

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

Instituto Nacional de Parasitología

"Dr. Mario Fatała Chabén"

Guía de procedimientos





Ministerio de Salud y Ambiente

Dr. Ginés González García

Secretaría de Políticas, Regulación y Relaciones Sanitarias

Dra. Graciela Zulema Rosso

**Administración Nacional de Laboratorios
e Institutos de Salud “Dr. Carlos G. Malbrán”**

Dr. Gustavo Alberto Ríos

**INSTITUTO NACIONAL DE PARASITOLOGIA
“Dr. Mario Fatala Chabén”**

Dr. Andrés Mariano Ruiz

Departamento de Diagnóstico:

Dra. Ana María De Rissio - Dra. Miriam Marián García

Servicio de Docencia:

Lic. Raúl Conforti - Lic. Siella María López

Diseño gráfico:

D. G. Claudia Nose

LEA ESTAS INDICACIONES ANTES DE COMENZAR

- Si opta por realizar el curso, deberá capacitarse como mínimo en dos de las tres técnicas que ofrecemos.
- La lectura de la “Guía de Procedimientos” deberá complementarla con el video; éste le mostrará los movimientos adecuados (Gestos profesionales) en la ejecución del método. Para una mejor asimilación de las secuencias, luego de una primera lectura de los contenidos, reúna los materiales necesarios para realizar la técnica (sin utilizar sueros ni reactivos) para acompañar los movimientos que muestra el video.
- Complete el cuestionario de “Actividad” incluida en la “Guía de procedimientos”. Las preguntas que se incluyen tienen como finalidad que usted pueda interiorizarse sobre los procedimientos utilizados en el diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi* que se realiza en su ámbito de trabajo.
- Una vez completa, deberá remitir a este Instituto, dentro de las fechas indicadas en el cronograma adjunto, la evaluación parcial para su corrección, adjuntando copia del cuestionario de “Actividad” con la información que obtenga.
- Contará con la asesoría de un profesional a quien podrá consultar si surgen dificultades para avanzar en su capacitación. Puede contactarse vía e-mail: docenciainp@ineex.com.ar. De no ser posible, al FAX: 011 4 331 7142 o mediante correo postal a: Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatala Chabán”, Servicio de Docencia, Av. Paseo Colón 568 (1063) Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
- Aprobada la evaluación, usted está en condiciones de solicitar un segundo módulo, siendo el procedimiento idéntico al explicitado.
- Teniendo aprobadas las evaluaciones parciales, deberá concurrir a nuestro Instituto en fecha a acordar, según lo establece el cronograma para rendir una evaluación de la que dependerá la aprobación del curso.
- Con la aprobación de esta última instancia, le entregaremos un certificado otorgado por el Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatala Chabán”



Introducción

El laboratorio tiene gran importancia en el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*, ya que los cuadros clínicos encontrados en las fases agudas y crónicas, en muy pocos casos tienen signos patognomónicos.

La demostración de la presencia del parásito constituye un diagnóstico de certeza de la infección. Sin embargo en la práctica sólo es posible detectar eficientemente la forma circulante del *T. cruzi* durante la fase aguda. En etapas posteriores el diagnóstico de laboratorio se apoya en la detección de elementos que señalen indirectamente la presencia de la infección, tales como antígenos parasitarios circulantes o, más comúnmente anticuerpos séricos. El resultado del inmunodiagnóstico es sólo indicativo de infección y no del estado clínico del paciente.

El diagnóstico de laboratorio de la infección de Chagas por *T. cruzi* es de fundamental importancia para:

- *El control y tratamiento de la Enfermedad de Chagas*
- *El desarrollo de medidas de control de la endemia*
- *Detección de la transmisión vectorial*
- *El seguimiento serológico de los niños de 2 a 14 años*
- *La detección de la madre chagásica y el seguimiento del recién nacido hasta el primer año de vida*
- *El control obligado de la sangre donada para transfusiones*
- *El seguimiento de pacientes inmunosuprimidos (trasplantes de órganos, HIV, etc)*

La Normativa vigente, establece que para el estudio de pacientes en la **etapa aguda** los métodos de diagnóstico recomendados son los *Parasitológicos* –que se detallaran en otro módulo- y para la etapa **indeterminada y crónica** los métodos de elección son los *serológicos*. Los métodos parasitológicos no son los indicados en estas etapas por su baja sensibilidad que es menor al 50%.

Las *Duplas Serológicas* recomendadas son:

- **HAI- IFI**
- **HAI – ELISA**
- **ELISA – IFI**





El empleo de duplas serológicas permite combinar distintos antígenos y demostrar distintos anticuerpos en el suero del paciente. Si las dos reacciones efectuadas coinciden en sus resultados se puede certificar o descartar el diagnóstico de infección chagásica. Para aquellas muestras de reacciones discordantes, se debe solicitar una nueva muestra y si la discordancia se repite se recurrirá al centro de referencia provincial o nacional para su confirmación.

Métodos Serológicos

A través de los métodos serológicos detectamos anticuerpos específicos generados en respuesta a la infección por *T.cruzi*. En todos los casos se determinan Inmunoglobulina humana, de tipo IgG y/o IgM. La utilidad de estos métodos y su aplicación van a depender de las diferentes situaciones epidemiológicas y diagnósticas.

Método de Inmunofluorescencia

Introducción

El procedimiento conocido con el nombre de técnica de anticuerpos fluorescentes (fluorescent antibody technique) fue introducido, en 1941, por el investigador Albert Coons quien intentó conjugar los anticuerpos con colorantes fluorescentes y en 1942 publicó la primera aplicación de esta técnica inmunológica.

La microscopía de inmunofluorescencia es una técnica inmunohistoquímica que ha tenido significativos avances técnicos desde aquellas tempranas investigaciones en que la antiglobulina marcada era utilizada para localizar su antígeno específico. Con la obtención de conjugados estables, la técnica de anticuerpos fluorescentes se ha diversificado en los últimos 25 años.

La inmunofluorescencia tiende a descubrir antígenos o anticuerpos mediante la fluorescencia específica que se produce al unirlos con sus anticuerpos o antígenos respectivamente y observar al microscopio la fluorescencia.

Para la marcación de proteínas inmunológicas se utilizan distintos fluorocromos, como isotiocianato de fluoresceína, rodamina B de lisamina o ácido 1-dimetilaminonaftil-5-sulfónico. Éstos deben cumplir con las siguientes propiedades:

1)- Su molécula debe presentar grupos capaces de reaccionar formando uniones estables (covalentes) con la molécula de proteína.





2)- Su rendimiento cuántico no debe afectarse significativamente después de conjugarse con la proteína. En general no se admiten disminuciones superiores a un 50% con respecto a su eficiencia en disolución. 3)- El color de fluorescencia del conjugado debe diferir de la emisión fluorescente primaria que puede presentar la preparación, como para asegurar un buen contraste.

4)- No debe interferir con las propiedades inmunológicas de la globulina.

5)- El conjugado debe ser estable bajo condiciones normales de almacenamiento.

6)- Cuando un conjugado es utilizado para la detección de un antígeno *in vivo*, no debe ser tóxico.

Actualmente, el isotiocianato de fluoresceína (FITC) es el compuesto más empleado en la marcación ya que es el que cumple con las seis premisas establecidas. El máximo de absorción, más significativo, es el azul visible (470-490nm), que superpone parte de su superficie con la banda de emisión con máximo a 550nm. Es por esto que se emplean filtros excitadores de banda estrecha (interferenciales) que permita una limpia separación de la longitud de onda excitatriz, eliminándola sin afectar el máximo de emisión en el verde.

El FITC muestra su máximo de fluorescencia a pH 8. Variaciones de este parámetro puede producir cambios significativos en el equilibrio iónico entre moléculas de conjugado y solvente y puede afectar la intensidad de la fluorescencia de los conjugados. Es importante que los medios de montaje de los preparados para observar al microscopio, con este conjugado marcado, deban hacerse con fluidos adecuadamente tamponados.

Microscopía de Fluorescencia

La microscopía de fluorescencia se desarrolló a comienzos de este siglo cuando merced a trabajos experimentales tendientes a incrementar la resolución de un sistema óptico, Koehler (1904) utilizó una radiación de onda muy corta (U.V.), en general monocromática, y óptica de cuarzo (transparente al U.V.) computada especialmente para la longitud de onda de 280 nm. Si bien el sistema de iluminación, propuesto por Koehler, es antiguo continúa siendo aún el más eficaz, tanto para transiluminación como para epiiluminación.





Descripción del microscopio de inmunofluorescencia con un sistema de epiluminación:

-Fuente luminosa: lámpara de mercurio o de halógeno, debe emitir la mayor cantidad de luz ultravioleta

-Microscopio: Con tubo binocular, ocular 10x, objetivos acromático 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.

-Sistemas de filtros:

1)-el de excitación o de selección de luz ubicado entre la fuente de luz y el preparado.

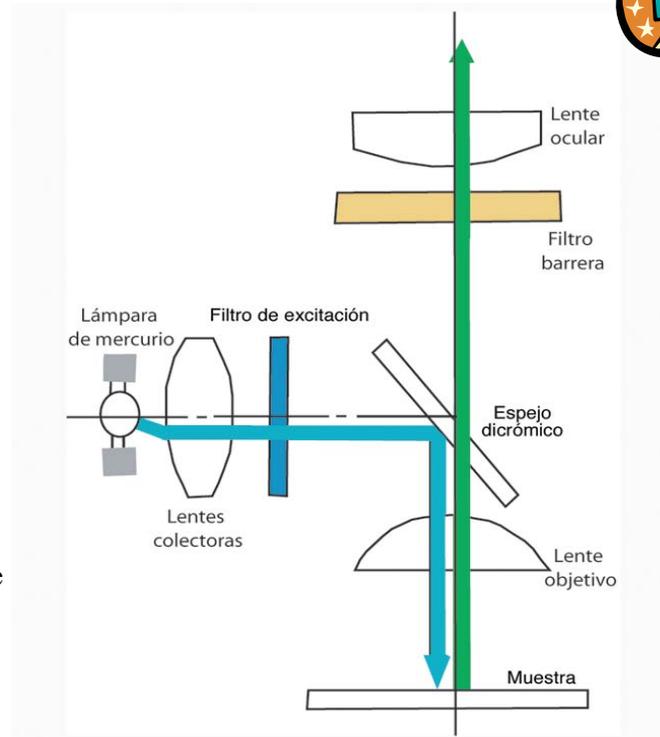
Permite el paso de ondas de luz con longitud que caiga en el rango azul con el fin que el preparado sea alcanzado exclusivamente por la luz azul y produzca emisión de luz fluorescente.

2)-filtro de calor: está ubicado, en los microscopios de luz transmitida, entre la fuente de luz y el filtro de excitación y en los microscopios de luz incidente, entre la fuente de luz y el espejo dicromático.

3)-filtro de barrera: colocado antes del ocular para prevenir daños retinianos que podrían ser causados por rayos ultravioletas que escapan el espejo dicromático.

La figura muestra la trayectoria de los rayos para un correcto sistema de epiluminación de acuerdo a lo propuesto por Koehler:

La luz de una fuente de longitud de onda múltiple se mueve a través de un filtro excitador que sólo permite que pase la radiación excitada de la longitud de onda deseada. Esta radiación es reflejada por el filtro dicromático y enfocada por la lente del objetivo sobre la muestra, las moléculas fluorescentes de la muestra se excitan y emiten luz (por fluorescencia) de una longitud de onda específica y mayor. Esta luz es enfocada por el objetivo y la mayor parte pasa a través del filtro dicromático y no se refleja. Un filtro de barrera final bloquea toda la luz residual con la frecuencia de la radiación de excitación.



Métodos

Existen dos métodos:

Directo

Detecta: *Antígeno*.

Ventajas: es un método seguro

Desventajas: requiere tener marcados para cada germen los anticuerpos específicos, - costos en reactivos y microscopio de inmunofluorescencia.

Indirecto

Detecta: *Anticuerpo*.

Ventajas:- no requiere de un anticuerpo específico. - fluorescencia más intensa
Desventajas:- costos en reactivos y microscopio de inmunofluorescencia.



Antígeno

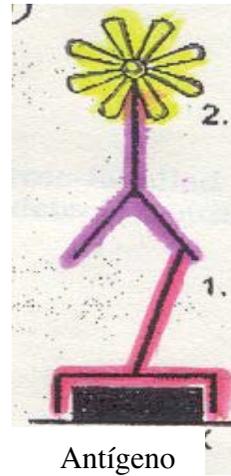
corte de tejido extendido
con material de

hisopado nasal
hisopado faríngeo
heces de vinchucas
Frotis de sangre

Anticuerpo específico marcado
anti-*T. cruzi*, anti-*T. gondii*, anti *T. pallidum* etc.

Aplicación:

La inmunofluorescencia es uno de los métodos modernos de grandes aplicaciones en la investigación y en el diagnóstico de anticuerpos o antígenos correspondientes a cortes de tejidos, extendido de microorganismos o de células, o cultivo de tejidos en capa única. Se utiliza también en el estudio de la distribución intracelular de las moléculas.



2. Anticuerpo secundario conjugado con isotiocianato de fluoresceína

1. Anticuerpo primario no marcado

Antígeno

T. cruzi, *T. gondii*, *T. pallidum*,

Anticuerpo específico
Suero, LCR, Plasma, Orina, etc

Antigamaglobulina humana
marcada

Diagnóstico de Laboratorio de la Infección por *Trypanosoma cruzi*:

Indumentaria de Seguridad

- Guardapolvo de mangas largas y prendido
- Guantes de látex
- Máscara facial o Antiparras
- Barbijo
- Zapatos cerrados.
- Cabello recogido o cofia

Materiales

1. Microscopio de fluorescencia
2. Caloventor o secador de pelo
3. Estufa de 37°C
4. Heladera
5. Baño de incubación a 56°C
6. Mechero Bunsen
7. Cubreobjetos de 22x48 mm
8. Cámara húmeda
9. Jarra de Koplín
10. Portaobjetos de vidrio no fluorescente y espesor no mayor de 1.2 mm marcados con doce divisiones indelebles de forma circular de 8 mm de diámetro (impronta)
11. Policubetas de polipropileno con fondo en U de 96 pocillos
12. Tubos de Khan o de hemólisis
13. Pipeta de vidrio de 10 ml con propipeta
14. Micropipeta automática monocanal de 25 microlitros (25 μ l)
15. Micropipeta automática multicanal de 25 μ l para diluciones
16. Microdiluidores (ver anexo)
17. Cubeta plástica para buffer
18. Tips (para pipeta de 25 μ l)
19. Recipiente con solución de hipoclorito de sodio (lavandina) al 10% o cloroxilenol al 30%
20. Papel de filtro
21. Algodón
22. Marcador de fibra con tinta indeleble
23. Cronómetro
24. Matraces aforados de 1000ml para preparación de Solución Buffer
25. Caja de plástico con tapa para guardar improntas





Reactivos

1. Antígeno (ver preparación en anexos)
2. Antigamaglobulina humana, marcada con isotiocianato de fluoresceína (conjugado)
3. Solución de Azul de Evans al 1% (ver preparación en anexos)
4. Solución salina estabilizadora (SSE) (ver preparación en anexos)
5. Glicerina bufferada (ver preparación en anexos)
6. Sueros Testigos Reactivo (1/256) y No Reactivos (ver preparación en anexos)
7. Sueros problemas



Estabilidad y Conservación de los Reactivos:

- *Los reactivos son estables hasta la fecha de vencimiento indicada en el frasco.
- ***Conservar en heladera (2° a 8°C) siempre en posición vertical.**
- *No Congelar.



propipeta de goma

• I- Pegado del Antígeno a la impronta

El Antígeno para la inmunofluorescencia indirecta está constituido por epimastigotes de *T. cruzi* tratados con una solución formolada, a partir de cultivos de medios bifásicos sin sangre y cosechados en la fase exponencial de crecimiento, para que los parásitos estén aislados sin formación de rosetas y también para evitar la formación de detritos de degradación de los mismos.

El pegado del Antígeno a la impronta se puede realizar por dos métodos: físico o químico.

Método físico: fijado del antígeno a la impronta por medio de calor.

Método químico: pretratado de las improntas por medio de una solución de Poly-L-Lysina 0.1% (P/V).



Sueros testigo liofilizados



a) Método físico:

Para comenzar a trabajar colóquese la indumentaria de bioseguridad

- 1-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
- 2-Colocar, con pipeta Pasteur, en las improntas perfectamente limpias y desengrasadas una gota de dicha suspensión en cada uno de los círculos. Cada vez que comience una nueva impronta, homogenice la dilución de antígeno.
- 3-Secar las improntas por medio de aire caliente.
- 4-Fijar a la llama flameando el preparado.
- 5-Lavar los portaobjetos con agua destilada.
- 6-Secar con aire frío.
- 7-Conservar en freezer a - 20°C, en cajas de plástico con tapa, bien protegidas de la humedad.

b) Método químico:

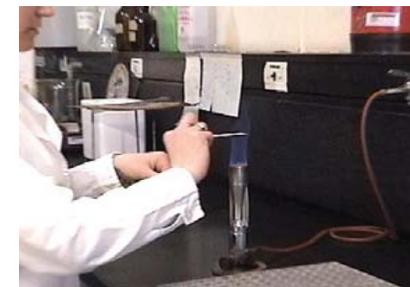
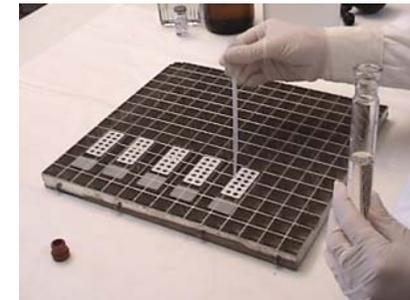
- 1- Preparar una solución de Poly-L-Lysina 1/10 con agua desionizada. Esta solución se prepara en un envase plástico.
- 2- Colocar las improntas, perfectamente limpias y desengrasadas, en una jarra de Koplin.
- 3- Cubrir los portaobjetos con la dilución de Poly-L-Lysina durante 5 minutos.
- 4- Secar las improntas dejándolas a temperatura ambiente hasta el día siguiente o puede colocarlas en estufa a 60°C durante 1 hora.
- 5- 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.
- 6- Colocar, con pipeta Pasteur, en las improntas pre-tratadas una gota de dicha suspensión en cada uno de los círculos .
- 7- Secar las improntas por medio de aire frío o a temperatura ambiente.
- 8- Conservar las láminas a temperatura ambiente, en cajas de plástico con tapas.

Recomendaciones para el uso del reactivo químico:

- El reactivo químico sin diluir se conserva a temperatura ambiente (18-26°C) y es estable hasta la fecha de vencimiento.
- La solución diluida de Poly-L-Lysina es estable hasta 3 meses y se conserva en heladera (2-8°C).



Antígeno de inmunofluorescencia





- Si la dilución de Poly-L-Lysina presenta turbidez por el desarrollo de bacterias, descártela y prepare una nueva.
- No agregue solución fresca a la solución diluida en uso.
- Los portaobjetos se pueden alterar con este procedimiento, si esto ocurriera puede limpiarlos con una solución de alcohol ácido (CIH 1% en etanol 70%).

• II- Titulación de la antigamaglobulina humana marcada con isotiocianato de fluoresceína (conjugado)

Determinar la dilución de utilización de la antigamaglobulina humana marcada con isotiocianato de fluoresceína (conjugado) frente a un control reactivo de título conocido y un control no reactivo. La determinación del título de la antigamaglobulina humana marcada con isotiocianato de fluoresceína debe realizarse para cada lote de conjugado y para cada equipo microscópico.

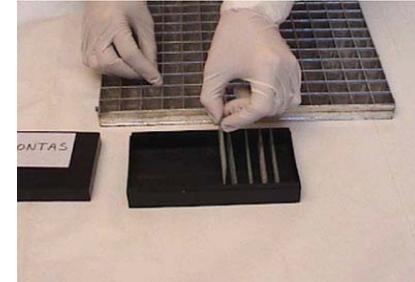
El procedimiento para la titulación consta de las siguientes etapas:

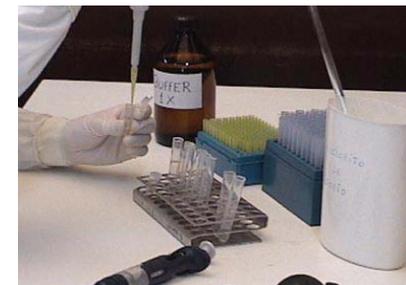
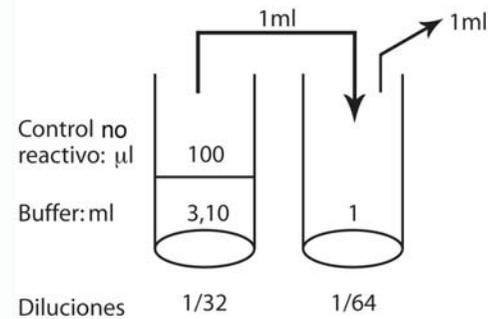
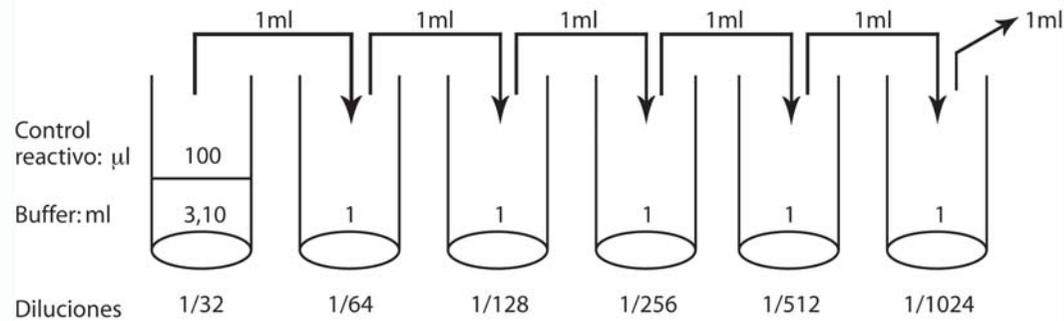
- a) Diluciones de los controles reactivo y no reactivo.
- b) Reacción Antígeno-Anticuerpo.
- c) Reacción Antígeno-Anticuerpo-Conjugado.
- d) Lectura en microscopio fluorescente

a)- Diluciones de los controles reactivo y no reactivo.

Realizar una serie de diluciones crecientes del control reactivo y no reactivo en buffer (SSE 1X).

Esquema de trabajo:

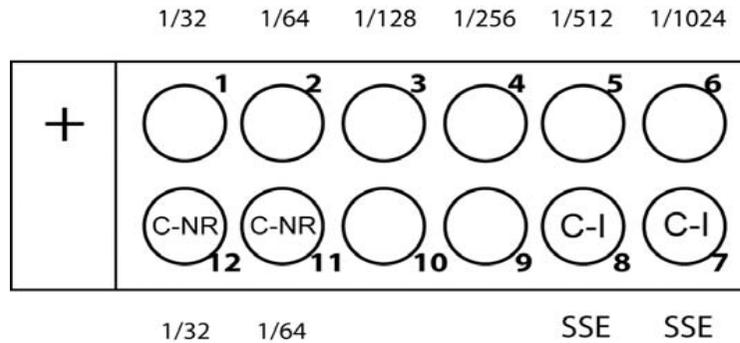




b)- Reacción Antígeno-Anticuerpo:

- 1- Disponer de 5 improntas con antígeno pegado.
- 2- Colocar, con pipeta Pasteur, una gota (20 μl) de cada dilución del **control reactivo** en el interior de los círculos de la fila superior del portaobjeto. Una dilución por círculo comenzando desde la más diluída a la más concentrada.
- 3- Colocar, con pipeta Pasteur, una gota (20 μl) de cada dilución del **control no reactivo** en el interior de los círculos, de la fila inferior del portaobjeto. En esta misma hilera debe colocar, en otros dos círculos, una gota de SSE (control de coloración inespecífica: CI). Una dilución por círculo.

Esquema:

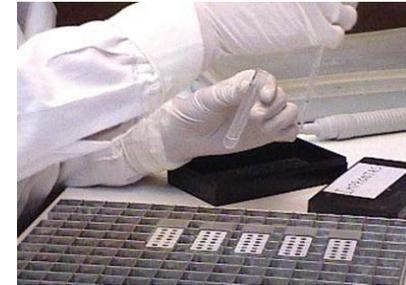


- 4)- El punto 2) y 3) lo repite tantas veces como diluciones de antigamaglobulina humana marcada desee probar.
(Ej: se ensayan 5 títulos de antigamaglobulina)
- 5)- Incubar todas las improntas en cámara húmeda durante 30 minutos a 37°C.
- 6)- Lavar los portaobjetos colocándolos en una jarra de Koplín; primero con agua destilada y luego dos lavados con SSE1X, cada uno de 5 minutos.
- 7)- Finalmente enjuagar con agua destilada.
- 8)- Secar los preparados con papel de filtro y corriente de aire frío.

c)- Reacción Antígeno-Anticuerpo-Conjugado:

- 1)- Preparar diluciones del conjugado mayores y menores a las del título estimado por el productor, como se muestra en el video.
Por ejemplo: El título estimado de la antigamaglobulina humana marcada es 1/500, se ensayan los siguientes títulos: 1/200, 1/400, 1/600, 1/800 y 1/1000.

Preparar cada dilución de antigamaglobulina humana marcada en solución de Azul de Evans 1% (Ver cálculo en punto 19 de Desarrollo de técnica)





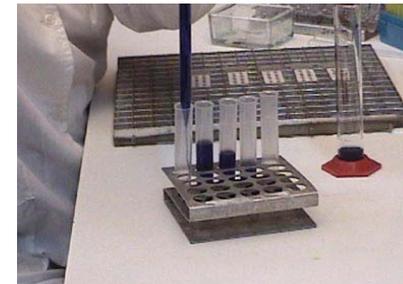
- 2)- Rotular cada impronta, con el título a ensayar.
- 3)- Cubrir cada círculo de la impronta con una gota (20 μ l) de la dilución correspondiente a la antigamaglobulina humana marcada.
- 4)- Incubar todas las improntas en cámara húmeda durante 30 minutos a 37 °C.
- 5)- Lavar los portaobjetos colocándolos en una jarra de Koplín, primero con agua destilada y luego dos lavados con SSE 1X cada uno de 5 minutos.
- 6)- Finalmente enjuagar con agua destilada.
- 7)- Secar los preparados con papel de filtro y corriente de aire frío.
- 8)- Colocar en la parte media de la impronta una gota de líquido de montaje y cubrir con el cubreobjeto.

d) Lectura en microscopio de fluorescencia:

Leer cada impronta en el microscopio de fluorescencia y determinar la mayor dilución del conjugado que permite detectar el título del control reactivo conocido. En el ejemplo del esquema, se enfrentaron diferentes diluciones del conjugado frente a un control reactivo de título 1/256, un control no reactivo y un control de inespecificidad.

La lectura microscópica indica que el título óptimo del conjugado es 1/800.

- a) Control de fluorescencia inespecífica: Al microscopio los parásitos deberán presentar una coloración **rojiza pardusca** y no mostrar fluorescencia. El conjugado diluido no debe teñir inespecíficamente a los parásitos.
- b) Control no reactivo: El suero control no reactivo debe presentar una coloración **rojiza pardusca** sin fluorescencia.
- c) Control 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 en el flagelo del parásito. Deberá observarse fluorescente hasta la dilución de su título (Título 1/256).





Conjugado	Diluciones		
	Reactivo	No Reactivo	Inespecificidad
1/200	1/1024+	+	+
1/400	1/1024+	+	-
1/600	1/512 +	+ ó -	-
1/800	1/256 +	-	-
1/1000	1/64 +	-	-

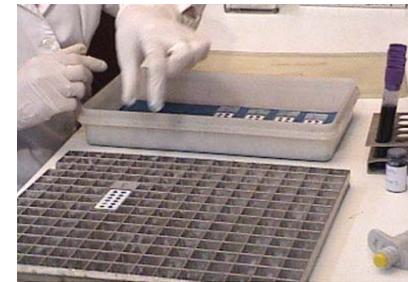
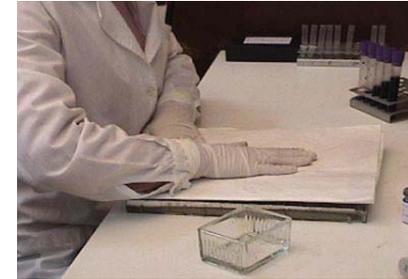
III- Titulación de la solución de Azul de Evans

Si realiza por primera vez la técnica de Inmunofluorescencia tiene que hallar, en forma simultánea, el título de de antigamaglobulina humana marcada y de Azul de Evans respectivamente. Para esto ensaye varios títulos de antigamaglobulina humana marcada con tres títulos de Azul de Evans.

Esquema:

Conjugado	Diluciones
	Azul de Evans
1/200	1/10000, 1/15000, 1/20000
1/400	1/10000, 1/15000, 1/20000
1/600	1/10000, 1/15000, 1/20000
1/800	1/10000, 1/15000, 1/20000
1/1000	1/10000, 1/15000, 1/20000

Dado que el Azul de Evans es utilizado como colorante de contraste, su óptima titulación ayudará a una mejor definición de los sueros en estudio. El rango de títulos hallados habitualmente, es de 1/10000 a 1/15000.





Desarrollo de la técnica propiamente dicha

Fundamento:

- La inmunofluorescencia indirecta se basa en la capacidad que tienen las proteínas de unirse a colorantes específicos sin alterar las propiedades inmunológicas, es decir, se los puede conjugar con determinados compuestos químicos sin destruir su capacidad de reaccionar con el antígeno correspondiente.

- El procedimiento técnico consta de dos etapas:

La primera, los antígenos (epimastigotes) fijados a la impronta se incuban con diluciones seriadas del suero del paciente (1/32, 1/64 y 1/128). Si en el suero del paciente existen anticuerpos *anti-T. cruzi* se forma un primer complejo antígeno-anticuerpo no visible. Se lavan los preparados y en un segundo paso, se incuban el complejo antígeno-anticuerpo con la antigamaglobulina marcada (conjugado).

La antigamaglobulina se obtiene por inmunización de gammaglobulina total humana en conejo, cabra etc, la que luego se marca con el isotiocianato de fluoresceína. Este segundo complejo que se forma fluorescerá al ser excitado por la longitud de onda adecuada para el fluorocromo dando una reacción positiva de fluorescencia que será observada en el microscopio de fluorescencia.

- Para comenzar a realizar la técnica, colóquese la indumentaria de bioseguridad y disponga sobre la mesada de trabajo, previamente desinfectada con lavandina al 10% o cloroxilenol al 30%, los materiales y reactivos a utilizar. Los reactivos deben estar a temperatura ambiente.

1. Retirar las improntas pegadas con el Antígeno del freezer a -20 , para que tomen temperatura ambiente.

2. Realizar la planilla de trabajo, identificando cada casillero con el número que le corresponde a cada suero problema y controles reactivo y no reactivo.

Utilice una de las policubetas para las **muestras problemas**. Como podrá observar, las columnas están identificadas con números (del 1 al 12) y las hileras con letras (A hasta H).

3. Utilizando el marcador, identifique cada uno de los pocillos de la primera hilera con el código (números, letras, etc.) que utilizó para individualizar los sueros de los pacientes a procesar.

	C1	C2	C3	C4	
1					21
2	113	118	119	120	22
3	121	122	123	124	23
4	125	126	127	128	24
5	129	130	131	132	25
6	133	134	135	136	26
7	137	138	139	140	27
8	141	142	143	144	28
9					29
10					30
11					31
12					32

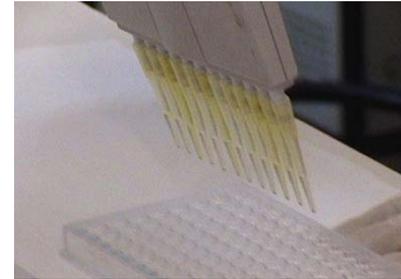




4. A continuación tome la otra policubeta, para **los controles**. De esta policubeta sólo utilizará las dos primeras hileras (A y B). Identifique con él marcador la hilera A como control reactivo (+) y la B como control no reactivo(-)
5. Trabaje sobre la primera policubeta (**muestras**) colocando en todos los pocillos a utilizar, 25 µl de SSE; con pipeta automática multi o mono canal (ver anexo).
6. Pase a la segunda policubeta (**controles**) y dispense en todos los pocillos de las hileras A y B, 25 µl de SSE.
7. En el pocillo A1 de la policubeta de **muestras problemáticas**, dispense 25 µl de suero problema (Dilución inicial: 1/2). El mismo procedimiento deberá efectuarlo para el resto de los sueros en los pocillos correspondientes: A2, A3, A4, etc.
8. En los pocillos A1 y B1 de la policubeta de los **controles**, agregue 25 µl del control reactivo y no reactivo respectivamente.

Diluciones:

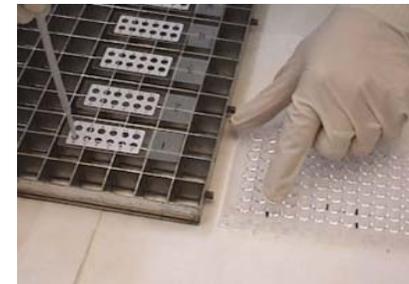
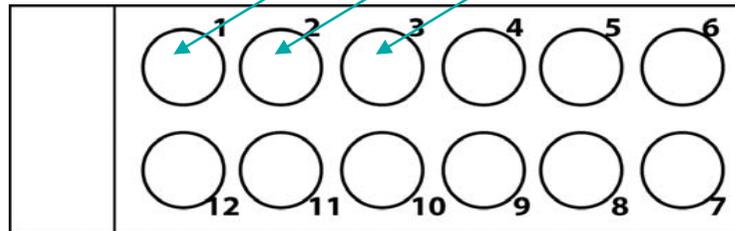
9. **Policubeta de muestras problemáticas:** Con pipeta automática multicanal de 25µl homogenice la muestra mediante carga y descarga (evitando la formación de espuma) por lo menos 5 veces. Transfiera 25 µl del pocillo A1 al B1 (segunda dilución) y así sucesivamente hasta el pocillo H1, descartando los últimos 25 µl
 10. Proceda de igual manera con las muestras restantes.
 11. **Policubeta de controles:** Con pipeta automática mono o multicanal de 25 µl homogenice el control reactivo del pocillo A1, por carga y descarga (evitando la formación de espuma), por lo menos 5 veces y transfiera 25 µl al pocillo A2 (segunda dilución) y así sucesivamente hasta el pocillo A12, descartando los últimos 25 µl.
 12. Del mismo modo al señalado en el punto anterior, proceda con el control no reactivo (fila B)
- Al finalizar este procedimiento, habrá realizado las siguientes diluciones:
Para las muestras problemáticas en los pocillos A1: 1/2, B1: 1/4, C1: 1/8, H1: 1/256.
Para los controles en los pocillos A1: 1/2, A2: 1/4, A3: 1/8, A12: 1/4096.
13. Introduzca un control de fluorescencia inespecífica utilizando SSE1X.



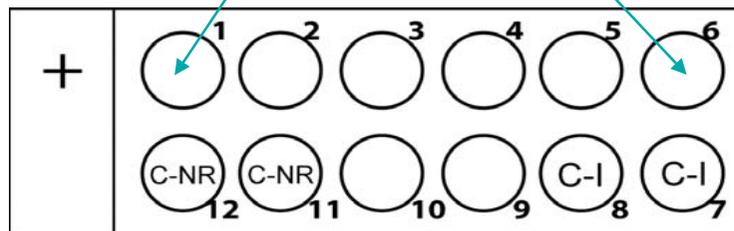


Reacción Antígeno-Anticuerpo

14. Con pipeta monocanal, colocar 20 µl de las diluciones 1/32, 1/64 y 1/128 de los sueros problemas, en los círculos de la impronta. Por cada impronta de antígeno colocará cuatro sueros problemas.



En otra impronta, colocar en los seis círculos de la fila superior, 20µl de las diluciones del **control reactivo** (1/32 a 1/1024) y en los dos círculos de la fila inferior las diluciones 1/32 y 1/64 del **control no reactivo**. En esta misma fila, en otros dos círculos, coloque 20µl de SSE 1X (control de fluorescencia inespecifica: CI).





15. Incubar todas las improntas en cámara húmeda durante 30 minutos a 37°C.
16. Lavar los portaobjetos colocándolos en una jarra de Koplín, primero con agua destilada y luego con SSE 1X durante 5 minutos, por dos veces consecutivas. De esta manera se eliminan las fijaciones no específicas.
17. Finalmente enjuagar con agua destilada.
18. Secar los preparados con papel de filtro y corriente de aire frío.



Reacción Antígeno-Anticuerpo-Conjugado

19. Cálculo para preparar la solución del conjugado (antigamaglobulina humana marcada con isotiocianato de fluoresceína según título 1/800) en un volumen final de 8 ml en solución de Azul de Evans (título 1/12000):

- Por ej:
- Título obtenido de la antigamaglobulina humana marcada: 1/800
 - Título del Azul de Evans: 1/12000 (C2)
 - Concentración de la solución stock del Azul de Evans: 1% (C1)
 - Volumen final en SSE 1X c.s.p : 8 ml. (V2)
 - Volumen requerido de Azul de Evans al 1% (V1) : (incógnita)





Aplicando la fórmula de las proporciones $V1 \times C1 = V2 \times C2$

y reemplazando $V1 \times 1/100 = 8 \text{ ml} \times 1/12000$

resulta $V1 = \frac{8 \text{ ml} \times 1/12000}{1/100}$

$V1 = 0.066 \text{ ml.} = 66\mu\text{l de Azul de Evans}$

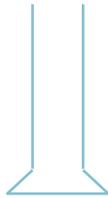
En una probeta coloque: 8 ml de SSE 1X

+

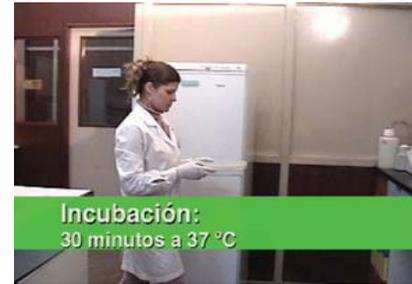
66 μl Azul de Evans

+

10 μl Anti-gamaglobulina humana marcada (Título 1/800)



20. Cubrir los preparados con la solución del conjugado.
21. Incubar los portaobjetos como se indica en el punto 15.
22. Lavar los portaobjetos como se indica en el punto 16.
23. Finalmente enjuagar con agua destilada.
24. Secar los portaobjetos como se indica en el punto 18.
25. Colocar en la parte media de la impronta una gota de líquido de montaje y cubrir con el cubreobjeto.
26. Leer en microscopio de fluorescencia.





Lectura:

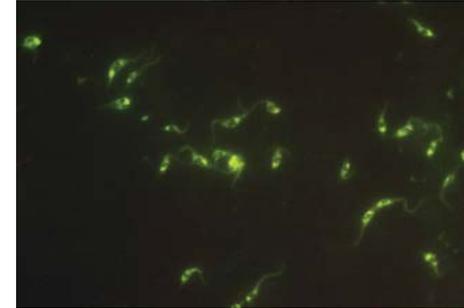
Antes de realizar la lectura de las muestras problemas deberá leer primero los controles de la reacción.

Interpretación de los Resultados

- Control de fluorescencia inespecífica: Al microscopio los parásitos deberán presentar una coloración rojiza pardusca y no mostrar fluorescencia.
- Control no reactivo: El suero control no reactivo debe presentar una coloración rojiza pardusca sin fluorescencia.
- Control 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 en el flagelo del parásito. Deberá observarse fluorescente hasta la dilución de su título.
- Para Diagnóstico confirmatorio: se considera **reactivo** para anticuerpos del tipo IgG específico contra el *T.cruzi* aquellos sueros que tengan títulos iguales o mayores a 1/32.

Sensibilidad de la Reacción: La reacción de inmunofluorescencia por sí sola tiene una sensibilidad del 99%.

En la enfermedad de Chagas se debe trabajar con duplas serológicas para alcanzar el 99.9% de sensibilidad

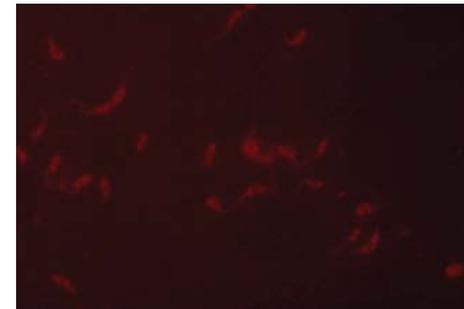


Consideraciones Generales:

Los procedimientos de laboratorio están sujetos a múltiples errores que deben ser detectados para poder corregirlos. Aún cuando una técnica es realizada más de una vez por un mismo operador, siguiendo la misma metodología, utilizando aparatos y reactivos iguales, las medidas no son idénticas.

Por consiguiente debe tener en cuenta los siguientes aspectos:

- Verifique que las pipetas automáticas mono y/o multicanal y de los microdiluidores, estén correctamente calibrado.
- No congelar la antigamaglobulina humana marcada con isotiocianato de fluoresceína y el antígeno. Si esto ocurre accidentalmente, no deben ser utilizados. Conservarlos entre 2-8 °C.





- Los reactivos, antigamaglobulina humana marcada con isotiocianato de fluoresceína y el antígeno, son estables hasta la fecha de caducidad indicada sobre la etiqueta del envase si se conservan en las condiciones recomendadas.
- La antigamaglobulina humana diluída no debe reutilizarse. Debe ser preparada dentro de las 2 hs. de su uso.
- Debe controlar la preparación y control del pH de la SSE. Conservar entre 2-8°C.
- En la etapa de las diluciones de los sueros y controles respete el número de veces que tiene que homogenizar.
- No modifique la temperatura y el tiempo de incubación.
- Realice las incubaciones en cámara húmeda que contenga papel de filtro humedecido para evitar la evaporación de los reactivos.
- Respete el número de lavados.
- Después de los pasos de lavados se recomienda absorber, con cuidado, el excedente de humedad con papel de filtro, como se muestra en el video.
- Cuando procese las muestras problemas, incluya **siempre** controles reactivo y no reactivo. Esto le permitirá verificar la reproducibilidad del ensayo, la estabilidad de los reactivos y posibles errores del operador.
- Si el suero pertenece a un recién nacido, realice las diluciones del mismo hasta título final (1/2 a 1/4096) de esta manera podrá confeccionar una curva serológica con todos los títulos obtenidos durante la etapa de seguimiento (una impronta por paciente).
- Algunos de los componentes de esta técnica contienen un conservante (azida sódica). Ésta puede reaccionar con el plomo o el cobre de las cañerías y formar azidas metálicas explosivas. Se recomienda enjuagar con abundante agua todo desecho.
- No pipetear con la boca las muestras y los reactivos.



Recuerde:

- ❖ La IFI como cualquier otra técnica serológica no puede ser considerada como único método para realizar el diagnóstico.
- ❖ Las Normas para el Diagnóstico de la infección Chagásica establecen utilizar como mínimo dos técnicas serológicas
- ❖ Para que los resultados del diagnóstico sean confiables, deben efectuarse siguiendo técnicas estandarizadas y validadas, con operadores capacitados, utilizando reactivos controlados.
- ❖ Lleve siempre un registro de las lecturas de los controles reactivos y no reactivos.
- ❖ Decontamine la mesada de trabajo cada vez que termine de realizar la técnica utilizando hipoclorito de sodio al 10%, como así también todos los reactivos, muestras y materiales para que se inactiven los agentes infecciosos.



Anexo

Normas Nacionales para el Diagnóstico de Infección por *T. Cruzi*:

“En Argentina el diagnóstico de infección de Chagas esta regulado por la ley Nacional 22360, desde 1983. En cuya reglamentación se nomina al actualmente Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatala Chaben” como Centro de Referencia Nacional, a cargo de dictar las Normas Técnicas para la realización de este diagnóstico de Laboratorio en todo el territorio del país. Las mismas han sido revisadas y modificadas en 1996 y aprobadas por resolución ministerial 523/97.” Primera Edición, Segunda Edición 1999.

Azul de Evans:

Preparar una solución stock de Azul de Evans al 1% en agua destilada. Dejar estabilizar durante 1 mes a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo filtrar por papel de filtro y titular.

**Azul de Evans.....1 gr
Agua destilada c.s.p.....100 ml**

Líquido de montaje:

**Glicerina bidestilada neutra.....9 partes
SSE 10X.....1 parte**



Anexo

Solución Salina Estabilizadora (SSE) pH 7.2 :

a)- Solución madre (10X)

Fosfato disódico dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).....17.0 gr
Fosfato monosódico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$).....2.2 gr
Cloruro de sodio (Cl Na).....81.7gr
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.

Preparación de los controles Reactivos y no reactivos

Resuspenda el liofilizado en 1ml de agua destilada, homogenice y prepare 20 alícuotas de trabajo de 50 microlitros cada una.

- Utilice diariamente una alícuota de trabajo.
- Conserve en freezer a -20° , es estable por 6 meses.



Anexo

Microdiluidores

En caso de no contar con pipetas automáticas mono y multicanal debe realizar la técnica con los siguientes materiales:

- ✓ microdiluidores de 25 μ l
- ✓ papel de calibración (para los microdiluidores)
- ✓ micropipeta gotero de 25 μ l
- ✓ vaso de precipitación para sumergir los microdiluidores
- ✓ agua desionizada

Procedimiento

1. Con un microgotero de 25 μ l colocar una gota de SSE 1X en todos los pocillos de la policubeta de las muestras problemas y controles
2. Con microdiluidor de 25 μ l, dispense cada suero a ensayar en el pocillo que corresponda y homogenice la muestra por rotación del microdiluidor por lo menos 10 veces, para asegurar una correcta dilución de la misma.
3. Realice diluciones seriadas, pasando los microdiluidores del pocillo A1 al B1 y así sucesivamente hasta la dilución del pocillo H1. Rotando en cada paso, el microdiluidor, por lo menos 10 veces para asegurar una correcta dilución de la muestra.
4. Con los controles reactivo, no reactivo y el de inespecificidad proceda de la misma manera desde el pocillo A1 al A12 respectivamente.
5. Continúe con la técnica como se indica en el punto Reacción Antígeno-Anticuerpo.

Recomendaciones para el uso de los microdiluidores

- ✓ En caso de no contar con pipetas automáticas puede realizar la técnica utilizando microgotero y microdiluidores .
- ✓ Si son nuevos deberá por única vez, quemarlos a la llama hasta que el material se ponga incandescente, luego déjelos enfriar y colóquelos en agua desionizada
- ✓ No frotar el microdiluidor en el fondo del pocillo, para no rayar la placa.
- ✓ Previo a su utilización compruebe que estén debidamente calibrados, utilizando papeles absorbentes marcados con círculos que permitan dispensar los 25 ml requeridos.
- ✓ Antes de tomar la muestra con el microdiluidor, apóyelo sobre papel de filtro para descargar el volumen excedente y asegurar así una correcta toma de la misma.
- ✓ Al finalizar la dilución deberá pasar el microdiluidor sucesivamente por dos recipientes de agua desionizada y finalmente apoyarlos sobre papel de filtro antes de tomar una nueva muestra.



BIBLIOGRAFIA

- Koehler A, Wiss Z. Mikroskop. 21:273,1904.
- McKinney RM, Spillane JT, Pearce GW. Fluorescent Diacetate as a Reference Color Standard in Fluorescent Antibody Studies. Anal Biochem. Vol.9: 474-76. 1964.
- Alvarez M, Cerisola JA, Rohwedder RW. Test de Inmunofluorescencia para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Bol. Chil Parasitol 23: 4-9, 1968.
- White R G. “ In standardization in Immunofluorescence”. Ed. Holborow E J: Oxford, Blackwell Scientific . Publications, p.49.1970.
- The T H, Feltkamp TE: Conjugation of fluorescein isothiocyanate to antibodies. Immunology 18, 865. 1970.
- Schttschneider W, Lopes ER, De Alencar JE, Bienzle U, Feldmeier H. A comparative study of four serological methods for diagnosis of acute and chronic Chagas`Disease in Brazilian patients. Trop. Geogra. Med. 44: 210-18. 1992.
- Murray P, Drew W, Kobayashi G, Thompson J. Microbiología Médica. Mosby Company Madrid 39: 479. 1992.
- Rojas W. Inmunología. Corporación para investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia, 14: 197-200. 1995.
- Ministerio de Salud y Acción Social, INP “Dr. Mario Fatała Chabén” Normas para el diagnóstico de la infección chagásica. Resolución ministerial 523/97, (1998).
- Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud “ Dr. Carlos G. Malbran” Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatała Chabén” Manual de Diagnóstico en Parasitosis, Manual de laboratorio 1era. Edición 1999.-



Actividad

- 1)- El Laboratorio donde Ud. trabaja pertenece a:
 - a)- Hospital público provincial
 - b)- Hospital privado
 - c)- Laboratorio particular
 - d)- Otros (especifique)

- 2)- ¿El Laboratorio donde Ud. trabaja integra la Red Provincial de Chagas? SI NO

- 3)- En su laboratorio:
 - a)- ¿Realiza la técnica IFI? SI NO
 - b)- ¿Desde cuándo?
 - c)- ¿Realiza determinaciones?:
 - diarias
 - quincenales
 - mensuales
 - otras (especifique)
 - d)- Si no realiza la técnica IFI :
 - 1) Deriva la muestra para confirmar por IFI? SI NO
 - 2) ¿A dónde deriva?

- 4)- Cuando realiza la técnica de inmunofluorescencia:
 - a)- ¿Incorpora un suero reactivo y no reactivo, además de los controles del equipo?
 - b)- ¿En qué y cuáles títulos utiliza el o los controles internos?
 - c)- ¿Tiene posibilidad de aplicar el método químico para el pegado del antígeno a la impronta?

- 5)- Para el desarrollo de esta técnica, aplica las Normas de Bioseguridad?. Mencione y justifique.