

Principios y Práctica de Nuevos Métodos Diagnósticos en Toxoplasmosis

Gregoire Cozon,
Universidad de Lyon

ELISA

- 1) Fijación del antígeno sobre el plástico
Ag proteico en tampón carbonato/bicarbonato
Concentración 1 –10 µg/ml



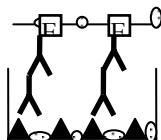
- 2) Saturación en albumina sérica bovina (BSA)



- 3) Incubación de los sueros diluidos
- 4) Lavados para eliminar los anticuerpos no específicos



- 5) Anticuerpos anti-IgG humanos acoplados a una enzima
peroxidasa
fosfatasa alcalina



6) Lavados

7) Incubación con substrato

reacción colorimétrica si la enzima está presente
reacción proporcional a la concentración de la enzima

8) Medición de la densidad óptica (absorbancia) según la longitud de onda específica de la reacción colorimétrica.

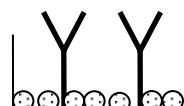
9) Interpretación: del punto de corte, de la curva estándar, o conversión de unidades por el método alfa.

Principio del ELISA de Captura para IgA o IgM

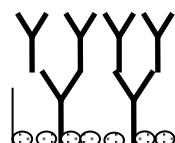
- 1) Fijación de un anticuerpo anti-IgA o anti-IgM
. En tampón carbonato/bicarbonato
. Concentración : 1–10 µg/ml



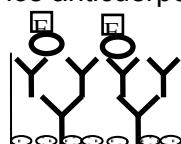
2) Saturación en BSA



3) Incubación de los sueros diluidos



4) Lavados para eliminar los anticuerpos no específicos



5) Antígeno toxoplásmico acoplado a una enzima peroxidasa

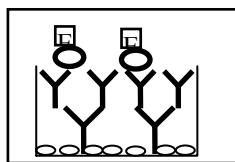
fosfatasa alcalina

6) Lavados

7) Incubación con el substrato

reacción coloreada si la enzima está presente

reacción proporcional a la concentración de la enzima



8) Medición de la densidad óptica (absorbancia) a la longitud de onda específica de la reacción coloreada.

9) Interpretación: del punto de corte, de la curva estándar, o conversión de unidades por el método alfa.

Principio de la medición de la avidez en ELISA

Se basa en un principio idéntico al ELISA estándar variando solamente en que se comparan los resultados de 2 pozos de ELISA, el uno tratado clásicamente, y el otro tratado con un agente eluente que va disociar y eliminar los anticuerpos de baja afinidad.

Para cada suero la incubación de la dilución a probar se realiza en 2 pozos recubiertos de antígeno y de BSA.

Luego del lavado se realiza una incubación de 5 minutos de uno de los pozos con el PBS y del otro con urea 6 M en tampón de lavado.

Luego del lavado se continua con la técnica ELISA estándar.

Al final por cada suero se obtienen 2 valores, uno de la incubación en PBS y el otro con la incubación en la urea.

Se define entonces un Índice de Avidez (IA)

$$\text{IA} = \text{Título con Urea} / \text{Título sin Urea}$$

En Lyon con el ELISA de la casa comercial Behring

Sí el IA > 35% → seroconversión superior a 3 meses

Sí el IA < 35% → puede ser una seroconversión reciente o la ausencia de maduración en la afinidad de los anticuerpos.

DETECCIÓN DE LA INMUNIDAD CELULAR

Test in vivo: intradermo-reacción o IDR a la “toxoplasmina” lectura a las 48 horas como se hace para la reacción a la tuberculina.

Tests in vitro: Cultivo de linfocitos en presencia del antígeno parasitario.

¿Qué células cultivar?

Células mononucleares (PBMC) luego de separación en Ficoll
Sangre completa sin separación.

¿Cuál marcador de la inmunidad explorar?

Clásicamente se utiliza la incorporación de la timidina tritiada por las células en multiplicación y la detección de las células en división por la medición de la radioactividad incorporada por las células con un medidor de radiación.

Expresión de las moléculas de “activación” en la superficie de las células.

Utilización de las moléculas fluorescentes incorporadas en las células al inicio del cultivo y que irán disminuyendo en las células en división.

Detección de las citocinas en el sobrenadante del cultivo.

EL DYE TEST O PRUEBA DEL COLORANTE

Principio: activación del complemento por los anticuerpos específicos que polimerizan la fracción C9, última etapa del complejo de ataque de membrana.

Técnica clásica:

- Taquizoitos sobre cultivo celular para evitar la fijación de los IgM polyespecíficos o taquizoitos + TG 180 (Sarcoma) intraperitoneales
- Sueros de pacientes inactivados (30 min a 56°C.)
- Sueros normales humanos (Toxo -) o suero de cobayo que no lisen los taquizoitos
- Dilución de los sueros por probar de 2 en 2 a partir de la dilución 1/10 en PBS
- Mezclar 50 µl de los sueros diluidos con 50 µl de una suspensión de taquizoitos vivos $1,5 \times 10^6$ /ml en complemento.
- Incubación 1 hora a 37°C.

Para la lectura existen varias alternativas

- Fijar las células con 100 µl de formol al 5%, luego se realiza lectura en contraste de fase (CMF)
 - Adicionar un colorante "no-vital" (Eosina Y) o Azul de tripano que es excluido de las células vivas.

TÉCNICA DE CITOMETRIA EN FLUJO

Se utiliza sangre completa tomada en tubo estéril con heparina (tubo verde de Becton Dickinson). Se requiere una muestra de menos de 6 horas

Antígeno toxoplasmico "crudo": preparar una suspensión de toxoplasmas a partir de cultivo celular, lavar los toxoplasmas con PBS y ajustar a 100 millones (10^8) por ml. Congelar y descongelar esta suspensión cinco a seis veces y luego filtrar la solución proteica por membrana de 0.22 µm. Esta solución se utiliza diluida a 1/10 o 1/50.

Se puede utilizar también el sobrenadante del cultivo celular infectado por los toxoplasmas. Tubos de cultivo en polipropileno del tipo "Micronic" estériles (esterilizados en el autoclave).

Anticuerpos monoclonales: anti-CD3 PE-Cy5 Sigma, anti-CD4 PE DAKO y anti-CD25 FITC DAKO

Métodos

Colocar 50 µl de sangre completa con 50 µl de solución antagónica a 1/10, 1/50, incubar 24h a 37°C. 5% de CO₂. Añadir 500µl de RPMI. Dejar seis días en la incubadora. Proveer controles negativos (50µl de PBS) y positivos (50 µl de PHA o fitohemaglutinina 10 µg/ml). En el día 7 aspirar el sobrenadante, lisar los glóbulos rojos con tampón de lisis (NH₄ Cl). Centrifugar y aspirar el sobrenadante, sobre el botón de sedimentación colocar 10 µl de anticuerpos anti-CD, antiCD4 y antiCD25 diluidos 1/30 en PBS azida 0.02% suero humano normal 10% EDTA 5 mM. Incubar 15 min a +4°C. la noche anterior una vez con PBS. Añadir 250µl de PBS y pasar en el citómetro de flujo. Es posible fijar las células utilizando PBS formol 1% Albúmina seria bovina 0.1 % (HP 7.2) luego de la última etapa. No fijar las células antes del marcaje con los anticuerpos monoclonales

Coloración de membrana y Citometría de Flujo

El exceso de medio es decantado de la suspensión de células y almacenado a -20°C para la detección de citoquinas. Los eritrocitos son lisados con 155 mmol/litro de NH₄Cl, 10 mmol de KHCO₃, y 0,1 mmol de EDTA. Los leucocitos se recuperan por centrifugación y el sedimento es teñido con una combinación de tres anticuerpos monoclonales específicos marcados con fluorocromos por 15 min en cámara oscura a 4°C. Para la detección de CD69, una combinación de anticuerpos conjugados anti-CD69 con FITC (Dako, Trappes, France), PE-anti-CD4 (Dako) y cyanin 5-phycoerythrín (Cy5PE) anti-CD3 (Sigma) son usados para estimar la expresión de CD25. Luego, las células son lavadas y resuspendidas en PBS con 0.1% de albúmina sérica bovina 5 mM y EDTA. Las células son analizadas el mismo día con un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson). Para la adquisición de los datos se utiliza el programa Cellquest. Para obtener los datos de la población CD3+ se utiliza el canal f13. En el canal de monocitos-linfocitos pueden ser leídas hasta dos mil CD3+. Los datos son luego mostrados en dos curvas de color identificadas como f1 y f2 sobre el total de células f13, con el fin de obtener la proporción de linfocitos activados que expresan los marcadores CD25 o CD69. El total de células CD3+ o CD4+ activadas se estima sustrayendo los valores obtenidos en el control negativo.

INMUNIDAD ANTI-TOXOPLASMICA

Exploración de la inmunidad anti-*Toxoplasma gondii*

Exploración de la inmunidad humoral: la serología

- El dye test o test de colorante
- La inmunofluorescencia indirecta
- El ISAGA
- Las técnicas ELISA

- Las técnicas de “Western Blot”

Exploración de la inmunidad celular:

- Prueba cutánea con la toxoplasmina
- Prueba de activación linfocitaria in vitro
- Incorporación de la timidina tritiada
- Expresión de “marcadores de activación” CD25, CD71
- Producción de citoquinas

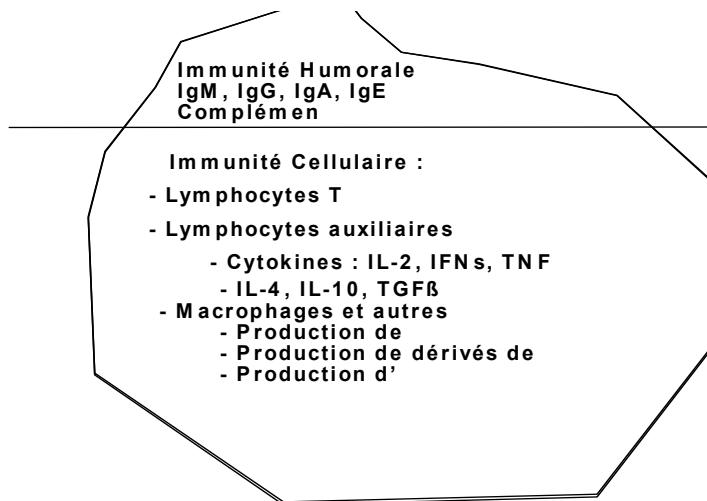


Figura 1. El “iceberg del estudio de la inmunidad anti-*Toxoplasma*: lo más fácilmente puesto en evidencia (inmunidad humoral) es sólo la punta del iceberg