



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DEL NORDESTE

“Aplicación de la Inmunofluorescencia Indirecta para el diagnóstico de enfermedades infecciosas y autoinmunes”

Asignatura: Práctica Electiva

Carrera: Bioquímica

Directora: Mg Graciela Ruth Svibel de Mizdraji

Alumna: María A. Alcaraz

Año 2020

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	4
2. ENFERMEDADES AUTOINMUNES	4
2.1. Fundamento teórico conceptual	4
2.2. Anticuerpos anti-DNAn	7
2.3. Anticuerpos anti-núcleo-citoplasmáticos (ANA/FAN)	8
2.4. Anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA)	11
2.5. Anticuerpos anti-antígenos órgano-específicos	13
3. ENFERMEDADES INFECCIOSAS	13
3.1. Fundamento teórico conceptual	13
3.2. Anticuerpos anti - Toxoplasma gondii	14
3.3. Anticuerpos anti – Trypanosoma cruzi	15
3.4. Anticuerpos anti – Treponema pallidum	16
4. OBJETIVOS	18
4.1. Objetivos generales	18
4.2. Objetivos específicos	18
5. MARCO METODOLÓGICO	18
5.1. Lugar de desarrollo	19
5.2. Tipo de estudio y diseño	19
6. POBLACIÓN	19
6.1. Población objetivo	19
6.2. Criterios de inclusión	19

Práctica Electiva – María A. Alcaraz

6.3. Criterios de exclusión	19
6.4. Muestra	19
7. PROCEDIMIENTO	19
8. PROCESAMIENTO DE DATOS	21
9. RESULTADOS	21
10. DISCUSIÓN	24
11. CONCLUSIÓN	25
12. AGRADECIMIENTOS	25
13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
14. ANEXO	29

1. INTRODUCCIÓN

El diagnóstico de las enfermedades autoinmunes (EAI) e infecciosas puede realizarse utilizando un gran número de técnicas inmunológicas. Las mismas, permiten tanto la identificación como cuantificación de los antígenos específicos reconocidos. Además, este tipo de técnicas han evolucionado de manera importante en las últimas décadas, ya que se han desarrollado pruebas con mayor especificidad y sensibilidad. Entre las técnicas más utilizadas se encuentra la inmunofluorescencia indirecta (IFI), que consiste en la identificación de los anticuerpos que reconocen estructuras antigénicas celulares nativas.

Esta técnica es un poco más compleja que la inmunofluorescencia directa (IFD), requiere más pasos y es posible que sufra más interferencias, pero en contrapartida es mucho más flexible que una técnica directa. En este aspecto, ya que es posible que un anticuerpo primario una a más de un anticuerpo secundario, existe un efecto de amplificación que también aumenta la sensibilidad de la técnica.

Recordemos que los anticuerpos constan de dos partes, una región variable, que es la que reconoce al antígeno y una constante, reconocida por el anticuerpo secundario. Asimismo, es posible que existan varios anticuerpos que reconozcan diferentes antígenos (es decir que tengan diferentes regiones variables) pero que compartan la misma región constante. Todos estos anticuerpos con diferentes especificidades pueden ser reconocidos a su vez por un único anticuerpo secundario que reconozca la región constante. Esto ahorra el esfuerzo técnico y el costo de modificar cada uno de los anticuerpos primarios para acarrear el fluoróforo.

La interacción se evidencia por medio de un anticuerpo anti-inmunoglobulina humana, obtenido en conejo, cabra o cobayo, dirigido contra las fracciones constantes (Fc) de las inmunoglobulinas IgG, IgA y/o IgM. Este anticuerpo anti-inmunoglobulina humano está conjugado o acoplado a un fluoróforo, generalmente isotiocianato de fluoresceína (FITC). Las improntas utilizadas en el ensayo, una vez finalizada la técnica de IFI, se observan en un microscopio de epifluorescencia (Hernández Ramírez y Cabiedes, 2010).

Sin embargo, para poder desempeñarnos de una forma más completa en el ejercicio profesional, es relevante el manejo de los datos clínicos, lo que implica interacción activa con el equipo de salud.

2. ENFERMEDADES AUTOINMUNES

2.1. Fundamento teórico - conceptual

La detección de anticuerpos dirigidos contra antígenos nucleares, citoplasmáticos y mitóticos puede realizarse utilizando como sustratos líneas celulares epiteliales humanas como las **células HEP-2**.

El nombre es un acrónimo acuñado por el grupo de investigación original que proviene de *Human Epidermoid carcinoma strain*; actualmente se utiliza también según la connotación *Human Epithelioma* (Toolan, 1954).

Las células originales provenían de un tumor metastásico nodular de laringe; extirpado en el año 1952 de un paciente masculino de 57 años de edad que padecía cáncer de garganta. Las mismas, quirúrgicamente removidas, fueron posteriormente implantadas en ratas inmunosuprimidas por irradiación con rayos X y cortisona, para finalmente ser establecidas en cultivo celular (Toolan, 1954; Fjelde, 1955).

Un sustrato ideal de células HEp-2 debe cumplir ciertos estándares (Hammar, 2013):

- Los núcleos celulares deberían ser grandes y de tamaño y forma regulares.
- La distribución de células no debería ser ni demasiado densa, ni demasiado dispersa, el número óptimo debería estar entre 70 y 100 células por campo a un aumento de 400, menos de 50 o más de 110 no es adecuado.
- Es necesario que tengan citoplasmas amplios, donde puedan distinguirse claramente diferentes patrones citoplasmáticos y donde el núcleo se encuentre claramente delimitado.
- Debe poseer un número considerable de células en diferentes fases del ciclo celular.
- Debe permitir ver un número limitado de cromosomas (<10) con claridad. De dos a seis cromosomas en los cuales de uno a tres se encuentran en metafase es lo óptimo.
- Debe tener una fluorescencia de fondo mínima.

Hasta el día de hoy, la detección de autoanticuerpos por medio de células HEp-2 sigue manteniendo un rol central. En casos en que se sospecha una enfermedad autoinmune, el ensayo sobre células HEp-2 es el método de tamizaje recomendado, el cual además tiene una excelente relación beneficio/costo y permite un diagnóstico diferencial de alta calidad entre varias enfermedades autoinmunes (EAI). Cualquier resultado positivo, es seguido por lo general de una batería de determinaciones en etapas, las cuales, dependiendo de la reactividad que presentan los anticuerpos frente a HEp2, pueden incluir otras pruebas inmunológicas tales como **ELISA** (acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* - ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima) para anticuerpos individuales o inmunoblot.

Práctica Electiva – María A. Alcaraz

Los cultivos celulares, o los cortes histológicos de tejidos presentan a los antígenos relevantes en su ambiente natural, además de que permiten la determinación de múltiples anticuerpos simultáneamente con una alta sensibilidad. La detección de autoanticuerpos por medio de células HEp-2 provee mucha más información que una simple señal, positiva o negativa. Muchos anticuerpos presentan patrones de fluorescencia característicos, (homogéneo, granular, nucleolar, punteado, citoplasmático) que permiten la diferenciación en varios grupos de autoanticuerpos. En especial para la determinación de ANA/FAN, las células HEp-2 de cultivo proveen una mayor sensibilidad que los cortes histológicos de tejidos de mamíferos. Los diferentes patrones de fluorescencia son fácilmente discernibles en la monocapa de células HEp-2, mientras que son difíciles de apreciar en los cortes de tejido de hígado y riñón de rata. Asimismo, los anticuerpos que reconocen antígenos órgano-específicos, se investigan en improntas de cortes de tejidos específicos, tales como corazón, estómago, hígado y riñón de rata, tiroides de conejo fijados y sin fijar, esófago de mono.

Los **anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA)** son un grupo de autoanticuerpos principalmente de tipo IgG, dirigidos contra antígenos que se encuentran presentes en el citoplasma de los neutrófilos. Se pueden detectar en un gran número de EAI, pero se encuentran particularmente asociados a la vasculitis sistémica, también llamada vasculitis asociada a ANCA.

En este caso se utilizan neutrófilos fijados con formalina y etanol.

La Tabla 1 muestra los diferentes tipos de anticuerpos, incluyendo las enfermedades relacionadas con sus porcentajes de incidencia.

Tabla 1: Incidencia de EAI y los diferentes autoanticuerpos.

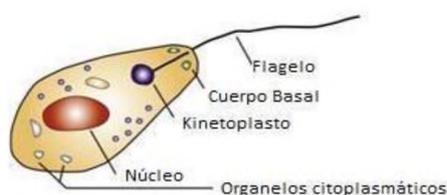
Autoanticuerpos	Enfermedad relacionada	Sustrato antigénico	Dilución de screening	% de Incidencia
ANA/FAN	Lupus Eritematoso Sistémico	Hígado/Riñón HEp-2	1/40	95 - 100
	Esclerodermia		1/80	70 - 90
	Síndrome de Sjögren			> 95
	Artritis Reumatoidea			> 90
	Artritis Juvenil			15 - 30
	Cirrosis Biliar Primaria			24 - 45
	Hepatitis autoinmune tipo I			95
AMA	Cirrosis Biliar Primaria	Riñón y Estómago	1/40	95
	Hepatitis autoinmune tipo I			25 - 28
	Cirrosis Criptogénica			15 - 30
ASMA	Hepatitis autoinmune tipo I	Estómago y Riñón	1/40	40 - 70
	Cirrosis Biliar Primaria			50
	Cirrosis Criptogénica			28
APCA	Anemia perniciosa	Estómago	1/40	> 90
	Gastritis Atrófica Simple			60
	Tiroiditis de Hashimoto			33
	Úlcera Gástrica			22

	Síndrome de Sjögren			15
ATA	Enfermedad de Hashimoto Enfermedad de Graves	Tiroides	1/20	70 - 90 40
EVI	Enfermedad de Chagas - Cardiopatía Chagásica	Corazón	1/20	45 - 75
Anti DNAn	Lupus Eritematoso Sistémico Otras Patologías	Crithidia Luciliae	1/10	> 75 < 2
Anti – LKM-1	Hepatitis autoinmune tipo II Hepatitis C	Riñón e Hígado	1/40	80 7
EMA IgA	Enfermedad Celíaca Dermatitis Herpetiforme	Esófago de mono	1/5	100 90

2.2. Anticuerpos anti-DNAn

El ensayo se fundamenta en el reconocimiento de los anticuerpos que reaccionan contra el DNA de la mitocondria gigante (kinetoplasto) del parásito (hemoflagelado) *Crithidia luciliae* (Fig. 1) (Schwartz & Stollar, 1985; Griemberg y col, 2006; Wang, 2019).

Fig. 1. Estructura de *Crithidia luciliae*



Actualmente, la IFI se utiliza en los estudios de autoinmunidad para la detección de anticuerpos anti-DNA de doble cadena (DNAds) o DNA nativo (DNAn) utilizando como sustrato *Crithidia luciliae* (Fig. 2).

La prueba sólo se considera positiva cuando se tiñe el kinetoplasto independientemente de la tinción en el núcleo ya que, en este último, puede existir reactividad contra otros componentes, lo que podría dar resultados falsos positivos.

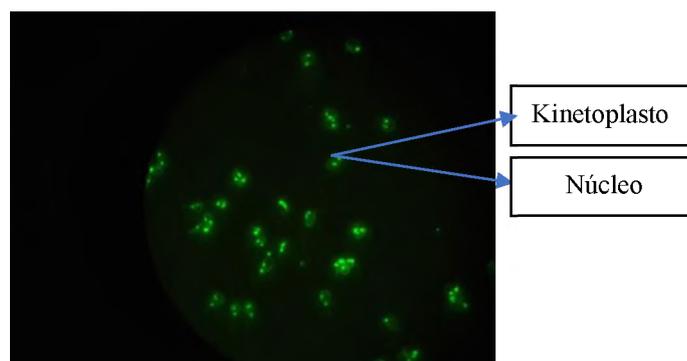
La técnica es altamente específica, el isotipo IgG se considera marcador diagnóstico del LES por su elevada especificidad (> 95%) (Méndez Rayo y col, 2018). Se consideran también marcadores pronósticos debido a que su presencia marca un curso multisistémico más grave del LES, así como la presencia o el desarrollo de manifestaciones renales o del sistema nervioso central (SNC). Los títulos de estos anticuerpos se relacionan generalmente con la actividad clínica (especialmente en nefritis lúpica) y por ello, se consideran marcadores de actividad del LES. Los anticuerpos depositados fijan complemento y sus niveles séricos disminuyen por consumo.

También se ha visto que la subclase de IgG puede ser importante por estar relacionada con su capacidad diferente para activar complemento; los anticuerpos isotipos IgG1 son considerados menos patógenos que los isotipos IgG2a, ya que son menos eficientes en la activación de complemento.

En respuesta al tratamiento terapéutico, el título de anticuerpos disminuye o se negativiza y el complemento recupera valores normales.

Sin embargo, no olvidemos que, a pesar de su especificidad, esta técnica es poco sensible, por lo que es conveniente en ciertos casos confirmar los resultados con otras pruebas como el ELISA.

Fig.2. IFI anti-DNAn (400X)



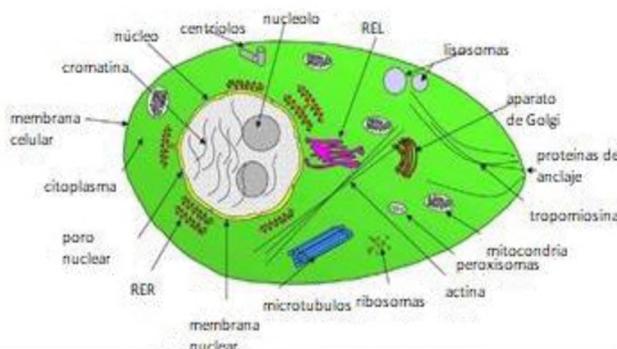
2.3. Anticuerpos anti-núcleo-citoplasmáticos (ANA/FAN)

Los ANA/FAN son inmunoglobulinas que reconocen componentes celulares autólogos (nucleares y citoplasmáticos). Es importante tener en cuenta, que en circulación pueden encontrarse también autoanticuerpos naturales y relacionados a procesos infecciosos (Cabiedes y Núñez Álvarez, 2010).

Los ANA/FAN detectados por IFI deben ser considerados teniendo en cuenta el **patrón y título**. La detección específica de diversos autoanticuerpos (anti-ENA, anti-DNAn) resulta útil en el diagnóstico y seguimiento de pacientes con enfermedades autoinmunes. Por tal motivo, su detección debe realizarse de manera ordenada y razonable, empleando las guías o estrategias enfocadas al buen uso e interpretación de la presencia de autoanticuerpos.

La identificación y cuantificación de ANA/FAN no sólo incluye antígenos que se localizan en el núcleo de células HEp-2, sino también aquellos presentes en el citoplasma y células mitóticas (Fig. 3).

Fig. 3. Estructura de la célula HEp-2 en interfase



La importancia de usar células HEp-2 como sustrato se fundamenta principalmente en que tienen características particulares. Un núcleo más grande de lo normal, debido a su gran cantidad de antígenos nucleares (más de 46 cromosomas, más de 3 nucleolos, abundantes ribonucleoproteínas) (Cabiedes y Núñez Álvarez, 2010). Asimismo, expresan una variedad de antígenos citoplasmáticos relacionados a organelas como mitocondrias, lisosomas, ribosomas. Todo ello permite hacer una fácil detección e identificación de los antígenos reconocidos por los autoanticuerpos, presentes en los sueros de los pacientes con enfermedades autoinmunes. Además, por ser una línea celular muy activa, se pueden observar todas las fases del ciclo celular en los cultivos, con lo que se facilita la identificación de antígenos presentes sólo en las fases de división, como los centrómeros o aquellos conocidos como proliferación celular de antígenos nucleares (PCNA).

La Fig.4 muestra las fases del ciclo celular que deben tenerse en cuenta para identificar los distintos patrones. Recordemos que cada una de ellas, profase, metafase, anafase y telofase, presentan características antigénicas diferentes.

La detección de ANA/FAN por IFI utilizando como sustrato células HEp-2 es útil como prueba de tamizado inicial, debido a que los patrones de tinción más comunes se relacionan con una gran variedad de antígenos.

Se considera que un ANA/FAN es positivo a partir de la dilución 1/80 en adultos (aunque algunas guías recomiendan considerar el límite inferior a partir de 1/160 y en pediatría 1/10 o 1/20 (Hernández Flórez y Valor, 2018).

La Tabla 2 muestra los distintos patrones, imágenes y antígenos de fluorescencia relacionados a los distintos autoanticuerpos.

Tabla 2. Patrones, imágenes y antígenos asociados a autoanticuerpos

Patrón	Imagen (Nomenclatura según ANAPatterns)	Antígenos
	AC-1 Nuclear homogéneo	DNAds, histonas, Ku

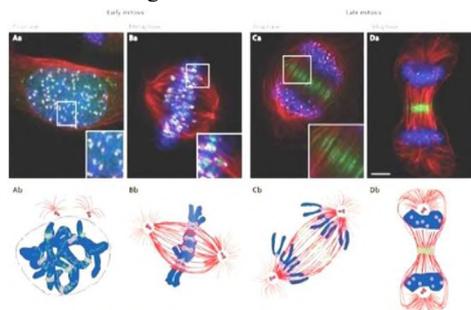
Práctica Electiva – María A. Alcaraz

Nuclear	AC-2 Nuclear granular fino denso	DFS70/LEDGF
	AC-3 Centrómero	CENP-A/B
	AC-4 Nuclear granular fino	SS-A/Ro, SS-B/La, Mi-2, TIF1, Ku
	AC-5 Nuclear granular grueso	HnRNP, U1RNP, Sm, ARN polimerasa III
	AC-6 Gránulos nucleares múltiples	Sp-100, proteínas PMN, MJ/ NXP-2
	AC-7 Gránulos nucleares escasos	P80-Colina-SMN
	AC-8 Nucleolar homogéneo	PM/Scl, PM/Scl-100, Th/To, B23/nucleofosmina, Nucleolina, No55/SC65
	AC-9 Nucleolar grumoso	U3snoRNP/fibrilarina
	AC-10 Nucleolar granular	ARN polimerasa I, hUBF/NOR-90
	AC-11 Membrana nuclear lisa	Láminas ABC o proteínas asociadas con las láminas
	AC-12 Membrana nuclear granular	Complejo de proteínas de los poros nucleares: ejemplo gp210
	AC-13 Parecido a PCNA	Antígeno nuclear de células proliferativas
	AC-14 Parecido a CENP-F	Proteínas del centrómero F
	AC-29 DNA-topoisomerasa-I	DNA-topoisomerasa-I
Citoplasmático	AC-15 Citoplasmático fibrilar lineal	Antígenos, actina, miosina no muscular
	AC-16 Citoplasmático fibrilar filamentar	Vimentina, citoqueratina, tropomiosina
	AC-17 Citoplasmático fibrilar segmentado	Actina alfa, vinculina
	AC-18 Citoplasmático granular discreto	GW182, Anti-Su/Ago2
	AC-19 Citoplasmático granular fino denso	PL-7, PL-12, Proteína P ribosomal
	AC-20 Citoplasmático granular fino	Jo-1/sintetasa del Histidil del ARNt
	AC-21 Citoplasmático reticular/AAM	PDC-E2/M2, BCOADC-E2, subunidad E1 de PDC, E3 DP/proteína X
	AC-22 Citoplasmático granular polar	Giantina/macrogolgina, Golgin-95/GM130, Golgin-160, Golgin-97

	AC-23 Bastones y anillos	IMPDH2
Mitótico	AC-24 Centrosoma	Centríolos
	AC-25 Huso mitótico	HsEg5
	AC-26 Parecido a NuMA	NuMA
	AC-27 Puente intercelular	Ninguno
	AC-28 Envoltura cromosómica mitótica	Histona H3 modificada, MCA-1

DNAds: DNA de cadena doble; DNAn: DNA de cadena sencilla o nativa; RNP: ribonucleoproteínas

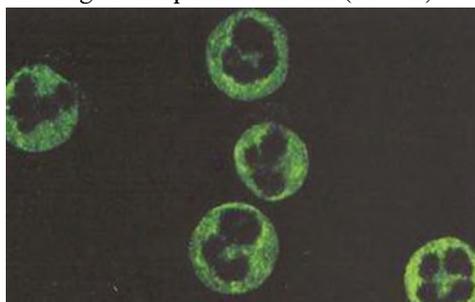
Fig. 4. Mitosis celular



2.4. Anticuerpos anticitoplasma del neutrófilo (ANCA)

La IFI se utiliza también como prueba de tamizado inicial para la detección de ANCA, debido a que en ella se observan los 3 patrones de tinción que se relacionan con manifestaciones clínicas de autoinmunidad. Los patrones son el citoplásmico o cANCA, el perinuclear o pANCA y el atípico o xANCA. El patrón cANCA se caracteriza por presentar una tinción citoplásmica en neutrófilos fijados con etanol o acetona. Los anticuerpos que dan el patrón cANCA reconocen proteínas débilmente catiónicas o neutras como la proteinasa-3 (PR-3) y la proteína catiónica de 57kDa (CAP-57), las cuales se liberan de los gránulos específicos por el tratamiento de las células con alcohol o acetona y se distribuyen de manera homogénea en el citoplasma de los neutrófilos. (Fig. 5) (Cabiedes y Núñez Álvarez, 2010).

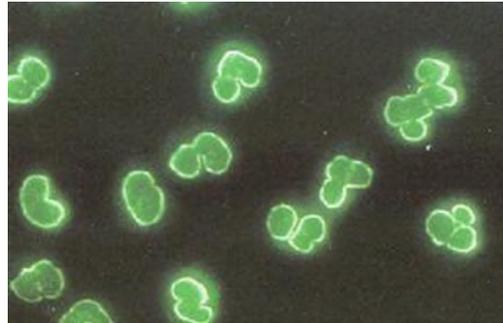
Fig. 5. IFI patrón cANCA (1000X)



El patrón pANCA se observa en neutrófilos fijados con etanol o acetona y es perinuclear. El patrón está dado por los anticuerpos que reconocen proteínas fuertemente catiónicas como: mieloperoxidasa

(MPO), elastasa y azurocidina, las cuales cuando son liberadas de los gránulos primarios y específicos del neutrófilo se reorganizan en la periferia del núcleo, el cual tiene carga negativa por el DNA (Fig. 6) (Hernández Ramírez y Cabiedes, 2010). El patrón pANCA se debe confirmar en neutrófilos fijados con formalina. La formalina es un solvente orgánico que reduce el efecto de atracción de las proteínas catiónicas (MPO, elastasa y azurocidina) hacia el DNA, con lo que quedan distribuidas en el citoplasma.

Fig. 6. IFI patrón pANCA (1000X)



El patrón xANCA o atípico es el resultado del reconocimiento de las proteínas: catepsina G, lisozima y lactoferrina. Dichas proteínas se liberan de los gránulos específicos de los neutrófilos y se redistribuyen en la periferia del núcleo cuando son tratados con etanol, acetona o formalina. Es importante enfatizar que el efecto de reacomodo perinuclear de las proteínas mencionadas no se ve modificado en los neutrófilos fijados con formalina (Fig. 7) Por ser un patrón perinuclear se puede confundir con el patrón pANCA, por lo que es importante estudiar las muestras de los pacientes que presentan dicho patrón en neutrófilos fijados con alcohol o acetona y en neutrófilos fijados con formalina (Hernández Ramírez y Cabiedes, 2010).

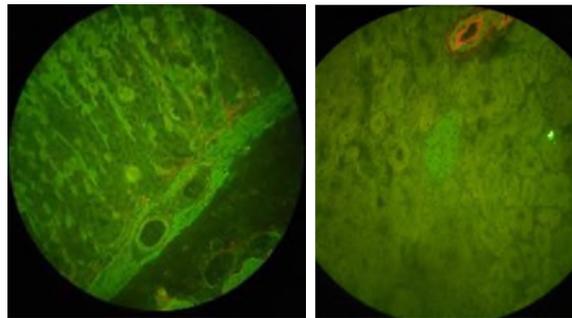
Fig. 7. IFI patrón xANCA (1000X)



2.5. Anticuerpos anti-antígenos órgano específicos

La técnica de IFI nos permite evaluar la presencia de los autoanticuerpos presentes en las muestras de pacientes con enfermedades autoinmunes, los cuales reconocen antígenos específicos de determinados órganos. Para caracterizar los anticuerpos dirigidos contra los distintos antígenos específicos, es necesario utilizar un ensayo de ELISA. Para la detección de anticuerpos órgano específicos, se emplean improntas que contienen cortes de tejidos de órganos, en su mayoría de primates. Entre ellos podemos mencionar, glándulas adrenales, músculo cardíaco, esófago (para identificar anticuerpos antiendomiso), riñón (para identificar anticuerpos antimembrana basal glomerular) y páncreas (para identificar anticuerpos anticélulas de los islotes pancreáticos). Para ejemplificar, se observa un corte de estómago y riñón de rata y las imágenes de fluorescencia (Fig.8).

Fig. 8. Corte de estómago y riñón de rata (400X)



3. ENFERMEDADES INFECCIOSAS

3.1. Fundamento teórico conceptual

Las enfermedades infecciosas representan un importante problema de salud. Con el desarrollo en las últimas décadas del siglo pasado de los antimicrobianos y la inmunoterapia, se insinuó en algún momento que se alcanzaría el control de estas enfermedades, pero en la actualidad continúa afectando a millones de personas, sobre todo en países con recursos limitados (García Palomo y col, 2010).

Las infecciones exógenas se producen por una contaminación directa por microorganismos del ambiente (presentes en el aire, suelo, agua, animales del entorno, otras personas con infección o portadores); por tanto las vías o rutas de transmisión más frecuentes serían: la transmisión fecal-oral (a partir del agua, alimentos contaminados), la vía aérea (aerosoles o gotas desde las secreciones respiratorias), inoculación transcutánea directa y mordeduras, transmisión parenteral (transfusiones de material contaminado), la vía sexual y la transmisión por artrópodos o insectos vectores.

Dado el amplio espectro de signos y síntomas con que pueden presentarse las enfermedades infecciosas debe realizarse una completa historia clínica que puede ayudar a identificar la localización de la infección, así como el microorganismo probablemente causal.

Si bien existen diferentes metodologías que permiten el diagnóstico de enfermedades infecciosas, la IFI es una herramienta utilizada en el laboratorio clínico. Es una técnica útil para la detección

serológica de distintos isotipos de anticuerpos, involucrados en la inmunopatología de distintas infecciones, como enfermedad de Chagas, toxoplasmosis, sífilis, entre otras. En algunos casos, complementa el panel serológico a la hora de diferenciar entre fase aguda y crónica; sin embargo, en sífilis, resulta útil porque es una prueba confirmatoria, al utilizar un antígeno treponémico. Asimismo, los estándares de referencia guardan relación con las características epidemiológicas de cada una de ellas, sobre todo lo referente a la endemicidad.

Por ello, es importante tener en cuenta tres aspectos fundamentales al realizar un método de diagnóstico: ¿Cuándo realizarlo?, ¿Qué tipo de análisis se debe efectuar? y ¿Cuáles son los objetivos del análisis?

3.2. Anticuerpos anti - *Toxoplasma gondii* (T. gondii)

La toxoplasmosis es una de las zoonosis parasitarias más difundidas en el mundo, causada por el *T gondii*.

La adquisición de una toxoplasmosis en el paciente inmunocompetente suele ser asintomática, un número muy bajo de los niños y adultos tienen manifestaciones clínicas con la infección aguda. La forma de presentación es muy variable. La forma de presentación clínica más frecuente de la toxoplasmosis aguda adquirida, en el individuo inmunocompetente, es la linfadenitis. Se presenta con fiebre, astenia y adenopatías, la ausencia de linfomonocitosis hiperbasófila en el hemograma permite establecer el diagnóstico diferencial con la mononucleosis infecciosa. (Andréu Mata, 2015)

La forma congénita puede mantenerse asintomática toda la vida o presentar un número impredecible de reactivaciones. La forma adquirida postnatal ocurre durante una pri-moinfección donde el ojo es una de las posibles localizaciones. Desde el punto de vista clínico es muy difícil distinguir entre una y otra forma de adquisición.

La infección genera en el individuo la respuesta de la inmunidad humoral y celular. Los anticuerpos presentes se ponen en evidencia con técnicas de laboratorio específicas. Las pruebas disponibles de primera línea, utilizadas en una primera instancia o de tamizaje, detectan anticuerpos específicos anti-*Toxoplasma gondii*, tipo IgG e IgM. Para la determinación de IgG debe elegirse una técnica sensible y temprana, estas características las cumplen las pruebas de inmunofluorescencia indirecta anti-IgG, el enzimoimmunoensayo y la aglutinación directa. En la inmunofluorescencia indirecta el principio de este procedimiento se basa en el uso de láminas portaobjetos con áreas circulares con trofozoítos de *T gondii*, previamente fijados y listos para la identificación de inmunoglobulinas específicas contenidas en la muestra.

Los anticuerpos de clase IgG presentes en el suero del paciente, se adhieren a la pared del parásito, donde se detectan, por medio de una anti-IgG humana marcada con isotiocianato de fluoresceína. La reacción se lee al microscopio de fluorescencia y se determina el título en la última dilución del suero,

en la cual se ve fluorescencia en toda la periferia de los trofozoítos. Se considera no reactiva cuando el parásito se observa completamente rojo o si la fluorescencia se ve localizada en uno de los extremos lo que se denomina fluorescencia polar.

La detección de anticuerpos IgG, independientemente del título obtenido, confirma el estado inmune de la paciente. Los títulos elevados son expresión de infección reciente y estos pueden persistir más allá del año. En las infecciones antiguas predominan los títulos bajos.

Las IgM están habitualmente presentes en la infección aguda y ausentes en la crónica, aunque se puede persistir reactiva durante meses o años. (Andréu Mata, 2015)

3.3. Anticuerpos anti – Trypanosoma cruzi (T cruzi)

La IFI se aplica al diagnóstico de leishmaniasis y la Enfermedad de Chagas utilizando como sustrato antigénico epimastigotes de T cruzi (Vásquez Huerta y col, 2011).

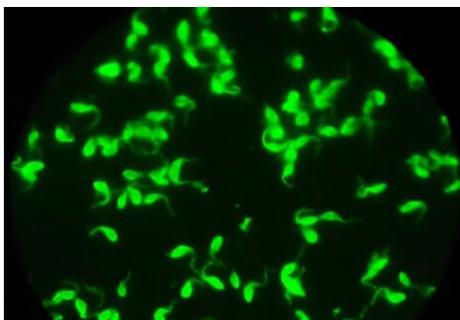
IFI es una técnica de muy buena sensibilidad y especificidad diagnóstica y relativamente de bajo costo debido principalmente a que el sustrato antigénico puede ser preparado en cualquier laboratorio de mediana complejidad. Esta técnica es utilizada para el diagnóstico de varias enfermedades.

La literatura específica menciona que no es recomendable el uso de la IFI cuando coexisten la Enfermedad de Chagas y la Leishmaniasis. Ello se debe a que la IFI presenta reacción cruzada para estas dos enfermedades, condición que reduce notablemente su especificidad y por lo tanto su valor predictivo positivo. Así mismo existe la necesidad de hacer el diagnóstico de leishmaniasis lo cual permite usar como antígeno epimastigotes de T Cruzii cuando no se pueda contar con cepas de Leishmania. Ello permitió visualizar diferencias en cuanto a la localización de la fluorescencia en el parásito, según se trate de sueros de pacientes con infección chagásica o leishmaniásica (Griemberg y col, 2006). Por esta razón es necesario establecer patrones de coloración para cada enfermedad, ya que este conocimiento no está reportado en la bibliografía y puede ser de mucha ayuda en laboratorios que no cuentan con todos los recursos. Además, el cultivo de Tc es relativamente fácil en comparación con el cultivo de Leishmania (Vásquez Huerta y col, 2011).

La observación cuidadosa de las improntas preparadas con epimastigotes de T.cruzi y utilizando sueros de pacientes con infección chagásica mostró un patrón de coloración periférico, es decir, coloración fluorescente amarillo verdosa intensa en la membrana celular y en el flagelo y menos intensa en el citoplasma; el núcleo apenas coloreó su membrana. Pero si observamos la misma preparación antigénica utilizando, esta vez, sueros de pacientes leishmaniásicos, la coloración fluorescente fue intensa sólo en el núcleo e inexistente en el resto del parásito. A este tipo de coloración la denominamos patrón de coloración nuclear.

Se considera prueba positiva a la coloración fluorescente de la membrana y flagelo principalmente y con menor intensidad el citoplasma de los parásitos (patrón de coloración periférico) utilizando epimastigotes de *T. cruzi* como sustrato antigénico (Fig. 9).

Fig. 9. IFI epimastigotes de *T. cruzi* (1000X)



Recordemos que la OMS (2002) debido a la distinta capacidad inmunogénica de las distintas cepas del parásito, la distinta respuesta inmunitaria entre los pacientes y la existencia de reacciones cruzadas con otros tripanosomátidos que coexisten en las áreas endémicas cuando utilizamos antígenos crudos del parásito, recomienda que, al menos, se realicen dos pruebas en paralelo que utilicen antígenos o principios distintos. En consecuencia, un individuo está infectado cuando el resultado de dos tests serológicos es positivo. Un problema que habitualmente se plantea con la serología durante la fase crónica es la obtención de resultados discordantes, indeterminados o no concluyentes. Habitualmente este problema de discordancia de resultados entre técnicas aparece cuando los títulos serológicos son bajos y cercanos al umbral de positividad lo que supone que decidir la reactividad o no de una muestra conlleva cierta imprecisión. En aquellos casos en que dos pruebas serológicas distintas, siguiendo las recomendaciones de la OMS, no sean suficientes para confirmar la infección se debe recurrir a una tercera técnica. Los expertos recomiendan que se utilice la IFI que tiene una sensibilidad del 95 % y una especificidad del 100 %. A pesar de ello, muchas veces no es la más aconsejable ya que su lectura es subjetiva, depende de la experiencia del operador y se recomienda que se realice en un centro especializado. Se han propuesto alternativas a la IFI como las técnicas que utilizan antígenos de secreción-excreción del parásito (TESA) utilizados en inmunoblot o ELISA, glicoproteínas 72 y 90 kDa, detectadas mediante radioinmunoensayo (RIPA) o antígenos recombinantes diversos usados en inmunoblot (Riera, 2012-2013).

3.4. Anticuerpos anti – *Treponema pallidum* (*T. pallidum*)

La sífilis es una infección sistémica crónica producida por *T. Pallidum*. Se transmite generalmente por contacto sexual y se caracteriza por episodios de enfermedad activa interrumpidos por periodos de latencia. Tras un periodo de incubación promedio de tres semanas, aparece una lesión primaria o chancro duro que con frecuencia se acompaña de adenopatía linfática regional. En la fase

bacteriémica secundaria, aparecen las lesiones mucocutáneas simétricas y adenopatía linfática generalizada, se continúa con un periodo de latencia de infección subclínica que dura muchos años. En los casos no tratados, se desarrolla la fase terciaria que se ha caracterizado por lesiones mucocutáneas, musculoesqueléticas o parenquimatosas de carácter destructivo del sistema nervioso central (SNC) (Carradas Bravo, 2003).

El examen microscópico en campo oscuro es esencial para evaluar las lesiones cutáneas húmedas como el chancro de la sífilis primaria o los condilomas planos de la sífilis secundaria. La identificación de un único microorganismo móvil característico, efectuada por un observador experimentado, es suficiente para el diagnóstico. Una prueba negativa no excluye la posibilidad de sífilis.

La infección sífilítica provoca la aparición de dos tipos de anticuerpos - anticuerpo antilípido “reagínico” y anticuerpo anti treponémico específico - que puede cuantificarse mediante las pruebas no treponémicas y treponémicas, respectivamente. Ambas son positivas en las personas que presentan cualquier tipo de infección treponémica, incluidos el pian, la pinta y la sífilis endémica. (Carradas Bravo, 2003).

Los anticuerpos no treponémicos contienen IgG e IgM dirigidas frente a un complejo antigénico cardiolípidina-lecitina-colesterol. Las pruebas no treponémicas más utilizadas para la sífilis es la prueba del Venereal Disease Research Laboratory (VDRL). En la actualidad se están evaluando métodos basados en la técnica de ELISA.

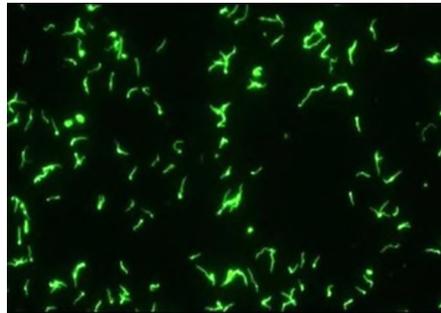
Existen dos pruebas treponémicas: la de absorción del anticuerpo treponémico fluorescente (FTA-Abs, Fluorescent Treponemal Antibody Absorption) y la determinación de microhemaglutinación para anticuerpos frente a Tp (MHA-TP). Ambas son específicas y, cuando se las utiliza para la confirmación de positividad de las pruebas de anticuerpos reagínicos, tienen un valor predictivo positivo para el diagnóstico de sífilis elevado, aunque incluso estas pruebas dan falsos positivos, hasta en 1 a 2% de los casos, cuando se utilizan como métodos de detección en la población general.

En la sífilis primaria, la detección de anticuerpos puede incrementarse mediante la realización de la prueba FTA-Abs (Fig. 10) o simplemente mediante la repetición de la prueba VDRL al cabo de una a dos semanas, si la prueba inicial fue negativa; pero una prueba de anticuerpos reagínicos no es suficiente por sí misma para la detección de la sífilis tardía sintomática, en los casos probables de sífilis tardía se debe realizar de manera sistemática la prueba FTA-Abs que es más sensible. (Carradas Bravo, 2003).

Todas las pruebas treponémicas y no treponémicas son siempre reactivas durante la sífilis secundaria, y un resultado negativo excluye virtualmente la posibilidad de sífilis en un paciente que presente lesiones mucocutáneas compatibles. Menos de 1% de los pacientes con sífilis secundaria presenta

negatividad o positividad débil en la prueba VDRL con suero no diluido, con positividad para diluciones séricas mayores, lo que se conoce como fenómeno de prozona. Aunque las pruebas no treponémicas se negativizan o muestran positividad con títulos bajos tras el tratamiento de la sífilis inicial, las pruebas treponémicas suelen presentar positividad después del tratamiento y, por tanto, no son útiles para determinar la actividad de la infección en las personas con antecedentes de sífilis.

Fig. 10. FTA-Abs T pallidum (1000X)



4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos generales

- Adquirir habilidades y destrezas en el manejo de técnicas inmunológicas.
- Conocer y aplicar las normas de Bioseguridad en un laboratorio Clínico.

4.2. Objetivos específicos

- Profundizar los conocimientos inmunopatológicos y diagnósticos, relacionados a distintas enfermedades infecciosas y autoinmunes.
- Adquirir destreza en el manejo del microscopio óptico con adaptación de epifluorescencia.
- Reconocer los distintos patrones de fluorescencia.
- Relacionar los patrones de fluorescencia con las diferentes características clínicas de los pacientes.
- Integrar e interaccionar las experiencias con el equipo de salud.

5. MARCO METODOLÓGICO

Definición operacional de variables y categorías

Tipo de variable	Variable	Categoría
Demográfica	Sexo	Masculino/Femenino

5.1. Lugar de desarrollo

El plan de trabajo de la Práctica Electiva se desarrolló en el área Inmunoserología del Laboratorio Central del Hospital Escuela “Gral. José F. de San Martín” de la ciudad de Corrientes, por un período de tres meses, a partir del mes de Noviembre de 2020.

5.2. Tipo de estudio y diseño

Se realizó un estudio con enfoque cuantitativo de alcance correlacional y descriptivo.

6. POBLACIÓN

6.1. Población objetivo

Los pacientes incluidos en este estudio fueron aquellos que consultaron al servicio de Clínica Médica y/o Reumatología del Hospital Escuela “Gral. José F. de San Martín” de la ciudad de Corrientes, tanto ambulatorios como internados en él.

6.2. Criterios de inclusión

Se incluyeron todos los pacientes diagnosticados con alguna enfermedad autoinmune o infecciosa.

6.3. Criterios de exclusión

No se consideró un criterio de exclusión.

6.4. Muestras

Se estudiaron setenta y cinco sueros (75), recepcionados en un período de tres meses, correspondientes a individuos de ambos sexos, con rango etario entre 25 a 70 años (con una media de 50 años).

Cuarenta y siete (47) de ellos corresponden a pacientes que padecían alguna enfermedad autoinmune ya diagnosticada y dieciocho (18) controles negativos para las enfermedades seleccionadas.

7. PROCEDIMIENTO

Obtención de la muestra

Las muestras fueron obtenidas por el personal del Laboratorio Central del Hospital Escuela “Gral. José F. de San Martín” de la ciudad de Corrientes.

Se realizó utilizando la técnica de punción venosa convencional. Se incubó a 37°C durante 15-20 minutos hasta formación del coágulo y luego se centrifugó a 3000 rpm para la separación del suero.

Las mismas fueron alicuotadas (dos) y conservadas a 4°C hasta su procesamiento (una semana).

ANTICUERPOS ANTI-NÚCLEO-CITOPLASMÁTICOS (ANA/FAN)

Reactivo: kit comercial de Biocientífica.

Procedimiento: se realizó la técnica de IFI utilizando células de la línea celular HEp-2. Se siguieron los lineamientos del inserto del reactivo, partiendo de una dilución de tamizaje 1/80 con PBS.

Criterios de Reactividad

Tinción fluorescente de los núcleos y/o citoplasma de las células en interfase y/o mitóticas, de la línea celular Hep-2.

Interpretación de patrones:

Patente nuclear homogéneo (AC-1): se observa una imagen de tinción nuclear sólida con o sin enmascaramiento aparente del nucleolo (antígenos: dsDNA, histonas)

Patente moteada (distintos patrones de ANA patterns): se observa una imagen de tinción fina o granulosa en los nucleolos generalmente sin fluorescencia en el nucleolo (antígenos ENAs, ribonucleoproteínas, Scl70)

Patente nucleolar (distintos patrones según ANA patterns): se observa una imagen de tinción nucleolar homogénea o granular (antígenos: PM, Scl, U3RNP, NOR90, RNAPolimerasa I, Scl70, Ku, otros).

Patente centromérica (AC-3): se observa una imagen nucleolar de tinción granular discreta con tendencia al apareamiento en las células en interfase, fuertes puntos alineados en la placa metafásica durante la metafase (antígenos: proteínas centroméricas, A, B y C)

Criterios de No Reactividad

No se observa tinción fluorescente característica (AC-0).

La **interpretación** de los patrones de fluorescencia se realizó siguiendo los lineamientos del Consenso Internacional sobre Patrones de Anticuerpos Antinucleares, ANA patterns. Es una herramienta que permite describir los patrones morfológicos observados en IFI utilizando las células HEp-2. La nomenclatura utilizada es AC-n (anti-célula), en donde “n” toma valores desde 0 a 29, los cuales corresponden a los diferentes patrones.

ANTICUERPOS ANTI – DNA nativo

Reactivo: kit comercial de Biocientífica.

Procedimiento: se utilizó la técnica de IFI sobre *Crithidia luciliae*. Se siguieron los lineamientos del inserto del reactivo y en este caso se realizó una dilución de tamizaje 1/10 con PBS.

Criterios de Reactividad

Tinción verde manzana brillante del kinetoplasto con o sin tinción del núcleo.

Criterios de No Reactividad

No presenta tinción fluorescente específica del kinetoplasto. La tinción sólo del núcleo o del cuerpo basal se considera negativo.

ANTICUERPOS ANTI-ANTÍGENOS DE TRYPANOSOMA CRUZI, TOXOPLASMA GONDII, TREPONEMA PALLIDUM

Reactivos: Kits comerciales

Práctica Electiva – María A. Alcaraz

- Inmunofluor Chagas Biocientífica, incluye como sustrato antigénico epimastigotes de *T. cruzi* formolados, obtenidos a partir de cultivo.
- Inmunofluor Toxoplasma Biocientífica, incluye como sustrato antigénico trofozoítos de *T. gondii* formolados, obtenidos a partir de exudado peritoneal de ratones.
- Inmunofluor Treponema pallidum Biocientífica (FTA-Abs), incluye como antígeno Treponema cepa Nichols obtenido a partir de testículo de conejo y mantenido por una serie de pasos. La muestra sérica se diluyó con absorbente de la cepa Reiter 1/5.

Procedimiento: se utilizó la técnica de IFI /FTA-Abs, siguiendo los lineamientos del inserto de cada reactivo.

Criterio de Reactividad

T cruzi: se observa una típica fluorescencia verde manzana que es intensa en toda la membrana y el flagelo del parásito.

T gondii: se observa una típica fluorescencia verde manzana alrededor de toda la membrana del parásito.

T pallidum: se observan teñidos en forma homogénea, con una típica fluorescencia verde manzana.

Criterio de No Reactividad

T cruzi y *T gondii* se observa ausencia total de fluorescencia con predominio de la coloración del contracolorante (fondo y parásitos rojizos).

Parásitos coloreados difusamente sin fluorescencia en la membrana.

Parásitos mostrando fluorescencia del citoplasma y estructuras intracitoplasmáticas no homogéneas.

T pallidum se observa ausencia total de fluorescencia o coloración verde amarilla muy débil opaca.

8. PROCESAMIENTO DE DATOS

Los datos obtenidos fueron ingresados en una planilla de Microsoft Excel para su tratamiento estadístico.

9. RESULTADOS

Se estudiaron **75 muestras** provenientes de pacientes ambulatorios e internados provistos por el Laboratorio Central del Hospital Escuela “Gral. José de San Martín”, 50 de sexo femenino (66,66%) y 25 de sexo masculino (33,33%). El rango etario fue entre 25 a 70 años con una media de 50 años.

Las muestras séricas correspondieron a pacientes que presentaban alguna EAI ya diagnosticada (47); enfermedad infecciosa (enfermedad de Chagas, toxoplasmosis, sífilis) (10.) Las muestras de los controles normales (18) no presentaron positividad, para autoanticuerpos ni enfermedades infecciosas estudiadas.

Práctica Electiva – María A. Alcaraz

La distribución de la población estudiada, según la prevalencia de EAI, se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3: Pacientes con EAI estudiados

Pacientes con enfermedades autoinmunes	Nº	Porcentaje %
Lupus Eritematoso Sistémico (LES)	27	57,45
Artritis Reumatoidea (AR)	15	31,91
Síndrome de Sjögren (SS)	3	6,38
Síndrome de Reiter (SR)	1	2,13
Tiroiditis autoinmune (TA)	1	2,13

En el área Inmunoserología del Laboratorio Central del Hospital Escuela “Gral. José F. de San Martín” se obtuvieron datos sobre el perfil autoinmune de los **47 pacientes** previamente seleccionados. Observamos que 27 de ellos tenían diagnóstico de LES, 15 AR, 3 TA, 1 SS y 1 SR. La determinación de FAN/ANA se realizó en los pacientes con LES, AR y SS obteniendo en la totalidad de los casos un resultado positivo. La distribución según patrones de FAN/ANA en los pacientes con LES, AR y SS se muestran en la Tabla 4, 5 y 6, respectivamente.

Tabla 4: Patrones FAN/ANA en pacientes con LES

Patrones de tinción de FAN/ANA	Nº	Porcentaje (%)
AC-1 Nuclear Homogéneo	10	37,04
AC-2 Granular Fino Denso	6	22,22
AC-4 Nuclear Granular Fino	8	29,63
AC-5 Nuclear Granular Grueso	1	3,70
AC-10 Nucleolar Granular	2	7,41

Práctica Electiva – María A. Alcaraz

Tabla 5: Patrones FAN/ANA en pacientes con AR

Patrones de tinción de FAN/ANA	Nº	Porcentaje (%)
AC-1 Nuclear Homogéneo	5	33,33
AC-2 Granular Fino Denso	4	26,67
AC-4 Nuclear Granular Fino	4	26,67
AC-5 Nuclear Granular Grueso	1	6,67
AC-10 Nucleolar Granular	1	6,67

Tabla 6: Patrones FAN/ANA en pacientes con SS

Patrones de tinción de FAN/ANA	Nº	Porcentaje (%)
AC-1 Nuclear Homogéneo	2	66,67
AC-4 Nuclear Granular Fino	1	33,33

La determinación de aDNAn se realizó en pacientes con LES, AR y SS, resultando **positivo en 17 casos** (Tabla 7).

Tabla 7: Pacientes con aDNAn positivo

Determinación aDNAn	Nº	Porcentaje %
Lupus Eritematoso Sistémico (LES)	10	58.82
Artritis Reumatoidea (AR)	6	35.30
Síndrome de Sjögren (SS)	1	5.88

Además, se realizaron otras determinaciones de laboratorio como cuantificación de fracciones del complemento, factor reumatoideo, a-CCP3 (anti péptido citrulinado), anti-ENA (anti anticuerpos

nucleares extraíbles), proteinograma electroforético, eritrosedimentación, que ayudaron al diagnóstico de las enfermedades.

Los pacientes seleccionados con alguna enfermedad infecciosa y cuyas muestras fueron recepcionadas en el área Inmunoserología del Laboratorio Central del Hospital Escuela “Gral. José F. de San Martín” fueron diez. Se incluyeron en nuestro caso seis que tenían diagnóstico de enfermedad de Chagas, uno con Toxoplasmosis y tres con Sífilis.

La distribución según la prevalencia de enfermedades infecciosas se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8: Pacientes estudiados con enfermedades infecciosas

Pacientes con enfermedades infecciosas	Nº	Porcentaje (%)
Enfermedad de Chagas	6	60
Toxoplasmosis	1	10
Sífilis	3	30

Además, se realizaron otras determinaciones de laboratorio como HAI (Hemoaglutinación indirecta de partículas), ELISA, VDRL (Venereal Disease Research Laboratory), que ayudaron al diagnóstico de las enfermedades.

10.DISCUSIÓN

Los casos presentados de enfermedades autoinmunes correspondieron, en su mayoría, a mujeres jóvenes lo que se condice con la tendencia en cuanto al sexo y rango etario mencionada en la bibliografía de referencia (Palmezano Díaz y col, 2018).

Si tenemos en cuenta que la determinación de los ANA/FAN por IFI tiene una excelente sensibilidad y es una realización sencilla de bajo costo, podemos afirmar que esta prueba reúne todas las características para ser empleada como la prueba de partida para la detección precoz (tamizaje) del LES (Kokuina, 2016).

En nuestro trabajo, observamos que la totalidad de los pacientes con diagnóstico de LES, AR y SS presentaron un resultado positivo para la determinación de FAN/ANA lo que concuerda con lo mencionado por Conrad (Conrad y col, 2008) acerca de la elevada prevalencia de anticuerpos en EAI. Las determinaciones de autoanticuerpos como los anti-DNA_{dc}, anti-Sm y anti-CL (anticoagulante lúpico), por ser menos sensibles, pero mucho más específicas y costosas, deben ser reservadas como pruebas de confirmación o para un segundo nivel del diagnóstico del LES.

Recordemos que ante un resultado negativo de ANA/FAN, existe una alta probabilidad de que el aDNA sea negativo, por lo que no se aconseja realizarlo en forma indiscriminada (Kokuina, 2016).

Las muestras estudiadas de pacientes con EAI corresponden en su mayoría a LES, hallazgo que coincide con lo expresado por Méndez Rayo y col (Méndez Rayo y col, 2018). Debemos recordar que se han encontrado, en baja frecuencia (generalmente menos del 5%), y generalmente en títulos bajos y con baja afinidad, en pacientes con AR, SS, esclerodermia, fenómeno de Raynaud, enfermedad mixta del tejido conectivo, lupus discoide, miositis, uveítis, artritis juvenil, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Graves, enfermedad de Alzheimer y en la hepatitis autoinmune. En nuestro caso, es válido para los pacientes con SS, sin embargo, es considerable en el caso de AR. Por ello, es interesante el **seguimiento** de estos pacientes, que podrían tener un LES asociado a AR (Rhus), por la posibilidad de desarrollar complicaciones renales o neurológicas. La forma de artritis desencadenada por el lupus es diferente a la causada por AR. Es interesante mencionar, que puede haber un vínculo genético entre la AR y el lupus y otras afecciones autoinmunes, como el trastorno inflamatorio intestinal (EII) y la enfermedad celíaca (Solís Cartas y col, 2018).

Los resultados obtenidos en pacientes con diagnóstico de enfermedades infecciosas nos muestran que en ningún caso se observaron patrones atípicos. El grupo estudiado fue muy pequeño para poder realizar un análisis epidemiológico – clínico adecuado.

Tal vez, lo que podríamos mencionar es que prevaleció la enfermedad de Chagas, teniendo en cuenta que se trata de una patología endémica, coincidiendo con lo expresado por Spillman (Spillmann y col, 2013).

11. CONCLUSIÓN

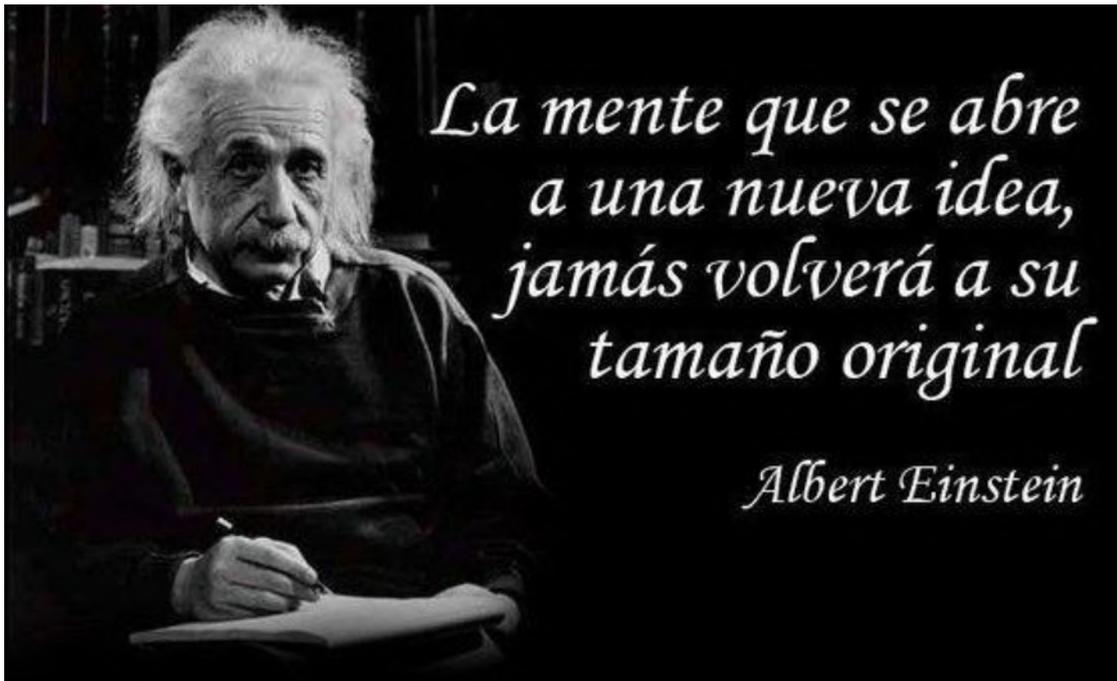
Este trabajo me permitió adquirir destrezas en la realización e interpretación de la técnica inmunológica IFI. Pero no puedo dejar de mencionar que también me permitió profundizar mis conocimientos en los aspectos clínicos de enfermedades autoinmunes e infecciosas, mediante la lectura y análisis detallado de las historias clínicas respectivas.

Me brindó la oportunidad de incorporarme al equipo de salud compartiendo espacios multidisciplinarios.

12. AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis formadores. A mi directora Magister Svibel de Mizdraji Graciela, a la bioquímica Soto Troia Sandra, que se esforzaron en transmitirme sus conocimientos y me han acompañado durante el proceso de producción de este trabajo siendo la última instancia para mi titulación profesional.

Muchas gracias



*La mente que se abre
a una nueva idea,
jamás volverá a su
tamaño original*

Albert Einstein

13.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ramírez Hernández, D. y Cabiedes, J. (2010). Técnicas inmunológicas que apoyan el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes. *Reumatología clínica*, 173-177.
2. Toolan, H.W. (1954). Transplantable Human Neoplasms Maintained in Cortisone Treated Laboratory Animals: H.S. #1; H.Ep. #1; H.Ep. #2; H.Ep. #3; and H.Emb.Rh. #1. *Cancer Res* (14): 660-666.
3. Fjelde, A. (1955). Human Tumor Cells in Tissue Culture. *Cancer*, 8 (4): 845-851.
4. Hammar, F. (2013). "Portrait of the HEp2 cell, the pet of immunofluorescence professionals". *ORGENTEC Autoimmunity Blog*.
5. Schwartz, R.S., Stollar B.D. (1985). Origins of anti-DNA autoantibodies. *J Clin Invest*, 75(2):321-7.
6. Griemberg, G., Ferrarotti F, N., Svibel, G., Ravelli R, M., Taranto, N., Malchiod, E., & Pizzimenti, M. (2006). Inmunofluorescencia con *Crithidia luciliae* para la detección de anticuerpos Anti-DNA. *Medicina*, 3-8.
7. Wang. X., Xia. Y. (2019) Anti-double stranded DNA antibodies: Origin, pathogenicity, and targeted therapies. *Front Immunol.*,10:1667.
8. Mendez Rayo, T., Zárate Ochoa, L., Osorio Posso, I., Ortiz, E., Naranjo Escobar, J., y Tobón, G. (2018). Interpretación de los anticuerpos en enfermedades reumatológicas. *Revista Colombiana de Reumatología*, 112-125.
9. Cabiedes, J. y Núñez Álvarez A. (2010). Anticuerpos antinucleares. *Reumatología clínica*, 224-230.
10. Hernández Flórez, D., y Valor, L. (2018). Ni los anticuerpos antinucleares ni los anticuerpos dirigidos contra antígenos extraíbles son lo que solían ser. Un futuro cambio de nomenclatura y recomendaciones para su detección en práctica clínica habitual. *Reumatología clínica*, 317-319.
11. García Palomo, J.D., Agüero Balbín, J., Parra Blanco, J.A., Santos Benito, M.F. (2010). Enfermedades infecciosas. Concepto. Clasificación. Aspectos generales y específicos de las infecciones. Criterios de sospecha de enfermedad infecciosa. Pruebas diagnósticas complementarias. Criterios de indicación. 2010 04 08. *Medicine*, 10(49):3251-64.
12. Andreú Mata, L. (2015). Toxoplasmosis: Diagnóstico serológico en las gestantes. *Control de Calidad SEIMC*, 5-6.
13. Vásquez Huerta, L., Llerena Ruela, N., y Benzaquen Córdova, E. (2011). Patrones de coloración en la inmunofluorescencia indirecta y su utilidad en el diagnóstico de leishmaniasis tegumentaria y enfermedad de Chagas. *Acta Médica Peruana*, 19-22.

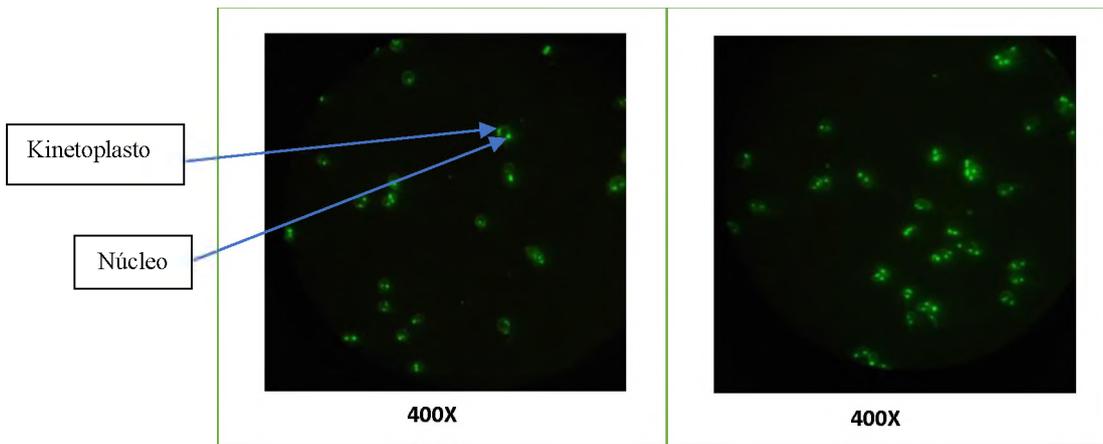
14. Riera, C. (2012-2013). Diagnóstico de Laboratorio en enfermedad de Chagas. Ed Cont Lab Clí1682-92-[Internet]. Disponible en:
<https://www.seqc.es/download/tema/7/3322/64814485/1217704/cms/tema-7-diagnostico-de-laboratorio-de-la-enfermedad-de-chagas.pdf/>
15. Carradas Bravo, Teodoro (2003). El diagnóstico de laboratorio de la sífilis. *Revista Mexicana de Patologías Clínicas*, 82-96.
16. Palmezano Díaz, J. M., Figueroa Pineda, C. L., Rodríguez Amaya, R. M., y Plazas Rey, L. K. (2018). Prevalencia y caracterización de las enfermedades autoinmunitarias en pacientes mayores de 13 años en un hospital de Colombia. *Medicina Interna México*, 522-535.
17. Kokuina E. (2016). Importancia de indicar e interpretar las pruebas de autoanticuerpos. *Rev Cubana Med.*, 55(4):324–39.
18. Solís Cartas, U., Martínez Larrarte, J.P., Prada Hernández, D.M., Gómez Morejón, J.A., Valdés González, J.L., Molinero Rodríguez, C. (2017). Síndrome de Rhupus. Una superposición infrecuente. *Rev Colomb Reumatol.*, 24(4):237–41.
19. Spillmann, C., Burrone, S., & Coto, H. (2013). Análisis de la situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Argentina: Avance en el centro 2012. *Rev Argent Salud Pública*, 4 (15):40-44.

**14. ATLAS DE INMUNOFLUORESCENCIA
ENFERMEDADES AUTOINMUNES**

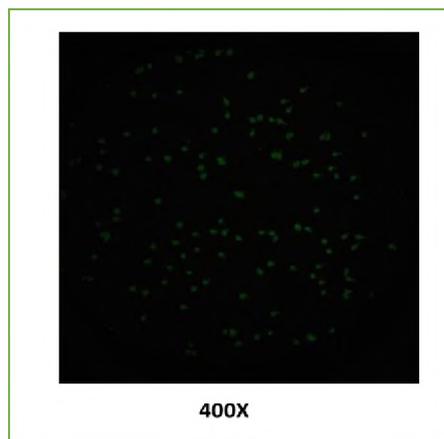
La observación microscópica se realizó utilizando aumento de 40X, microscopio de epifluorescencia Olympus BX 40, aunque en ciertos casos con 100X para destacar ciertas estructuras observadas en células mitóticas.

✓ **ANTICUERPOS aDNA**

Positivo: tinción de kinetoplasto .



✓ **Negativo:** no se observa tinción en kinetoplasto.

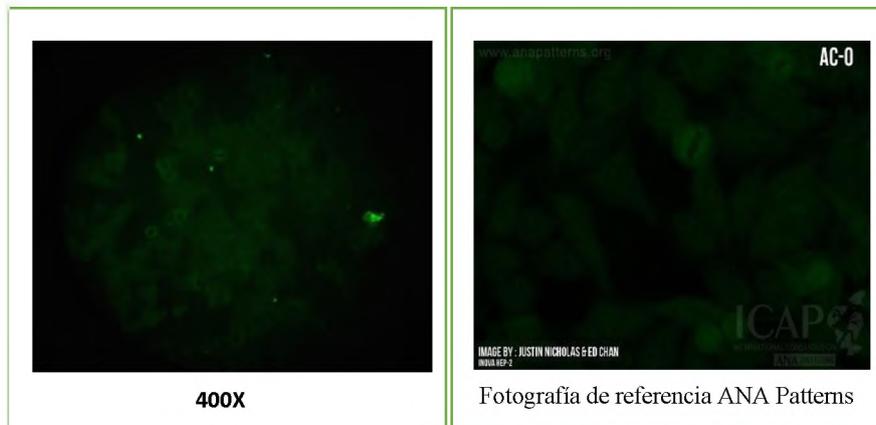


**ANTICUERPOS ANTI NÚCLEO-CITOPLASMÁTICOS
IMÁGENES NUCLEARES**

✓ FAN/ANA

AC-0 - Negativo

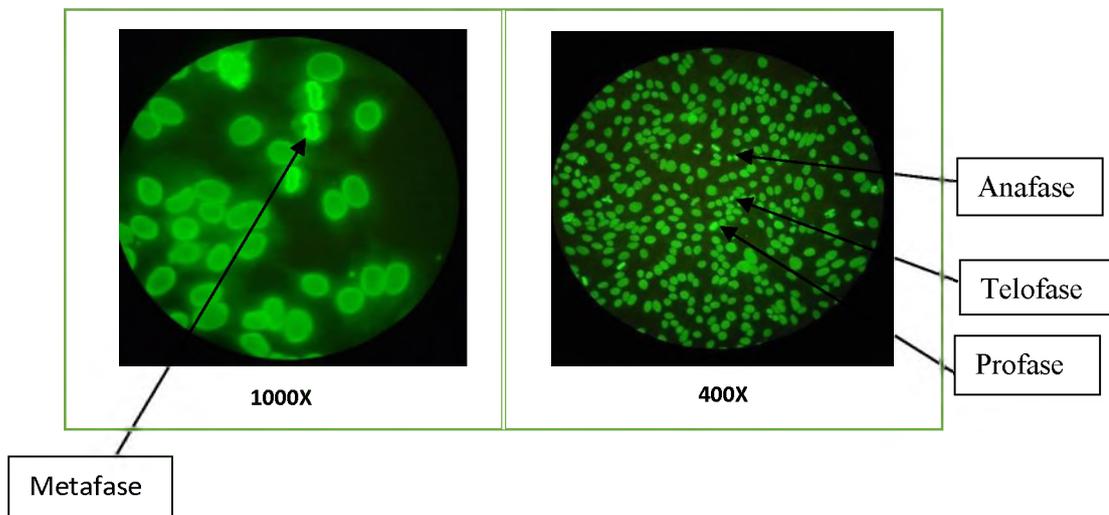
Las características que enlazan estas posibles variables es la ausencia de una tinción bien definida en cualquiera de las estructuras subcelulares. Esta definición es tanto subjetiva como semi-cuantitativa en el mejor de los casos.

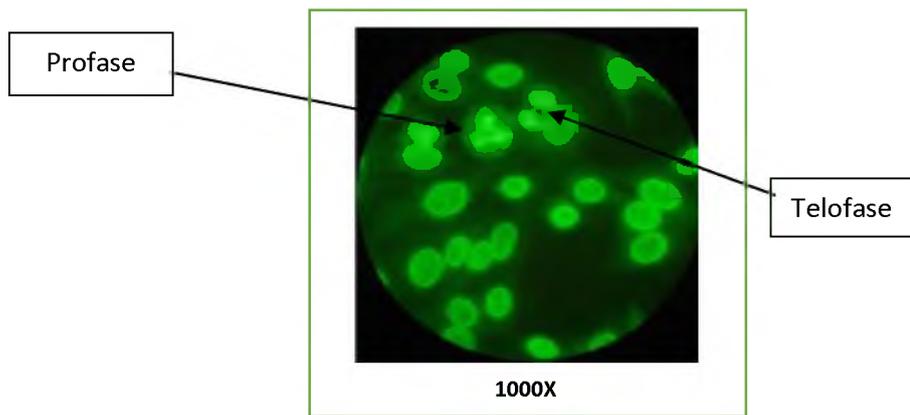


AC-1-Nuclear homogéneo

Fluorescencia homogénea y regular a través de todo el nucleoplasma, los nucléolos pueden o no fluorescer dependiendo del sustrato celular. Las células en mitosis (profase, metafase, anafase y telofase) tienen la cromatina intensamente fluorescente de manera homogénea.

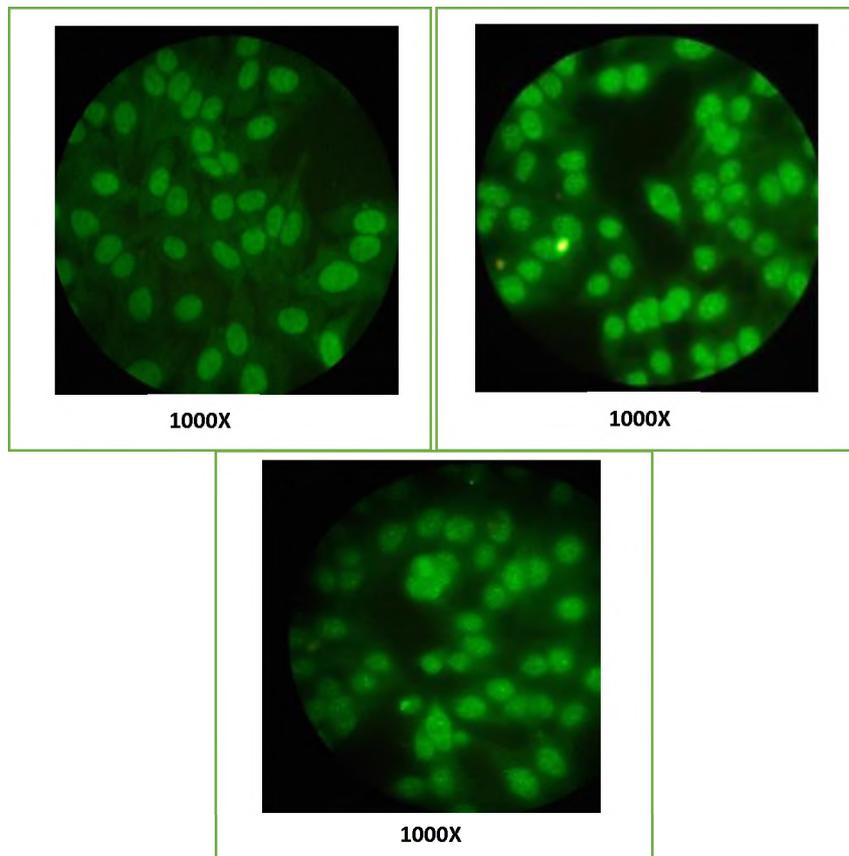
LES, lupus inducido por medicamentos, artritis idiopática juvenil.





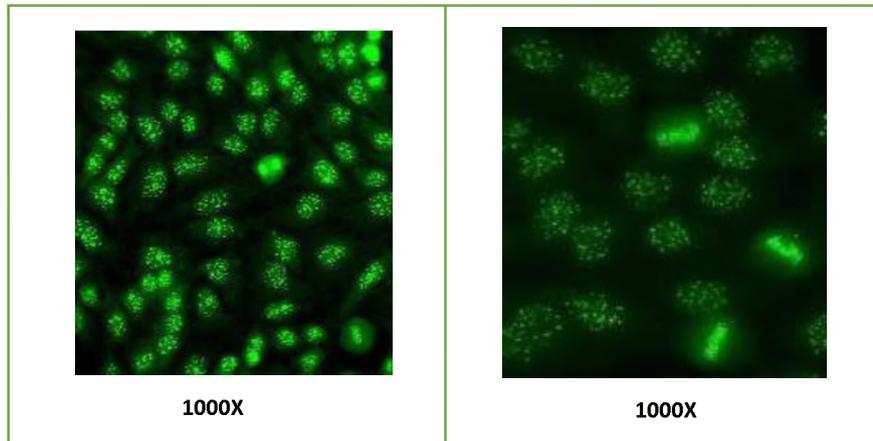
AC-2-Nuclear granular fino denso

Patrón granular distribuido por todo el núcleo de las células en interfase, con heterogeneidad en tamaño, brillo y distribución de los gránulos. A lo largo del núcleo en interfase, hay algunas zonas más densas y débiles de los gránulos (rasgo muy característico). La placa metafásica muestra un fuerte patrón granular destacándose algunas manchas gruesas.



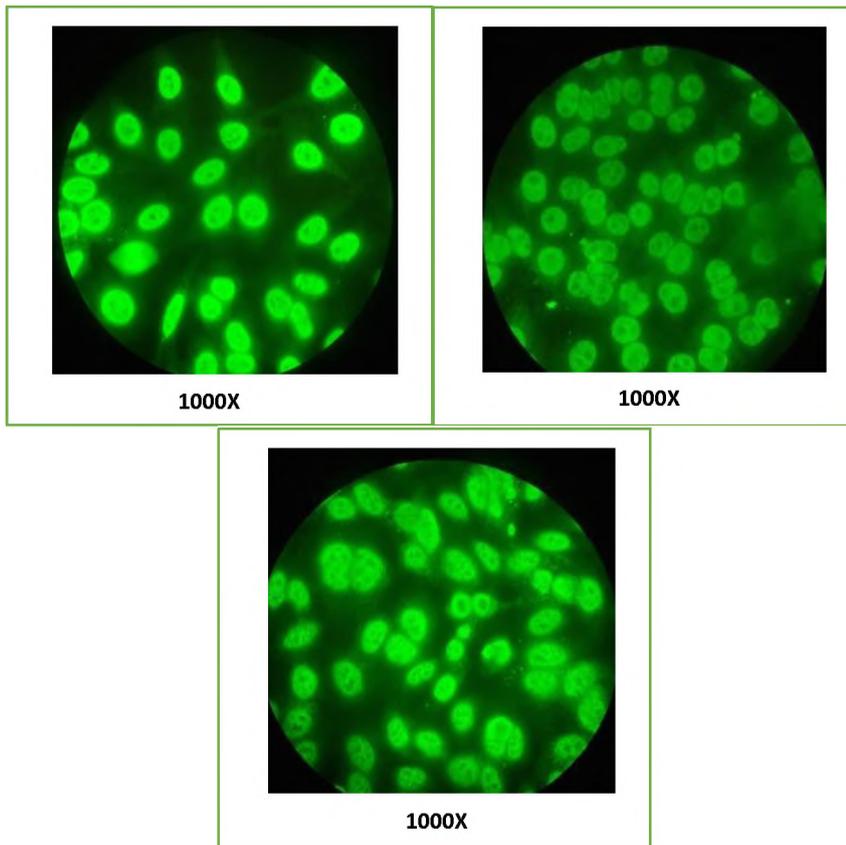
AC-3- Centrómero

Granular grueso discreto dispersos en los núcleos de las células en interfase y alineados en la masa de la cromatina en las células mitóticas.



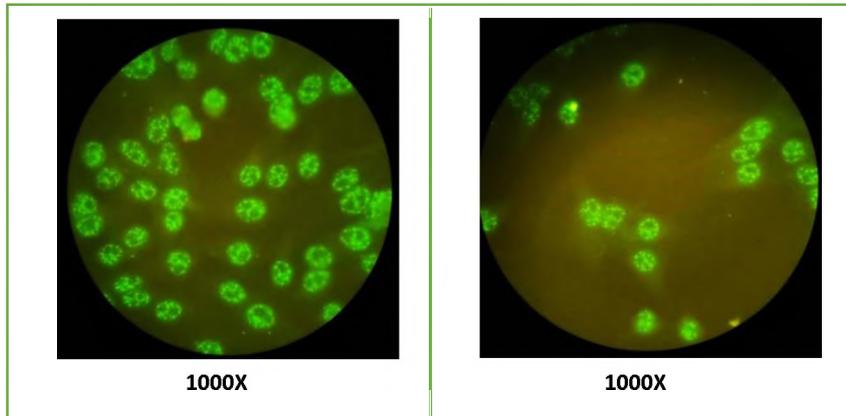
AC-4-Nuclear granular fino

Gránulos diminutos finos a través de todo el nucleoplasma. El nucléolo puede teñirse o no. Las células mitóticas (metafase, anafase y telofase) tienen la masa de la cromatina no teñida.

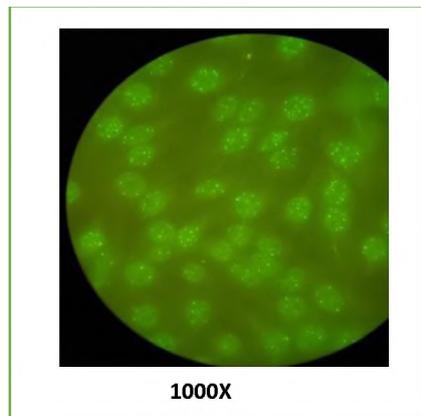


AC-5-Nuclear granular grueso

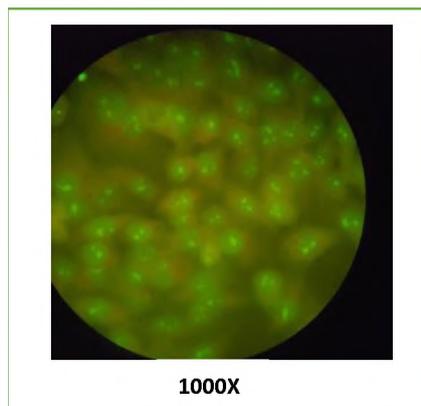
Gránulos gruesos a través de todo el nucleoplasma. El núcleo puede teñirse o no. Las células mitóticas (metafase, anafase y telofase) tienen la masa de la cromatina no teñida.



AC-7-Gránulos nucleares escasos

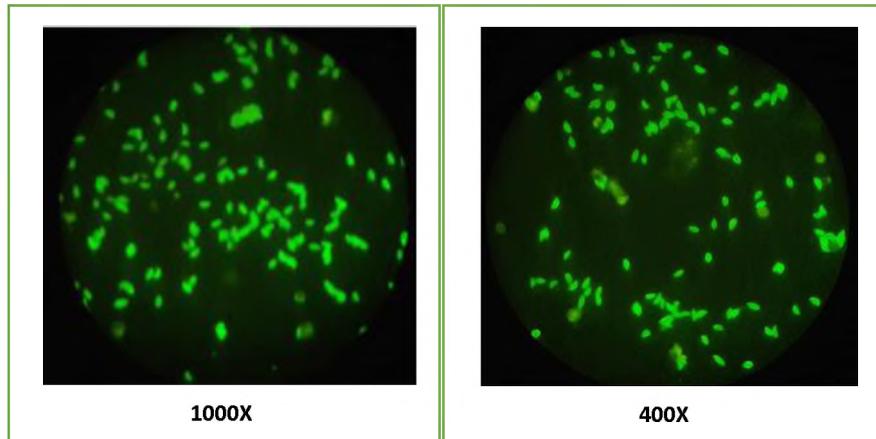


AC-8-Nucleolar homogéneo



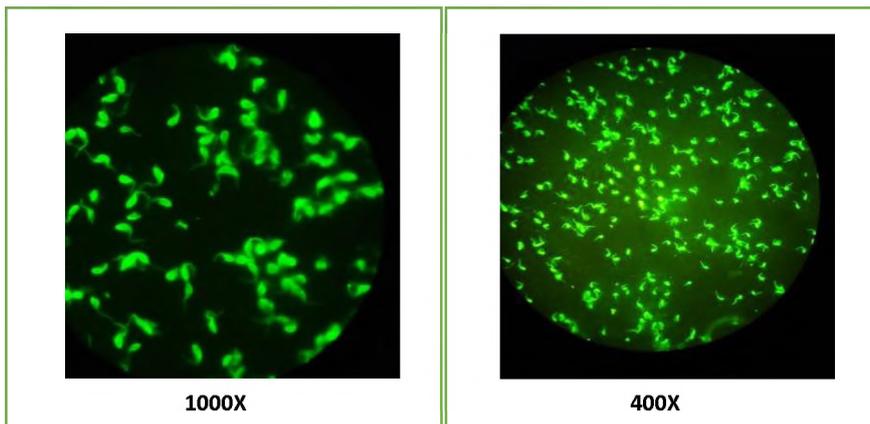
ENFERMEDADES INFECCIOSAS

✓ ANTICUERPOS ANTI TOXOPLASMA GONDII

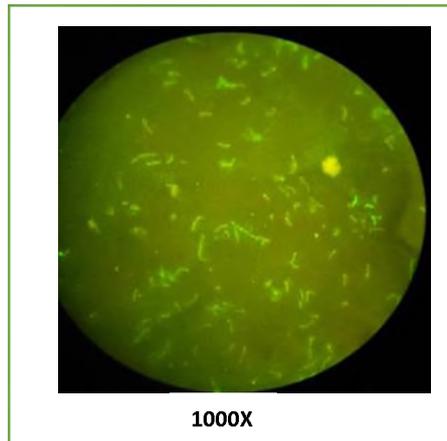


Toxoplasma gondii
forma característica similar a una “banana”

✓ ANTICUERPOS ANTI TRYPANOSOMA CRUZI



✓ ANTICUERPOS ANTI TREPONEMA PALLIDUM

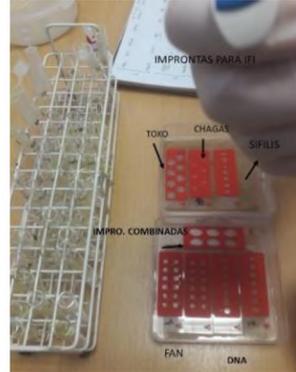


Espiroquetas de *Treponema pallidum*

EQUIPAMIENTO - MATERIALES



Improntas cerradas con lote, vencimiento y conservación



Improntas



Microscopio de Fluorescencia Olympus BX40



Cubreobjetos 24x60mm



Líquido de montaje