



Diagnóstico precoz de la neumonía por *Mycoplasma pneumoniae* mediante la detección de IgM: estudio de dos técnicas serológicas

S. Bello Dronda, E. Chacón Vallés, M. Omeñaca Teres*, A. Esteban*, M. Gascón Pelegrín, A. Senar Calderón y A. Hernández Caballero

Servicio de Neumología. * Servicio de Microbiología. Hospital Miguel Servet. Zaragoza.

Para la evaluación del diagnóstico serológico precoz de la neumonía por *Mycoplasma pneumoniae*, se han evaluado dos métodos comerciales para la detección de IgM específica.

Se han estudiado un total de 86 sueros distribuidos de la siguiente forma: a) 28 pacientes diagnosticados de neumonía por *Mycoplasma pneumoniae* por seroconversión por fijación de complemento. En todos ellos se trabaja con la muestra inicial y fase de convalecencia (56 sueros). b) Un grupo control, en el que se usan los sueros correspondientes a la fase de convalecencia de 8 pacientes con neumonía por *Legionella*, de tres con psitacosis, otros tres con fiebre Q (todos ellos diagnosticados serológicamente) y otros 6 sueros con factor reumatoide a títulos altos y 10 sueros con títulos bajos a *Mycoplasma pneumoniae* en los que no ha habido una modificación significativa en la segunda muestra (total 30 muestras control).

El método usado ha sido un inmunoensayo de captura de IgM (ELISA) (Mp-test; Diatech Diagnostica; Israel) y el otro inmunofluorescencia para IgM (*Mycoplasma pneumoniae* IgM antibody Test System; Zeus, EE.UU.).

De las 28 muestras iniciales se ha encontrado positividad en 22 por ELISA (22/28) y en 15 para IF (15/28) con una sensibilidad de 78,6 y 53,6 %, respectivamente. Todas las muestras de la fase de convalecencia fueron positivas para ELISA (28/28) y dos fueron negativas para IF (26/28) con una sensibilidad del 100 y del 92,85 %, respectivamente. Sólo se encontró un falso positivo para IF y ninguno para ELISA. Se concluye que dada la alta sensibilidad y especificidad del test ELISA de captura de IgM, así como su bajo coste, es un método útil para el diagnóstico precoz de la infección por este microorganismo.

Early diagnosis of pneumonia due to *Mycoplasma pneumoniae* by detection of specific IgM antibodies: A comparative study of two serological techniques

We have evaluated early serological diagnosis of pneumonia caused by *Mycoplasma pneumoniae* by assessing two commercial methods for detection of specific IgM antibodies.

Eighty-six sera were taken for study from subjects distributed as follows: a) 28 patients diagnosed by complement fixation antibody test as having pneumonia due to *M. pneumoniae* (a total of 56 sera from initial and convalescent phase samples); b) 30 controls, consisting of 8 patients convalescing from *Legionella* pneumonia, 3 with Q fever diagnosed serologically, 6 with rheumatoid factor at high titres, and 10 with low titres of *M. pneumoniae* that changed insignificantly between the first and the second sample.

The two methods used were enzyme-linked immunoassay (ELISA) for detection of IgM antibodies (Mp-test, Diatech Diagnostica, Israel), and immunofluorescence (IF) for IgM (*M. pneumoniae* IgM Antibody Test System, Zeus, USA).

Analyzing the initial 28 samples, we obtained positive results in 22 using ELISA (22/28) and 15 using IF (15/28) (sensitivity of 78.6 and 53.6 %, respectively). All samples taken during the convalescent phase were positive by ELISA (28/28) and only 2 were negative by IF (26/28). We found only 1 false positive by IF and none by ELISA. We conclude that the high sensitivity and specificity of ELISA for the capture of IgM antibodies, along with its low cost, make this test useful for early diagnosis of *M. pneumoniae* infection.

Arch Bronconeumol 1993; 29: 373-378

Introducción

Mycoplasma pneumoniae (Mp) es uno de los más importantes agentes etiológicos de neumonía adquirida en la comunidad (NAC). Este microorganismo produce entre 11 y 15 millones de infecciones anuales en

Estados Unidos¹ y su incidencia como causa de NAC es variable, entre un 5-18 %². En un reciente estudio prospectivo de 453 NAC de 25 hospitales fue del 18 %, siendo la segunda causa más frecuente después de *Streptococcus pneumoniae*³. Dado el parecido clínico de esta neumonía con las producidas por otros gérmenes, como virus, *Chlamydia*, *Rickettsia*, etc., la mayoría son tratadas empíricamente al no disponerse habitualmente de un diagnóstico temprano que per-

Correspondencia: Dr. S. Bello Dronda.
Pº Sagasta 32-38, esc. 2, 6.º B. 50006 Zaragoza.

Recibido el 9-11-1992; aceptado para su publicación el 4-5-1993.



mita la instauración de un tratamiento antibiótico específico.

El método diagnóstico tradicional es la fijación de complemento (FC)⁴, que se establece en la fase de convalecencia cuando en ésta se encuentra una seroconversión o unos títulos cuatro veces superiores a la muestra inicial de la fase aguda, aunque también se acepta un solo título en convalecencia igual o superior a 1/64, si existe un cuadro clínico reciente compatible con infección por Mp^{1,5}. La FC no proporciona el diagnóstico, por tanto, cuando ha de tratarse la enfermedad. Se ha desarrollado también un cultivo específico que proporciona en el esputo unos resultados pobres debido al crecimiento más rápido de la flora bacteriana y fúngica de la boca que a menudo invade el medio¹ y habitualmente sólo sirve, como la FC, para un diagnóstico retrospectivo^{6,7}. También puede detectarse antígeno de Mp, pero esta técnica es compleja y de difícil disponibilidad⁷⁻⁹.

En los últimos años se han ensayado algunos métodos para la detección de IgM específicas contra Mp en suero con el fin de obtener un diagnóstico temprano de infección por este germen, como hemaglutinación indirecta^{10,11}, inmunobloting^{6,12}, inmunofluorescencia indirecta^{1,7,13}, aglutinación de micropartículas¹⁴, radioinmunoanálisis¹⁵ y enzimoimmunoanálisis (ELISA)^{1,5,7,9,12,14-16}.

Nosotros hemos estudiado la rentabilidad clínica de dos de estos métodos comercializados en un grupo de pacientes con neumonía por Mp demostrada.

Material y métodos

Material

Hemos estudiado de forma retrospectiva un total de 86 sueros congelados de pacientes, distribuidos de la siguiente forma:

El grupo de estudio estaba formado por 28 pares de sueros de pacientes con neumonía y que mostraban seroconversión desde títulos negativos a positivos, o bien un incremento de cuatro veces el título inicial por fijación de complemento (FC) para *Mycoplasma pneumoniae* (Mp). En todos los casos se realizaron dos extracciones de sangre, la inicial durante las primeras 24 horas después del ingreso del paciente en el hospital y la segunda, entre 2 y 4 semanas más tarde. El grupo constaba de 16 varones y 12 mujeres con rango de edades entre 1 y 48 años (media \pm DE = 10,58 \pm 10,89). Había 24 sujetos menores de 20 años y cuatro mayores. El comienzo de los síntomas hasta su llegada al hospital varió entre 5 y 16 días (7,8 \pm 2,3). A todos ellos se había practicado a su ingreso una radiografía de tórax en la que se apreciaban infiltrados pulmonares y el diagnóstico final establecido retrospectivamente fue de neumonía por Mp.

El grupo control lo constituían 30 sueros congelados correspondientes a: a) 8 pacientes con neumonía por *Legionella pneumophila* diagnosticada, pertenecientes a la segunda muestra de pares de sueros con incremento de sus títulos cuatro veces los iniciales por inmunofluorescencia indirecta; b) 3 pacientes con neumonía por *Chlamydia psittaci* (psitacosis); c) 3 pacientes con neumonía por *Coxiella burnetii* (fiebre Q). En estos dos últimos grupos se analizó la segunda muestra de sus pares de sueros, que había alcanzado un incremento de cuatro veces sus valores iniciales mediante

FC; d) 6 sueros con títulos elevados de factor reumatoide (FR), pertenecientes a pacientes diagnosticados de artritis reumatoide, y e) 10 muestras correspondientes a la segunda toma de pares de sueros con títulos no significativos frente a Mp investigados por FC, y que no habían sufrido ninguna variación entre la primera y la segunda muestra. Todos los títulos eran iguales o inferiores a 1/32. Estos sueros fueron considerados como residuales y pertenecientes a sujetos con infección no reciente por Mp. De los 30 controles había 18 varones y 12 mujeres, con rango de edades entre 18 y 56 años (35,2 \pm 12,84).

En ambos grupos, todos los sueros fueron analizados por duplicado y simultáneamente por ambas técnicas. Las muestras habían permanecido almacenadas a -20 °C.

Métodos

Fijación de complemento. Se utilizó antígeno de Mp comercial Behring (Behringwerke AG, Marburg, W. Germany), y el desarrollo de la técnica fue el descrito por Grist et al⁴.

Inmunofluorescencia indirecta. Como sustrato se utilizaron portaobjetos comerciales con antígeno de Mp fijado a los mismos (Zeus Mycoplasma Pneumonia IgM Antibody [Mp] Test System for the qualitative and semiquantitative detection of *Mycoplasma pneumoniae* IgM antibody by the indirect fluorescent antibody technique, USA). Se analizaron diluciones seriadas de los mismos a partir de su dilución inicial de 1/10. Como conjugado se utilizó un anticuerpo anti-IgM marcado con fluoresceína, previamente titulada a la dilución de 1/200 (Fluoline M, Bio-Mérieux, France). Todos los sueros antes de ser analizados fueron tratados con el reactivo RF-Sorbent (Behringwerke AG, Marburg, W. Germany), con el fin de evitar interferencias con las IgG y el factor reumatoide.

ELISA de captura de IgM. Los anticuerpos IgM específicos anti-Mp se midieron mediante la técnica comercial IgM-Mp Test; reverse ELISA test for the determination of specific IgM antibodies to *Mycoplasma pneumoniae* in human serum (Diatch Diagnostica, Israel). Tanto el desarrollo de la técnica como la lectura e interpretación de resultados se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

Resultados

Grupo de estudio

En la primera muestra la fijación de complemento (FC) resultó con títulos significativos en 7 pacientes y negativa en 21 (sensibilidad: 25 %). La inmunofluorescencia indirecta (IF) mostró títulos positivos en 15 y negativa, en los otros 13 (sensibilidad de 53,57 %). El ELISA fue positivo en 22 y negativo, en 6 (sensibilidad del 78,57 %). En la segunda se objetivaron títulos significativos (considerando como positivos los títulos iguales o superiores a 1/64), a los que se atribuye valor diagnóstico en un suero aislado en convalecencia en pacientes con cuadro reciente compatible con infección por Mp^{1,5}, en 26 sueros por FC, 25 por IF y 28 mediante ELISA (sensibilidades de 92,85, 89,28 y 100 %, respectivamente).

La tabla I muestra los resultados positivos en los primeros sueros de IF y de ELISA respecto a los días transcurridos desde el comienzo de los síntomas, así como los porcentajes acumulados de los mismos. En



ella podemos observar que en las 27 muestras extraídas en el 10.º día se consiguieron 14 resultados positivos por IF y 21 por ELISA (sensibilidades de 50 y 75 %, respectivamente). El suero extraído en el día 16 fue positivo por ambos métodos.

Del total de 28 sueros correspondientes a la primera muestra, 24 correspondieron a pacientes con edad inferior a 20 años. De ellos, 14 fueron positivos al analizarlos por IF (sensibilidad de 58,33 %) y 19, al testarlos por ELISA (sensibilidad de 79,16 %). De los 4 pacientes con más de 20 años, uno fue positivo con IF y tres lo fueron con ELISA.

Grupo control

De los 30 sueros de pacientes con psitacosis, fiebre Q y enfermedad de los legionarios, así como los de los sujetos con títulos elevados de factor reumatoide y los de infección por Mp no reciente, se registró un falso positivo para IF en un paciente con fiebre Q (especificidad de 96,66 %). No hubo, en cambio, ningún falso positivo para ELISA (especificidad del 100 %).

Discusión

Mycoplasma pneumoniae (Mp) es un germen que frecuentemente produce infecciones respiratorias, desde procesos leves de vías superiores, exacerbaciones de asma bronquial (el 21 % de asmáticos agudizados tuvieron evidencia de infección reciente por Mp en una serie)¹⁷, hasta neumonías y manifestaciones extrapulmonares muy diversas, como anemia hemolítica, síndrome de Stevens-Johnson, alteraciones neurológicas, cardíacas, artritis, hepatitis e incluso la muerte. La patogenia de estas manifestaciones no está bien aclarada; parecen desempeñar un importante papel fenómenos inmunológicos relacionados con Mp¹⁸, habiéndose relacionado la severidad de los síntomas con la respuesta de IgG y una subsiguiente reacción de hipersensibilidad¹², aunque se han reportado casos de invasión directa de Mp en el sistema nervioso central¹⁹. Se ha publicado también la existencia de una depresión transitoria de la función inmune²⁰, y la aparición de factor reumatoide IgM (complejos IgG-IgM-RF) tras infección por Mp^{17, 21}.

A pesar de tener tratamiento antibiótico eficaz, éste no puede aplicarse habitualmente en la fase aguda de la neumonía conociendo el agente etiológico, puesto que sólo se suele conocer una vez evolucionada ésta mediante la técnica de fijación de complemento (FC), que precisa una seroconversión, un incremento de cuatro veces los títulos iniciales en el caso de que existan muestras en la fase aguda y en la de convalecencia, o un solo título $\geq 1/64$ que suele obtenerse tardíamente, y si ha existido un cuadro clínico compatible con neumonía por Mp¹⁻⁵. Los inferiores a esta cifra no se consideran significativos y se atribuyen a infecciones no recientes. Otros autores establecen el punto de corte en 1/128¹⁴. Al depender estos títulos de la respuesta inmunitaria del paciente, su sensibilidad es variable y es considerada baja por algunos autores

TABLA I
Resultados IgM para Mp por ambas técnicas (porcentaje de positivos en el primer suero en relación con el comienzo de los síntomas)

Días de evolución	IF			ELISA	
	Número	+	Porcentaje acumulado	+	Porcentaje acumulado
5	3	0	0	1	3,57
6	8	4	14,28	6	25
7	3	3	25	3	35,71
8	4	2	32,14	3	46,42
9	4	2	39,28	4	60,71
10	5	3	50	4	75
16	1	1	53,57	1	78,57

Resultados positivos por IF y ELISA en la primera muestra en relación con el número de días desde el comienzo de los síntomas y sus porcentajes acumulados.

cuando se compara con otras técnicas más modernas^{1, 18}. También ha sido puesta en duda una alta especificidad, por la existencia de reacciones cruzadas del antígeno glucolípido de la FC con componentes de las membranas de los tejidos del huésped^{6, 14} y otros agentes bacterianos²². Sin embargo, estas reacciones cruzadas han sido sólo demostradas en pacientes con manifestaciones clínicas extrapulmonares y en niños asintomáticos¹⁴. La FC detecta cualquier tipo de Ig (M, G, A) frente a Mp, sin distinguir una de otra.

Aunque es posible cultivar Mp, resulta difícil¹ y lento, sirviendo muchas veces sólo para el diagnóstico después de la enfermedad aguda^{6, 7}. La detección de antígeno de Mp en secreciones respiratorias ha sido desarrollada, mostrando una sensibilidad superior a la del cultivo²³, pero este método es complejo y no ha sido extensamente aplicado⁷⁻⁹. Además, se recomienda asociarlo al examen serológico para una cobertura diagnóstica completa²³.

Con el fin de conseguir un diagnóstico precoz y de más fácil aplicación de infección por Mp se han ensayado en los últimos años diversos métodos serológicos para detectar IgM específica^{1, 5, 7, 9-16}, debido a su aparición precoz en suero después de la infección.

La IgM aparece en la sangre al final de la primera semana tras el comienzo de los síntomas^{12, 24}, alcanzando su pico entre los 10 y los 30 días y es indetectable entre 12 y 26 semanas después²⁴. La IgG no aparece hasta la segunda semana, llega a su nivel máximo a las 4-5 semanas o más tarde, y permanece elevada algunos meses. Parece que, a diferencia de los niños, los adultos, especialmente los grupos de mayor edad, producen en menor proporción respuestas IgM, hecho que se ha explicado por la mayor incidencia de reinfecciones en estos últimos^{12, 14}. Incluso ha sido publicado un caso de un paciente con infección aguda que tenía títulos altos de IgG preinfección y que no produjo una respuesta IgM detectable¹².

Los dos métodos más utilizados para la detección de IgM específica contra Mp son el test de inmunofluorescencia indirecta (IF) y el enzoinmunoanálisis



sis (ELISA)¹. Ambos métodos han demostrado una mayor sensibilidad que la FC^{1, 18} y una buena correlación entre ellos²⁵ en la investigación de anticuerpos contra Mp. La sensibilidad de la IF tomando como referencia a la FC se ha reportado en torno al 87 %, y la de ELISA, entre 71-87,5 %, y su especificidad, de 81 y de 80-96,3 %, respectivamente^{1, 26}. Esto podría hacer pensar que la sensibilidad del test de referencia con el que se seleccionaron los sueros (FC) es superior a IF y ELISA, pero hay que tener en cuenta que en las series publicadas se comparaban títulos elevados de FC, pertenecientes casi en su totalidad a la fase de convalecencia de los pacientes y no a la fase aguda. Además, en un reciente estudio comparativo entre los tres métodos¹, se observó una mayor sensibilidad y títulos más elevados mediante IF y ELISA que en FC. Por otra parte, se han demostrado sueros con FC negativa y ELISA²⁶ e IF¹ positivos y a títulos crecientes.

Nosotros hemos utilizado como referencia la FC en nuestro grupo de pacientes siguiendo como criterio diagnóstico la seroconversión (de negativo a positivo) o el incremento de cuatro veces los valores iniciales séricos por ser un método convencional con las suficientes garantías de diagnóstico de infección reciente por Mp. Además no se han demostrado reacciones cruzadas de FC en pacientes con neumonía¹⁴, que presentaban todos nuestros enfermos.

La toma de 2 muestras nos ha permitido comparar la sensibilidad de los tres métodos tanto en la fase inicial como en la de convalecencia. Sólo siete de 28 (25 %) tuvieron títulos significativos de FC en el primer suero, mientras la IF fue positiva en 15 (53,57 %) y ELISA, en 22 (78,57 %). En la segunda muestra, IF mostró valores significativos en 25 sueros (89,3 %) y ELISA, en los 28 (100 %). Quedó por tanto patente la superioridad de IF y ELISA sobre FC en cuanto a sensibilidad en la fase precoz de la enfermedad.

Se ha publicado que Mp *in vitro* es capaz de activar a las células T, que producen unos factores helper no específicos, induciendo a las células B a fabricar anticuerpos de la clase IgM e IgG que reaccionaban con antígenos de ciertos virus²⁷. Así mismo, se han descrito otras reacciones cruzadas, como la aparición de seroconversiones de FC e IF para Mp en legionelosis demostradas²⁸, y de FC y ELISA en pacientes con meningitis bacteriana, atribuyéndose a anticuerpos inespecíficos frente al polisacárido capsular de *N. meningitidis*²⁹. Aunque se han descrito reacciones cruzadas de Mp con otras especies de *Mycoplasma*, como *M. genitalium*, esto no parece tener un papel sustancial en el diagnóstico serológico de infección por Mp³⁰. En nuestro grupo control incluimos los sueros en fase de convalecencia de 8 pares de muestras con seroconversión o aumento de cuatro veces el título a *Legionella 9* (IF-IgG), tres a *C. psittaci* (FC), tres a *C. burnetii* (FC) (todos los pacientes habían tenido una neumonía por estos agentes demostrada serológicamente). Tan sólo encontramos un falso positivo en IF en un sujeto con fiebre Q y ninguno con ELISA. En otros 10 controles con títulos residuales (no significa-

tivos y sin clínica reciente de infección) a Mp no hemos encontrado ningún positivo para IgM en ninguna de las dos técnicas, lo que demuestra aún más su utilidad en los procesos agudos.

Sin embargo, uno de los principales responsables de falsos positivos en las técnicas de detección de IgM específica contra Mp es el factor reumatoide³¹. Ello es debido a que la anti-IgM marcada con fluoresceína (IF), o unida a la enzima (ELISA), reconoce al componente IgM del FR (IgG-IgM) unido al antígeno por su componente IgG (caso de ser anti-Mp) erróneamente como una IgM específica frente a Mp. Además es frecuente la aparición de FR en infecciones por este germen^{17, 21}. Nuestro grupo control también incluía el suero de 6 sujetos con títulos elevados de FR, aunque sin relación conocida con infección por Mp, siendo negativo en todos ellos para ambas técnicas. En todos nuestros sueros, absorbimos el FR mediante precipitación con anti-IgG antes de analizarlos por IF. También se han descrito algunas técnicas de separación de IgG, como ultracentrifugación a través de gradientes de densidad en sacarosa³² y tratamiento del suero con proteína A antiestafilocócica³³, entre otras. En el ELISA anti-mu de captura IgM descrito por Wreghitt y Sillis¹⁶ que hemos utilizado no existe tal problema, debido a que se separan selectivamente las IgM del suero mediante una anti-IgM (en vez de un antígeno) unida a un soporte sólido.

Por tanto, la especificidad de ambos métodos fue sumamente alta, del 96,66 % para IF y del 100 % para ELISA. En la serie de Lee et al¹ se observó una especificidad del 81 % para IF, pero se incluía también detección de IgG. La del ELISA fue sólo del 71 %, pero, al determinarse también IgG, se utilizó un ELISA convencional, y no uno de captura de IgM, como en nuestros pacientes. Con este último sistema, se han publicado especificidades del 96,22¹⁴ y 96 %³⁴, con falsos positivos en infecciones por virus *Parainfluenza 3* e *Influenza B*¹⁴, y *Chlamydia* y *S. pneumoniae*³⁴.

En los dos estudios mencionados y en otros³⁵ que también han utilizado este ELISA de captura IgM se han empleado simultáneamente pares de sueros con incrementos significativos en sus títulos, y sueros únicos de pacientes con un solo título considerado positivo, debido a que su finalidad principal era el estudio de la sensibilidad y especificidad globales de esta técnica y no su rendimiento clínico en el diagnóstico precoz de la neumonía por Mp, como ha sido nuestro propósito. Sin embargo, cuando han analizado los resultados de sus pares de sueros^{14, 35}, han llegado a conclusiones similares a las reflejadas en nuestro estudio, es decir, que se llega a un porcentaje alto de positivos en la primera muestra cuando ésta se toma a partir del día 9-10 desde el comienzo de los síntomas (en torno al 75-80 % de diagnósticos), que en los días 6-8 se diagnostican entre el 40-50 % de los casos y menos si la muestra es recogida más tempranamente. Los días transcurridos entre el comienzo de la enfermedad y la llegada del paciente al hospital nos hubieran permitido tener el diagnóstico unas 24 horas después de nuestra primera visita al paciente en cerca del



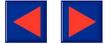
80 % de los casos. La sensibilidad de la IF, aunque interesante, fue considerablemente inferior.

Otro aspecto importante es el de las diferencias en la sensibilidad de las determinaciones de IgM en relación a la edad del paciente. Se han reportado diferencias significativas entre niños y adultos también en estas técnicas (usando 20 años como punto de corte)³⁵, aunque la magnitud de dichas diferencias no está aún bien establecida. En un reciente estudio en el que se evaluaron con ELISA de captura de IgM 120 pacientes con infección por Mp diagnosticada por FC (no en estadio precoz), se encontró una sensibilidad del 100 % en menores de 15 años, y del 82 % en los mayores. En nuestra serie sólo había 4 pacientes mayores de 20 años y, aunque tres de ellos fueron positivos en fase precoz con este test, y los cuatro lo fueron en la segunda muestra, dado su escaso número no cabe sacar ninguna conclusión al respecto.

En definitiva, pensamos que estos dos tests, en especial el ELISA, son muy útiles para el diagnóstico precoz de neumonía por Mp, debiéndose practicar a los pacientes con sospecha de esta enfermedad en la primera visita. Si el primer resultado es negativo, especialmente si la muestra es de antes de los 9-10 días tras el comienzo de los síntomas, debería obtenerse una segunda muestra una vez cumplido el día 10. El ELISA ha demostrado una gran fiabilidad, lo que unido a su rapidez en el diagnóstico y su bajo costo (unos 5 dólares cada determinación) aconseja su utilización de forma sistemática, sobre todo en niños y adultos jóvenes, que son los grupos más afectados por la enfermedad. Aunque en adultos también debe practicarse este test, parece necesaria también la determinación de FC clásica, al menos cuando resulte negativa la detección de IgM, siendo necesarios estudios al respecto.

BIBLIOGRAFÍA

- Lee SH, Charoenying S, Brennan T, Markowski M, Mayo DR. Comparative studies of three serologic methods for the measurement of *Mycoplasma pneumoniae* antibodies. *AJCP* 1989; 92:342-347.
- MacFarlane JT. Treatment of lower respiratory infections. *Lancet*, 1987 Dec 19, 2(8573):1.446-1.449.
- The British Thoracic Society and the Public Health Laboratory Service: Community-acquired pneumonia in adults in British hospital in 1982-1983: a survey of aetiology, mortality, prognostic factors and outcome. *Q J Med* 1987; 62:195-220.
- Grist NR, Bell EJ, Follet EAC, Urquhart GED. Diagnostic methods in clinical virology. Ed. Blackwell Scientific Publications (3.^a ed.). Oxford 1979; 95-115.
- Uldum SA, Sondergard-Andersen J, Skov Jensen J, Lind K. Evaluation of a commercial enzyme immunoassay for detection of *Mycoplasma pneumoniae* specific immunoglobulin G antibodies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 9:221-223.
- Cimolai N, Mash D, Thomas E, Middleton PJ. Rapid immunoblot method for diagnosis of acute *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 9:223-226.
- Barker CE, Sillis M, Wreghitt TG. Evaluation of Serodia Myco II particle agglutination test for detecting *Mycoplasma pneumoniae* antibody: comparison with mu-capture ELISA and indirect immunofluorescence. *J Clin Pathol* 1990; 43:163-165.
- Cimolai N, Schryvers A, Bryan LE, Woods DE. Culture-amplified immunological detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1988; 9: 207-212.
- Kok TW, Varkanis G, Marmion BP, Martin J, Esterman A. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. I. Direct detection of antigen in respiratory exudates by enzyme immunoassay. *Epidemiol Infect* 1988; 101:669-684.
- Kok TW, Marmion BP, Varkanis G, Worswick DA, Martin J. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* by a modified indirect haemagglutination test. *Epidemiol Infect* 1989; 103:613-623.
- Coombs RR, Easter G, Matejtschuk P, Wreghitt TG. Red-cell IgM-antibody capture assay for the detection of *Mycoplasma pneumoniae*-specific IgM. *Epidemiol Infect* 1988; 100:101-109.
- Jacobs E, Bennewitz A, Bredt W. Reaction pattern of human anti-*Mycoplasma pneumoniae* antibodies in enzyme-linked immunosorbent assays and immunoblotting. *J Clin Microbiol* 1986; 23:517-522.
- Carter JB, Carter SL. Acute phase, indirect fluorescent antibody procedure for diagnosis *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Ann Clin Lab Sci* 1983; 13:150-155.
- Echevarría JM, León P, Balfagón P, López JA, Fernández MV. Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection by microparticle agglutination and antibody-capture enzyme-immunoassay. *Eur J Microbiol Infect Dis* 1990; 9:217-220.
- Price PC. Direct radioimmunoassay for the detection of IgM antibodies against *Mycoplasma pneumoniae*. *J Immunol Methods* 1980; 32:261-273.
- Wreghitt TG, Sillis M. A micro-capture ELISA for detecting *Mycoplasma pneumoniae* IgM: comparison with indirect immunofluorescence and indirect ELISA. *J Hyg (Lond)* 1985; 94: 217-227.
- Seggey Js, Lis I, Siman-Tov R, Gutman R, Abu-Samara H, Schey G, Naot Y. *Mycoplasma pneumoniae* is a frequent cause of exacerbation of bronchial asthma in adults. *Ann Allergy* 1986; 57:263-265.
- Ali NJ, Sillis M, Andrews BE, Jenkins PF, Harrison BD. The clinical spectrum and diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Q J Med* 1986; 58:241-251.
- Abramovitz P, Schvartzman P, Harel D, Lis I, Naot Y. Direct invasion of the central nervous system by *Mycoplasma pneumoniae*: a report of two cases. *J Infect Dis* 1987; 155:482-487.
- Sabato AR, Cooper DM, Thong YH. Transitory depression of immune function following *Mycoplasma pneumoniae* infection in children. *Pediatr Res* 1981; 15:813-816.
- Mizutani H. Immunoglobulin M rheumatoid factor in patients with mycoplasmal pneumonia. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134:1.237-1.240.
- Brunner H, Prescott B, Greenberg H, James WD, Horswood RL, Chanock RM. Unexpected high frequency of antibody to *Mycoplasma pneumoniae* in human sera as measured by sensitive techniques. *J Infect Dis* 1977; 135:524-530.
- Kochk TW, Varkanis G, Marmion BP, Martin J, Esterman A. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. I. Direct detection of antigen in respiratory exudates by enzyme immunoassay. *Epidemiol Infect* 1988; 101:669-684.
- Moule JH, Caul EO, Wreghitt TG. The specific response to *Mycoplasma pneumoniae* infection: interpretation and application to early diagnosis. *Epidemiol Infect* 1987; 99:685-692.
- Wreghitt TG, Sillis M. An investigation of the *Mycoplasma pneumoniae* infections in Cambridge in 1983 using mu-capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), indirect immunofluorescence (IF) and complement fixation (FC) tests. *Isr J Med Sci* 1987; 23:704-708.
- Chia WK, Spence L, Dunkley L, Bradbury W. Development of urease conjugated enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for the detection of IgM and IgG antibodies against *Mycoplasma pneumoniae* in human sera. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1988; 11:101-107.
- Biberfeld G, Arneborn P, Forsgren M, von Stedingk LV, Blomqvist S. Non-specific polyclonal antibody response induced by *Mycoplasma pneumoniae*. *Yale J Biol Med* 1983; 56:639-642.



28. Bornstein N, Fleurette J, Bosshard S, Bouvet C, Thouvenot D, Aymard M. Evaluation of the incidence of serological cross reactions between *Legionella* and *Mycoplasma* or *Chlamydia*. *Pathol Biol (Paris)* 1984; 32:165-168.
29. Kleemola M, Kayhty H. Increase in titers of antibodies to *Mycoplasma pneumoniae* in patients with purulent meningitis. *J Infect Dis* 1982; 146:284-288.
30. Brecht W, Kleinmann B, Jacobs E. Antibodies in the sera of *Mycoplasma pneumoniae*-infected patients against proteins of *Mycoplasma genitalium* and other mycoplasmas of man. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg* 1987; 266:32-42.
31. Dussaix E, Slim A, Tournier P. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and complement fixation test for detection of *Mycoplasma pneumoniae* antibodies. *J Clin Pathol* 1983; 36:228-232.
32. Chamberlain P, Saeed AA. A study of the specific IgM antibody response in *Mycoplasma pneumoniae* infection in man. *J Hyg (Lond)* 1983; 90:207-211.
33. Roach EB, Benn RA, Kappagoda NK. Measurement of IgM antibodies in the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae*. *Pathology* 1980; 12:519-524.
34. Hirschberg L, Krook A, Pettersson CA, Vikerfors T. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Mycoplasma pneumoniae* specific immunoglobulin M. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988; 7:420-423.
35. Vikerfors T, Brodlin G, Grandien M, Hirschberg L, Krook A. Detection of specific IgM antibodies for the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections: a clinical evaluation. *Scand J Infect Dis* 1988; 20:601-610.