

XXIX SEMINARIO INTERNACIONAL DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

# Nuevas técnicas en el diagnóstico serológico de las infecciones

Hospital de la Princesa, 25 octubre 2012

Fernando de Ory  
[fory@isciii.es](mailto:fory@isciii.es)



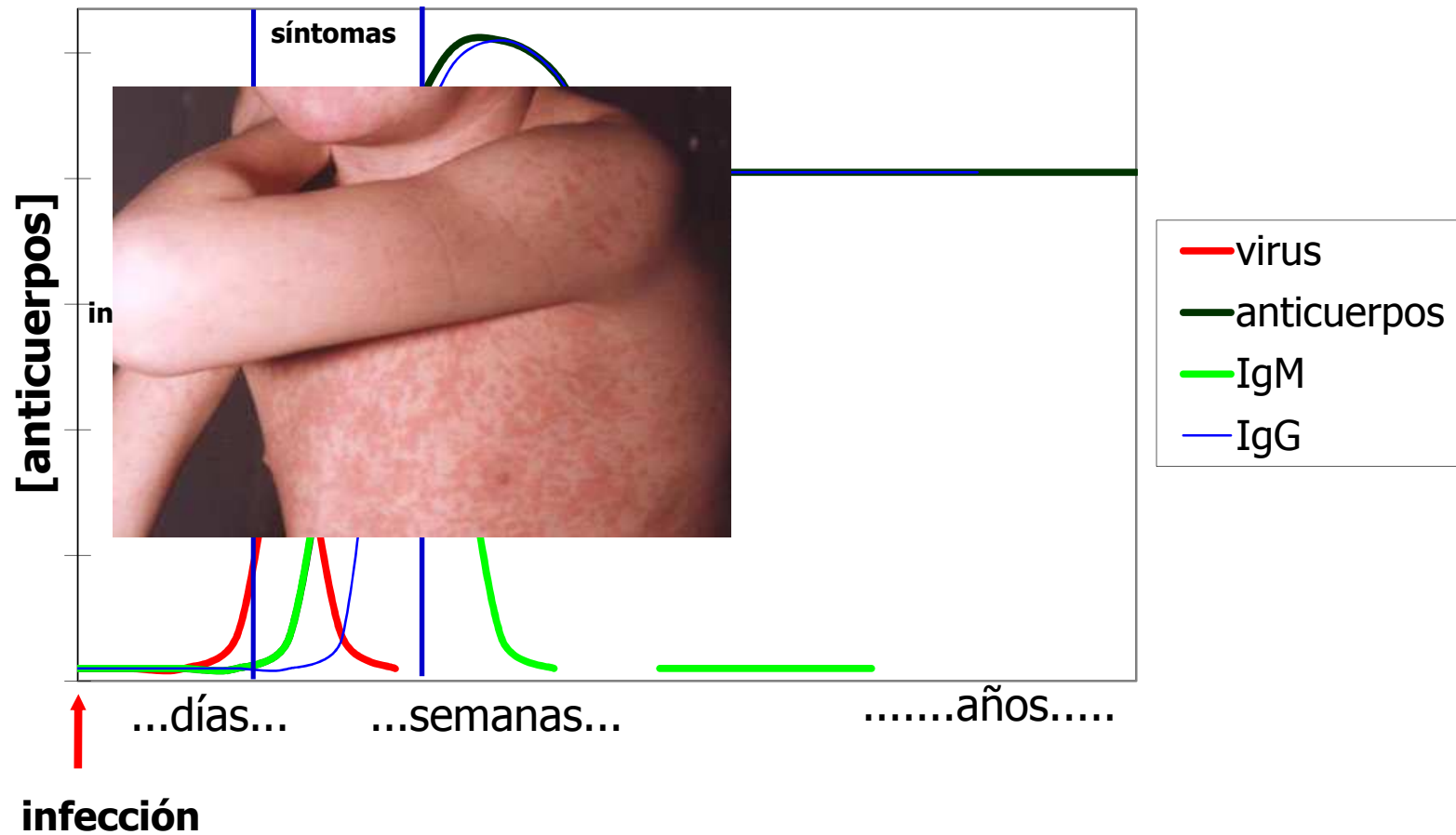
## Algunas fechas importantes

- Todo comenzó hace más de 100 años...
- Cultivo y caracterización de virus
- Obtención de conjugados (fluorescentes, radioisótopos, enzimas) : IF, ELISA, RIA
- Proteínas recombinantes, péptidos sintéticos
- Robótica
- Quimioluminiscencia
- Arrays en fase sólida o en suspensión: x-MAP
- Inmunoensayos rápidos (*point-of-care*)

# Serología

1. Métodos para diagnóstico
2. Técnicas para detectar anticuerpos
3. Ensayos de IgM y sus problemas
4. Aplicación de marcadores serológicos alternativos
5. Diagnóstico serológico en otras muestras
6. Automatización en serología
7. Ensayos *point-of-care*
8. Validación de ensayos e intercomparaciones

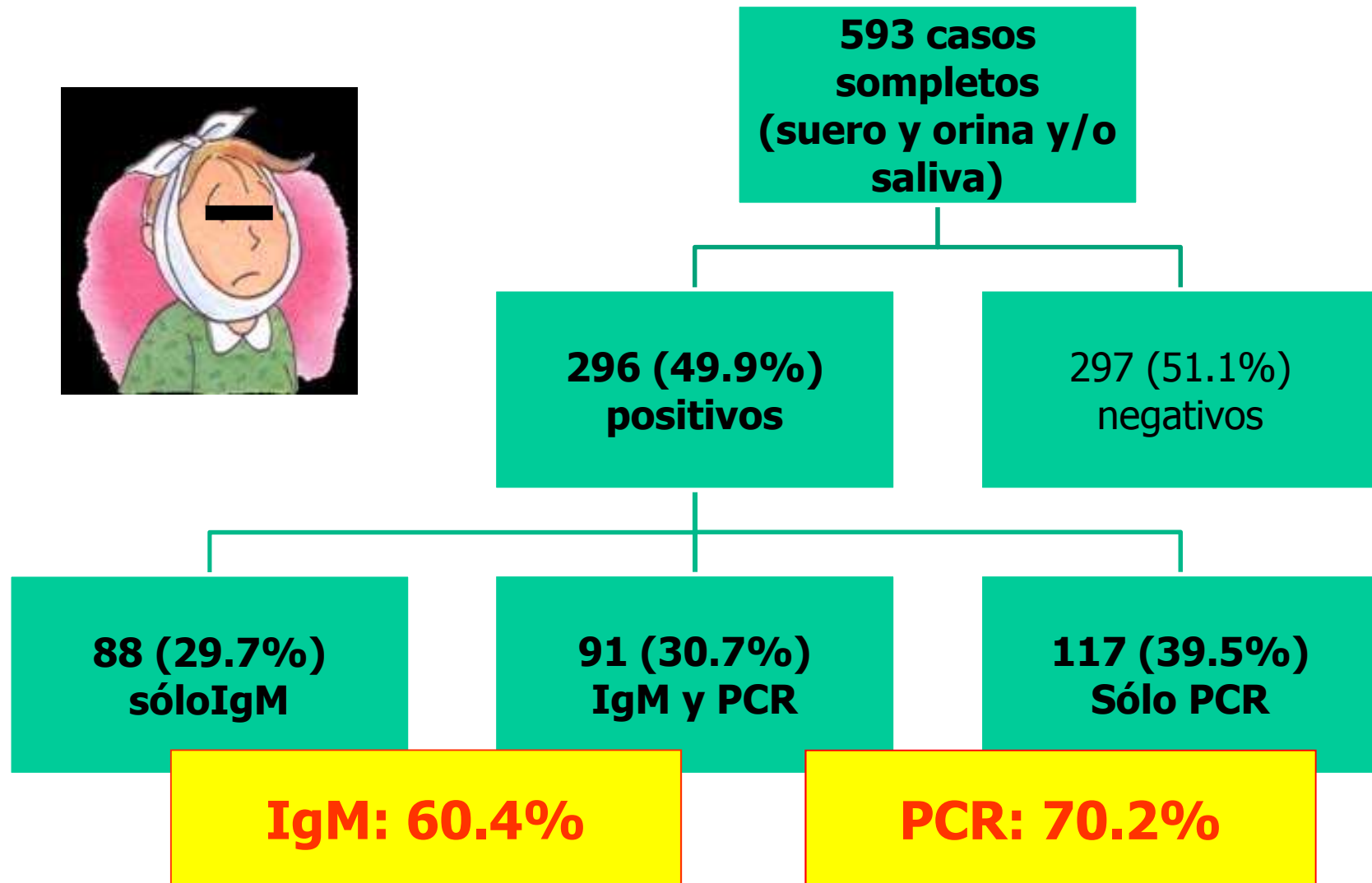
# Respuesta de anticuerpos a la infección



# 1. Métodos para diagnóstico

- Diagnóstico directo
  - Aislamiento
  - Detección de antígenos
  - Detección de genomas
- Diagnóstico indirecto (serología)
  - Detección de IgM específica
  - Seroconversión

# Métodos para diagnóstico. Parotiditis. IgM vs. PCR



# Serología

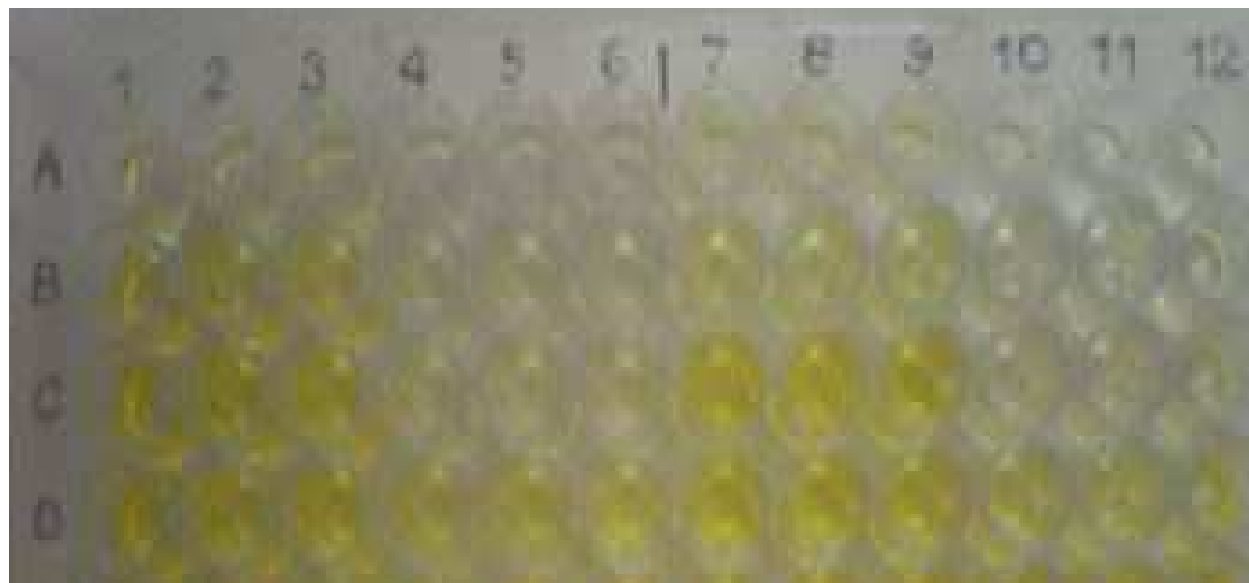
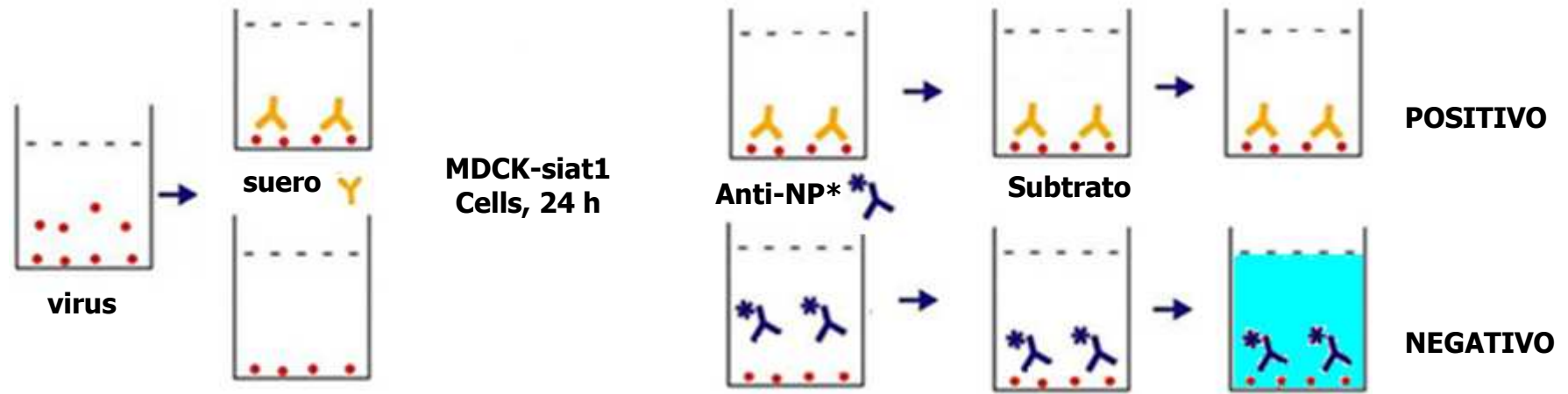
1. Métodos para diagnóstico
2. Técnicas para detectar anticuerpos
3. Ensayos de IgM y sus problemas
4. Aplicación de marcadores serológicos alternativos
5. Diagnóstico serológico en otras muestras
6. Automatización en serología
7. Ensayos *point-of-care*
8. Validación de ensayos e intercomparaciones

# Técnicas para anticuerpos totales

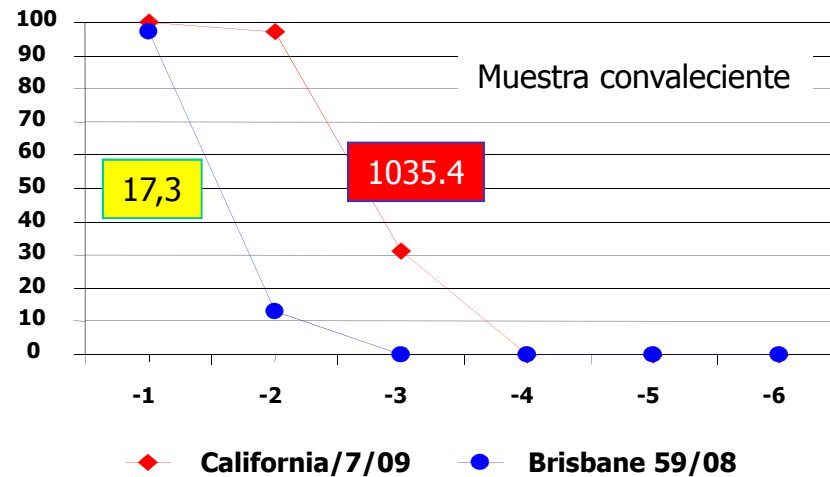
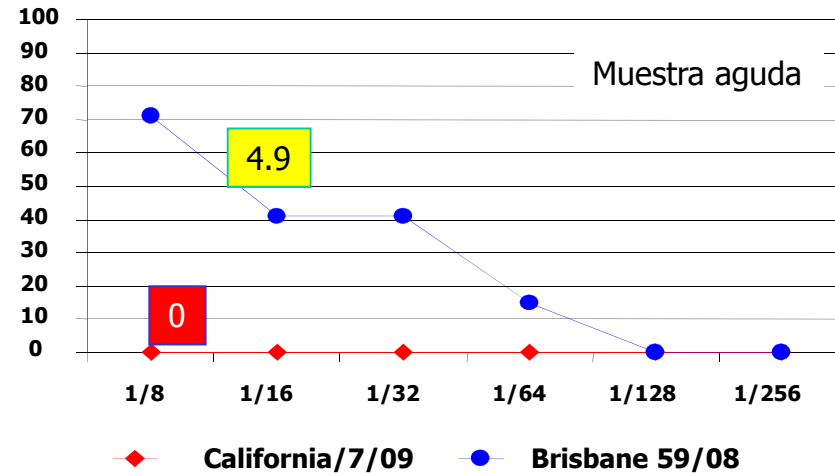
- Inhibición de la hemaglutinación
- Neutralización
- Fijación del complemento
- ...



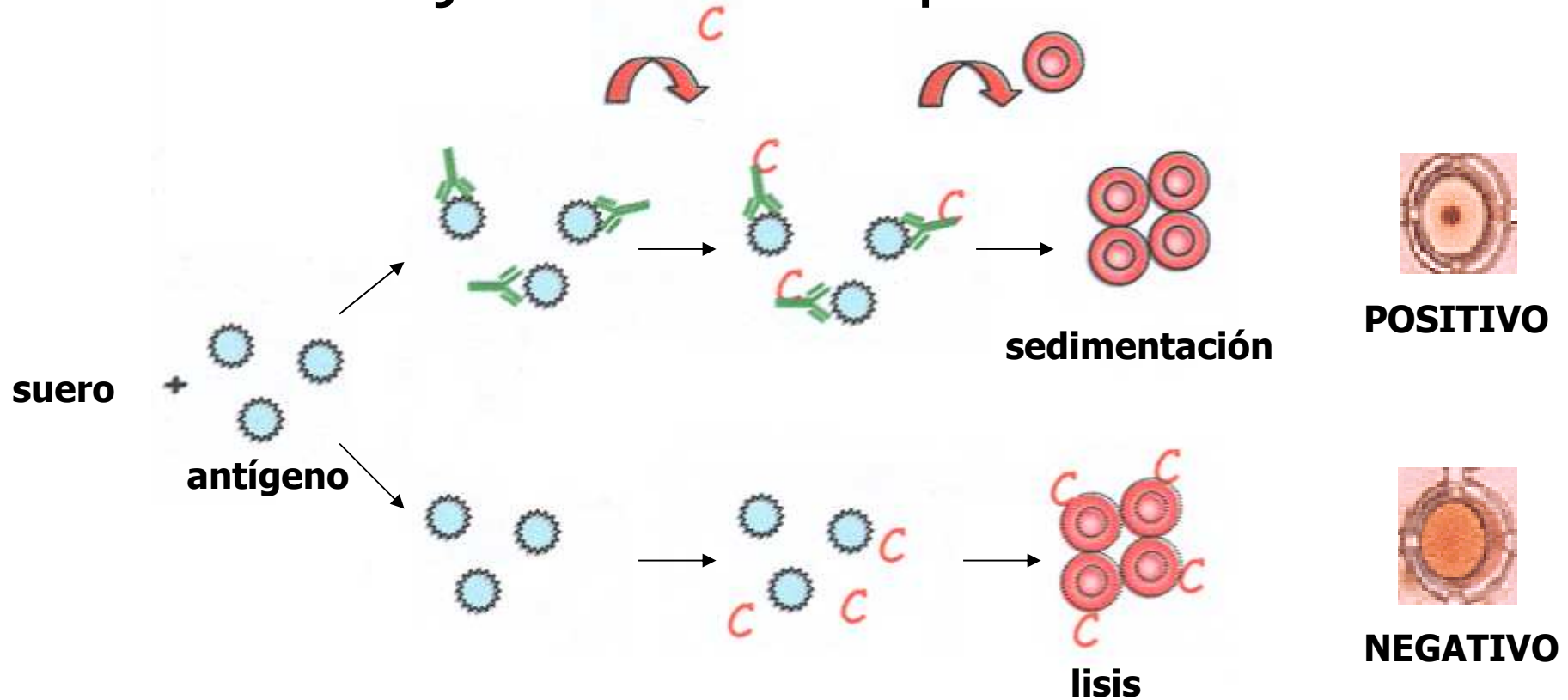
# Neutralización. Virus Influenza A



# Neutralización. Virus Influenza A



# Fijación del Complemento



✓ **A Favor:** en el formato convencional (microplaca) permite el estudio simultáneo de varios antígenos: infección respiratoria

✓ **En contra:** Requiere una estricta estandarización



## Fijación del complemento automatizada



<b>Antígeno</b>	<b>No.</b>	<b>positivo (%)</b>
<b>Influenza A</b>	<b>19</b>	<b>18 (95)</b>
<b>RSV</b>	<b>6</b>	<b>5 (83)</b>
<b>Adenovirus</b>	<b>6</b>	<b>6 (100)</b>
<b>Influenza B</b>	<b>8</b>	<b>6 (75)</b>
<b>CMV</b>	<b>7</b>	<b>5 (71)</b>
<b>TOTAL</b>	<b>46</b>	<b>40 (87)</b>

- 140 determinaciones / 8 h
- Alto volumen de muestra

## Técnicas para anticuerpos totales

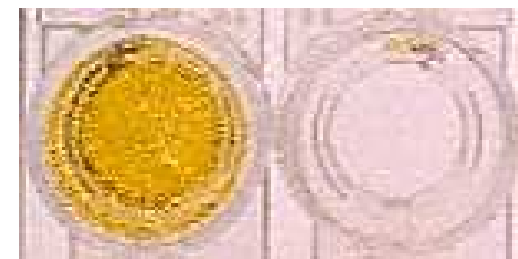
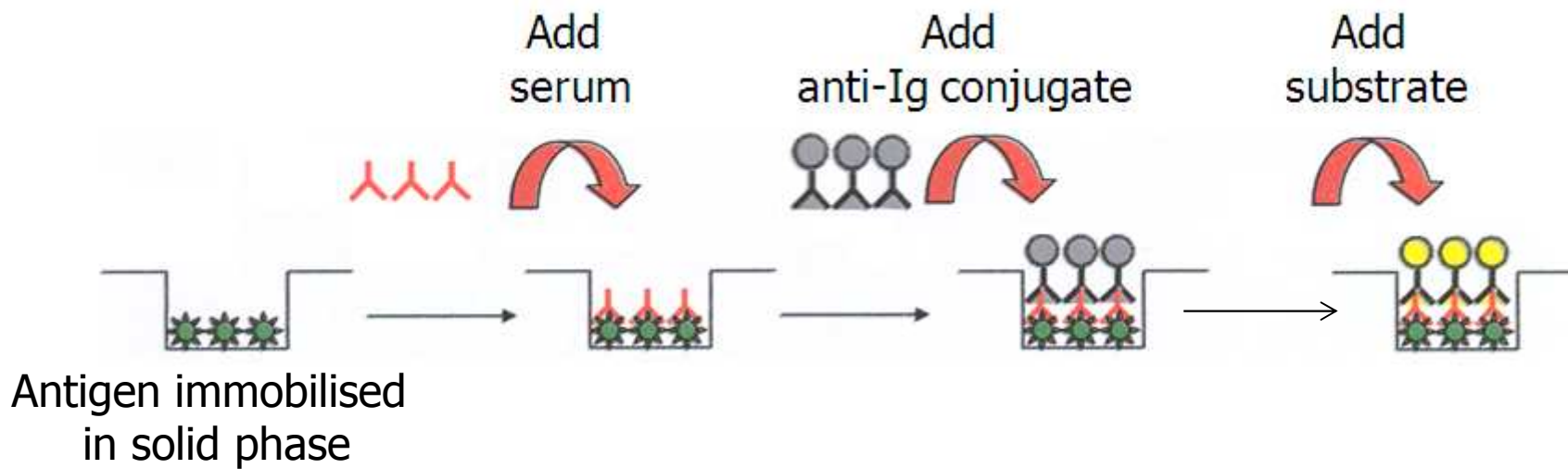
- Aplicables para diagnóstico detectando seroconversión
  - se precisan muestras pareadas; no proporcionan diagnóstico rápido
- Útiles para estudios seroepidemiológicos
- Neutralización, inhibición de la hemaglutinación, fijación del complemento

## Técnicas para anticuerpos de clase

- Aplicables para diagnóstico identificando respuestas IgM
  - no se precisan muestras de seguimiento: diagnóstico rápido
- Útiles para seroepidemiología (IgG)
- Aplicables en muestras diferentes de suero (saliva, LCR)
- **Ensayos en fase sólida**

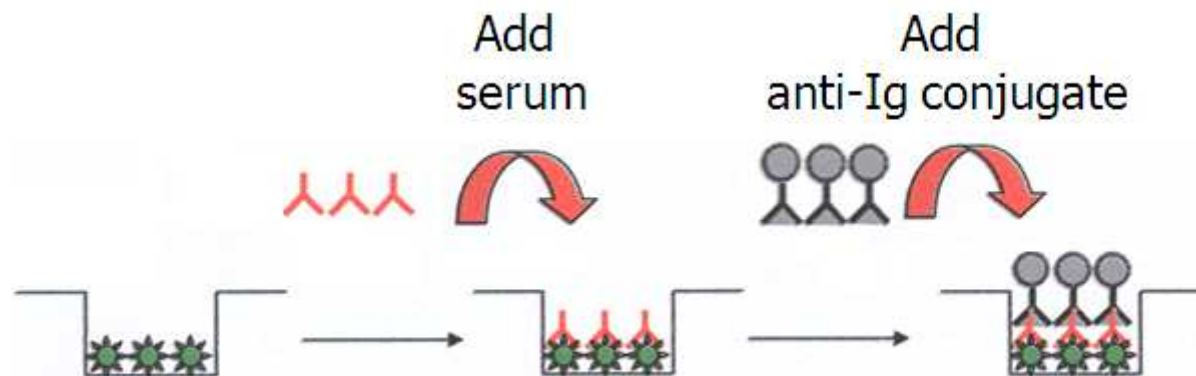
# Ensayos en fase sólida

## a. ELISA indirecto



# Ensayos en fase sólida

## a. Inmunofluorescencia indirecta



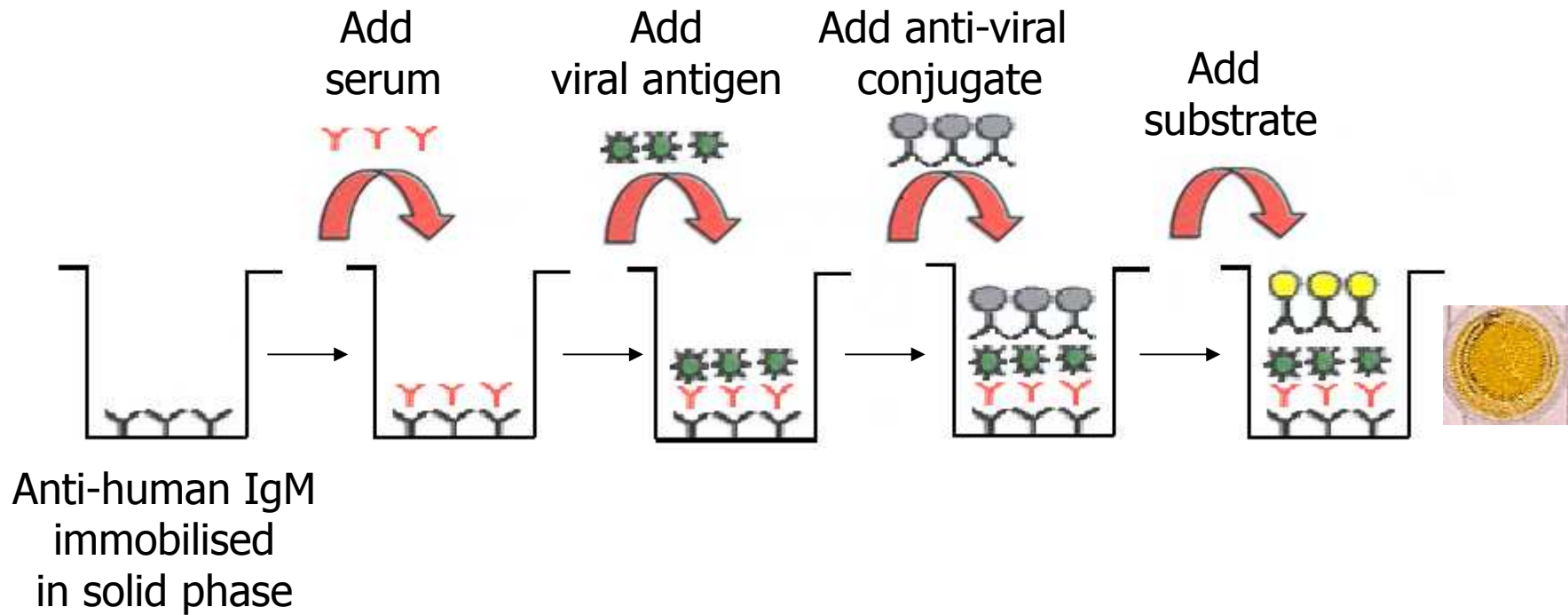
Antigen immobilised  
in solid phase



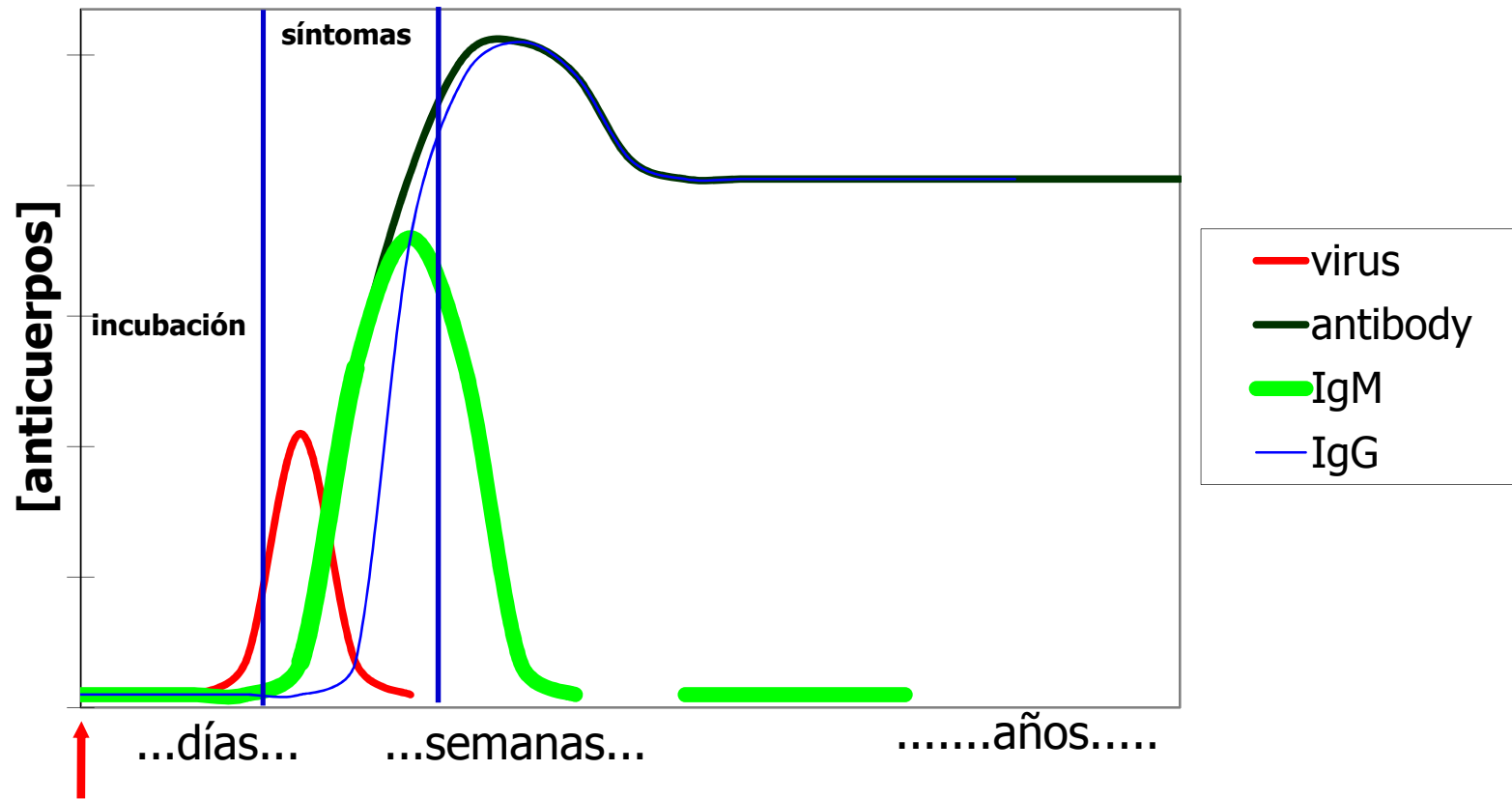


# Ensayos en fase sólida

## c. ELISA de captura



# Respuesta de anticuerpos a la infección



infección

“La detección de IgM es el método de elección para el diagnóstico serológico”

# Serología

1. Métodos para diagnóstico
2. Técnicas para detectar anticuerpos
3. Ensayos de IgM y sus problemas
4. Aplicación de marcadores serológicos alternativos
5. Diagnóstico serológico en otras muestras
6. Automatización en serología
7. Ensayos *point-of-care*
8. Validación de ensayos e intercomparaciones

“La detección de IgM es el método de elección para el diagnóstico serológico”

- Presencia simultánea de IgG específica y FR
- **Solución: Eliminar IgG de la muestra** (eliminación policlonal de linfocitos de memoria)
- Reactividad cruzada (herpesvirus, flavivirus)
- Diferenciación de infecciones primarias y no primarias
- Persistencia de IgM específica (rubéola en el embarazo)
- Ausencia de respuesta IgM

“La detección de IgM es el método de elección para el diagnóstico serológico”

- Presencia simultánea de IgG específica y FR
- Reactividad múltiple debida a estimulación policlonal de linfocitos de memoria.

Reactividad IgM múltiple en casos de mononucleosis infecciosa por CMV

Caso	CMV	EBV	Rubéola	<i>T. gondii</i>
1-a	Pos	Pos	Neg	Pos
1- c	Pos	Pos	Neg	Pos
2-a	Pos	Pos	Neg	Neg
3-a	Pos	Pos	Pos	Pos
3-c	Neg	Pos	Pos	Neg

“La detección de IgM es el método de elección para el diagnóstico serológico”

- Presencia simultánea de IgG específica y FR
- Reactividad múltiple debida a estimulación policlonal de linfocitos de memoria
- **Reactividad cruzada (herpesvirus, flavivirus)**
- Diferenciación de infecciones primarias y no primarias
- Persistencia de IgM específica (rubéola en el embarazo)
- Ausencia de respuesta IgM

“La detección de IgM es el método de elección para el diagnóstico serológico”

Reactividad IgM a EBV en infecciones por CMV			
Ensayo	Antígeno	Positivos/ensayados	%
IFI	P3HR1	9/17	52,9
IF	Zebra	13/17	74,5
IQL	VCA p18	13/17	74,5
IQL	VCA p18	7/17	42,1
ELISA	VCA p18	3/17	17,6
ELFA	VCA p18	4/7	57,1
Reactividad IgM a CMV en infecciones por EBV			
ELISA	Captura	27/99	27,3
ELISA	Indirecto	15/99	15,2

“La detección de IgM es el método de elección para el diagnóstico serológico”

- Presencia simultánea de IgG específica y FR
- Reactividad múltiple debida a estimulación policlonal de linfocitos de memoria
- Reactividad cruzada (herpesvirus, flavivirus)
- Diferenciación de infecciones primarias y no primarias
- Persistencia de IgM específica (rubéola en el embarazo)

**“hasta el 1% de mujeres embarazadas muestra IgM a rubeóla”**



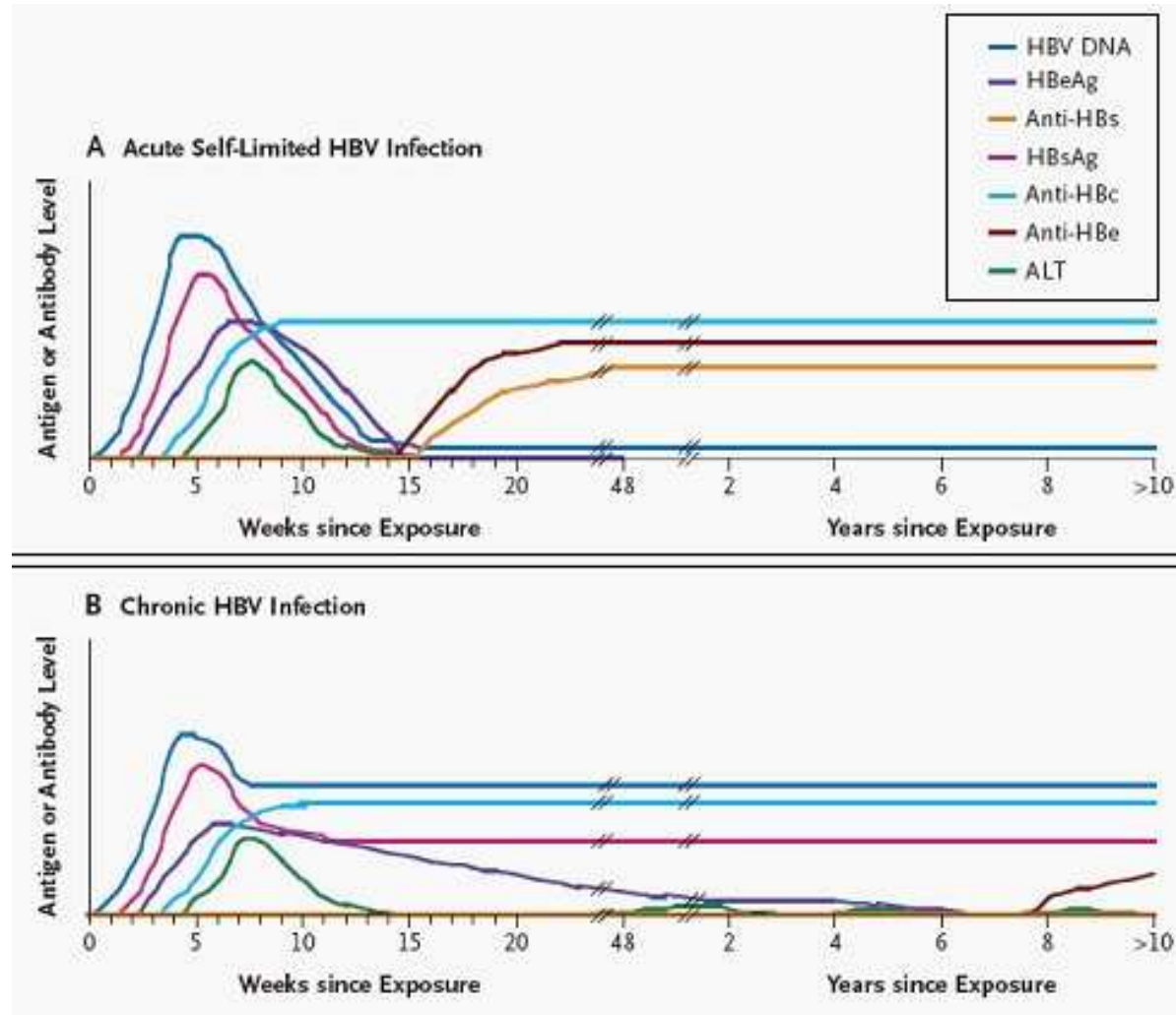
## ¿Es la detección de IgM el método de elección para el diagnóstico serológico?

- Presencia simultánea de IgG específica y FR
- Reactividad múltiple debida a estimulación p
- R **✓ Estudio de muestras pareadas**
- D **✓ Definición de perfiles de anticuerpos y antígenos**
- D **✓ Ensayos de avidéz de IgG** 0
- primarias
- Persistencia de IgM específica (rubéola en el embarazo)
- Ausencia de respuesta IgM

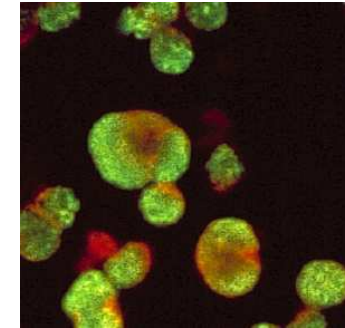
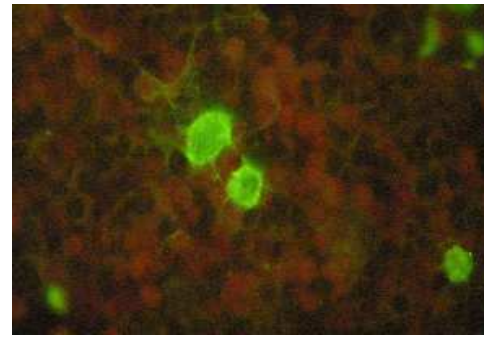
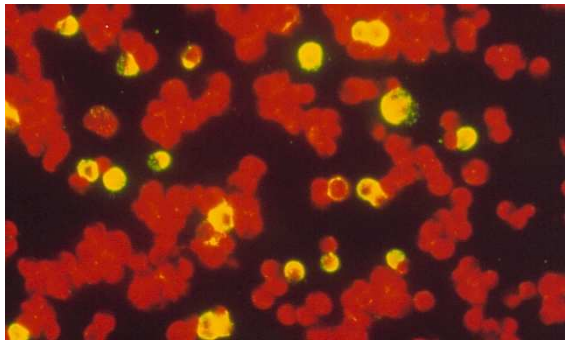
# Serología

1. Métodos para diagnóstico
2. Técnicas para detectar anticuerpos
3. Ensayos de IgM y sus problemas
4. Aplicación de marcadores serológicos alternativos
5. Diagnóstico serológico en otras muestras
6. Automatización en serología
7. Ensayos *point-of-care*
8. Validación de ensayos e intercomparaciones

# Definición de perfiles de anticuerpos: HBV



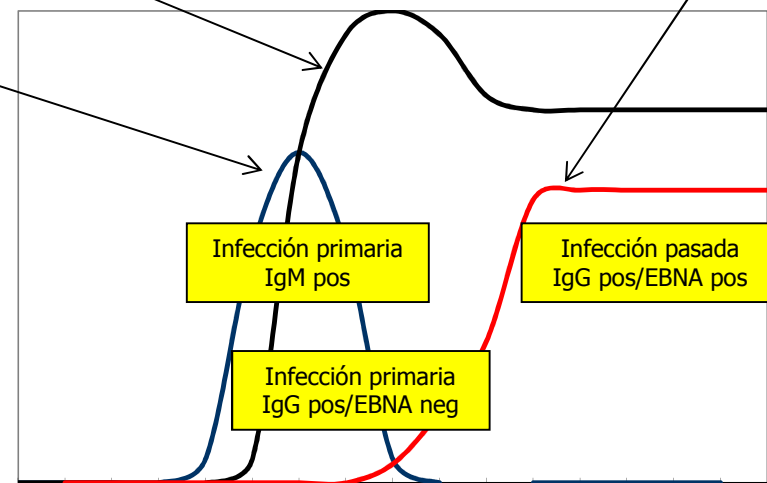
# Definición de perfiles de anticuerpos: EBV



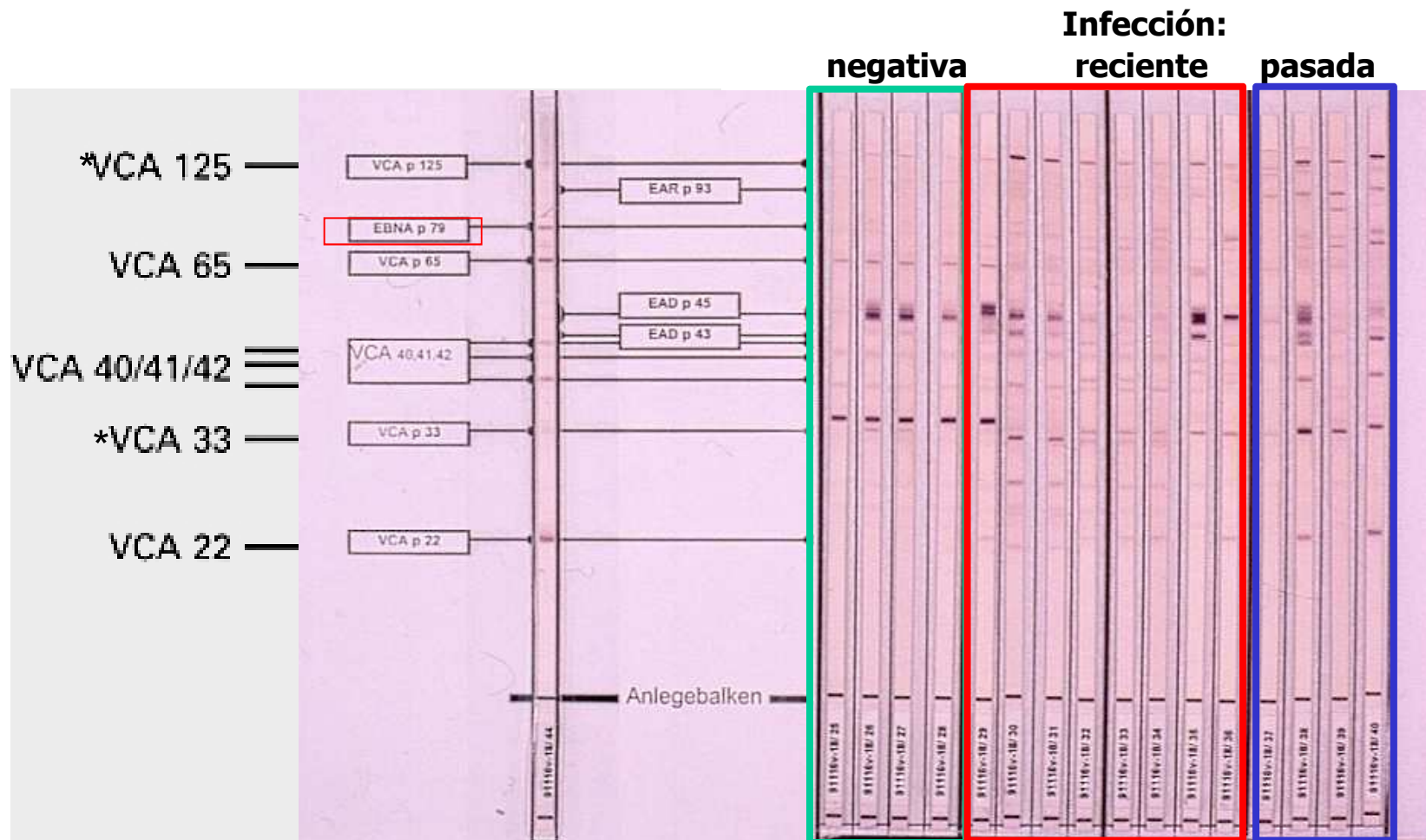
IgM VCA

IgG VCA

EBNA

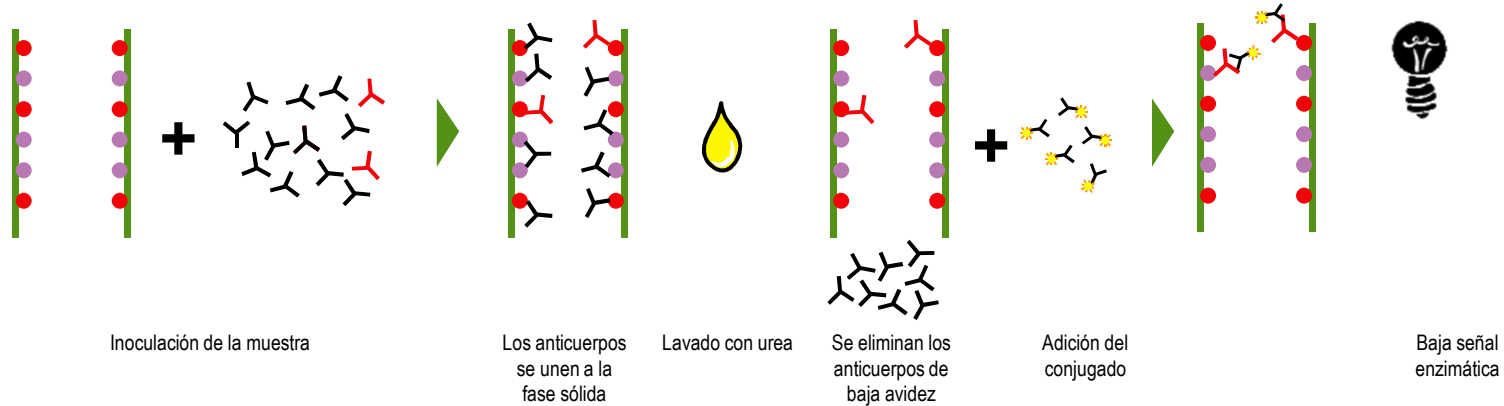


# Definición de perfiles de anticuerpos: EBV-IgG por *Western Blot* (Euroimmun)

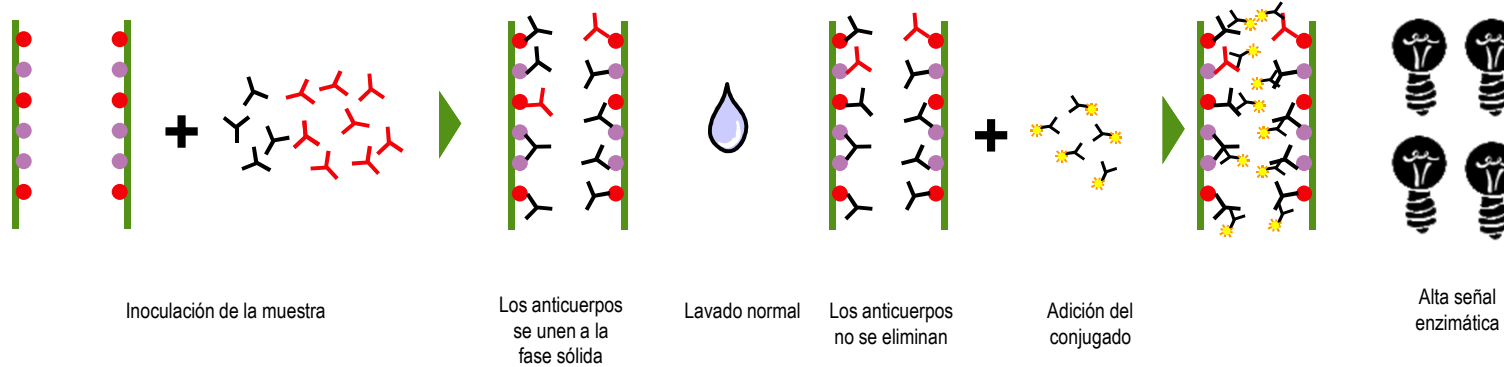


# Ensayos de avidéz de IgG

Ensayo con urea



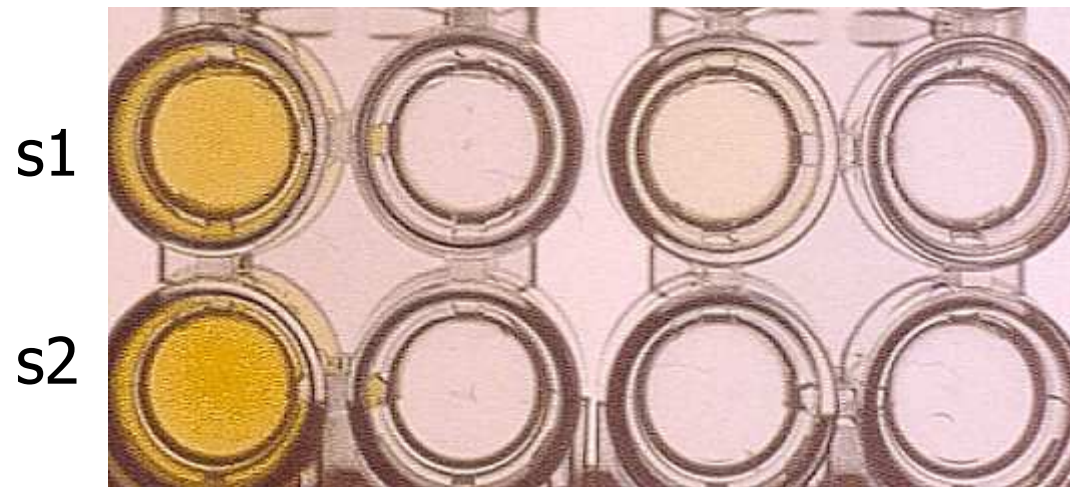
Ensayo control



La reducción en señal o en título después de tratar con urea indica la presencia de IgG de baja avidéz: INFECCIÓN PRIMARIA

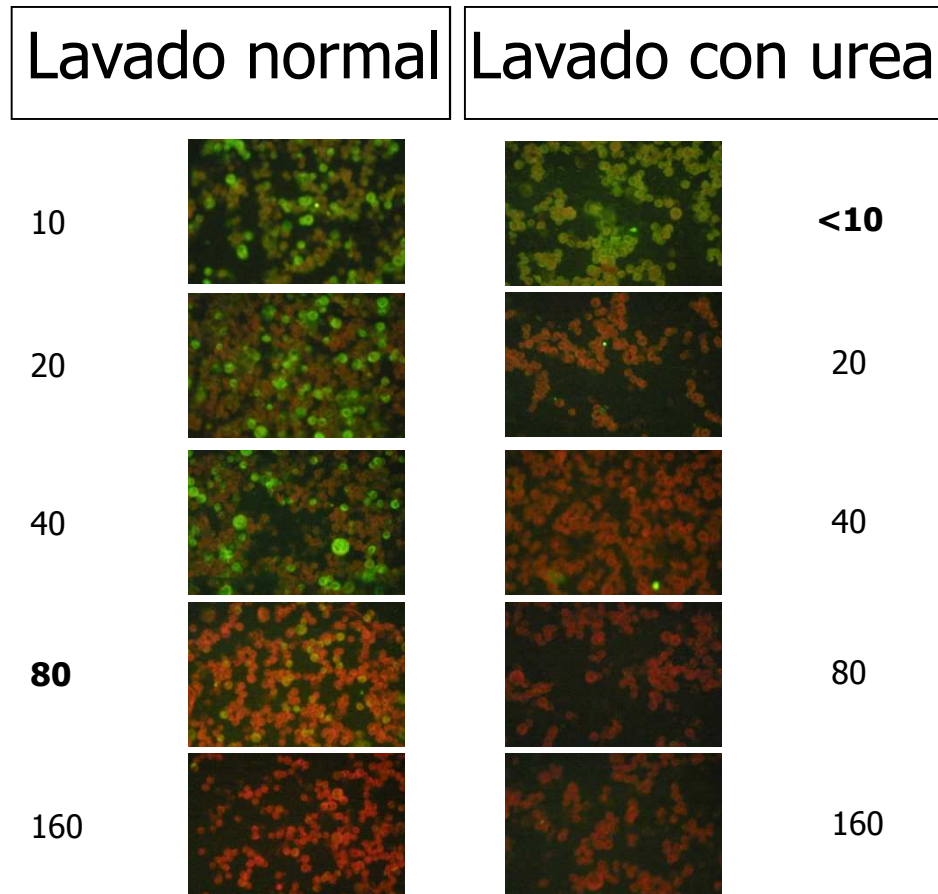
# Ensayo de avididad de IgG: ELISA

Lavado normal	Lavado con urea
---------------	-----------------



- ❖ Reducción en la señal después del tratamiento con urea:  
IgG de baja avididad → Infección primaria

# Ensayo de avididad de IgG: IFI



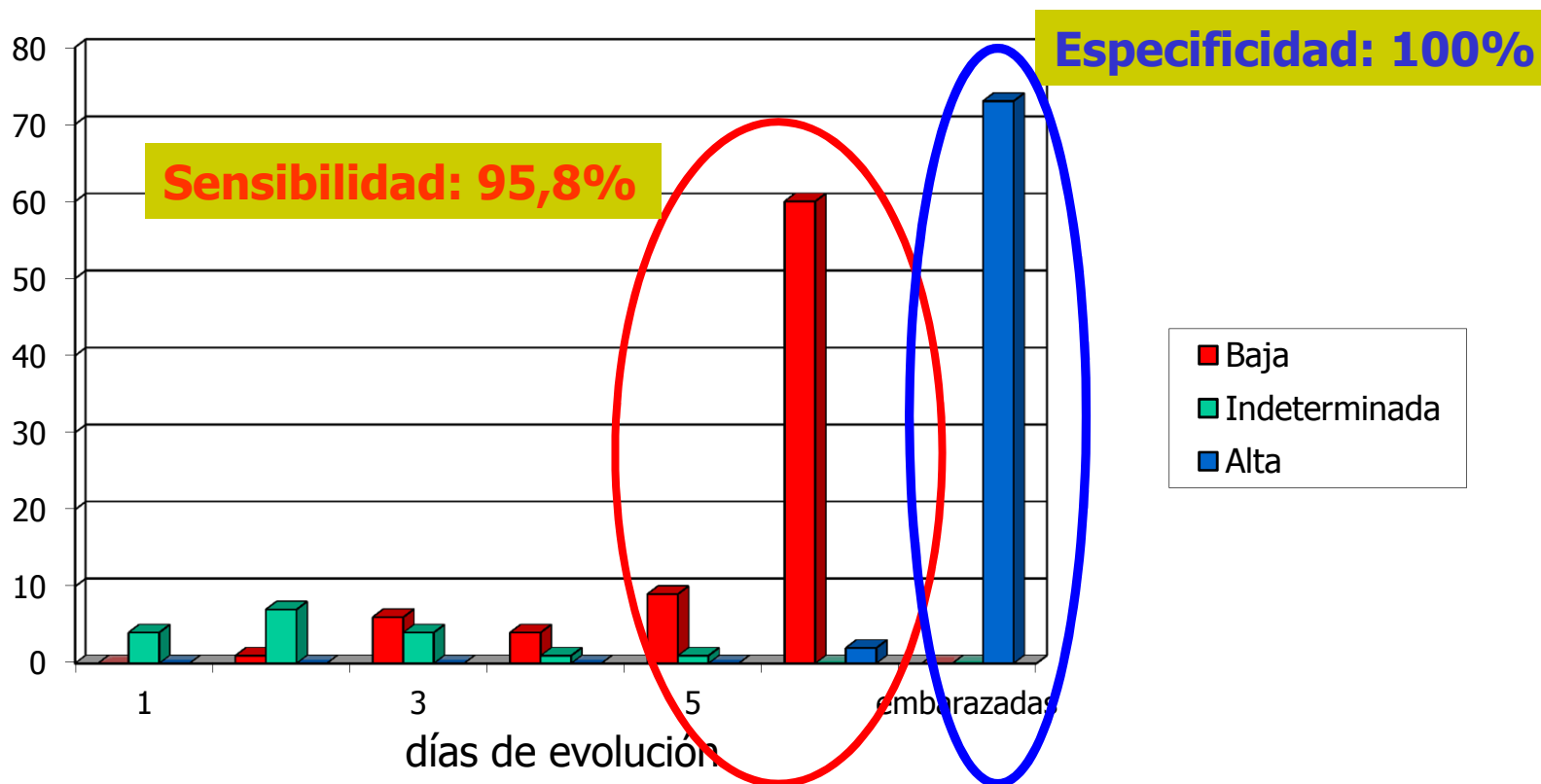
- ❖ Reducción en el título después del tratamiento con urea:  
IgG de baja avididad → Infección primaria



# Ensayos de avididad de IgG: aplicaciones

- Marcador serológico de infección primaria (rubéola, EBV)
- Diferenciación de infección primaria y no primaria (herpesvirus, fallo vacunal)
- Exclusión de infección primaria en presencia de IgM durante el embarazo (rubéola, CMV, *Toxoplasma gondii*)

# IgG de baja avidéz como marcador de infección primaria por rubéola



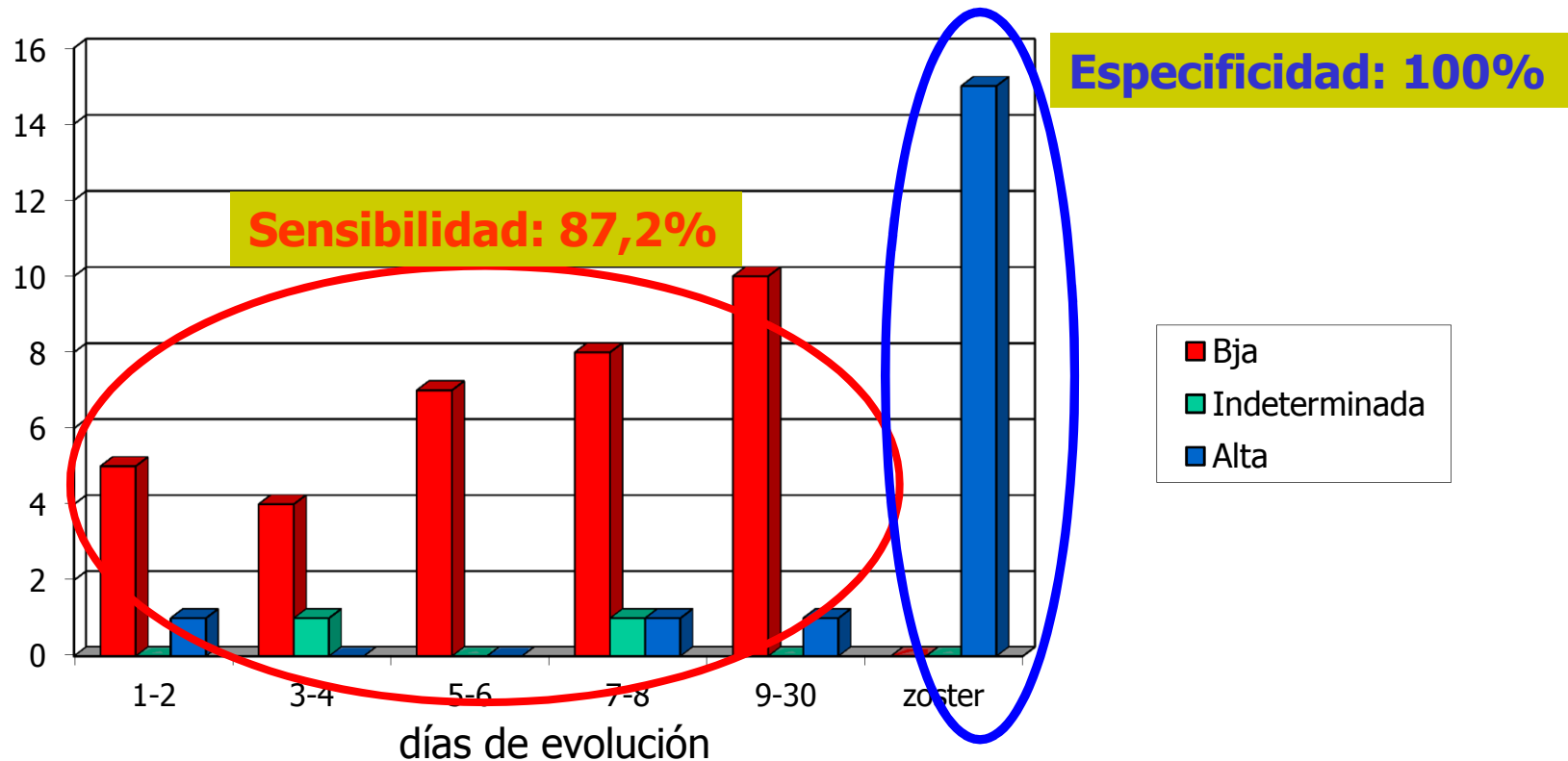
# IgG de baja avididad como marcador de infección primaria por EBV

Infección ↓	VCA			N	N (%) de muestras positivas por ensayo	N de muestras con título de IgG de baja avididad de:			
	IgM 87 (93)	IgG 85	Anti EBNA (90)			<4	4	16	>64
<b>Reciente</b>				94	89 (95)	5	35	34	20
	Pos	Pos	Neg	78	74 (95)	4	30	26	18
	Pos	Pos	Pos	9	9 (100)	0	3	5	1
	Neg	Pos	Neg	7	6 (86)	1	2	3	1
<b>Pasada</b>	Neg	Pos	Pos	27	2 (7)	25	1	1	0

# Ensayos de avididad de IgG: aplicaciones

- Marcador serológico de infección primaria (rubéola, EBV)
- Diferenciación de infección primaria y no primaria (herpesvirus, fallo vacunal)
- Exclusión de infección primaria en presencia de IgM durante el embarazo (rubéola, CMV, *Toxoplasma gondii*)

# IgG de baja avididad para la diferenciación de infección primaria y no primaria por VVZ, en presencia of IgM



# IgG de baja avididad para la diferenciación de infección primaria y no primaria por virus parotiditis

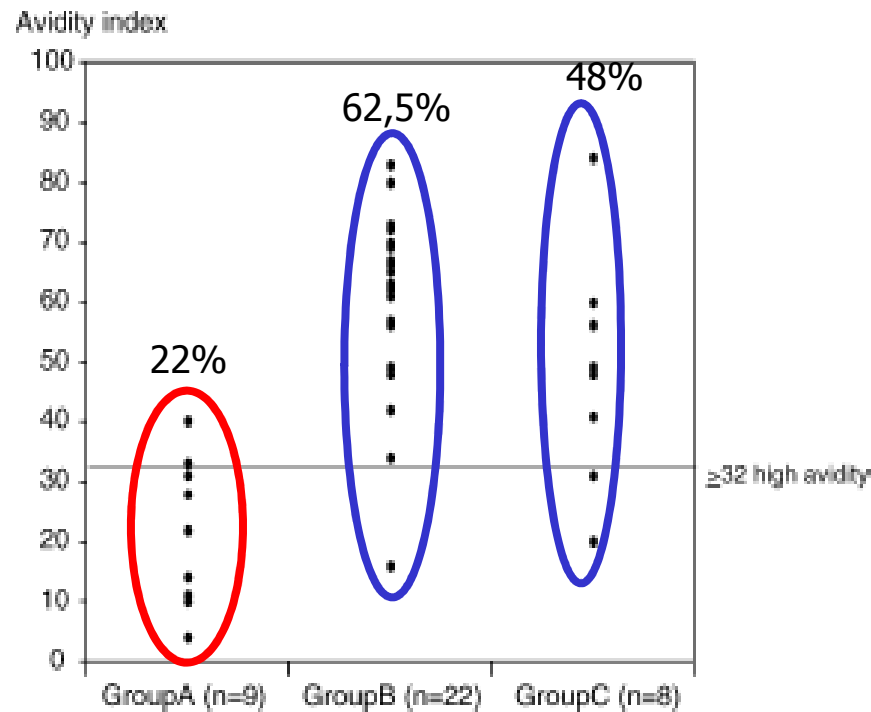


Fig. 1. Distribution of AI results in unvaccinated patients (group A) and in those vaccinated with one or two doses (groups B and C, respectively).

# Ensayos de avididad de IgG: aplicaciones

- Marcador serológico de infección primaria (rubéola, EBV)
- Diferenciación de infección primaria y no primaria (herpesvirus, fallo vacunal)
- Exclusión de infección primaria en presencia de IgM durante el embarazo (rubéola, CMV, *Toxoplasma gondii*)

# Ensayos de avididad de IgG

"hasta el 1% de mujeres embarazadas muestra IgM a rubeola"

	Resultado original	ELISA Indirecto	ELISA de captura	Avididad de IgG
35	Positivo	Positivo	Positivo	<b>ALTA</b>
2	Positivo	Positivo	Positivo	<b>BAJA</b>
14	Positivo	Positivo	Negativo	<b>ALTA</b>
1	Positivo	Positivo	Negativo	nv
19	Positivo	Negativo	Positivo	<b>ALTA</b>
1	Positivo	Negativo	Positivo	<b>BAJA</b>
1	Positivo	Negativo	Positivo	Nv
28	Positivo	Negativo	Negativo	<b>ALTA</b>
101				

Los ensayos de avididad de IgG permiten excluir la infección reciente en muestras recibidas para referencia



# Serología

1. Métodos para diagnóstico
2. Técnicas para detectar anticuerpos
3. Ensayos de IgM y sus problemas
4. Aplicación de marcadores serológicos alternativos
5. Diagnóstico serológico en otras muestras
6. Automatización en serología
7. Ensayos *point-of-care*
8. Validación de ensayos e intercomparaciones

## Diagnóstico serológico en otras muestras

- **Saliva:** útil en niños
- **Sangre seca en papel de filtro:** una vez eluido útil para detección de antígenos y anticuerpos
- **Líquido cefalorraquídeo:** diagnóstico de infección neurológica

# Sangre seca en papel de filtro. Sarampión Equatorial Guinea, 2001



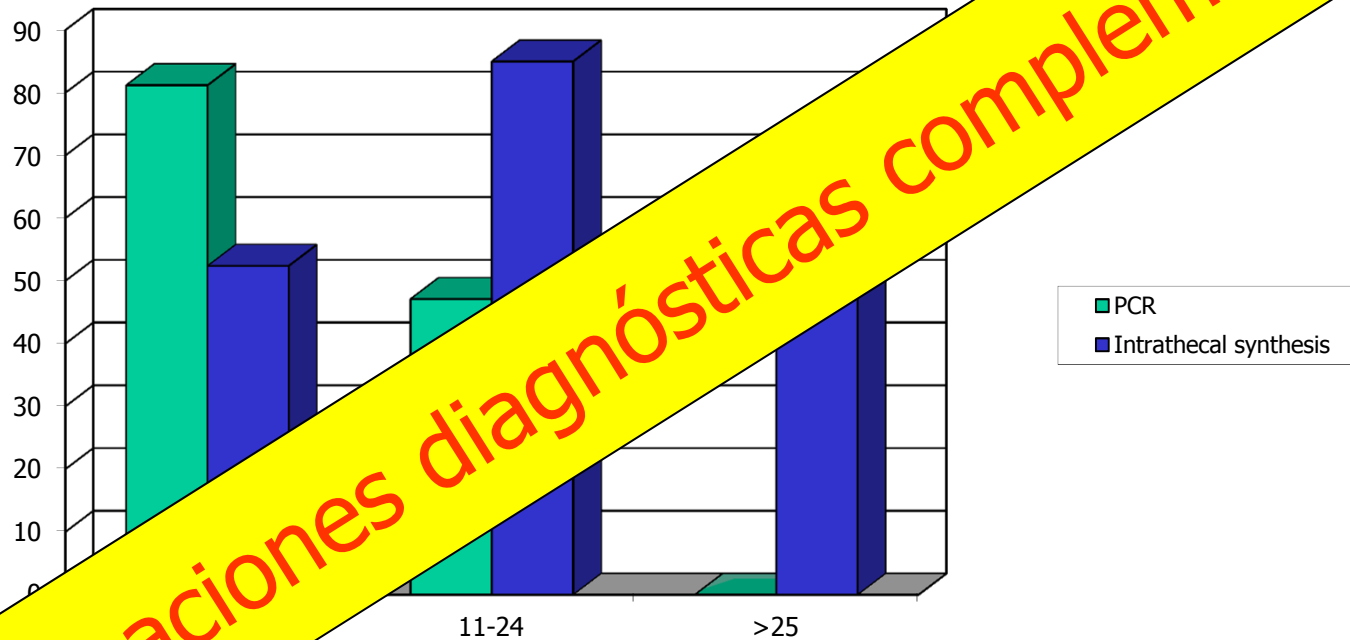
<i>muestra</i>	<i>edad</i>	<i>PCR sar</i>	<i>EIA IgM sar IND</i>	<i>EIA IgM M</i>
<b>1</b>	21 m	Pos	Equiv	
<b>2</b>	3 m	Pos	Pos	
<b>3</b>	unk	Neg	Neg	
<b>4</b>	3 a	Neg		
<b>5</b>	unk	Pos		Pos
<b>6</b>	5 a	Neg		Equiv
<b>7</b>	6 a			NH
<b>8</b>	unk			NH
<b>9</b>			NH	NH
<b>10</b>			Equiv	Equiv
<b>11</b>		Neg	NH	NH
		Pos	Neg	Pos
	m	Neg	Pos	Pos
	5 a	Pos	NH	NH
	4 m	Neg	Pos	Pos
<b>16</b>	1 a	Neg	RNI	Pos
<b>17</b>	7 a	Pos	Neg	Pos
<b>18</b>	7 a	Neg	Neg	Pos
<b>19</b>	9 m	Pos	Equiv	Pos
<b>20</b>	6 m	Neg	NH	Neg
<b>Positive/total (%)</b>		8 /20 (40%)	8/14 (57,1%)	13/15 (86,7%)

Aproximaciones diagnósticas complementarias

# Síntesis intratecal de anticuerpos en meningitis aséptica vírica

Indice		Parotiditis	VZV	TOTAL
Albúmina (I. Alb)	<0,0075	7/12 (58)	14/19 (74)	21/31 (68)
Anticuerpos (I. Ac)	<32	5/12 (42)	5/19 (26)	10/31 (32)
IgG específica/Albúmina	>0,8	10/12 (83)	18/19 (95)	28/31 (90)
IgG específica /IgG	>2,0	9/12 (75)	19/19 (100)	28/31 (87)

# Síntesis intratecal de anticuerpos vs PCR en meningitis por VZV



	Días de evolución		
	<10	11-24	>25
PCR	13/16 (81,2)	8/17 (47,1)	0/3 (0)
I. Ac/Alb	11/21 (52,4)	17/20 (85)	3/6 (50)

# Serología

1. Métodos para diagnóstico
2. Técnicas para detectar anticuerpos
3. Ensayos de IgM y sus problemas
4. Aplicación de marcadores serológicos alternativos
5. Diagnóstico serológico en otras muestras
6. Automatización en serología
7. Ensayos *point-of-care*
8. Validación de ensayos e intercomparaciones

# Automatización en serología



# Automatización en serología

- Estabilidad de la calibración
- Acceso abierto
- Volumen de muestra; detección de muestra
- *Carry over*, puntas desechables
- Rendimiento (número de ensayos/hora)
- Equipamiento preanalítico
- Tamaño
- Panel de ensayos



# Automatización en serología

- **Ventajas:**
  - Aumento de la productividad
  - Reducción en tiempo de respuesta
  - Mejora en la calidad de los procesos
  - Mayor disponibilidad de tiempo
  - Reducción de costes
- **Desventajas:**
  - Marcadores no automatizados
  - Alto volumen de muestra

# Automatización en serología

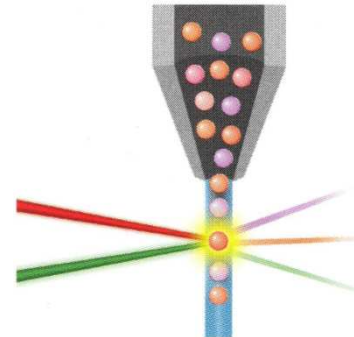
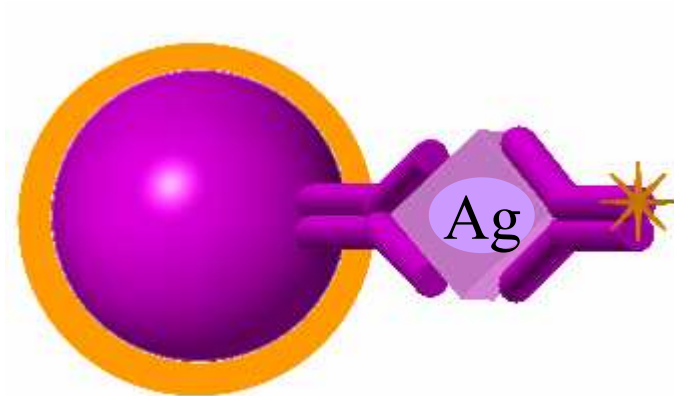
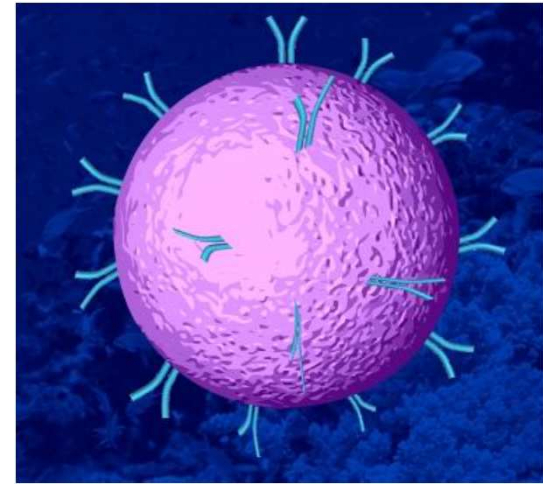
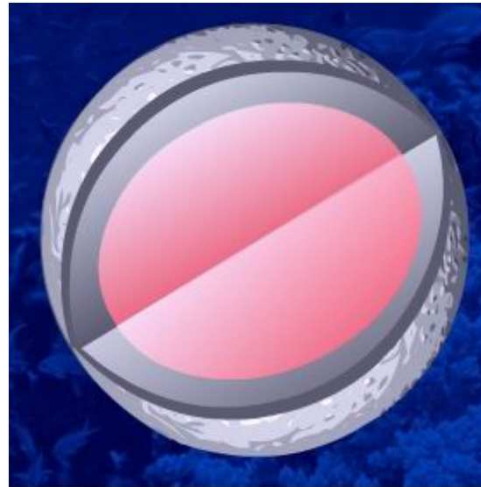
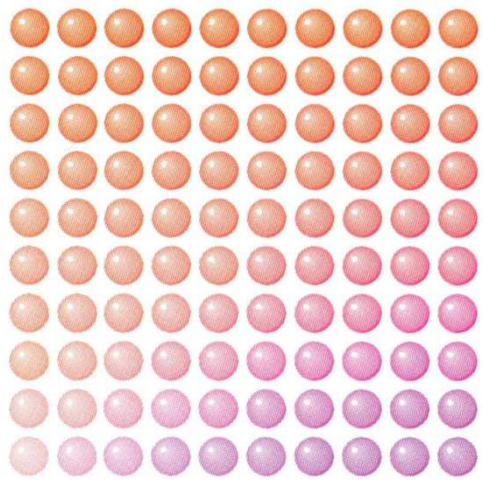
– Arrays en fase sólida. InoDiag



	Sensibilidad	especificidad
<i>C. burnetii</i> IgM	100%	100%
<i>M. pneumoniae</i> IgM	100%	98%
<i>C. pneumoniae</i> y <i>C. psittaci</i> IgG	81%	94%
<i>L. pneumophila</i> IgG	63%	98%
<i>F. tularensis</i> IgG	100%	95%
<i>F. tularensis</i> IgM	100%	100%

# Automatización en serología

- Arrays en suspensión



# Automatización en serología

- Arrays en suspensión

Concordancia de 97.9% (IgM-VCA), 91.4% (IgG-VCA) y 96.9% (EBNA), 94.1% (clasificación de casos)

Para IgG mostró concordancia de 98.7% (*T. gondii*), y 93.3% (rubéola y CMV); para IgM 91.2%, 87.3 y 95.2%

Concordancia de 91.6% (sarampión), 94.2% (parotiditis), 94.4% rubéola, y 91.8% (VZV)

Concordancia para IgG HSV1: AtheNA 94.9%, **BioPlex** 97.8%, y Plexus 97.4%; para IgG HSV2 AtheNA 87.9%, **BioPlex** 97.2%, y Plexus 96.8%

# Serología

1. Métodos para diagnóstico
2. Técnicas para detectar anticuerpos
3. Ensayos de IgM y sus problemas
4. Aplicación de marcadores serológicos alternativos
5. Diagnóstico serológico en otras muestras
6. Automatización en serología
7. Ensayos *point-of-care*
8. Validación de ensayos e intercomparaciones

# Ensayos *point-of-care*



Virus Chikungunya

# Serología

1. Métodos para diagnóstico
2. Técnicas para detectar anticuerpos
3. Ensayos de IgM y sus problemas
4. Aplicación de marcadores serológicos alternativos
5. Diagnóstico serológico en otras muestras
6. Automatización en serología
7. Ensayos *point-of-care*
8. Validación de ensayos e intercomparaciones

# ESEN 2. Armonización de ensayos de VZV para seroepidemiología Ecuaciones de estandarización

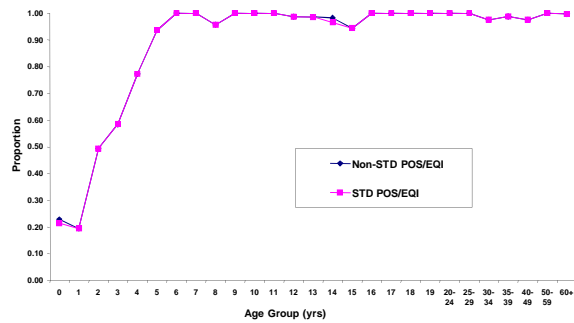
País	Ecuación	R <sup>2</sup>	Rango estandarizado de indeterminación
Belgium	$y=0.13x^2+1.06x-0.07$	0.97	0.04-0.10
England and Wales	$y=0.18x^2+0.92x+1.78$	0.88	0.0008-0.0017
Finland	$y=0.08x^2+0.86x-0.17$	0.97	0.03-0.08
Germany	$y=0.26x^2+1.30x-0.03$	0.95	0.05-0.12
Ireland	$y=0.57x+1.79$	0.91	0.08-0.14
Israel	$y=0.14x^2+1.00x-0.08$	0.95	0.03-0.08
Italy	$y=21x^2+1.18x-0.03$	0.87	0.04-0.10
Luxembourg	$y=0.09x^2+0.90x-0.08$	0.95	0.02-0.08
Netherlands	$y=0.08x^2+0.60x+0.16$	0.92	0.04-0.06
Slovakia	$y=0.08x^2+0.82x-0.39$	0.90	0.03-0.11

\*de Ory et al., 2006.

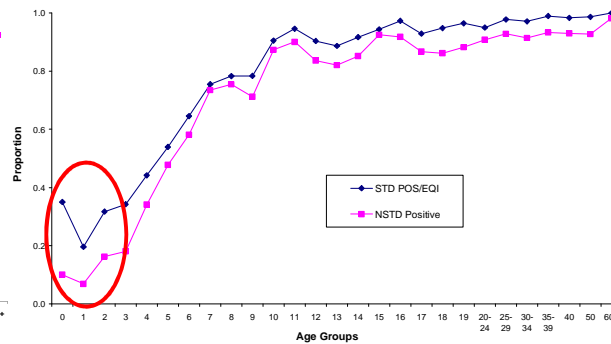


# Impacto de la estandarización en los perfiles de anticuerpos (VZV, Europa)

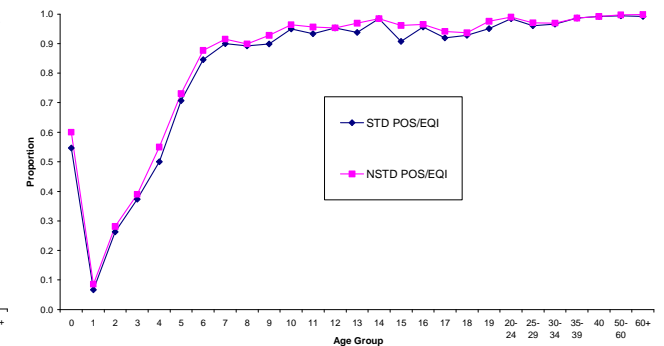
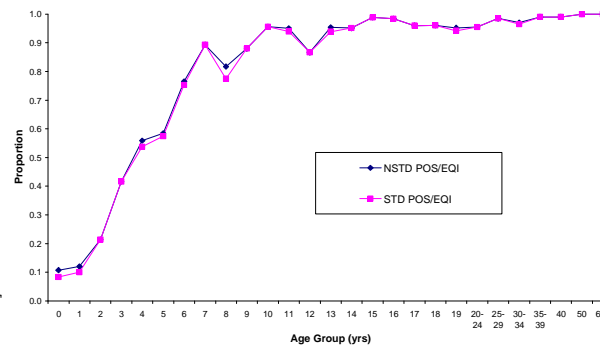
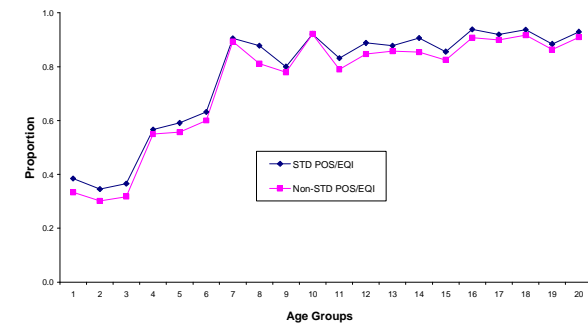
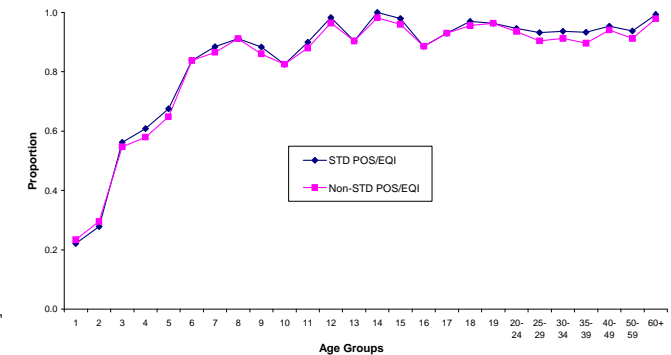
**Países Bajos (Human)**



**Eslovaquia (Euroimmun)**



**Irlanda (DiaMedix)**



**Inglaterra y Gales (DiaMedix)**

**Finlandia (Behring)**

**Alemania (Behring)**

\*de Ory et al., 2006.

# Comparación de ensayos: IgM CMV

- Comparación sobre 173 muestras
- Caracterización de casos por
  - ELISA indirecto (Dade Behring)
  - ELISA de captura (Medac)

Ensayo	Antígenos	Sensibilidad	Especificidad
Axsym CMV	r150, r52, r65 y r38	100%	81,1%
Architect CMV	Nativos y r150, r52	100%	95,3%



Cobo del Hoyo MJ et al 2007



# Comparación de ensayos: *M. pneumoniae*

panel i (casos)	Concordancia	Sensibilidad	Especificidad
ELISA-IgG	97,3%	100%	95,8%
IQL-IgG	97,3%	100%	95,8%
ELISA-IgM	97,3%	92,3%	100%
IQL-IgM	91,9%	76,9%	100%



# Sistemas automáticos para la serología de EBV

## ¿Cuál es el método de elección?

marcador	ensayo	sensibilidad	especificidad	concordancia
IgM	CLIA-L	92,2	93,8	92,8
IgG	CLIA-I	94,4	100	92,8
Anti-EBNA	ELISA	87,5	89,9	89,3



Laboratorios de referencia

# Laboratorios de referencia

- Requeridos por laboratorios clínicos
- Los ensayos de referencia (neutralización, western blot, avidéz de IgG...) no están automatizados
- Se requiere la validación de nuevos ensayos mediante el uso de paneles de muestras bien caracterizadas

Muchas gracias

XXIX SEMINARIO INTERNACIONAL DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

# Nuevas técnicas en el diagnóstico serológico de las infecciones

Hospital de la Princesa, 25 octubre 2012

Fernando de Ory  
[fory@isciii.es](mailto:fory@isciii.es)

