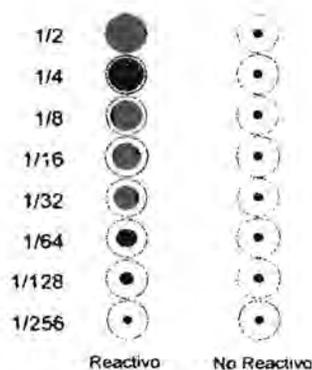
4 - Estas mismas diluciones sucesivas dobles, pueden hacerse con la pipeta multicanal, de

25µl.

5 - Efectuados los pasos 3 y 4 se coloca 25µl. de la suspensión antigénica en cada pocillo, agitando luego con suaves golpes en los bordes de la placa. Dejar en reposo en una superficie plana, sobre un papel húmedo (evita las cargas electrostáticas) y en una mesada libre de vibraciones.

La lectura se realizará en el tiempo estipulado por el productor.

La falta de reactividad se manifiesta por la sedimentación del antígeno en forma de botón. La reactividad del suero se manifiesta por la formación de un manto de bordes irregulares que cubre el 50 - 100% del fondo del pocillo, como se muestra a continuación:



INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA CUANTITATIVA (IFI) PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *T. CRUZI*

Materiales: Microscopio: de epifluorescencia con tubo binocular, ocular 10 x, objetivos acromáticos de 10x y 40x seco y cubo de filtros para luz azul. Debe estar equipado con óptica de buena calidad, un condensador de campo oscuro e iluminación de luz ultravioleta. La fuente luminosa debe contar con filtros excitadores que dejen pasar selectivamente la luz azul y debe tener un filtro barrera que impida que el exceso de luz no absorbida por el objeto, llegue al

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Mario Fataia Chabèn"

ojo del observador.

Estufa de Incubación a 37°C.

Heladera.

Caloventor.

Cámara húmeda.

Portaobjetos de vidrio no fluorescente y espesor no mayor de 1,2 mm marcados con 12 divisiones indelebles de forma circular de 8 mm de diámetro y cubreobjetos de 24 x 48 mm.

Matraces aforados de 1000 ml.

Probetas de 100 ml.

Pipetas automáticas de 20µl, 200µl.

Jarras de Koplín.

Frasco gotero para líquido de montaje.

Cajas plásticas con tapa para almacenar portaobjetos.

Reactivos:

1.- Solución salina estabilizadora (SSE) pH 7.2

a) Solución madre (10X)

Fosfato disódico dihidratado (Na ₂ HPO ₄ - 2H ₂ O)	17.0g
Fosfato monosódico monohidratado (NaH ₂ PO ₄ - H ₂ O)	2.2g
Cloruro de sodio (NaCl)	81.7g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

b) Solución salina estabilizadora (SSE) pH 7.2 (1X)

De la solución madre se toman 100 ml y se lleva a un volumen final de 1000 ml con agua destilada.

2.- Antígeno

a) Diluir la suspensión antigénica de acuerdo al título, en SSE 1X, hasta que se pueda visualizar de 20 a 40 parásitos por campo microscópico de 400 aumentos.

b) Colocar en los portaobjetos perfectamente limpios y desengrasados, 25µl de dicha suspensión en cada una de las divisiones marcadas.

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Mario Fatała Chabén"

- c) Secar las improntas así preparadas por medio de aire caliente.
- d) Fijar a la llama flameando el preparado suavemente.
- e) Lavar los portaobjetos con agua destilada.
- f) Secar con aire frío.
- g) Conservar en congelador a -20°C , en cajas de plástico con tapa, bien protegidas de la humedad.

3.- Antigamaglobulina humana marcada con isoticianato de fluoresceína (conjugado). Determinar el título de la antigama globulina marcada para cada lote y para cada equipo microscópico, pues depende del sistema óptico a utilizar.

4.- Azul de Evans

Preparar una solución stock de azul de Evans al 1% en agua destilada. Dejar estabilizar durante 1 mes y titular.

5.- Líquido de montaje

Glicerina bidestilada neutra	9 partes
SSE 10X	1 parte

Diluciones de Sueros:

Sueros testigo: Regenerar si son liofilizados y preparar diluciones dobles en SSE 1X. Preparar 2 portaobjetos conteniendo diluciones de sueros testigo desde 1/16 a 1/512, reactivo (arriba) y no reactivo (abajo). Disponer estos portaobjetos, uno al comienzo y otro al final de la tanda de cada día. Si se analizan más de 10 portaobjetos, disponer otros testigos intermedios.

Sueros problema:

Inactivar los sueros a 56°C durante 30 minutos, por razones de seguridad. Preparar diluciones dobles del suero en SSE 1X. Se recomienda utilizar como mínimo tres diluciones diagnósticas (1/32, 1/64, 1/128) en SSE 1X.

Titulación del conjugado:

- Preparar diluciones del conjugado mayores y menores que el título estimado por el productor, en SSE 1X.
- Cada dilución de conjugado debe probarse frente a sueros testigo como se indicó en el punto anterior.
- Efectuar el control de coloración inespecíficas (blanco de la reacción, sin suero) en todas las diluciones del conjugado que se ensayen.

Ejemplo de titulación:

Para un título estimado de 1/500

Diluciones de conjugado	Control Positivo Dilución seriada	Control Negativo (1/32)	Control Inespecificidad
1/200	1/1024+	+	-
1/400	1/512+	+ ó -	-
1/600	1/256+	-	-
1/800	1/128+	-	-
1/1000	1/64+	-	-

El título del conjugado corresponde a la máxima dilución que da fluorescencia con el suero positivo en su título conocido. En el ejemplo del esquema donde el suero control positivo tiene un título de 1/128, la dilución adecuada del conjugado, es decir su título, es de 1/800.

El conjugado diluido no debe teñir inespecíficamente a los parásitos.

Titulación de la solución de Azul de Evans:

Efectuar diluciones a partir de la solución madre al 1% en SSE 1X. Realizar una titulación semejante a la descrita para la antigamaglobulina humana marcada utilizando un conjugado de título conocido. Dado que el Azul de Evans, es utilizado como colorante de contraste, su óptima titulación ayudará a una mejor discriminación de los sueros en estudio. El rango de títulos hallados habitualmente, es de 1/10.000 a 1/20.000.

Reacción propiamente dicha:

- a) Tomar los portaobjetos con antígenos de la congeladora y secarlos a temperatura ambiente sobre papel de filtro.
 - b) Colocar en cada división 25 µl de cada dilución de suero problema.
 - c) Trabajar cada vez con los siguientes controles: Testigo de fluorescencia inespecífica, Testigo no reactivo y Testigo reactivo de título conocido.
 - d) Incubar los portaobjetos con los sueros controles y problemas en cámara húmeda, durante 30 minutos en estufa a 37°C.
 - e) Lavar los portaobjetos colocándolos en una jarra de Koplín primero con agua destilada y luego con SSE 1X durante 5 minutos, por 2 veces consecutivas. Finalmente enjuagar con agua destilada.
 - f) Secar los preparados con papel de filtro y corriente de aire frío.
 - g) Cubrir los preparados con la antigamaglobulina humana marcada, diluida de acuerdo al título, en Azul de Evans según título. Colocar 25 µl en cada división e incubar a 37°C en estufa, en cámara húmeda por 30 minutos.
- La dilución del conjugado debe ser preparada en el momento y utilizada dentro de las 2 horas de su preparación (conservada en heladera y al abrigo de la luz).
- h) Lavar los portaobjetos como se indica en punto e) y secarlos como en f).
 - i) Colocar los cubreobjetos con una gota de líquido de montaje.
 - j) Leer en microscopio de fluorescencia.

Lectura:

Leer los testigos antes que los sueros problemas.

- a) Testigo de fluorescencia inespecífica: Al microscopio los parásitos deberán presentar una coloración rojiza y no mostrar fluorescencia.
- b) Testigo no reactivo: El suero control no reactivo debe presentar una coloración parduzca sin fluorescencia.
- c) Testigo reactivo: El suero control reactivo debe presentar los parásitos teñidos con el fluorocromo de un color verde fluorescente. La fluorescencia es particularmente intensa en

la membrana y el flagelo del parásito. Deberá observarse fluorescente hasta la dilución de su título.

INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO (IEE), ELISA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *T. CRUZI*

Equipos y materiales:

Estufa de incubación a 37°C.

Heladera (4°C).

Balanza de precisión.

Congelador de -70 °C.

Micropipeta de 5-20 µl.

Pipeta multicanal de 50-200 µl.

Espectrofotómetro para microplaca capaz de leer a 490 nm.

Policubeta de poliestireno con 96 pocillos de fondo plano.

Reactivos:

Solución estabilizadora de fosfatos pH 7.2-7.4 10X.

Fosfato disódico dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 14,42 g

Fosfato monopotásico anhidro (KH_2PO_4) 2,00 g

Cloruro de potasio (KCl) 2,00 g

Cloruro de sodio (NaCl) 80,00 g

Agua destilada c.s.p. 1000,00 ml

Solución estabilizadora de fosfatos 1X (SEF 1X o PBS 1X)

100 ml de SEF 10X + agua destilada csp 1000 ml. Conservar a 4°C.

SEF - Tween 0,05% para lavados

Tween 20 al 20% acuoso 2,5 ml

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Mario Fatała Chabén"

A partir de esta solución concentrada se prepara en el día: llevando 8 ml a 25 ml. con agua destilada.

Sustrato : Orto-fenilendiamina (OPD), pastillas de SIGMA por 10 mg. de producto activo.

Solución de Sustrato: Solución perecedera. Preparar minutos antes de su uso y mantener al abrigo de la luz.

A los 25 ml. de la Solución Estabilizadora pH=5 recientemente preparada, agregar la pastilla de OPD de 10 mg. y 10 μ l. de peróxido de hidrógeno al 30%.

Peróxido de hidrógeno al 30%. Conservar fraccionado para uso mensual, en envase hermético, a 4°C.

Acido sulfúrico 1,0 N

Reacción propiamente dicha:

1- Pegado de Antígeno Purificado Soluble (AgPS) a la placa

Disolver el AgPS liofilizado con agua destilada, según indica la etiqueta y llevar al volumen final indicado, en matríz, con PBS 1 X, pH=7,2 de preparación reciente.

Pegar a policubetas de poliestireno marca Dynatech, Nunc o Costar de fondo plano, 100 μ l por pocillo. Las policubetas no podrán reusarse.

Dejar 2 hs. a temp. ambiente y luego guardar a 70° bajo cero.

2- Bloqueo de sitios inespecíficos

Retirar del congelador la placa con Ag y permitir que tome la temperatura ambiente.

Lavar con lavador automático o con pipeta, con no menos de 150 μ l de líquido de lavado en cada pocillo. Cada vez, eliminando el líquido de lavado y absorbiendo el resto sobre papel.

Líquido de lavado: PBS- Tween 0,05%.

Repetir el lavado 3 veces.

Bloquear con PBS- leche 5%. Con 100 μ l. por pocillo.

Dejar 1 h. a Temp. Amb.

Diluciones de sueros:

Los sueros deben ser preferentemente frescos, no lipémicos no hemolizados, aunque no se observaron interferencias con la reacción. Inactivarlos durante 30 minutos a 56°C, por razones de seguridad. Los testigos y controles pueden ser glicerinados o liofilizados.

Testigos y problemas se ensayan en dilución 1/200 en SEF - leche 1%.

En policubetas de pocillo en U, limpias, se diluyen los sueros Testigos y los Problemas con PBS- leche 1%.

Todos los sueros se usan en dilución 1/200.

Para ello se preparan 2 placas de diluciones:

Primera Dilución 1/20, llenar la placa con 190µl de PBS-leche 1%.

Cargar los sueros, 10µl de cada uno por pocillo, como se ilustra en un ejemplo.

Ejemplo de dilución 1/20 en policubeta:

	1	2	3	4	5
A	PBS	P	N	1	2
B	PBS	P	N	1	2

P= Testigo Positivo

N= Testigo Negativo 1,2, etc. son sueros Problema.

Segunda Dilución 1/200, llenar la placa con 180 µl de PBS-leche 1%, por pocillo y transferir, con pipeta multicanal cada fila de la dilución 1/20, con 20 µl. por pocillo, respectivamente. Cambiar los tips para cada fila.

Esta última dilución puede hacerse:

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Mario Fatała Chabèn"

Directamente en la policubeta sensibilizada con antígeno, luego de bloqueados los sitios inespecíficos y lavada, agregando a cada pocillo 90 μ l de PBS-leche 1% más 10 μ l. de la dilución 1/20 de los sueros (quedando 100 μ l. por pocillo de la dilución 1/200 de los sueros).

También se pueden hacer las diluciones en tubo, cuando no se cuenta con el material volumétrico antes mencionado.

Incubación de los sueros:

Lavar la placa con Ag, luego de bloqueados los sitios inespecíficos, por 3 veces como en el punto 2-

Colocar 100 μ l. por pocillo de la dilución 1/200 de los sueros, transfiriéndolas con pipeta multicanal, por filas, cambiando los tips para cada fila.

Incubar 30 minutos en estufa a 37 °C., con la placa tapada.

Incubación con el conjugado:

Lavar la placa como en el punto 2-.Repetir el lavado 3 veces.

Se usa Anti- gammaglobulina G humana conjugada con Peroxidasa, previamente titulada.

Mezclar el conjugado antes de medir, con agitador mecánico tipo Vortex.

Ejemplo, para título 1/2000, usar: 10 ml. de PBS-leche 1% + 5 μ l de conjugado.

Mezclar por inversión 10-15 veces.

Colocar 70 μ l. por pocillo del conjugado preparado según el título.

Incubar 20 minutos en estufa a 37 °C., con la placa tapada.

Reacción con el sustrato:

Preparar el sustrato en frasco negro o cubierto con papel de aluminio, minutos antes de usarlo.

Preparación del sustrato:

8 ml de bufer de citrato pH = 5 concentrado, llevar a 25 ml. con agua destilada, en probeta.

Agregar una pastillo de OPD Sigma de 10 mg. y disolver en frasco oscuro.

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Marlo Fatała Chabén"

Inmediatamente antes de usar agregar el Peróxido de Hidrógeno (para H₂O₂ de 100 volúmenes, usar 10 µl. en 25 ml.). Homogeneizar con la tapa del frasco sin apretar, permitiendo que se liberen las burbujas.

Lavar la placa como en el punto 2. Repetir el lavado 5 veces.

Colocar la preparación de OPD, 70 µl. por pocillo.

Dejar al abrigo de la luz y a Temperatura Ambiente durante 15 minutos.

Frenar la reacción con ácido sulfúrico 1N, 70 µl. por pocillo.

Lectura:

Se realiza en espectrofotómetro para policubetas, a 490 nm.

Título de corte: Densidad Optica > 0,200 .

Lecturas entre 0,170 - 0,200 D.O. se consideran en zona gris.

Se puede realizar la lectura a ojo descubierto, considerando reactivos los pocillos que tienen el color de los Testigos Reactivos. Los No Reactivos, al igual que el testigo No Reactivo, desarrollan un color muy claro, casi incoloro.

Criterio para la aceptación o rechazo del proceso de rutina diario:

1 - Si los **sueros testigo no reactivo** dan lecturas por encima de 0.150 Densidad Optica, se deberá verificar el procedimiento para ser aceptado.

2 - Si los **sueros testigo reactivo** dan lecturas por debajo de 0.300 Densidad Optica, no se aceptarán los resultados obtenidos en esa rutina, debiéndose identificar las causas de error y corregirlas.

TEST DE ISAGA (DETECCIÓN DE IgM) PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *TOXOPLASMA GONDII*

Materiales: policubetas con fondo en U

cámara húmeda
pipetas de 50 a 200ul
buffer fosfato Ph 7.2
buffer carbonato ph 9.6
buffer alcalino ph 8.7
solución de lavado
solución bloqueante
anti IgM humana
suspensión de taquizoitos
sueros controles positivos y negativos
espejo de aumento para lectura de microplacas
baño termostático a 56°C
estufa a 37°C
heladera

Preparación de las soluciones:

1-solución de pbs ph 7.2

fosfato disódico	72 ml
fosfato monopotásico	28ml
cloruro de sodio 0.15 m	8.4 g
agua destilada csp	1000 ml

2-buffer carbonato ph 9.6

bicarbonato de sodio 0.1 m 500 ml
carbonato de sodio 0.1 m csp ph 9.6

3-buffer alcalino

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Mario Fatała Chabèn"

cloruro de sodio	7.02 g
ácido bórico	3.09 g
hidróxido de sodio 1n	24 ml
seroalbuminabovina	4 g
azida sódica	1 g
agua destilada csp	1000 ml

4-solución de lavado

pbs ph 7.2	100 ml
tween 20	50ul

5-solución bloqueante

solución de lavado	10 ml
seroalbuminabovina	0.1 g

Mecanismo de la reacción:

- 1 - Colocar en las policubetas en fondo en U 100 ul/pozo de antiIgM humana diluída en buffer carbonato a una concentracion de 20ug/ml.
- 2 - Incubar toda la noche a 4°C en cámara húmeda.
- 3 - Invertir la placa y secar con papel de filtro con cuidado.
- 4 - Lavar 3 veces durante 5 minutos con solución de lavado.
- 5 - Colocar 200 ul por pozo de solución bloqueante.
- 6 - Incubar 60 minutos a 37°C en cámara húmeda.
- 7 - Inactivar los sueros 30 minutos a 56 °c.
- 8 - Diluir los sueros en solución de lavado desde 1/32 a 1/256.
- 9 - Repetir el paso 3 y 4.
- 10 - Colocar 150 ul por pozo de las diluciones de sueros desconocidos y de los controles positivos y negativo destinar celdas para control del antígeno.

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Mario Fataja Chabén"

- 11 - Repetir el paso 6.
- 12 - Repetir el paso 3y 4.
- 13 - Colocar 50 ul del antígeno.
- 14 - Incubar toda la noche a 37 °c en cámara húmeda.
- 15 - Lectura de la reacción.

Examinar la policubeta en el espejo comenzando por los controles .

Lectura positiva aglutinacion en velo.

Lectura negativa sedimentacion de toxoplasmas

El título está dado por la última dilución que presnta aglutinación.

Test de inmunofluorescencia indirecta

Se basa en que la unión antígeno anticuerpo específica es revelada por una antiinmunoglobulina g o m marcada con isotiocianato de fluoresceina y éstas uniones observadas en un microscopio de fluorescencia.

- Materiales:
- Pipetas de 10 a 50ul
 - cubreobjetos de 22 x48 mm
 - policubetas para efectuar diluciones
 - cámara húmeda con palillos
 - papel de filtro
 - marcadores
 - jarras de koplím
 - improntas con taquizoitos de *Toxoplasma gondii*
 - antigammaglobulina humana g y m marcada con isotiocianato de fluoresceina
 - buffer de fosfato pbs ph 7.6
 - glicerina buffereada
 - controles de sueros positivo negativo

control de suero interno

estufa a 37c

heladera

baño maria a 56°c

Preparación de las soluciones:

solucion madre (10x)

fosfato disodico

fosfato monopotasico

cloruro de sodio

agua destilada

Solución de trabajo:

De la solución madre se toman 100 ml y se lleva a volúmen final de 1000 ml con agua destilada.

Solución de glicerina:

pbs ph 7.6 1 vol

glicerina 9 vol

Titulación de antigamma globulina humana marcada con isotiocianato de fluoresceina:

Existen preparados comerciales de diferente calidad, es necesario controlar cada lote, titular para cada equipo microscopico y cada vez que se cambie la lámpara del mismo, ya que depende de la fuente de iluminación y del sistema óptico que se emplea. La dilución optima sera aquella que permita diferenciar la fluorescencia presente en tres grupos de suero controles positivos alto, bajo y negativo

Procedimiento:

- 1 - Retirar las improntas del congelador.
 - 2 - Lavar rápidamente con agua destilada para eliminar exceso de sales.
 - 3 - Secar las improntas con papel de filtro whatman presionando suavemente o empleando corriente de aire.
 - 4 - Rotular las improntas.
 - 5 - Hacer diluciones seriadas con los sueros controles desde 1/16 hasta 1/2048.
 - 6 - Incubar las diluciones de suero con el antígeno colocado en las improntas, 30 minutos a 37 °C en cámara húmeda.
 - 7 - Preparar diluciones del conjugado mayores y menores que las especificadas por el fabricante con buffer pbs ph 7.6. Cada dilución de conjugado debe ser probada con los sueros controles.
 - 8 - Retirar los preparados de la estufa y lavar 10 minutos con agitación en pbs ph 7.6
 - 9 - Colocar el control de coloración inespecífica en cada determinación.
 - 10 - Incubar con las diluciones del conjugado en estudio y con el conjugado de referencia, 30 minutos a 37 °C en cámara húmeda.
 - 11 - Lavar como en el paso 8 y secar con papel de filtro o corriente de aire.
 - 12 - Colocar una gota de glicerina buffereada y superponer un cubre objeto evitando la formación de burbujas.
 - 13 - Lectura de la reacción
- Examinar los preparados con 400 aumentos con lámpara de halógeno para producir la excitación con sistema de iluminación de epifluorescencia.
- Lectura positiva es la que presenta fluorescencia amarillo verdosa en la membrana del parásito.
- Lectura negativa cuando se observan los parásitos de color rojo ladrillo o solamente hay fluorescencia en alguno de los polos o lados del parásito.

Ejemplo para la elección de la dilución de conjugado:

Sueros	Dilucion del conjugado			Conjugado de referencia	
	1/100	1/200	1/400	1/200	
Control Negativo (negativo)	1/16	Neg	Neg	Neg	
Control Positivo (1/512)	1/2048	1/512	1/256	1/512	

En el ejemplo la dilución de elección es 1/200 cuyos resultados son idénticos a los del conjugado de referencia.

Mecanismo de la reacción

- 1 - Inactivar los sueros 30 minutos a 56°C.
- 2 - Preparar las diluciones de los mismos en buffer PBS.
- 3 - Repetir los pasos 1, 3, 4 y 6 de titulación de conjugado.
- 4 - Preparar la dilución de conjugado.
- 5 - Repetir desde el paso 8 al 13.
- 6 - Efectuar la lectura de la reacción.

El título está dado por la última dilución que se detecta fluorescencia. Actualmente se están informando a nivel internacional en unidades internacionales convirtiendo las diluciones en UI.

PREPARACIÓN DE ANTÍGENOS PARA EL INMUNODIAGNOSTICO DE LA TOXOPLASMOSIS

Los antígenos que se emplean en las reacciones de inmunodiagnóstico se obtienen por inoculación del peritoneo del ratón cepa efectuando pasajes cada tres días. El exudado debe de estar libre de células, hematíes o leucocitos.

Antígeno para inmunofluorescencia indirecta:

Está constituido por taquizoitos de *T. gondii*.

Procedimiento:

- 1 - Extraer exudado del peritoneo de ratón, inoculado 72 hs antes.
- 2 - Examinar al microscopio que no existan células u otros contaminantes.
- 3 - Si se observan abundantes células endoteliales esperar unas horas antes de sacrificar otro animal.
- 4 - Centrifugar el exudado a 500 rpm 10 minutos; sedimentan elementos formes y en el sobrenadante se encuentran los parasitos.
- 5 - Centrifugar 15 minutos a 2000 rpm; sedimentan los toxoplasmas.
- 6 - Descartar el sobrenadante y resuspender en igual volumen de pbs ph 7.6
- 7 - Efectuar 3 lavados con solución de pbs (ver preparación), durante 15 minutos a 2000 rpm.
- 8 - Diluir la suspensión antigénica en pbs hasta tener una concentración de 15 a 20 toxoplasmas por campo microscopico de 400 aumentos.
- 9 - Colocar en los portaobjetos perfectamente limpios y desengrasados, 0.025ml de la suspensión antigénica, en cada una de las divisiones marcadas.
- 10 - Distribuir en forma homogénea en toda la superficie de la misma.
- 11 - Secar las impromtas a 37 c.
- 12 - Conservar en congelador a -20c.

Antígeno para ISAGA

- 1 - Extraer exudado del peritoneo de ratón inoculado 72 horas antes con *T.gondii*.
- 2 - Observar por exámen microscópico que no contenga células.
- 3 - Centrifugar a baja velocidad 10 minutos.
- 4 - El sobrenadante centrifugarlo 15 minutos a 3000rpm.
- 5 - Lavar el sedimento tres veces con PBS, centrifugando 15 minutos a 3000 rpm.

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Mario Fatała Chabén"

- 6 - Diluir al medio con solución salina formolada al 2%.
- 7 - Realizar un recuento de taquizoitos en cámara para recuento de globulos blancos.
- 8 - Diluir en buffer alcalino hasta obtener 106 taquizoitos/ml.

DOBLE DIFUSIÓN ARCO 5 (DD5) PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *ECHINOCOCCUS GRANULOSUS*

Materiales: Portaobjetos de 2.5 x 7.5 cm

Agar al 1.2%

PBS pH 7.2

Sacabocados

Cámara húmeda

Mapa de agujeros

Pipetas automáticas

Pipetas Pasteur

Antisuero de referencia

Antígeno para DD5

Cristalizador

Papel Whatman Nro 1

Sc Colorante

Sc Decolorante

Jarras de Kopic

Marcadores

Pinzas

Procedimiento:

- 1 - Reconstituir con agua destilada, según el rótulo de la etiqueta, el antígeno para DD5 y el antisuero de referencia.

- 2 - Marcar con el número de código que corresponda, láminas portaobjetos de 2.5 x 7.5 cm perfectamente limpias y secas, en cada una de las cuales se pueden examinar dos sueros.
- 3 - Colocar sobre una superficie lisa y nivelada. Distribuir 3.5 ml del Agar previamente fundido sobre cada una y lo dejar solidificar a temperatura ambiente.
- 4 - Colocar las láminas sobre el diagrama y cortar en el agar los orificios para el antígeno, el antisuero control y el suero en estudio.
- 5 - Sueros en estudio: el orificio de 10 mm de diámetro, volumen aprox de 180 μ l
 - 3 Antisuero de referencia: 6 mm en 60 μ l
 - 4 Antisuero de referencia: 1 mm en 3 μ l
- 6 - Llenar los orificios respectivamente con el suero en estudio, el antisuero control y el antígeno, llevar las láminas a una cámara húmeda y dejar difundir a temperatura ambiente durante 40 - 48 hs, sin mover.
- 7 - Finalizada la difusión, sumergir las láminas en solución fisiológica tamponada pH 7.4 y dejar en ella a temperatura ambiente durante 36 hs. Durante este período, se cambiará 5 veces la solución de lavado. Para que el lavado sea más efectivo, es conveniente al hacer los dos primeros cambios de líquido, eliminar de los orificios del antígeno, el antisuero y los sueros, los posibles restos que pudiesen haber quedado adheridos a las paredes. Para ello, mediante una pipeta, se los rociará a moderada presión con solución fisiológica tamponada.
- 8 - Finalizado el lavado, sumergir las láminas durante 10 minutos en agua destilada. Luego, envolverlas en papel de filtro (Whatman N° 1) previamente humedecido en agua destilada y poner a secar en una estufa a 37°C.
- 9 - Una vez secas las láminas, retirar cuidadosamente el papel que las envuelve y sumergirlas 15 - 20 min. en solución colorante.
- 10 - Escurrir las láminas, enjuagarlas con agua, volver a escurrir y sumergir en la solución decolorante durante 30 - 40 min.
- 11 - Dejar secar a temperatura ambiente.

NOTA: Para visualizar mejor las bandas, se pueden limpiar suavemente, con un algodón embebido en alcohol.

Interpretación de Resultados:

Observar las bandas de precipitación producidas por la interacción del suero en estudio con el antígeno y verificar si alguna de ellas presenta identidad inmunológica con el arco 5, formada al reaccionar el suero control con el mismo antígeno.

Reacción positiva: banda de identidad entre el suero en estudio y el antisuero de referencia.

Reacción negativa: ausencia de banda de identidad, bandas con identidad parcial o bandas sin identidad que serán consideradas como inespecíficas

Tres o más bandas de precipitación sin la banda del Arco 5, podría estar indicando la presencia de un quiste hidatídico, mientras que una o dos bandas de precipitación sin el arco 5, podría no tratarse de un quiste.

INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO (ELISA) PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *E. GRANULOSUS*

Es una técnica de screening, que detecta anticuerpos contra antígenos del líquido hidatídico total.

Según la técnica de Coltorti (1986)

- Materiales:
- Antígeno: líquido hidatídico total
 - Estufa de incubación a 37° C
 - Cámara húmeda
 - Policubetas de fondo plano: Maxisorp Nunc Immuno Plate
 - Pipetas automáticas
 - Marcador
 - Suero control positivo de alto título
 - Suero control positivo de bajo título

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Mario Fatala Chabèn"

Suero control negativo

Sueros problemas inactivados 30 min a 56°C

Conjugado anti Gammaglobulina humana marcada con peroxidasa

PBS pH 7.4

PBS / Tween 0.1%

PBS / Tween 0.1% - Leche 1.5 %

Buffer CO₃H/CO₃ 0.1 M pH 9.6

Ácido fluorhídrico 0.1 M pH 3.2

Tween 20

ABTS (2-2'-azinodi-(3ethylbenz-thiazoline sulfonic acid)

Acido cítrico 0.05 M pH 3.5

Peróxido de hidrógeno

Procedimiento:

- 1 - Marcar la placa con 50 µl por celda de la dilución del líquido hidatídico total en buffer carbonato pH 9.6 (ver Preparación del Antígeno para ELISA)
- 2 - Incubar 18 hs en cámara húmeda.
- 3 - El exceso de antígeno se elimina por inversión de la placa y 3 lavados con PBS/Tween 0.1% de 5 min cada uno.
- 4 - Bloquear la placa con 100ul por celda de PBS-Leche 1.5% durante 1 hora a 4° C en cámara húmeda. Mientras, preparar las diluciones de los sueros : 1/100 en TBS-FC-SNO-Leche 1.5%
- 5 - Lavar nuevamente como en 2.
- 6 - Colocar en cada celda 50 µl de la dilución respectiva de suero. (ATENCIÓN: en cada placa incluir controles positivos, negativos y blancos) Procesar cada muestra, por lo menos, por duplicado.
- 7 - Incubar 30 min. a 37°C en cámara húmeda.
- 8 - Lavar 3 veces con PBS/Tween.
- 9 - Colocar 50 µl de conjugado (Anti Gammaglobulina humana) diluído según título en

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Mario Fatała Chabén"

PBS/Tween 0.1%

- 10 - Incubar 30 min. a 37°C en cámara húmeda.
- 11 - Lavar 3 veces con PBS/Tween 0.1%
- 12 - Agregar 100 µl de sustrato (solución de trabajo).
- 13 - Incubar 10 min a 37°C en cámara húmeda.
- 14 - Detener la reacción con 100 µl de FH.
- 15 - Leer en espectrofotómetro a 405 - 410 nm

Interpretación de Resultados:

Cálculo de cut off:

- 1 - Seleccionar por lo menos, de 20 a 30 sueros de personas sin antecedentes de hidatidosis, ni imágenes quísticas.
- 2 - Desarrollar la técnica según procedimiento.
- 3 - Con las densidades ópticas obtenidas, calcular el promedio y la desviación standard. El cut off es igual a : densidad óptica promedio + 3 desvíos standard.

Se considerará:

Suero positivo: si el valor de DO es mayor al cut off

Suero negativo: si el valor es menor o igual al cut off

WESTERN BLOT PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *E. GRANULOSUS*

La electroforesis en geles de poliacrilamida es un método analítico de alto poder resolutivo que combina la migración en un campo eléctrico y el tamizado molecular a través de un gel de corrida.

Luego de la separación, la transferencia a membranas de nitrocelulosa tiene lugar mediante el paso de corriente eléctrica, a pH alto. Como consecuencia, las moléculas proteicas se

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS – I.N.P. “Dr. Mario Fatała Chabén”

movilizan y contactan con la membrana de nitrocelulosa donde se fijan. Las moléculas antigénicas transferidas son identificadas por interacción con anticuerpos específicos. Los complejos así formados son identificados a través de la adición de un conjugado (anti anticuerpo marcado con una enzima)

Materiales: Equipo Mini Protean II de BioRad

Equipo Trans blot de BioRad

Pipetas automáticas

Guantes: La poliacrilamida es neurotóxica, la DAB es cancerígena

Si se toca la nitrocelulosa con los dedos, quedará manchada con las proteínas de la piel.

Vasos de precipitados de 20 ml

Tubos Eppendorff

Solución A

Solución B

Solución C

Persulfato de amonio

TEMED

Agua destilada

Buffer muestra

Buffer de corrida

Solución D

Buffer de transferencia

Patrón de peso molecular

Nitrocelulosa

Diluyente de sueros: Buffer TBS-FC-SON-Leche 1.5%

Sc Lavados: PBS - Tween 0.5%

Sc Bloqueante: PBS - Tween 0.5%- Leche 5%

Diluyente de conjugado: PBS- Tween 0.5%-Leche 1.5%

Conjugado: Anti Inmunoglobulina humana marcado con peroxidasa

Sustrato: DAB (diaminobencidina)

eróxido de hidrógeno

Papeles de filtro

Cubetas para incubar las tiras de nitrocelulosa

Sueros problemas inactivados

Controles positivos y negativos

Bisturí

Colorante para los pesos moleculares: Negro Amido

Agitador

Pinza

Probetas

Procedimiento:

Etapas del Western blot:

SDS-PAGE

Transferencia a nitrocelulosa

Reacción inmunoenzimática

Interpretación de resultados

SDS-PAGE

1 - Se separan las proteínas de acuerdo a la técnica descrita por Laemmli, con modificaciones, en un gel de poliacrilamida de 0.75mm de espesor, 4% de T en el del de stacking y 12.5% del gel running; en condiciones no reductoras (sin 2 Mercapto etanol) en una cuba Mini Protean II de BioRad.

2 - Armado de los geles.

3 - Armar el equipo (cuba Mini protean II de Biorad) de acuerdo al manual del fabricante.

4 - Utilizar separadores de 0.75mm de espesor.

5 - Mezclar los reactivos para armar primero el running (colocar a lo último el TEMED).

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Mario Fatala Chabèn"

	10 %	12.5 %	15 %
Solución A	3.34 ml	4.16 ml	5 ml
Solución B	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
Solución C	100 µl	100 µl	100 ul
Persulfato	50 µl	50 ul	50 ul
TEMED	10 µl	10 ul	10 ul
Agua destilada	4 ml	3.18 ml	2.35 ml
Volumen final	10 ml	10 ml	10 ml

6 - Agitar levemente para homogeneizar, una vez que se tiene todo el equipo armado, adicionar el TEMED, y colocar rápidamente entre los vidrios (aproximadamente 3.5 ml).

7 - Colocar unos 100 µl de agua para nivelar el gel.

NOTA: En todo momento evitar la formación de burbujas

8 - Una vez polimerizado el gel de running, preparar el gel de stacking, mezclando los reactivos correspondientes.

9 - Gel Stacking:

Solución A 830 ul
D 600 ul
C 50 ul
Agua destilada 3.52 ml
Persulfato 50 ul
TEMED 2.5 ul

10 - Sacar el excedente de agua sobre el gel de runnig por inversión. Luego colocar la solución para el gel de stacking.

11 - Rápidamente, colocar el peine correspondiente.

12 - En todo momento, evitar la formación de burbujas.

Preparación de la muestra:

1 - Medir la concentración de proteínas y sembrar:

15 a 20 ug de proteína para la fracción S2B por calle

0.8 a 1 ug de proteína para el líquido hidatídico total por calle

2 - Diluir al medio la muestra a sembrar en buffer muestra.

3 - Conjuntamente, utilizar marcadores de peso molecular, según las instrucciones del fabricante.

4 - Siembra

5 - Corrida

6 - Condiciones de corrida: a voltaje constante de 200 V, 60 mA y 30 W,

7 - Durante aproximadamente 1 hora, o hasta que el frente de corrida llegue al borde del gel.

Transferencia a nitrocelulosa:

Una vez finalizada la corrida, desarmar el SDS PAGE y preparar el equipo (Transblott de Biorad), según instrucciones del fabricante, para la transferencia.

Las condiciones de transferencia son: 100 V, 250 mA y 60 W durante 1 hora.

Reacción inmunoenzimática:

Bloquear la nitrocelulosa una hora con PBS-Tween 0.5%-leche 5% a temperatura ambiente, con agitación (Todas las incubaciones son de una hora, a temperatura ambiente con agitación suave)

(La nitrocelulosa marcada y bloqueada puede guardarse a -20° C hasta 60 días)

Lavar tres veces (5 min cada uno) con PBS-Tween 0.5%

Diluir los sueros 1/100 en TBS-SNO-FC-Leche 1.5%

Incubar los sueros con la nitrocelulosa una hora

Lavar tres veces

Incubar con el anti Ig-humana conjugado con peroxidasa en la dilución óptima en PBS-

Tween 0.5%-leche 2.5%

Lavar dos veces con PBS-Tween 0.5% y una vez con PBS

Revelar con DAB

Interpretación de Resultados

Necesariamente, deben estar presentes las bandas correspondientes al antígeno 5: sin 2

Mercapto etanol 65-55 kDa

8/12 - 16 - 20 - 30 kDa Ag B (Que puede no estar presente)

ELISA DE CAPTURA PARA DETECCIÓN DE COMPLEJO INMUNE CIRCULANTE PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *E. GRANULOSUS*

Varios estudios muestran la presencia de complejos inmunes circulantes (CIC) específicos e inespecíficos en sueros de personas con Hidatidosis. Además, algunos estudios demuestran que los niveles de CIC decrecen drásticamente en pacientes post quirúrgicos y en pacientes bajo tratamiento.

La técnica es un Elisa de captura en el que se utiliza un Anti 5 policlonal adsorbido a la placa de poliestireno que atrapa los complejos por el antígeno y se hace reaccionar luego con un conjugado anti humano de tipo anti Ig G o IG M

Materiales: Placas de fondo plano Maxisorp Nunc Immuno Plate

Cámara húmeda

Pipetas automáticas

Buffer de marcación: Buffer carbonato/bicarbonato pH: 9.6

Solución de lavado: PBS - Tween 0.1%

Solución de bloqueo: PBS - Tween 0.1% - Seroalbúmina bovina 2%

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Mario Fatala Chabén"

Diluyente de sueros: PBS - Tween 0.1% - Seroalbúmina bovina 1%

Conjugado: Anti Ig G marcado con peroxidasa

Anti Ig M marcado con peroxidasa

Diluyente de conjugados: PBS - Tween 0.1%

Sustrato:

Ácido cítrico 12 ml

Peróxido de hidrógeno 1/16 : 50 μ l

ABTS (solución stock): 50 μ l

Estufa 37 °C

Lector para placas de ELISA

Sueros problemas inactivados

Controles positivos y negativos

Procedimiento:

- 1 - Marcar la placa con 50 μ l por well del Anti 5 (10 μ g/ml) en buffer carbonato.
- 2 - Incubar over night a 4° C en cámara húmeda.
- 3 - Lavar 3 veces con sc de lavado a temperatura ambiente, 5 minutos cada lavado.
- 4 - Bloquear con 100 μ l por well con solución bloqueante, durante 30 min a 4° C. Mientras:
Diluir los sueros 1/40 en sc diluyente de sueros..
- 5 - Lavar 3 veces.
- 6 - Sembrar 50 μ l de los sueros diluidos por well e incubar 30 min a 37°C (como mínimo, sembrar las muestras por duplicado).
- 7 - Lavar 3 veces.
- 8 - Sembrar el conjugado (Anti Ig G o Anti Ig M) en la dilución obtenida por titulación
- 9 - Incubar 30 min a 37°C
- 10 - Lavar 3 veces
- 11 - Sembrar 100 μ l del sustrato, e incubar 10 min a 37° C
- 12 - Leer a 410 nm

NOTA: Colocar siempre Blancos, Controles positivos y Controles negativos en cada placa. Titular los anticuerpos y los conjugados utilizados en la técnica.

Criterio de positividad del ELISA

Cada laboratorio debe calcular su cut off en sus condiciones de uso, y según la población a estudiar.

Seleccionar, como mínimo, 20 sueros de personas sanas, sin antecedentes de Hidatidosis, y si es posible de una zona no endémica.

Con las densidades ópticas obtenidas, calcular la DO promedio y el desvío standard.

El cut off es $D_{prom} + 3 \text{ desvíos}$

Para nuestro Laboratorio, el cut off obtenido es de 0.285 para CIC de tipo Ig G y 0.252 para CIC de tipo Ig M. (Pero cada laboratorio debe calcular su cut off para su metodología y para la población en estudio)

DOT ELISA PARA DETECCIÓN DE ANTÍGENO CIRCULANTE PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *E. GRANULOSUS*

Se basa en la precipitación de los complejos inmunes circulantes presentes en el suero con polietilenglicol (PEG): polímero que no desnaturaliza las proteínas que precipita. La precipitación depende del peso molecular y la concentración de las proteínas: las proteínas normales del suero no precipitan con concentraciones menores al 4%; entonces los complejos inmunes circulantes son de mayor peso molecular y precipitan en presencia de PEG al 3%.

Las proteínas precipitadas se adsorben en forma pasiva sobre un soporte inerte, como la nitrocelulosa. Los complejos se disocian con un buffer ácido, se amplifica la señal con un sistema de Anti 5 en conejo y conjugado anti conejo. Al revelar con el sustrato, el producto insoluble precipita en la nitrocelulosa y se aprecia una mancha de color marrón.

Materiales: Sueros problemas inactivados

Control positivo

Control negativo

Precipitante: Polietilenglicol 8000 al 6% en PBS pH 7.4

Sc lavado y para resuspender el pellet: PBS pH 7.4

Buffer disociante: Glicina 0.1 M pH 2.5

Buffer lavado del DPBS - Tween 0.5%

Sc bloqueante:

PBS - Tween 0.5% - Leche 5%

Sc diluyente de primer Ac y conjugado: PBS - Tween 0.5% - Leche 2.5%

Sustrato: Diaminobencidina

Peróxido de hidrógeno

Nitrocelulosa

Tubos Eppendorff de 0.5 ml

Centrífuga tipo Sorvall para Eppendorff

Pipetas automáticas

Guantes

Pinzas

Anticuerpos monoclonales Anti 5

Conjugado: anti-conejo marcado con peroxidasa

Agitador

Procedimiento:

- 1 - Colocar en tubos Eppendorff, 50 μ l de suero y 50 μ l de PEG (Si se usa menor cantidad de suero, respetar la dilución en partes iguales de suero y PEG).
- 2 - Incubar no más de 18 horas en heladera. (dejar precipitando de un día para el otro. No exceder el tiempo de precipitación, ya que se redisuelve el precipitado).
- 3 - Centrifugar 2 a 3 min a 7.000 rpm en frío (las centrifugaciones de los lavados también se harán en frío para evitar que se redisuelva el precipitado).
- 4 - Descartar totalmente el sobrenadante, y resuspender el pellet en 100 μ l de PBS.

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Mario Fataala Chabèn"

- 5 - Volver a centrifugar 2 a 3 min a 7000 rpm.
- 6 - Repetir los pasos 4 y 5 dos veces más (en total son tres lavados).
- 7 - En el último lavado, descartar completamente el sobrenadante y resuspender en 10 μ l de PBS (Se pueden guardar así a -20°C)
- 8 - Sembrar 5 μ l del pellet resuspendido directamente sobre la nitrocelulosa (previamente humedecida en agua destilada)
- 9 - Incubar una hora a temperatura ambiente en cámara húmeda, sin mover.

NOTA: todas las incubaciones son a temperatura ambiente.

- 10 - Sembrar 2 μ l del buffer disociante. Dejar no más de 5 min.
- 11 - Lavar 3 veces con PBS-Tween 0.5%, 5min cada vez, con agitación.
- 12 - Bloquear con PBS-Tween 0.5%-leche 5% una hora con agitación suave.
- 13 - Lavar tres veces
- 14 - Secar suavemente.
- 15 - Incubar 30 min con agitación suave, con el Anti 5 diluido en PBS-Tween 0.5%-Leche 2.5%.
- 16 - Lavar tres veces
- 17 - Secar suavemente.
- 18 - Incubar con el conjugado (anti conejo), diluido en PBS-Tween 0.5%-Leche 2.5%, 30 min, con agitación suave.
- 19 - Lavar dos veces con PBS-Tween 0.5% y una vez con PBS
- 20 - Revelar con el sustrato (DAB): colocar la nitrocelulosa en la solución de sustrato recientemente preparada, y observar la aparición de una mancha marrón. Apenas comienza a hacerse bien nítida la mancha, parar la reacción colocando la nitrocelulosa en agua destilada, enjuagar abundantemente y secar sobre papel absorbente.
- 21 - Guardar la nitrocelulosa entre papeles de filtro o secantes.

NOTAS : Titular los anticuerpos a utilizar en un sistema de damero.

No dejar los sueros precipitando más de 18 a 20 hs: si se deja más tiempo, se redisuelve el precipitado.

Los pellets lavados se pueden conservar hasta 5 días congelados a -20°C .

La nitrocelulosa con los antígenos adsorbidos y bloqueada puede conservarse hasta tres días guardada entre papeles de filtro y bien envuelta a -20°C .

La DAB es muy insoluble. Es por ello que se recomienda pesar la DAB y colocarle el PBS y dejar agitando al resguardo de la luz, por lo menos una hora antes de ser utilizada (el peróxido de hidrógeno se coloca en el momento preciso antes de usar). Si se nota que no es buena la disolución, se recomienda filtrar la DAB antes de usar, para evitar manchas sobre la nitrocelulosa.

Titular los anticuerpos utilizados en un sistema de damero.

INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO (ELISA) PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *TOXOCARA*

Esta técnica se basa en la absorción pasiva del antígeno a una fase sólida (superficie de poliestireno), este antígeno se pone en contacto con la dilución adecuada de suero, luego se adiciona antigamaglobulina específica unida a una enzima (conjugado) y por último se agrega el sustrato enzimático correspondiente, produciendo una coloración característica. El color es directamente proporcional a la cantidad de conjugado ligado al complejo antígeno anticuerpo, en consecuencia a la cantidad de anticuerpo presentes en la muestra.

- Materiales:
- Pipetas automáticas de 10 a 50 μl
 - Pipetas multicanal de 50 a 200 μl
 - Policubetas de 96 celdas fondo plano (Inmunolon II)
 - Policubetas de 96 celdas fondo plano o en U para efectuar diluciones
 - Papel de filtro Whatman N°1
 - Marcadores resistentes al agua

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Mario Fatała Chabén"

Estufa de incubación a 37° C

Heladera

Baño María a 56°C

Antígeno Escretor secretor cc 5 µg/ml

Carbonato de sodio (Merck : 106395)

Bicarbonato de sodio (Merck 6329)

Gammaglobulina humana G marcada con peroxidasa(Sigma cat :1881)

Buffer de fosfato PBS pH 7.4

Tween 20 (sigma p:1373)

Leche descremada en polvo (Difco laboratories cat: 0032-17-3)

Acido cítrico (Merck 100244)

ABTS (2,2azino di (3-etilemtiazolino ácido sulfonico Sigma a:1888) Acido

Fluorhídrico 0.1 M pH:3.2

Agua Oxigenada 30 volúmenes(Merck 107210)

Controles de sueros positivo alto ,medio, negativo

Control de suero interno o de precisión

Preparación de las Soluciones:

Solución Madre (10x) de PBS

Fosfato Disódico (Baker Analyzer 3828-00)

Fosfato Monopotasico(Merck.48739) 5.7 g

Cloruro de Sodio(Merck 106404) 84.0 g

Agua Destilada csp 1000ml

Solución de trabajo:

De la solución madre de PBS se toman 100 ml y se lleva a volumen final de 1000 ml con agua destilada.

2- PBS /TWEEN 0.1 %(PBS /T)

PBS PH :7.4 100 ml

Tween 200.1ml

3-PBS / Leche descremada 1.5 % (pbs/l)

PBS pH 7.4 100 ml

Leche descremada 1.5 g

4-Buffer Carbonato ph 9.6

Bicarbonato de Sodio 0.1 m. 500 ml

Carbonato de Sodio 0.1 m csp ph 9.6

5-Sustrato

Preparación de la solución madre de ABTS

ABTS 25.5mg

Agua Destilada 1.25 ml

Guardar a 4°C

Solución de trabajo para una policubeta

Agua Oxigenada 30 vol diluida 1/16 50µl

Solución madre de ABTS 50µl

Acido Cítrico 12ml

Procedimiento:

1. Marcar las policubetas con 50 µl de antígeno diluido a una concentración de 5 µg/ml en buffer carbonato /bicarbonatos ph:9.5
2. Dejar en la heladera 18 horas.
3. Lavar 3 veces con PBS/T durante 5 minutos.
4. Bloquear con 100 µl de PBS /l 1 hora a 37 °C .
5. Diluir el suero 1/100.
6. Incubar 50 µl de las diluciones de suero con el antígeno colocado en las policubetas, 30

minutos a 37 °C en cámara húmeda.

7.Retirar las policubetas de la estufa y lavar 3 veces durante 5 minutos con PBS/T.

8.Incubar con 50 µl de la dilucion del conjugado , 30 minutos a 37°C en cámara húmeda.

9.Lavar 3 veces durante 5 minutos con PBS/T.

10.Agregar 100 µl de sustrato , incubar 10 minutos en cámara húmeda .

11.Detener la reacción con 100 µl de ácido fluohídrico.

12.Leer la reacción en un lector de policubetas Dynatech mr 4000 a 410 nm.

NOTA: Colocar siempre blanco y controles positivos y negativos.

Titulación de antigamma globulina humana marcada con peroxidasa

Existen preparados comerciales de diferente calidad, es nesesario controlar cada lote y titular para cada equipo de lectura. La dilución óptima será aquella que permita diferenciar tres grupos de suero controles positivos alto, bajo y negativo.

Se realiza el mismo procedimiento empleando diluciones del conjugado mayores y menores que las especificadas por el fabricante con buffer PBS/T; cada dilución de conjugado debe ser probada con los sueros controles.

Procedimiento para elegir la dilución de conjugado

Sueros	Dilución del Conjugado			Conjugado de Referencia
	1/1000	1/2000	1/4000	1/2000
Negativo	Pos	Neg	Neg	Neg
Positivo	Pos	Pos	Neg	Pos

En el ejemplo, la dilución de elección es 1/2000 dado que los resultados son idénticos a los del conjugado de referencia.

WESTERN BLOT PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *TOXOCARA*.

Esta técnica se basa en la absorción pasiva del antígeno a una fase sólida (superficie de Nitrocelulosa); el antígeno se pone en contacto con la dilución adecuada de suero, luego se adiciona antigamaglobulina específica unida a una enzima (conjugado) y por último se agrega el sustrato enzimático correspondiente, produciendo una coloración característica.

El color es directamente proporcional a la cantidad de conjugado ligado al complejo antígeno anticuerpo, en consecuencia a la cantidad de anticuerpo presentes en la muestra.

Materiales: Pipetas automáticas de 10 a 50 μ l.
Pipetas multicanal de 50 a 200 μ l.
Membrana de nitrocelulosa de 0.45 μ de poro.
Tubos para efectuar diluciones.
Papel de filtro Whatman N°1.
Marcadores resistentes al agua.
Heladera.
Baño María a 56°C.
Antígeno Escretor secretor de *Toxocara canis*.
Gammaglobulina humana G marcada con peroxidasa (Sigma cat :1881)
Buffer de fosfato PBS pH 7.4.
Tween 20 (Sigma p:1373).
Leche descremada en polvo (Difco laboratories cat: 0032-17-3 .
Diaminobencidina.
Agua Oxigenada 30 volúmenes(Merck 107210).
Controles de sueros positivos alto, medio, negativo.
Control de suero interno o de precisión.

Preparación de las soluciones:

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Mario Fatała Chabèn"

Solución Madre (10x) de PBS

Fosfato Disódico (Baker Analyzer 3828-00)

Fosfato Monopotásico (Merck.48739) 5.7 g

Cloruro de Sodio (Merck 106404) 84.0 g

Agua Destilada csp 1000ml

Solución de trabajo:

De la solución madre de PBS se toman 100 ml y se lleva a volúmen final de 1000 ml con agua destilada.

2-PBS / Leche descremada 1.5 % (PBS/l)

PBS pH 7.4 100 ml

Leche descremada 1.5 g

3-PBS / Leche descremada 5 % (PBS/5)

PBS pH 7.4 100 ml

Leche descremada 5 g

Solucion de lavado PBS /Tween 0.5 %

4-Sustrato

Diaminobencidina 10 mg

PBS 15ml

H₂O₂. 12µl

Procedimiento:

- 1 - Transferir el antígeno a la membrana.
- 2 - Bloquear de PBS/5 1 hora a temperatura ambiente.
- 3 - Lavar 3 veces con PBS / Twenn 0.5 % durante 5 minutos.

- 4 - Hacer diluciones 1/100 de los sueros en PBS/I
- 5 - Incubar las diluciones de suero con la membrana 1 hora a ta en cámara húmeda.
- 6 - Lavar 3 veces durante 5 minutos con PBS/ tween 0.5%
- 7 - Incubar con dilución del conjugado, 1 hora a ta.
- 8 - Lavar 3 veces durante 5 minutos con PBS/t 0.5 %
- 9 - Agregar sustrato, incubar 3 minutos, lavar con agua destilada.
- 10 - Leer la reacción visualmente.

NOTA: Colocar siempre blanco y controles positivos y negativos

INMUNOFLOURESCENCIA INDIRECTA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR TOXOCARA.

Se basa en que la unión antígeno anticuerpo específica es revelada por una antiInmunoglobulina G marcada con isotiocianato de fluoresceína y esta unión observada en un microscopio de fluorescencia.

- Materiales:**
- Pipetas de 10 a 50 μ l.
 - Cubreobjetos de 22 x 48 mm.
 - Policubetas para efectuar diluciones.
 - Cámara húmeda con palillos.
 - Papel de filtro.
 - Marcadores.
 - Jarras de koplím.
 - Improntas con cortes de larvas libres.
 - Antigammaglobulina humana G marcada con isotiocianato de fluoresceína.
 - Buffer de fosfato pbs ph 7.6
 - Glicerina buffereada.

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Mario Fatała Chabén"

Controles de sueros positivo negativo.

Control de suero interno.

Estufa a 37° C.

Heladera.

Baño María a 56° C.

Preparación de las soluciones:

Solución madre (10x):

Fosfato disódico

Fosfato monopotásico

Cloruro de sodio

Agua destilada

Solución de trabajo:

De la solución madre se toman 100 ml y se lleva a volumen final de 1000 ml con agua destilada.

Solución de glicerina:

Pbs ph 7.6 1 vol

Glicerina 9 vol

Titulación de antigamma globulina humana marcada con isotiocianato de fluoresceína.

Existen preparados comerciales de diferente calidad, es necesario controlar cada lote, titular para cada equipo microscópico y cada vez que se cambie la lámpara del mismo, ya que depende de la fuente de iluminación y del sistema óptico que se emplea.

La dilución óptima será aquella que permita diferenciar la fluorescencia presente en tres

grupos de suero controles, positivo alto, bajo y negativo

Procedimiento:

- 1 - Retirar las improntas del congelador.
- 2 - Lavar rápidamente con agua destilada para eliminar exceso de sales.
- 3 - Secar las improntas con papel de filtro whatman presionando suavemente o empleando corriente de aire.
- 4 - Rotular las improntas.
- 5 - Hacer diluciones seriadas con los sueros controles desde 1/16 hasta 1/2048.
- 6 - Incubar las diluciones de suero con el antígeno colocado en las improntas, 30 minutos a 37 ° C en cámara húmeda.
- 7 - Preparar diluciones del conjugado mayores y menores que las especificadas por el fabricante con buffer pbs ph 7.6 Cada dilucion de conjugado debe ser probada con los sueros controles.
- 8 - Retirar los preparados de la estufa y lavar 10 minutos con agitación en pbs ph 7.6
- 9 - Colocar el control de coloración inespecífica en cada determinación.
- 10 - Incubar con las diluciones del conjugado en estudio y con el conjugado de referencia, 30 minutos a 37 °C en cámara húmeda.
- 11 - Lavar como en el paso 8 y secar con papel de filtro o corriente de aire.
- 12 - Colocar una gota de glicerina buffereada y superponer un cubre objeto evitando la formación de burbujas.
- 13 - Lectura de la reacción.

Examinar los preparados con 400 aumentos para producir la excitación con sistema de iluminación de epifluorescencia.

Lectura positiva es la que presenta fluorescencia amarillo verdosa en la membrana del parásito.

Lectura negativa cuando se observan los parásitos de color rojo ladrillo o solamente hay fluorescencia en alguno de los polos o lados del parásito.

Ejemplo para la elección de la dilución de conjugado.

Sueros	Dilución del Conjugado			Conjugado de Referencia
	1/100	1/200	1/400	1/200
Negativo	1/16	Neg	Neg	Neg
Positivo (1/256)	1/512	1/256	1/128	1/256

En el ejemplo la dilución de elección es 1/200 cuyos resultados son idénticos a los del conjugado de referencia.

Mecanismo de la reacción:

- 1 - Inactivar los sueros 30 minutos a 56°C
- 2 - Preparar las diluciones de los mismos en buffer pbs.
- 3 - Repetir los pasos 1, 3, 4 y 6 de titulación de conjugado.
- 4 - Preparar la dilución de conjugado.
- 5 - Repetir desde el paso 8 al 13.
- 6 - Efectuar la lectura de la reacción.

El título está dado por la última dilución que se detecta.

Fluorescencia: actualmente se están informando a nivel internacional en unidades internacionales convirtiendo las diluciones en UI.

INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO (ELISA) PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *TRICHINELLA SPIRALIS*

- Materiales:
- Policubetas Maxisorb (NUNC)
 - Buffer carbonato-bicarbonato 0,05M pH 9,6
 - Buffer PBS 1x pH 7,2
 - Buffer citrato de sodio 0,05M pH5,5
 - Solución de lavado: PBS 1x / Tween20 0,05%
 - Solución de dilución de muestra y conjugado: PBS 1x / leche 5% (Molico)

OPD- H₂O₂ 100 vol

Procedimiento:

- 1 - Hervir el antígeno excretor- secretor 3 minutos, diluirlo en buffer carbonato a concentración de 5 µg/ ml.
- 2 - Pegar la placa con 100 µl de solución por well (500 ng/ well) over night a 4°C o 1 hora a 37°C.
- 3 - Volcar la solución y lavar una vez con 200 µl con Buffer PBS 1x pH 7,2.

Dilución de sueros:

Los sueros se diluyen en PBS 1x / leche 5% (Molico) en concentración 1/100.

- 1 - Sembrar los sueros por duplicado, junto a los blancos y los controles positivos y negativos 100 µl /well.
- 2 - Incubar 30' a 37°C en cámara húmeda o 1 hora a temperatura ambiente.
- 3 - Volcar y lavar rápidamente 3 veces con PBS 1x / Tween20 0,05% (200 µl/ well)

Conjugado:

- 1 - Se diluye apropiadamente en la misma solución usada para los sueros (se prepara en el momento de diluir los sueros).
- 2 - Incubar 1 hora a temperatura ambiente o 30' a 37°C en cámara húmeda.
- 3 - Volcar y lavar 2 veces con PBS 1x / Tween20 0,05% (200 µl/ well) y 1 vez con PBS 1x.

Revelado:

- 1 - Disolver 1 mg de OPD en 2 ml de Buffer citrato de sodio 0,05M pH5,5. Agregar 2 µl de H₂O₂ 100 vol.
- 2 - Sembrar 100 µl / well y mantener en oscuridad 15'
- 3 - Detener la reacción con HCl 3N 100µl/ well
- 4 - Leer a 492 nm

El cutoff de la placa se calcula como:

$$\left[\frac{(\sum \text{promedio de duplicado de sueros negativos})}{\text{N}^\circ \text{ sueros negativos (controles)}} \right] + 3\sigma$$

REACCIÓN INTRADÉRMICA DE MONTENEGRO PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *LEISHMANIA*.

Esta prueba intradérmica consiste en la aplicación de antígenos de Montenegro (o leishmanina) que se prepara a partir de promastigotes de *Leishmania panamensis* y *leishmania amazonensis* muertos, en una concentración final de 2×10^8 organismos por ml. Una prueba positiva no es diagnóstica de leishmaniasis activa; sólo indica que el paciente ha tenido contacto previo con el parásito.

Materiales: Jeringa de 1 ml con aguja 26 Gx 3/8 (tipo tuberculina)
Alcohol
Gasa
Antígeno de Montenegro
Bolígrafo
Papel blanco cortado en cuadros de 10x10 cm
Regla
Planilla de registro

Procedimiento:

1. Desinfectar el tapón de goma del frasco de antígeno de Montenegro.
2. Usando una técnica aséptica, tomar 0,1 ml de antígeno de Montenegro en una jeringa de tuberculina.
3. Limpiar con alcohol la cara medial del antebrazo derecho. Insertar la punta de la aguja intradérmicamente con el bisel hacia arriba. Introducir el antígeno lentamente, observando que se forme una pequeña pápula.
4. A las 24-48 horas se lee la prueba, llevando los papeles cortados:

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Mario Fatała Chabén"

- a) Identificar en el papel con lápiz los siguientes datos: Zona. Sector. N° de Casa. Nombre del paciente. Inicial del que la lee.
- b) Delimitar el área de induración con birome.
- c) Humedecer ligeramente el papel cortado en cuadro.
- d) Poner en contacto el papel con la piel demarcada con birome y presionar ligeramente. En el papel quedará dibujada el área.

TEST DE MICROELISA PARA EL DIAGNÓSTICO DE *FASCIOLA HEPÁTICA*

- Materiales:
- Agua destilada
 - Antígeno excretor-secretor de *Fasciola hepática*
 - Anti-IgG humana conjugada con peroxidasa
 - Baño termostático
 - Cámara húmeda
 - Improntas de 24 círculos de 3 cm de diámetro (Cell Line Ass. Inc. NY)
 - Micropipetas de volumen variable
 - Microplacas
 - Papel de filtro
 - PBS (buffer fosfato salino) pH 7.2
 - PBS/leche
 - Solución de sustrato
 - Sueros controles

Preparación de soluciones:

PBS pH 7.2

- Fosfato disódico 0.15 M 72.00 ml
- Fosfato monopotásico 0.15 M 28.00 ml
- Cloruro de sodio 8.40 g
- Agua destilada c.s.p. 1000.00 ml

PBS/leche

PBS pH 7.2 100.00 ml

Leche en polvo descremada 1.50 g

Solución de sustrato

OPD (ortofenil diamina) 1.00 mg

Acido cítrico pH 4.5 1.00 ml

Peróxido de hidrógeno 30 vol 2.00 μ l

Mecanismo de la reacción

Preparación de improntas con antígeno excretor-secretor de *Fasciola hepática*:

1. Diluir el antígeno liofilizado a una concentración de 20 ng/ μ l en agua destilada.
2. Colocar 10 μ l/celda de antígeno diluido.
3. Dejar secar a temperatura ambiente.
4. Colocar 10 μ l/celda de PBS/leche.
5. Incubar durante 40 min a temperatura ambiente en cámara húmeda.
6. Lavar 2 veces durante 5 min cada lavado en PBS manteniendo agitación constante.
7. Dejar secar a temperatura ambiente.
8. Guardar a 4°C hasta su uso (pueden ser almacenadas hasta 1 año).

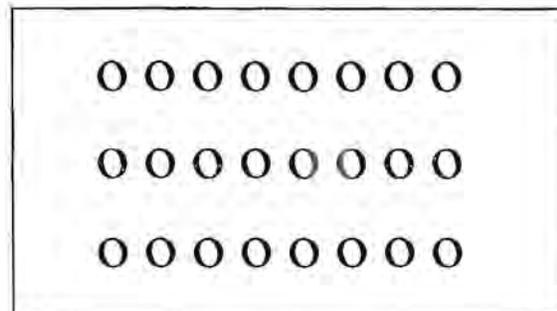
Preparación de diluciones de sueros

1. Inactivar los sueros en baño termostático durante 30 min a 56°C.
2. Diluir cada suero empleando microplacas 1:600 en PBS/leche.
3. Realizar la misma dilución para sueros controles positivos y negativos.

Desarrollo de la técnica

1. Colocar las improntas a temperatura ambiente 30 min antes de su uso.
2. Rotular las improntas en forma consecutiva e identificar los sueros utilizando

esquema.



3. Colocar 10 μ l de la dilución de suero en cada círculo de la impronta, realizando los ensayos por duplicado.
4. Incubar 20 min. a temperatura ambiente en cámara húmeda.
5. Enjuagar en PBS.
6. Lavar 2 veces durante 5 min. cada lavado en PBS manteniendo agitación constante.
7. Dejar secar a temperatura ambiente sobre papel de filtro.
8. Colocar 10 μ l de anti-IgG humana conjugada con peroxidasa diluída en PBS/leche en cada círculo de la impronta. Cada lote de reactivo deberá ser titulado antes de comenzar a utilizarse.
9. Incubar 20 min. a temperatura ambiente en cámara húmeda.
10. Enjuagar en PBS.
11. Lavar 2 veces en PBS durante 5 min. cada lavado manteniendo agitación constante.
12. Enjuagar en agua destilada.
13. Dejar secar a temperatura ambiente sobre papel de filtro.
14. Colocar 5 μ l de solución de sustrato en cada círculo de la impronta.
15. Incubar 10 min. a temperatura ambiente en cámara húmeda y oscuridad.

Lectura de la reacción

- I. Examinar los resultados por observación visual de la reacción colorimétrica, iniciando con los sueros controles.

Lectura positiva: color marrón-amarillento en el círculo de la impronta.

Lectura negativa: círculo de la impronta totalmente transparente.

Nota: Las placas pueden ser leídas a 495 nm.

TEST DE ELISA PARA EL DIAGNÓSTICO DE *FASCIOLA HEPÁTICA*

Materiales: Agua destilada

Antígeno excretor-secretor de *Fasciola hepática*

Anti-IgG humana conjugada con peroxidasa

Baño termostático

Buffer carbonato 0.05 M pH 9.6

Cámara húmeda

Estufa a 37°C

Micropipetas de volumen variable

Microplacas

Papel de filtro

PBS (buffer fosfato salino) pH 7.2

PBS/Tween

PBS/Tween/Albúmina

Policubetas de fondo plano 96 celdas Polysorp Nunc-Immuno Plate

Solución de sustrato

Sueros controles

Preparación de soluciones:

Buffer carbonato 0.05 M pH 9.6

Bicarbonato de sodio 0.1 M 500.00 ml

Carbonato de sodio 0.1 M c.s.p. pH 9.6, aprox. 500.00 ml

PBS pH 7.2

Fosfato disódico 0.15 M 72.00 ml

Fosfato monopotásico 0.15 M 28.00 ml

Cloruro de sodio 8.40 g

Agua destilada c.s.p. 1000.00 ml

PBS/Tween

PBS pH 7.2 100.00 ml

Tween 20 50.00 μ l

PBS/Tween/Albúmina

PBS pH 7.2 100.00 ml

Tween 20 50.00 μ l

Albúmina bovina 3.00 g

Solución madre de ABTS

ABTS (2,2'-azino diethyl tiazolin sulfonic acid) 25.50 mg

Agua destilada 1.25 ml

Solución de trabajo de sustrato

Acido cítrico 0.05 M pH 3.5 12.00 ml

Solución madre de ABTS 50.00 μ l

Peróxido de hidrógeno 30 Vol 50.00 μ l

Mecanismo de la reacción

Preparación de policubetas con antígeno excretor-secretor de *Fasciola hepática*:

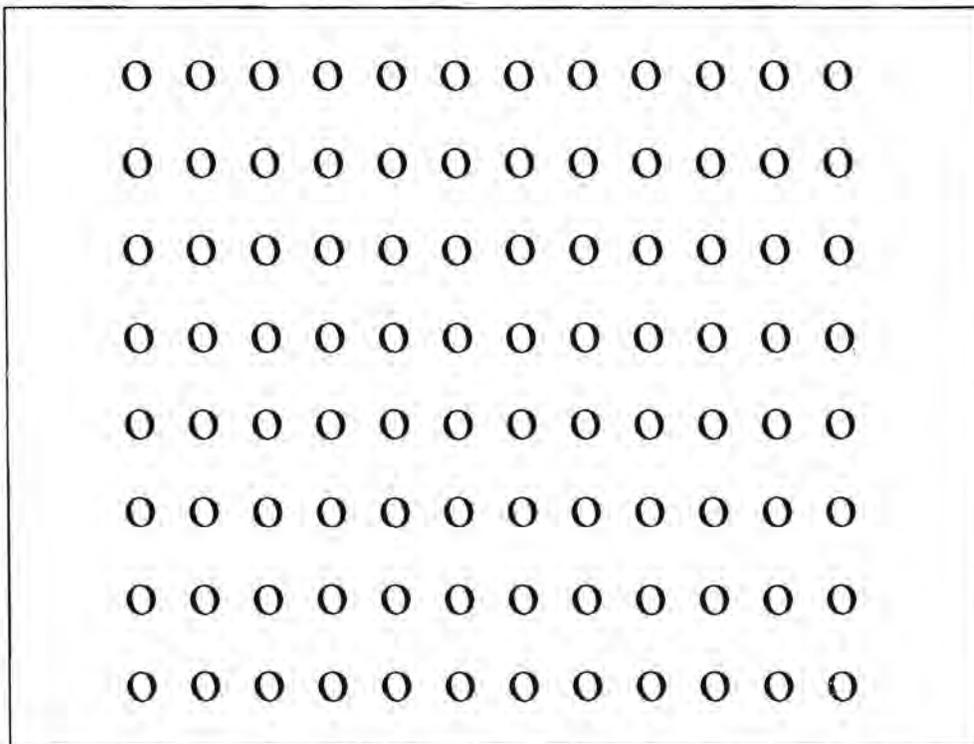
1. Diluir el antígeno liofilizado a una concentración de 40 μ g/ml en buffer carbonato.
2. Colocar 100 μ l/celda de antígeno diluido.
3. Incubar durante 3 h a 37°C en cámara húmeda.
4. Incubar o.n. a 4°C en cámara húmeda.

Preparación de diluciones de sueros

1. Inactivar los sueros en baño termostático durante 30 min a 56°C.
2. Diluir cada suero empleando microplacas 1:800 en PBS/Tween/Albúmina.
3. Realizar la misma dilución para sueros controles positivos y negativos.

Desarrollo de la técnica

1. Rotular las policubetas en forma consecutiva e identificar los sueros utilizando el esquema:



2. Volcar el antígeno por inversión y lavar tres veces por durante 3 min. cada lavado con 200 µl/celda de PBS/Tween.
3. Colocar 100 µl de PBS/Tween/Albúmina en cada celda.
4. Incubar 30 min. a 37 °C en cámara húmeda.
5. Volcar el bloqueante por inversión y lavar tres veces durante 3 min. cada lavado con 200 µl/celda de PBS/Tween.
6. Colocar 100 µl de la dilución de suero en cada celda, realizando los ensayos por

duplicado.

7. Incubar 30 min. a 37°C en cámara húmeda.
8. Volcar los sueros por inversión y lavar 3 veces durante 3 min. cada lavado con 200 µl./celda de PBS/Tween.
9. Colocar 100 µl de anti-IgG humana conjugada con peroxidasa diluída en PBS/Tween/Albùmina en cada celda. Cada lote de reactivo deberá ser titulado antes de comenzar a utilizarse.
10. Incubar 30 min. a 37°C en cámara húmeda.
11. Volcar el conjugado por inversión y lavar 3 veces durante 3 min. cada lavado con 200 µl./celda de PBS/Tween.
12. Colocar 100 µl de la solución de trabajo de sustrato en cada celda.
13. Incubar 10 min. a 37°C en cámara húmeda.

Lectura de la reacción

I. Leer absorbancia en lector de policubetas a 410 nm

Lectura positiva: $A_{410} > 0.35$

Lectura negativa: $A_{410} < 0.35$

3 - CONTROL DE CALIDAD DEL DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA INFECCIÓN POR T. CRUZI.

Teniendo en cuenta las condiciones que existen en Argentina para la realización de la serología de Chagas:

1. se realiza en laboratorios de muy diferente estructura y recursos, establecidos en lugares muy distantes uno de otros, y
2. se trata de un diagnóstico serológico que debe realizarse con por lo menos dos

métodos para cubrir un rango de sensibilidad lo más alto posible, pues se usan reactivos antigénicos variados, provenientes de cultivos de *T. cruzi*.

El Instituto Nacional de Parasitología, Referencia Nacional, diseñó y desarrolla un Programa de Garantía de Calidad del Diagnóstico, contemplando múltiples factores cuya variabilidad impacta en los resultados de las pruebas diagnósticas y que deben ser sistemáticamente considerados en su control mejoramiento, para asegurar la confiabilidad de esos resultados en el país. Este diseño está basado fundamentalmente en:

- operar con una Red de Laboratorios, con Centros de Referencia Provincial y respetando la autonomía de estos distritos para determinar su cabecera y estructura de red interna.
- un enfoque de múltiples miradas para el control y el mejoramiento de la calidad del diagnóstico, según el siguiente esquema:

Todo Laboratorio que realice el Diagnóstico de Chagas, cualquiera sea su tamaño y estructura deberá tener un Programa de Control de Calidad Interno, debiendo considerarse en el mismo:

- 1 - Política de organización.
- 2 - Capacitación técnica permanente del personal,
- 3 - Uso de Procedimientos Operativos Estándar validados por el Centro Referencial, para 4
- 4 - Diagnóstico y Control de Calidad,
- 5 - Trabajo bajo Buenas Prácticas de Laboratorio,
- 6 - Trabajo con Reactivos controlados,
- 8 - Monitoreo de Calidad de Procesos Interno (curvas o registro de Sueros de Control diarios),
- 9 - Control Externo de Calidad, por el Centro Referencial correspondiente.

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Mario Fatala Chabén"

Se recomienda a los laboratorios tomar como guía del estado de funcionamiento de las reacciones serológicas, el registro diario de resultados de sueros de control o la confección Curvas de Control, graficando diariamente esos resultados.

A continuación se describen los procedimientos para confeccionar los sueros de control, las Curvas de Control, y una orientación para la toma de decisiones en el trabajo diario de laboratorio.

a)- Confección de suero de control

De los sueros analizados en la rutina diaria se seleccionarán aquellos positivos o negativos por dos o tres técnicas, los que se conservarán a -20°C . Los sueros seleccionados deberán ser frescos, no lipémicos, no hemolizados, límpidos y sin coloraciones anormales. Cuando se cuente con suficiente cantidad de sueros, estos se descongelarán para hacer "pooles", de no más de 10 sueros.

Luego de hacer los "pooles", se les adicionará igual volúmen de glicerina neutra y se lo fraccionará en alícuotas. Las mismas se conservarán a -20°C hasta su uso en las determinaciones diarias. Es conveniente preparar sueros de control en cantidad suficiente para 4-6 meses, como mínimo, tomando nuevas alícuotas cada día. Es aconsejable confeccionar 2 sueros de control reactivos, uno de baja y otro de alta reactividad.

b)- Confección de la Curva de Control y su uso.

Ejemplo: Curva de control para ELISA

Diariamente deberán incluirse con el procesamiento rutinario de las muestras, alícuotas de sueros de control REACTIVO y otra de suero control NO REACTIVO.

Con los resultados diarios de por lo menos 30 determinaciones, se determinan la Media (\bar{X}) y la Desviación Estándar (S), ver ejemplo en la figura adjunta para la reacción de ELISA. Los resultados diarios de los sueros de control deberán registrarse en una planilla designada para este fin y con los mismos datos se puede construir la curva, como se

ejemplifica en la figura adjunta.

Para aceptar los resultados de la analítica de cada día, los mismos deberán estar entre los siguientes límites:

Suero de Control REACTIVO = entre $\pm 2S$.

Suero de Control NO REACTIVO = no > que el Título de corte.

En el ejemplo de la figura la prueba de ELISA tiene un título de corte de 0,200 Densidad Óptica (lectura a 490 nm).

Control de las pruebas cualitativas:

Para este tipo de pruebas también deben incluirse en la rutina sueros de control REACTIVOS y NO REACTIVOS y registrar sus resultados en una planilla especialmente destinada para esto.

Para aceptar el proceso de análisis, todos los días, estos sueros deberán cumplir la condición de dar resultados:

REACTIVO para sueros de control REACTIVOS y

NO REACTIVO para los sueros de control NO REACTIVOS.

Análisis fuera de control y medidas correctivas:

Cuando los resultados de los sueros de control caen fuera de los límites permitidos (o no cumplen las condiciones, para pruebas cualitativas) se debe rechazar el proceso del día y proceder a detectar los errores para corregirlos, de la siguiente forma:

1 - Revisar las posibles causas de error, controlando si hubo cambios de operador, diluciones, buffers, conjugados, microscopio o espectrofotómetro, etc. Repetir el proceso, habiendo o no hallado la causa de error.

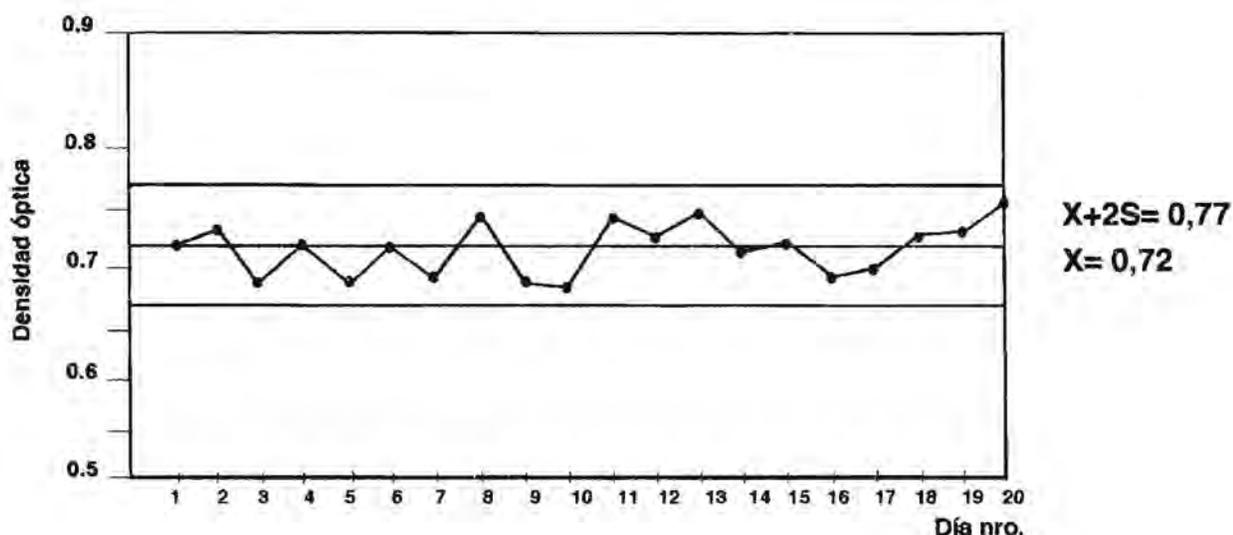
2 - Sí se reiteran estas situaciones deberá tenerse en cuenta si ocurren siempre hacia un

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Marlo Fatała Chabén"

mismo lado (sesgo de mayor o menor sensibilidad) y de todas maneras en este punto deberá revisarse todo el sistema de la prueba. Deberán recalibrarse los materiales con nuevos sueros de referencia.

	REACTIVO	NO REACTIVO
Día N°	D.O. 490 nm	D.O. 490 nm
1	0.720	0.101
2	0.732	0.094
3	0.690	0.098
4	0.716	0.082
5	0.689	0.094
6	0.721	0.076
7	0.696	0.088
8	0.743	0.111
9	0.690	0.098
10	0.680	0.092
11	0.740	0.079
12	0.722	0.095
13	0.743	0.098
14	0.711	0.099
15	0.720	0.102
16	0.688	0.075
17	0.692	0.096
18	0.726	0.074
19	0.730	0.082
20	0.752	0.076
	$X = \sum X_i/n = 0.72$	
	$S = 0,027$	

3. Si aún así no pudiera resolverse el problema, deberá solicitarse la visita de un experto al Laboratorio de Referencia.



INTERPRETACIÓN DEL DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO, VENTAJAS Y LIMITACIONES.

El resultado positivo del diagnóstico parasitológico es la certificación de infección por *T. cruzi*. Sin embargo por la modalidad de esta parasitosis, un resultado negativo no indica necesariamente ausencia de infección.

El resultado serológico reactivo es indicativo de infección y no del estado clínico del paciente. El mismo servirá de orientación al médico junto con el examen clínico y los antecedentes para llegar al diagnóstico del estado de salud del paciente.

Los resultados serológicos serán informados con títulos obtenidos para cada reacción utilizada. Si bien hasta ahora los títulos serológicos no han mostrado tener correlación con la patología chagásica se recomienda informarlos junto al resultado reactivo. Estos datos tienen significación diagnóstica en los casos de seguimiento, del niño hijo de madre chagásica y de los pacientes inmunosuprimidos.

En el caso de encontrar resultados "No Concordantes" entre las dos pruebas serológicas empleadas, se recomienda:

- a) repetir nuevamente ambos ensayos, para descartar errores operativos.
- b) efectuar una tercera reacción serológica o remitir la muestra a un laboratorio de mayor complejidad para su resolución.
- c) en caso de persistir la discordancia de resultados, analizar una nueva muestra en un lapso de 20 a 30 días.

4 - PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE USO CORRIENTE

SOLUCIONES UTILIZADAS EN EL DIAGNOSTICO DE LEISHMANIASIS

1. PBS (Solución Salina tamponada con fosfato)

Solución 1

Fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4) 4,75 grs.

Cloruro de Sodio (Na Cl) 5,00 grs.

Agua destilada 1.000 cm.³

Solución 2

Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) 4,53 grs.

Cloruro de Sodio (Na Cl) 5,00 grs.

Agua destilada 1.000 cm.³

Cada una de las soluciones se prepara y se esteriliza separadamente.

Para hacer la solución de trabajo se mezclan:

ocho partes de solución 1

dos partes de solución 2

El PH debe ajustarse a 7.2

2. PBS + antibiótico

La forma de preparar la solución primaria de penicilina/estreptomicina varía según la presentación de estos antibióticos. Los antibióticos deben reconstituirse en solución salina fisiológica estéril, a fin de lograr una concentración final así:

Penicilina 5.000 U por ml

Solución Primaria

Estreptomicina 10 mg. por ml

Para obtener la solución de trabajo (PBS + antibiótico) se diluye la solución primaria de PBS como sigue:

Solución primaria 1 ml

Soluciones de Trabajo

PBS: 9 ml

Esto da una solución 1:10, con una concentración final de 1000 U de penicilina y 1000 ug de estreptomicina por ml.

NOTA: Se recomienda mantener la solución congelada hasta el momento de usar.

3. Colorante de Giemsa

Solución Stock:

Colorante de Giemsa en polvo, certificado 0,75 grs.

Alcohol metílico puro 65,00 cc

Glicerina pura 35,00 cc

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Mario Fatała Chabén"

Poner todo lo anterior en una botella oscura con cuentas de vidrio. Agitar bien la botella seis a diez veces al día hasta que todo quede completamente mezclado. Mantener bien tapado siempre. No necesita calor. Usar después del tercer día.

Solución Buffer de fosfato:

Fosfato de Sodio (Na_2PO_4) 6,00 grs

Fosfato de Potasio (KH_2PO_4) 5,00 grs

Mezclar en un mortero. Usar 1 gr de esta mezcla para preparar la solución en 1000 ml de agua destilada. El PH debe quedar en 7.0

Giemsa diluido para tinción de láminas:

Solución Stock de Giemsa 1 ml

Buffer de Fosfato 50 ml

NOTA: Se recomienda preparar esta dilución en el momento de usarla.

4. Preparación del medio de Senekjie (Seneca)

Material: Extracto de carne (Bacto Beef Extract) 3 grs

Agar en polvo 20 grs

Peptone 20 grs

NaCl 5 grs

Agua destilada 1000 ml

Sangre de conejo defibrinada 150 ml

Procedimiento:

- Disolver el extracto de carne en el agua destilada y calentar a $55-60^\circ\text{C}$ durante 20 minutos, y luego aumentar la temperatura a 80°C por 5 minutos.
- Bajar la temperatura a $55-60^\circ\text{C}$, agregar el agar, peptona, y NaCl. Mantener a esta temperatura durante 20 minutos.
- Retirar del calor, llevar a pH 7.2, agregando NaOH 1N
- Esterilizar en autoclave

- Cuando la temperatura baje a 50-55% C agregar estérilmente la sangre defibrinada de conejo, mezclar y colocar en los tubos.
- Dejar los tubos inclinados al medio ambiente durante dos horas y luego guardar en heladera.

Sangre desfibrinada de conejo: en un Erlenmeyer estéril con perlas de vidrio, desfibrinar la sangre agitando 15 minutos seguidos, luego pasar a una probeta estéril, medir y agregar después el medio.

5. Soluciones fijadoras

1 Solución de formol al 10%

Formol al 40% 100 ml

Agua destilada 900 ml

2.- Solución de formol-buffer al 10%

Formol al 40% 100 ml

Fosfato monobásico de Sodio (NaH_2PO_4) 4 g

Fosfato dibásico de Sodio anhidro (Na_2HPO_4) 6.5 g

Agua destilada 900 ml

3.- Solución de Bouin:

Solución acuosa saturada de ácido pícrico 750 ml

Formol al 40% 250 ml

Acido acético glacial 50 ml

Fijar en esta solución el tejido durante 2 a 12 horas dependiendo del tamaño de la muestra. Luego de la fijación (2 horas para una toma de menos de 1 cm) lavar con alcohol 50% hasta que no haya vestigios de ácido pícrico. Almacenar en alcohol 70% hasta su procesamiento.

MEDIO PARA CULTIVO DE *T. CRUZI* (BHT)

Brain heart infusion 37 g/l
Tryptosa 3 g/l
PO₄ Na 2H₂O 4 G/L
KCl 0.4 g/l
Glucosa 0.3 g/l
H₂O dest. c.s.p.

Disolver y agregar Hemina (0.02 g/l). Autoclavar a 1 atm., 15 min.
Agregar 10 % de suero fetal bovino inactivado y Penicilina (200.000 U/l) - Streptomina (200 mg/l).

Fase sólida:

Nutrient agar Difco
Suero desfibrinado de conejo al 15%

SOLUCIONES UTILIZADAS EN EL DIAGNOSTICO DE ENTEROPARASITOSIS Y OTRAS PROTOZOOSIS DE INTERES SANITARIO

1. Solución Salina Formolada

- Cloruro de sodio 8.5 - 9.0 g
- Formol 40% 50.0 ml
- Agua destilada 1000.0 ml

2. Solución de Cloruro de Mercurio Acuoso Saturado (*)

• Cloruro mercúrico cristales (Cl₂Hg) 110 g
• Agua destilada 1000 ml

1- Disolver los cristales de cloruro mercúrico, calentando la mezcla (sin hervir, se puede realizar en Baño María).

2-Dejar enfriar lentamente hasta que precipite el exceso de cristales.

3-Filtrar la solución sobrenadante en el momento de usar.

4-Conservar en frasco caramelo con tapón de vidrio la solución stock sin filtrar

3. Solución fijadora de alcohol polivinílico (PVA)

- PVA (polvo) 10 g
- ETOH 95% 62.5 ml
- Cloruro de mercurio aq.sat(*) 125 ml
- Acido acetico glacial 10 ml
- Glicerina 3 ml

- 1- Mezclar los ingredientes líquidos en un vaso de precipitado adecuado al volumen a preparar.
- 2- Agregar el polvo de PVA (se recomienda no agitar).
- 3- Cubrir el vaso con papel encerado grueso o metálico y dejar remojar durante toda la noche.
- 4- Calentar lentamente la solución hasta 75°C, cuando se alcance dicha temperatura retirar el vaso y agitar la mezcla hasta obtener una solución homogénea ligeramente lechosa (30 segundos). El calentamiento es aconsejable hacerlo en Baño María.

NOTA: El fijador de PVA permanece estable durante largo período de tiempo (meses o años) en recipientes cerrados. Si se guarda fraccionado en pequeños volúmenes puede volverse viscoso y blanquecino después de 2. ó 3 meses, y debe descartarse.

4. Fijador de Schaudinn

Solución de reserva:

- Cloruro mercúrico pq. saturado 600 ml
- ETOH 95° 300 ml

- 1- Filtrar la solución aq. saturado de cloruro mercúrico en un frasco de 1 litro con tapón de cristal.
 - 2-Agregar el ETOH 95° y mezclar agitando el frasco.
 - 3-Rotular la botella y anotar la fecha de elaboración.
- La solución de reserva se conservará indefinidamente (1 año o más).

NOTA: El fijador de Schaudinn es utilizado para conservar materia fecal reciente o material recuperado del revestimiento de la mucosa intestinal.

Solución de trabajo:

- | | |
|---|--------|
| -Solución fijadora de Schudinn de reserva | 100 ml |
| -Acido acético glacial | 5 ml |

1- Medir la solución de reserva fijadora de Schaudinn en un erlenmeyer de 250 ml con tapón de cristal.

2-Agregar el ácido acético glacial y mezclar agitando la botella.

3-Rotular y anotar la fecha de elaboración.

4-La solución se conservará durante 2-3 meses.

ADVERTENCIA: El Cl_2Hg es sumamente tóxico. El ácido acético glacial es muy corrosivo. El ETOH es inflamable.

5. Solución salina sobresaturada

A un volumen de agua destilada en ebullición agregar cloruro de sodio (sal común de mesa) hasta que se observe que no hay disolución. Dejar enfriar a temperatura ambiente y luego medir densidad que debe ser de 1200 g/cm³ aproximadamente. Guardar hasta su uso sin filtrar.

6. Solución saturada de azúcar (Sheather)

- | | |
|-------------------|----------|
| - Sacarosa | 500.0 g |
| - Fenol cristales | 6.5 g |
| - Agua destilada | 320.0 ml |

Calentar el agua destilada a ebullición. Retirar el mechero, agregar el resto de los componentes y agitar con varilla hasta su disolución.

7. Solución de hidróxido de sodio 0.1N

- | | |
|---------------------------------|-----------|
| - Hidróxido de sodio (lentejas) | 4.0 gr |
| - Agua destilada | 1000.0 ml |

Mezclar con cuidado porque el hidróxido de sodio es muy cáustico. Guardar hasta su uso.

8. Solución de lugol

- Ioduro de potasio 10.0 g
- Iodo metálico bisublimado 5.0 g
- Agua destilada 100.0 ml

Disolver el ioduro de potasio en un pequeño volumen de agua destilada, añadir lentamente el iodo metálico agitando hasta su disolución. Filtrar y guardar en frasco color caramelo. Diluir 5 veces antes de usar.

9. Carbol - fucsina

Solución A

- Fucsina básica 0.3 g
- Etanol 95° 10.0 ml

Solución B

- Fenol cristales 5.0 g
- Agua destilada 95.0 ml

Preparar ambas soluciones por separado y luego mezclar

10. Ligh-green stain

- Ligh-green SF yellowish 0.2 g
- Acido acético glacial 0.2 ml
- Agua destilada 100.0 ml

11. Azul de metileno

- Azul de metileno 0.3 g
- Etanol 95° 30.0 ml
- Agua destilada 100.0 ml

Se disuelve el colorante en alcohol y se mezcla luego con agua.

12. Colorante de Bailenger

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Mario Fatała Chabén"

- Verde sólido FCF	1.5 g
-Cristales de ácido fosfotúngstico ($H_3(PO_4(W_{12}O_{36}).5H_2O)$)	7.0 g
-Acido Acético Glacial (CH_3COOH)	10.0 ml
-Agua destilada	1000.0 ml

- 1- Pesar los colorantes por separado y colocarlos en un recipiente adecuado.
- 2- Pesar los cristales de ácido Fosfotúngstico y agregarlo al recipiente que contiene los colorantes.
- 3-Agregar el ácido acético glacial a los componentes secos.
- 4-Mezclar para humedecer los colorantes con el ácido y dejar reposar 30 minutos para su maduración.
- 5-Agregar el agua destilada y mezclar bien.
- 6-Guardar el colorante en frasco caramelo bien cerrado (rotular y anota fecha de elaboración).

El colorante bien preparado es de color morado oscuro (púrpura) o negro. Se conservará durante un año o más.

Renovar la solución cuando se vuelva verdosa (mover el frasco y si el colorante de las paredes está más verde que violeta sustituirlo)

* El colorante Verde Sólido FCF puede ser sustituido por Verde Claro SF utilizando, por lo tanto 3 gramos de éste último.

14. Solución de Alcohol 70° con Iodo de D'antoni

- Iodo metálico bisublimado	5.0 g
- Ioduro de Potasio	10.0 g
- Etanol 70°	100.0 ml

Disolver el ioduro en un pequeño volumen de alcohol, añadir lentamente el iodo metálico agitando hasta su disolución.

Completar el volumen con etanol. Guardar herméticamente cerrado en fresco color caramelo, al abrigo de la luz.

15. Solución colorante de Tionina.

-Tionina en polvo	10.0 mg
-Agua destilada	100.0 ml

Mezclar los componentes en un recipiente adecuado. Filtrar con papel de filtro varias veces, hasta que no se produzca precipitación de los cristales de tionina.

16. Eosina al 1%

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Mario Fatała Chabén"

- Eosina amarilla 1.0 g
- Agua destilada 100.0 ml

17. Solución de cristal violeta

Solución A

- Anilina 2.0 ml
- Agua destilada 88.0 ml

Solución B

- Cristal violeta 5.0 g
- Etanol 95° 10.0 ml

Mezclar las soluciones A y B filtrar antes de usar (estables tres meses)

18. Solución Iodo de Gram

- Ioduro de Potasio (IK) 2.0 g
- Iodo metálico bisublimado(I₂) 1.0 g
- Agua destilada c.s.p 300.0 ml

Disolver el ioduro de potasio en un pequeño volumen de agua destilada, añadir lentamente el iodo metálico agitando hasta su disolución. Completar a volumen con agua destilada. Filtrar y guardar en frasco color caramelo.

19. Solución de Azul de Toluidina O

- Azul de Toluidina O 0.15 g
- Agua destilada 30.00 ml

Mezclar los componentes y agitar vigorosamente para disolver.
Agregar en el siguiente orden:

- Acido Clorhídrico concentrado (HCl) 1.00 ml
- Etanol absoluto (100°) 70.00 ml

Guardar el frasco con tapa a rosca, es estable a temperatura ambiente durante 6 meses.

20. Solución de Aceite de anilina-xileno

- Anilina 1 parte

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Mario Fatała Chabén"

-Xilol 1 parte

21. Reactivo de Sulfatación

-Eter etílico 40.0 ml
-Agua destilada 15.0 ml

Colocar los reactivos en una ampolla de decantación.

Agitar manteniendo el tapón flojo para eliminar el exceso de presión. Eliminar la fase acuosa (inferior).

Repetir una vez más el procedimiento. Es conveniente eliminar 5 ml de éter. Transferir los 35 ml de éter restantes a un frasco que se mantiene en baño de agua fría con hielo y agregar lentamente:

Acido Sulfúrico 35.0 ml
Debe quedar una solución transparente o levemente amarillenta.

22. Solución de Acido Crómico al 5%

-Trióxido de cromo (CrO_3) 5.0 g
-Agua destilada 100.0 ml

23. Solución de Bisulfito de Sodio al 1 %

-Bisulfito de Sodio (NaHSO_3) 1.0 g
-Agua destilada 100.0 ml

24. Solución de Nitrato de Plata al 5%

-Nitrato de Plata (AgNO_3) 5.0 g
-Agua destilada 100.0 ml

Guardar en frasco caramelo.

25. Solución de Hexametilén - tetramina al 3%

-Hexametilén-tetramina 3.0 g
-Agua destilada 100.0 ml

26. Solución de Bórax al 5%

- Borato de Sodio ($\text{NaB}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 5.0 ml
- Hexametilén tetramina al 3% 100.0 ml

Mezclar los componentes y agitar hasta disolver el precipitado blanco. La solución clara resultante es estable a 4°C.

27. Solución stock de Metanamina-Plata

- Nitrato de plata 5% 5.0 ml
- Hexametilén-tetranlina 3% 100.0 ml

Mezclar los componentes en un recipiente adecuado, agitando hasta disolver el precipitado blanco.

La solución clara resultante es estable a 4°C.

28. Solución de Trabajo de Metanamina-Plata

- Solución stock de metanamina plata 25.0 ml
- Agua destilada 25.0 ml

Agregar en el momento de usar:

- Bórax al 5% 2.0 ml

29. Solución de Tiosulfato al 2%

- Tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 2.0 g
- Agua destilada 100.0 ml

30. Solución de cloruro de Oro al 0.1 %

- Cloruro de Oro ($\text{AuCl}_3\text{ClH} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 1.0 g
- Agua destilada 100.0 ml

Esta solución puede usarse repetidamente.

31. Solución stock de Light-green (Verde Luz)

- Light -green SF yellowish 0.2 g
- Agua destilada 100.0 ml
- Acido acético glacial 0.1 ml

32. Solución de trabajo de Light-Green

- Solución stock de Light-Green 1 parte
- Agua destilada 100.0 ml

33. Etanol 70°

-Etanol absoluto	100.00 ml
-Agua destilada	45.75 ml

34. Etanol 90°

-Etanol absoluto	100.00 ml
-Agua destilada	13.25 ml

35. Etanol 90° acidificado con ácido acético 1 %

-Etanol 90°	99 ml
-Acido acético glacial	1 ml

36. Fijador PAF (fenol-alcohol-formol)

- Cristal de fenol	20 g
- Solución salina isotónica (0.85%)	825 ml
- Solución de formaldehído al 40% o 37%,	50 ml

Disolver los cristales de fenol (20 g) en 825 ml de solución salina isotónica (0,85%), agregar etanol al 95% (125 ml) y formaldehído al 40% o 37% (50 ml).

Mezclar bien y guardar tapado en lugar fresco.

Los 20 g de fenol en cristal pueden, ser reemplazados por 23 ml de fenol líquido.

Nota: Buen rendimiento para diagnóstico de quistes y trofozoitos protozoos y huevos de helmintos. Se obtiene también muy buen rendimiento en el diagnóstico de Entamoeba histolytica (Trofozoitos y quistes).

37. Colorante Tricrómico modificado

- Cromotrope 2R	6.00 g
- Fast Green	0.15 g
- Acido fosfotúngstico	0.70 g
- Acido acético glacial	3.00 ml

Mezclar los reactivos y dejar reposar 30 min.

Luego agregar

- Agua destilada	100.0 ml
------------------	----------

38. SAF, Solución Acética formolada

- Acetato de sodio 18 g
 - Acido acético 20 ml
 - Agua destilada 940 ml
 - Formol comercial 40 ml
 - Glicerina 20 ml
- 39. PAF, Fenol (Phenol), Alcohol, Formol**

- Solución fisiológica 815 ml
- Fenol líquido 20 ml
- Alcohol 95° 125 ml

Para disponer de fenol líquido se lo debe calentar a bañomaría y lue-go agregar un 5 % de agua destilada, cuando se enfría no se solidifica. Tiene la ventaja que en lugar de pesar el fenol, muy higroscópico e irritante, se mide el volumen indicado.

40. MIF, Merthiolate, Lugol (Iodide), Formol

Solución A

- Agua destilada 500 ml
- Merthiolate 400 ml
- Glicerina 10 ml
- Formol comercial 50 ml

Solución B

- Agua destilada 500 ml
- Ioduro de potasio IK 10 g
- Yodo metálico 5 g

Solución para usar

- Solución A 47 ml
- Solución B 3 ml

Para preparar la solución B, es conveniente disolver el Ioduro en agua destilada y luego ir agregando el Yodo lentamente. La solución A y B se mezclan en el momento que va a ser utilizada.

SOLUCIONES UTILIZADAS EN EL DIAGNOSTICO DE HIDATIDOSIS, TRIQUINOSIS Y TOXOCARIASIS

1. PBS

Soluciones madres:

		1 X	5 X	10 X
Fosfato dibásico de potasio 0.15 M	KH_2PO_4	0.57 g	2.85 g	5.7 g
Fosfato de sodio 0.15 M	Na_2HPO_4	1.53 g	7.65 g	15.3 g
Cloruro de Sodio	ClNa	8.4 g	42 g	84 g
Agua destilada csp		1000 ml	1000 ml	1000 ml

La solución 1 X llevar a pH 7.4 y estará lista para usar.

La solución 5X: colocar 200 ml de esta solución madre y llevar a 1000 ml con agua destilada. Llevar a pH 7.4.

La solución 10 X; colocar 100 ml de esta solución madre y llevar a 1000 ml con agua destilada. Llevar a pH 7.4

2. Buffer Lavado de DD5 0.1M

		1 X	10 X
Fosfato dibásico de potasio	KH_2PO_4	0.2 g	2 g

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Mario Fataia Chabén"

Fosfato monobásico de potasio	K_2HPO_4	1.5 g	15 g
Cloruro de Sodio	ClNa	7.6 g	76 g
Agua destilada csp		1000 ml	1000 ml

La solución 1 X llevar a pH 7.4 y estará lista para usar

La solución 10 X; colocar 100 ml de esta solución madre y llevar a 1000 ml con agua destilada. Llevar a pH 7.4

3. Agar Noble

Buffer de lavado de DD5 caliente : 100 ml
Agar : 1.2 g

Agitar hasta que esté transparente

Agregar una punta de espátula de azida sódica como conservante

Fraccionar en tubos y conservar a 4° C

4. Colorante

Amido Schwarz 0.5 g
Ácido acético glacial 20.0 g
Agua destilada csp 1000 ml

Conservar en frasco color caramelo.

5. Decolorante

Alcohol etílico 400 ml
Acido acético glacial 100 ml
Agua destilada csp 1000 ml

6. ELISA

PBS - Tween 0.1%

PBS 1X pH 7.4 1000 ml

Tween 20 1 ml

Buffer Carbonato/Bicarbonato 0.1 M pH 9.6

				Agua destilada Csp
A	Carbonato de sodio anhidro	Na ₂ CO ₃	10.6 g	1000 ml
B	Bicarbonato de sodio	NaHCO ₃	8.4 g	1000 ml

A la solución A ir agregando la solución B hasta pH 9.6

Buffer TBS-FC-SNO-LECHE

Trizma base	0.1 M	1.21 g	6.05 g	12.1 g
CINa	0.3 M	1.75 g	8.75 g	17.5 g
Fosforilcolina (FC)	10 mM	0.257 g	1.285 g	2.57 g
Suero normal de oveja (SNO)	1 %	1 ml	5 ml	10 ml
Leche descremada en polvo	1.5%	1.5 g	7.5 g	15 g
Agua destilada csp		100 ml	500 ml	1000 ml

Sustrato: solución stock

BTS	27.50 mg
Agua Destilada	1.25 ml

Guardar a 4°C, en frasco color caramelo

Ácido fluorhídrico 0.1 M pH 3.2

Ácido fluorhídrico	
Agua Destilada csp	100 ml

Ajustar a pH 3.2

Ácido cítrico 0.05 M pH 3.5

Ácido cítrico	6.85 gr
Agua Destilada csp	1000 ml

Solución de trabajo de sustrato

Ácido cítrico 0.05 M pH 3.5	12 ml
Peróxido de hidrógeno diluído 1/16	50 µl
Solución stock de sustrato	50 µl

7. GELES - Western Blotting

Soluciones Stock

NOTA: Todas las soluciones de Acrilamida deberán manejarse con cuidado, utilizando guantes, ya que todas son drogas neurotóxicas y/o cancerígenas.
--

Solución A

Acrilamida (grado electroforético)	30 g
Bisacrilamida	0.8g
Agua Destilada csp	100 ml

Guardar en frasco color caramelo

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Mario Fatała Chabèn"

Solución B

Trizma base 18,15 g
Agua Destilada 50 ml

Llevar a pH 8.8 con HCl concentrado (aproximadamente 2.5 ml)
Completar a 100 ml finales con Agua Destilada

Solución C

SDS (dodecil sulfato de sodio) 5 gr
Agua Destilada csp 50 ml

Solución D

Trizma base 12 gr
Agua Destilada 80 ml

Llevar a pH 6.8 con ClH concentrado (aproximadamente 9 ml)

Completar a 200 ml finales con Agua Destilada

Persulfato de amonio (APS)

0.1 g en 1 ml agua destilada

Guardar alicuotado de 200 ul a -20°C

Buffer de Corrida

	1 X	10 X
Trizma base	1.5g	15 g
Glicina	7.2 g	72 g
SDS	1 g	10 g
Agua destilada csp	1000 ml	1000 ml

La solución 1X está lista para usar

A partir de la solución 10X, preparar una dilución al décimo: por ejemplo, 100 ml de la solución 10 X y llevar a 1000 ml con agua destilada.

Buffer Muestra

	Condiciones No reductoras	Condiciones reductoras
Solución C	2 ml	2 ml
Solución D	1.25 ml	1.25 ml
2 Mercapto etanol		0.5 ml
Glicerol	1 ml	1 ml
Azul de bromofenol	5 mg	5 mg

Buffer de Transferencia

	1 x	10 x (solución stock)
Glicina	2.92 g	29.2 g
Trizma base	5.8 g	58 g
Metanol	100 ml	
Agua destilada csp	1000 ml	1000 ml

Preparación de la solución de trabajo a partir de la solución stock:

Colocar 100 ml de la solución 10 X

Agregar 100 ml de Metanol

Llevar a 1000 ml con agua destilada

Conservar a 4° C

Colorante permanente para la nitrocelulosa: Negro Amido

Negro Amido 0.125 g

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Mario Fatala Chabén"

Agua Destilada csp 100 ml

La solución se re usa

Decolorante

Metanol	50 ml
Acido Acético	10 ml
Agua Destilada	40 ml

Colorante transitorio para la nitrocelulosa: Rojo Ponceau

Rojo Ponceau	0.1g
Acido Acético al 5%	100 ml

PBS - Tween 0.5%

PBS 1X pH 7.4	1000 ml
Tween 20	5 ml

PBS - Tween 0.5% - Leche 5%

PBS 1X pH 7.4	100 ml
Tween 20	0.5 ml
Leche descremada en polvo	5 g

Solución de Sustrato Western Blot

DAB (diaminobencidina)

DAB	0.012 gr
PBS pH 7.4	20 ml
H ₂ O ₂	20 µl

8. Complejo Inmune Circulante (CIC)

PBS/Tween 0.1%/SAB 2%

PBS pH 7.4	10 ml
Tween 20	0.01 ml

DIAGNÓSTICO EN PARASITOSIS - I.N.P. "Dr. Mario Fatała Chabén"

Seroalbúmina bovina 0.2 gr

PBS/Tween 0.1%/SAB 1%

PBS pH 7.4 10 ml

Tween 20 0.01 ml

Seroalbúmina bovina 0.1 gr

9. Antígeno Circulante (CAg)

Polietilenglicol 3% (PEG)

PBS pH 7.4 10 ml

PEG 8000 0.3 gr

Buffer Glicina 0.1 M, pH 2.5

Glicina 7.5 gr

Agua Destilada 100 ml

Llevar a pH 2.5 con ClH

I.S.B.N. N° 987-95100-4-6

Este manual se terminó de imprimir en noviembre de 1999
en el Instituto Nacional de Parasitología
"Dr. Mario Fatała Chabén", Buenos Aires, Argentina.
Primera edición: 300 ejemplares

**Este manual se imprimió con papel aportado por el Rotary Club de Gral. San
Martín, Distrito 4850, Buenos Aires. Argentina**