

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

Registro de Servicio Social por Actividades relacionadas con la profesión.

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

“Determinación en suero de anticuerpos tipo IgG e IgM para Toxoplasma gondii mediante las técnicas serológicas de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) e inmunoensayo enzimático (ELISA)”

PRESENTA:

Berenice Aldave Jaime

***Matrícula
2132037795***

Asesor interno

Dra. Carmen Monroy Dosta
UAM-Xochimilco (28906)

Asesor externo

Q.F.B José de Jesús Pérez Galaviz
Instituto de Diagnóstico y Referencia
Epidemiológicos (DF00042743)

Ciudad de México

Mayo 2019

Resumen

La toxoplasmosis es una enfermedad cuyo agente causal es el parásito *Toxoplasma gondii*, está extendida en forma universal y la prevalencia de anticuerpos sugiere que la población de diferentes estados de la República Mexicana se expone al parásito constantemente. Entre las entidades que reportan al laboratorio un mayor número de muestras se encuentran Veracruz y Chiapas.

Generalmente la toxoplasmosis puede presentarse de manera asintomática en la mayoría de los pacientes, sin embargo, el diagnóstico clínico es difícil de establecer debido a la diversidad del cuadro clínico ya que la sintomatología puede ser muy grave cuando se presenta en personas inmunocomprometidas y mujeres embarazadas causando graves daños.

El Laboratorio de Toxoplasmosis perteneciente al Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) realiza el “diagnóstico serológico mediante la técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA)” y la “Determinación en suero de anticuerpos anti- toxoplasma tipo IgG e IgM Inmunofluorescencia indirecta (IFI)”. Para llevar a cabo estas técnicas lo primero que se realizó en el laboratorio fue, la obtención del antígeno mediante la inoculación intraperitoneal en ratones Balb/C, con una suspensión de 0.5ml del parásito *Toxoplasma gondii* tipo I previamente congelados en un criovial, (la descongelación se llevó a cabo en un baño María de 37°C a 40°C) y se continuó con un lavado de la cavidad peritoneal inyectando con una jeringa ,5mL de PBS y agitando suavemente el ratón para un lavado más completo, se extrajo con una jeringa la solución del peritoneo y se depositó en un tubo cónico de 15 mL, finalmente se colocó una gota de la suspensión de parásitos en un portaobjetos, y se verificó al microscopio (40X) la presencia de los parásitos y poder realizar las técnicas correspondientes, obtener los resultados en ellas para su interpretación, logrando un diagnóstico oportuno y certero.

Palabras clave: Toxoplasmosis, inmunofluorescencia ,inmunocomprometidas, diagnóstico

Índice

Resumen.....	2
Marco Institucional.....	4
Introducción.....	4
Ciclo biológico de <i>T.gondii</i>	6
Antecedentes.....	8
Ubicación Geográfica.....	9
Objetivo General.....	9
Especificación y fundamento de las actividades.....	9
Propagación y mantenimiento de la cepa en gabinete de seguridad biológica.....	9
Criopreservación de la cepa.....	11
Obtención de la suspensión de trabajo.....	11
Sensibilización de portaobjetos con cubierta de teflón.....	11
Titulación del conjugado.....	12
Determinación en suero de anticuerpos antitoxoplasma tipo IgG e IgM, mediante el método de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).....	13
Determinación en suero de anticuerpos antitoxoplasma tipo IgG e IgM, para el diagnóstico, mediante la técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA).....	16
Interpretación de resultados.....	17

Marco Institucional

La Licenciatura de Biología de la Universidad Autónoma Metropolitana tiene como misión formar biólogos cuyas habilidades, competencias y conocimientos les permitan participar en el diagnóstico, gestión y planeación del uso, conservación y restauración de los recursos naturales.

Introducción

La toxoplasmosis es una enfermedad cuyo agente causal es el parásito *Toxoplasma gondii*, tiene una distribución cosmopolita y en general es más frecuente en los países de clima cálido y húmedo que en los fríos y secos, este parásito es capaz de infectar las células nucleadas de todos los tejidos de los vertebrados con excepción de los eritrocitos (Sedano et al; 2000). Su forma arqueada es el origen del nombre del parásito, en griego “toxos” significa “arcos” y “plasma” significa “forma” (Peretti, 2015). Taxonómicamente *T. gondii* está relacionado con los coccidios y con los plasmodios, ya que pertenece al Phylum Apicomplexa; clase Sporozoa; subclase Coccidiasina; orden Eimeriorina (Sedano et al; 2000).

En la década de los 40's se identificaron anticuerpos neutralizantes contra taquizoitos extracelulares (Sabin y Feldman, 1948). El mapa genético de *Toxoplasma gondii* fue descrito por (Khan et al, 2005) y la distinción de cepas en los diferentes continentes fue realizada por (Lehmann et al, 2006).

Generalmente la toxoplasmosis puede presentarse de manera asintomática en la mayoría de los pacientes, sin embargo, puede causar diferentes cuadros o padecimientos como: **Toxoplasmosis adquirida en pacientes inmunocompetentes**, la infección puede ser subclínica o el paciente presentar fiebre, cefalea, dolores musculares y linfadenopatía. **Toxoplasmosis adquirida en pacientes inmunodeficientes** (es decir asociados al SIDA) o bajo tratamiento por terapia inmunosupresora, el paciente puede presentar fiebre, cefalea, confusión, problemas neurológicos y convulsiones (toxoplasmosis cerebral). **Toxoplasmosis ocular**, el paciente presenta retinitis, uveítis y retinocoroiditis, debilidad visual o ceguera, y cuando se trata de **Toxoplasmosis congénita**, puede causar abortos, alteraciones en el feto o graves consecuencias para el recién nacido, como desarrollo de afecciones del cerebro o el tejido ocular (hidrocefalia, retraso mental, sordera, deterioro psicomotor, cataratas, estrabismo, necrosis retiniana y/o ceguera). (Costa, 2014).

Toxoplasma gondii invade todas las células nucleadas y es capaz de adoptar distintas formas en la infección:

Ooquistes: Los felinos son los hospederos definitivos, eliminan los ooquistes no esporulados en sus heces fecales, y se tornan infectantes al cabo de 1 a 5 días en el medio ambiente (suelo). Los ooquistes esporulados son ovoidales, miden 10 - 12 μm y contienen 2 esporoquistes, cada uno con cuatro esporozoítos. (Figura 1)

Taquizoítos: Son las formas replicativas, intracelulares. Se observan en la fase aguda y son responsables de la diseminación y la destrucción tisular. Miden 3 μm x 6 μm , de forma oval, con un extremo aguzado y el otro redondeado. Se reproducen rápidamente por división binaria (endodiogenia) en vacuolas parasitóforas que se forman en células nucleadas. La replicación conduce a la lisis celular y a la diseminación de taquizoítos a diferentes tejidos (Figura 2).

Bradizoítos: *T. gondii* se diferencia en formas de muy lento crecimiento, contenidas en quistes tisulares. Los bradizoítos miden 1.5 μm x 7.0 μm y su morfología es similar a la de los taquizoítos. Existen mecanismos por los cuales entran en una etapa "quiescente" (latente). Estas formas, en su conjunto, con su membrana, constituyen los quistes tisulares, en condiciones de inmunocompromiso los bradizoítos que contienen se reactivan y diseminan como taquizoítos (Figura 3).

Los quistes tisulares varían en forma y tamaño. Los quistes pueden llegar a medir en un inicio unos 5 μm de diámetro. El tamaño varía, en promedio 70 μm y contienen unos 1 000 bradizoítos, aunque los hay de mayor tamaño. Presentan una delgada membrana elástica, y pueden persistir en tejidos durante el resto de la vida del hospedero. Se ubican principalmente en cerebro, músculo esquelético y cardíaco.

Se considera que los quistes tisulares contribuyen de manera fundamental al éxito de este parásito, ya que (I) ingeridos con carne cruda o mal cocida, sobreviven al tránsito por tracto digestivo, lo que permite la invasión del intestino delgado; (II) no son afectados por la respuesta inmune y por los fármacos; (III) los parásitos pueden persistir sin afectar a las células a lo largo de la vida del hospedero; (IV) los bradizoítos en los quistes son infecciosos, lo que contribuye a su diseminación en la naturaleza a través de animales carnívoros (Kamerkar & Davis. 2012).



Figura 1. Ooquiste de *T.gondii*



Figura 2. Taquizoito de *T.gondii*

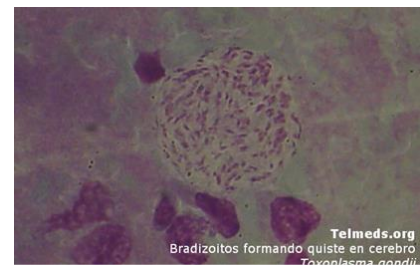


Figura 3. Bradizoitos formando un quiste tisular en el cerebro.

Este protozoo parasita a numerosas especies acuáticas y terrestres, fundamentalmente a mamíferos y aves; sin embargo, los felinos son los únicos hospederos de la forma sexuada del parásito y productores de ooquistes, es decir actúan como el hospedador definitivo por lo que su presencia es esencial en su ciclo biológico, los animales vertebrados y el hombre son hospedadores intermediarios (Sierra *et al*,1998). Así bien la presencia de gatos se relaciona directamente con la transmisión de la enfermedad pues en las regiones donde no se presentan no existe, y del mismo modo, en lugares donde el gato se integra como una mascota común, el índice de la infección suele ser muy elevado (Sedano *et al*; 2000).

Según algunos autores, por lo menos un tercio de la humanidad ha tenido exposición al parásito ya que la seroprevalencia de Toxoplasmosis está relacionada, entre otros factores, con las condiciones de vida, higiene y hábitos alimenticios. En el ser humano, las formas infectantes entran por vía oral mediante la ingestión de carnes crudas o mal cocidas que contienen quistes tisulares, al consumir aguas y/o alimentos contaminados con ooquistes esporulados provenientes de heces fecales del gato, por transfusiones sanguíneas o trasplantes de órganos y por vía transplacentaria (Peretti, 2015).

Ciclo biológico.

Los felinos domésticos y salvajes son los hospederos definitivos. En ellos se lleva a cabo las etapa sexual y asexual del ciclo biológico de *T. gondii*. Los gatos se infectan habitualmente al ingerir carne contaminada de aves y roedores con quistes tisulares, y con poca frecuencia a través de ingesta de ooquistes. Los felinos infectados (en gran mayoría asintomáticos) pueden eliminar hasta 1 millón de ooquistes/día, no esporulados,

En el transcurso de días a semanas, los ooquistes esporulan en un medio ambiente adecuado (cálido, con humedad); en jardines, cajas de arena, pueden permanecer infectantes durante meses.

En el humano y múltiples hospederos intermediarios (mamíferos, aves y otros animales de sangre caliente), después de la ingesta de quistes con bradizoítos u ooquistes con esporozoítos, los parásitos invaden las células de la mucosa del tracto digestivo, se diferencian a taquizoítos y se multiplican rápidamente antes de diseminarse por vía sanguínea o linfática a otros órganos. Invaden de manera activa casi cualquier célula, con la formación de una vacuola parasitófora a partir de la membrana citoplásmica del hospedero.

Después de unos ciclos de multiplicación rápida (por endodiogenia) y lisis de las células invadidas. Los taquizoítos se diferencian en bradizoítos dentro de las vacuolas parasitarias, y estas se convierten en quistes intracelulares que pueden permanecer latentes mientras la respuesta inmune permanezca estable (Mercier y Cesbron, 2015). (Figura 4) Los ooquistes sobreviven en el medio ambiente durante meses y son resistentes a desinfectantes, congelación y desecación. Temperaturas de 70 °C o mayores los destruyen.

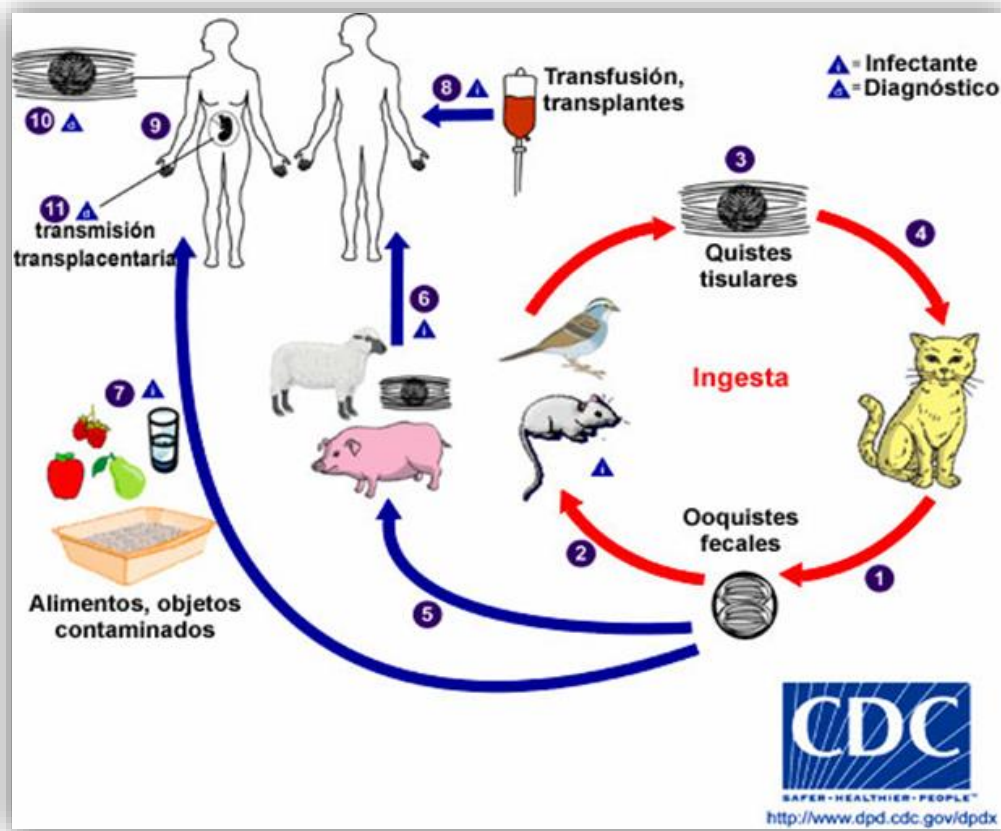


Figura 4. Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*

Antecedentes

- 1.- (Dubey,2010) reconoce a *T. gondii* como el agente causal de la toxoplasmosis, zoonosis reemergente y cosmopolita, que cursa generalmente asintomática, con síntomas muy sutiles comunes a otras afecciones. Es de transmisión horizontal y vertical, y aunque la segunda es menos frecuente puede causar abortos, alteraciones en el feto o graves consecuencias para el recién nacido, como desarrollo de afecciones del cerebro o el tejido ocular (hidrocefalia, retraso mental, sordera, deterioro psicomotor, cataratas, estrabismo, necrosis retiniana y/o ceguera), si la primoinfección ocurre durante la gestación (Costa, 2014).
2. (Montoya *et al*, 1996) menciona que es necesario hacer un diagnóstico en los recién nacidos con síntomas de síndrome TORCHS (sigla que agrupa los signos y síntomas producidos por las infecciones congénitas por *T.gondii*, Rubéola, Citomegalovirus, Herpes Virus, Sífilis u otros) debido a las secuelas que puede ocasionar si no se hace un diagnóstico oportuno que permita el tratamiento precoz y que evite la aparición de las secuelas tardías como el retardo en el desarrollo psicomotor o la retinocoroiditis.
3. (Cortés y Mancera, 2009) señalan que la toxoplasmosis congénita es una de las causas principales de lesiones oculares y malformaciones congénitas. Además, es una de las enfermedades que reporta altos índices de morbimortalidad.
4. (Grandía *et al*, 2009) indicó que la seroprevalencia está relacionada, entre otros factores, con las condiciones de vida, higiene y hábitos alimenticios. La población humana adulta presenta entre el 20 y el 70% de evidencia serológica por infección previa con el parásito (títulos altos de anticuerpos IgG), estimándose en más de un billón de individuos afectados a nivel mundial
5. (Grandía *et al*, 2009) Identificó tres estadios infecciosos de *T. gondii* para todos los hospederos: esporozoítos (en ooquistes esporulados como forma resistente al medio ambiente), taquizoítos (individualmente o en grupos y con multiplicación rápida) y bradizoítos (en quistes tisulares y con multiplicación lenta).
6. (Peretti,2015) basó el diagnóstico de la Toxoplasmosis fundamentalmente en el análisis serológico, que consiste en la búsqueda de anticuerpos (Ac) también conocido como inmunoglobulina (IgG) específicos en suero. Existe la necesidad de hacer un diagnóstico precoz de infecciones recientes en varias situaciones, como en embarazadas y personas inmunocomprometidas. El diagnóstico adecuado y el tratamiento oportuno constituyen la mejor manera tanto para prevenir la transmisión transplacentaria, como para reducir la morbimortalidad y las secuelas de la Toxoplasmosis congénita.
7. (Costa,2014) eligió las proteínas P22, P30 y P35 dichos antígenos fueron posteriormente evaluados por los siguientes ensayos inmunoquímicos: ELISA para detectar anticuerpos específicos IgM, IgG e IgA, ELISA de avidéz para IgG específica y dot blot para detectar IgG específica.
8. (Cortés y Mancera, 2009) midieron el grado de concordancia entre las técnicas de inmunofluorescencia indirecta y de ELISA, empleadas para la detección de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* en humanos. Concluyeron que el índice kappa muestra una concordancia casi absoluta entre las técnicas, IFI y ELISA, lo cual hace que los laboratorios departamentales de salud pública del país puedan cumplir con la determinación de anticuerpos IgG anti-*T. gondii*.

Ubicación Geográfica

El servicio social se llevó a cabo en el Laboratorio de Toxoplasmosis del Departamento de Parasitología que se encuentra en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) que se ubica en la calle Francisco de P. Miranda #177, Col. Unidad Lomas de Plateros, Alcaldía Álvaro Obregón, CP. 01480, en la Ciudad de México (Google Maps©, 2019).

Objetivo General

El servicio social se vincula con el objetivo general del proyecto de investigación aprobado por Consejo Divisional de CBS de esta unidad, el cual lleva como título: Determinación en suero de anticuerpos tipo IgG e IgM para *Toxoplasma gondii* mediante las técnicas serológicas de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) e inmunoensayo enzimático (ELISA). Dicho proyecto tuvo como objetivo general: **“Conocer y desarrollar las técnicas de (IFI) y (ELISA) basadas en la determinación de anticuerpos específicos de tipo IgG e IgM contra *Toxoplasma gondii* para el diagnóstico serológico temprano de la enfermedad parasitaria Toxoplasmosis la cual afecta a un gran número de personas de los diferentes estados de la República Mexicana”.**

Especificación y fundamento de las actividades

Propagación y mantenimiento de la cepa en gabinete de seguridad biológica

Se descongeló a baño maría (37 a 40°C) un criovial que contiene un ml de suspensión de parásitos de *T. gondii*. Después se tomó con una jeringa de insulina de 0.5 ml de la suspensión de parásitos y se inocularon vía intraperitoneal a cada uno de los ratones balb/c de aproximadamente 8 semanas de nacidos.

Se mantuvo en observación a los ratones hasta la aparición de signos de infección tales como (pelo erizado, postración falta de apetito, temblor entre otros.). Posteriormente con una jeringa de insulina de 0.5 se aplicaron 0.2 ml de anestesia (Zoletil 50) para inmediatamente sacrificarlos por dislocación cervical con el menor dolor posible.

Después se colocó a cada uno de los ratones en posición de decúbito dorsal y se realizó un pequeño corte con tijeras para descamisar a partir del área del esternón, y así dejar expuesto el peritoneo.

Inmediatamente se lavó la cavidad peritoneal inyectando con jeringa de 0.5 ml de PBC (pH 7.2) y se agitó suavemente el ratón para un lavado más completo. Figura 5.

Se extrajo con jeringa la solución con parásitos del peritoneo y se depositó en un tubo cónico de 15 mL, utilizando un tubo diferente para cada ratón y se rotularon con lote y fecha. Posteriormente se colocó una gota de la suspensión de parásitos en un portaobjetos y se le colocó un cubreobjetos para verificar en el microscopio a través del objetivo a (40X) la presencia de los parásitos; se realizó un segundo lavado peritoneal ya que se observaron más de 80 parásitos por campo en el primer lavado. Se realizó este proceso con cada ratón inoculado.

Por último, se centrifugó la suspensión de los parásitos a 2000 rpm durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. Después se disgregó el botón añadiendo 5 a 10 ml de PBS y nuevamente se centrifugó, eliminando el sobrenadante. A partir de este punto se inició: a) una nueva inoculación de ratones sanos, b) se fijó con formaldehído antígeno de IFI y c) la crioconservación de la cepa. Como paso final de este primer paso se registró en la bitácora electrónica (Carranza y Pérez, 2017).



Figura 5. Propagación y mantenimiento de la cepa en gabinete de seguridad biológica. Fotografía tomada en el laboratorio de Toxoplasmosis del Departamento de Parasitología (InDRE).

Criopreservación de la cepa

Se preparó una mezcla de congelación con:

- Suero fetal de ternera al 10%
- Medio de mantenimiento para cultivo celular al 80%
- Dímetil – sulfóxido al 10%

A partir del botón obtenido, se contó el número de parásitos en la cámara de Neubauer. Después se llevó a centrifugar el tubo a 2000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante. Se calculó el volumen de la mezcla de congelación necesario para obtener aproximadamente 5×10^5 parásitos por mL. Después se colocó 1mL de esta mezcla en cada criovial, y se congelaron en un ultracongelador de -60 a 70°C durante 24 horas y posteriormente se transfirió a nitrógeno líquido (N_2 aproximadamente -196°C). Finalmente se registró en la bitácora electrónica (Carranza y Pérez, 2017).

Obtención de la suspensión de trabajo para IFI

Se disgregó el botón de parásitos obtenido anteriormente y se re-suspendió en 10 mL de PBS para añadir 200 μl (2%) de formaldehído grado reactivo y conservar entre 2 a 8°C .

Posteriormente se homogenizó la suspensión de parásitos. Se tomó 10 μl de la suspensión y se colocó en un pozo de las láminas con cubierta de teflón, se dejó secar a temperatura ambiente y se fijó durante 20 minutos a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se lavó con agua destilada a chorro con pizeta. Se secó a temperatura ambiente y se observó en el objetivo a 40X que los parásitos no estén aglutinados, que conserven su forma de (media luna) y la cantidad de parásitos.

Finalmente se ajustó la suspensión de parásitos, concentrando las células por centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos, o bien diluyendo con PBS pH 7.2 hasta que el número de parásitos se aproximó de 90 a 100 por campo (objetivo 40X) (Carranza y Pérez, 2017).

Sensibilización de portaobjetos con cubierta de teflón

Los portaobjetos para sensibilizar fueron lavados con detergente y fueron desengrasados (con una solución de alcohol/acetona en una proporción 70/30) sobre una superficie plana. Después en cada pozo del portaobjetos se depositaron 10 μL de la suspensión de parásitos, esta se homogenizó agitando el tubo en forma manual o en vortex cada vez que se terminaba de sensibilizar en una laminilla completa, esto con el fin de evitar la sedimentación de los parásitos.

Se procedió a fijar en la incubadora a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 12 horas o toda la noche. Una vez que terminó la fijación, se colocaron los portaobjetos sensibilizados, se sumergieron en un recipiente con

agua destilada para después en un agitador orbital agitar suavemente durante 1 minuto. Se repitió esta operación 2 veces más en otros recipientes con agua destilada, se secaron y se almacenaron los portaobjetos en las cajas portaláminas a -20°C (Carranza y Pérez, 2017).

Titulación del conjugado

En una microplaca de fondo en U se colocaron 40µL de PBS a los pozos del 1-9 de la fila A, después se agregarán 40µL del suero control positivo IgG para *T.gondii* en el pozo 1 (dilución 1:2) se mezcló y se pasaron 40µL de esta solución al siguiente pozo y así sucesivamente hasta el pozo 9 con (una dilución total de 1:512).

Se colocaron en otra fila de la microplaca 40 µL de PBS en 2 pozos, en el pozo 1 se agregaron 40 µL del suero control negativo (dilución 1:2) se mezclaron y se pasarán nuevamente 40 µL de esta solución al siguiente pozo (dilución 1:4), y se mezcló. Posteriormente se colocaron en una lámina de teflón con 12 pozos sensibilizados con el parásito, 10 µL de cada una de las diluciones del control positivo hasta el pozo 9. Para cada una de las diluciones a probar del conjugado, se preparó e identificó un portaobjetos sensibilizado. Se colocaron 10 µL de PBS (blanco) en el pozo 10. Después se agregaron en los pozos 11 y 12, 10 µL de las diluciones 1:2 y 1:4 del suero control negativo.

Se incubaron durante 30 minutos a 37°C +/- 1°C en cámara húmeda, se lavaron con PBS con agitación durante 5 minutos y posteriormente con agua destilada con agitación durante 5 minutos y se secaron a temperatura ambiente. Se realizó la dilución del trabajo que sugiere el inserto, incluyendo 2 diluciones mayores y 2 menores a la sugerida del inserto.

Al preparar el conjugado, se añadió el medio de contraste (Azul de Evans al 1% en una dilución 1:100). Se agregaron 10 µL de la solución obtenida (Conjugado + Azul de Evans +PBS) a cada uno de los pozos que se probaron. Posteriormente se incubó a 37°C durante 30 minutos.

Se aplicó glicerol- PBS pH 8.0 en la lámina y se colocó un cubreobjetos, evitando la formación de burbujas. Después se realizó la lectura en el microscopio de epifluorescencia a (40 X) y se seleccionó la dilución del conjugado en la que se reproduzca el título esperado de los sueros control positivo y negativo.

Se utilizó el mismo método para seleccionar la dilución del conjugado tipo IgM. Por último, se anotaron los resultados de las lecturas en el formato **TOXO-F-01** y se conservaron en la bitácora de lecturas de muestras por inmunofluorescencia. Se eliminaron los residuos peligrosos y biológicos infecciosos de acuerdo a **GEAM-F-05**: Manejo interno de RPBI.

Durante el método se utilizó el **Microscopio de Epifluorescencia** el cual se manejó de acuerdo a la guía rápida del equipo y posteriormente se anotó el tiempo de su uso en la bitácora correspondiente (Carranza y Pérez, 2017).

Determinación en suero o LCR de anticuerpos antitoxoplasma tipo IgG e IgM, mediante el método de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

La inmunofluorescencia se refiere a la propiedad de una sustancia de emitir luz cuando es expuesta a radiaciones de baja longitud de onda y alta energía (UV – Rx). Las radiaciones absorbidas (invisibles al ojo), son transformadas en luz visible, o sea de una longitud de onda mayor al incidente, se le conoce como fluorescencia.

La inmunofluorescencia indirecta es una técnica de doble capa en donde se aplica el anticuerpo sin marcar directamente sobre los parásitos de la placa sensibilizada y se visualiza por tratamiento con un suero anti -inmunoglobulina conjugado con fluorocromo. El propósito es la detección de la reacción antígeno-anticuerpos mediante la adición de un anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína (FITC) y revelada dicha reacción en un microscopio de epifluorescencia (Sedana et al; 2000).

Primera etapa

Se colocó en una microplaca de 96 pozos fondo “U” 40 µl de PBS pH 7.2, (a todos los pozos de la fila A. Después se colocaron 40 µl del suero problema en el pozo A-1 (dilución 1:2), se mezcló perfectamente y se pasaron 40 µl de esta dilución al siguiente pozo de la fila hasta el pozo A-12 (dilución 1:4096).

Se repitió el procedimiento en las filas B, C, etc. por cada suero que se evaluó. Posteriormente se colocaron las diluciones del suero problema en una laminilla de 12 pozos con cubierta de teflón, previamente sensibilizada (Carranza y Pérez, 2017). Se empezó por la dilución más alta, colocando 15µl de la dilución del pozo 12 (1: 4096) en el pozo 12 de la laminilla, 15 µl de la dilución 11(1:2048) en el pozo 11 y así sucesivamente hasta el pozo No. 1. Se procedió a incubar las laminillas sensibilizadas en cámara húmeda a 37°C durante 30 min. Figura 6. (Sedano et al; 2000).

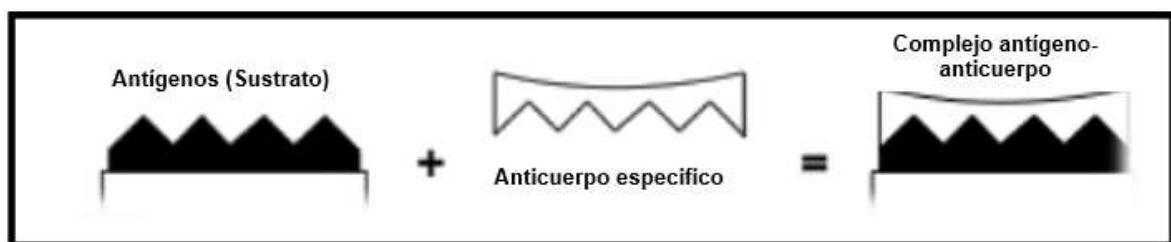


Figura 6. Primera etapa de IFI

Segunda etapa

Se eliminó el exceso de suero de las laminillas lavando al chorro de PBS pH 7.2 con una pizeta.

Y se realizó un lavado con PBS pH 7.2 en un vaso de Kipling, durante 5 min con agitación suave, después se pasó la laminilla a un vaso de Kipling con agua destilada y se agitó suavemente durante 1 min. Se dejó secar la laminilla a temperatura ambiente.

Posteriormente se preparó la solución de trabajo de los conjugados, una anti -inmunoglobulina humana marcada con fluoresceína (conjugado), IgG e IgM y se añadieron 15 µl de la solución de trabajo correspondiente a cada pozo de la laminilla que reaccionaron con el anticuerpo del complejo producido en la primera etapa.

Se incubó a 37°C durante 30 min en cámara húmeda y se repitió el paso 2. Se eliminó el exceso de líquido y se dejó secar.

Se agregaron de 3 a 4 gotas de glicerina/PBS pH 8.0 entre los pozos y colocaron en un cubreobjetos; se verificó que la glicerina se difundiera en toda el área cubierta por el cubreobjetos, evitando la formación de burbujas. Figura 1. Se observaron las laminillas al microscopio de epifluorescencia y se anotaron los resultados de la lectura en el formato TOXO-F-01/0.

Se capturaron los resultados y datos del paciente que se requirieron en el sistema de la red INFOLAB, se imprimió la hoja de resultados, se recabaron las firmas de los responsables del laboratorio según el Instructivo y finalmente se entregaron las hojas de resultados, e historias clínicas al área de recepción de muestras. Figura 7. (Sedanaet al; 2000).

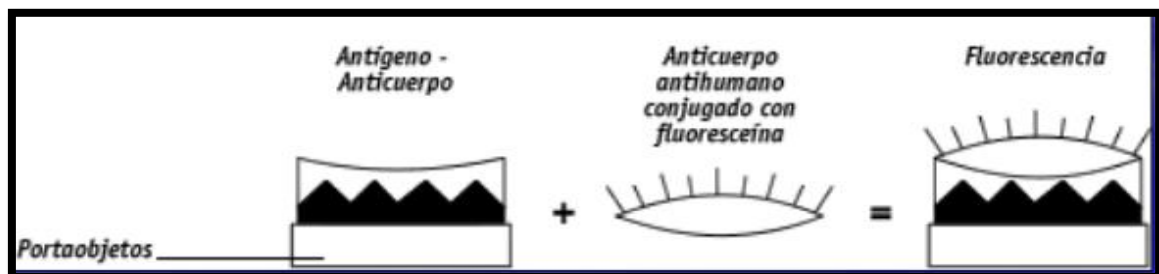


Figura 7. Segunda etapa de IFI

Interpretación de resultados

Se considera reactiva una muestra de suero problema, en la cual se observa fluorescencia en una dilución igual o mayor a 1:16, observándose como se muestra en la Figura 8.

La fluorescencia debe presentarse en toda la periferia del parásito, si se presenta cortada se considera como negativa.

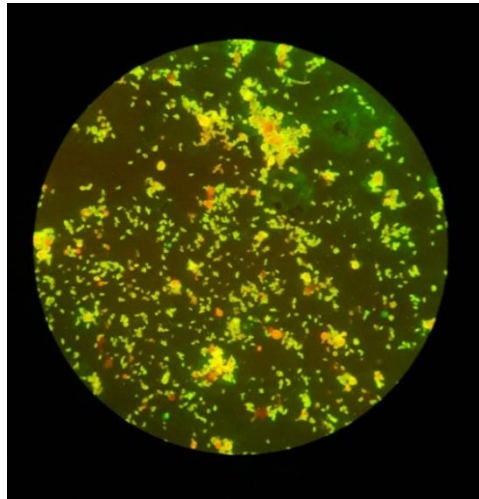


Figura 8. Anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii*, donde se observan los taquizoitos fluorescentes, indicando reacción positiva. Fotografía tomada en el laboratorio de Toxoplasmosis del Departamento de Parasitología (InDRE)

Se considera no reactiva (N.R) una muestra de suero problema, en la cual no se observe fluorescencia a partir de la dilución 1:16. Figura 9.

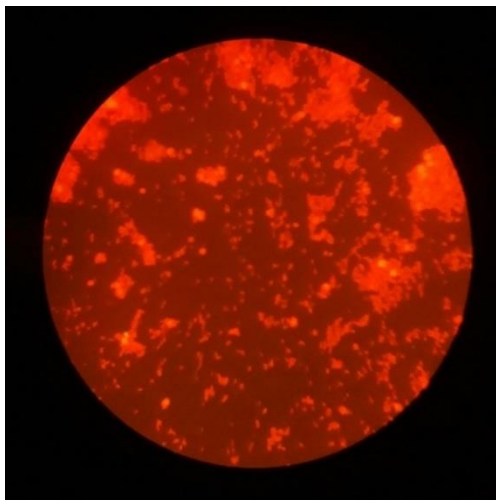


Figura 9. Se observan los taquizoitos sin fluorescencia, indicando que no hay reacción antígeno-anticuerpo, Fotografía tomada en el laboratorio de Toxoplasmosis del Departamento de Parasitología (InDRE)

Determinación en suero o LCR de anticuerpos antitoxoplasma tipo IgG e IgM, para el diagnóstico, mediante la técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA).

El principio de la técnica se basó principalmente en que el parásito sonificado se pone en presencia del suero del paciente y de un antisuero marcado (inmunoglobulina antihumana conjugada a peroxidasa). La unión de los tres componentes de la reacción se evidencia mediante una reacción química de óxido-reducción del sustrato (peróxido de hidrógeno), la cual en presencia de Ortofenilendiamina genera un color cuya intensidad es directamente proporcional a la reacción.

Se realizó la sensibilización de la microplaca con 100 μ L de antígeno en cada pozo a la concentración de trabajo y se dejó incubando a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se lavó con PBS-tween 0.05%. Se adicionó por duplicado 100 μ L del **suero problema** diluido 1:50 en PBS-Tween al 0.05%. Se introdujo en la prueba un suero que proporcione un valor de corte (suero de corte). Se adicionó por duplicado 100 μ L de este suero diluido 1:50 en PBS-Tween al 0.05%, y también se introdujo en la prueba un control positivo, y un control negativo, se adicionó por duplicado 100 μ L de ambos sueros diluidos 1:50 en PBS-Tween al 0.50%. Se incubó a 37°C por 30 minutos y se lavó la placa con PBS-tween 0.05%. Se colocó en todos los pozos 100 μ L de conjugado anti IgG diluido 1:1000 en PBS-Tween al 0.05% (Se realiza el mismo procedimiento con una dilución 1:500 de conjugado anti IgM). Se dejó incubar 30 minutos 37° C. Se lavó con PBS-tween 0.05%. Se procedió a preparar 5 ml de OPD al 0.04% en PBS Tween al 0.05% y se añadieron 2.5 ml de peróxido de hidrógeno al 30 %, de la solución preparada, se coloca 100 μ L en cada pozo. Se dejó incubar de 15 a 20 minutos a temperatura ambiente para la formación del color.

Finalmente se detuvo la reacción con 100 μ L de Acido sulfúrico (H₂SO₄) 2N y se llevó a cabo la lectura en el espectrofotómetro a 492 nm. Figura 10.(Sedanaet al; 2000).

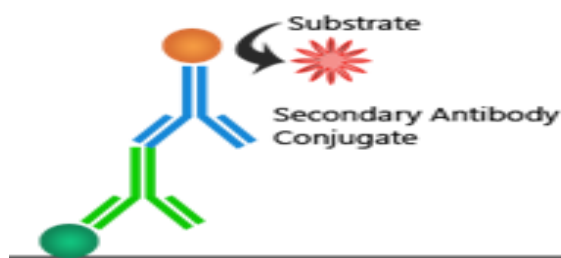


Figura 10. Representación del procedimiento de ELISA

Interpretación de resultados

- Se considera un suero problema no reactivo, a aquel en que la lectura obtenida, sea menor ó igual a la lectura del suero de corte.
- Se considera como sueros problema reactivos, a aquellos en los que la lectura a 492 nm, sea mayor a la obtenida en el suero de corte.

Cuando en alguna muestra problema, los resultados de la técnica de IFI, se presentan poco confiables, se comparan con las lecturas obtenidas en la técnica de ELISA, si en ésta hay reacción, se considera la prueba reactiva, si por el contrario no la hay, se considera no reactiva.

Otras actividades a desarrollar.

Además del diagnóstico realizado en el laboratorio, se llevó a cabo actividades en la oficina, una de las más importantes es la captura de los datos de los pacientes en el programa informático INFOLAB, en donde se resguardan los aspectos principales de la historia clínica de cada paciente. De aquí la importancia de registrar el ingreso de una muestra al laboratorio, asegurando que se cumplan con la primera meta de la OMS en cuanto a la seguridad del paciente, la cual es “paciente correcto, identificación correcta”, la cual consiste en verificar que los datos del paciente en su historial clínico coincidan con los datos que vienen en la muestra. Si esto es correcto, entonces los datos se remiten a el área de REMU para solicitar la captura en un sistema informático denominado “INFOLAB”. Posteriormente se “escanea” la historia clínica del paciente, los resultados obtenidos y el formato oficial de InDRE.

Para que un laboratorio funcione adecuadamente tiene que llevar a cabo un Sistema de Gestión de Calidad, por lo tanto, se tiene que cumplir con las Normas ISO 2000 y la 15189 que en forma general exigen:

- Verificar que los equipos del laboratorio en los cuales se trabaja, estén a las temperaturas y en condiciones adecuadas para su uso mediante el llenado de registros y bitácoras de uso. La calibración de equipos y materiales como micropipetas no la realiza el laboratorio, sin embargo, si se realiza una lista de todas las micropipetas que requieran de calibración, identificadas correctamente cada una, con modelo y número de serie. Posterior a la calibración el laboratorio si realiza la verificación de ésta, realizando mediciones repetidas a un volumen establecido de la micropipeta, para obtener la variación y precisión.
- Cumplir con el Sistema Globalmente Armonizado, mediante la identificación correcta de todos los reactivos del laboratorio.

- Presente en sesiones de auditorías internas al Instituto, para conocer la dinámica del procedimiento de esta naturaleza.

Impacto de las actividades del servicio social, aprendizaje, y fundamento

Al conocer y poner en práctica las técnicas serológicas de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) e inmunoensayo enzimático (ELISA), es de utilidad para conocer cómo se realiza un diagnóstico que debe cumplir con los indicadores de calidad, como son la oportunidad y la confiabilidad. Esto fortalece la formación académica y profesional del servidor social y las capacidades del mismo dentro del ámbito del laboratorio sobre un tema específico. Los conocimientos adquiridos servirán para impulsar el desarrollo de los proyectos de investigación aplicada del Laboratorio de Toxoplasmosis del Departamento de Parasitología perteneciente al (InDRE) enfocado principalmente a pacientes como mujeres embarazadas, pacientes inmunosuprimidos y pacientes con enfermedad ocular.

Fundamento de las actividades

La licenciatura de Biología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, tiene como objetivo formar profesionales críticos y creativos, capaces de realizar actividades científicas para desarrollar y evaluar, con una perspectiva multidisciplinaria, estrategias de manejo de los recursos naturales bióticos con base en metodologías propias de las ciencias biológicas. En ese sentido es importante que los alumnos realicen servicio social, con la finalidad de que adquieran herramientas metodológicas y habilidades de investigación que les permitan desarrollarse en su futuro profesional. El Laboratorio de Toxoplasmosis del Departamento de Parasitología, le permitió a la servidora social adquirir conocimientos de las técnicas serológicas de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) e inmunoensayo enzimático (ELISA) para la determinación de anticuerpos específicos de tipo IgG e IgM contra *T. gondii* que se requieren para el diagnóstico serológico de la Toxoplasmosis. La servidora social aporta beneficios al laboratorio al colaborar con todas las actividades administrativas y técnicas, así como de conocer los criterios pertinentes que corresponden para dar un diagnóstico correcto y oportuno de la enfermedad. Debido a ello, los prestadores de servicio social son parte importante en el desarrollo de las actividades.

Bibliografía

- Ana Ma. Sedano Lara, J. M. (2000). MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO DE TOXOPLASMOSIS. México: Jorge Luis de la Rosa Arana.
- Carranza, J. M. ; Pérez, G. J.J. (2017). Metodo de Determinación en suero o LCR de anticuerpos antitoxoplasma tipo IgG e IgM (IFI). México: Instituto de Diagnóstico y Referencia epidemiológicos.
- Dubey JP. 2010a. Toxoplasmosis of animals and humans. 2nd ed. Maryland: CRC Press. 319 p.
- Liliana Jazmín Cortés¹, Lorena Mancera¹ (2009). Concordancia entre ELISA e IFI para la determinación de anticuerpos tipo IgG contra *Toxoplasma gondii*. REVISTA INFECTIO.
- Costa, J. G. (2014). Estudio de la utilidad de las proteínas P22, P30 y P35 de *Toxoplasma gondii* para el diagnóstico de fase aguda de la toxoplasmosis. Tesis, 12-226.
- Google Maps©. (2019). Recuperado el 3 de Octubre de 2018, de <https://www.google.com.mx/maps/place/Instituto+de+Diagn%C3%B3stico+y+Referencia+Epidemiol%C3%B3gicos+InDRE/@19.366988,99.203537,17z/data=!3m1!>
- Raiden Grandía G.1,3, Ángel Entrena G.1, Jeddú Cruz H.2 (2009). TOXOPLASMOSIS EN *Felis catus*: ETIOLOGÍA, EPIDEMIOLOGÍA Y ENFERMEDAD. Rev Inv Vet Perú 2013; 24(2): 131-149
- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. (Octubre de 2019). Obtenido de <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/instituto-de-diagnostico-y-referencia-epidemiologicos-mision-vision-y-politica-de-calidad-135502?state=published>
- Lehmann T., Marcet PL., Graham DH., Dahl ER., Dubey JP. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. Proc Natl Acad Sci. 2006;103:11423-11428.
- Liliana Jazmín Cortés¹, L. M. (2009). Concordancia entre ELISA e IFI para la determinación de anticuerpos tipo IgG contra *Toxoplasma gondii*. 13(2), 76-82.
- Mercier, C. y Cesbron-Delauw, MF (2015). Gránulos secretores de toxoplasma : ¿una población o más? Tendencias Parasitol 31, 60-71. doi: 10.1016 / j.pt.2014.12.002
- María Teresa Montoya¹, Jorge Enrique Gómez, John Carlos Castaño, Cathy Marx, Dominique Aubert, Annie Bonhomme, Jean Michel Pinon (1996) Avances diagnósticos en toxoplasmosis PCR, nuevos marcadores de infección evolutiva y otras técnicas. Acta Med Colomb Vol. 21 N° 3
- Peretti, L. E. (2015). Síntesis controlada y caracterización de complejos látex-proteína para detección de toxoplasmosis aguda mediante pruebas de inmunoaglutinación. 7-8 240.
- SABIN A. y FELDMAN. H. A. 1948.- Dyesas microchemical indicator of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite 364 (*toxoplasma*). Science. 108~660.
- Sierra, M. B. (30 de 05 de (1998)). Diagnóstico serológico de las infecciones por *Toxoplasma gondii*. Obtenido de: <http://www.seimc.org:https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/serologia/toxo.pdf>
- Khan A, Taylor S, Su C, Mackey AJ, Boyle J, Cole R, Glover D, Tang K, Paulsen IT, Berriman M, Boothroyd JC, Pfefferkorn ER, Dubey JP, Ajioka JW, Roos DS, Wootton JC, Sibley LD. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. Nucleic Acids Res. 2005; 33: 2980-2992.

