



Descripción de las pruebas de los laboratorios R.E.D.

CATÁLOGO EN LÍNEA : <https://catalog.redlabs.be/en/>

I. Pruebas para detectar disfunciones inmunológicas y metabólicas

(General - Immunity request form)

Expresión de las citoquinas

- Una de las principales vías de investigación ha sido la medición en sangre de las señales inmunitarias conducidas por las citoquinas.
- En estudios en animales, la administración de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1, TNF- α , e IL-6) directamente en el cerebro puede inducir "comportamientos de enfermedad" que se asemejan mucho a los síntomas del CFS. En particular, la disminución de la actividad motora, la alteración de la ingesta de alimentos y agua, el sueño y la cognición se han relacionado con el aumento de los niveles de IL-1b, IL-6 y TNF- α [Dantzer et al. Nat Rev Neurosci 2008].
- En los seres humanos, las citoquinas pro-inflamatorias administradas sistémicamente, como IL-6 y TNF- α típicamente inducen una respuesta inflamatoria sistémica.
- Las células inmunitarias Th1 y Th2 producen y liberan citoquinas que desencadenan un efecto dominó que conduce a una reacción inmunitaria.
- Las citoquinas liberadas por Th1 son: IL-2, IL-12, INF γ , INF α e INF β
- Las citoquinas liberadas por Th2 son: IL-4, IL-5, IL-10
- Las citoquinas Th1 suprimen las citoquinas Th2 y viceversa.
- Si el patógeno es derrotado, el sistema inmunitario vuelve a un equilibrio entre Th1 y Th2. Lamentablemente, algunas afecciones implican la activación o supresión crónica de una de las dos categorías.
- Una vez presentes en el cuerpo, las biotoxinas comienzan a desencadenar una compleja cascada de acontecimientos bioquímicos. La biotoxina se une a los receptores de superficie (receptores Toll y muchos más) en casi todos los tipos de células del cuerpo. Este reconocimiento y unión de la biotoxina provoca un aumento continuo de múltiples vías inflamatorias, incluyendo la producción de citoquinas y TGF Beta-1. Las citoquinas, a su vez, se unen a sus receptores, provocando la liberación de MMP9 en la sangre. En el cerebro, las citoquinas se unen al receptor de la leptina,

impidiendo su función normal en el hipotálamo. El receptor de leptina bloqueado ya no creará el inicio de los pasos que conducen a la producción de la hormona estimulante de los melanocitos alfa (MSH). Las citoquinas elevadas pueden producir muchos síntomas diferentes, entre ellos: dolor de cabeza, dolor muscular, temperatura inestable y dificultad para concentrarse. Los niveles elevados de citoquinas también pueden dar lugar a un aumento de los niveles de compuestos importantes como el I-1 y los factores de coagulación, tal y como muestra el perfil de von Willebrand.

- Ashwood y otros (BrainBehav Immun. 2011) informaron sobre aumentos significativos en los niveles plasmáticos de varias citoquinas, incluyendo IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-12p40 en el grupo ASD (trastornos del espectro autista) en comparación con los controles.

- Suzuki y cols. (PLoS One 2011) informaron que las concentraciones plasmáticas de IL-1 β , IL-1RA, IL-5, IL-8, IL-12(p70), IL-13, IL-17 y GRO- α fueron significativamente mayores en sujetos con TEA en comparación con los valores correspondientes de los controles coincidentes.

- Okada et al (Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2007) y Ashwood et al (J Neuroimmunol. 2008) informaron sobre la disminución de los niveles séricos de factor de crecimiento transformante beta1 (TGF β 1) en pacientes con autismo, con niveles más bajos de TGF β 1 asociados con conductas adaptativas más bajas y síntomas conductuales más graves, lo que sugiere que las respuestas inmunitarias en el autismo pueden estar reguladas de forma inapropiada debido a las disminuciones en TGF β 1.

- Al-Ayadhi LY1, Mostafa GA - J Neuroinflamación. 2012 9:158, informaron de que los niños con autismo tenían niveles de IL-17A en suero significativamente más altos que los controles sanos (P <0,001), encontrándose un aumento de los niveles de IL-17A en suero en el 48,9% del grupo con autismo.

- Los pacientes con autismo severo tenían niveles séricos de IL-17A significativamente más altos que aquellos con autismo leve a moderado (P=0.01), y los niveles séricos elevados de IL-17A fueron significativamente más comunes en niños con autismo severo (67.9%) que en aquellos con autismo leve a moderado (17.6%), P=0.001.

- Los niveles de IL-17A en suero se elevaron en el grupo con autismo, y los niveles se correlacionaron significativamente con la gravedad del autismo

- Se justifica la realización de más investigaciones para determinar si el aumento de los niveles séricos de IL-17A en plasma tiene un papel patogénico en el autismo, y si la terapia contra la IL-17A podría ser útil.

Nuestras publicaciones:

- Khaiboullina SF, DeMeirleir KL, Rawat S, Berk GS, Gaynor-Berk RS, Mijatovic T, Blatt N, Rizvanov AA, Young SG, Lombardi VC. Cytokine expression provides clues to the pathophysiology of Gulf War illness and myalgic encephalomyelitis. Cytokine. 2015 Mar;72(1):1-8. doi: 10.1016/j.cyto.2014.11.019.
- Metzger K, Frémont M, Roelant C, De Meirleir K. Lower frequency of IL-17F sequence variant (His161Arg) in chronic fatigue syndrome patients. Biochem Biophys Res Commun. 2008 Nov 7;376(1):231-3. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.08.135.
- Nijs J, Van Oosterwijck J, Meeus M, Lambrecht L, Metzger K, Frémont M, Paul L. Unravelling the nature of postexertional malaise in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: the role of elastase, complement C4a and interleukin-1beta. J Intern Med. 2010 Apr;267(4):418-35. doi: 10.1111/j.1365-2796.2009.02178.x.
- Chris Roelant and Kenny De Meirleir. Self-test monitoring of the Th1/Th2 balance in health and disease with special emphasis on chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis. Journal of Medical Laboratory and Diagnosis Vol. 3(1), pp. 1- 6, February 2012.

➤ Pruebas para la evaluación de la expresión de citoquinas :

o Basado en suero : CYTS (combinación IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF, TGF-b1, MIP-1b, MCP1), IL-17, IL-8, VEGF, TGF-b1,

o Basado en ARN: CYTI (combinación de IL-6,IL-8,IL-10,TNF,TGF-b1,MIP-1bmRNA); CYTH (citoquinas Th1/Th2 (IL 2,IL-4, IFN γ mRNA ratio)

o Prueba de equilibrio de orina Th1/Th2 (ver abajo)

Examen de equilibrio de orina Th1/Th2

La prueba de balance de orina tiene como objetivo detectar alteraciones en el balance de Th1/Th2. La prueba permite a los pacientes y a los médicos realizar un seguimiento del equilibrio Th1/Th2 durante la terapia y evaluar si el tratamiento es realmente efectivo. Además, la prueba también proporciona una herramienta para comprobar la eficacia de los productos de venta libre que afirman equilibrar el estado de Th1/Th2, tales como: antioxidantes, probióticos y otros. Hasta ahora, los perfiles Th1/Th2 sólo se pueden determinar en laboratorios especializados con análisis de sangre prácticamente difíciles de realizar repetidamente en períodos cortos de tiempo.

- puede detectar a tiempo perturbaciones de este delicado equilibrio para restablecerlo siempre que sea necesario y antes de que se desarrollen condiciones irreversibles
- permite a los pacientes hacer un seguimiento del equilibrio Th1/Th2 durante la terapia (antioxidantes, probióticos, nutracéuticos).
- es una autoprueba, por favor contáctenos para pedir el kit

Prueba ELISA de prostaglandina E2 en suero (PGE2)

La PGE2 es un compuesto derivado de los fosfolípidos de membrana.

La PGE2 es también un mediador clave de la inmunopatología en las infecciones crónicas y el cáncer.

La PGE2 aumenta su propia producción pero suprime los mediadores inflamatorios agudos, lo que da lugar a su predominio en las fases tardías/crónicas de la inmunidad.

La PGE2 suprime selectivamente las funciones efectoras de macrófagos y neutrófilos y la inmunidad de tipo 1 mediada por células Th1, CTL y NK, pero promueve las respuestas de células Th2, Th17 y T reguladoras.

La PGE2 modula la producción de quimiocinas, inhibiendo la atracción de células proinflamatorias y potenciando al mismo tiempo la acumulación local de células T reguladoras y células supresoras derivadas de los mieloides.

La prostaglandina E2 (PGE2) se ha encontrado como significativamente mayor en los pacientes autistas, registrando un aumento del 91,15% (El-Ansary & Al-Ayadhi, *Lipids Health Dis.* 2012).

- Furuyashiki, T. & Narumiya, S. Stress responses: the contribution of prostaglandin E2 and its receptors. *Nat. Rev. Endocrinol.* doi:10.1038/nrendo.2010.194.
- Narumiya S, Furuyashiki T. Fever, inflammation, pain and beyond: prostanoid receptor research during these 25 years. *FASEB J.* 2011 Mar;25(3):813-8. doi: 10.1096/fj.11-0302ufm. Review.

Proteína C reactiva de alta sensibilidad (hs-CRP)

La proteína C reactiva (PCR) es un biomarcador de inflamación. Las concentraciones plasmáticas de PCR aumentan rápida y drásticamente (100 veces o más) en respuesta a una lesión tisular o una inflamación. La PCR de alta sensibilidad (PCR-as) es más precisa que la PCR estándar cuando se miden las concentraciones de referencia (es decir, normales) y permite medir la inflamación crónica.

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria y la PCR-as ha sido aprobada por múltiples directrices como biomarcador del riesgo de enfermedad cardiovascular aterosclerótica.

Ensayo de expresión de perforina (PERF)

Las células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés) son células citotóxicas que median la respuesta inmunológica contra ciertas células infectadas por el cáncer y los virus. Las células NK se encuentran normalmente en la sangre periférica y se clasifican por sus marcadores de superficie celular, como las células CD3-/CD56+.

La actividad de las células NK se altera en varios trastornos como la esclerosis múltiple, el lupus y el SFC. La actividad es muy sensible a diversos contaminantes ambientales. Dado que las células NK tienen un papel importante en la defensa contra los virus, la disminución de la actividad de NK puede llevar al desarrollo de infecciones virales oportunistas. Las células NK ejercen su efecto citotóxico liberando perforina. La perforina es una proteína que destruye la membrana citoplasmática de las células diana y finalmente las mata. La expresión de ARNm perforina puede ser medida como un medio para evaluar la activación de las células NK.

Ensayo de expresión de elastasa (ELAS)

La elastasa es una proteasa inflamatoria que se expresa en las células inmunitarias. La elastasa contribuye a la defensa inmunitaria al inactivar las bacterias extrañas, pero causa daño al tejido conectivo y descompone las citoquinas, las inmunoglobulinas y los receptores de las células inmunitarias al mismo tiempo. Por lo tanto, una producción excesiva y crónica de elastasa es perjudicial. La expresión de ARNm puede ser cuantificada como un marcador específico de inflamación.

- Nijs J, Van Oosterwijck J, Meeus M, Lambrecht L, Metzger K, Frémont M, Paul L. Unravelling the nature of postexertional malaise in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: the role of elastase, complement C4a and interleukin-1beta. *J Intern Med.* 2010 Apr;267(4):418-35. doi: 10.1111/j.1365-2796.2009.02178.x.

- Morrison TB1, Weis JH, Weis JJ. Borrelia burgdorferi outer surface protein A (OspA) activates and primes human neutrophils. *J Immunol.* 1997 May 15;158(10):4838-45.

CD57+/CD3- recuento absoluto de células

Las células CD57+/CD3- son un subconjunto de células NK. Su función exacta no se conoce bien, pero las diferencia de las células NK CD56+. El número absoluto de células CD57+/CD3- es bajo en los pacientes que padecen la enfermedad de Lyme crónica [Stricker et al. 2001]. Los pacientes con un número muy bajo de CD57 tienen significativamente más coinfecciones y defectos inmunológicos persistentes que los pacientes con recuentos más altos. En los pacientes que responden a la terapia antibiótica, el número de células vuelve a la normalidad. Por lo tanto, este es un marcador útil para seguir el efecto de la terapia.

Nuestro estudio (Siniscalco et al, In Vivo 2016) mostró que sobre 107 pacientes autistas inscritos, 73 (68,2%) de ellos mostraron CD57 por debajo de 100 células/μl de sangre total (media±SE 49,12±3,12), y entre ellos 47 (64,4%) pacientes mostraron CD57 por debajo del límite inferior del rango normal (el rango normal se considera 60-360 células/μl de sangre total).

sCD14 en suero soluble (sCD14)

El CD14 se expresa en los monocitos/macrófagos y tiene un papel fundamental en el reconocimiento de los componentes de la pared celular bacteriana (LPS). La parte extracelular de CD14 puede escindir y liberarse en el plasma. Allí inactivará los LPS circulantes. Los niveles de CD14 soluble en suero están significativamente elevados en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal y enfermedad de Crohn. En los pacientes que padecen brucelosis o la enfermedad de Lyme estos niveles también son significativamente elevados.

Prueba ELISA C3A y C4A en suero

La C3A es una de las proteínas formadas por la escisión del componente 3 del complemento. Aunque tradicionalmente se creía que tenía una función estrictamente proinflamatoria, investigaciones recientes han demostrado que el C3a también puede actuar contra el C5a para desempeñar una función antiinflamatoria. Además, la migración y la degranulación de los neutrófilos pueden suprimirse en presencia de C3a.

C4A es una anafilatoxina generada por la escisión del componente 4 del complemento (C4) al activarse el sistema de componentes. El aumento de C4a provoca una respuesta inflamatoria local y síntomas de hipersensibilidad. Los niveles de C4a están elevados tras el ejercicio en pacientes con SFC.

Tanto el C3A como el C4A fueron identificados como actores principales en la vía de la biotoxina del CIRS (Síndrome de Respuesta Inmune Crónica) - el sistema del complemento se activa crónicamente dando lugar a altos niveles de C4A y C3A.

Un estudio estadounidense (Shoemaker et al., Int Arch Allergy Immunol 2008;146:255-261) había informado de que los niveles elevados de C3A y C4A del complemento son marcadores tempranos de la enfermedad de Lyme en pacientes picados por garrapatas.

- Stricker RB, Savely VR, Motanya NC, Giclas PC. Complement split products c3a and c4a in chronic lyme disease. Scand J Immunol. 2009 Jan;69(1):64-9. doi: 10.1111/j.1365-3083.2008.02191.x.

- Nijs J, Van Oosterwijck J, Meeus M, Lambrecht L, Metzger K, Frémont M, Paul L. Unravelling the nature of postexertional malaise in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: the role of elastase, complement C4a and interleukin-1beta. J Intern Med. 2010 Apr;267(4):418-35. doi: 10.1111/j.1365-2796.2009.02178.x.

Examen ELISA del VEGF en suero

El VEGF tiene un gran papel en las condiciones patológicas que se asocian a las enfermedades autoinmunes, como en el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide y la esclerosis múltiple.

Los niveles séricos de VEGF se correlacionan con la actividad de la enfermedad en un gran número de enfermedades autoinmunes y disminuyen con el uso de la terapia estándar.

Posibles estrategias terapéuticas futuras en las enfermedades autoinmunes con el (receptor) anti-VEGF o anti-VEGFR. Hasta ahora, esta terapia se ha utilizado en el cáncer y la degeneración ocular macular en la diabetes.

Niveles anormalmente altos de VEGF en un entorno sin moho sugerirían una infección por Bartonella.

El VEGF puede bajar en presencia de mohos en el interior.

El VEGF también se identificó como actor principal en la vía de las biotoxinas del CIRS (Síndrome de Respuesta Inmune Crónica). Los niveles elevados de citoquinas en los capilares atraen a los glóbulos blancos, lo que provoca una restricción del flujo sanguíneo y una disminución de los niveles de oxígeno en los tejidos (hipoperfusión capilar). La reducción del VEGF provoca fatiga, calambres musculares y dificultad para respirar.

- Kempf VA, Volkman B, Schaller M, Sander CA, Alitalo K, Riess T, Autenrieth IB. Evidence of a leading role for VEGF in Bartonella henselae-induced endothelial cell proliferations. Cell Microbiol. 2001 Sep;3(9):623-32.

- Cerimele F, Brown LF, Bravo F, Ihler GM, Kouadio P, Arbiser JL. Infectious angiogenesis: Bartonella bacilliformis infection results in endothelial production of

angiopoietin-2 and epidermal production of vascular endothelial growth factor. Am J Pathol. 2003 Oct;163(4):1321-7.

- Schulte B, Linke D, Klumpp S, Schaller M, Riess T, Autenrieth IB, Kempf VA. Bartonella quintana variably expressed outer membrane proteins mediate vascular endothelial growth factor secretion but not host cell adherence. Infect Immun. 2006 Sep;74(9):5003-13.

Ensayo de actividad de la nagalasa (NAGA)

Nuevo método implementado para la medición de pacientes Nagalase, reportado como NAGAnew. Presenta una medición mejorada de la nagalasa que diferencia la actividad de la nagalasa libre, la cantidad de nagalasa no activa y la cantidad total de nagalasa (libre más ligada).

Los valores del nuevo método de medición de la Nagalase son diferentes de los que se han comunicado anteriormente y los límites normales (P10 - P90) son diferentes de los que se han comunicado anteriormente (nueva evaluación basada en sueros de personas sanas normales) que deben compararse con la distribución de los valores observados en diferentes tipos de pacientes (cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de páncreas...) El uso de estos 3 parámetros y su aumento en la sangre puede utilizarse como un valor diagnóstico y pronóstico para un determinado tipo de cáncer en cada paciente. Su valor puede ser determinado. El coste de este conjunto de análisis se cargará al equivalente del antiguo conjunto de parámetros. Se establece un precio separado para la determinación de los niveles del complejo Nagalase-GcMAF.

En la antigua prueba NAGALASE el nivel aparente de Nagalase representa la actividad enzimática de la nagalase determinada en suero diluido con un sustrato específico derivado de umbeliferilo, pero el método analítico es una medición cinética. En el nuevo método llamado Nagalase libre también utilizamos el mismo sustrato derivado de umbeliferilo para la Nagalase, pero el método de determinación es una medición de punto final que hace que la prueba sea más robusta y menos propensa a las interferencias. En el método antiguo, la calibración se basaba en un grupo de más de 300 donantes de suero, mientras que en el nuevo método la calibración se basa en la señal de una cantidad exacta basada en el peso del producto final del sustrato convertido, es decir, umbeliferona. Este enfoque de la calibración y el método de punto final de la medición hacen que la determinación sea más estable y robusta. En el nuevo método el rango se ha determinado de nuevo sobre una población de más de 300 controles sanos normales y, como era de esperar, este rango se sitúa más bajo que en el método anterior. Esto concuerda con los valores medianos obtenidos en donantes sanos normales para ambos métodos, es decir, 0,73 para el método antiguo y 0,43 para el nuevo método.

Para el ítem nagalasa efectiva (antiguo) y nagalasa total (nuevo) estos dos ítems tienen como objetivo dar una idea de la cantidad total de nagalasa en circulación, es decir, la nagalasa libre (medida directamente a través de su actividad enzimática) más la nagalasa ligada circulante (enzimáticamente inactiva o bloqueada).

Para estos parámetros observaremos mayores diferencias entre el viejo y el nuevo método. En el antiguo método la nagalasa efectiva se derivó de un cálculo basado en los niveles de Nagalasa libre y la Gc-globulina, en el nuevo método la nagalasa total (libre + bloqueada) se precipita desde el suero, se convierte en enzima activa enzimáticamente y se mide como contenido total de Nagalasa en el suero. Los rangos normales y los valores de la mediana en ambos métodos se determinaron en una población de control sana normal de 300 controles sanos normales. Por razones de comparación se puede aplicar el principio de las proporciones del resultado antiguo vs. el valor mediano de la población normal, es decir, el valor antiguo sobre 1.03 (mediana del método antiguo), vs. la proporción del valor del nuevo método sobre 1.44 (mediana del nuevo método), y luego la proporción de los 2 valores obtenidos.

Además del conjunto de parámetros mencionados anteriormente, se ha desarrollado un parámetro totalmente nuevo para tener una idea de la respuesta de la respuesta inmune innata. La respuesta inmune innata del paciente es modulada por la actividad de un macrófago, un monocito y una célula dendrítica. Esta actividad se estimula a través de un factor activador de macrófagos, es decir, Gc-MAF, que se produce en una concentración muy baja en la sangre. Además, este Gc-MAF se elimina inmediatamente después de su unión a la Nagalasa y la unión a los macrófagos, monocitos y células dendríticas que se activan. Hasta ahora nadie ha sido capaz de medir el Gc-MAF libre en suero o plasma. Sin embargo, aparte de la captura celular de Gc-MAF este factor activador también se elimina de la sangre como un complejo estable con la enzima Nagalase y la cantidad de este complejo Nagalase-GcMAF es un parámetro adicional para monitorear la defensa inmune innata. Si hay una invasión a través de las células cancerosas, aparentemente hay un sistema inmunológico innato defectuoso debido a una baja producción de Gc-MAF de su precursor Gc-globulina. Una disminución en la circulación del complejo Gc-MAF es un marcador de un sistema inmunológico innato defectuoso y puede ser utilizado para el diagnóstico del cáncer y para monitorear la terapia contra el cáncer con suplementos similares al Gc-MAF. Este conjunto adicional de parámetros se facturará por separado cuando el médico solicite esta prueba.

El método para la determinación de la glóbula Gc se ha cambiado de la turbidimetría a un método ELISA. Sin embargo, la calibración de ambas pruebas ha permanecido igual y el estándar en ambos métodos se basa en un pool de sueros que incluye más de 300 sueros de personas normales de control sanas. Los rangos normales para la versión de prueba anterior y la nueva versión de prueba se han basado en los valores de percentil P10 (límite inferior) y P90 (límite superior) de los sueros de más de 300 controles sanos normales. El valor mediano de esta población normal cambió ligeramente de 420,71 mg/L (método antiguo) a 451,03 para el nuevo método (ELISA). La globulina Gc se sintetiza principalmente en el hígado y se puede esperar una variación fisiológica en función del tiempo y de la función hepática. Sólo si la glóbula Gc tiende a disminuir continuamente puede ser una indicación de una disminución de la función hepática que finalmente conduce a la insuficiencia hepática. Sin embargo, sólo en niveles

6

inferiores a 100mg/L existe un peligro agudo de insuficiencia hepática. A niveles por encima de 300mg/L no hay ciertamente ninguna razón para admitir que el nivel de este precursor debe influenciar la síntesis normal de Gc-MAF y afectar el sistema inmunológico innato.

El valor de DPP4 se sigue proporcionando, y el método sigue siendo el mismo. DPP4 es un marcador de activación de células T presente en muchas células inmunes, pero éstas aumentan con la activación inmunológica. Parte de la DPP4 ligada a la membrana puede ser eliminada en el plasma/suero donde se mide. Un aumento del valor de Dpp4 debe asociarse con una activación inmune de diferente origen (infección, inflamación, autoinmunidad, etc.). Los niveles bajos de DPP4 se han asociado con el síndrome de fatiga crónica y ciertos tumores pueden desprender cantidades muy altas de DPP4 en el suero.

Así, los nuevos formularios de solicitud indican 2 paneles Nagalase:

NAGAnew1, mostrando Nagalase total, Nagalase libre, Nagalase ligada y DPP4.

NAGAnew2, que muestra 6 parámetros (total, libre, nagalasa ligada, complejo Nagalase-GcMAF, proteína Gc y DPP4).

Prueba ELISA S100B en suero

S100B es un marcador de lesión cerebral, enfermedades neurológicas crónicas y activación glial. S100B es un péptido fijador de calcio y se utiliza como parámetro de activación glial y/o muerte en muchos trastornos del sistema nervioso central (SNC). Desempeña un papel importante en el desarrollo normal del SNC y en la recuperación después de una lesión. Aunque el S100B se encuentra principalmente en células astrogliales y de Schwann, también tiene fuentes extracerebrales. S100B es un útil marcador neurobioquímico de daño cerebral, como en el paro circulatorio, el derrame cerebral y la lesión cerebral traumática. S100B se asoció con la electrosensibilidad. El S100B también está asociado con enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer u otras enfermedades neurológicas crónicas.

Prueba ELISA de alfa-MSH en suero (a-MSH)

La hormona estimulante de los melanocitos (alfa-MSH) es un neuropéptido regulador de importancia crítica. Se produce en el hipotálamo, una zona del cerebro importante para el control hormonal del cuerpo, y donde el sistema nervioso se une al sistema endocrino. Es probable que también se produzcan pequeñas cantidades en otras partes del cerebro.

La a-MSH es baja en el Síndrome de Respuesta Inflamatoria Crónica (CIRS), un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica aguda y crónica adquirida tras la exposición al ambiente interior de un edificio dañado por el agua con organismos toxigénicos residentes, así como compuestos orgánicos volátiles. En el CIRS, los receptores de leptina bloqueados ya no crean el inicio de los pasos que conducen a la producción de a-MSH. La reducción de la producción de MSH da lugar a otra serie de problemas y síntomas. La producción de melatonina se reduce lo que resulta en problemas de sueño. La producción de endorfinas se suprime, lo que conduce a un dolor crónico y a veces inusual. La falta de MSH puede causar malabsorción o "intestino permeable", lo que debilita y desregula aún más el sistema inmunitario. Los glóbulos blancos acaban perdiendo la regulación de la respuesta de las citoquinas, por lo que pueden aparecer infecciones oportunistas o la recuperación de las infecciones es más lenta. Un nivel bajo de a-MSH puede hacer que los estafilococos resistentes (MARCoNS) sobrevivan en la biopelícula de las membranas mucosas.

Prueba ELISA de péptidos activos vasointestinales en suero (VIP)

El VIP es un importante regulador de la motilidad intestinal humana. El VIP actúa como mediador neuroendocrino en condiciones fisiológicas, con un importante papel en la secreción de agua y electrolitos en el intestino. Esta hormona cerebral/intestinal tiene una amplia distribución y está presente en los cuerpos celulares neuronales localizados en el sistema nervioso central, los tractos digestivo, respiratorio y urogenital, las glándulas exocrinas y las glándulas tiroideas y suprarrenales. El VIP tiene una amplia gama de acciones biológicas. Los principales efectos del VIP incluyen la relajación del músculo liso (dilatación bronquial y vascular), la estimulación de la secreción gastrointestinal de agua y electrolitos y la liberación de hormonas pancreáticas. El aumento de los niveles plasmáticos de VIP provoca una diarrea secretora grave. Los tumores productores de VIP (VIPomas) son raros; la mayoría (90%) se localizan en el páncreas. La diarrea acuosa, la hipopotasemia y la aclorhidria son los síntomas principales.

Cuando se trata de CIRS (mohos, biotoxinas), el VIP apoya los niveles hormonales saludables, trabaja para limitar la inflamación, regula el sistema inmunológico y ayuda al cerebro a sanar. Dado el impacto sistémico del VIP, no es de extrañar que cuando el VIP baja (<25 pg/mL), como ocurre en cerca del 91% de los pacientes con CIRS, la gente se siente mal en muchos niveles. El Dr. Shoemaker utiliza sprays de VIP en sus pacientes (para aumentar los niveles de VIP).

Examen ELISA MMP-9 en suero

La MMP-9 transporta elementos inflamatorios de la sangre a los tejidos sensibles y puede combinarse con la PAI-1 para aumentar la formación de coágulos y la obstrucción arterial.

La MMP-9, junto con la elastasa, parece ser un factor regulador de la migración de neutrófilos a través de la membrana basal.

La MMP-9 desempeña varias funciones importantes dentro de la acción de los neutrófilos, como la degradación de la matriz extracelular, la activación de la IL-1 β y la escisión de varias quimiocinas. La MMP-9 puede desempeñar un papel importante en la angiogénesis y la neovascularización. Se ha descubierto que la MMP-9 está asociada a numerosos procesos patológicos, como el cáncer, la malaria placentaria y las enfermedades inmunológicas y cardiovasculares. Se pueden encontrar niveles elevados de MMP-9 en los casos de artritis reumatoide e isquemia cerebral focal. Una de las patologías más asociadas a la MMP-9 es la relación con el cáncer, debido a su papel en la remodelación de la matriz extracelular y la angiogénesis.

La MMP-9 es un buen marcador de la presencia de un exceso de producción de citoquinas de cualquier enfermedad inflamatoria.

En la enfermedad de Lyme, los niveles de MMP-9 pueden dispararse como resultado del tratamiento con antibióticos, y la consiguiente muerte bacteriana en lo que comúnmente se conoce como reacción de Herxheimer.

CD38 ELISA en suero

El CD38, que desempeña un papel importante en la quimiotaxis de las células dendríticas (CD) y la migración a los ganglios linfáticos, fue fuertemente regulado por el LPS, pero prácticamente no por la *Borrelia garinii* (que induce principalmente la neuroborreliosis). La *Borrelia garinii* puede afectar a las funciones cruciales de las DC al bloquear la regulación al alza de moléculas importantes en la migración de las DC a los ganglios linfáticos, afectando así a las respuestas inmunitarias posteriores en la infección por borreliosis de Lyme (Hartiala et al. 2007). Además, para determinar si la incapacidad de *B. garinii* para inducir la expresión de CD38 estaría relacionada también con otras genoespecies de *B. burgdorferi*, Hartiala y sus colegas (J Immunol. 2010) estimularon las DC con *B. burgdorferi* sensu stricto y *B. afzelii*. Ninguna de estas genoespecies de *Borrelia* indujo la regulación de CD38. Por lo tanto, los niveles bajos de CD38 podrían indicar una infección por *Borrelia*. Así, los niveles bajos de CD38 apuntarían a una infección por *Borrelia*, mientras que los niveles altos de

CD38 sugerirían otra(s) infección(es) por bacterias Gram (-).

Prueba ELISA de ácido kinurénico en suero (KYNA)

El ácido cinurénico (KYNA) es un metabolito del triptófano formado enzimáticamente a lo largo de la vía de la cinurenina. El primer paso de la vía es catalizado por la triptófano 2, 3-dioxigenasa (TDO) y la indoleamina 2, 3-dioxigenasa (IDO), enzimas responsables de la degradación del triptófano a formilcinurenina. La TDO se expresa principalmente en el hígado y la IDO es una enzima extrahepática inducible por citoquinas. El siguiente paso en la síntesis de la cinurenina es catalizado por la formilcinurenina formamidasa. El principal producto final del catabolismo de la cinurenina es la nicotinamida adenosina dinucleótido (NAD⁺). Otro producto biológicamente activo, el KYNA, es generado a partir de la cinurenina por la cinurenina aminotransferasa.

Se han realizado numerosos estudios para investigar el papel del KYNA en la fisiología y la patología del sistema nervioso central (SNC). Dado que tanto la concentración de KYNA en el cerebro humano como la penetración de KYNA a través de la barrera hematoencefálica son bajas, los estudios de KYNA periférico ganaron popularidad. Las investigaciones han señalado la realidad de que el ácido cinurénico es el componente clave del disparo de las neuronas dopaminérgicas, y cuando sus niveles son demasiado elevados en el sistema nervioso central, pueden prevalecer los estados neuropáticos e incluso la desorientación.

El ácido cinurénico contribuye a la patogénesis de la esquizofrenia y vincula la hipótesis de la dopamina en la esquizofrenia con la idea de una deficiencia en la función glutamatérgica en esta enfermedad. El ácido cinurénico actúa en el cerebro como un antagonista del NMDA del sitio de la glicina, clave en el sistema de neurotransmisión glutamatérgica, que se cree que está implicado en la fisiopatología y la patogénesis de la esquizofrenia. Se han identificado niveles elevados de ácido cinúrico en pacientes que padecen encefalitis transmitida por garrapatas, esquizofrenia y enfermedades relacionadas con el VIH. En todas estas situaciones, el aumento de los niveles se asoció con confusión y síntomas psicóticos.

Examen ELISA de ácido quinolínico en suero (QUINO)

El ácido quinolínico es un producto derivado de la vía de la cinurenina, que metaboliza el aminoácido triptófano. Actúa como agonista del receptor NMDA. El ácido quinolínico tiene un potente efecto neurotóxico. Los estudios han demostrado que el ácido quinolínico puede estar implicado en muchos trastornos psiquiátricos, procesos neurodegenerativos en el cerebro, así como en otros trastornos.

Dentro del cerebro, el ácido quinolínico sólo es producido por la microglía y los macrófagos activados. Los niveles de ácido quinolínico aumentan en los cerebros de los niños infectados con una serie de infecciones bacterianas del sistema nervioso central (SNC), de los pacientes con poliovirus y de los pacientes con enfermedad de Lyme con afectación del SNC. Además, se han encontrado niveles elevados de ácido quinolínico en pacientes con lesiones traumáticas del SNC, pacientes que sufren deterioro cognitivo con el envejecimiento, pacientes con hiperamonemia, pacientes con hipoglucemia y pacientes con lupus eritematoso sistémico. También se ha descubierto que las personas que sufren malaria y los pacientes con atrofia olivopontocerebelosa tienen un metabolismo del ácido quinolínico elevado.

En las dos últimas décadas, las pruebas de la implicación del ácido quinolínico en las enfermedades neuroinflamatorias han aumentado exponencialmente. En el cerebro, la QUINO es producida y liberada por los macrófagos infiltrados y la microglía activada, las mismas células que destacan durante la neuroinflamación. La QUINO actúa como agonista del receptor del N-metil-D

aspartato y, como tal, se considera una excitotoxina endógena cerebral. Desde el descubrimiento de la actividad excitotóxica de la QUINO a principios de los años 80, se han identificado otros mecanismos citotóxicos. Hoy sabemos que la QUINO actúa como neurotoxina, gliotoxina, mediador proinflamatorio, molécula prooxidante y puede alterar la integridad y cohesión de la barrera hematoencefálica.

Prueba ELISA de lactato D y L en suero

El lactato, el anión que resulta de la disociación del ácido láctico, es un metabolito intracelular de la glucosa; concretamente es el producto final de la glucólisis anaeróbica, cuyo paso final es la conversión del piruvato en lactato por la enzima lactato deshidrogenasa. Los dos isómeros del lactato se conocen como L-lactato y D-lactato. Ambas formas (estereoisómeros) de lactato se producen a partir del piruvato y se metabolizan en él por la acción de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Sin embargo, la enzima es específica de los isómeros, de modo que la producción y el metabolismo del D-lactato requiere D-LDH y el L-lactato requiere L-LDH. Las células de los mamíferos sólo contienen L-LDH, por lo que en los humanos el lactato producido es casi exclusivamente L-lactato. Por el contrario, las especies bacterianas que fermentan carbohidratos (por ejemplo, *Lactobacillus* spp) tienen ambas enzimas y, por tanto, la capacidad de producir tanto D-lactato como L-lactato. Algunas especies sólo producen D-lactato, otras sólo L-lactato y otras ambas formas.

Por lo tanto, el L-lactato está normalmente presente en el cuerpo humano. Si la hiperlactatemia (sobreproducción de L-lactato) es lo suficientemente grave, se asocia a una acidosis (pH sanguíneo <7,35). La condición se denomina entonces acidosis láctica. Hay muchas causas de hiperlactatemia y de la acidosis láctica resultante, pero la más común es el aumento de la producción de lactato a partir de la glucólisis anaeróbica debido a la reducción del suministro de oxígeno a las células de los tejidos (hipoxia tisular). La hipoxia tisular, que es el resultado de una perfusión inadecuada de los tejidos y/o de una reducción del oxígeno en la sangre (hipoxemia), es una característica común de muchos tipos de enfermedades críticas, por lo que la medición del lactato se utiliza con mayor frecuencia para monitorizar la oxigenación de los tejidos en los pacientes críticos. El L-lactato dentro del rango de referencia se considera una evidencia fiable de que los tejidos están adecuadamente oxigenados.

En los seres humanos, el D-lactato se encuentra principalmente como producto del metabolismo bacteriano. Normalmente, los niveles elevados de D-lactato se deben a una infección bacteriana o al síndrome del intestino corto en humanos. Debido a su lento metabolismo y excreción, el D-lactato elevado puede causar acidosis y encefalopatía. Durante los episodios de encefalopatía relacionados con la acidosis por D-lactato, todos los pacientes presentan un estado mental reducido, que puede ir desde una leve somnolencia o letargo hasta el coma. Otros síntomas varían entre los pacientes, pero pueden incluir dificultad para hablar, confusión, incapacidad para concentrarse, marcha inestable y dolor de cabeza.

- Sheedy JR, Wettenhall RE, Scanlon D, Gooley PR, Lewis DP, McGregor N, Stapleton DI, Butt HL, DE Meirleir KL. Increased d-lactic Acid intestinal bacteria in patients with chronic fatigue syndrome. *In Vivo*. 2009 Jul-Aug;23(4):621-8.

Prueba ELISA de amoníaco en suero (AMMON)

El amoníaco se deriva de la acción enzimática bacteriana sobre los aminoácidos ingeridos. Se absorbe en el tracto gastrointestinal y se envía a través de la vena porta al hígado, que convierte la mayor parte en urea. Los niveles anormalmente altos de amoníaco pueden ser el resultado de un cólico o de una "hiperamoniemia entérica" (combinación de una mayor producción bacteriana y una mayor permeabilidad intestinal) que se produce a pesar de una función hepática normal. La hiperamoniemia es una condición metabólica caracterizada por niveles elevados de amoníaco en la sangre. El aumento de la entrada de amoníaco en el cerebro es una de las principales causas de trastornos neurológicos, trastornos metabólicos y algunas encefalopatías tóxicas.

- Patel VC, White H, Støy S, Bajaj JS, Shawcross DL. Clinical science workshop: targeting the gut-liver-brain axis. *Metab Brain Dis*. 2016 Dec;31(6):1327-1337.

- Shen TC, Albenberg L, Bittinger K, Chehoud C, Chen YY, Judge CA, Chau L, Ni J, Sheng M, Lin A, Wilkins BJ, Buza EL, Lewis JD, Daikhin Y, Nissim I, Yudkoff M, Bushman FD, Wu GD. Engineering the gut microbiota to treat hyperammonemia. *J Clin Invest*. 2015 Jul 1;125(7):2841-50. doi: 10.1172/JCI79214.

- Romero-Gómez M, Jover M, Galán JJ, Ruiz A. Gut ammonia production and its modulation. *Metab Brain Dis*. 2009 Mar;24(1):147-57. doi: 10.1007/s11011-008-9124-3..

Prueba de estrés oxidativo

El estrés oxidativo está implicado en un gran número de enfermedades, incluidas las neurodegenerativas y las autoinmunes.

Se han detectado indicadores de estrés oxidativo en los músculos y la sangre de pacientes con SFC. Los síntomas cognitivos observados en los pacientes, podrían estar desencadenados por la alteración de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Esta alteración se debe al daño oxidativo de las membranas celulares. El aumento del estrés oxidativo en los pacientes con SFC puede tener varios orígenes como la inflamación crónica, la producción excesiva de óxido nítrico o la exposición a toxinas ambientales.

ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo es el resultado de la acción dañina de las especies reactivas del oxígeno. Estas moléculas reaccionan con las proteínas, los lípidos o el ADN, alterando su estructura y provocando daños oxidativos en las células.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se producen durante los procesos fisiológicos normales, como la producción de energía, lo que conduce inevitablemente a la generación de moléculas oxidativas: superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o radical hidroxilo ($\cdot OH$). Los metales de transición como el Fe o el Cu, aunque son necesarios para ciertas funciones enzimáticas, agravan el daño oxidativo al catalizar la conversión del peróxido de hidrógeno en $\cdot OH$, un radical altamente reactivo que reacciona inmediatamente con cualquier molécula biológica, especialmente con los ácidos grasos poliinsaturados.

Otro radical libre importante es el óxido nítrico (NO). Esta molécula, producida por las enzimas iNOS y eNOS, ejerce diversas funciones fisiológicas como neuromediador, regulador de las funciones inmunitarias o vasodilatador. Sin embargo, puede reaccionar con el superóxido para formar peroxinitrito (ONOO), un oxidante celular extremadamente potente.

VÍAS DE ANTIOXIDANTES

Hasta cierto punto, nuestras células pueden protegerse contra el daño oxidativo. La enzima superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación del superóxido en H_2O_2 , que luego es convertido en H_2O por la glutatión peroxidasa (GPx) o en $O_2 + H_2O$ por la catalasa. La reacción catalizada por la GPx requiere de glutatión (GSH), que se convierte en glutatión reducida (GSSG). Las concentraciones de GSH y GSSG, y su proporción, reflejan el estado redox de la célula y son cruciales para una desintoxicación eficiente de las ROS.

El efecto perjudicial de los metales de transición se minimiza gracias a la acción de proteínas como la ferritina, la transferrina y la lactoferrina, que pueden almacenar iones de Fe, manteniendo su concentración celular libre lo más baja posible.

Por último, las células también están protegidas por antioxidantes que eliminan los radicales, como la vitamina E, que pueden capturar los radicales libres.

ESTRÉS OXIDATIVO Y ENFERMEDAD

El estrés oxidativo está implicado en un gran número de enfermedades: cáncer (el daño oxidativo en el ADN provoca mutaciones que pueden conducir a la carcinogénesis), aterosclerosis (las placas ateroscleróticas están formadas por grasa oxidada), enfermedades neurodegenerativas (el daño oxidativo es un componente central de la destrucción de las células nerviosas). Se han detectado indicadores de estrés oxidativo en los músculos y la sangre de los pacientes con SFC. El daño oxidativo puede alterar la barrera hematoencefálica, lo que podría explicar algunos de los problemas cognitivos que experimentan los pacientes.

CAPACIDAD ALTERADA PARA LUCHAR CONTRA EL ESTRÉS OXIDATIVO

Los factores que influyen en la eficacia de la defensa antioxidante son los siguientes

- Deficiencias nutricionales: una ingesta nutricional adecuada es crucial. Los sistemas antioxidantes requieren una serie de cofactores (glutatión, sulfato, vitamina A, vitamina E o minerales como el selenio y el cobre) que deben estar presentes en nuestra alimentación. La suplementación con ácidos grasos adecuados también es determinante, ya que podría compensar los daños causados por el estrés oxidativo (los ácidos grasos poliinsaturados son muy sensibles al daño oxidativo).

- Exposición a sustancias químicas tóxicas: la exposición excesiva a sustancias químicas tóxicas presentes en nuestro entorno puede provocar un grave daño oxidativo. Por ejemplo, la dioxina aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno por parte de las mitocondrias, lo que provoca daños oxidativos en el endotelio, el hígado y el cerebro. La exposición a determinados compuestos clorados se asocia a un aumento de la 8-OHdG, un marcador de daño oxidativo del ADN. Los pesticidas organofosforados generan radicales libres y alteran el sistema de defensa antioxidante de los eritrocitos. La exposición a metales pesados también provoca un fuerte daño oxidativo: el mercurio, el plomo, el cadmio y el arsénico promueven la formación de peróxido de hidrógeno y, al mismo tiempo, inhiben las enzimas antioxidantes (GSH sintetasa, GSH reductasa, SOD). Dado que la mayoría de las sustancias químicas pueden generar en cierta medida estrés oxidativo, la exposición a dosis bajas de diferentes sustancias químicas puede finalmente, cuando se combinan, provocar una carga oxidativa importante.

- Infecciones: las infecciones y los procesos inflamatorios están asociados a la producción de moléculas pro-oxidativas. En efecto, las células fagocíticas eliminan las bacterias produciendo ácido hipocloroso (HOCl) a partir de peróxido de hidrógeno (una reacción catalizada por la mieloperoxidasa). El ácido hipocloroso es en sí mismo un fuerte oxidante. Por lo tanto, las infecciones crónicas se asocian a un aumento de la carga oxidativa; por ejemplo, las infecciones por *Helicobacter pylori* causan graves daños oxidativos en la mucosa gástrica.

Los marcadores de estrés oxidativo son útiles para evaluar la necesidad de una terapia antioxidante. Las pruebas útiles a tal efecto son:

- Capacidad antioxidante total
- Oxidación de ácidos grasos

Capacidad antioxidante total (prueba ANOX)

Los sistemas antioxidantes del organismo normalmente limitan el alcance del daño oxidativo. Sin embargo, hay una serie de factores que pueden afectar gravemente a su función.

Hay muchos tipos de sistemas antioxidantes. Aunque las mediciones de antioxidantes individuales pueden ser necesarias en algunos casos, el mejor índice en los estudios de estrés oxidativo es medir la capacidad antioxidante total de una muestra. Esa medición mostrará el efecto global de los antioxidantes trabajando juntos.

Ensayo ANOX - Ensayo colorimétrico que mide la capacidad antioxidante total de una muestra (por ejemplo, suero), basado en la reducción de Cu^{++} a Cu^{+} .

- Una baja capacidad antioxidante significa un "alto" estrés oxidativo debido a las altas concentraciones de ROS (especies reactivas del oxígeno: por ejemplo, peróxidos) en la sangre. Suele combinarse con una elevada actividad de elastasa.
- Alta capacidad antioxidante significa: alta actividad neutralizadora de ROS.

Oxidación de ácidos grasos (prueba OXFA)

La peroxidación de lípidos es un mecanismo bien definido de daño celular. Los peróxidos de lípidos se descomponen para formar compuestos como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonal (4-HNE), productos finales naturales de la peroxidación de lípidos. La medición de estos productos finales es uno de los ensayos más ampliamente aceptados para la determinación del daño oxidativo. La

capacidad de la MDA para interactuar con el ácido tiobarbitúrico (TBA) se utiliza para cuantificar la MDA en una muestra de suero. Esto forma un aducto MDA-TBA que puede ser cuantificado espectrofotométricamente.

Factor de hipoxia-inducible 1-alfa (HIF-1A)

HIF1-alfa (HIF1A) es una subunidad de HIF1, que es un factor de transcripción que se encuentra en las células de mamíferos cultivadas bajo tensión de oxígeno reducida. HIF-1 es un heterodímero que consiste en una subunidad alfa y beta, ambas pertenecientes a la familia de factores de transcripción del translocador nuclear del receptor de hidrocarburos de per-arilo Basic-helix-loop-helix-Sim (PAS). HIF1 funciona como un regulador transcripcional de la respuesta adaptativa a la hipoxia. En condiciones hipóxicas, HIF-1 activa la transcripción de más de 40 genes, incluyendo la eritropoyetina, los transportadores de glucosa, las enzimas glicolíticas, el factor de crecimiento endotelial vascular, HILPDA, y otros genes cuyos productos proteicos aumentan el suministro de oxígeno o facilitan la adaptación metabólica a la hipoxia. HIF1-alfa regula la apoptosis mediada por la hipoxia, la proliferación celular y la angiogénesis tumoral. La hipoxia que induce la acumulación de proteína p53, interactúa directamente con HIF1-alfa y reduce la expresión inducida por la hipoxia de HIF1-alfa al promover la ubiquitina mediada por MDM2 y la degradación proteasomal bajo condiciones hipóxicas. Estudios recientes sugieren que la inducción de NOX4 por HIF1-alfa contribuye a mantener los niveles de ROS después de la hipoxia y la proliferación inducida por ésta. En los humanos, se encuentra en el brazo q del cromosoma 14. El terminal C de HIF1A se une a p300. Los complejos p300/CBP-HIF participan en la inducción de genes que responden a la hipoxia, incluido el VEGF. La hipoxia contribuye significativamente a la fisiopatología de las principales categorías de enfermedades humanas, incluyendo la isquemia miocárdica y cerebral, el cáncer, la hipertensión pulmonar, las cardiopatías congénitas y las enfermedades pulmonares obstructivas crónicas. La desregulación y sobreexpresión de HIF1A por hipoxia o alteraciones genéticas han estado fuertemente implicadas en la biología del cáncer, así como en una serie de otras patofisiologías, específicamente en áreas de vascularización y angiogénesis, metabolismo energético, supervivencia celular e invasión tumoral.

Pruebas de PrPc

Esta prueba permite evaluar la demanda energética de los PBMCs. Condiciones: PBMCs aislados de sangre heparinizada dentro de un lapso de 1-2 días después de que la sangre ha sido extraída. El índice de estimulación SI se calcula de la siguiente manera: (conteos máximos (con verapamilo): conteos máximos (sin verapamilo)).

- **Bajo SI (menos de 8)** significa agotamiento energético de las células--- como es el caso de CFS (las baterías están casi vacías...). Un valor por de bajo de 8 significa una alta demanda energética
- **Lamedia SI (8-13)** es una demanda energética normal.
- **El SI alto** es una mitocondria hiperactiva en respuesta a un desencadenante movilizador intracelular de Ca²⁺ (como el verapamilo), efecto observado con condiciones de inflamación (SI = superior a 13). Los valores más altos se refieren al exceso de producción de ATP y a las mitocondrias "sobrecalentadas".

Inmunoblot ANA/ENA IgG

El inmunoblot IgG ANA/ENA con 15 antígenos es un inmunoblot para autoanticuerpos en las enfermedades del tejido conectivo CTD - Lupus eritematoso sistémico (LES), Sjögren's syndrom (SjS), enfermedad mixta del tejido conectivo (MCTD), esclerodermia sistémica progresiva (PSS) y miositis. ANA/ENA IgG sirve para la diferenciación entre las enfermedades reumáticas autoinmunes y otras enfermedades reumáticas con síntomas similares.

Auto-anticuerpos para antígenos neuronales (AA-Neuro)

Inmunoblot IgG

Inmunoblot AA-Neuro IgG para autoanticuerpos para antígenos neuronales - La detección de estos anticuerpos en sueros de pacientes con síntomas neurológicos indica la presencia de un síndrome neurológico paraneoplásico (SNP).

Metales pesados en orina (METU)

Los metales pesados también pueden inhibir directamente las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa o la glutatión reductasa. Esta prueba suele realizarse en pacientes crónicos, pacientes con TEA, pacientes crónicos de Lyme.

La orina de base o la orina después de la quelación puede ser analizada para 28 elementos : Al, Sb, As, Ba, Be, Bi, Pb, Ce, Ga, Cd, Ni, Pd, Pt, Hg, Pr, Re, Rh, Ru, Ag, Te, Tl, Sn, W, U, Zr, Cu, Se, Zn.

Intoxicación por MOLDE - Cuantificación de IgG (MOLP)

Pruebas (en panel o cada una por separado) de IgG contra 6 moldes principales: Candida albicans, Cladosporium herbarum, Aspergillus niger, Alternaria alternata, Penicillium chrysogenum, Aspergillus fumigatus.

Prueba de expresión de receptores cannabinoides (CBR)

Siniscalco et al. (J Autism Dev Disord. 2013; J Neuroinflammation 2014) informaron de que el receptor cannabinoide tipo 2 está regulado al alza en las células mononucleares de la sangre periférica de los niños afectados por trastornos autistas y propusieron el receptor CBR2 como posible diana terapéutica para el manejo farmacológico del autismo.

"La desregulación del sistema inmunitario está bien reconocida en el autismo y se cree que forma parte de la etiología de este trastorno. El sistema endocannabinoide es un regulador clave del sistema inmunitario a través del receptor cannabinoide tipo 2 (CB2R), que se expresa en gran medida en los macrófagos y las células microgliales. El nivel de ARNm para el receptor cannabinoide tipo 2 (CB2) aumentó significativamente en las CMBD en comparación con los sujetos sanos (media \pm SE de unidades arbitrarias: $0,34 \pm 0,03$ frente a $0,23 \pm 0,02$ en los niños autistas y en los sujetos sanos, respectivamente), mientras que los niveles de ARNm de CB1 y de la amida hidrolasa de ácidos grasos no se modificaron. Los niveles de ARNm del gen de la fosfolipasa D hidrolizante de N-acilfatidiletanolamina disminuyeron ligeramente. Los datos de este estudio indican que el receptor CB2 es una posible diana terapéutica para el tratamiento farmacológico del autismo. El tratamiento con GcMAF fue capaz de normalizar las diferencias observadas en la expresión génica desregulada del sistema endocannabinoide del grupo de autismo." (De: Siniscalco et al. J Autism Dev Disord. 2013; Siniscalco et al. J Neuroinflammation 2014).

Esta prueba es útil en caso de que se contemple la terapia con aceite de cáñamo.

Genotipado

GFOL : Polimorfismos del ciclo de metilación

677C-T y 1298A-C son dos SNP en el gen que codifica la MTHFR (metileno tetrahidrofolato reductasa). El alelo T de 677C-T, y el alelo C de 1298A-C son los alelos "malos", que corresponden a una forma de baja actividad de la MTHFR. La baja actividad conduce a la acumulación de homocisteína y a niveles bajos de folato.

Los resultados se indican como "actividad alta", "actividad moderada" o "actividad baja", que corresponden a los siguientes genotipos:

677C-T:

Genotipo C/C: actividad alta
genotipo C/T: actividad moderada
genotipo T/T: baja actividad

1298A-C:

Genotipo A/A: actividad alta
Genotipo A/C: actividad moderada
Genotipo C/C: actividad baja

La actividad total de la MTHFR depende de la combinación de ambos SNP. Lo peor es la "baja actividad" en ambos.

La MTHFR participa en las vías biológicas relacionadas con la síntesis del ADN, la metilación del ADN (importante para la regulación de los genes), la síntesis de neurotransmisores, la síntesis de mielina y la síntesis de glutatión (importante para la desintoxicación y las actividades antioxidantes). El ácido fólico en sí mismo, es un fuerte antioxidante.

Existe una relación entre la deficiencia de folato y el cáncer (especialmente el de próstata), pero los beneficios de los suplementos de folato en el cáncer son un tema controvertido. El folato puede prevenir la aparición del cáncer, pero dado que es importante para las células que se dividen rápidamente (porque es necesario para la síntesis del ADN), en realidad podría promover el crecimiento de los tumores, una vez establecidos.

GVDR : Polimorfismos del receptor de vitamina D

Bsm1 y Fok1 son dos SNP en el gen que codifica el VDR (receptor de la vitamina D). El VDR no sólo interviene en el metabolismo del esqueleto, sino también en la modulación de la respuesta inmunitaria, la regulación de la proliferación y la diferenciación celular. La disfunción del VDR se ha relacionado con la osteoartritis, el cáncer, la diabetes y las enfermedades cardiovasculares.

Fok1 es un polimorfismo T-C. El alelo T da lugar a una proteína menos eficaz en la transducción de la señal de la vitamina D. Este alelo puede estar asociado a ciertos tipos de cáncer (cáncer de ovario), así como a la enfermedad de Crohn. Según el resumen de Ruggiero, las personas con el alelo T tienen una menor respuesta al GcMAF. Las personas con el alelo C tienen una mayor respuesta. Los heterocigotos tienen una respuesta moderada. Otro Bsm1 es un polimorfismo C-T. El alelo C se asocia con la supresión de Th1 y el cáncer de mama, el alelo T con el LES y la AR. Por lo tanto, puede haber una relación entre el polimorfismo VDR y el equilibrio Th1/Th2.

Fok1:

Genotipo C/C: alta respuesta (genotipo FF)
Genotipo T/C: respuesta moderada (genotipo Ff)
Genotipo T/T: respuesta baja (genotipo ff)

Bsm1:

Genotipo C/C: alta respuesta (genotipo bb)
Genotipo T/C: respuesta moderada (genotipo Bb)
Genotipo T/T: baja respuesta (genotipo BB).

CIRS = Síndrome de Respuesta Inflamatoria Crónica

- Dr. Ritchie Shoemaker: Pionero en CIRS, mohos y biotoxinas
- El cuerpo adquiere biotoxinas u organismos productores de toxinas a través de los alimentos, el agua, el aire o las picaduras de insectos

- Las biotoxinas provocan una producción continua y no regulada de citoquinas
- Múltiples daños en el organismo con síntomas relacionados con la inflamación, síntomas del sistema inmunitario, bacterias resistentes, dolor crónico, alteración del sueño, problemas gastrointestinales,....
- Investigación de varios marcadores de la vía de la biotoxina de Shoemaker: citoquinas (incluyendo TGFbeta), VEGF, C3A, C4A, MMP-9, VIP, a-MSH, IgG de moho, intestino permeable (zonulina).

II. Pruebas para detectar disfunciones gastrointestinales

(Formulario de solicitud de MSA, formularios S y R)

FUNCIÓN NORMAL DEL TRACTO GASTROINTESTINAL

El tracto gastrointestinal es una de las interfaces más grandes entre el ambiente interno humano y el mundo exterior. Su función es digerir y absorber los nutrientes cruciales que proporcionan los alimentos. Al mismo tiempo, también proporciona una barrera que impide que las moléculas que amenazan la salud pasen a través de la mucosa intestinal y accedan a la circulación sistémica.

Se cree que las disfunciones intestinales son factores que contribuyen a muchas enfermedades crónicas como alergias, trastornos autoinmunes, trastornos inflamatorios y enfermedades degenerativas.

DISBIOSIS INTESTINAL

La microflora intestinal representa un ecosistema de máxima complejidad. La microflora no sólo tiene un papel fundamental en la digestión y absorción de nutrientes, en la síntesis de vitaminas y ácidos grasos, en la desintoxicación de las sustancias químicas ingeridas, sino también en la regulación del sistema inmunitario. Por tanto, las alteraciones en la composición de la microflora pueden tener graves consecuencias para la salud del huésped. Un trastorno frecuente de la función intestinal es la disbiosis. Se trata de un crecimiento excesivo de bacterias patógenas en el intestino. Se calcula que el tracto intestinal humano adulto alberga hasta 50 géneros diferentes de bacterias, que representan más de 500 especies distintas.

· El uso de antibióticos es una causa común de alteraciones importantes. La dosis, la duración de la administración y el espectro de actividad determinarán el impacto en la flora microbiana. · El estrés psicológico también puede afectar a la composición de la flora, incluyendo una disminución significativa de bacterias beneficiosas (Lactobacilos y Bifidobacterias) y un aumento de E. coli patógena. El estrés puede afectar al crecimiento bacteriano al reducir significativamente la producción de mucopolisacáridos y mucinas en la mucosa, que son importantes para inhibir la adherencia de los organismos patógenos, y al disminuir la producción de inmunoglobulina A (IgA), que desempeña un papel crucial en su eliminación. Los neuroquímicos producidos ante el estrés psicológico también pueden potenciar directamente el crecimiento de organismos patógenos: la norepinefrina estimula el crecimiento de Y. Enterocolítica, P. Aeruginosa y bacterias gramnegativas como E. coli.

· Otro factor que puede influir en la flora intestinal humana es la dieta. Algunas dietas promueven el crecimiento de microorganismos beneficiosos, mientras que otras promueven actividades microflorales perjudiciales. Por ejemplo, las dietas ricas en compuestos azufrados (productos lácteos, huevos, ciertas verduras, frutos secos...) promueven el crecimiento de bacterias reductoras de sulfatos. En general, parece que las poblaciones que consumen la típica dieta occidental tienen más bacterias anaerobias, menos Enterococos y menos tipos de levaduras que las poblaciones que consumen una dieta vegetariana o rica en carbohidratos complejos.

PERMEABILIDAD INTESTINAL: SÍNDROME DE FILTRACIÓN INTESTINAL

La mucosa intestinal sana absorbe normalmente las pequeñas moléculas que resultan de la digestión

completa. Las células intestinales expresan proteínas portadoras especializadas que transportan los nutrientes a través de la pared intestinal y hacia el torrente sanguíneo. Las moléculas más grandes no son transportadas por estos sistemas y normalmente se mantienen dentro del intestino porque las células de la mucosa intestinal están muy juntas. El síndrome de intestino permeable (LGS) es una condición en la que la capacidad de la pared intestinal para mantener fuera las moléculas grandes e indeseables, se reduce. Cuando los espacios entre las células de la pared intestinal se agrandan, las macromoléculas, los antígenos y las toxinas se abren paso hacia el torrente sanguíneo.

Hay un gran número de factores que pueden provocar el intestino permeable:

- Componentes de la dieta: la fermentación de ciertos componentes de la dieta (proteínas, carbohidratos refinados) da lugar a productos finales potencialmente dañinos: amoníaco, aminas, fenoles, sulfuros... estos compuestos reducen la vida útil de las células de la mucosa. Los aditivos alimentarios, el alcohol, la cafeína también irritan la pared intestinal.
- Disbiosis intestinal: la producción de compuestos tóxicos a través de la fermentación también depende del tipo de bacterias presentes en el intestino. En caso de disbiosis, las bacterias patógenas sobrecrecidas producen toxinas y compuestos muy perjudiciales para las células intestinales. Por ejemplo, las bacterias reductoras de sulfato producen sulfuro de hidrógeno tóxico.
- Alergias e intolerancias alimentarias: la intolerancia a determinados alimentos (lactosa...) puede provocar una inflamación intestinal perjudicial.
- Estrés crónico: además de favorecer la disbiosis, el estrés reduce el flujo sanguíneo al intestino dejándolo incapaz de repararse. El estrés también hace que las células del intestino se contraigan, lo que da lugar a mayores huecos entre las células.

Consecuencias del intestino permeable

La alteración de la permeabilidad de la pared intestinal puede tener efectos muy perjudiciales, como:

- Deficiencias nutricionales: los sistemas portadores que normalmente transportan los nutrientes a través de la pared intestinal son menos activos en las células de la mucosa dañadas o inflamadas.
- Aumento de la absorción de toxinas ambientales: la mucosa intestinal es normalmente una barrera eficaz contra las sustancias químicas ambientales que están presentes en los alimentos (aditivos alimentarios, pesticidas, PCB...). Cuando pasan a la circulación, estas toxinas pueden causar daños en todos los órganos, especialmente en el hígado y el cerebro. Las sensibilidades químicas múltiples pueden desarrollarse a medida que el sistema nervioso se sensibiliza.
- Desarrollo de alergias y reacciones autoinmunes: moléculas grandes no digeridas pasan al torrente sanguíneo. El sistema inmunitario reconoce estas moléculas como extrañas y genera anticuerpos contra ellas. Como resultado, los pacientes afectados desarrollarán alergias a muchos tipos de alimentos, lo que en realidad inicia un círculo vicioso, ya que las alergias provocarán una inflamación intestinal que conducirá a una mayor permeabilidad intestinal... Además, algunas de las moléculas que pasan a la sangre pueden compartir homologías con proteínas que están normalmente presentes en el organismo. Por lo tanto, los anticuerpos contra estas moléculas atacarán a las propias células del organismo, lo que dará lugar a enfermedades autoinmunes.
- Activación crónica (inflamación) del sistema inmunitario: Un compuesto bacteriano que puede llegar fácilmente a la sangre es el lipopolisacárido (LPS). Presente en el torrente sanguíneo, el LPS inducirá una fuerte respuesta proinflamatoria en los monocitos y macrófagos, que implica el reconocimiento por parte de un receptor (Toll-like receptor-4) y la posterior secreción de citoquinas como IL-1, IL-6, TNF-alfa. Este estado inflamatorio crónico se observa en el Síndrome de Fatiga Crónica (SFC/EM). El LPS también induce la producción de óxido nítrico mediada por NK-kB. Al aumentar el NO, se inhibe la función de las NK y a menudo se observan infecciones oportunistas como las infecciones por micoplasma. Los herpesvirus, que tienden a reactivarse en un contexto de activación inmunitaria, también se detectarán con frecuencia.

SÍNDROME DEL INTESTINO IRRITABLE (SU SIGLA EN INGLÉS ES IBS)

Entre las patologías que se desarrollan a raíz de la disbiosis intestinal y el intestino permeable, la más frecuente es probablemente el síndrome del intestino irritable (SII). El SII se caracteriza por dolor o malestar abdominal junto con signos de disfunción intestinal, más comúnmente diarrea y/o

estreñimiento. Las cifras actuales sugieren que entre el 10 y el 20% de la población puede padecer esta enfermedad. Se cree que el SII es el resultado de una activación inapropiada y crónica del sistema inmunitario de la mucosa. Las causas de esta activación no están claras, la enfermedad es muy probablemente multifactorial. Los factores que pueden tener un papel en el SII incluyen

o Disfunción neurológica e interacción cerebro-intestino

- Un avance importante en el estudio del SII y otras enfermedades gastrointestinales ha sido darse cuenta de la influencia del sistema nervioso en estos trastornos. El intestino tiene la mayor concentración de células nerviosas del cuerpo, además del cerebro. Hay una comunicación constante entre el cerebro y el intestino, y el neurotransmisor serotonina, producido por las células nerviosas, puede ejercer una amplia gama de efectos en los intestinos, sobre todo el control de la motilidad intestinal y las secreciones intestinales.

- Estudios recientes sugieren que los pacientes con SII presentan niveles aumentados de serotonina; la administración de sustancias similares a la serotonina a sujetos de prueba parece desencadenar los síntomas del SII. Otros estudios han demostrado anomalías en la forma de actuar de la serotonina en los pacientes con SII. Estas anomalías en los niveles y la función de la serotonina pueden causar directamente anomalías en la función intestinal.

o El estrés

- Desde hace tiempo se cree que el estrés desempeña un papel importante en el SII. Debido a la alta concentración de células nerviosas en el intestino, cualquier alteración de la función cerebral debida al estrés puede repercutir fácilmente en la función intestinal. El estrés crónico conduce a una inhibición crónica de la función intestinal. Como se ha comentado anteriormente, el estrés puede favorecer la disbiosis intestinal y el leaky gut; el estrés también provoca la liberación de sustancias químicas inflamatorias en el intestino, como la sustancia P, y puede activar la inflamación intestinal cuando se experimenta junto con otro factor como una infección.

o Sensibilidades e intolerancias alimentarias ; enfermedad celíaca

- Comer ciertos alimentos puede exacerbar los síntomas del SII. En un estudio reciente, los pacientes con SII fueron sometidos a pruebas de reacciones IgG a diferentes alimentos (las IgG indican sensibilidades alimentarias, en lugar de las clásicas alergias alimentarias que implican IgE). A continuación, se sometió a los pacientes a una dieta que excluía los alimentos a los que habían dado positivo; estas dietas de eliminación dieron lugar a una reducción significativa de los síntomas. Un caso particular de intolerancia alimentaria es la enfermedad celíaca. Se ha descubierto que un subgrupo de pacientes con SII tiene una enfermedad celíaca leve/moderada, que es una intolerancia al gluten (reacción inmunitaria a la proteína del gluten que provoca daños en el intestino). Las personas con la enfermedad celíaca tienen que evitar los alimentos que contienen gluten, como el trigo, el centeno, la cebada y la avena.

o Disbiosis intestinal

- Como se ha comentado anteriormente las consecuencias de la disbiosis incluyen molestias intestinales, intestino permeable, alergias alimentarias, inflamación intestinal, todo ello asociado al SII. · Las investigaciones han demostrado realmente que los pacientes con SII tienen un número bajo de bacterias beneficiosas (lactobacilos y bifidobacterias) y un número anormalmente alto de organismos facultativos que fermentan los residuos de los alimentos para producir grandes cantidades de gas y productos de desecho tóxicos.

o Factores genéticos

- Parece que hay factores genéticos que predisponen al desarrollo del SII: los familiares directos de un individuo con SII tienen entre 4 y 20 veces más probabilidades de desarrollar la enfermedad que la población general. La identificación de una mutación genética exacta ha sido hasta ahora esquiva, sin embargo, los resultados recientes sugieren una implicación de los genes relevantes para la inflamación en general (citoquinas), así como de los genes que codifican los receptores tipo Toll (especialmente el TLR-4, que reconoce el LPS).

REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN INMUNITARIA EN EL INTESTINO:

- El 80% de nuestras células inmunitarias residen en el intestino
- El tejido linfoide asociado al intestino (GALT) se extiende a lo largo de la mucosa intestinal (mancha de Peyer en el intestino delgado, folículos linfoides en el colon) y alberga el 80% de las células inmunitarias del organismo
- Estas células inmunitarias interactúan permanentemente con los microorganismos asociados a la mucosa (bacterias, virus...)
- Se mantiene un delicado equilibrio entre la tolerancia a los antígenos intestinales (regulación a la baja de la inflamación,...), y la defensa contra los patógenos (producción de defensinas,...).

El desequilibrio de la inmunidad intestinal afecta a todo el organismo:

- La integridad de la barrera intestinal es esencial : El aumento de la permeabilidad de la mucosa provoca endotoxemia sistémica (inflamación crónica de bajo grado) y reacciones inmunitarias anormales a los antígenos intestinales
- Interacciones huésped/flora intestinal: la flora microbiana intestinal desempeña un papel importante en el mantenimiento de la salud del huésped, pero puede verse afectada por una función inmunitaria anormal del huésped.

Actualmente se cree que las alteraciones de la flora intestinal son factores que contribuyen a muchas enfermedades crónicas como las alergias, los trastornos autoinmunes e inflamatorios o las enfermedades degenerativas. Una serie de factores, como el uso de antibióticos, el estrés o ciertos componentes de la dieta, pueden tener un impacto perjudicial en la microflora intestinal. El crecimiento excesivo de bacterias patógenas da lugar a la producción de compuestos bacterianos tóxicos (como las endotoxinas) que se absorben en el torrente sanguíneo y provocan una activación inmunitaria anormal.

La inflamación intestinal, que puede ser consecuencia de intolerancias alimentarias o alergias, provoca un aumento de la permeabilidad de la pared intestinal ("leaky gut"), facilitando el paso de los compuestos bacterianos a la sangre.

Autismo e inflamación gastrointestinal:

- Varios informes han revelado una alta prevalencia de síntomas gastrointestinales, inflamación y disfunción en niños con autismo (revisado por Horvath y Perman, Curr Gastroenterol Rep. 2002).
- Se encontraron grados de inflamación de leves a moderados en el tracto intestinal superior e inferior. En los niños con TEA, la presencia de una disfunción GI se asocia a menudo con un aumento de la irritabilidad, las rabietas, el comportamiento agresivo y los trastornos del sueño (revisado por Critchfield et al., Gastroenterol Res Pract. 2011).

Utilizamos los siguientes ensayos para investigar la disfunción intestinal:

Análisis de sangre:

- Prueba de deficiencia de lactasa (prueba LACT en el formulario de solicitud general)
- sCD14

Ensayos basados en heces:

- Prueba ELISA de sIgA en muestras de heces (sIgA en el formulario de solicitud de la estación S)
- Prueba de zonulina en muestras de heces (ZONU en el formulario de solicitud de la estación S)
- Pruebas ELISA de EPX/EDN en muestras de heces (EPX/EDN en el formulario de solicitud de la estación S)

- Prueba ELISA de β -defensina-2 en muestras de heces (β -defensina-2 en el formulario de solicitud de la estación S)
- Marcadores de inflamación en muestras de heces (C/INFL en el formulario de solicitud R)
- Infecciones en muestras de heces (diferentes pruebas en el formulario de solicitud R)
- Ensayo de MSA (ver página dedicada y formulario de solicitud de MSA)

Ensayo de deficiencia de lactasa (LACT)

La intolerancia a la lactasa puede provocar una fuerte disfunción intestinal. Esta afección relativamente común tiene un origen genético, a saber, un polimorfismo en el gen que codifica la lactasa, una enzima responsable de la digestión de la lactosa. En las personas afectadas, la producción de la enzima disminuye durante o poco después de la infancia, lo que provoca una mala absorción de la lactosa. Los azúcares de la lactosa no digeridos afectan al desarrollo de la microflora intestinal, provocando una disbiosis. En el genoma hay dos copias, o alelos, del gen de la lactasa. Cada alelo puede ser del tipo T (normal) o del tipo C (anormal).

Un paciente puede tener tres posibles genotipos:

- T/T: expresión normal de la enzima, los pacientes son tolerantes a la lactosa
- C/T: sólo una copia funcional que es suficiente para el metabolismo de la lactosa, por lo que estos pacientes pueden considerarse tolerantes a la lactosa
- C/C: estos pacientes son deficientes en lactasa, su tolerancia a la lactosa es limitada.

Pruebas ELISA sIgA en muestras de heces (sIgA)

La función principal de la sIgA es unirse a los microorganismos invasores y a las toxinas y atraparlos en la capa de mucosidad o en el interior de las células epiteliales, inhibiendo así la motilidad microbiana, aglutinando los organismos y neutralizando sus exotoxinas para luego ayudar a su eliminación inofensiva del cuerpo en el flujo fecal. La sIgA también "etiqueta" los alimentos como aceptables, por lo que una sIgA baja conduce a una mayor sensibilidad a los alimentos. La concentración de sIgA nos da información sobre la defensa inmunitaria intestinal: Una falta de sIgA indica una actividad disminuida del sistema inmunitario intestinal. Un nivel elevado de sIgA muestra una inflamación intestinal.

Marcadores de inflamación en muestras de heces (C/INFL)

Hemoglobina: descargada con las heces en las enfermedades hemorrágicas gastrointestinales
Transferrina: un componente derivado de la sangre; un buen marcador de hemorragia gastrointestinal
Calprotectina: una proteína citosólica de los neutrófilos con propiedades antimicrobianas, que está presente en mayor concentración en las heces durante la inflamación intestinal

Lactoferrina: componente glicoproteico de los gránulos secundarios de los neutrófilos, liberado por los leucocitos fecales; puede servir como marcador de inflamación en el intestino.

Esta prueba de inmunocompetencia se realiza en las heces y da una respuesta cualitativa (positiva/negativa).

Zonulina en muestras de heces (ZONU)

La zonulina es la "puerta de entrada" al intestino permeable. La zonulina abre los espacios entre las células del revestimiento intestinal. Esto ocurre normalmente para que los nutrientes y otras

moléculas entren y salgan del intestino. Sin embargo, cuando hay intestino permeable, los espacios entre las células se abren demasiado, permitiendo que moléculas proteicas más grandes lleguen al torrente sanguíneo, donde puede producirse una reacción inmunitaria. También puede producirse una fuga del contenido intestinal, como las bacterias, hacia el sistema inmunitario, creando una inflamación. A medida que aumenta el nivel de zonulina, el sellado entre las células intestinales disminuye, abriendo espacios entre las células que permiten el paso de todo tipo de cosas. Esto se denomina "intestino permeable". La zonulina es el único modulador fisiológico de las uniones estrechas intercelulares descrito hasta ahora que interviene en el tráfico de macromoléculas y, por tanto, en el equilibrio tolerancia/respuesta inmunitaria.

Pruebas ELISA EPX/EDN en muestras de heces (EPX/EDN)

La acumulación de EDN en el intestino se asocia con la inflamación y el daño tisular. La medición de EDN en las heces puede servir como parámetro objetivo de una inflamación clínica o subclínica actual localizada en el área gastrointestinal.

La EDN fecal se considera la mejor de las proteínas de gránulos citotóxicos para la evaluación de la inflamación intestinal, ya que refleja con mayor precisión las puntuaciones clínicas, endoscópicas e histológicas de la actividad de la enfermedad y el daño de la mucosa.

Los niveles elevados de EDN fecal están relacionados con múltiples afecciones inflamatorias, como la alergia/sensibilidad a los alimentos, las infecciones patógenas (*C. difficile* y *H. Pylori*), el SII y los trastornos gastrointestinales eosinofílicos.

Pruebas ELISA de β -defensina-2 en muestras de heces (β -DEF-2)

Las β -defensinas son parte integrante del sistema inmunitario congénito y contribuyen con su efecto antimicrobiano a la función de barrera de las células epiteliales intestinales. Las defensinas ejercen un grado variable de actividad antimicrobiana contra las bacterias, los hongos y algunos virus envueltos. La expresión de las β -defensinas es inducida por las citoquinas proinflamatorias y también por microorganismos (por ejemplo, *E. coli*, *H. pylori* o *P. aeruginosa*) y por microorganismos probióticos. Por ejemplo, puede observarse una deficiencia de β -defensina-2 en la mucosa intestinal de pacientes con la enfermedad de Crohn. Por lo tanto, el sistema de defensa de la mucosa está restringido y permite un aumento de la invasión de bacterias, lo que posiblemente podría conducir a una infección típica en los pacientes con enfermedad de Crohn. Resultados recientes implican que la β -defensina-2 se sobreexpresa en la inflamación intestinal activa, especialmente en la colitis ulcerosa.

Evaluaciones de infecciones en muestras de heces

Las pruebas inmunocromatográficas se basan en la captura inmunológica de un coloide coloreado al pasar a través de una membrana. Sobreestamembranasehainmovilizado un anticuerpo antigénico. La detección de una posible infección es fácil y rápida, ya que no requiere el cultivo de una muestra fecal. Las siguientes pruebas están disponibles (formulario de solicitud R):

- C/PARAS Cryptosporidium/Giardia Ag
- HPYL Helicobacter Pylori Ag
- SHIG Shigella spp.
- ADENOV Adenovirus Ag
- SALMO Salmonella Spp. Ag
- ENTEROV Enterovirus Ag
- HepA Virus de la hepatitis A Ag
- EntaHIST Entamoebahistolytica
- CampBact Campylobacter Ag
- YERSI Yersinia enterocolitica
- CLOST Clostridium difficile
- CLOSTRICCombo Clostridium difficile 3 toxinas
- Tularemia TULAR (Francisella tularensis)

Ensayo de heces metagenómico (MSA)

La microflora intestinal (microbioma intestinal) puede considerarse como un órgano adquirido postnatalmente. Compuesto por una gran diversidad de células bacterianas, tiene diferentes funciones para el huésped. La microflora tiene un papel importante en la maduración intestinal, la integridad intestinal, la prevención de la colonización bacteriana patógena y oportunista, También modula el sistema inmunológico. La microflora también participa en la síntesis de vitaminas, la producción de ácidos grasos de cadena corta y el metabolismo de sustancias carcinógenas.

El microbioma contribuye al procesamiento y metabolización de los alimentos:

- digestión y absorción de nutrientes
- metabolismo del azúcar
- Síntesis de ácidos grasos de cadena corta (por ejemplo, síntesis de butirato por *Faecalibacterium*, *Roseburia*.... es importante para la salud del colon... pero da mucha energía → obesidad).
- síntesis de aminoácidos y vitaminas (vit B12, vit B9, vit K)
- desintoxicación de contaminantes y moléculas tóxicas presentes en los alimentos
- regulación de la función inmune

Aunque la flora intestinal es bastante estable a lo largo del tiempo, hay una serie de factores que pueden alterar el equilibrio normal y provocar así una disbiosis intestinal. La microflora intestinal puede verse alterada por los mecanismos inmunitarios del huésped, el estado redox, la función suprarrenal, el pH intestinal, la dieta del huésped, la edad del mismo, los medicamentos, los organismos exógenos y el estrés emocional. La disbiosis intestinal se observa en una serie de enfermedades crónicas como la enfermedad de Crohn, el síndrome del intestino irritable y el síndrome de fatiga crónica, y puede estar asociada a trastornos atópicos y del desarrollo como el autismo y el TDAH.

Hasta hace poco, la investigación sobre la composición de la microbiota se basaba casi exclusivamente en el cultivo, a pesar de que

- entre el 40 y el 80% de las bacterias intestinales no pueden cultivarse
- La identificación de las colonias puede ser difícil
- Las bacterias deben estar vivas: los estudios de los anaerobios son muy difíciles, con grandes pérdidas durante la recogida y el procesamiento de las muestras
- El método de cultivo puede abarcar sólo una pequeña fracción de todas las especies bacterianas (¿10%?)
- *E. coli*, que antes se consideraba una especie dominante, es un miembro menor...

La flora intestinal y el estado gastrointestinal en niños con autismo se correlacionan con la gravedad del autismo: · Adams et al. (BMC Gastroenterology 2011) informaron que los síntomas gastrointestinales estaban fuertemente correlacionados con la gravedad del autismo. De cuatro tipos de bacterias beneficiosas que se investigaron, los niños con autismo tenían niveles mucho más bajos de *Bifidobacterium* (-45%), niveles ligeramente más bajos de *Enterococcus* (-16%), y niveles mucho más altos de *Lactobacillus* (+100%).

· Finegold et al. (Anaerobe 2010) informaron de que en las heces de los niños de control, los Firmicutes representaban el 63,6% de la flora total, pero sólo el 38-39% de la flora de las heces de los niños autistas. Los Bacteroidetes representaban el 30% de la flora fecal en los controles y el 51% en la flora de las heces de los niños autistas. Las actinobacterias constituían el 1,8% de la flora fecal de los niños de control y entre el 0,4 y el 0,7% de la flora de los niños autistas. Las proteobacterias constituían el 0,5% de la flora de los niños de control y entre el 2,3 y el 3,1% de la flora de los niños autistas. En resumen, la flora fecal de los niños autistas era significativamente diferente de la flora fecal de los niños sanos.

Disbiosis en el síndrome de fatiga crónica:

· Un trastorno frecuente de la función intestinal es la disbiosis, es decir, el crecimiento excesivo de bacterias patógenas en el intestino.

· Varios estudios publicados sugieren que el SFC está asociado a la disbiosis

o Los ensayos basados en cultivos revelaron un aumento de los niveles de Streptococcus y Enterococcus spp. en muestras fecales de pacientes con ME/CFS [Sheedy et al., In Vivo 2009].

o La suplementación con probióticos (L. casei en un estudio, L. paracasei + L. acidophilus + B. lactis en otro estudio) dio lugar a una mejora de los síntomas emocionales y las funciones neurocognitivas [Rao et al., Gut Pathog 2009; Sullivan et al., Nutr J 2009].

En los Laboratorios R.E.D. hemos desarrollado un nuevo procedimiento para analizar las poblaciones bacterianas en una muestra de heces (publicado por Fremont et al., Anaerobe 2013). Este procedimiento de última generación se basa en la amplificación por PCR de 16s seguida de una secuenciación de alto rendimiento. Proporciona una visión global de todas las especies bacterianas, incluyendo aquellas que no pudieron ser analizadas por las técnicas de cultivo tradicionales.

Nuestro análisis metagenómico de heces proporciona una visión completa de las poblaciones bacterianas presentes en una muestra de heces, incluyendo aerobios, anaerobios y especies bacterianas que no pueden ser analizadas por las técnicas de cultivo tradicionales.

Interés y aplicaciones potenciales:

- Procedimiento de recogida fácil, las muestras pueden estabilizarse: fácil acceso a los pacientes - Gran número de aplicaciones: autismo, infecciones crónicas, SFC, diversas enfermedades intestinales, obesidad, alergias, cáncer...

- Puede seguir el efecto de las intervenciones terapéuticas: pre o probióticos, antibióticos, extractos de plantas, cambios de dieta...

- Puede utilizarse para ensayos clínicos

III. Pruebas para detectar infecciones virales

(Inmunidad - Formulario de solicitud general)

Las infecciones víricas se analizan mediante pruebas de PCR y serología (inmunoblot). Nos centramos en investigar aquellas infecciones víricas que se han asociado a afecciones crónicas y multifactoriales, como el HHV6, HHV7, HHV8, EPBV, Parvovirus B19, CMV, etc.

La prueba qPCR (Herpesvirus -6, 7, 8 - HHV6, HHV7, HHV8, Virus de Epstein-Barr - EPBV, Parvovirus B19 - PARV, Citomegalovirus - CYMV, Virus Coxsackie - COXV, Enterovirus - ENTV, Virus del Nilo Occidental - WNV, Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas -TBE, Adenovirus F&G - ADVfg) está disponible para cuantificar el número de copias presentes en los fluidos o tejidos corporales. Esta prueba puede realizarse en sangre, fluidos corporales (líquido cefalorraquídeo, saliva, hisopos vaginales, etc.), biopsias (intestinales, cutáneas, etc.), garrapatas, etc.

Existen pruebas de inmunoblot para evaluar la presencia de anticuerpos contra los siguientes virus en muestras de suero humano:

· SeroTorch - COMBO TORCH IgG & IgM inmunoblot : Toxoplasma gondii, virus de la rubéola, citomegalovirus (CMV), virus del herpes simple tipo 1 y 2 (HSV-1/2) · SeroTropical - COMBO

Tropical Fever IgG & IgM immunoblot : virus Chikungunya, virus del dengue, virus Zika

· SeroHanta - COMBO Hanta Plus viruses IgG & IgM immunoblot :Hantavirus (serotipos Puumala (PuN), Sin Nombre (SinN), Hantaan (HaN), Dobrava (DobN) y Seoul (SeoN)), Sandfly Fever Virus, (SFFV) serotipos Toscana y Sicilian · SeroHCV- Hepatitis virus C IgG immunoblot

· SeroHepE - Inmunoblot de IgG e IgM del virus de la hepatitis E

· SeroCMV- Citomegalovirus IgG & IgM immunoblot

· SeroHSV1/2 - Herpes virus 1&2 IgG immunoblot

· SeroPARVO - Parvovirus B19 IgG & IgM immunoblot

· SeroEBVblot - Inmunoblot del virus de Epstein-Barr IgG e IgA

Se han asociado varios virus con el SFC:

· Herpesvirus humano 6 y 7 [Chapenko et al., J Clin Virol 2006]

· Enterovirus [Chia et al., J Clin Pathol 2010]

· Parvovirus B19 [Kerr et al., J Gen Virol 2010]

· Bornavirus [Nakaya et al., FEBS Lett 1996]

· Virus de Epstein-Barr [Lerner et al., In Vivo 2004]

· No es específico para el SFC; ninguno de estos virus se encuentra en todos los pacientes con SFC
· La ausencia de detección podría explicarse en algunos casos por la localización viral. · Las infecciones virales persistentes pueden afectar a la inmunidad intestinal

· El VHH-6 es inmunosupresor, causa depleción de células CD4, regulación a la baja de CD3 en células T infectadas, alteración de la expresión de citoquinas (TNF α , IL-1b, IL-10, IL-12). La infección por parvovirus se asocia a la alteración de la respuesta de IFN γ .

Consecuencias en la salud intestinal

· La inmunosupresión puede favorecer el desarrollo de otros virus o patógenos; la alteración de la inmunidad intestinal también puede afectar a la flora intestinal. Búsqueda de virus en la mucosa intestinal: fundamento y enfoque experimental

· La mucosa gastrointestinal es un reservorio conocido de varios virus · Se encuentran HHV-6, HHV-7, CMV en biopsias intestinales de pacientes con VIH y trasplantados.

· El VEB se encuentra en la mucosa gástrica, asociado a la gastritis y al cáncer gástrico; crónica

· Se han encontrado infecciones por enterovirus en el estómago de pacientes con SFC. · Se ha realizado un estudio en los Laboratorios RED para investigar la presencia de infecciones víricas específicas en el tracto gastrointestinal de los pacientes con SFC

o Determinación de las cargas virales de HHV-6, EBV y parvovirus B19 en biopsias gástricas e intestinales de pacientes con SFC y controles sin SFC, mediante PCR cuantitativa en tiempo real. 48 pacientes, 35 controles.

▪ HHV-6 en biopsias de estómago y duodeno: entre el 13 y el 31% de las biopsias son positivas. Proporciones similares en controles y pacientes.

▪ Mayor frecuencia de Parvovirus B19 en la mucosa gástrica y duodenal de los pacientes en comparación con los controles.

- Publicado en: In Vivo 2009; Mar-Apr;23(2):209-13. Detection of herpesviruses and parvovirus B19 in gastric and intestinal mucosa of chronic fatigue syndrome patients. By Frémont M, Metzger K, Rady H, Hulstaert J, De Meirleir K.

HERPESVIRUS HUMANO 6 (HHV6)

· El VHH-6 tiene una prevalencia muy alta (cerca del 100% de la población mundial ha estado expuesta). Se transmite principalmente por la saliva. La transmisión se produce normalmente en los dos primeros años de vida; la infección primaria suele estar asociada a un cuadro febril y, en ocasiones, a la aparición de la roséola (exantema subitum).

· Se conocen dos variantes del virus, el HHV-6A y el HHV-6B. El HHV-6 es principalmente linfotrópico, infectando una amplia gama de células inmunes, incluyendo células T, monocitos, células NK; sin embargo, el virus también puede infectar muchos otros tejidos como el cerebro o el hígado.

· El VHH-6 tiene efectos inmunomoduladores, incluyendo la supresión de la proliferación de células T y la alteración de la producción de citoquinas. Esta inmunosupresión puede favorecer el desarrollo o la progresión de otras infecciones víricas como el CMV, el EBV o el VIH.

· Varios estudios han informado de una posible relación entre el HHV-6 y la esclerosis múltiple (EM). La expresión de las proteínas del VHH-6 se observa en el lugar de las lesiones de la EM; se ha detectado ADN del VHH-6 libre de células en el suero de los pacientes con EM. También se sospecha que la reactivación del HHV-6 contribuye a la patogénesis del SFC.

· Nicolson et al. (J Neurosci Res. 2007) examinaron la sangre de 48 pacientes del centro y sur de California diagnosticados de trastornos del espectro autista (TEA) para detectar el virus del herpes humano 6 (HHV-6, 14/48 o 29,2% positivo, odds ratio = 4,5, P < 0,01).

La prueba qPCR está disponible para cuantificar el número de copias presentes en los fluidos o tejidos corporales. Esta prueba puede realizarse en sangre, saliva y biopsias de tejido. La prueba también puede descubrir la posible integración cromosómica del HHV6.

HERPESVIRUS HUMANO 7 (HHV7)

· El HHV-7 está estrechamente relacionado con el HHV-6. La infección primaria por HHV-7 suele producirse más tarde en la infancia que la infección por HHV-6; también puede causar exantema subitum. · El HHV-7 puede tener un tropismo más estrecho que el HHV-6: el virus infecta y se replica eficazmente en las células CD4+; puede encontrarse en el tejido cerebral, pero con menos frecuencia que el HHV-6.

· Se ha sugerido que el HHV-7 puede reactivar el HHV-6 desde la latencia. Se ha informado de que es más frecuente en personas con enfermedades autoinmunes.

Existe una prueba qPCR para cuantificar el número de copias presentes en fluidos o tejidos corporales. Esta prueba puede realizarse en sangre, saliva y biopsias de tejido. La prueba también puede descubrir una posible integración cromosómica del HHV7.

CITOMEGALOVIRUS (CMV)

· El CMV se transmite por contacto personal estrecho (saliva, sangre, leche materna, semen...).

· El 20% de los niños ya están infectados antes de la pubertad; la infección es entonces común durante la adolescencia. Finalmente entre el 40 y el 100% de la población general mostrará evidencia de exposición previa.

· Las infecciones primarias por CMV en los recién nacidos pueden dar lugar a complicaciones graves, pero en los niños mayores y en los adultos, la infección primaria suele ser asintomática.

· Tras la infección, el CMV permanece latente en el huésped y puede reactivarse cuando el sistema inmunitario está gravemente deteriorado.

· La reactivación del virus puede dirigirse al sistema nervioso central (encefalitis aguda), dañar la retina o tener manifestaciones dermatológicas (erupción, lesiones ulcerosas). · Se sospecha un papel patógeno del CMV en la enfermedad del intestino irritable.

Se dispone de una prueba qPCR (CYMV) para cuantificar el número de copias presentes en los fluidos o tejidos corporales. Esta prueba puede realizarse en sangre, saliva y biopsias de tejido.

Existen pruebas de inmunoblot (SeroCMV) o de inmunocromatografía (CMVser) para evaluar la presencia de IgG e IgM contra el CMV en muestras de suero humano.

VIRUS EPSTEIN-BARR (EBV)

· El VEB (HHV-4) infecta a más del 90% de la población adulta mundial. · Se transmite por contacto salival; el virus se replica primero en el epitelio de la orofaringe antes de infectar los linfocitos B, donde persistirá de por vida en estado latente.

· La infección primaria suele producirse en los primeros años de vida y suele ser asintomática. En los países desarrollados, sin embargo, la infección primaria se retrasa a veces hasta el final de la adolescencia, y puede entonces dar lugar a una mononucleosis.

· En la mayoría de los individuos, la persistencia del virus no tiene consecuencias; sin embargo, en algunas personas el VEB está asociado al desarrollo de cáncer.

· Las infecciones por el VEB se asociaron por primera vez con el linfoma de Burkitt (un cáncer común que afecta a los niños en ciertas regiones de África) y se han implicado en la enfermedad de Hodgkin, el linfoma no Hodgkin y el carcinoma nasofaríngeo (en regiones asiáticas específicas).

· Además del cáncer, el VEB se ha relacionado con varias enfermedades inmunológicas. Al infectar las células T y NK, el VEB puede causar el síndrome hemofagocítico (EBV-AHS). · Hay pruebas de que la esclerosis múltiple puede producirse a veces como consecuencia de una infección por el VEB.

· Los anticuerpos séricos contra los antígenos del VEB se encuentran en un subgrupo de pacientes con SFC; dado que las infecciones por el VEB pueden dar lugar a una mononucleosis infecciosa, cuyos síntomas agudos son similares a los del SFC, en su día se propuso que el VEB fuera el principal agente causal.

Existe una prueba qPCR (EPBV) para cuantificar el número de copias presentes en los fluidos o tejidos corporales. Esta prueba puede realizarse en sangre, otros fluidos corporales y biopsias de tejido. Existen pruebas de inmunoblot (SeroEBV) o inmunocromatografía (SeroEBVimas) para evaluar la presencia de IgG e IgA contra el VEB en muestras de suero humano. El inmunoblot del VEB puede proporcionar información sobre la infección pasada, la reactivación y la infección en curso.

IV. Pruebas para detectar infecciones bacterianas (Inmunidad - Formulario de solicitud general)

Las infecciones bacterianas se prueban mediante pruebas de PCR y serología (inmunoblots e inmunoensayos). Nos centramos en la investigación de aquellas infecciones virales que han sido asociadas con afecciones crónicas y multifactoriales, como micoplasmas, clamidias, bacterias transmitidas por garrapatas, etc.

Un resumen especial está disponible para la guía sobre la prueba de infecciones transmitidas por garrapatas (ver el documento **Tick-borne related testing v2020**, disponible en inglés, holandés y francés).

Una asociación entre la enfermedad de Lyme (LYD) y otras infecciones transmitidas por garrapatas (TBI) durante el desarrollo fetal y en la infancia con autismo, trastornos del espectro autista (ASD) y síntomas autistas ha sido observada por numerosos médicos y padres.

· Bransfield et al. escribieron en 2008 un artículo de revisión (Med. Hypotheses 2008) para cotejar la información de las presentaciones de las conferencias sobre este tema con otras fuentes que abordan esta asociación. Indicaron que los datos preliminares sugieren que la Borreliosis puede ser un contribuyente en el 20- 30% de los TEA, y el *Mycoplasma* patógeno puede ser un contribuyente en el 58%.

· Kuhn et al. (Med. Hypotheses 2012) sugirió que la terapia antibiótica a largo plazo puede ser un tratamiento eficaz para los niños con comorbilidad de la enfermedad de Lyme y el trastorno del espectro autista.

PHELIX PHAGE TEST: Una forma innovadora de detectar bacterias intracelulares

¿Qué son los bacteriófagos?

Los fagos pertenecen a la forma de vida más simple y primitiva (virus). Son extraordinariamente específicos para el huésped bacteriano que infectan para propagarse. Pueden infectar rápidamente a su huésped e insertar su material genético en su huésped. Como resultado, producen un gran número de copias que pueden infectar aún más (y en algunos casos específicos diezmar) las bacterias que causan la infección. Lo más importante es que los bacteriófagos pueden tener capacidad para matar.

¿Por qué utilizar bacteriófagos como herramienta de diagnóstico?

Los bacteriófagos podrían convertirse en una herramienta de diagnóstico basada en el principio de que si hay fagos es porque hay bacterias vivas. Los fagos están en el torrente sanguíneo buscando bacterias desesperadamente, porque si no las encuentran, morirán. Y son mucho más numerosos que las bacterias (hay de 10 a 100 bacteriófagos por bacteria).

Hemos desarrollado un método directo y específico que es más sensible. Nuestro método de detección (patentado por Phelix R&D y Leicester University, WO2018083491A1) consiste en detectar la presencia de profagos superados en número en el ciclo lisogénico de las bacterias. Proponemos un ensayo de PCR más sensible, basado en fagos para detectar la enfermedad de Lyme y la fiebre recurrente causada por diferentes especies de *Borrelia*. Para ello, nos centramos en secuencias de ADN de fagos específicas de todas las especies de *Borrelia*: Enfermedad de Lyme y fiebre recurrente.

Este enfoque ofrece una mayor sensibilidad ya que hay muchos más fagos circulantes en comparación con las bacterias, por lo tanto es preciso y más sensible que las pruebas convencionales de PCR, que con frecuencia son negativas debido a la baja concentración bacteriana en la sangre. También es una prueba DIRECTA, evidenciando material genético propio de la bacteria en el cuerpo, en contraste con todas las pruebas indirectas existentes (ELISA, Western BLOT, LTT/ELISPOT). En segundo lugar, permite diferenciar entre los diferentes subtipos de bacterias (*B. burgdorferi* s.l., *B. miyamotoi*,...), así como las fiebres recurrentes. Finalmente, esta prueba es también la mejor opción para la detección temprana (recuerde que los anticuerpos necesitan varias semanas para aparecer...). Para más detalles, por favor vea el material dedicado a la prueba de Phelix Phage.

Pruebas de PCR

Existen pruebas de PCR para evaluar la presencia de ADN bacteriano en fluidos o tejidos corporales. Este examen se puede hacer en sangre, fluidos corporales (líquido cefalorraquídeo, saliva, hisopos vaginales, etc.), biopsias (intestinales, cutáneas, etc.), garrapatas, etc. Se pueden evaluar las siguientes bacterias: CHLP - *Chlamydia pneumoniae*, CHLT - *Chlamydia trachomatis*,

CHLPST - Chlamydia psittaci,

COXI - Coxiella spp., BRUC - Brucella spp., BORB - Borrelia burgdorferi sl., MYCPs - Mycoplasma spp. + Mycopl. Pneumoniae, BART - Bartonella spp., EHRL - Ehrlichia chaffeensis-canis, BABE - Babesia spp., ANAP - Anaplasma phagocytophilum, RICK - Rickettsia spp., MycoFERM - Mycoplasma fermentans, MidiMitoch - Midichloria mitochondrii.

ENSAYOS INMUNOS

Existen ensayos inmunológicos para evaluar la presencia de anticuerpos contra las siguientes bacterias en muestras de suero humano:

- ZONP - Cribado de zoonosis (serología) - Bartonella henselae, Borrelia burgdorferi, Coxiella burnetii, Rickettsia conorii
- TULAR - Serología de tularemia; si es positivo IgM ELISA de tularemia
- LEPTO - Serología de Leptospira IgM
- BruCAPT - Serología de Brucella.

La hibridación fluorescente in situ (**FISH**) está disponible para evaluar la infección por Babesia. Es la prueba más sensible para Babesia. Esta prueba se realiza en sangre total (tubo EDTA, no congelado).

La prueba **Mycobacterium QuantiFeron GOLD (Mycob)** detecta las respuestas in vitro a la infección por micobacterias midiendo la respuesta de IFN-gamma a los antígenos ESAT-6 o CFP-10. Esta prueba requiere un juego de tubos especial.

La presencia de espiroquetas de Borrelia también puede descubrirse mediante el examen microscópico de la sangre del dedo - prueba SlideBorrel (necesita 300µl de sangre de la yema del dedo).

IMMUNOBLOTS

Las pruebas de inmunoblot (los resultados se proporcionan con el diagrama) están disponibles para evaluar la presencia de anticuerpos contra las siguientes bacterias en muestras de suero humano:

- SeroBORREL - Borrelia IgG & IgM inmunoblot. Un inmunoensayo (inmunoblot) para la detección de anticuerpos IgG e IgM contra Borrelia burgdorferi en suero, plasma o LCR humano. Detecta anticuerpos contra cuatro genoespecies inmunopatógenas (B. burgdorferi sensu stricto, B. garinii, B. afzelii, B. spielmanii y B. bavariensis). Precisamente, permite detectar p100, VisE, p58, p41, p39, OspA (sin distinción de genoespecies), OspC de todas las genoespecies y p18 de todas las genoespecies. El objetivo de la prueba no es distinguir las genoespecies sino ofrecer la mayor cobertura en términos de detección de la enfermedad de Lyme.
- SeroCHLAM - Chlamydias IgG & IgA inmunoblot (Chlamydia pneumoniae, Chlamydia trachomatis, Chlamydia psittaci)
- SeroYERS - Yersinia IgG & IgA inmunoblot. Un inmunoblot para la detección de anticuerpos IgG e IgA contra todas las Yersinias patógenas por medio de las proteínas externas de Yersinia (YOPs). La diferenciación serológica de las infecciones por Y. enterocolitica e Y. pseudotuberculosis es posible por primera vez con el uso de nuevos antígenos específicos de la especie específicos de Yersinia (PsaA, MyfA).
- SeroTRPN - Treponema IgG & IgM inmunoblot
- SeroHPylor - Helicobacter pylori IgG & IgA inmunoblot

MYCOPLASMAS

Los micoplasmas son bacterias atípicas que viven como parásitos intra o extracelulares. Los micoplasmas pueden transmitirse a través de aerosoles (M. pneumoniae, M. fermentans, ambos en

la saliva); la transmisión sexual también es frecuente (*M. genitalium*). Las infecciones agudas por *M. pneumoniae* causan neumonía, bronquitis; la infección crónica en los pulmones puede agravar otras enfermedades respiratorias como el asma. Los micoplasmas pueden diseminarse desde su lugar de infección primario a otros órganos. El sistema nervioso central puede ser un objetivo, dando lugar a encefalitis; también es frecuente el ataque a las articulaciones y el desarrollo de artritis.

Las infecciones por micoplasma son especialmente frecuentes en los pacientes con SFC. Mediante la detección por PCR, se encontró *M. fermentans* en el 34% de los pacientes con SFC, frente al 8% de los controles sanos. Otro estudio demostró que más de dos tercios de los pacientes con SFC (frente al 5,6% de los controles) estaban infectados por al menos una especie de micoplasma (*M. fermentans*, *M. pneumoniae* o *M. hominis*). Esta alta prevalencia puede ser el resultado de la inmunodepresión típicamente observada en el SFC (baja actividad NK); sin embargo, las infecciones persistentes por micoplasma pueden contribuir a su vez a la etiología de la enfermedad al provocar una respuesta inflamatoria crónica.

Nicolson et al. (J Neurosci Res. 2007) examinaron la sangre de 48 pacientes del centro y el sur de California diagnosticados de trastornos del espectro autista (TEA) y descubrieron que un gran subconjunto (28/48 o el 58,3%) de los pacientes mostraba indicios de infecciones por *Mycoplasma* spp. en comparación con dos de 45 (4,7%) sujetos de control de la misma edad (odds ratio = 13,8, $P < 0,001$).

CHLAMYDIA TRACHOMATIS Y CHLAMYDIA PNEUMONIAE

Las clamidias son patógenos bacterianos intracelulares que causan infecciones generalizadas en los seres humanos. *C. trachomatis* es el patógeno bacteriano de transmisión sexual más común del mundo. *C. pneumoniae*, que se transmite a través de las secreciones respiratorias, provoca neumonía. El porcentaje de personas que muestran serología positiva a *C. pneumoniae* es elevado, llegando al 80% en adultos. Los organismos clamidianos tienen la capacidad de entrar en una etapa de crecimiento particular caracterizada por cuerpos reticulados que se dividen muy lentamente y pueden persistir en las células durante mucho tiempo. Esto da lugar a una infección crónica que, al inducir una respuesta inflamatoria sostenida, puede dar lugar a una serie de patologías graves.

- *Chlamydia pneumoniae*: Las infecciones agudas por *C. pneumoniae* causan neumonitis; la persistencia crónica del patógeno en los pulmones se ha relacionado con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, el asma e incluso el cáncer de pulmón. En los pulmones, *C. pneumoniae* puede infectar a los macrófagos alveolares y propagarse a otros órganos a través de la sangre. La infección puede transferirse directamente a las células endoteliales vasculares, lo que provoca una inflamación crónica del endotelio que favorece la aterogénesis. La infección por *Chlamydia* estimula la migración de monocitos a través de la barrera hematoencefálica, promoviendo la inflamación del sistema nervioso central. Se ha informado de un aumento de la prevalencia de las infecciones por *C. pneumoniae* en los pacientes con SFC.

- *Chlamydia trachomatis*: *C. trachomatis* tiene tropismo por las células epiteliales conjuntivales y urogenitales. Las infecciones oculares causan conjuntivitis que frecuentemente evolucionan a tracoma. Las infecciones urogenitales causan uretritis aguda. Al igual que *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* puede diseminarse fuera del lugar de la infección primaria. Varios días después de una infección genital, algunos pacientes desarrollan una artritis inflamatoria aguda, causada por organismos de *C. trachomatis* que han llegado a la articulación a través de monocitos circulantes. Una parte de estos pacientes desarrollará después una enfermedad artrítica crónica. Las infecciones clamidiales persistentes y crónicas pueden presentar pocos o ningún síntoma aparente. Sin embargo, siguen provocando una inflamación crónica que acabará causando la enfermedad. Esto, por supuesto, justifica en gran medida la detección de infecciones. Los monocitos aparecen como células huésped comunes para los organismos persistentes, y principales efectores de la diseminación sistémica. Por lo tanto, la prueba PCR en sangre completa es un enfoque adecuado para la detección de infecciones por *Chlamydia*.

BORRELIA

La *Borrelia burgdorferi* es una bacteria espiroqueta gramnegativa que causa la enfermedad de Lyme.

Las espiroquetas son un grupo de bacterias filogenéticamente distintas que tienen un modo único de motilidad mediante filamentos axiales (endoflagelos).

Las *Borrelia* se dividen en "genoespecies" que incluyen *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* y *B. afzelii*. El término utilizado para describir colectivamente todas estas genoespecies es *B. burgdorferi* sensu lato. *B. burgdorferi* invade la sangre y los tejidos de varios mamíferos y aves infectados a través de la picadura de garrapatas del género *Ixodes*. Se cree que el reservorio natural de *B. burgdorferi* es el ratón de patas blancas. Las garrapatas transfieren las espiroquetas a los ciervos, a los seres humanos y a otros animales de sangre caliente tras alimentarse de la sangre de un animal infectado. En la mayoría de los mamíferos, incluido el ser humano, la infección por *B. burgdorferi* puede provocar la enfermedad de Lyme.

La enfermedad de Lyme presenta una serie de síntomas que pueden confundirse con trastornos inmunológicos e inflamatorios. La inflamación alrededor de la picadura de la garrapata provoca lesiones en la piel. El eritema (crónico) migratorio (ECM), una lesión cutánea única que se expande con un claro central que tiene un aspecto anular, suele ser el primer estadio de la enfermedad. La artritis, la enfermedad neurológica y la enfermedad cardíaca pueden ser manifestaciones posteriores.

COINFECCIONES DE LA ENFERMEDAD DE LYME

En la enfermedad de Lyme se producen con frecuencia infecciones concurrentes. El impacto clínico y patológico de las coinfecciones se reconoció por primera vez en la década de 1990. Su sinergia patológica puede exacerbar la enfermedad de Lyme o inducir manifestaciones patológicas similares. Los agentes co-infecciosos pueden ser transmitidos junto con *Borrelia burgdorferi* por la picadura de la garrapata dando lugar a múltiples infecciones, pero una fracción de las co-infecciones se producen independientemente de la picadura de la garrapata.

Las coinfecciones clínicamente relevantes están causadas por las especies de *Bartonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma pneumoniae*. Las infecciones causadas por estos patógenos en pacientes no infectados por *Borrelia burgdorferi* pueden dar lugar a síntomas clínicos similares a los de la enfermedad de Lyme. Esto se aplica especialmente a las infecciones causadas por *Bartonella henselae*, *Yersinia enterocolitica* y *Mycoplasma pneumoniae*. La *Chlamydia trachomatis* causa principalmente poliartritis. *Chlamydia pneumoniae* no sólo provoca artritis, sino que también afecta al sistema nervioso y al corazón, lo que dificulta el diagnóstico diferencial. El diagnóstico es aún más complejo cuando se producen coinfecciones en asociación con la enfermedad de Lyme. (de Berghoff W. *Open Neurol J.* 2012;6:158-78.)

V. Pruebas para detectar parásitos

(Inmunidad - Formulario de solicitud general)

Además de las pruebas de heces para la evaluación de enfermedades parasitarias, ofrecemos los siguientes inmunoensayos (realizados en muestras de suero) para la investigación de la serología parasitaria:

- Serología de toxoplasmosis TOXO - IgG & IgM
- SCHIS - Esquistosomiasis (Bilharziosis) serología
- FILAR - Filariasis (Filariasis) serología
- FASCIO - Serología para fascioliasis.

PARA MÁS INFORMACIÓN:

Material disponible en el sitio web (www.redlabs.com)

CATÁLOGO EN LÍNEA : <https://catalog.redlabs.be/en/>

FORMULARIOS DE SOLICITUD : <https://redlabs.be/ordering/request-forms/>

Visite regularmente nuestro sitio web (www.redlabs.com) para ver las actualizaciones

Preguntas y contacto: - info@redlabs.be