

Comparación entre los métodos de inmunocromatografía e inmunoensayo enzimático (ELISA) en el diagnóstico del dengue

Comparison Between Immunochromatographic and Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) in the Dengue Diagnosis

**Valero, Nereida ^{1,4}; Montiel, Milagros ²;
Arias, Julia ²; Fuentes, Belkis ³; Mavarez,
Alibeth ¹; Nava, Lesmy ¹ y Hernández, José ¹**

¹Sección de Virología, Instituto de Investigaciones Clínicas “Dr. Américo Negrette”. ²Departamento de Microbiología, Práctica Profesional de Inmunología. ³Departamento de Salud Pública y Social, Práctica Profesional Asistencial/agroindustrial, Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

⁴Autor de correspondencia: Nereida Valero, Sección de Virología, Instituto de Investigaciones Clínicas “Dr. Américo Negrette”. Apartado postal 23. E-mail: nere98@hotmail.com

Resumen

La búsqueda de técnicas para la confirmación diagnóstica de Dengue y su reciente comercialización requieren su estudio en cuanto a sensibilidad, especificidad, reproducibilidad, rapidez y costo. Con el objetivo de comparar dos técnicas serológicas para el diagnóstico de esta infección, se analizaron 184 sueros provenientes de pacientes con diagnóstico confirmatorio de Dengue y 60 de Rubéola para la evaluación de la especificidad. Fueron procesados por el método de Inmunocromatografía (IC) e Inmunoensayo Enzimático (ELISA) para la determinación de anticuerpos IgM e IgG antidengue. Para IC y ELISA se obtuvo un 0,70 y 0,79 respectivamente, de sensibilidad nosológica en la determinación de anticuerpos IgM; en la determinación de IgG la sensibilidad del ELISA resultó significativamente incrementada ($p < 0,0001$) con respecto a IC (0,92 vs. 0,65). Ambas técnicas alcanzaron un 98% de reproducibilidad y 100% de especificidad. Estos resultados sugieren que el ELISA es óptima para la detección de infecciones primarias y secundarias, mientras que IC demostró ser más rápida y aplicable en caso de brotes y/o epidemias, sin embargo es menos

sensible en el diagnóstico de infecciones secundarias por virus Dengue y consecuentemente menos adecuada para el seguimiento y detección de casos de Fiebre Hemorrágica por Dengue/Síndrome de Choque (FHD/SCD) en áreas endémicas.

Palabras clave: Anticuerpos, dengue, inmunoanálisis enzimático, inmunocromatografía

Abstract

The search for techniques for the diagnostic confirmation of Dengue (IgM and IgG) and recent commercialization of such serums requires of the study of their sensibility, specificity, reproductibility, speed and costs. For the purpose of comparing two serological techniques for the diagnosis of this infection, 184 serum samples of patients with confirmed diagnosis of Dengue and 60 with Rubella, were analyzed by immune-chromatographic (IC) and enzyme linked immune-absorbent tests (ELISA) by determination of anti-dengue antibody IgM and IgG. In the IC and ELISA techniques levels of 0,70 and 0,79 in nosologic sensibility were obtained, respectively in the determination of antibody IgM; while the sensibility of ELISA IgG resulted significantly elevated ($p < 0,0001$) with respect to IC (0,92 vs 0,65). Both techniques reached reproduction levels of 98% and a specificity of 100%. These results suggest that ELISA is best for the detection of primary and secondary infections, while IC was the fastest assay and applicable in outbreaks and epidemics; however, it was less sensitive for the diagnosis of secondary infections for dengue virus and consequently less adequate for the screening of dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome (DHF/DSS) in endemic areas.

Key words: Antibodies, enzymatic immune-analysis, immune-chromatography.

Introducción

El diagnóstico integral del Dengue se hace sobre la base del cuadro clínico, factores epidemiológicos y por diversos métodos de laboratorio, basados fundamentalmente en el aislamiento viral y en técnicas serológicas; cada uno de ellos con distintos grados de sensibilidad, especificidad y complejidad (1-6).

La abrupta incidencia del Dengue en el mundo, ha puesto en evidencia la necesidad de buscar métodos nuevos para el diagnóstico preciso, que además sean simples, eficientes y rápidos desde el punto de vista serológico, epidemiológico y clínico; características que reúnen los métodos para la detección de anticuerpos IgM; que aunque no diferencian el serotipo infectante son los más usados, aún cuando la reactividad cruzada que se produce

entre los *Flavivirus* y su amplia distribución provoca ciertas polémicas en cuanto a su especificidad y sensibilidad (7-11); razones por las cuales han surgido nuevas técnicas comerciales, con el fin de aligerar y hacer menos laborioso el proceso de confirmación diagnóstica de pacientes que padecen esta enfermedad, al tiempo que permiten aportar un mejor control, monitoreo poblacional y prevención (12 -15).

El propósito de este trabajo es comparar dos pruebas serológicas de ELISA e IC, actualmente muy utilizadas para la detección de anticuerpos de tipo IgM e IgG en pacientes con diagnóstico confirmatorio de Dengue; con la finalidad de valorar la rapidez, especificidad, sensibilidad y reproducibilidad de ambas pruebas para un diagnóstico eficaz y oportuno en las infecciones primarias y se-

cundarias producidas por el virus Dengue en una población del Estado Zulia, Venezuela.

Material y Método

Población Estudiada

Se seleccionaron 184 muestras de suero convaleciente provenientes de pacientes con diagnóstico confirmatorio por aislamiento viral de infección por virus Dengue (Fiebre Dengue [FD] y Fiebre Hemorrágica [FHD]), sin distinción de sexo, con edades comprendidas entre 0 a 75 años, referidos a la Unidad de Inmunoserología del Hospital "Dr. Adolfo Pons" de Maracaibo, y al Instituto de Investigaciones Clínicas "Dr. Américo Negrette" de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia. A todos los pacientes se les llenó un formulario diseñado para la investigación de Arbovirus. Las muestras seleccionadas presentaron un promedio de 9 ± 2 días de evolución de la enfermedad.

Una infección primaria es la primoinfección por cualquier serotipo del virus y una secundaria es la siguiente infección heterotípica, que serológicamente se determinan la primera por detección de IgM y la segunda por títulos altos de IgG, respectivamente.

Se incluyeron 40 individuos con inmunidad confirmada al virus de Rubéola como control de la especificidad para la detección de IgG y 20 con diagnóstico de infección aguda para la IgM.

Prueba de Inmunocromatografía para la detección de anticuerpos IgM e IgG anti- Dengue (PanBio Pty. Ltd., Brisbane-Australia)

Los anticuerpos tipo IgM o IgG, presentes en el suero reaccionan cuando se combinan con anti IgM e IgG humana, inmovilizados en un soporte o tira, en 2 líneas. El anticuerpo monoclonal antidengue marcado con

oro coloidal reacciona con los antígenos virales. En una muestra positiva, el complejo de oro es capturado por la IgM y/o IgG en la membrana formando una línea color púrpura. El procedimiento fue desarrollado según instrucciones de la casa comercial, ensayando todas las muestras por duplicados.

ELISA para la detección de anticuerpos IgM e IgG anti Dengue (Diag Kit C.A., Venezuela)

La prueba consiste en un inmunoensayo de captura sobre fase sólida, para la detección de anticuerpos IgM específicos a virus Dengue. Se utilizan pozos sensibilizados con anticuerpos anti IgM humana. Cuando se adicionan las muestras de suero, los anticuerpos IgM presentes en los mismos son capturados y detectados mediante la adición de un complejo antígeno Dengue/anticuerpo monoclonal antinflavivirus conjugado a la enzima peroxidasa. Esta reacción se evidencia mediante la reacción con un cromógeno-sustrato para esta enzima (Tetrametilbenzidina/ H_2O_2). La determinación de anticuerpos IgG se basa en el mismo principio, solo cambia el anticuerpo que está adherido a la fase sólida. El procedimiento fue desarrollado según instrucciones del fabricante y todas las muestras fueron ensayadas por duplicado.

Análisis estadístico

Los resultados se representaron en Tablas de distribución de frecuencia y gráficos según variables de positividad para cada una de las técnicas, concordancias positivas y negativas y sensibilidad y especificidad nosológica al comparar con una prueba de referencia, así como la reproducibilidad inter e intraensayo la cual fue obtenida promediándose el índice de variabilidad de los valores de los controles entre y dentro de cinco montajes. Se utilizó la prueba Ji-cuadrado y se con-

sideró significativo toda $p < 0,05$. El cálculo de la sensibilidad nosológica y especificidad se realizó según la siguiente fórmula: $S(+/E)$ y $P(-/E)$, respectivamente. Donde S es la sensibilidad, + los casos positivos, - los casos negativos, P es la especificidad y E el total de enfermos (16).

Resultados

En la Tabla 1 se observan los porcentajes de positividad para IgM anti Dengue determinados por los métodos de ELISA e IC. Del total analizados 130 muestras resultaron positivas (70,65%) por IC y 146 (79,34%) por ELISA, correspondiendo a una sensibilidad nosológica de 0,70 y 0,79, respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre la positividad encontrada con ambas técnicas. La especificidad para IgM fue de 100% con ambas técnicas. La determinación de anticuerpos IgG antidengue, arrojó un número significativamente ($p < 0,0001$) mayor (170/184) de casos positivos por ELISA (92,39%) con respecto a la técnica de IC (65,21%); con la cual se obtuvo una sensibilidad de 0,92 vs. 0,65.

La reproducibilidad de ambas técnicas obtenida por los valores controles fue de 98% intra e interensayo.

En la Figura 1 se representa el total de muestras analizadas por los métodos de ELISA e IC para la determinación de anticuerpos IgM e IgG antidengue. Del total de muestras analizadas para IgM, 32 (17,39%) mostraron coincidencia (positividad o negatividad por ambas técnicas) entre los casos falsos negativos detectados por ambas técnicas, mientras que 134 fueron diagnosticadas como positivas, lo que constituye una coincidencia de 67,39%. En la detección de IgG, fue similar el porcentaje de casos negativos (34/18,47%) y positivos (56/60,86).

Discusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran una alta sensibilidad y especificidad diagnóstica para la determinación de anticuerpos IgM antidengue a través de las técnicas de ELISA e IC; no así para la detección de infecciones secundarias, para lo cual la ELISA resultó ser altamente sensible en relación a IC.

Al respecto, Vaughn y cols., (14) encontraron con la prueba de IC, un 100% de sensibilidad con un 89% de especificidad en el diagnóstico de las infecciones primarias y secundarias de Dengue, pero a través de las determinaciones separadas de IgM e IgG.

Tabla 1. Seropositividad de anticuerpos IgM e IgG antidengue por los métodos de Inmunocromatografía e Inmunoanálisis enzimático en pacientes con Dengue.

Isotipo de Inmunoglobulina	Método				
	n	+ /%	IC	ELISA	
S/P			+ /%	S/P	
IgM (Infección Primaria)	184	130 /70,7	0,70/1	146/ 79,3	0,79/1
IgG (Infección Secundaria)	184	120 /65,2	0,65/1	170*/ 92,4	0,92/1

n: Número total de muestras analizadas, +: positivos, %: porcentaje, S: sensibilidad nosológica, P: especificidad.
* $p < 0,0001$

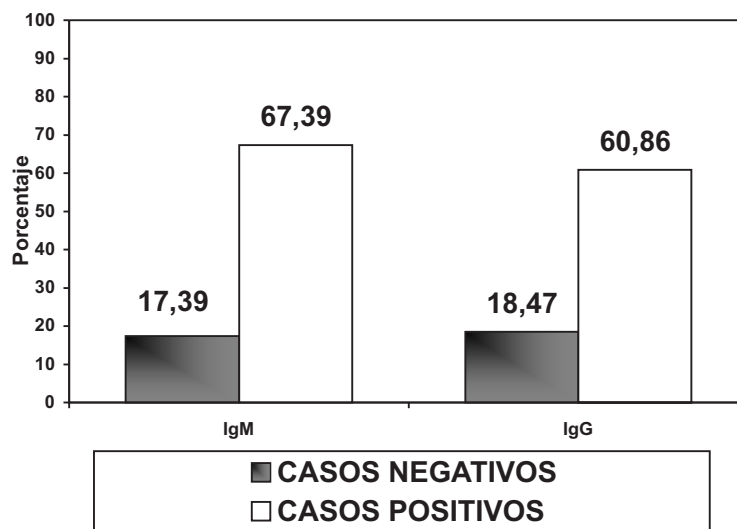


Figura 1. Coincidencia entre resultados obtenidos por ELISA e Inmunocromatografía para la determinación de IgM e IgG antidengue.

Groen y cols., (18) reportaron una sensibilidad y especificidad para IC de 100 y 92%, respectivamente para IgM antidengue. Hallazgos similares reportan Palmer y cols. (12), los cuales concluyeron que el método de IC es 100% sensible y específico. Cifras superiores en cuanto a la sensibilidad encontrada en este estudio en el cual se demostró sólo un 70%. Resultados similares publican, Branch y cols. (17) quienes determinaron en 62 muestras de pacientes con Dengue una sensibilidad de 84% para dos métodos similares a los de este estudio, de 85,5% para IgM Elisa y 83,9% para IC.

Con respecto al ELISA en este estudio se obtuvo una sensibilidad de 79% y 92% en la detección de IgM e IgG anti dengue; hallazgo que concuerda con los resultados encontrados por Groen y cols. (18) que al evaluar seis inmunoensayos para la detección de IgM e IgG al virus dengue obtuvieron una sensibilidad de 87% para la IgM y una sensibilidad de 100% para la IgG en la confirmación diagnóstica del Dengue; mientras que Cuzzubbo y cols. (7) y Lam y cols. (8) obtuvieron un 95%

de sensibilidad con la técnica de ELISA IgM y una especificidad de 94%.

Al comparar los resultados obtenidos por el método de Elisa con los de IC y el porcentaje de coincidencia en la detección de casos positivos para la determinación de anticuerpos IgM, no mostraron diferencias entre ellos, dejando claramente establecidos que ambas técnicas son útiles en la detección de casos agudos de Dengue; sin embargo cuando se relacionan los resultados obtenidos en la seropositividad para infecciones secundarias se observó una diferencia marcada en la capacidad diagnóstica de detección de IgG, que descartando la reactividad cruzada con otros Flavivirus, es obvia la ventaja del ELISA sobre la IC La detección de Infecciones secundarias en una población con un alto índice de endemidad, es un indicador importante de susceptibilidad a la aparición cada vez más frecuente de casos de FHD/SCD y un pilar fundamental en la vigilancia serológica (13, 19-21).

Con respecto a la reproducibilidad, en este estudio fue de 98%, a la misma conclusión llegaron Vaughn y cols. (13, 14), quienes

en sus investigaciones obtuvieron una reproducibilidad similar y una sensibilidad de 100% para IC con una buena correlación con Elisa e Inhibición de la Hemaglutinación (IHA). De igual forma han reseñado otros investigadores, resultados semejantes en las técnicas de IC y Elisa donde pudieron demostrar que ambos métodos tenían similitud en su alta reproducibilidad (7).

En cuanto al tiempo empleado para la realización de estos métodos se destaca que la técnica de Elisa tiene un tiempo preestablecido de ejecución de aproximadamente 3 horas, que al compararse con el método de IC el cual es de 7 minutos, se evidencia rapidez notable. Diversos autores (12, 13, 17) han concluido que la IC es una técnica rápida y confiable para el diagnóstico del dengue, no obstante, no sólo es importante la rapidez para que una técnica sea la mejor, debe tener alta especificidad, sensibilidad y reproducibilidad, para que pueda ser confiable en la generación de resultados fidedignos.

En cuanto a los equipos utilizados para la realización del método de Elisa se necesita de una infraestructura adecuada, mientras que la prueba de IC no exige infraestructura especial dado que se puede ejecutar en espacios limitados o en situaciones de emergencia donde la electricidad no está disponible (12).

Los resultados obtenidos arrojaron que IC es un método sensible, específico, reproducible, rápido, económico, fácil de utilizar e interpretar, además permite obtener el diagnóstico de infecciones primarias y secundarias en la misma corrida, y se requiere de una sola muestra para la realización de la misma, pero demostró no ser lo suficientemente sensible a la detección de IgG antidengue, hallazgos que concuerdan con Blacksell y cols., (2, 4).

Por otro lado, el Elisa ensayado cuenta con una alta sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, sin embargo esta técnica

cuenta con desventajas con respecto a IC, en cuanto al tiempo empleado para su ejecución y la determinación de anticuerpos IgM e IgG es por separado. Se requiere de número mínimo de muestras para su montaje y un equipo para su lectura; no obstante, su alto valor diagnóstico es evidente en el monitoreo de infecciones primarias y especialmente en pacientes con respuesta anamnésica temprana con altos títulos de IgG y valores muchas veces indetectables de IgM antidengue.

Conclusiones

Estos resultados sugieren que el ELISA es óptima para la detección de infecciones primarias y secundarias, mientras que IC demostró ser más rápida y aplicable en caso de brotes y/o epidemias, sin embargo es menos sensible en el diagnóstico de infecciones secundarias por virus Dengue y consecuentemente menos adecuada para el seguimiento y detección de casos de Fiebre Hemorrágica por Dengue/Síndrome de Choque (FHD/SCD) en áreas endémicas.

Finalmente se recomienda el uso de polipéptidos recombinantes con la finalidad de mejorar aún más la sensibilidad del ELISA y disminuir el porcentaje de falsos negativos observado en este estudio (21, 22).

Agradecimientos

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES/LUZ), CC-0789-04.

Referencias Bibliográficas

- (1) Martínez, E. Dengue y Dengue Hemorrágico. Editorial de la Universidad Nacional de Quilmes. Primera Edición. Buenos Aires. 1998; p 269.

- (2) Blacksell, SD.; Newton, PN.; Bell, D.; Kelley, J.; Mammen MP, Jr. Vaughn DW, Wuthiekanun, V.; Sungkakum, A.; Nisalak, A.; Day, NP. The comparative accuracy of 8 commercial rapid immunochromatographic assays for the diagnosis of acute dengue virus infection. *Clin Infect Dis.* 2006; 42(8):1127-34.
- (3) Montes, T. Actualización en Dengue. Parte I. *Rev SVM.* 2001; 21(1): 39-45.
- (4) Tran, TN.; De Vries, PJ.; Hoang, LP.; Phan, GT.; Le, HQ.; Tran, BQ.; Vo, CM.; Nguyen, NV.; Kager, PA.; Nagelkerke, N.; Groen, J. Enzyme-linked immunoassay for dengue virus IgM and IgG antibodies in serum and filter paper blood. *BMC Infect Dis.* 2006; 25: 6-13.
- (5) Montes T. Actualización en Dengue. Parte 2. *Rev SVM.* 2001; 21(2):78-84.
- (6) Valero, N.; Añez, F.; Larreal, Y.; Arias, J.; Rodríguez, E.; Espina, L. Evaluación de la inmunidad contra los virus de la Encefalitis Equina y dengue en la población humana de San Carlos, Municipio Insular Almirante Padilla, Estado Zulia, Venezuela. Año 1996. *Invest Clin.* 2001; 42 (3): 161-169.
- (7) Cuzzubbo, A.; Vaughn, D.; Nisalak, A.; Solomon, T.; Kalayanarooj, S.; Aaskov, J.; et al. Comparison of PanBio dengue Duo IgM and IgG capture Elisa and Venture technologies dengue IgM and IgG Dot Blot. *J Clin Virol.* 2000; 16: 135-144.
- (8) Lam, S.; Ew, Ch.; Mitchell, J.; Cuzzubbo, A.; Devine, P. Evaluation of a capture screening linked immunosorbent assay for combined determination of immunoglobulin M and G antibodies produced during Dengue infection. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000; 7(5): 850-852.
- (9) Koraka, P.; Zeller, H.; Niedrig, M.; Osterhaus, AD.; Groen, J. Reactivity of serum samples from patients with a Flavivirus infection measured by immunofluorescence assay and ELISA. *Microbes Infect.* 2002; 4(12): 1209-1215.
- (10) Vázquez, S.; Lemos, G.; Pupo, M.; Ganzón, O.; Palenzuela, D.; Indar, A.; Guzmán, M. Diagnosis of Dengue Virus Infection by the visual and simple AuBioDOT Immunoglobulin M Capture System. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003. 10(6): 1074-1077.
- (11) Wu, S.J.L.; Paxton, H.; Hanson, B.; Kung, CG.; Chen, TB.; Rossi, C.; et al. Comparison of Two Rapid Diagnostic Assays for Detection of Immunoglobulin M Antibodies to Dengue Virus. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2000; 7(1): 106-110.
- (12) Palmer, C.; King, D.; Cuadrado, R.; Peréz, E.; Baum, M.; Ager, A. Evaluation of the MRL diagnostic dengue fever virus IgM capture Elisa and the PanBio rapid immunochromatographic test for diagnostic of dengue fever in Jamaica. *J Clin Microbiol.* 1999; 37 (5): 1600-1601.
- (13) Vaughn, D.; Nisalak, A.; Solomon, T.; Kalayanarooj, S.; Dung, N.; Kneen, R. et al. Rapid serology diagnosis of dengue virus infection using a commercial capture Elisa that distinguishes primary and secondary infections. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 60 (4): 693-698.
- (14) Vaughn, D.; Nisalak, A.; Kalayanarooj, S.; Solomon, T.; Dung, N.; Cuzzubbo, A. et al. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of dengue virus infection. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 234-238.
- (15) Theng, SCh.; Cuzzubbo, A.; Devine P. Evaluation of a comercial capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Immunoglobulin M and G Antibodies produced during Dengue infection. *Clin Diagn lab Immunol.* 1998; 5(1) 7-10.
- (16) Méndez, I.; Guerrero, D.; Moreno, L.; Sosa, C. *El Protocolo de Investigación.* 1era ed. Ciudad de México: Trillas; 1996. p. 210.
- (17) Branch, S.; Levett, P. Evaluation of four methods for detection of immunoglobulin M antibodies to Dengue virus. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999; 6 (4): 555-557
- (18) Groen, J.; Koraka, P.; Velzing, J.; Copra, C.; Osterhaus A. Evaluation of Six Immunoassays for Detection of Dengue Virus-Specific Immunoglobulin M and G Antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000; 7 (6): 867-871.
- (19) Vázquez, S.; Bravo, J.; Pérez, A.; Guzmán, M. Elisa de Inhibición. Su utilidad para clasificar un caso de Dengue. *Rev Cubana Med Trop.* 1997; 42(2): 108-112.

- (20) Cuzzubbo, A.; Endy, T.; Nisalak, A.; Kalayanaroj, S.; Vaughn, D.; Ogata, S. et al. Use of recombinant envelope proteins for serological diagnosis of dengue virus infection in an immunochromatographic assay. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001; 8(6): 1150-5.
- (21) Oliveira, C.; Parada, D.; Queiroz, M.; Borba, L.; Goldenberg, S.; Nunes, C.; Aurelio M. Dengue virus infection: Comparison of methods for diagnosis the acute disease. *J Clin Virol.* 2005; 8 (1): 272-277.
- (22) Barreto, F.; Pereira, M.; Ribeiro, R.; Goncalves, H.; Riley, L.; Harris E. Analysis of recombinant dengue virus polypeptides for dengue diagnosis and evaluation of the humoral immune response. *Am J Trop Med Hyg.* 2004; 71 (2): 144-152.