

COMUNICACIÓN CORTA

Concordancia de antígenos de dengue en el ELISA de captura de IgM (MAC ELISA) en el IICS-UNA**Concordance of dengue antigens M antibody-capture ELISA (MAC ELISA) in the IICS-UNA**

***Aria L^I, Guillén Y^I, Rojas A^I, Acosta ME^I, Roig C^I, Meza T^I,
Carpinelli M^{II}, Ferreira L^{II}**

^IDepartamento de Producción-Bioquímica del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de Asunción (UNA), Paraguay

^{II}Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de Asunción (UNA), Paraguay

RESUMEN

El dengue es una enfermedad aguda grave considerada actualmente como infección reemergente, cuyo vector principal es el *Aedes aegypti*. En Paraguay en el 2007 fueron reportados 28.181 casos, 55 se clasificaron como fiebre hemorrágica del dengue de los cuales 7 fallecieron. El 90% de los casos fueron de Asunción y del Departamento Central, 10% del resto del país. En los últimos años se han desarrollado diferentes sistemas inmunoenzimáticos para el diagnóstico del dengue, entre ellos el ELISA de captura de IgM (MAC ELISA). El objetivo de este estudio observacional analítico de corte transversal fue comparar la prueba del MAC ELISA desarrollada en el Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS) utilizando antígenos suministrados por el Instituto Pedro Kouri (IPK) de Cuba y el Evandro Chagas de Brasil, con el kit comercial ELISA IgM por captura para virus del dengue (*Focus Diagnostics Inc. Cypress, CA, USA*). Fueron seleccionados al azar 92 sueros de pacientes codificados que concurren al IICS con sospecha de dengue, respetándose la confidencialidad de los mismos. La concordancia obtenida fue del 94.6% (Índice Kappa: 0.891) utilizando el antígeno del IPK y 96.7% (Índice Kappa: 0.9350) con el antígeno del Evandro Chagas, mostrándose alta significancia estadística ($p < 0.00001$) en ambos casos. La excelente concordancia obtenida con los dos antígenos indica que los mismos pueden ser utilizados indistintamente en la prueba del MAC ELISA desarrollada en el IICS, a fin de apoyar el diagnóstico del dengue a menor costo y que sería de producción local.

Palabras claves: dengue, MAC ELISA, antígeno.

ABSTRACT

Dengue is an acute disease currently considered a re-emerging infection, whose main vector is *Aedes aegypti*. In 2007, 28,181 cases were reported in Paraguay, 55 were classified as dengue hemorrhagic fever and seven of them died. Ninety percent of the cases were from Asunción and the Central Department and the remaining 10% from the rest of the country. In recent years various immunoenzymatic systems have been developed immunoassay for the diagnosis of dengue, including the M antibody capture ELISA (MAC ELISA). The aim of this cross-sectional observational study was to compare the MAC ELISA test developed at the Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS) using antigens supplied by the Instituto Pedro Kouri (IPK) of Cuba and Evandro Chagas of Brazil with a commercial kit of M antibody capture ELISA for dengue virus (*Focus Diagnostics Inc. Cypress, CA, USA*). Ninety two coded serum samples were randomly selected from patients who attended the IICS with suspected dengue,

*Autor Correspondiente: **QA. Laura Aria**. Dpto. de Producción Bioquímica

Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. Río de la Plata y Lagerenza. Asunción-Paraguay

Email: produccion@iics.una.py. Fecha de recepción: Abril de 2010, Fecha de aceptación: Noviembre de 2010

respecting their confidentiality. The concordance obtained was 94.6% (Kappa Index: 0.891) using the IPK antigen and 96.7% (Kappa index: 0.9350) with the antigen from Evandro Chagas showing high statistical significance ($p < 0.00001$) in both cases. The excellent concordance obtained with the two antigens indicates that they can be used indistinctly in the MAC ELISA test developed in the IICS to support the diagnosis of dengue at a lower cost and would be locally produced.

Keywords: dengue, MAC ELISA, antigen.

INTRODUCCIÓN

El complejo dengue está integrado por 4 serotipos (DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4), que son miembros de la familia *flaviviridae*, género *flavivirus* y presentan una morfología y estructura genómica común. Estos agentes comparten determinantes antigénicos comunes entre todos los miembros de la familia *flaviviridae* y presentan además, antígenos específicos propios de cada serotipo viral (1).

Las enfermedades producidas por *flavivirus* transmitidas por mosquitos son hoy día consideradas infecciones reemergentes, por el incremento en la incidencia observada en los últimos años de la fiebre amarilla y principalmente del dengue y la fiebre hemorrágica del dengue (FHD) (2-5). Por lo general, la enfermedad causada por virus dengue ocurre en áreas tropicales y afecta a más de 100 millones de personas al año (6).

En el Paraguay, la reaparición del dengue se produjo hacia el año 1989, con 41.990 casos registrados del serotipo 1. Luego de un período de silencio epidemiológico de casi diez años, se originó un segundo brote en el año 1999, extendiéndose hasta el año 2000 con 24.282 casos y una estimación de 300.000 casos. Entre marzo y abril del 2006 se registró otro brote importante del serotipo 3 totalizando 1.884 casos confirmados por el Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social (7). Hasta junio del 2007 se registraron 55 casos de FHD, de los cuales 7 tuvieron desenlace fatal (8). En total en ese año se diagnosticaron 28.181 casos en el país, siendo la tasa de incidencia de 469 x 100 000 habitantes (9).

Ante la carencia de tratamiento farmacológico e inmunoprofilaxis, la Organización Mundial de la Salud (OMS) define como estrategia global para el control del dengue incluyendo entre otros componentes, la vigilancia basada en el laboratorio (10). De esta manera la confirmación laboratorial rápida de infecciones, es esencial para instituir medidas eficaces de control (11).

Así, la vigilancia se hace rutinariamente por serología, la cual detecta anticuerpos IgM, siendo el MAC-ELISA (ELISA de captura de IgM) el procedimiento más utilizado por ser económico y fácil de ejecutar (12).

En el Instituto de Investigación en Ciencias de la Salud en el año 2000 se desarrolló la prueba del MAC ELISA IgM lográndose una sensibilidad y especificidad del 82% y 99% respectivamente (13).

El objetivo de este estudio fue comparar la prueba del MAC ELISA desarrollada en el Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS) con el Kit comercial ELISA IgM por captura para virus del dengue (*Focus Diagnostics Inc. Cypress, CA, USA*).

En nuestro país los kits comerciales tienen un elevado costo por ser éstos importados, por lo que el resultado de este estudio posibilitaría apoyar el diagnóstico serológico del dengue con la utilización de kits de menor costo por ser estos de producción local.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este es un estudio observacional y analítico de corte transversal, que incluyó a 92 pacientes cuyos sueros (positivos y negativos) fueron testados previamente con un reactivo comercial "ELISA IgM por captura para virus del dengue" (*Focus Diagnostics Inc., Cypress, CA, USA*). Los pacientes concurren al Departamento de Inmunología Humoral

del IICS entre febrero y abril del 2007. El muestreo fue probabilístico, aleatorio simple de sueros codificados respetándose la confidencialidad de los mismos. Fueron excluidos del estudio los sueros lipémicos, ictericos y hemolizados.

Antígenos: Se utilizaron el antígeno liofilizado de dengue suministrado por el IPK (Instituto Pedro Kouri) de Cuba, constituido por un pool de los serotipos DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4 y el antígeno donado por el Instituto Evandro Chagas de Brasil compuesto por el serotipo DEN- 1.

Conjugado: Preparado con anticuerpo anti-dengue de suero hiperinmune de un paciente con segunda infección de dengue. Las inmunoglobulinas IgG anti-dengue del suero fueron purificadas por cromatografía de intercambio iónico DEAE celulosa. La conjugación fue realizada con peroxidasa (POD) (14).

Prueba de ELISA de captura de IgM (MAC-ELISA): El procedimiento se desarrolló en el Departamento de Producción-Bioquímica del IICS y consistió en sensibilizar placas de poliestireno (*Nunc-immunoplates*) con anticuerpos anti-IgM humano de cabra (comercial) dejándose toda la noche a 4°C. Al día siguiente fueron saturadas con leche descremada en buffer carbonato por una hora a temperatura ambiente y luego la post-saturación con PBS-leche descremada. Las muestras de pacientes y controles fueron incubadas en las placas sensibilizadas por una hora a 37°C en cámara húmeda, luego se realizaron cinco lavados con PBS-Tween. Posteriormente se añadió el antígeno de dengue y se incubó por 18 horas a 4°C. Se volvió a lavar cinco veces con PBS-Tween y se agregó el conjugado, se incubó una hora a 37°C y se lavó nuevamente siete veces con PBS-Tween, se añadió el sustrato ABTS incubando luego por 15 minutos en cámara húmeda. La lectura se realizó en el lector de ELISA (*Biorad 450, Japón*) a 405nm (15).

Prueba de ELISA IgM por captura para virus del dengue. Focus Diagnostics Inc., Cypress, CA, USA: Prueba cualitativa para la detección de anticuerpos séricos humanos IgM contra el virus dengue. El antígeno contiene iguales porciones de los cuatro serotipos del virus dengue.

Análisis estadísticos: El análisis de la concordancia entre la prueba de MAC-ELISA de producción local con antígenos del IPK y del Evandro Chagas frente al kit comercial ELISA IgM por captura para virus del dengue (*FOCUS Diagnostics Inc.*) se realizó mediante el cálculo del índice kappa utilizando el paquete estadístico Epi-dat versión 2.0 para Windows. Los valores de concordancia del índice kappa según Landis y Koch son: pobre <0, leve entre 0 y 0.20, baja entre 0.21 y .40, moderada entre 0.41 y 0.60, buena entre 0.61 y 0.80, casi perfecta o excelente entre 0.81 y 1.00 (16).

RESULTADOS

La prueba del MAC ELISA para la detección de anticuerpos IgM anti dengue desarrollado en el IICS con el antígeno IPK tuvo una concordancia del 94.6% con un Índice Kappa de 0.891 (IC 95% 0.797-0.983) y $p < 0.00001$, (tabla 1) y con el antígeno de Evandro Chagas fue del 96.7% de concordancia con un Índice Kappa de 0.9350 (IC 95% 0.862-0.1.00) y $p < 0.00001$. (tabla 2).

La concordancia obtenida con ambos antígenos comparado con el Kit comercial es excelente según la escala de Landis y Koch.

Tabla 1. Concordancia del MAC-ELISA IgM utilizando antígeno IPK Vs. Kit comercial

MAC-ELISA antígeno IPK	Focus Diagnostics Inc.		
	+	-	total
+	48	5	53
-	0	39	39
Total	48	44	92

Tabla 2. Concordancia del MAC ELISA IgM utilizando antígeno del Evandro Chagas Vs. Kit comercial

MAC- ELISA antígeno E.Chagas	Focus Diagnostics Inc.		
	+	-	total
+	45	0	45
-	3	44	47
total	48	44	92

DISCUSIÓN

La emergencia de la fiebre hemorrágica del dengue y la continua aparición de casos de dengue informados en el país refuerzan la importancia de los métodos laboratoriales para la detección de la infección debida al virus. Existen por lo menos dos razones para la vigilancia en casos de dengue: la primera porque se requieren confirmar los casos teniendo en cuenta que existen enfermedades clínicamente semejantes como sarampión, influenza, leptospirosis, fiebre tifoidea, malaria y otras e igualmente frecuentes; la segunda porque se ha demostrado que el riesgo de epidemias de dengue e incremento de casos hemorrágicos puede depender del serotipo y la cepa del virus que este circulando (17).

En la mayoría de las localidades donde ocurre el dengue la vigilancia de casos se realiza por métodos laboratoriales como la serología para IgM empleando la prueba de ELISA de captura (MAC-ELISA). Debido a que los anticuerpos IgM anti-dengue se producen transitoriamente durante las infecciones primaria y secundaria y su detección indica una infección activa o reciente, la puesta en evidencia de estos anticuerpos se ha convertido en una herramienta de incalculable valor muy importante y útil en el diagnóstico de esta patología (1).

De acuerdo a los resultados obtenidos a partir de este estudio utilizando la prueba de ELISA de captura de IgM desarrollada en el IICS y comparando con una prueba de ELISA comercial (*Focus Diagnostics, USA*) se demuestra excelente concordancia, estadísticamente significativa y similar para ambos antígenos (el del Instituto Pedro Kouri de Cuba compuesto por los cuatro serotipos del virus dengue y el del Instituto Evandro Chagas de Brasil constituido por un solo serotipo, DEN-1). Por ello que consideramos que éstos pueden utilizarse indistintamente en la mencionada prueba para detectar anticuerpos IgM anti dengue en pacientes comprometidos.

Estos hallazgos contrastan con los del estudio realizado por Wu y colaboradores donde se efectuó una comparación de dos antígenos, uno compuesto por los cuatro serotipos de dengue y otro por un solo serotipo: DEN-2. En dicho estudio se obtuvieron mejores resultados con el antígeno constituido por los cuatro serotipos, esta diferencia se debió a que los pacientes que dieron falsos negativos con la prueba que contenía el antígeno DEN-2 provenían de una zona endémica para DEN-1 en el momento de la recolección de muestras (18).

En otro estudio llevado a cabo por Matheus y colaboradores se demostró que cualquiera de los cuatro serotipos de dengue podría ser utilizado como antígeno para el diagnóstico de la enfermedad y discriminar la infección primaria de la secundaria mediante un test de avidéz (19).

Por lo anteriormente expuesto, se concluye que cualquiera de los dos antígenos propuestos pueden ser utilizados en la prueba de ELISA de captura de IgM desarrollada en el IICS para la detección de IgM anti dengue y que esta podría ser de mucha utilidad

como herramienta epidemiológica en zonas de riesgo. Además, constituye un servicio a la comunidad que será a menor costo dado que el kit es de producción local.

AGRADECIMIENTO

Este estudio ha sido posible gracias al apoyo económico de la Japan International Cooperation Agency (JICA).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Guzmán M, Vázquez S. Apuntes sobre el diagnóstico de laboratorio del virus dengue. *Rev Cubana Med Trop* 2002; 54(3):180-8.
2. Jacobs M. Dengue: Emergence as a global health problem and prospects for control. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 2000; 94:7-8.
3. Guzmán M, Kourí G, Bravo J. La emergencia de la fiebre hemorrágica del dengue en las Américas. Reemergencia del dengue. *Rev Cubana Med Trop* 1999; 51:5-13.
4. Guzmán M, Kourí G. Dengue-an update. *The Lancet Infectious Dis* 2002;2: 33-42.
5. Gubler D. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:480-96.
6. Matheus S, Deparis X, Labeau B, Lelarge J, Morvan J, Dussart P. Use of Four Dengue Virus Antigens for Determination of Dengue Immune Status by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Immunoglobulin G Avidity. *J Clin Microbiol* 2005 Nov; 43(11):5784-6.
7. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Antecedentes de Dengue en Paraguay. *Boletín epidemiológico semanal* 2007; 6(5): 1.
8. Paraguay. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Actualización de datos de Dengue. *Boletín epidemiológico semanal*. 2007; 25(5): 2.
9. Paraguay. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Situación epidemiológica del Dengue en Paraguay. *Boletín epidemiológico semanal*. 2008; 52(5): 1.
10. World Health Organization. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2^{da} ed. Geneva: World Health Organization 1997.
11. Rossi C, Drabick J, Gambel J, Sun W, Lewis T, Henchal E. Laboratory diagnosis of acute dengue fever during the United Nations mission in Haiti, 1995–1996. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59(2):275-8.
12. Vorndam V, Kuno G. Laboratory diagnosis of dengue virus infections. In: Gubler D, Kuno G, editors. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. Londres: CAB International 1997: 313-33.
13. Pozzoli L, Guillén Y, Velázquez G, Velázquez G, Russomando G, Franco L, et al. ELISA de captura de IgM (MAC-ELISA) para detección de IgM del virus Dengue. Informe preliminar. Asunción: 3er Congreso Paraguaya de Alergia e Inmunología, 2000.
14. Catty D. Practical Approach Series. En: Catty D, editor. *Antibodies*. New York: Oxford University 1996.
15. Kuno G, Gomez D, Gubler D. Na ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. *J Virol Methods* 1991; 33: 101.
16. Ruíz A, Morillo L. Estudios de concordancia. In: Editorial Médica Panamericana, editor. *Epidemiología Clínica. Investigación clínica aplicada*. 1^{ra} ed. Bogotá: Médica Panamericana 2004.
17. Ocazonez Raquel E, Cortés F, Villar L. Vigilancia del dengue basado en el laboratorio: diferencias en el número de casos virus aislados según la recolección del suero y la prueba serológica. *Colomb Med* 2005; 36 (2): 65-72.
18. Wu S, Paxton H, Hanson B. Comparison of Two Rapid Diagnostic Assays for Detection of Immunoglobulin M Antibodies to Dengue Virus. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2000; 7(1):106-10.
19. Matheus S, Deparis X, Labeau B, Lelarge J, Morvan J, Dussart P. Use of Four Dengue Virus Antigens for Determination of Dengue Immune Status by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Immunoglobulin G Avidity. *J Clin Microbiol* 2005; 43(11):5784-6.