

Microinmuno Fluorescencia para el Diagnóstico de Enfermedades Infecciosas

Rodríguez Pérez¹, Abreu Mireya², Waard Mazzali³

¹Departamento de Microbiología, Universidade Catolica Portuguesa, Porto, Portugal

²Departamento de Microbiología, Universidade de Lisboa, Portugal

³Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Portugal

Resumen

La infección por *Chlamydia pneumoniae* se produce en todo el mundo, lo que da como resultado una prevalencia del 40-90% de anticuerpos séricos contra la especie en diversas poblaciones. La serología es la herramienta de diagnóstico más utilizada para la detección de infecciones respiratorias por clamidia en la práctica clínica habitual. El principal problema de este estudio es la validez de las pruebas utilizadas, especialmente el nuevo rDNA LPS ELISA.

Palabras clave: Enfermedad Infecciosa, Micro-inmuno-Fluorescencia, Diagnóstico

1.Introducción

La infección por *Chlamydia pneumoniae* ocurre en todo el mundo, resultando en una prevalencia de suero de 40-90% Anticuerpos contra las especies en diversas poblaciones[1]. DO. neumonía se ha asociado tanto con la epidemia y casos endémicos de enfermedad respiratoria aguda. y se cree que es responsable del 6-20% de todos neumonías adquiridas en la comunidad. Sin embargo, el papel de *C. pneumoniae* en la patogenia de recurrentes[2-4]. Exacerbaciones de enfermedades pulmonares obstructivas crónicas. (EPOC) es desconocida. La serología es actualmente la Herramienta utilizada con mayor frecuencia para el diagnóstico de rutina de la reciente *C. Infección por neumonía*[5,6]. La técnica serológica estándar. En este momento se encuentra la microinmunofluorescencia. (MIF) prueba. Cuerpos de clamidia elemental (EBs), que son las formas celulares infecciosas de la clamidia, se utilizan como Antígeno en el test MIF. Se afirma que esta prueba es Específico de la especie y puede diferenciar entre IgG, IgM y anticuerpos IgA[7].

Este estudio evaluó un lipopolisacárido de ADNr comercial. (LPS) ELISA (Medac GmbH, Hamburgo, Alemania) para la detección de clamidias específicas Los anticuerpos en pacientes con EPOC y lo compararon con el ensayo MIF[8].

La población de estudio consistió en 271 pacientes (21 1 varones y 60 mujeres) con EPOC atendiendo a la clínica ambulatoria de la unidad de enfermedad pulmonar en el St Hospital Antonius, Nieuwegein, Países Bajos[9]. los rango de edad de los pacientes fue 34-88 años con una Mediana de 67 años. Se tomaron muestras de sangre de Cada paciente cada 2-7 meses (mediana 4 meses)[10]. los El período de vigilancia osciló entre 3 y 19 meses. (mediana 15 meses). Todas las muestras de suero de cada una[11]. El paciente fue evaluado en una carrera para evitar una mala interpretación. Debido a la variación del día a día en los ensayos[12].

2.Metodos

Se utilizó el ensayo de microinmunofluorescencia (MIF). para medir anticuerpos específicos IgG, IgM e IgA contra *C. pneumoniae* (Cp) cuerpos elementales (Washington Fundación de Investigación, Seattle, WA, EE. UU.)[14]. En Además, una prueba MIF disponible comercialmente (Labsystems OY, Finlandia) se utilizó para distinguir entre *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* y *C. psittaci* LPSespecíficos anticuerpos La prevalencia de Cp específica Los anticuerpos IgG, IgM e IgA se basaron en los presencia de anticuerpos en los títulos 3 32, 2 16 y 32, respectivamente[16]. Diagnóstico de una infección por Cp durante La vigilancia se basó en la presencia de Cp-específicos. IgM en cualquier muestra de suero, o un título de cuatro veces o más aumento del anticuerpo IgG o IgA específico de Cp, o ambos, entre dos muestras de suero consecutivas. Todas dos diluciones fueron hechas por un robot de pipeteo (MARCA 5; DPC, Los Angeles, CA, USA)[17].

Los anticuerpos IgG, IgM e IgA específicos de clamidia fueron También detectado por un ADN recombinante (rDNA) LPS ELISA (Medac GmbH, Hamburgo, Alemania). Esta ELISA se basa en un producto químicamente puro, recombinante[18].LPS que contiene un epítipo específico de género de *Chlamydia spp.* Cada muestra de suero fue mezclado bien antes de procesar de acuerdo con el Instrucciones del fabricante. Diluciones iniciales de suero para Las mediciones de anticuerpos IgG, IgM e IgA fueron 1 en 100, 1 en 50 y 1 en 50, respectivamente. Sueros con OD los valores > 2,5 se volvieron a probar a una dilución previa de 1 en 4. Se usó un suero estándar

diluido en serie dos veces para calcular el título \log_2 de las muestras de los pacientes. Los valores de corte de IgG, IgM e IgA se calcularon como prescrito por el fabricante[19]. La prevalencia de Los anticuerpos IgG, IgM e IgA específicos para clamidia fueron Con base en los siguientes criterios: corte calculado. X 1.10, 3 corte calculado X 1.15 y 3 calculado corte X 1.10, respectivamente. Diagnóstico serológico de una infección aguda por clamidia se basó en los resultados de ELISA con los siguientes criterios: una triple o Mayor aumento de IgG o IgA específica para clamidia Título de anticuerpos, o un aumento de dos veces en IgM específica título, o un aumento doble en el anticuerpo IgG específico título en combinación con un aumento de dos veces en Título específico de anticuerpos IgA. Todo el pipeteo fue hecho. Por el mismo robot de pipeteo[20].

La variabilidad intraensayo de la clamidia IgG, IgM e IgA rDNA LPS ELISA se calculó probando un Muestra de suero positiva 10 veces en una carrera. El interensayo La variabilidad se calculó probando un positivo. Muestra en 10 carreras diferentes[21]. Se utilizó una curva estándar. Para calcular el título de la muestra del paciente. El intraand Las variabilidades entre ensayos oscilaron entre 2.8 y 6.7%. y del 10.6 al 12.2%, respectivamente[22].

3.Experimentos

Un total de 1058 muestras de suero de 271 EPOC. Los pacientes fueron probados en este estudio. La C. pneumoniae La seroprevalencia de IgG observada por MIF fue de 72% cuando Se analizó la primera muestra de suero de cada paciente. UNA Se encontró seroprevalencia del 53% cuando la clamidia. Se aplicó IgG rDNA LPS ELISA a los mismos sueros[23]. Los resultados correspondientes para IgG con ambas pruebas fueron encontrado en 182 (67%) de los pacientes con EPOC; 70 (79%) de 89 pacientes con resultados discordantes de IgG fueron MIF positivo y rADN ELISA ELISA negativo. Había muy poca discordancia en los resultados de IgM; 9 (90%) de 10 pacientes con resultados de IgM discordantes fueron ADNr Positivo y MIF negativo. Ochenta y nueve (33%) de la 271 sueros mostraron resultados discordantes de IgA; de nuevo, 52 (58%) de 89 pacientes tuvieron resultados positivos de MIF con Resultados negativos de ELISA para ELPS de ADNr[24].

No hay cambios significativos en IgG específica para clamidia, IgM y el anticuerpo IgA durante el periodo de vigilancia fueron encontrado en 263 (97%) y 248 (92%) pacientes, como observado por MIF y rDNA ELPS ELISA, respectivamente[25]. Los títulos de anticuerpos de estos individuos fueron constantes. a lo largo del tiempo con cambios muy limitados observados entre Muestras consecutivas[26].

Siete (3%) pacientes tuvieron resultados MIF que indicaron C. Infección por neumonía durante su periodo de vigilancia. Estos resultados fueron confirmados en cinco de los pacientes por ADNr LPS ELISA. Once pacientes más fueron infectados durante la observación de acuerdo con el rDNA Solo resultados de LPS ELISA. Estos pacientes tuvieron significativamente IgG e IgA específicas de C. pneumoniae elevadas Títulos de FOMIN, en comparación con los pacientes sin infección ($p = 0,007$ y $0,008$ respectivamente). En Además, 6 (55%) de los 11 pacientes tenían títulos de MIF IgG. 3 512, que fue significativamente más de 19 (8%) de 253 pacientes sin evidencia de infección ($p = 0.0001$). Los perfiles serológicos de los 18. Pacientes con evidencia de infección durante su periodo de vigilancia se presentan. Todos los 18 Los pacientes también fueron probados con el comercial Prueba de MIF disponible de LabSystems. Este ensayo MIF utiliza tres. Diferentes manchas de antígeno / pozo, para distinguir. entre C. pneumoniae, C. trachomatis y C. psittaci anticuerpos específicos para LPS. Ninguno de los pacientes Los resultados serológicos indican resultados recientes de C. trachomatis. o infección por C. psittaci. Además, no significativo Diferencias en los títulos de C. pneumoniae para estos. Se encontraron pacientes, en comparación con los pacientes "internos". MIF (datos no mostrados).

4.Resultados

Dos pacientes tenían ELD ELISA para el ADNr de IgM contra la clamidia Resultados indicativos de infección por C. pneumoniae al ingreso al estudio. Tres pacientes tuvieron clamidia positiva. IgM rDNA LPS ELISA resultados durante todo su período de vigilancia (período de observación varió de 13 a 18 meses). En dos de estos pacientes, ninguna significativa. cambio de título en la reactividad de IgM se observó con el tiempo. Un paciente tuvo una caída significativa del título IgM entre La primera y la última muestra de suero. Ninguno de esos Los pacientes tenían reactividad IgM MIF. Otros cuatro pacientes tuvo resultados de ELISA ELISA para el ADNr de IgM de clamidia cerca de El valor de corte durante toda su vigilancia. período. Nuevamente, ninguno de estos pacientes tenía MIF IgM reactividad.

La incidencia de infección por C. pneumoniae según lo determinado por la prueba MIF y el rDNA LPS ELISA fue 2.2 y 5.3 / 100 persona-años, respectivamente. La serología es la herramienta diagnóstica más utilizada. para la detección de infecciones respiratorias por clamidia en práctica clínica de rutina. A principios de la década de 1970, un sensible Se desarrolló el ensayo de microinmunofluorescencia (MIF). que resultó ser adecuado para el

diagnóstico de rutina. En la prueba del FOMIN, los cuerpos elementales purificados son utilizado para detectar anticuerpos específicos contra la clamidia en la IgM, IgG e IgA fracciones séricas. La prueba MIF es generalmente Aceptado como el estándar de oro para la serología. Diagnóstico de una infección aguda por *C. pneumoniae*. Sin embargo, Interpretación de fluorescencia específica y no específica. patrones requieren experiencia y habilidad, y la La interpretación de títulos altos (2 512) es muy difícil. y subjetivo. Además, las reacciones cruzadas entre *C. neumonía* y otras especies de clamidia han sido informo. Los antígenos químicamente puros han sido Aislada para la detección de anticuerpos contra. LPS clamidial y esto se ha desarrollado en una ELISA para ADN recombinante LPS disponible comercialmente. En el presente estudio, este rDNA LPS ELISA. Desarrollado para la detección de IgG específica para clamidia, Los anticuerpos IgM e IgA lograron un alto grado de Reproducibilidad, concordancia parcial en seroprevalencia. se encontró con el ensayo interno de *C. pneumoniae* MIF. Hubo resultados discordantes entre las dos pruebas. Sin embargo, y una menor seroprevalencia se encontró con El rDNA LPS ELISA en comparación con el interno FOMIN Una posible explicación para esto es que los anti-LPS Los anticuerpos contra la clamidia pueden tener una vida media más corta que Los anticuerpos MOMP detectados por MIF. sin embargo, el Datos serológicos obtenidos por MIF y el ADNr LPS. ELISA fue idéntico en > 95% de los pacientes. Sobre el Por otro lado, el rDNA LPS ELISA parece ser más Sensible para la detección de clamidia respiratoria aguda. Infección que el tradicional FOMIN. Mas pacientes tenían resultados serológicos que indicaban infección durante el Período de vigilancia al utilizar el rDNA LPS ELISA. Muchos de estos pacientes tenían niveles elevados de IgG e IgA de MIF títulos de anticuerpos que no cambiaron significativamente sobre hora. Este fenómeno confirma la visión de Grayston. et al. que *C. pneumoniae* títulos MIF IgG 2 512 pueden indicar infección actual o reciente. Sobre el Por el contrario, varios pacientes con IgG MIF elevada los anticuerpos no tenían resultados de ELISA para ELISA de ADNr Infección por clamidia durante el periodo de vigilancia. Estos títulos de anticuerpos IgG constantemente altos pueden indicar Una infección crónica por clamidia. Falck et al. reportado títulos altos de anticuerpos IgG de IgG de *pneumoniae* pacientes con infección persistente por *C. pneumoniae* sin Signos clínicos de infección por periodos de 6 meses. Hasta un año.

5. Discusión

En tres pacientes, la reactividad de IgM por rDNA LPS ELISA persistió durante todo el período de observación. Cuatro otros pacientes tenían niveles bajos de clamidia IgM rDNA Anticuerpo LPS cercano al valor de corte del ELISA durante todo su período de vigilancia. Una crónica, La infección asintomática por *C. pneumoniae* puede haber sido Responsable de este fenómeno. Esta observacion sugiere que puede ser difícil hacer una Diagnóstico de una infección aguda por clamidia respiratoria. con el rDNA LPS chlamydia IgM ELISA, especialmente cuando solo se dispone de una muestra de suero. El uso de muestras de suero pareadas, tomadas con al menos un 1-2 el intervalo de la semana solucionará este problema, requiriendo al menos un cambio de título de dos veces en la IgM clamidial para Un diagnóstico de una infección aguda por clamidia.

El ensayo de clamidia de ADNr LPS se puede utilizar para diagnosticar la infección aguda por *C. pneumoniae* respiratoria A pesar del género específico de la prueba. Esto puede Se justifica por la diferencia en prevalencia de infección. por las tres especies de clamidia. *C. pneumoniae* Las infecciones respiratorias se producen con más frecuencia que *C. trachomatis* y *C. psittaci* respiratoria infecciones Ahora hay datos disponibles que indican que Los ensayos actuales del FOMIN con EB no pueden ser confiados a distinguir con precisión entre los tres especies de clamidia (R. P. Verkooyen et al. no publicadas ob servat i ons).

6. Conclusión

El tema principal de este estudio es la validez de las pruebas. Se utiliza, especialmente el nuevo rDNA LPS ELISA. Sin embargo, El principal problema en la validación de una nueva prueba es el Definición de un patrón oro. Cultura o PCR, o ambos, Se puede utilizar para calcular la sensibilidad y especificidad. de ensayos serológicos. Sin embargo, la infección asintomática, A menudo sin respuesta serológica, se ha reportado. y poco se sabe sobre el papel de la El organismo como comensal y la posibilidad de c d e r estado. La mayoría de los clínicos están interesados en diagnosticar Infecciones agudas por *C. pneumoniae* y una significativa. Aumento de anticuerpos específicos contra clamidia entre agudos. y las muestras de suero convaleciente generalmente se consideran Para ser una indicación de infección aguda. los Incidencia encontrada en este grupo de pacientes con EPOC por MIF Fue comparable con la incidencia encontrada por Grayston. Se encontró una mayor incidencia cuando el Se usó ADNr ELPS ELISA.

En conclusión, el estudio muestra que el rDNA LPS El ensayo de clamidia puede ser actualmente el más sensible. Método serológico para el diagnóstico de recientes. Infección respiratoria por *Chlamydia* spp. *C. pneumoniae* infección puede hacer una contribución significativa a Morbilidad en pacientes con EPOC.

Referencias

- [1] Karakavuk, M., Aykur, M., Ünver, A., Döşkaya, M. (2018) "Parasitic Diseases that can Infect Travelers to Africa", *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 42(2), pp. 154-160.
- [2] Petrovska, L., Tang, Y., van Rensburg, M.J.J., Cawthraw, S., Nunez, J., Sheppard, S.K., Ellis, R.J., Whatmore, A.M., Crawshaw, T.R., Irvine, R.M. (2017) "Corrigendum: Genome reduction for niche association in *Campylobacter Hepaticus*, a cause of spotty liver disease in poultry", *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7 (NOV), art. no. 480.
- [3] Briceno L, Rodriguez EM, Medina M, Campos Y, Mosca W, Briceno A, Leon G (2010) "An inexpensive antigen for serodiagnosis of Chagas' disease", *Investigacion Clinica*, 51(1), pp. 101-113.
- [4] Ming, R.-X., Liu, J., Cheung, W.K.W., Wan, X. (2017) "Erratum to: Stochastic modelling of infectious diseases for heterogeneous populations", *Infectious Diseases of Poverty*, 6 (1), art. no. 50.
- [5] Agoramorthy, G. (2016) "Corrigendum to India needs to strengthen microbial disease surveillance strategies", *Journal of Infection*, 72(6), p. 767.
- [6] Dietrich, J., Roy, S., Rosenkrands, I., Lindenstrøm, T., Filskov, J., Rasmussen, E.M., Cassidy, J., Andersen, P. "Correction for Dietrich et al. (2015) "Differential influence of nutrient-starved *Mycobacterium tuberculosis* on adaptive immunity results in progressive tuberculosis disease and pathology", *Infection and Immunity*, 84(2), p. 608.
- [7] Derincon DP, Bonilla E (1986) "Psychiatric aspects of huntingtons-disease patients and their offsprings - a preliminary-report", *Investigacion Clinica*, 27(3), pp. 165-201.
- [8] Buschmann, C., Kleber, C. (2014) "Tension pneumothorax as internal emergency: Resuscitation under infect-exacerbated chronic-obstructive pulmonal disease", *Notarzt*, 30(1), pp. 16-20.
- [9] Noya-Alarcon O, Colmenares C, Lander O, Montero M, Cantele H, Petit M, Botto C, de Noya BA (2011) "Polycystic hydatid disease in two patients indigenous Yanomami in the Upper Orinoco, Amazonas, Venezuela", *Boletin de Malariologia y Salud Ambiental*, 51(2), pp. 159-165.
- [10] Taylor, N.S., Fox, J.G. (2012) "Animal models of helicobacter-induced disease: Methods to successfully infect the mouse", *Methods in Molecular Biology*, 921, pp. 131-142.
- [11] Eliane J, Azevedo C (2018) "Principle and practice of infectious disease of humans", *Boletin de Malariologia y Salud Ambiental*, 58(4), pp. 2-7.
- [12] Navarro, B., Gisel, A., Rodio, M.-E., Delgado, S., Flores, R., Di Serio, F. "Viroids: How to infect a host and cause disease without encoding proteins", (2012) *Biochimie*, 94 (7), pp. 1474-1480.
- [13] Sauter, P., Hober, D. (2009) "Corrigendum to "Mechanisms and results of the antibody-dependent enhancement of viral infections and role in the pathogenesis of coxsackievirus B-induced diseases"", *Microbes and Infection*, 11(14-15), p. 1219.
- [14] Puche ML, Kay-Valero S, Michelli P, Oropeza MD, Loureiro CL, Devesa M, Dagher L, Pujol FH (2016) "Genetic diversity of hepatitis B virus and mutations associated to hepatocellular carcinoma in patients from Venezuela, with different stages of liver disease", *Investigacion Clinica*, 57(1), pp. 38-46.
- [15] Johnson, J.R., Mereghetti, L., Tayoro, J., Watt, S., Lanotte, P., Loulergue, J., Perrotin, D., Quentin, R. "Re: Mereghetti, L., Tayoro, J., Watt, S., et al. (2003) "General relationship between *Escherichia coli* strains isolated from the intestinal flora and those responsible for infectious diseases among patients hospitalized in intensive care units", *Journal of Hospital Infection*, 54(1), pp. 83-85.
- [16] Lieb, K., Staeheli, P. (2001) "Borna disease virus - Does it infect humans and cause psychiatric disorders?", *Journal of Clinical Virology*, 21(2), pp. 119-127.
- [17] Martinez D, Lema D, Moreno DD, Garcia AH, Garmendia JV, De Sanctis JB (2016) "Single nucleotide polymorphisms V4 and T1 of the ADAM33 gene in Venezuelan patients with asthma or chronic obstructive pulmonary disease", *Investigacion Clinica*, 57(2), pp. 176-186.
- [18] Swayne, D.E., Beck, J.R., Perdue, M.L., Brugh, M., Slemons, R.D. (1996) "Assessment of the ability of ratite-origin influenza viruses to infect and produce disease in rheas and chickens", *Avian Diseases*, 40(2), pp. 438-447.
- [19] Morocoima A, Brito EJT, Ferrer E, Herrera L, Nunez M (2008) "Chagas disease in Anzoategui state, Venezuela: Detection of an acute case and parasitological and molecular characterization of the parasite isolate", *Boletin de Malariologia y Salud Ambiental*, 48(2), pp. 121-126.
- [20] Piesman, J., Dolan, M.C., Schriefer, M.E., Burkot, T.R. (1996) "Ability of experimentally infected chickens to infect ticks with the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*", *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 54(3), pp. 294-298.
- [21] Rowbotton ARA, Verde O, Ache LJ, Gonzalez J, Guerra A, Sanchez V, Salas C, Martinadonna G, Salazar M, Hurtado H (2012) "Evaluation of the efficacy of antihelminthic drugs for the control of *Trichuris trichiura* and other helminthic diseases in the state of Aragua, Venezuela", *Boletin de Malariologia y Salud Ambiental*, 52(2), pp. 195-209.

- [22] Mason, P.W., Baxt, B., Brown, F., Harber, J., Murdin, A., Wimmer, E. (1993) "Antibody-complexed foot-and-mouth disease virus, but not poliovirus, can infect normally insusceptible cells via the Fc receptor", *Virology*, 192(2), pp. 568-577.
- [23] Beardsley, T.M. (1990) "Tainted feed, mad cows. Could a British cattle disease infect U.S. herds?", *Scientific American*, 262(5), p. 34.
- [24] Marcano Y, Suarez B, Gonzalez M, Gallego L, Hernandez T, Naranjo M (2013) "Epidemiological characterization of intestinal parasitic diseases in the community 18 de Mayo, Santa Rita, Aragua state, Venezuela, 2012", *Boletin de Malariologia y Salud Ambiental*, 53(2), pp. 135-145
- [25] Payne, F.K. (1923) "Investigations on the control of hookworm disease. XXXI. The relation of the physiological age of hookworm larvae to their ability to infect the human host", *American Journal of Epidemiology*, 3(5), pp. 584-597.
- [26] Noya O, Campos ME, Cardenas J, Losada S, Pabon R, Contreras R, Colmenares C, de Noya BA, Valera A, Moreno S (2018) "Parasitic diseases in African students: how international exchange programs could affect public health", *Investigacion Clinica*, 59(2), pp. 118-134.

Micro-immuno Fluorescence for the Diagnosis of Infectious Disease

Abstract

Infection with *Chlamydia pneumoniae* occurs worldwide, resulting in a 40-90% prevalence of serum antibody to the species in various populations. Serology is the most commonly used diagnostic tool for the detection of respiratory chlamydial infections in routine clinical practice. The major issue of this study is the validity of the tests used, especially the new rDNA LPS ELISA.

Keywords: Infectious Disease, Micro-Immuno Fluorescence, Diagnosis