Anales de la Facultad de Medicina
Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Copyright © 1999
ISSN 1025 - 5583
Vol. 60, N° 2 - 1999
Págs. 110 - 114

Inmunoanálisis Ligado a Enzimas en Membranas de Nitrocelulosa para la Determinacion de IgM en el Diagnóstico de Dengue serotipo 1*

SEGUNDO LEÓN
ASESORES: DRA. CAROLINA GUEVARA, DR. AUSBERTO CHUNGA
Servicio de Medicina Transfusional del Centro Médico Naval, Lima - Perú.

RESUMEN

OBJETIVOS: Evaluar la sensibilidad y especificidad de un inmunoensayo en membranas de nitrocelulosa para la determinación de IgM, utilizando como referencia la prueba de inmunoensayo de captura de IgM en placa, para el diagnóstico de dengue. MÉTODOS: Se procesaron 101 muestras de suero divididas en dos grupos: 53 muestras de personas con dengue serotipo 1 (DEN1), y 48 muestras de personas aparentemente sanas. Ambos grupos fueron evaluados por el método de enzimoinmunoensayo en placa (ELISA) como método de referencia y por el método de enzimoinmunoensayo en membranas de nitrocelulosa (EIA-NC). RESULTADOS: Con el método de EIA-NC, se detectaron anticuerpos IgM antiDEN1 en 50 (94,34%) de las muestras de pacientes enfermos y en 7 (14,58%) de las muestras de controles sanos, mientras que con el método de ELISA el total de muestras de pacientes enfermos y el total de muestras de pacientes sanos fueron positivas y negativas, respectivamente. CONCLUSIÓN: El EIA-NC desarrollado parece ser una buena alternativa para el diagnóstico de infección por virus dengue.

Palabras claves: Dengue; Colodion; Inmunoensayo; IgM.

NITROCELLULOSE MEMBRANE-BASED ENZYME-LINKED IMMUNOASSAY FOR DENGUE SEROTYPE-1 IgM DETECTION

SUMMARY

OBJETIVES: To evaluate the sensitivity and specifity of a nitrocellulose membrane-based immunoassay for dengue IgM, with respect to capture enzyme immunoassay, for the diagnosis of dengue virus infection. METHODS: 101 serum samples were processed and divided into 2 groups: 53 from dengue serotype 1 (DEN1) infected patients, and 48 from healthy subjects. Both groups were tested with a nitrocellulose membrane-based IgM capture enzyme immunoassay (NMB-EIA) and also with an ELISA as referential pattern. RESULTS: NMB-EIA testing detected IgM anti-DEN1 in 94,34% of samples from infected patients, and in 14,58% of control samples, whereas ELISA fails to report false positive or false negative results. CONCLUSION: NMB-EIA appears to be a good alternative for dengue infection diagnosis.

Keywords: Dengue; Collodion; Immunoassay; IgM.

* Trabajo presentado como Tesis para optar el Título de Licenciado en Tecnología Médica en la Facultad de Medicina-UNMSM.

Correspondencia:
Tec. Méd. Segundo León Sandoval
Servicio Medicina Transfusional. Centro Médico Naval.
Av. Venezuela s/n. Callao-2, Perú.
E-mail: ortiz002@marina.mil.pe

INTRODUCCIÓN

Los arbovirus (del termino en inglés *arthropod borne virus*) son un grupo de agentes infecciosos biológicamente transmitidos por artrópodos hematófagos a hospederos vertebrados susceptibles ([1-4]).

Se pueden replicar en los tejidos orgánicos de los artrópodos sin señal de enfermedad o daño. El vector adquiere una infección de por vida mediante la ingesión de sangre de un vertebrado virémico. Algunos arbovirus se conservan en la naturaleza mediante transmisión transovárica del vector a su descendencia, y posiblemente sexual en algunos artrópodos ([1,2,5,6]). Casi 100 especies de arbovirus son capaces de infectar al hombre, pero no todos causan enfermedad manifiesta; se cree que los que infectan al hombre son todos zoonóticos, siendo éste el huésped accidental que no desempeña papel importante alguno en el mantenimiento o en el ciclo de transmisión del virus. Las excepciones a esta regla son la fiebre amarilla urbana y el dengue ([3,4,6]).

Los arbovirus se encuentran clasificados en cinco familias de acuerdo a sus propiedades físicas, químicas y antigénicas; estas son las familias *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae* y *Rhabdoviridae* ([3,6,7]).

El virus dengue a ser estudiado se encuentra dentro del género flavivirus, conjuntamente con los virus de la encefalitis B japonesa, encefalitis del valle Murray, encefalitis de San Luis, fiebre del Oeste del Nilo, fiebre amarilla, entre otros ([1,3,6]).

Usando anticuerpos monoclonales y policlonales de humanos y primates, ha sido posible la identificación de cuatro serotipos distintos de dengue, DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4. Han sido descubiertos subtipos antigénicos de los virus dengue 3 y 4 ([3,6]).

El virus dengue es transmitido exclusivamente de humano a humano a través de la picadura de mosquitos infectados de la familia Aedes. La hembra adquiere el virus al alimentarse de una persona virémica, las picaduras de mosquito son infectantes después de un período de incubación de 8 a 14 días (incubación extrínseca). Luego que una persona ha sido picada por un mosquito infectado va a transcurrir un período de incubación de 3 a 15 días (incubación intrínseca), luego de lo cual aparecen la clásica fiebre dengue caracterizada por fiebre, sudoración, dolores musculares y articulares, pudiendo aparecer una erupción cutánea. Los hallazgos de laboratorio incluyen neutropenia con subsecuente linfocitosis, con marcada presencia de linfocitos atípicos, y trombocitopenia, pudiendo aparecer también proteinuria y elevación de las enzimas hepáticas. La enfermedad es usualmente menos severa en niños que en adultos. La fiebre hemorrágica por dengue y el síndrome de choque por dengue son formas más severas de la enfermedad, asociadas con una segunda infección causada por un serotipo distinto al que causó la primoinfección ([1,6,8,10,11]).

El diagnóstico serológico utilizando pruebas rápidas y/o de campo se ha incrementado en los últimos años debido a la facilidad que se tiene en su manejo y utilización.

Los objetivos del presente trabajo fueron evaluar la sensibilidad y especificidad de un inmunoensayo enzimático en membranas de nitrocelulosa (NC) para la determinación de IgM, utilizando como referencia la prueba de ELISA en el diagnóstico de dengue y determinar los valores predictivo positivo (VPP) y predictivo negativo del ensayo (VPN).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se procesó un total de 101 muestras divididas en dos grupos. El primer grupo constó de 53 muestras de suero provenientes de personas enfermas infectadas con dengue 1, las cuales fueron obtenidas durante un brote epidémico habido en el distrito de Mancora, provincia de Talara, departamento de Piura, entre los meses de mayo y julio de 1997. Las muestras fueron proporcionadas por el Laboratorio de Virología del Naval Medical Research Institute Detachment (NAMRID). El segundo grupo constó de 48 muestras de suero provenientes de personas aparentemente sanas, las cuales fueron proporcionadas por el servicio de Medicina Transfusional del Centro Medico Naval. Ambos grupos de muestras fueron conservados a -20°C hasta el día del análisis.

Enzimoinmunoensayo en membranas de nitrocelulosa (EIA-NC)

Se cortó el papel de nitrocelulosa en cuadros de 1,0 x 1,5 cm, sobre los cuales se colocó 2 µL de anticuerpo anti-IgM humano diluido 1:200 en agua destilada estéril. Luego de secar las membranas por 30 minutos a temperatura ambiente, se sumergieron en solución de leche descremada al 5% por espacio de 2 horas para

bloquear los sitios no ligados al anticuerpo, luego se lavaron las membranas en agua destilada por una vez, se secaron a temperatura ambiente y se conservaron a 4°C hasta el día de su uso. Posteriormente las muestras fueron evaluadas mediante EIA-NC con la siguiente metodología: 1) Adición de 500 µL de muestra diluida 1:10 sobre cada membrana de NC; 2) adición de 500 µL de antígeno de dengue 1 diluido 1:20; 3) adición de 500 µL de fluido ascítico de ratón antidengue 1 diluído 1:200; 4) adición de 500 µL de conjugado anti IgA-IgG-IgM de ratón / fosfatasa alcalina diluido 1:500; y 5) adición de 500 µL de solución de sustrato Bromo Cloro Indol Fosfato-Nitroazul de Tetrazolio (BCIP-NBT). Se dejó desarrollar el color por espacio de 10 minutos, luego de lo cual se lavó con agua destilada y procedió a la lectura de las membranas de NC. Se incubó las membranas de NC a 37°C por 30 minutos y luego se lavaron en solución PBS Tween 20 al 0,02% (tres lavados con intervalos de cinco minutos) luego de los pasos 1, 2, 3 y 4. Las diluciones de los reactivos se realizaron en solución de leche descremada al 5%.

Inmunoanálisis Ligado a Enzimas (ELISA)

Se colocó 100 µL de anticuerpo anti-IgM humano diluido 1:1000 en PBS pH 7,4 en placas de cloruro de polivinilo (PVC). Luego se cubrieron con papel aluminio y guardadas a 4°C hasta el día del ensayo. Posteriormente, las muestras fueron evaluadas mediante ELISA con la siguiente metodología: 1) Adición de 100 µL de muestra diluída 1:100 en cada pocillo; 2) adición de 100 µL de antígeno de dengue 1 diluído 1:5; 3) adición de 100 µL de fluido ascítico de ratón antidengue 1 diluido 1:2000; 4) adición de 100 µL de conjugado anti IgA-IgG-IgM de ratón/peroxidasa de rabano, diluido 1:2000; 5) adición de 100 µL de solución de sustrato 2,2´-azinodi(3-etil-benztiazolina sulfonato) (ABTS) (6). Se incubó a 37°C durante 30 minutos y se procedió a su lectura en un espectrofotómetro a 410 nm. Se incubó las placas a 37°C por espacio de 60 minutos y luego se lavaron en solución de PBS Tween 20 al 0,01% (ciclo de 5 lavados en un lavador automático) luego de los pasos 1, 2, 3 y 4. Las diluciones de los reactivos se realizaron en solución de leche descremada al 5% conteniendo suero humano normal al 2%.

El valor de corte para la prueba de ELISA fue 0,200. Para el EIA-NC se consideró como positiva toda aquella muestra que presentara un halo visible de coloración azul púrpura en el sitio donde se colocó el anticuerpo anti IgM, mientras que aquellas que no presentaron el halo fueron consideradas negativas. Las muestras de suero fueron evaluadas por duplicado tanto para el ELISA como para el EIA-NC.

RESULTADOS

Ambos grupos de muestras estudiados se procesaron mediante ELISA, la cual es considerada la prueba de referencia. En esta prueba el total de muestras provenientes de personas infectadas con dengue 1 resultaron positivas para IgM antidengue 1, mientras que las del segundo grupo de muestras, las cuales provenían de personas sanas, todas fueron negativas para IgM antidengue 1.

En cuanto al EIA-NC desarrollado en este trabajo, tenemos que de las 53 muestras provenientes de pacientes enfermos infectados con DEN1, 50 mostraron resultados positivos en esta prueba y 3 resultaron negativas, mientras que de las 48 muestras provenientes de donantes aparentemente sanos 41 resultaron negativas y 7 positivas. Es decir que, con relación al ELISA, el ensayo en mención presentó una sensibilidad de 94,34% y una especificidad de 85,24%. El VPP de la prueba fue 87,72 y el VPN fue 93,18%.

DISCUSIÓN

La sensibilidad alcanzada del 94,34% nos garantiza que la prueba va a poder captar una gran proporción de posibles personas infectadas. La diferencia del 5,66% nos representa el porcentaje de falsos negativos que pueden resultar al realizar el ensayo. Éstos pueden deberse a muchos factores como dilución de las muestras, calidad de los anticuerpos presentes en las muestras de suero y calidad de conservación de las muestras, pues la congelación puede alterar significativamente la reactividad de una muestra.

La especificidad mostrada, que es 85,32%, nos está revelando que existe un 14,68% de probabilidades de obtener resultados falsos positivos. Esto al parecer se produce por reacciones inespecíficas entre el suero del paciente y el antígeno, lo cual nos lleva a pensar en la búsqueda de métodos para purificar el antígeno. Además, debemos imaginar que quizá el problema sea el bloqueo de las membranas, lo cual podría mejorarse con la utilización de otros bloqueadores como la albúmina sérica bovina, cuyo uso no es fácil por su elevado precio.

Tabla N° 1.- Sensibilidad y sensibilidad de la prueba de ELISA para IgM, en seis centros de control de dengue ([12]), y de la EIA-NC para IgM, en el presente trabajo, para el diagnóstico de dengue.

Centro de Estudio	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
ELISA-IgM		
Universidad de Malasia - Malasia	98,10	85,70
Hosp. General de Singapur - Singapur	94,90	100,00
Inst. Louis Malardé - Tahíti	85,70	94,70
Universidad de Nagasaki - Japón	98,30	60,00
Laboratorio CDC - Puerto Rico	80,00	100,00
Lab. AFRIMS - Tailandia	95,70	88,50
EIA-NC IgM		
Centro Médico Naval - Perú	94,34	85,42

El uso de un EIA-NC para la detección de IgM específica contra el virus dengue puede incrementar la eficiencia del diagnóstico de laboratorio de infección con el mencionado agente, por dos razones fundamentales: 1) La presencia de IgM específica contra el virus dengue es indicativa de infección reciente, y 2) la seroconversión de IgM ocurre más rápidamente que la seroconversión de la IgG. Además, las pruebas de ELISA en placa son difíciles de descentralizar, pues se requiere una gran inversión de capital en equipos, como los lavadores y lectores de ELISA.

En la Tabla N° 1 podemos observar los resultados obtenidos en el presente trabajo comparados con un estudio realizado por Lam y col. en seis centros de referencia para el diagnóstico de dengue en diversos países, en el cual se utilizó un ELISA para la determinación de IgM antidengue en membranas de NC ([12]).

CONCLUSIONES

1) El inmunoensayo enzimático desarrollado en este trabajo se presenta como una buena alternativa para el diagnóstico temprano de dengue, siendo una prueba segura y confiable.
2) Las pruebas de campo como la aquí desarrollada pueden ser usadas como ayuda diagnóstica de infección temprana con virus dengue, con el fin de realizar un mejor control de la enfermedad en zonas endémicas, así como tener un mejor control en la erradicación del vector.

AGRADECIMIENTOS

A todo el personal del Laboratorio de Virología del Naval Medical Research Institute Detachment (NAMRID) de Lima, y al Servicio de Medicina Transfusional del Centro Médico Naval, por su incondicional apoyo en el desarrollo de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1) **Nimmannitya S.** Dengue and dengue haemorrhagic fever. En: Cook GC, editor. Manson's Tropical Diseases. 20va ed. WB Saunders Company. Londres, 1996. Capítulo 34.
2) **Ramirez-Ronda CH, García CD.** Dengue in the Western hemisphere. Infect Dis Clin North Am 1994; 8: 107-28.
3) **Rigau-Perez JG, Asociación de Epiemiólogos de Puerto Rico.** Manifestaciones clínicas del dengue hemorrágico en Puerto Rico, 1990-1991. Rev Panam Salud Púb 1997; 1: 435-43.

4) **Jawest E, Melnick J, Adelberg E, Brooks G, Butel J, Ornston LN, editores.** Microbiología Médica. 13va ed. El Manual Moderno. México, 1989.
5) **Beaty BJ, Calisher CH, Shope RE.** Arbovirus. En: Schmidt, NJ, Emmons TP, editores. Diagnostics procedures for viral, rickettsial and chlamydial infectious. 6th ed. American Public Health Association Inc. Washington, 1989. Capítulo 24.
6) **Bundo K, Iragashi A.** Antibody-capture ELISA for detection of immunoglobulin M antibodies in sera from japanese encephalitis and dengue hemorrhagic fever patients. J Virolog Methods 1985; 11: 15-22.
7) **Karabatos N, editor.** International catalogue of Arboviruses. 3th ed. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. Texas, 1985.
8) **Colon-Perez Y, Negron-Pagan J, Maldonado Benitez J, Perez-Bonano A, Pumarejo M, Rigau-Perez JG.** Severe dengue at the University of Puerto Rico Pediatric Hospital, 1994-97: Clinical manifestations and results of treatment. 46th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene 1997; 57: 116.
9) **Bonilla GL, Rigau-Perez JG.** The evaluation of a modified case definition for dengue hemorrhagic fever. 46th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene 1997; 57:116.
10) **Centers for Diseases Control and Prevention.** Dengue epidemic, Peru 1990. MMWR 1991; 40: 145-7.
11) **Cardosa MJ, Tio PH.** Dot enzyme immunoassay: an alternative diagnostic aid for dengue fever and dengue haemorrhagic fever. Bull WHO 1991; 69: 741-5.
12) **Lam SK, Fong MY, Chungue E, Doraisingham S, Igarashi A, Khin MA, Kyaw ZT, Nisalak A, Roche C, Vaughn DW, Vorndam V.** Multicentre evaluation of dengue IgM dot enzyme immunoassay. Clin Diagn Virology 1996; 7: 93-8.