

*Rev Biomed 2005; 16:1-13.*

## ***UltramicroELISA para la detección de IgM anti dengue con reactivos listos para el uso.***

**Artículo Original**

Regla de la Caridad Herrera<sup>1</sup>, Carmen Acosta<sup>2</sup>, Antonio Melchor<sup>3</sup>, Vivian Alonso<sup>3</sup>, Rosa Lidia Solís<sup>4</sup>, Susana Vázquez<sup>5</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Enfermedades Infecciosas, <sup>2</sup>Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales, <sup>3</sup>Laboratorio de Purificación de Proteínas, Centro de Inmunoensayo, Cuba. <sup>4</sup>Instituto Carlos Juan Finlay, Cuba. <sup>5</sup>Departamento de Virología, Instituto Pedro Kourí, Cuba.

### **RESUMEN.**

El dengue es en la actualidad, la arbovirosis humana de mayor importancia. La enfermedad se reporta en más de 100 países y 2,500 millones de personas están en riesgo de padecerla. Se estima que anualmente ocurren 50,000,000 de infecciones con más de 500,000 casos de hospitalización y se producen entre 25,000 y 50,000 muertes. Dada la emergencia y reemergencia del dengue y la fiebre hemorrágica del dengue, su diagnóstico se convierte en un objetivo de primer orden para cualquier país, por la necesidad de diferenciarlo de otras enfermedades y como soporte a los sistemas de vigilancia de la enfermedad. En este sentido, la confirmación de laboratorio ocupa un papel prioritario, siendo el inmunoensayo enzimático para la captura de IgM anti-dengue el método de elección por su elevada especificidad, sensibilidad y rapidez de ejecución. Un ejemplo de esta técnica lo constituye el estuche de reactivos ultramicroELISA Dengue IgM. En el trabajo se presentan los resultados de la normalización de un nuevo formato para el mismo,

consistente en emplear placas de tiras y reactivos preparados listos para el uso.

En el nuevo formato del estuche se mantuvieron las condiciones originales de concentración de recubrimiento y dilución de conjugado. La precisión de las placas, intra e inter-ensayos, fue en ambos casos inferior al 10 %. Todos los reactivos tuvieron una estabilidad superior al 90 % durante el tiempo de prueba. Al comparar las placas de tiras con las placas rígidas, así como los reactivos listos para el uso con los reactivos concentrados, no se obtuvieron diferencias significativas. Respecto a la inhibición de la hemaglutinación, se obtuvo un 94.3 % de sensibilidad, un 94.1 % de especificidad y un índice *kappa* de 0.91.

Los resultados indican que el UMELISA DENGUE IgM en su nuevo formato mantiene confiabilidad para la detección temprana de pacientes afectados por el dengue.

***(Rev Biomed 2005; 16:1-13)***

**Palabras clave:** dengue, ultramicroELISA, IgM,

*Solicitud de sobretiros: Lic. Regla de la C. Herrera Ruíz, Centro de Inmunoensayo. Calle 134 y Ave 25. Playa. Apto 6945, Ciudad de la Habana, Cuba. E-mail: iqtorch@cie.sld.cu*

*Recibido el 26/Mayo/2004. Aceptado para publicación el 17/Enero/2005.*

Este artículo está disponible en <http://www.uady.mx/sitios/biomedic/revbiomed/pdf/rb051611.pdf>

**Vol. 16/No. 1/Enero-Marzo, 2005**

diagnóstico.

## SUMMARY.

### **Dengue IgM capture UltraMicroELISA test with ready-to-use reagents.**

Dengue is currently one of the most important human arboviruses. It is reported in more than 100 countries, and two and a half billion people are at risk of infection. Annually, it has been estimated that there are 50 000 000 cases of infection, with more than 500 000 hospitalized cases, and 25 000 to 50 000 deaths. Because of the emergence and re-emergence of dengue and its hemorrhagic fever, the diagnosis of this disease through laboratory tests is the first objective in any country for the differentiation of dengue from other diseases, as well as, for the support of the surveillance systems. The best choice for the diagnosis of dengue fever is an immunoglobulin M-specific capture Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), due to its specificity, sensitivity, and fast performance. An example of this technique is IgM dengue ultramicro ELISA. We present the results of normalization of dengue ultramicro ELISA's new format, which includes strip plates and ready-to-use reagents. The original conditions of coating and conjugate dilution of UMELISA Dengue IgM were maintained. Both, within-run and between-run precision values were below 10%, the stability of all reagents was higher than 90%. There were no significant differences when comparing the previous kinds of reagents and strips with the new ones. Compared to hemagglutination inhibition, the sensitivity was 94.3%, the specificity was 94.1%, and the *kappa* concordance index was 0.91.

Results indicated the ultramicro ELISA's new format maintains its reliability in the early detection of dengue. (*Rev Biomed* 2005; 16:1-13)

**Key words:** dengue, ultramicroELISA, IgM, diagnosis.

## INTRODUCCIÓN.

El dengue es una enfermedad infecciosa producida por un virus ARN, perteneciente a la Familia

*Flaviviridae*, al cual se le reconocen cuatro serotipos (DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4) (1), transmitidos por el *Aedes aegypti* como vector principal (2). En términos de morbi-mortalidad y de costo económico, es a escala mundial, el arbovirus más importante con un estimado anual de 100 millones de casos (3, 4).

En las infecciones agudas por dengue, se aprecian dos patrones de respuesta sérica: primaria y secundaria. La primera se ve en individuos que no son inmunes a flavivirus y en ella los anticuerpos IgM se incrementan entre el tercer y el quinto día de comienzo de los síntomas, alcanzan un pico a las dos semanas y prácticamente a los tres meses descienden a niveles no detectables, aunque en algunos casos pueden persistir por más de 90 días. La elevación de los anticuerpos IgG ocurre entre los días 10 al 14 y permanecen así durante toda la vida. La respuesta secundaria se observa en aquellos individuos con una infección aguda por dengue, los que han padecido previamente una infección por flavivirus. En este caso, los títulos de anticuerpos IgG se elevan entre el primer y el segundo día hasta niveles altos, y los IgM lo hacen más lentamente y en menor nivel que en las infecciones primarias (5-9).

La mayoría de las infecciones primarias, resultan en la fiebre del dengue (FD), enfermedad leve caracterizada por fiebre bifásica, intenso dolor de cabeza, mialgia, artralgia, erupción cutánea, linfadenopatía y leucopenia (10). Las formas graves de la enfermedad, fiebre hemorrágica del dengue (FHD) y síndrome de choque por dengue (SCD), están usualmente asociadas a infecciones secundarias (11). La FHD se caracteriza por fiebre alta, fenómenos hemorrágicos asociados con disminución de la cantidad de plaquetas, incremento en la permeabilidad capilar y hepatomegalia. En el SCD el estado del paciente se deteriora de forma súbita, y aparecen signos de insuficiencia circulatoria (12).

A pesar de los avances en el conocimiento y caracterización clínico-epidemiológica de la FD, la FHD y el SCD, el apoyo del laboratorio resulta imprescindible en el diagnóstico diferencial mediante el aislamiento viral, el diagnóstico serológico o la detección molecular. El diagnóstico serológico de

### *Detección de IgM anti dengue.*

rutina incluye la inhibición de la hemaglutinación (IH), la fijación del complemento (FC), la neutralización (N) y el ELISA de captura de IgM (MAC-ELISA) (13).

Un ejemplo de MAC-ELISA lo constituye el ultramicroELISA (UMELISA) Dengue IgM (14). Con el objetivo de mejorar la utilización y manipulación del mismo, se modificó el formato del estuche a placas de tiras y reactivos listos para el uso. Los resultados en la normalización del nuevo formato, se presentan en el siguiente trabajo.

### **MATERIALES Y MÉTODOS.**

**Muestras de suero humano:** Se evaluaron 52 pares de sueros de pacientes con sospecha clínica de infección por dengue. Las muestras fueron colectadas durante la epidemia de dengue ocurrida en el primer semestre de 1997 en Santiago de Cuba, Cuba (15, 16). Los sueros se conservaron a -20°C y se dividieron en infección primaria ( $n = 4$ ), infección secundaria ( $n = 31$ ) y no dengue ( $n = 17$ ), según el criterio de IH.

**Fase sólida:** Placas (Greinerlabortechnik, Alemania) de ultramicroELISA (10 µL por pocillo) rígidas (96 pocillos) y en tiras (8 pocillos X 12 tiras) (17).

**Anticuerpos del recubrimiento:** Los anticuerpos anti IgM humana obtenidos en carnero (Centro de Inmunoensayo), fueron adsorbidos con AH-Sepharose 4B-IgG humana y purificados por cromatografía de afinidad con AH-Sepharose 4B-IgM humana. Finalmente se dializaron contra solución salina tamponada con fosfato (SSTF) pH 7.4 y se almacenaron en la misma solución a -20°C hasta el momento del uso.

**Sueros controles:** El suero control negativo fue obtenido de un donante de sangre del Banco Provincial del municipio Marianao, Ciudad de la Habana, Cuba. Para confeccionar el suero control positivo, se mezclaron muestras de Brasil y Colombia pertenecientes a pacientes con infección por dengue. La negatividad o positividad de los sueros controles se evaluó mediante la técnica de IH y el MAC ELISA del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK), Cuba.

**Antígeno:** Para las pruebas de IH y el UMELISA, se emplearon antígenos extraídos por el método de

acetona-sacarosa (18), de cerebro de ratones lactantes inoculados con los virus dengue 1 (Hawai), dengue 2 (Nueva Guinea), dengue 3 (H-87) y dengue 4 (H-241).

Para la técnica de IH se utilizaron sólo los serotipos DEN1 y DEN2. En el UMELISA se empleó una mezcla que contenía los 4 serotipos, cada uno a 16 Unidades Hemaglutinantes (UH) (19).

**Conjugado anticuerpo-enzima:** Un anticuerpo monoclonal anti-complejo dengue (isotipo IgG 1), purificado por cromatografía de afinidad utilizando una columna de Proteína A - Sepharosa CL 4B, se conjugó con la fosfatasa alcalina EIA-grado I (Roche, Alemania) mediante el método del glutaraldehído en un solo paso (20).

**Sustrato fluorogénico:** Se empleó una solución concentrada (0,5 mM) de 4 metilumbeliferil fosfato (Koch Light Ltd. Haverhill, Suffolk, Gran Bretaña). Para su dilución se utilizó dietanolamina 1 M, pH 9.8 (Merck, Alemania).

**Equipamiento:** Para el lavado de las placas se empleó un lavador MAS 301 y para medir la intensidad de fluorescencia el Fotómetro-Fluorímetro PR-521, equipos pertenecientes a la tecnología SUMA (21).

**Prueba de la IH:** Se empleó el método original adaptado al formato de microtécnica con 8 UH de cada virus (18). Se consideraron como positivos los pares en los cuales entre el primer y el segundo suero hubo un incremento de 4 veces el título. En los casos en que alguno de los dos sueros presentó títulos  $\geq 1:2560$  se consideró infección secundaria (1).

**UMELISA DENGUE IgM:** Ensayo inmunoenzimático heterogéneo en su variante de captura. Se realizaron tres incubaciones de 1 hora a 37°C cada una, correspondientes a las muestras y los sueros controles, el antígeno y el conjugado. Al culminar cada incubación, se efectuaron 6 ciclos de lavado con tampón Tris-HCl 15 mM, Tween-20 al 0.05 % pH 7.8. Finalmente se añadió e incubó el sustrato 30 minutos a temperatura ambiente. Los resultados se expresaron en unidades de fluorescencia (UF) y se calcularon como la relación M-B/P-B, donde M, B (solución diluyente de las muestras) y P

fueron las UF de la muestra, el blanco y el suero control positivo, respectivamente. Se consideraron como positivas las muestras cuyo valor de relación fue mayor o igual a 0.3.

**Recubrimiento de la fase sólida:** Las placas rígidas (placas control) y las de tiras (placas prueba), fueron recubiertas con diferentes concentraciones de anti IgM humana en solución de tampón  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$  10 mM, pH 9.6. Se incubaron durante 4 horas a 45°C y finalmente fueron bloqueadas con SSTF que contenía seroalbúmina bovina (SAB) al 0.1%.

**Preparación de los sueros controles:** Se probaron dos variantes: concentrados (variante control) y listos para el uso (variante prueba). Los controles concentrados, en el momento de la prueba, se diluyeron 1:21 con una solución de suero de carnero al 5 % en Tris-HCl 15 mM, Tween-20 al 0.05 % pH 7.8, mientras que los listos para el uso, se presentaron diluidos 1:21 con la solución anterior, de manera que se utilizaron directamente como se suministraban en el estuche de reactivos.

**Preparación del conjugado:** Al igual que en los sueros controles, se probaron dos variantes de presentación una concentrada (variante control) y otra lista para el uso (variante prueba). En el primer caso el conjugado se preparó a la dilución de trabajo en el momento de realizar la prueba. Por su parte, en la variante lista para el uso, se presentó una solución del conjugado, a la dilución de trabajo, para ser aplicada directamente en el ensayo.

**Selección de las condiciones de ensayo:** El empleo de las placas de tiras exigió evaluar nuevamente la concentración de recubrimiento y la dilución del conjugado. Para ello, se realizó una titulación cruzada que comprendió la evaluación de forma simultánea de diferentes concentraciones de recubrimiento (de 4.5 a 17.5  $\mu\text{g/mL}$  de anti IgM humana) con diferentes diluciones del conjugado (de 1:1000 a 1:9000).

Para la selección de la combinación óptima de concentración de recubrimiento y dilución de conjugado, se consideró que la concentración escogida se encontrara dentro de la zona de meseta, definida como el rango de concentraciones para las cuales las

UF de cada uno de los sueros controles se mantenían constantes, y que hubiese una adecuada separación entre los sueros controles con valores inferiores a 10 UF para el negativo y entre 130 a 150 UF para el positivo.

**Estudio de reproducibilidad:** Se utilizaron las dos fases sólidas y 5 muestras con diferentes niveles de positividad. Las mismas fueron aplicadas 10 veces por placa durante cinco días consecutivos para determinar los coeficientes de variación (CV) intra e interplacas.

**Estudio de estabilidad en anaquel:** Se realizó con las placas de tiras y los sueros controles y el conjugado preparados listos para el uso. La condición control fueron los resultados de los sueros controles, en cada una de las condiciones analizadas, obtenidos el día inicial del estudio (tiempo cero) y la condición prueba los resultados mensuales durante los 24 meses posteriores. El criterio de estabilidad se mantuvo mientras no se observaron diferencias significativas entre la condición prueba y la control. La temperatura de almacenaje fue 4°C.

**Comparación de las placas, los sueros controles y el conjugado:** Se realizó la comparación de las placas de tiras rígidas y de los sueros controles y el conjugado de preparados listos para el uso respecto a los concentrados, a partir de 20 replicados de cada uno.

**Comparación entre la IH y el UMELISA en su nuevo formato:** Empleando los resultados de los 52 pares de sueros, se determinó la especificidad y sensibilidad del UMELISA Dengue IgM en su nuevo formato de presentación respecto a la técnica de IH, así como la concordancia entre ambas pruebas, mediante el estadístico *kappa* (22). También, se evaluó la capacidad de una u otra técnica para realizar el diagnóstico de infección por dengue, a partir del primer suero del par (S1), tomado en la fase aguda de la enfermedad.

**Análisis estadístico:** En la prueba de estabilidad en anaquel la comparación se realizó empleando el test  $X^2$  y en la comparación de las placas, los sueros controles y el conjugado, la prueba empleada fue t de

Student. Ambas pruebas se hicieron para un  $\alpha=0.01$  y se utilizó el programa Microsoft Excel 2002.

## RESULTADOS.

### Selección de las condiciones de ensayo.

Con las placas de tiras, tanto la concentración de recubrimiento (12.5  $\mu\text{g/mL}$  de anti IgM humana) como la dilución del conjugado (1:7000), coincidió con la empleada cuando se utilizan las placas rígidas. En las figuras 1 y 2, se presentan los resultados de los sueros controles en los dos tipos de placas con las diferentes concentraciones de recubrimiento evaluadas y el conjugado 1:7000. La figura 3 muestra los resultados de los controles para ambas placas con 12.5  $\mu\text{g/mL}$  de anti IgM humana y con las diferentes diluciones de conjugado ensayadas.

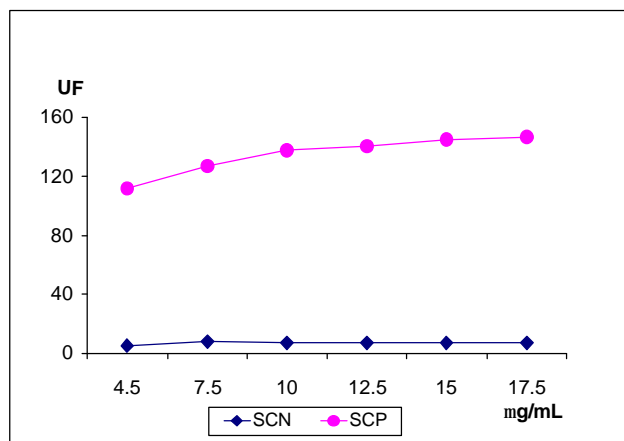
### Estudio de reproducibilidad.

Los coeficientes de variación intra e interplacas no excedieron de 4 y 7 %, respectivamente (cuadro 1).

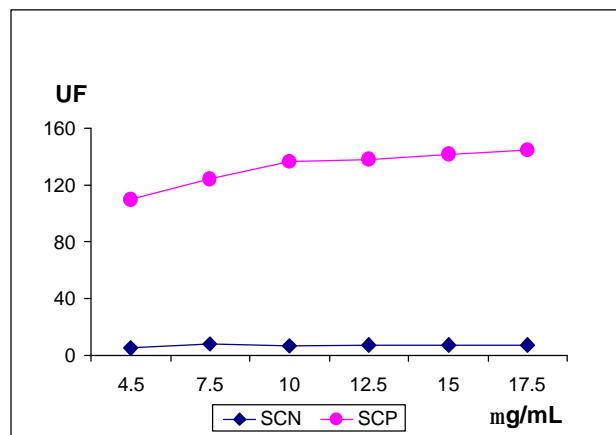
### Estudio de estabilidad anaquel.

Durante el estudio, los resultados de UF de los sueros controles, en cada de una de las condiciones analizadas, no presentaron diferencias significativas, respecto al tiempo cero (datos no mostrados). En el cuadro 2 se muestran las medias de las UF obtenidas al tiempo cero y a los 24 meses de estudio.

### Comparación de las placas, los sueros controles



**Figura 1.-** Evaluación de las diferentes concentraciones de recubrimiento en las placas rígidas empleando el suero control positivo (SCP) y el suero control negativo (SCN) del ensayo



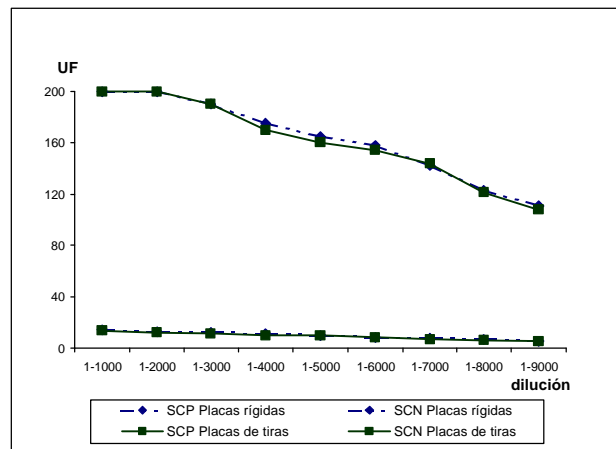
**Figura 2.-** Evaluación de las diferentes concentraciones de recubrimiento en las placas de tiras empleando el suero control positivo (SCP) y el suero control negativo (SCN) del ensayo.

### y el conjugado.

Al realizar la comparación de medias con el estadístico t de Student, no se obtuvieron diferencias significativas entre las placas de tiras y las rígidas ni entre los reactivos preparados listos para el uso con los reactivos concentrados. En el cuadro 3 se muestran, para cada caso, los valores de las UF medias y de t.

### Comparación entre la IH y el UMELISA en su nuevo formato.

La distribución de los resultados con el



**Figura 3.-** Evaluación de las diferentes diluciones de conjugado en las placas rígidas y en las placas de tiras empleando el suero control positivo (SCP) y el suero control negativo (SCN) del ensayo.

*R de la C Herrera, C Acosta, A Melchor, V Alonso, RL Solís, S Vázquez.*

**Cuadro 1**  
**Resultados del estudio de reproducibilidad con las placas rígidas y las placas de tiras.**

| Muestra | Placas rígidas |                     |                     | Placas de tiras |                     |                     |
|---------|----------------|---------------------|---------------------|-----------------|---------------------|---------------------|
|         | UF             | CV intra-ensayo (%) | CV inter-ensayo (%) | UF              | CV intra-ensayo (%) | CV inter-ensayo (%) |
| 1       | 16,4           | 3,5                 | 6,7                 | 17,5            | 2,3                 | 7,0                 |
| 2       | 25,8           | 2,7                 | 7,1                 | 23,7            | 4,1                 | 5,7                 |
| 3       | 30,8           | 3,3                 | 6,8                 | 31,0            | 3,6                 | 5,9                 |
| 4       | 58,6           | 2,8                 | 6,6                 | 60,5            | 3,9                 | 6,1                 |
| 5       | 102,3          | 4,0                 | 5,2                 | 104,4           | 2,9                 | 6,4                 |

UF: Unidades de fluorescencia

CV: Coeficientes de variación

UMELISA en su nuevo formato y la IH, se muestran en el cuadro 4. Con los pares de sueros clasificados con la IH como no dengue, hubo coincidencia en 16 de 17 y un par (21) se evaluó como positivo por el UMELISA. Con éste, se detectaron los 4/4 pares de infección primaria y 29/31 de los pares de infección secundaria. En esta ocasión los pares discordantes fueron el 12 y el 50, diagnosticados como negativos con el UMELISA. Los datos de las muestras discordantes aparecen en el cuadro 5.

La muestras S1 empleadas en el estudio de la capacidad de ambos ensayos para realizar diagnóstico de infección por dengue con el suero de fase aguda, fueron tomadas entre los días 1 al 5 de comenzados los síntomas, cuando los pacientes asistieron por primera vez al médico. Con el S1, en los casos de infección primaria el UMELISA detectó 2 casos y la IH no detectó ninguno. En los pares de infección secundaria, el UMELISA fue capaz de establecer el diagnóstico de infección por dengue en 11 de ellos,

**Cuadro 2**  
**Resultados del estudio de estabilidad prueba para las placas de tiras y con los sueros controles y el conjugado listos para el uso.**

| Sueros controles | Placas |       |       | Sueros controles |       |      | Conjugado |       |      |
|------------------|--------|-------|-------|------------------|-------|------|-----------|-------|------|
|                  | T0     | T24   | %     | T0               | T24   | %    | T0        | T24   | %    |
| Blanco           | 6,3    | 6,5   | 100   | -                | -     | -    | 6,4       | 5,9   | 92,2 |
| Control Negativo | 8,0    | 7,8   | 97,5  | 7,9              | 8,1   | 100  | 8,4       | 8,0   | 95,2 |
| Control Positivo | 142,5  | 141,1 | 99,01 | 143,7            | 140,7 | 97,9 | 139,6     | 138,4 | 99,1 |

T0: Evaluación al tiempo cero

T24: Evaluación a los 24 meses de prueba

%: Porcentaje de recuperación obtenido a los 24 meses respecto al tiempo cero.

*Detección de IgM anti dengue.*

**Cuadro 3**  
**Resultados de las medias y de la comparación estadística mediante t de Student.**

| Control          | Placas  |        |      | Sueros controles |        |      | Conjugado |        |      |
|------------------|---------|--------|------|------------------|--------|------|-----------|--------|------|
|                  | Control | Tiras  | t    | Control          | LU     | t    | Control   | LU     | t    |
| Control Negativo | 5,75    | 5,91   | 0,31 | 6,23             | 6,32   | 0,23 | 6,11      | 6,17   | 0,17 |
| Control Positivo | 139,24  | 138,24 | 1,04 | 140,91           | 140,82 | 0,01 | 148,63    | 146,95 | 1,59 |

Control: Placas rígidas o reactivo concentrado (según sea el caso)

LU: Reactivo listo para el uso

$t_{(0,01)} = 2.86$

**Cuadro 4**  
**Distribución de positivos y negativos por IH y el UMELISA.**

| UMELISA         | IH                             |                                |              | Total |
|-----------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------|-------|
|                 | Infección<br>1 <sup>aria</sup> | Infección<br>2 <sup>aria</sup> | No<br>dengue |       |
| <b>Positivo</b> | 4/4(100%)                      | 29/31(93,5%)                   | 1/17(5,8%)   | 34    |
| <b>Negativo</b> | -                              | 2/31(6,4%)                     | 16/17(94,1%) | 18    |
| <b>Total</b>    | 4                              | 31                             | 17           | 52    |

**Cuadro 5**  
**Resultados de las muestras discordantes.**

| Muestras        | DEN-1 | IH    |                   | Clasificación | UMELISA |               |
|-----------------|-------|-------|-------------------|---------------|---------|---------------|
|                 |       | DEN-2 |                   |               | M-B/P-B | Clasificación |
| 12              | 20    | 20    | 2 <sup>aria</sup> |               | 0,056   | Negativa      |
| 12 <sup>a</sup> | 2560  | 2560  |                   |               | 0,138   |               |
| 21              | <20   | <20   | No dengue         |               | 0,17    | Positiva      |
| 21 <sup>a</sup> | 20    | 40    |                   |               | 0,32    |               |
| 50              | -     | 40    | 2 <sup>aria</sup> |               | 0,024   | Negativa      |
| 50 <sup>a</sup> | -     | 2560  |                   |               | 0,064   |               |

los cuales estaban incluidos en los 13 que detectó la IH.

La sensibilidad, especificidad e índice *kappa* fueron 94.3%, 94.1% y 0.91, respectivamente.

## DISCUSIÓN.

La Organización Panamericana de la Salud (OPS), plantea que cada país endémico de dengue, debe tener un sistema pasivo de vigilancia, basado en el diagnóstico clínico, que considere al dengue/DH una enfermedad notificable (6). Sin embargo, como a menudo no es posible diferenciarlo clínicamente de otras enfermedades (23) causadas por distintos virus, bacterias e incluso algunos protozoos, cuando los casos son detectados y notificados por los médicos, ya ha ocurrido una considerable transmisión del dengue e incluso puede haber llegado al máximo.

Las manifestaciones clínicas similares a las provocadas por otros patógenos, así como el incremento en la prevalencia e incidencia de la fiebre de dengue, la fiebre hemorrágica de dengue y el síndrome de choque por dengue (24), han establecido la importancia de la vigilancia activa basada en pruebas de laboratorio. Con ella se obtiene información necesaria sobre el inicio, la ubicación, el serotipo viral y la gravedad de la enfermedad (25).

Las técnicas comúnmente empleadas en el diagnóstico de dengue son la IH (18) y los ELISA desarrollados para la detección de anticuerpos IgM o IgG (26). Tanto la IH como los ELISA para IgG requieren de muestras pareadas colectadas al menos con un intervalo de 7 días para realizar un diagnóstico definitivo a partir del incremento en 4 veces o más del título (6). Por su parte los ELISA para IgM (MAC-ELISA), frecuentemente pueden efectuar el diagnóstico con un único suero colectado en la fase aguda de la enfermedad. Diversos estudios han demostrado que los anticuerpos IgM entre el sexto y el décimo día de la enfermedad en el 95 % de los casos, tanto primarios como secundarios, son detectables (27) y, por ello, la captación por ELISA de anticuerpos IgM es en la actualidad la prueba más útil para fines de vigilancia activa y su empleo se ha generalizado en los últimos años.

En la actualidad se ha promocionado el desarrollo y producción de diferentes estuches de reactivos (24) basados en MAC-ELISA dentro de los que se encuentra el UMELISA Dengue IgM. El formato original del mismo tenía placas rígidas (96 pocillos), el antígeno liofilizado y los sueros controles y el conjugado concentrados. Teniendo en cuenta que la tendencia actual en el formato de presentación de los estuches está encaminada a emplear el antígeno liofilizado y los demás reactivos preparados listos para el uso (28), el objetivo del presente trabajo fue evaluar la sustitución de los sueros controles y el conjugado concentrado por sueros controles y el conjugado preparado listos para el uso, y además analizar el posible reemplazo de las placas rígidas por placas de tiras.

En las placas de tiras durante la evaluación de la concentración de recubrimiento y la dilución del conjugado, se observó que a partir de 10 µg/mL comenzaba la meseta de recubrimiento, o sea, los valores de fluorescencia de cada uno de los sueros controles se mantenían. Teniendo en cuenta, lo planteado por otros investigadores (29), que se debe trabajar en la zona de meseta de recubrimiento, se seleccionó como valor de concentración óptima 12,5 µg/mL. Esta concentración se encuentra en dicha zona y además con ella y el conjugado 1:7000, se obtuvo buena separación entre el suero control positivo y el suero control negativo (8 y 137 UF, respectivamente), de manera que no fue necesario variar las condiciones actuales de concentración de recubrimiento y dilución de conjugado existentes hasta ese momento.

En cuanto al estudio de reproducibilidad, los coeficientes de variación intra e interplacas no excedieron de 10 %, respectivamente, indicando que la precisión del ensayo era adecuada para garantizar la homogeneidad de los resultados de una misma muestra evaluada en momentos diferentes (30).

El análisis estadístico de los resultados de estabilidad, evidenció que tanto las placas de tiras, así como los sueros controles y el conjugado preparado listo para el uso, eran estables conservados 24 meses a 4°C. Este resultado mostró que la introducción de los mismos, no alteró la estabilidad



### *Detección de IgM anti dengue.*

que estos componentes del estuche de reactivos presentaban en el formato original del UMELISA Dengue IgM (18 meses a 4°C).

En la evaluación de las placas, el no haber obtenido diferencias significativas al comparar las de tiras con las rígidas, puso de manifiesto que con las primeras los resultados eran igualmente confiables si se mantenían las anteriores condiciones de tiempo y temperatura de almacenaje. Este resultado es de vital importancia porque incrementa las potencialidades de uso del UMELISA ya que la introducción de las placas de tiras permite que el estuche se pueda emplear tanto en los laboratorios de pesquisas masivas como en aquellos donde se procesa un pequeño número de muestras, sin el temor de desperdiciar determinaciones o tener retrasos en la emisión del diagnóstico esperando completar el número de muestras (90) requeridas en las placas rígidas.

Cuando la comparación se hizo entre los sueros controles y el conjugado preparado listo para el uso respecto a estos mismos reactivos concentrados, tampoco se obtuvieron diferencias significativas, de manera que es posible suprimir el paso de preparar las diluciones finales de cada uno de estos reactivos, con la consiguiente eliminación de posibles alteraciones en la prueba, derivadas de su preparación.

En el análisis de los resultados de las muestras, con el UMELISA y con la IH, obtuvimos 3 pares de sueros discordantes. El primer par discordante fue el 21 que tenía clasificación de no dengue por IH (títulos inferiores 1:1280, sin seroconversión) (31) y con el UMELISA fue débil positivo. Este resultado pudo deberse a la mayor sensibilidad de las técnicas de ELISA respecto a la IH (32). Los otros dos pares discordantes fueron el 12 y el 50, que por IH tuvieron seroconversión y el título del suero convaleciente fue  $\geq 1:2560$ , lo cual es compatible con una infección secundaria comprobada (31) y en estos casos se ha reportado que en un pequeño número de individuos los anticuerpos IgM pueden no ser detectados (33, 34).

Considerando que una de las desventajas

fundamentales de la IH es la necesidad de sueros pareados para realizar el diagnóstico de infección por dengue, excepto en aquellos casos en donde el primer suero tuvo títulos  $\geq 1:2560$ , como parte de la comparación entre el UMELISA y la IH, evaluamos la capacidad de ambas técnicas de realizar el diagnóstico con la muestra S1. Encontramos que ninguna de las dos técnicas, IH o UMELISA, fue particularmente eficiente en la realización del diagnóstico de infección por dengue con el suero de fase aguda. De los 33 pares de sueros evaluados como positivos por la IH, el UMELISA empleando el suero de fase aguda diagnosticó el 39% de ellos (13/33) correspondientes a 2 de infección primaria y a 11 de infección secundaria; por su parte la IH con el S1 pudo establecer el diagnóstico en 13 muestras de los pares de infección secundaria. Las dos muestras de infección primaria que no fueron detectadas por el UMELISA fueron tomadas al primer y segundo día de comenzados los síntomas, tiempo inferior al establecido para que eleven a niveles detectables los anticuerpos IgM en las primoinfecciones por dengue (35). En los casos de infección secundaria la IH superó al UMELISA y esto pudo estar influenciado porque con ella se detectan anticuerpos totales (18), tanto IgM como IgG. Estos últimos son los predominantes en este tipo de infección y por ello en las re-infecciones son considerados el marcador por excelencia (28).

La coincidencia entre el UMELISA en su nuevo formato de presentación y la IH fue del 94,2%, resultado similar al 92,85% obtenido al compararlo con la IH en su formato original con la IH (14). Este resultado reafirmó que el cambio de formato no produjo afectación en la calidad del estuche de reactivos establecida previamente.

El valor del índice *kappa* (0.91) evidenció buena concordancia con la IH (22). Los porcentajes de sensibilidad (94.3%) y especificidad (94.1%), fueron comparables a los de otros estuches de diagnóstico diseñados con igual fin (33) y estuvieron en correspondencia con la aplicación del ensayo encaminado al desarrollo de pesquisas masivas en población con sospecha de infección por dengue.

*R de la C Herrera, C Acosta, A Melchor, V Alonso, RL Solís, S Vázquez.*

## CONCLUSIONES.

La presentación del UMELISA DENGUE IgM en el formato placas de tiras y de reactivos listo para el uso optimiza las actuales condiciones de manipulación y empleo del estuche. Este ensayo, cuyo tiempo de ejecución son 4 horas, constituye una favorable alternativa en el diagnóstico serológico de infección por dengue, a partir de una sola muestra de suero y sin ninguna de las limitaciones asociadas a la IH.

## REFERENCIAS.

- 1.- Guzmán L, Vázquez S. Apuntes sobre el diagnóstico de laboratorio del virus dengue. *Rev Cubana Med Trop* 2002; 54:180-8.
- 2.- Chen JP, Cosgriff TM. Hemorrhagic fever virus-induced changes in hemostasis and vascular biology. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2000; 11:461-83.
- 3.- Cuzzubbo A, Baughn D, Nisalak A, Suntayakorn S, Aaskov H, Devine PL. Detection of specific antibodies in saliva during dengue infection. *J Clin Microbiol* 1998;3737-9.
- 4.- Kurane I, Rothman A, Livingston P, Green S, Gagnon S, Janus J, *et al.* Immunopathologic mechanisms of dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. *Arch Virol Suppl* 1994; 9:59-64.
- 5.- Nogueira R, Miagostovich M, Cavalcanti S, Marzochi K, Schatzmayr H. Levels of IgM antibodies against dengue virus in Rio de Janeiro, Brazil. *Res Virol* 1992; 143:423-7.
- 6.- Organización Panamericana de la Salud. Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control. *Publicación Científica* 1995; 548:23-9.
- 7.- Koraka P, Suharti C, Setiati TE, Mairuhu AT, Van Gorp E, Hack CE, *et al.* Kinetics of dengue virus-specific serum immunoglobulin classes and subclasses correlate with clinical outcome of infection. *J Clin Microbiol* 2001; 39:4332-8.
- 8.- Sang C, Hoon L, Cuzzubbo A, Devine P. Clinical evaluation of a rapid immunochromatographic test for the diagnosis of dengue virus infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998; 5:407-9.
- 9.- Delgado I, Vázquez S, Bravo JR, Guzmán G. Predicción del serotipo del virus del dengue mediante la respuesta de anticuerpos IgM. *Rev Cubana Med Trop* 2002; 54:113-7.
- 10.- Lei HY, Yeh TM, Liu HS, Lin YS, Chen SH, Liu CC. Immunopathogenesis of dengue virus infection. *J Biomed Sci* 2001; 8:377-88.
- 11.- Hayes A, Gubler D. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Pediatric Inf Dis J* 1992; 11:311-7.
- 12.- Thein S, Aung M, Shwe T, Aye M, Zaw A, Aye K, *et al.* Risk factors in dengue shock syndrome. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 56:566-72.
- 13.- Zarate A, Del Rio A, Gómez H. El diagnóstico del dengue en México. *Salud Pública Mex* 1995; 37:521-8.
- 14.- Laferté J, Pelegrino J, Guzmán M, González G, Vázquez S, Hermida S. Rapid diagnosis of dengue virus infection a novel 10 µL IgM antibody capture ultramicroELISA assay (MAC UMELISA Dengue). *Adv Modern Biotechnol* 1992:1-19.
- 15.- Kourí G, Guzmán MG, Valdés L, Carbonell I, Rosario D, Vázquez S, *et al.* Reemergence of dengue in Cuba: a 1997 epidemic in Santiago de Cuba. *Emerg Infect Dis* 1998; 1:89-92.
- 16.- Valdés L, Guzmán MG, Kourí G, Delgado J, Carbonell I, Cabrera MV, *et al.* La epidemiología del dengue en Cuba en 1997. *Rev Panam Salud Pub* 1999; 6:16-25.
- 17.- Butler JE, Ni L, Nessler R, Joshi KS, Suter M, Rosenberg B, *et al.* The physical and functional behavior of capture antibodies adsorbed on polystyrene. *J Immunol Methods* 1992; 150:77-90.
- 18.- Clarke D, Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1958; 7:561-77.
- 19.- Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, Kusalerdchariya S, Chongswasdi V, Suntayakorn S *et al.* An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am J Trop Med Hyg* 1989:418-27.
- 20.- Avrameas J. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for detection of Antigens and Antibodies. *Immunochemistry* 1969; 6:43-52.

### *Detección de IgM anti dengue.*

- 21.- Fernández J, García F, Solís R, Robaina R, García M, Valdés V, *et al.* The ultramicroanalytic system (SUMA): A versatile technology for clinical testing. International Symposium Biotechria '91. Biotechnology of growth factors: vascular and nervous systems 1991:203.
- 22.- Ochoa R, Martínez JC, Ferriol X, Estrada E, García AM, Blanco R y cols. Guía para la estandarización de técnicas inmunoenzimáticas en ensayos de vacunas. *VacchiMonitor* 2000; 9:17-20.
- 23.- Peyrel G, Schwobel B, Jordan S, Vamisaveth V, Phetsouvanh R, Christophel EM, *et al.* Serological investigation of the prevalence of anti-dengue IgM and IgG antibodies in Attapeu Province, South Laos. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10:181-4.
- 24.- Porter KR, Widjaja S, Darmawan H, Hadiwijaya SH, Nisa C, Suharyono W *et al.* Evaluation of a commercially available immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assay kit for diagnosing acute dengue infections. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;741-4.
- 25.- Campione J, Ruben M, Vaughan H, Morris V. Dengue viruses in the Caribbean. Twenty years of dengue virus isolates from the Caribbean Epidemiology Centre. *West Indian Med J* 2003; 52:191-8.
- 26.- Kuno G, Gomez I, Gubler DJ. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. *J Virol Methods* 1991:101-13.
- 27.- Valdés L, Carbonell I, Delgado J, Santín M. Dengue. En: Ministerio de Salud Pública. Enfermedades emergentes y reemergentes. Ciudad de la Habana, 1998;178-195.
- 28.- Lam SK, Devine PL. Evaluation of capture ELISA and rapid immunochromatographic test for the determination of IgM and IgG antibodies produced during dengue infection. *Clin Diagnostic Virol* 1998:75-81.
- 29.- Tijssen P. Non-immunologic molecular recognition system used in immunoassays. In Burdon R.H and Van Knippenberg P.H., editores Practice and theory of enzyme immunoassays. 1<sup>st</sup> edition. The Netherlands 1985:21-3.
- 30.- Chan DW. Automation of Immunoassays. En: Diamandis EP, Christopoulos TK, editores. Immunoassay, San Diego, California, 1996:483-504.
- 31.- IPK. Técnicas de Laboratorio para el Diagnóstico de Dengue y la caracterización del virus del dengue. El dengue, un desafío en el tercer milenio Curso Internacional, La Habana 2001; Cuba: 1-118.
- 32.- Nawa M, Takasaki T, Yamada K, Akatsuka T, Kurane I. Development of dengue IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay with higher sensitivity using monoclonal detection antibody. *J Virol Methods* 2001; 92:65-70.
- 33.- Sang C, Cuzzubbo A, Devine P. Evaluation of commercial capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin M and G antibodies produced during dengue infection. *Clin Diagn Lab* 1998; 5:7-10.
- 34.- Vorndam V, Kuno G. Laboratory diagnosis of dengue virus infections. En: Gubler DJ, Kuno G editores. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. CAB International, 1997.
- 35.- Gubler D. Serological diagnosis of dengue/dengue haemorrhagic fever. *Dengue Bull* 1996; 20:20-3.