

ESTUDIO COMPARATIVO MAC-ELISA- INMUNODIFUSIÓN (PAN BIO®) DENGUE 1998

Fca. Zulema Flores Romo(2), Nicole Monteny(1), Dolores Velasco Olmos(2).

(1) I.R.D.- ORSTOM 213, rue La Fayette, Paris, Francia

(2) LESPSON Calle Dr José Miró Abella s/n Hermosillo, Sonora, México

RESUMEN

El dengue es un flavivirus encontrado en áreas tropicales y subtropicales, cuatro son los serotipos de este virus (1, 2, 3 y 4) que se han detectado, los cuales son relacionados cercanamente, pero distintos antigénicamente. El virus es causante de dengue en humanos, el cual es transmitido por un mosquito principalmente *Aedes aegyti*. En términos de morbilidad, mortalidad y costos económicos, encontramos que el dengue es una de las enfermedades más importantes en el mundo, y podemos observar que esta enfermedad aún sigue avanzando.

El dengue primario se caracteriza por el incremento de las IgM específica de 3-5 días después de la infección, que generalmente persiste de 30-90 días. En el dengue secundario se caracteriza por la alta respuesta a la IgG específica, así como también no todos los pacientes producen una respuesta para la IgM. Esta forma de enfermedad es más complicada, la cual puede resultar en casos graves de Fiebre por Dengue Hemorrágico (FDH) y Síndrome de Shock por Dengue (SSD). La infección por el virus del dengue causa desde un cuadro de manifestaciones clínicas inapreciables hasta enfermedad hemorrágica

fatal. El dengue clásico o fiebre quebrantahuesos es caracterizada por un inicio repentino de fiebre, dolor de cabeza, mialgias, artralgias, prurito, anorexia, cuadro febril, pérdida del gusto. El síndrome de shock por dengue son complicaciones severas asociadas a una infección secundaria con otro serotipo, el diagnóstico temprano de SSD es particularmente el más importante, ya que el paciente puede morir en las siguientes 12-24 horas si no se le aplica el tratamiento adecuado.

El presente estudio se realizó en el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Sonora, México; teniendo como objetivo la comparación de las pruebas MAC-ELISA-Inmunodifusión (Pan Bio®) para dengue realizándose en el año de 1998, en donde se analizaron 126 muestras de sueros humanos.

Los resultados obtenidos en este estudio fueron 26 muestras positivas y 88 negativas por ambas pruebas. Sin embargo, hubo un remanente de 9 casos que no coincidieron. El estudio reveló que en la mayoría de los casos, se obtuvo una concordancia de 90.5% en los resultados, mostrando una comparación favorable.

INTRODUCCIÓN:

El dengue es un flavivirus encontrado en áreas tropicales y subtropicales, cuatro son los serotipos de este virus (1, 2, 3 y 4) que se han detectado, los cuales son relacionados cercanamente, pero distintos antigénicamente. El virus es causante de dengue en humanos, el cual es transmitido por un mosquito principalmente *Aedes aegyti*. En términos de morbilidad, mortalidad y costos económicos, encontramos que el dengue es una de las enfermedades más importantes en el mundo, y podemos observar que esta enfermedad aún sigue avanzando.

La respuesta en anticuerpos difiere en pacientes con infección primaria o secundaria, los cuales son diagnosticados en forma diferente para localizar ya sea una infección primaria o secundaria.

El dengue primario se caracteriza por el incremento de las IgM específica de 3-5 días después de la infección, que generalmente persiste

de 30-90 días. En el dengue secundario se caracteriza por la alta respuesta a la IgG específica, así como también no todos los pacientes producen una respuesta para la IgM. (Ramos-García, C. 1997). Esta forma de enfermedad es más complicada, la cual puede resultar en casos graves de Fiebre por Dengue Hemorrágico (FDH) y Síndrome de Shock por Dengue (SSD). La infección por el virus del dengue causa desde un cuadro de manifestaciones clínicas inapreciables hasta enfermedad hemorrágica fatal. El dengue clásico o fiebre "quebrantahuesos" es caracterizada por un inicio repentino de fiebre, dolor de cabeza, mialgias, artralgias, prurito, anorexia, cuadro febril, pérdida del gusto. El síndrome de shock por dengue son complicaciones severas asociadas a una infección secundaria con otro serotipo, el diagnóstico temprano de SSD es particularmente el más importante, ya que el paciente puede morir en las siguientes 12-24 horas si no se le aplica el tratamiento adecuado.



MATERIAL:

Se trabajaron 126 muestras de suero humano los cuales cumplieran con los criterios de aceptación de muestras: sueros tomados a partir del 6to. al 20 día de evolución (no hemolizados, ni contaminados) provenientes de las diversas instituciones del Estado de Sonora, recolectadas para diagnóstico de dengue. Las muestras fueron procesadas por dos técnicas de estudio: ELISA de captura en la cual se emplea una mezcla de antígenos de los cuatro serotipos (1, 2, 3 y 4); un conjugado de anticuerpo monoclonal (6B6C-1), ambos reactivos proporcionados por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE); además se emplean los respectivos controles positivo alto, positivo bajo y negativo a dengue, anti-IgM humana (μ -chain specific) I-1636 de Sigma, sustrato ABTS Microwell (Peroxidase Substrate System) code 50-62-00 de KLP, albúmina bovina A-7906 de Sigma, placas de 96 pozos de fondo plano y alta adherencia Costar 3590, plástico adherente termorresistente SEAL-PLT-PP2 no estériles de Elkay, baño maría, espectrofotómetro con filtro de 405 nm e impresora.

Para la prueba de Dengue Fever IgM and IgG Rapid Immunochromatographic test, se utilizó un reactivo comercial Pan Bio[®], el cual consta de una tarjeta de prueba y un reactivo A, en presentación de 25 pruebas individuales, micropipeta de 5-50 μ l y reloj de intervalos.

MÉTODOS:

- MAC-ELISA: Captura de IgM específicas de dengue presentes en el suero por medio de anti-IgM humana, en placas de poliestireno con 96 pozos; se les agregan antígenos de dengue titulados y los complejos formados se revelan con un sistema generador de color, cuya intensidad se mide con un espectrofotómetro con filtro de 405 nm (Innis *et al.*

1989). La prueba se considera válida en el momento que el control positivo de una densidad óptica (D.O.) ≥ 1.0 , las muestras problema con D.O. ≥ 0.200 se consideran positivas, muestras con una D.O. ≤ 0.150 se consideran negativas y las muestras con D.O. entre 0.151-0.199 se consideran dudosas. Tiempo de reacción: 3 días.

- Inmunodifusión (Pan Bio[®]): Es un sistema comercializado de difusión en un soporte de nitrocelulosa en donde la IgG y la IgM son capturadas por una línea de anticuerpos de captura anti-IgG humana y anti-IgM humana. Al mismo tiempo se rehidrata un anticuerpo monoclonal anti-dengue revestido con oro coloidal mediante la adición de amortiguador a una zona de color rosado. Una vez que el suero alcanza la línea límite (menos de 2 minutos) la tarjeta se cierra. Esto permite que reaccione el anticuerpo monoclonal anti-dengue con los antígenos de dengue estabilizados en un cojín en la parte superior de la membrana de nitrocelulosa. Adicionalmente en el momento de cerrar el cojín expulsa el complejo antígeno-oro coloidal hacia la membrana de nitrocelulosa así como a un cojín de absorción permitiendo así la fijación de la IgM o la IgG al complejo antígeno-oro coloidal, lo cual nos permite hacer una diferenciación de una infección primaria y una infección secundaria. Tras 5 minutos, nos permite la visualización de los resultados sin medición de intensidad a través de la ventana del panel frontal de la tarjeta. (Vaughn, D., *et al.* 1997). Cuando ocurre la captura del anticuerpo-antígeno marcado con oro coloidal, estos aparecen como líneas púrpuras de la misma manera que las líneas anti-IgG y anti-IgM, se incluye una línea de control como garantía que el resultado de la prueba es correcto (Ramos-García, C. 1997). Tiempo de reacción: 7 minutos.

RESULTADOS:

Los resultados obtenidos de las 126 muestras analizadas por cada una de las dos técnicas se resumieron en la siguiente tabla:

MAC-ELISA	Pan Bio [®]		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	26	1	27
Dudoso	2	1	3
Negativo	8	88	96
Total	36	90	126

Se obtuvo una concordancia en 90.5% [(88+26)/126] de los resultados en base a las dos técnicas, mostrando esto una coincidencia favorable.

Con respecto a la respuesta débil por la técnica de ELISA (resultado dudoso) son tres, de los cuales dos resultaron positivos en Pan Bio[®] (D.O.= 0.161 y 0.174) indicando una mayor sensibilidad de la prueba de inmunodifusión; la tercera muestra con una densidad óptica de 0.153, límite de la zona de lectura dudosa, quedó negativa con la prueba Pan Bio[®].

Sin embargo en algunas muestras, 9 dentro de las 126 estudiadas, los resultados obtenidos en ambas pruebas no coincidieron.

- prueba ELISA positiva con Pan Bio[®] negativo: se presentó un solo caso, con una D.O. = 0.231, la muestra corresponde a una evolución de la enfermedad de 9 días en un joven de 16 años de edad.

- prueba ELISA negativa con Pan Bio[®] positivo: Se presentaron 8 casos, esto puede ocurrir cuando los anticuerpos más representados son IgG, no pudimos detectar los niveles de IgG, debido a que nosotros realizamos detección de anticuerpos IgM solamente.

CONCLUSIONES:

El estudio realizado a 126 muestras, nos permitió analizar la sensibilidad de las dos pruebas utilizadas para el diagnóstico del dengue, donde pudimos constatar que ambas son confiables ya que el porcentaje de concordancia entre ambas técnicas fue de 90.5%. Aunque hubo un remanente de casos que no coincidieron, los cuales podrían deberse a la

BIBLIOGRAFÍA:

Innis, B.L., Nisalak, A., Nimmannitya, S., Kusalerdchariya, S., Chongswasdi, V., Suntayakorn, S., Puttisri, P. and Hoke, C.H. 1989. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis cocirculate. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 40: 418-427

Vaughn, D., Nisalak, A., Theng-Sang, Ch. and Siew-Hoon, L. 1997. Clinical Evaluations of PanBio Dengue

sensibilidad de las técnicas y a factores propios del paciente.

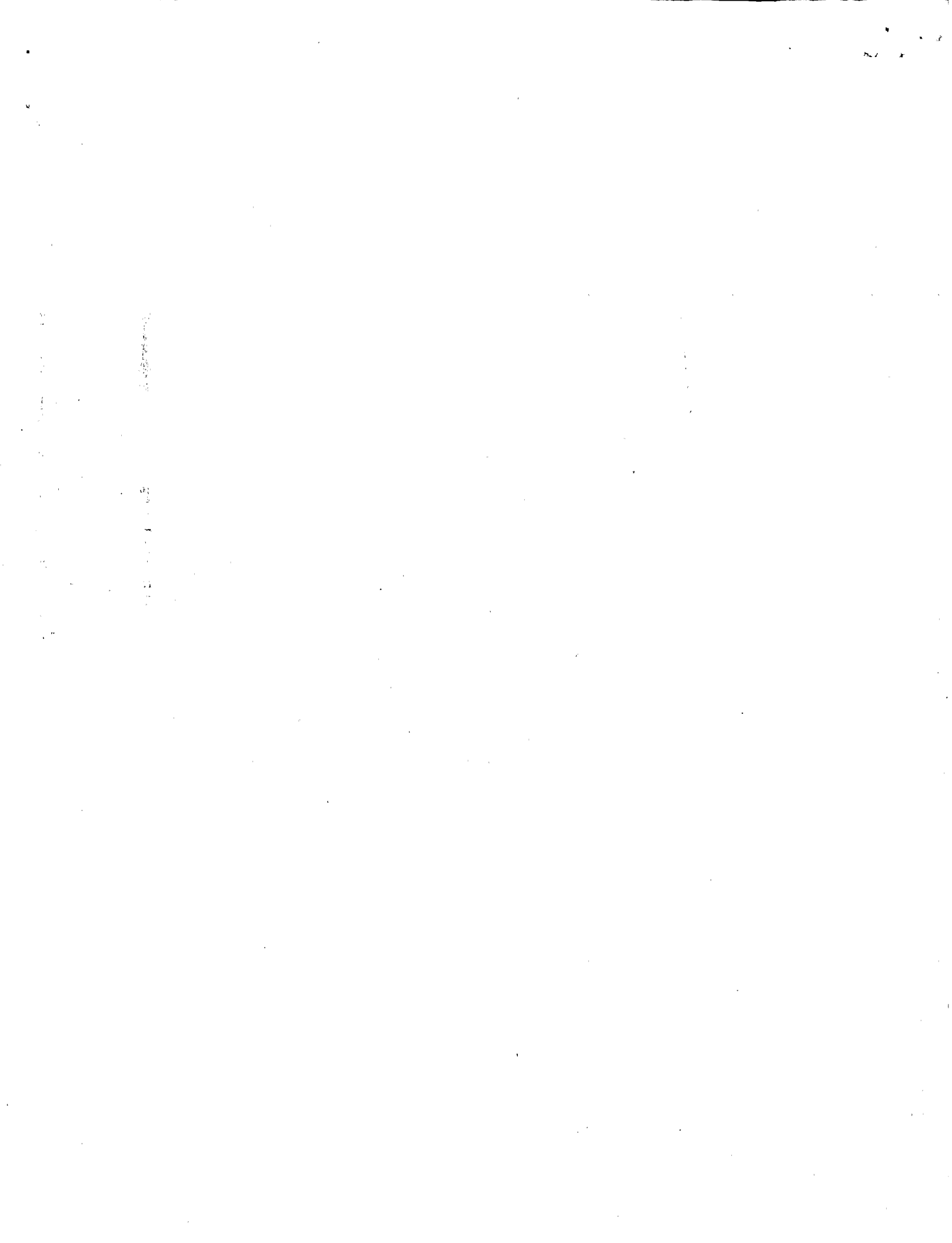
En cuanto al costo de la prueba de Pan-Bio[®] es mucho más costoso que una prueba Mac-ELISA, pero aún así se compensa con el tiempo de obtención de resultados, representando ésta una opción más como apoyo a la vigilancia epidemiológica a éste padecimiento. También presenta la ventaja de ser corrida en el mismo lugar que se encuentra el paciente y no se requiere de personal muy experimentado o equipo de laboratorio sofisticado.

La técnica de Mac-ELISA, es específica para denguevirus y no presenta reacciones cruzadas con otros flavivirus, además de ser una técnica registrada y estandarizada para los laboratorios estatales a nivel Nacional. Esta técnica nos permite procesar un número mayor de muestras, debido a que una placa cuenta con 96 pozos disponibles para muestras y controles, a diferencia del Pan-Bio[®] que únicamente un equipo es disponible para 25 pruebas.

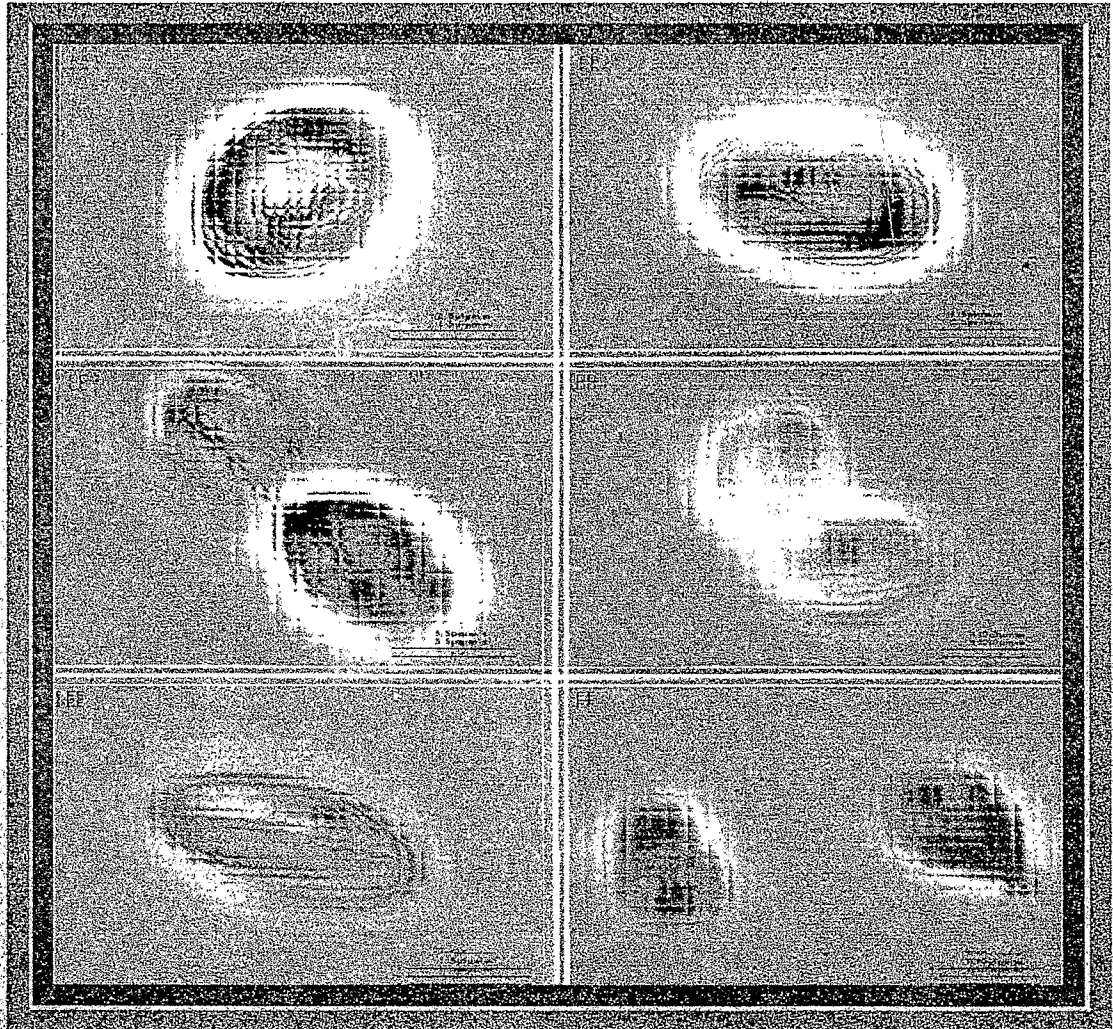
La introducción de nuevas técnicas constituye un gran avance en el estudio del dengue. Sin embargo, no hay que olvidar que la infección por dengue, es un problema a nivel mundial, y por lo tanto es importante seguir investigando y buscando técnicas que nos permitan identificar la infección en los primeros días de evolución y especificarnos el serotipo causante, para obtener un diagnóstico precoz de la enfermedad y poder tomar oportunamente las medidas preventivas para evitar que un gran número de personas se encuentren en riesgo de adquirir la infección.

Rapid Test in South East Asia. Department of Virology Armed Forces Research Institute of Medical Science, Bangkok, Thailand and Department of Pathology Singapore General Hospital, Singapore.pp. 1-11.

Ramos-García, C.1997. Dengue Fever Rapid. Instituto Nacional de Salud Pública. Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas CISE-INSP, Cuernavaca.



6ta. Reunión de Investigación en Salud



MEMORIA
1980

