

Detección de IgM contra el virus del dengue en sangre entera absorbida en papel de filtro

Susana Vázquez,¹ Elisabeth Sáenz,² Gustavo Huelva,³
Alcides González,³ Gustavo Kourí¹ y María Guzmán³

RESUMEN

En este trabajo se presenta la normalización del procedimiento de detección de anticuerpos IgM contra el virus del dengue en muestras de sangre tomadas en papel de filtro. Las muestras se obtuvieron de 118 pacientes, de los cuales 91 tenían un diagnóstico clínico de dengue y 27 un diagnóstico de una infección viral que no guardaba relación con esa enfermedad, siendo los primeros originarios de Costa Rica y Nicaragua y de Cuba los segundos. En todas las muestras se determinó la presencia de anticuerpos IgM contra el virus del dengue mediante un inmunoensayo enzimático (ELISA) de captura. Al analizarse en su conjunto los resultados de los pacientes de los tres países se determinaron una sensibilidad y especificidad de 98,1% y 98,5%, respectivamente, para la prueba efectuada con sangre entera en papel de filtro conservada a 4 °C, y una concordancia de 96% entre los resultados de esa prueba y los del ELISA. Cuando se compararon los resultados obtenidos con las tres muestras de un mismo paciente —las de sangre en papel de filtro conservadas a la temperatura ambiental y a 4 °C, y la del suero correspondiente— también se obtuvo una concordancia de 86%. Este estudio demuestra la elevada sensibilidad y especificidad diagnósticas logradas con el procesamiento de sangre entera absorbida en papel de filtro en las condiciones detalladas en el artículo. Los autores recomiendan utilizar este método en los programas de vigilancia de dengue en la Región.

El dengue y sus formas más graves, el dengue hemorrágico y el síndrome de choque del dengue, constituyen en la actualidad un problema de salud que reaparece en la Región de las Américas (1). En los últimos años se ha observado un notable incremento del número de epidemias y de los países afectados por esa enfermedad (2–4). Por otra parte, las formas graves se

están haciendo endémicas en nuestros países, como ha sucedido en el Asia Sudoriental (5, 6).

Desde 1991, expertos en el tema, bajo la dirección de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), presentaron nuevas pautas para la prevención y el control del dengue en las Américas, donde la vigilancia activa de la enfermedad basada en pruebas de laboratorio ocupa un lugar prioritario (5).

Con el desarrollo de inmunoensayos enzimáticos (ELISA) y su aplicación al diagnóstico serológico de las enfermedades virales, se inició la evaluación del papel de filtro como método sencillo, económico y rápido para el análisis de muestras de sangre entera (7, 8). Entre las principales ventajas del papel

de filtro se encuentran la facilidad para obtener la muestra de sangre (especialmente en niños pequeños y personas en las que resulta difícil la extracción de sangre venosa), así como su fácil transporte y almacenamiento y la posibilidad de recolectar muestras en condiciones de campo. Varios autores han demostrado la utilidad del papel de filtro para el diagnóstico serológico del dengue (9–14), tanto para la detección de inmunoglobulinas totales con las técnicas de inhibición de la hemaglutinación y ELISA como para la determinación de anticuerpos IgM.

Los programas efectivos para la vigilancia y control de las enfermedades infecciosas exigen métodos de diagnóstico sencillos y económicos. En

¹ Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", La Habana, Cuba.

² Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud, San José, Costa Rica.

³ Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia, Managua, Nicaragua. Las solicitudes de separatas han de remitirse a María G. Guzmán a la siguiente dirección postal: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí," Autopista Novia del Mediodía, Km 6, Ciudad Habana, PO Box 601 Marianao 13, Cuba.

el caso particular del dengue y de su forma grave, la utilidad ya demostrada del papel de filtro para el análisis de muestras de sangre y la posterior determinación de los títulos de anticuerpos IgM no ha redundado en su uso generalizado. De ahí que durante el Curso Internacional de Dengue y Dengue Hemorrágico en las Américas que tuvo lugar en 1995 en La Habana, Cuba, los participantes plantearon la necesidad de normalizar el método para su aplicación en nuestro entorno. Con ese fin el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" de Cuba y los laboratorios de virología del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia de Nicaragua y del Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud emprendieron el presente estudio.

El objetivo de este trabajo fue ilustrar la normalización de la técnica de detección de anticuerpos IgM en muestras de sangre tomadas en papel de filtro y determinar su sensibilidad y especificidad. Los resultados obtenidos pueden servir de modelo para que otros laboratorios de la Región normalicen su propia metodología, a fin de evitar los posibles errores técnicos ocasionados por la detección de resultados falsos positivos y negativos.

MATERIALES Y MÉTODOS

En octubre y noviembre de 1995 se extrajeron muestras de sangre de 91 pacientes con diagnóstico clínico de dengue, siguiendo los criterios que figuran en las guías de la OPS para la prevención y el control del dengue en las Américas (5), y de 27 personas que padecían una enfermedad viral no relacionada con el dengue.

En los pacientes con dengue, los síntomas habían aparecido de 1 a 60 días antes de la extracción de las muestras de sangre. De cada caso se obtuvieron muestras de sangre entera capilar en papel de filtro (*Blood Sampling Paper*, NOBUTO, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japón) y de sangre venosa periférica.

De los 91 pacientes de dengue estudiados, 62 procedían de Costa Rica y 29, de Nicaragua. Las muestras de los

primeros se recibieron a través del Sistema de vigilancia del dengue de Costa Rica. Los segundos habían acudido a los servicios de urgencias de los hospitales Manolo Morales y Mascota de Managua. Por otra parte, se incluyó a 27 personas procedentes de Cuba que padecían una infección viral distinta del dengue.

Para obtener las muestras de sangre capilar, y después de rotular los papeles de filtro con un lápiz de grafito (figura 1), se puncionó el dedo índice con una lanceta y la sangre se dejó absorber sobre papel de filtro (figura 1, zona A) hasta dejar ambos lados impregnados. A continuación, la sangre se dejó secar a temperatura ambiental y se colocó el papel de filtro en posición vertical con la zona B (figura 1) situada hacia abajo y evitando exponerlo a temperaturas elevadas.

A los pacientes de Costa Rica se les extrajeron dos muestras de sangre entera capilar en papel de filtro con objeto de comparar dos temperaturas de conservación distintas (4 °C y temperatura ambiental), y a los restantes, solo una, que se conservó a 4 °C.

Las muestras de sangre destinadas a la obtención de suero se extrajeron por punción venosa. Una vez coagulada la sangre, se separó el suero mediante centrifugación y se almacenó a -20 °C. Las muestras de sangre y de suero procesadas habían estado almacenadas entre 3 y 5 meses.

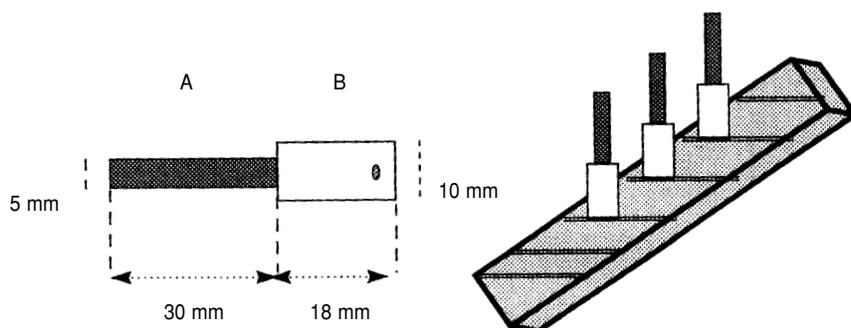
Las muestras de sangre entera capilar absorbidas en papel de filtro se eluyeron durante toda la noche a 4 °C en

400 µL de una solución PBS que contenía albúmina bovina al 0,5%, lo cual corresponde a una dilución del suero de 1/10 según las indicaciones del fabricante.

Posteriormente, en cada muestra se midió la presencia de anticuerpos IgM contra el virus del dengue, utilizando reactivos diagnósticos, contenidos en un estuche, que habían sido desarrollados en el Instituto Pedro Kourí de La Habana (Pelegrino JL, comunicación personal, 1995). El método de diagnóstico empleado consistió en un ELISA de captura de anticuerpos IgM (15). Las muestras de sangre colocadas en papel de filtro y los sueros correspondientes se procesaron a una dilución final de 1/20, utilizando los mismos reactivos diagnósticos.

El estuche diagnóstico empleado contenía dos placas de poliestireno desmontables en 12 tiras de ocho pozos sensibilizadas con inmunoglobulinas anti-IgM humanas (SIGMA). La dilución de las muestras se realizó con el diluyente que contiene dicho estuche y que está constituido por PBS y albúmina humana al 0,5%. En cada pozuelo se colocaron 50 µL de cada muestra. Esta operación se efectuó por duplicado. Las placas se incubaron a temperatura ambiental durante 2 horas y, a continuación, se lavaron cinco veces con la solución PBS del estuche. Seguidamente, se añadieron 50 µL de una mezcla de antígenos que contenía los cuatro serotipos del virus del dengue en 16 unidades hemaglutinantes. La solución resultante se

FIGURA 1. Papel de filtro empleado en el estudio. En él se aprecian las zonas de absorción de sangre (A) y de identificación de las muestras (B). La Habana, 1995



incubó a 4 °C durante 18 horas. La mezcla de antígenos se había diluido previamente con una mezcla de PBS y suero humano carente de anticuerpos contra el virus del dengue. Tras lavar cinco veces esta mezcla con la solución de lavado del estuche, se añadió un conjugado peroxidasa antidengue (9) diluido al 1/2500 (en el mismo diluyente empleado en la mezcla de antígenos) y se mantuvo a 37 °C durante 1 hora. Las placas se lavaron siete veces con la misma solución, se les añadió el sustrato (ortofenilendiamina, OPD), y la reacción se detuvo con ácido sulfúrico diluido al 12,5%. En cada prueba se incluyeron sueros de control positivo y negativo. La lectura se efectuó con un lector de ELISA Titertek\Multiskan a una longitud de onda de 492 nm. El valor de corte para considerar una muestra positiva se calculó como el doble de la densidad óptica (DO) del suero de control negativo. Se consideraron positivos todos aquellos sueros y muestras de sangre absorbidas en papel de filtro cuya DO media fue mayor o igual al valor de corte fijado.

En los análisis estadísticos se estimaron la sensibilidad y especificidad de la prueba del papel de filtro en relación con la que utiliza suero (16), así como la concordancia de ambas mediante el estadístico kappa (*k*) (17). La relación entre los valores de DO de las muestras analizadas con las dos pruebas se estimó por medio del coeficiente de correlación de Spearman (16). Todos los valores se acompañan de sus respectivos intervalos de confianza de 95% (IC95%).

RESULTADOS

De las 118 muestras analizadas, en 52 (44%) se detectaron anticuerpos IgM. De estas últimas, 49 (94,2%) procedían de Costa Rica y tres (5,8%), de Nicaragua. Ninguna de las muestras procedentes de Cuba fue positiva.

De las 62 muestras de Costa Rica, 10 se habían extraído antes de los 5 días que precedieron al comienzo de los síntomas; 50 entre 5 y 30 días antes, y 2, 30 días después. Entre las primeras, solo una (10%) fue positiva,

entre las segundas, 46 (92%) y entre las terceras, ambas fueron positivas. Setenta y nueve por ciento (49 de 62) de las muestras de Costa Rica fueron positivas.

De las 29 muestras procedentes de Nicaragua, 15 se habían extraído antes del quinto día del inicio de los síntomas y las restantes, entre 5 y 30 días después. Las tres muestras positivas se extrajeron después del quinto día de la aparición del primer síntoma. Tres (10%) de las muestras procedentes de Nicaragua fueron positivas.

Los resultados obtenidos al analizar las 118 muestras con ambas pruebas (en la de papel de filtro las muestras se conservaron de 3 a 5 meses a 4 °C) fueron los siguientes: en 51 muestras se detectaron anticuerpos IgM contra el virus del dengue con ambas pruebas. Solo en dos muestras —ambas procedentes de Nicaragua— los resultados de las dos pruebas fueron discordantes: una muestra solo fue positiva en la prueba del suero y la otra, en la del papel de filtro. Las DO de las dos muestras se aproximaron al valor de corte. La sensibilidad de la prueba del papel de filtro fue de 98,1% (IC95%: 94,4 a 100%), su especificidad, de 98,5% (IC95%: 95,6 a 100%), y su concordancia con la del suero, estimada mediante el estadístico *k*, de 96% (IC95%: 78 a 100%). El coeficiente de correlación de Spearman entre los valores de las DO de las muestras analizadas con ambas pruebas fue de 0,96 (IC95%: 0,94 a 0,97).

En el cuadro 1 aparecen los resultados obtenidos al analizar las 62 muestras procedentes de Costa Rica con la prueba del suero y la del papel de filtro. El análisis de la prueba del papel de filtro se realizó por separado para cada temperatura de conservación de las muestras de sangre: a 4 °C y a temperatura ambiental. A 4 °C, la sensibilidad, especificidad y concordancia estimadas de la prueba del papel de filtro fueron 100%. Cuando la comparación se llevó a cabo conservando las muestras a temperatura ambiental, la especificidad estimada de la prueba del papel de filtro también fue 100%, si bien su sensibilidad se redujo a 93,9% (IC95%: 87,2 a 100%) y su concordancia

CUADRO 1. Comparación de los resultados de las pruebas del suero y del papel de filtro para detectar anticuerpos IgM contra el virus del dengue a diferentes temperaturas de conservación de las muestras. La Habana, 1995

		Prueba del papel de filtro			
		4 °C		Temperatura ambiental	
Suero a -20 °C	+	49	0	46	3
	-	0	13	0	13

con la del suero fue de 86% (IC95%: 61 a 100%), dado que los resultados de tres muestras fueron discordantes. Las DO en las muestras de suero se aproximaron al valor de corte. El coeficiente de correlación entre las DO de las muestras de suero y las absorbidas en papel de filtro conservadas a 4 °C fue de 0,87 (IC95%: 0,79 a 0,92), y entre las DO de las primeras y las segundas cuando las muestras se conservaron a temperatura ambiental, de 0,76 (IC95%: 0,65 a 0,84).

DISCUSIÓN

Una de las etapas más importantes en el diagnóstico de laboratorio es la obtención de las muestras. La facilidad, economía y rapidez que ofrece a este respecto la absorción de muestras de sangre en papel de filtro convierten a este procedimiento en un método aplicable en los sistemas de vigilancia seroepidemiológica. Por este motivo, en el presente trabajo se decidió estandarizar la prueba de detección de anticuerpos IgM contra el virus del dengue a las condiciones del estudio.

Antes de iniciar la investigación, se supuso que el número de muestras de sangre positivas procedentes de Costa Rica y Nicaragua sería elevado como consecuencia de la endemidad del dengue en estos países (4, 5). Por ello, se decidió incluir muestras de Cuba bajo el supuesto de que deberían ser negativas, ya que en este país no se habían notificado casos desde 1981.

Estas muestras permitirían detectar resultados positivos falsos con la prueba que utiliza papel de filtro. Los resultados obtenidos confirmaron este supuesto, ya que todas las muestras de sangre de Cuba fueron negativas.

El elevado porcentaje de resultados positivos (79%) observado en las muestras de suero procedentes de Costa Rica contrasta con la baja proporción (10%) registrada en las de Nicaragua. En este último país el dengue es endémico y circulan los cuatro serotipos del virus. Esta baja proporción podría explicarse por tres motivos: el reducido número de muestras estudiadas, la escasa cifra de casos de dengue que se habían notificado antes de realizar el estudio, y el elevado número de muestras obtenidas antes del quinto día del inicio de los síntomas.

Los resultados obtenidos revelan la alta sensibilidad y especificidad de la prueba del papel de filtro (conservando las muestras de sangre de 3 a 5 meses a 4 °C) para detectar anticuerpos IgM contra el virus del dengue, al compararla con la que se realiza en suero, así como la elevada concordancia entre ambas pruebas. Las estimaciones de estos parámetros también fueron elevadas cuando las muestras de sangre utilizadas en la prueba del papel de filtro se conservaron a la temperatura ambiental. Solo se obtuvieron resultados discordantes con tres muestras.

Las DO de los sueros se aproximaron a los valores de corte, lo cual indica que en ellos la concentración de anticuerpos IgM contra el dengue era baja. El prolongado tiempo de conservación de las muestras a la temperatura ambiental y la baja concentración de anticuerpos IgM detectada en ellas probablemente expliquen que fuesen negativas en el ELISA. De hecho, los

resultados obtenidos con las muestras de sangre de los mismos pacientes que se absorbieron en papel de filtro y se conservaron a 4 °C durante el mismo tiempo fueron concordantes con los de sus sueros. Un grupo de investigadores (14) indicó que las inmunoglobulinas IgM se degradan fácilmente a consecuencia de su gran tamaño y porque contienen cadenas J, cuyos coeficientes de extinción son muy bajos. Otra posibilidad es la degradación de las IgM sobre el papel de filtro por acción de diversos microorganismos (14).

En otros estudios se ha demostrado la presencia de IgM contra el virus del dengue al quinto día del inicio de los síntomas en 95% de los pacientes (5). Por ello, en los programas de vigilancia serológica del dengue se recomienda que las muestras de suero se extraigan 5 días después de la aparición de las manifestaciones clínicas de la enfermedad y que se procesen lo antes posible.

Como norma general, se recomienda que el tiempo que transcurra entre el envío y el procesamiento de las muestras no exceda 30 días. Los resultados de este estudio sugieren que, aunque el procesamiento de las muestras absorbidas en papel de filtro se retrase 3 meses, la sensibilidad, especificidad y concordancia de la prueba (en relación con la del suero) son satisfactorias, incluso en las muestras que se conservan a la temperatura ambiental. Estos hallazgos están respaldados por los coeficientes de correlación estimados, pues fueron altos al margen de la temperatura a la cual se conservaron las muestras absorbidas en papel de filtro. No obstante, es preciso recordar que la correlación más alta se observó con las muestras conservadas a 4 °C. Cabe esperar que en las muestras de sangre que se conserven a la temperatura ambiental du-

rante menos tiempo la sensibilidad y la concordancia sean más elevadas.

A excepción de la elución previa de las muestras absorbidas en papel de filtro, las condiciones requeridas para medir la concentración de IgM contra el virus del dengue con el ELISA de captura son iguales a las de la prueba del suero, incluidos el valor de corte fijado y la dilución de las muestras de 1/20.

Sobre la base de los resultados obtenidos se recomienda utilizar el papel de filtro como alternativa útil, sencilla y económica para analizar muestras de sangre en los programas de vigilancia seroepidemiológica del virus del dengue en los países de la Región. Este método no precisa sangre venosa ni suero, al tiempo que facilita su transporte y conservación. Es de destacar, no obstante, que la utilización de papel de filtro no elimina la necesidad de obtener las muestras de suero que se precisan para aislar e identificar los serotipos circulantes y para caracterizar el genoma de las cepas que circulan en la Región, aunque recientemente se ha notificado el empleo de muestras de sangre absorbidas en papel de filtro para detectar ácidos nucleicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (18, 19).

Agradecimiento. Los autores agradecen a Crisanta Rocha del Hospital de la Mascota y a Fernando Ruiz del Hospital Manolo Morales de Nicaragua, así como a Luis Vargas Chaves del INCIENSA de Costa Rica, su ayuda en la recolección de las muestras. También agradecen a José Bravo, del Instituto Pedro Kourí de La Habana, el análisis estadístico de los resultados, y a Francisco Pinheiro, de la OPS, su colaboración científica en este estudio.

REFERENCIAS

1. Monath T. Yellow fever and dengue: the interactions of virus, vector and host in the reemergence of epidemic disease. *Seminars Virol* 1994;5:34-145.
2. Organización Panamericana de la Salud. Dengue en las Américas: una actualización. *Bol Epidemiol* 1993;14:1-3.
3. Centers for Disease Control and Prevention. Dengue type 3 infection: Nicaragua and Panama, October-November 1994. *MMWR* 1995;44:21-24.
4. Guzmán MG, Vázquez S, Martínez E, Álvarez M, Rodríguez R, Kourí G, et al. Dengue en Nicaragua, 1994: reintroducción del serotipo 3 en las Américas. *Bol Oficina Sanit Panam* 1996;121:102-110.
5. Organización Panamericana de la Salud. *Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control*. Washington, DC: OPS; 1995. (Publicación Científica 548).

6. Gubler DJ, Clark GG. Dengue\Dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerging Infect Dis* 1995;1: 55-57.
7. Farzadegan H, Quinn T, Polk BF. Detecting antibodies to human immunodeficiency virus in dried blood on paper filter. *J Infect Dis* 1987;155:1073-1074.
8. Wassilak SGF, Bernier RH, Hermann KL, Oresteina WA, Bart KJ, Amler R. Measles seroconfirmation using dried blood specimens in paper filter. *Pediatr Infect Dis* 1984;3:117-121.
9. Vázquez S, Fernández R, Llorente C. Utilidad de la sangre almacenada en papel de filtro para estudios serológicos por ELISA de inhibición. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1991;33: 309-311.
10. Guzmán MG, Kourí G, Bravo J. Normalización de la toma de muestra de sangre en papel de filtro para la serología del dengue. *Rev Cubana Med Trop* 1982;34:114-118.
11. Kuno G, Gómez I, Gubler DJ. Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg* 1987;36:153-159.
12. Burke DS, Chatyanonda K, Anandrik S, Nakornsri S, Nisalak A, Hoke CH. Improved surveillance of Japanese encephalitis blood specimens. *Bull WHO* 1985;63:1037-1042.
13. Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, Kusalerdchariya S, Chongwasdi 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;40: 418-427.
14. Ruangturakit S, Rojanasuphot S, Srijuggravanvong A, Duangchanda S, Nuangplee S, Igarashi A. Storage stability of dengue IgM and IgG antibodies in whole blood and serum dried on filter paper strips detected by ELISA. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1994;25:560-564.
15. Kuno G, Gómez I, Gubler DJ. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. *J Virol Methods* 1991;33:101-113.
16. Freund JE. *Estadística elemental moderna*. La Habana: Pueblo y Educación; 1983.
17. Fleiss JL. *Statistical methods for rates and proportions*. 2a ed. New York: John Wiley and Sons; 1982.
18. Kunisada T, Ando S, Eshita Y, Roeder W, Kruse M, Mueller WEG, et al. Detection of human immunodeficiency virus-1 nucleic acid on inactivated filter paper disk by polymerase chain reaction and microtiter plate assay. *Microbiol Immunol* 1994;38:649-654.
19. Shibata M, Takano H, Hironaka K, Hirai K. Detection of human cytomegalovirus DNA in dried newborn blood filter paper. *J Virol Methods* 1994;46:279-285.

Manuscrito recibido el 24 de julio de 1996 y aceptado para publicación en versión revisada el 15 de mayo de 1997.

ABSTRACT

Detection of IgM antibodies to dengue virus in whole blood absorbed on filter paper

This paper presents a standardized procedure for the detection of IgM antibodies to dengue virus in blood samples taken from filter paper. The samples were obtained from 118 patients, of whom 91 had been clinically diagnosed with dengue and 27 with a viral infection unrelated to that disease. The first group of patients came from Costa Rica and Nicaragua and the second group from Cuba. All the samples were tested for IgM antibody against dengue virus by means of a capture enzyme immunoassay (EIA). Analysis of the results for patients from all three countries together yielded a sensitivity of 98.1% and a specificity of 98.5% for the test done on whole blood on filter paper stored at 4 °C; agreement between the results of that test and those of the EIA using serum samples was 96%. In a comparison of the results obtained with three samples from the same patient—whole blood on filter paper stored at room temperature, the same type of sample stored at 4 °C, and serum—the agreement was 86%. This study demonstrates the high diagnostic sensitivity and specificity achieved when whole blood absorbed on filter paper is processed in the manner described in detail in the article. The authors recommend the use of this method in the dengue surveillance programs in the Region.