

ELISA de captura de anticuerpos IgM e IgG contra el virus Chikungunya

Código SCPC (Sociedad Colombiana de Patología Clínica): 54400 (IgG)-54410 (IgM). Código CUPS (Codificación Única de Procedimientos en salud): No aplica. Sección: Inmunología. Nivel de complejidad: Alto. Metodología: Enzimoinmunoensayo (ELISA). Sinónimos: anti-Chikungunya

Definición

La ELISA de captura de IgM o IgG para el diagnóstico de la fiebre chikungunya es un ensayo inmunoenzimático para la detección cualitativa de anticuerpos IgM o IgG específicos contra el virus Chikungunya en muestras de suero o plasma humano [1], como ayuda diagnóstica y diferencial de la fiebre del dengue, a partir de cuatro a siete días después de la aparición de la enfermedad [2].

Espectro clínico de aplicación

La fiebre chikungunya es una infección viral aguda transmitida por la mordedura de un mosquito infectado de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, con un periodo de incubación de 3 - 7 días (rango entre uno y 12 días) y viremia entre cinco y seis días (incluso hasta 10 días) (ver [figura 1](#)) [3-5]. Desde su reemergencia en el año 2005, el virus Chikungunya ha sido responsable de más de un millón de casos en humanos en las islas del océano Índico y Pacífico, el subcontinente Indio, Asia sur-oriental, África, y el sur de Europa [4, 6]. Para diciembre de 2013 se confirmaron los primeros casos de transmisión autóctona del virus en las Américas [4, 7].

En Colombia, no existe hasta la fecha evidencia por laboratorio de circulación del virus Chikungunya, sin embargo, el *A. aegypti* se encuentra en el 90% del territorio nacional por debajo de los 2.200 m.s.n.m, lo cual, sumado a un inadecuado control de vectores en las viviendas (p. ej., acumulación de aguas estancadas) constituye un factor de riesgo para la transmisión de este virus. En enero de 2014, la Secretaría Seccional de Salud y Protección Social de Antioquia publicó una circular sobre la preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus Chikungunya en Antioquia, en la que se recomienda el diagnóstico del virus en todo paciente con sospecha de la enfermedad [8].

La infección por Chikungunya debe considerarse en todo paciente que presente erupción, fiebre de incremento rápido (hasta 40 °C) con o sin escalofríos, y artralgias severas, principalmente de las pequeñas articulaciones y más intenso al levantarse; también pueden observarse petequias [3]. Generalmente es una enfermedad febril autolimitada; los síntomas tienen una duración de una a dos semanas, incluso hasta meses (ver [figura 1](#)), y suelen ser clínicamente indistinguibles de los de la fiebre del dengue [3], enfermedad que tiene igual distribución geográfica y es transmitida por el mismo vector, lo que hace de suma importancia el diagnóstico diferencial entre estas dos entidades [2, 4].

El diagnóstico por laboratorio está basado en el análisis de suero o plasma para: i) detección del virus, mediante cultivo para aislamiento viral en los primeros tres días post-infección, ii) identificación de ácidos nucleicos virales tipo RNA por prueba de reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa (RT-PCR) en tiempo real en los primeros ocho días después de la infección, iii) determinación de inmunoglobulinas tipo IgM y tipo IgG específicas del virus a partir de la primera semana de infección (ver figura 1) [2, 4]. Según el Instituto Nacional de Salud de Colombia, la confirmación de un caso sospechoso de chikungunya está dada por la positividad de cualquiera de estas tres pruebas [5].

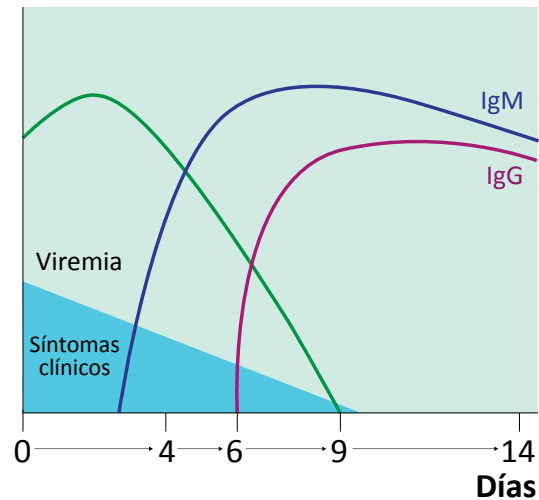


Figura 1. Viremia, respuesta inmune (anticuerpos IgM e IgG) y síntomas clínicos después de la infección por el virus Chikungunya.

Actualmente no existe tratamiento ni vacuna para esta enfermedad; se recomienda que el paciente con sospecha de chikungunya tenga un tratamiento clínico de dengue hasta que se realice el diagnóstico diferencial oportuno, con el objetivo de reducir el riesgo de complicaciones médicas y la muerte [2]. Además del dengue, se debe considerar hacer un diagnóstico diferencial con: leptospirosis, malaria, rickettsiosis, estreptococos del grupo A, rubéola, sarampión, parvovirus, enterovirus, adenovirus, otras infecciones por alfavirus (p. ej., los virus Mayaro, del río Ross, del bosque Barmah, O'nyong-nyong y Sindbis), infecciones post-artritis y enfermedad reumatológica [2, 5].

Fundamento

La determinación cualitativa de anticuerpos IgG específicos contra el virus Chikungunya, en suero o plasma citratado humano, se realiza a través de un ensayo inmunoenzimático (ELISA) en el cual las tiras (de ocho pozos) de placas de microtitulación se encuentran recubiertas con anticuerpos anti-IgG humana que unen los anticuerpos tipo IgG presentes en la muestra del paciente. Después de retirar y lavar el material de la muestra que no se une, se adiciona el antígeno del virus Chikungunya, se realiza un segundo lavado y se adiciona el anticuerpo biotinilado anti-Chikungunya. Se hace un nuevo lavado y se adiciona el conjugado de estreptavidina-peroxidasa que se une al inmunocomplejo específico capturado y, tras la adición del sustrato de tetrametilbenzidina (TMB) produce una coloración azul. Por último, se añade ácido sulfúrico para detener la reacción, lo que produce un cambio de color de azul a amarillo, y se mide la densidad óptica con un espectrofotómetro a 450 nm. La intensidad de la coloración producida (valor de la densidad óptica) es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos IgG específicos del Chikungunya [1].

Preparación del paciente y manejo de las muestras

Preparación del paciente

El paciente con sospecha de chikungunya no requiere preparación previa.

Tipo de muestra

La muestra recomendada es suero humano obtenido a partir de sangre venosa recolectada en tubos separadores de suero (tapa amarilla), la cual antes de ser procesada o enviada debe dejarse coagular y luego girar los tubos para separar el suero del coágulo. También se pueden utilizar tubos sin aditivos (tapa roja), caso en el cual se deja la sangre coagular, se centrifuga y se extrae el suero en un tubo limpio antes de ser procesada o enviada [1, 9]. Otro tipo de muestra utilizada es plasma humano recolectado en tubos separadores de plasma con citrato (tapa azul) [1]. Los tubos con heparina (tapa verde) y EDTA (tapa morada) no son adecuados para las pruebas del Chikungunya [9].

Antes del ensayo, las muestras deben diluirse en una relación 1:100 con el tampón de dilución para la muestra incluido en el estuche de ELISA de captura de anticuerpos IgG contra Chikungunya (NovaTec Immundiagnostica GmbH, Dietzenbach, Alemania) [1].

Manejo y conservación de las muestras

En caso de que el ensayo de ELISA se vaya a realizar dentro de los cinco días después de la toma de la muestra, se separa el suero o el plasma y se almacena de 2 °C a 8 °C, en caso contrario deben congelarse a -20 °C [1].

El transporte de las muestras debe realizarse de 2 °C a 8 °C, sin congelar. Después de procesadas deben almacenarse a -20 °C. Debe evitarse ciclos de congelación y descongelación [10].

Resultados

Antes de calcular los resultados de cada muestra clínica se debe determinar que la prueba es válida. Para que el ensayo de ELISA de captura de anticuerpos IgG contra Chikungunya de NovaTec se considere válida debe cumplir lo siguiente [1]:

- Blanco (sustrato solo): valor de absorbancia mayor que 0,100.
- Control negativo: valor de absorbancia menor al control «punto de corte».
- Control «punto de corte»: valor de absorbancia 0,150 - 1,300.
- Control positivo: valor de absorbancia mayor al control «punto de corte».

Si estos criterios no se cumplen, la prueba no es válida y debe repetirse.

Los resultados del estuche de ELISA de captura de anticuerpos IgG contra Chikungunya (NovaTec) son expresados en términos de unidades de NovaTec (NTU) y sus valores obtenidos a partir de la siguiente fórmula [1]:

$$NTU = \frac{D.O. \text{ paciente}}{D.O. \text{ punto de corte}} \times 10$$

Donde:

NTU = unidades de NovaTec

D.O paciente = valor de la densidad óptica de la muestra del paciente (media)

D.O punto de corte = valor de la densidad óptica del control punto de corte (media)

El control «punto de corte» debe ser incluido en las placas de análisis por duplicado durante el inmunoensayo, de forma simultánea y con igual procesamiento que la muestra del paciente. El valor de la media de la absorbancia para el control «punto de corte» debe estar entre 0,150 y 1,300 [1].

Valores esperados

Una muestra se considera positiva cuando el valor de su absorbancia es mayor al 10% del valor del punto de corte. Una muestra se considera negativa cuando el valor de su absorbancia es menor al 10% del valor del punto de corte. Los resultados en términos de las unidades de NovaTec (NTU) son [1]:

- Punto de corte: 10
- Zona intermedia (zona gris): 9 - 11
- Negativo: Menor a 9
- Positivo: Mayor a 11

Interpretación de resultados

Los resultados con un valor de absorbancia por encima o por debajo del 10% del valor del punto de corte, son clasificadas como en zona intermedia o gris y no deben considerarse ni negativas ni positivas. Se recomienda repetir la prueba con una muestra recién tomada dos a cuatro semanas después. Si el segundo resultado se encuentra nuevamente en la zona intermedia (zona gris), la muestra debe ser considerada negativa [1].

Un resultado concluyente positivo será mayor al 10% del valor del punto de corte y una muestra claramente negativa menor que el 10% [1].

La sensibilidad y especificidad del estudio de ELISA de captura de anticuerpos IgG contra Chikungunya (NovaTec) son mayores del 90% [1].

La confirmación del diagnóstico de infección con el virus Chikungunya está dado por un resultado positivo para por lo menos uno de los dos tipos de anticuerpos específicos contra el virus (IgM e IgG), según el tiempo post-infección al que sean evaluados (ver figura 1) y en lo posible, un resultado positivo para viremia [5]. Es importante recalcar que el diagnóstico de dengue debe ser realizado antes de aplicar las pruebas diagnósticas para chikungunya en pacientes con sospecha de la enfermedad. La infección con dengue es confirmada por el laboratorio cuando se obtiene un resultado positivo por lo menos en una de las siguientes pruebas: anticuerpos IgM/

IgG anti-dengue, aislamiento viral ó identificación de ácidos nucleicos del virus Dengue por reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa (RT-PCR) en tiempo real [11].

Interferentes

Para el estudio de ELISA de captura de anticuerpos IgG contra Chikungunya (NovaTec) no se han encontrado interferentes con muestras lipémicas, ictericas o hemolizadas [1]. No se ha encontrado reacción cruzada con muestras con anticuerpos IgG contra el virus Dengue, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, Citomegalovirus, virus Epstein-Barr y *Helicobacter pylori*, sin embargo, no se excluye la reacción cruzada con anticuerpos contra el virus O'Nyong Nyong [1].

Limitaciones

- Pueden producirse cambios en los valores de las absorbancias de las muestras debido a la contaminación con bacterias o ciclos repetidos de congelación y descongelación [1].
- Para el diagnóstico de la infección por Chikungunya es necesario correlacionar el resultado serológico obtenido con esta prueba con la anamnesis y la sintomatología del paciente [1].
- Los resultados tienen un valor restringido en personas inmunodeprimidas y en neonatos [1].

Observaciones adicionales de importancia

Los médicos deben considerar la infección por Chikungunya en el diagnóstico diferencial de individuos que presentan fiebre y artralgias no explicadas por otra etiología o que tienen una presentación atípica de dengue [10].

El índice de sospecha debe ser mayor en viajeros o personas en contacto con viajeros que han regresado recientemente de un área que presenta infecciones por Chikungunya [10].

Antes de aplicar las pruebas diagnósticas para el virus Chikungunya en pacientes con sospecha de la enfermedad debe descartarse la infección por el virus Dengue.

La chikungunya no es una enfermedad de declaración obligatoria, sin embargo, los casos autóctonos (sospechosos y confirmados) deben ser reportados a las autoridades locales de salud pública para que hagan el respectivo reporte a las autoridades regionales, entes nacionales y a la Organización Mundial de la Salud (OMS), con la colaboración de un epidemiólogo y de acuerdo con el Reglamento Sanitario Internacional (RSI) [10].

Bibliografía

1. **NovaLisa™**. 2013. Chikungunya Virus IgG capture ELISA.
2. **Centers for Disease Control and Prevention**. 2014. Fact Sheet: General Information for Healthcare Providers.
3. **Chhabra M, Mittal V, Bhattacharya D, Rana U, Lal S**. Chikungunya fever: a re-emerging viral infection. *Indian J Med Microbiol* 2008; 26: 5-12.
4. **Centers for Disease Control and Prevention**. Notice to Public Health Officials and Clinicians: Recognizing, Managing, and Reporting Chikungunya Virus Infections in Travelers Returning from the Caribbean. *CDC Health Advisory*. Atlanta, Georgia, USA; Diciembre 13, 2013.
5. **Ministerio de Salud y Protección Social, Instituto Nacional de Salud**. Marzo 12 de 2014.

Circular 000014 de 2014: Instrucciones para la detección y alerta temprana ante la eventual introducción del virus de la Fiebre Chikungunya en Colombia.

6. **Thiberville SD, Moyen N, Dupuis-Maguiraga L, Nougairde A, Gould EA, Roques P, et al.** Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. *Antiviral Res* 2013; 99: 345-370.
7. **Leparc-Goffart I, Nougairde A, Cassadou S, Prat C, de Lamballerie X.** Chikungunya in the Americas. *Lancet* 2014; 383: 514.
8. **Secretaría Seccional de Salud y Protección Social de Antioquia.** Enero 3 de 2014. Circular 00014 del 3 de enero de 2014: Preparación

y respuesta ante la eventual introducción del virus Chikungunya en Antioquia.

9. **Centers for Disease Control and Prevention.** Diagnostic Testing. Chikungunya virus For Health Care Providers; 2014.
10. **Centers for Disease Control and Prevention, Organización Panamericana de la Salud.** 2011. Preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus chikungunya en las Américas.
11. **Ministerio de Salud y Protección Social, Instituto Nacional de Salud, Organización Panamericana de la Salud (OPS).** 2010. Guía de Atención Clínica Integral del Paciente con Dengue.



Póramo del Sol
Urrao, Antioquia, Colombia.
Cortersna de Alejandro Campuzano Zul̄aga.