

MANLAB®

Diagnóstico Bioquímico y Genómico

Diagnóstico serológico de Dengue: comparación entre dos métodos de ELISA indirecto

>>> En el 2016 Argentina sufre el peor brote epidémico de dengue de la historia del país. Según las cifras del propio Ministerio de Salud de la Nación se confirmaron más de 40 mil casos, llegando a superar los 70 mil. Indudablemente el diagnóstico de esta infección plantea un gran desafío para los bioquímicos que debemos arribar a un diagnóstico rápido pero sobre todo correcto. En el siguiente trabajo presentado por MANLAB se evalúan dos técnicas de Elisa.

>>> AUTORES

Víctor M. Cárdenas Delgado¹, Guillermo G. Nuñez Taquia¹

¹ Laboratorio Mantel-MANLAB. Sección Virología y Autoinmunidad. Marcelo T. de Alvear 2263 (1122), Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina.

E-mail: victor.cardenas@manlab.com.ar

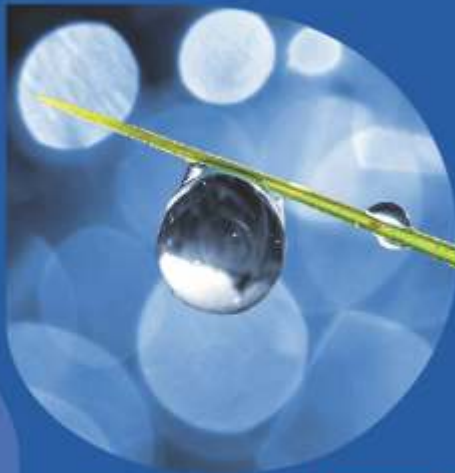
>>> INTRODUCCIÓN

El Dengue es una enfermedad febril de etiología

viral causada por infección del virus del Dengue (VD), un arbovirus miembro de la familia *Flaviridae*. La transmisión de este agente se produce mediante la picadura de mosquitos del género *Aedes*. En Argentina se sabe que el vector biológico predominante es la hembra hematófaga del mosquito *Aedes aegypti*, de hábitos diurnos. Algunos factores favorecen el desarrollo del ciclo biológico del vector, incrementan su densidad y facilitan la expansión geográfica de la enfermedad (Mammen *et al.*, 2008, Reiter, 2001) en ámbitos tanto urbanos como rurales. Estos factores son las lluvias, la humedad, las temperaturas en el rango 4-40 °C, la ovipostura y la formación de criaderos en el domicilio y peridomicilio por estancamiento de agua,



Tecnología escalable que acompaña su crecimiento



- Gestión de laboratorios
- Conectividad con analizadores
- Trazabilidad de muestras
- Redes de laboratorios
- Integración hospitalaria
- Facturación



PUB

PUBLISHER
Publicación automática de resultados vía fax / email / PDF. Envío simultáneo a pacientes / médicos / instituciones.



WEB

Integración a la web. Consulta interactiva de resultados para Pacientes / Médicos / Derivantes / Recepción en línea de derivaciones.

CONNECT

Comunicación con instrumentos. Producto independiente o componente de NextLAB LIS.



MICROBIOLOGÍA

Definición de paneles de antibióticos (CIM, Disco, IDI) / Manejo de múltiples aislamientos para muestra / Informes preliminares.



SISTEMA DE TRACKING DE MUESTRAS

Seguimiento de las muestras dentro del laboratorio. Producto independiente o integrado a NextLAB LIS.

CONECTOR

Integración en tiempo real de NextLAB LIS con Sistemas hospitalarios / Middleware / LIS de otros fabricantes.



LABORATORY INFORMATION SYSTEM®

Flexibilidad y poder de parametrización. Software abierto que puede integrarse con instrumentos de cualquier fabricante. Solución ideal para instituciones públicas y privadas al contemplar facturación e integración con sistemas hospitalarios. NextLAB® LIS se presenta en tres versiones: Lite, Professional y Enterprise.

LITE

PRO

ENT

 **NextLAB®**

SOFTWARE INTELIGENTE

NextLAB by Genetrics S.A.
Av. del Libertador 8630 6to Piso "11"
C1429BNT Núñez Buenos Aires
T. [+5411] 52 63 02 75 Rot
F. [+5411] 52 63 02 75 Ext 100
info@nextlab.com.ar

déficits en la red de suministro de agua y aumento del flujo de viajeros en los meses estivales (Gubler 2011). Además, una vez alimentado con sangre de un individuo virémico, el mosquito es capaz de transmitir el virus durante un tiempo indeterminado (WHO, 2009). Esta constelación de factores justifica el crecimiento de la epidemia en los trópicos y subtropicales. A pesar de los avances en los programas de vigilancia e informe del síndrome febril, se piensa que el verdadero impacto socioeconómico de la enfermedad es aún subestimado (Murray *et al.*, 2013). Por lo expuesto, y ante la imposibilidad de contar con herramientas efectivas de inmunoprofilaxis, el énfasis oficial está puesto en medidas orientadas al control vectorial.

Hasta el momento se conocen cinco serotipos del VD (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 y DENV-5), los cuales están estrechamente relacionados en cuanto a antigenicidad y tienen una homología genética de aproximadamente el 65% (Sasmono *et al.*, 2018, Mustafa *et al.*, 2014). La infección por un determinado serotipo da lugar a un síndrome febril inespecífico que remite espontáneamente y provee protección de larga duración por inmunidad homóloga, en la que el pilar de la respuesta protectora sería la biosíntesis de anticuerpos neutralizantes dirigidos contra ese serotipo específico (Roehrig *et al.*, 2008). La protección contra la infección por otro de los cuatro serotipos no es efectiva dado el escaso nivel de reactividad cruzada de los anticuerpos neutralizantes (Xu *et al.*, 2017). Al no contar entonces con mecanismos protectores de inmunidad heteróloga, ante una eventual reinfección en un área donde co-circulan distintos serotipos, está aumentado el riesgo de padecer formas graves de la enfermedad como la fiebre hemorrágica por dengue.

En esta comunicación breve se estudió la utilidad de dos técnicas de ELISA para evaluar la respuesta humoral anti-DV. La falta de conmutabilidad observada entre las dos técnicas estudiadas sugiere que, en caso de usarlas como herramienta diagnóstica, podría ser necesario considerar el serotipo del VD cuya respuesta humoral evalúan.

>>> MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevó a cabo la detección de anticuerpos anti-

virus del dengue (VD) de clase IgG e IgM por medio de dos pruebas de ELISA indirecto de dos fabricantes distintos (denominados por comodidad *i* y *ii* en el texto) en muestras de suero (n=78 para IgM, n=26 para IgG) (marca *i*: DRG Dengue Virus IgM y DRG Dengue Virus IgG, DRG Diagnostics, GmbH) de manera automatizada. Las muestras se sometieron además a otra técnica de ELISA indirecto manual (marca *ii*: Dengue Virus IgM Capture DxSelect y Dengue Virus IgG DxSelect FOCUS Diagnostics). La interpretación de resultados del método *i* hace uso de una escala semicuantitativa en unidades arbitrarias adimensionales, según la cual las muestras con 0-9 Unidades DRG (UDRG) son negativas, aquellas con valores entre 9 y 11 UDRG son indeterminadas y los valores mayores a 11 UDRG corresponden a muestras positivas. Por otro lado, el método *ii* emplea una escala semicuantitativa en la cual las muestras con resultados de 0 a 1 para el valor del índice (VI) son negativas y aquellas con valores superiores a 1 se consideran positivas. En ambos métodos la escala se construye relacionando el resultado promedio de densidad óptica de cada muestra leída a $\lambda=450$ nm (DO_{450nm}) con la DO del Cutoff (DO_{cutoff}). La ejecución de los ELISA se llevó a cabo siguiendo las instrucciones brindadas por los fabricantes.

Para los dos ensayos de ELISA se evaluaron los siguientes aspectos: A-correlación entre los dos métodos y B-concordancia. El aspecto A implicó la evaluación del coeficiente de correlación lineal de Pearson, mientras que el aspecto B se basó en el análisis de concordancia de Bland-Altman. El procesamiento estadístico de los datos se realizó con el programa GraphPad Prism v4.03 (GraphPad Software, Inc.).

Las muestras analizadas fueron remitidas a MANLAB en base a la sospecha de infección por dengue y con sus correspondientes fichas epidemiológicas en la mayoría de los casos.

La información epidemiológica disponible para la mayoría de las muestras remitidas incluyó fecha estimada de comienzo de los síntomas, fecha de la toma de muestra, edad, sexo, resumen de historia clínica y diagnóstico presuntivo, antecedentes de viaje en los meses previos al comienzo de los síntomas e historia de vacunación.

Los resultados positivos por ambos métodos

fueron notificados a la autoridad sanitaria oportunamente.

>>> RESULTADOS

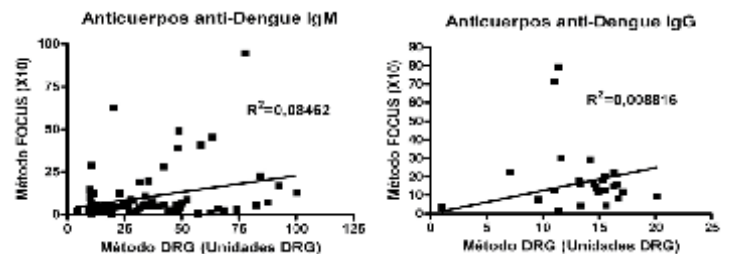
El análisis de correlación aplicado a la determinación de anticuerpos anti-DV de clase IgM (n=78) reveló que existen profundas discordancias entre los resultados obtenidos por el fabricante i o por ii. El valor tan bajo del coeficiente de Pearson ($R^2=0,08462$) no deja lugar a dudas en cuanto a la falta de correlación entre ambos métodos. Para el caso de la determinación de anticuerpos anti-DV de clase IgG, si bien se contó con una casuística más reducida (n=26) se observó el mismo fenómeno que para la detección de IgM, con un valor de coeficiente de correlación de Pearson R^2 de 0,08816 (Figura 1).

Por otro lado, el análisis de concordancia de Bland-Altman (Figura 2) confirma que no puede reemplazarse un método por el otro dado que en el caso de IgM, el valor de sesgo obtenido fue 23,7161 y los límites de confianza del 95 % (LC 95%) fueron -22,9407 y 70,3729. Para la IgG, el sesgo fue -4,98141 y los LC 95% fueron -42,5739 y 32,6111. Considerando un valor de corte de 11,0 (método i) y 1,0 unidades(método ii) para discriminar muestras positivas de negativas tanto en el caso de los anticuerpos IgM como IgG anti-DV, los intervalos resultan muy amplios de manera que compromete su aplicación clínica.

La elevada tasa de muestras discordantes, respaldado por los resultados de la estadística, confirman

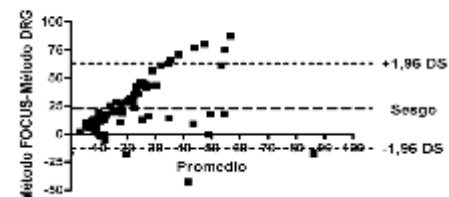
que los dos métodos analizados no son conmutables.

>> Figura 1. Análisis de correlación para la valoración semicuantitativa de anticuerpos anti-DV de clase IgM e IgG por los métodos i y ii. Se multiplicaron x10 los resultados del método ii.

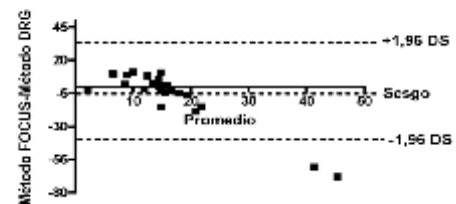


>> Figura 2. Análisis de concordancia por el método de Bland-Altman para la valoración semicuantitativa de anticuerpos anti-DV de clase IgM e IgG por los métodos i y ii.

Anticuerpos anti-Dengue IgM: Diferencia vs. promedio



Anticuerpos anti-dengue IgG: Diferencia vs. promedio



DIAGNOS MED S.R.L. 



www.diasource-diagnostics.com

17 (OH) PROGESTERONA NUEVA!

Adaptable para sistemas abiertos Elisa

Controles incluidos

Opcional: Extracción de muestra para neonatos

CALPROTECTINA ELISA

Opcional: Set de recolectores de muestra

CROMOGRANINA ELISA Y RIA

RSR

Diagnostics for Autoimmunity

www.rsrltd.com

3 Screen Islet Cell (ELISA)

IA2 (ELISA Y RIA)

VGKC Ab (RIA)

VGCC Ab (RIA)

>> Tabla 1. Interpretación de los resultados del análisis de ELISA por los métodos **i** y **ii**. El número de muestras se detalla en cada recuadro.

	IgM		IgG	
	DRG	FOCUS	DRG	FOCUS
Positivas	72	20	23	15
Negativas	6	58	3	11

>>> DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El diagnóstico de la infección por el virus del Dengue (VD) plantea indudablemente un desafío al profesional bioquímico por cuestiones relacionadas a la cinética de replicación viral y la respuesta del hospedador, las cuales restringen la aplicación de métodos directos de estudio como la detección del antígeno NS1 o el RNA viral a la fase aguda temprana de la enfermedad (menos de 5 días de producida la infección). Esto hace que la detección de anticuerpos anti-DV esté muy difundida en los servicios de inmunología, pese a que la falta de especificidad de la técnica permite arribar, estrictamente hablando, a la conclusión de que existe historia de exposición a flavivirus y no al diagnóstico certero de dengue (Chan *et al.*, 2017).

Los serotipos del VD con mayor representación geográfica en Argentina son DENV-1 y DENV-2 (Boletín Integrado de Vigilancia, MSAL). Durante el brote de dengue registrado en las primeras 25 semanas de 2016 se remitieron numerosas muestras de pacientes con síndrome febril y diagnóstico presuntivo de infección por dengue a la Sección Serología de MANLAB. En la mayoría de los casos, el diagnóstico dependía de la confirmación por ELISA, estando disponible la determinación semicuantitativa de anticuerpos anti-DV por el ensayo de ELISA indirecto. Durante ese período, y con el objetivo de brindar la mejor prestación, se emplearon diferentes marcas de reactivos, entre ellas las citadas como **i** y **ii**.

Los hallazgos preliminares revelaron una abrumadora discordancia en los resultados obtenidos al ensayar una misma muestra por ambos métodos en numerosos casos de la serie analizada. Esto condujo a la hipótesis de la falta de armonización en la selección de antígenos que se inmovilizan en los pocillos del equipo diagnóstico, lo que implica una representación desigual de los serotipos del VD que pudieran ser potencialmente detectados. Así, el fabricante **i** declara en el inserto que se

ha inmovilizado un antígeno del serotipo DENV-2, mientras que el fabricante **ii** declara que el recubrimiento de los pocillos consiste en partículas virales inactivadas y purificadas de los serotipos 1-4. Por esta razón, llama la atención la mayor tasa de positividad que se obtiene al procesar muestras con la marca **i**, la cual podría deberse a reacción cruzada con otros miembros de la familia *Flaviridae* debido a la alta similitud estructural del antígeno inmovilizado. Por otro lado, es razonable cuestionar la validez de la marca **i** como medio para contrastar las muestras positivas por **ii**, ya que por lo menos tres serotipos del VD (1, 3 y 4) generarían respuestas humorales específicas que escapan a su detección.

Frecuentemente se cita la alta homología entre los serotipos del VD pero poco se ha discutido en relación la capacidad de discriminar las respuestas humorales anti-DV con base en los ensayos de ELISA. Se asume que la especificidad de los equipos comerciales de diagnóstico serológico basados en ELISA es insuficiente para lograr este cometido (Timiryasova *et al.*, 2013), mientras que la prueba de neutralización por reducción en placa (TNPRP) sería la única herramienta efectiva para el serodiagnóstico diferencial (Roehrig *et al.*, 2008, Maeda & Maeda, 2013), al punto tal que se ha incluido como estándar de oro en los protocolos de la WHO para evaluar la inmunogenicidad de las vacunas anti-VD. Esta comunicación analiza el poder de discriminación entre distintos serotipos ofrecido por las diferentes marcas comerciales de ELISA. Así, cobra especial importancia el asesoramiento de las empresas distribuidoras al momento de elegir un equipo comercial para la detección de la infección por el VD. Es de vital importancia también conocer los serotipos circulantes en la zona de residencia de los pacientes, ya que en ausencia de confirmación por métodos moleculares como RT-PCR, detección de antígeno NS1 o aislamiento viral, los resultados de la serología condicionan la inclusión de los casos sospechosos como confirmados dentro de las estadísticas, pese a las conocidas limitaciones en cuanto a especificidad características de estos inmunoensayos. En este mismo sentido, la notificación de los resultados de serología a la autoridad sanitaria local debería incluir un comentario acerca de la respuesta anti-serotipo evaluada por los equipos diagnósticos empleados para analizar las muestras, ya que esta información es de interés epidemiológico y podría optimizar el aprovechamiento de recursos en caso de emprender la detección sistemática

del genoma viral. ■

MANLAB®

Diagnóstico Bioquímico y Genómico

>>> REFERENCIAS

- Boletín integrado de Vigilancia N2 SE6. Febrero 2016. Ministerio de salud de la Nación.
- Chan HBY, How CH, Mark Ng CW “Definitive tests for dengue fever: when and which should I use? Singapore Med. J. 2017; 58(11): 632–635.
- Gubler DJ “Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century.” Trop. Med. Health. 2011; 39(4 Suppl):3-11.
- Maeda A, Maeda J “Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection.” Vet. J. 2013; 195(1):33-40.
- Mammen MP, Pimgate C, Koenraadt CJ, Rothman AL, Aldstadt J, Nisalak A, Jarman RG, Jones JW, Srikiatkachorn A, Ypil-Butac CA, Getis A, Thammapalo S, Morrison AC, Libraty DH, Green S, Scott TW “Spatial and temporal clustering of dengue virus transmission in Thai villages.” PLoS Med. 2008; 5(11):e205.
- Murray NE, Quam MB, Wilder-Smith A “Epidemiology of dengue: past, present and future prospects.” Clin. Epidemiol. 2013; 20:5: 299-309.
- Mustafa MS, Rasotgi V, Jain S, Gupta V “Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control.” Med. J. Armed Forces India. 2015; 71(1):67-70.
- Reiter P “Climate change and mosquito-borne disease.” Environ. Health Perspect. 2001; 109 1:141-61.
- Roehrig JT, Hombach J, Barrett AD “Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization Testing of Human Antibodies to Dengue Viruses” Viral Immunol. 2008; 21(2):123-32.
- Sasmono RT, Taurel AF, Prayitno A, Sitompul H, Yohan B, Hayati RF, Bouckenoghe A, Hadinegoro SR, Nealon J “Dengue virus serotype distribution based on serological evidence in a?? pediatric urban population in Indonesia.” PLoS Negl. Trop. Dis. 2018; 12(6):e0006616.
- Timiryasova TM, Bonaparte MI, Luo P, Zedar R, Hu BT, Hildreth SW “Optimization and validation of a plaque reduction neutralization test for the detection of neutralizing antibodies to four serotypes of dengue virus used in support of dengue vaccine development” Am. J. Trop. Med. Hyg. 2013; 88(5):962-70.
- WHO. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. Geneva: World Health Organization; 2009. New Edition 2009.
- Xu M, Zuest R, Velumani S, Tukijan F, Toh YX, Appanna R, Tan EY, Cerny D, MacAry P, Wang CI, Fink K “A potent neutralizing antibody with therapeutic potential against all four serotypes of dengue virus.” NPJ Vaccines. 2017; 2:2.

GEMATEC 
equipamiento para medicina



Int. Avalos 3651 | (1605) | Munro
Buenos Aires, Rep. Argentina
Tel./Fax: (54 11) 4512 5666

✉ ventas@gematec.com.ar
🌐 www.gematec.com.ar
📘 @Gematecarg