

# DETERMINACION DE ANTICUERPOS IgM CONTRA EL VIRUS DENGUE A PARTIR DE SANGRE ABSORBIDA EN PAPEL FILTRO: UN MÉTODO ALTERNATIVO Y SENCILLO.

María García M<sup>1</sup>, César Cabezas S<sup>2</sup>, Leonor Martos D<sup>3</sup>, Antero Gonzáles P<sup>3</sup>, Rosa Acosta C<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> División de Virología, Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud.

<sup>2</sup> Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud.

<sup>3</sup> Centro de Salud de Bagua Grande, Cajamarca, Perú.

## RESUMEN

**Objetivo:** Se propone como alternativa la obtención de muestras de sangre total en papel filtro, para la determinación de anticuerpos IgM contra dengue, por ser un método de recolección sencillo y no requerir de muchos cuidados en el envío al laboratorio. **Materiales y métodos:** De 100 pacientes con diagnóstico clínico de dengue clásico, se obtuvieron en forma simultánea, muestras de suero en tubos al vacío y de sangre total en papel filtro. Ambas muestras fueron evaluadas con el método serológico ELISA Captura de IgM a los 30 días de obtenida la muestra. **Resultados:** De las 100 muestras 25 fueron positivas y 75 negativas en suero, y 24 positivas y 74 negativas en papel filtro. Se obtuvo una concordancia por índice Kappa de 0,97, sensibilidad y especificidad de 96,0% y 98,0% respectivamente; el valor predictivo positivo fue 96,0%, y valor predictivo negativo fue 98,0%. **Conclusión:** Se evidencia muy buena sensibilidad, especificidad y concordancia en la determinación de IgM contra dengue, al utilizar papel filtro en la obtención de muestra de sangre.

**Palabra clave:** Dengue/diagnóstico; Filtros de papel; Test de ELISA (fuente: BIREME).

## ABSTRACT

**Objective:** This study proposes the use of filter paper, in whole blood samples to test for Dengue, as an alternate method, due to the fact that it is very simple and does not require of much detail for shipping samples to the laboratory. **Materials and Methods:** Using vacutainers and filter papers, whole blood sample obtained simultaneously from 100 patients diagnosed as classic dengue. All samples were tested using IgM capture ELISA. **Findings:** Out of 100 samples, 25 were positive and 75 were negative in sera, in filter paper 24 positive and 74 negative, with a Kappa concordance index of 0,97 and a sensitivity and specificity of 96,0% and 98,0% respectively: the positive predictive value was 96.0% and the negative predictive value was 98,0%. **Conclusions:** A very good sensitivity, specificity and concordance in the determination of IgM antibodies against Dengue is evidenced using filter paper when obtaining blood samples.

**Key words:** Dengue/diagnosis; Paper filters; Enzyme-linked immunosorbent assay (source: BIREME).

## INTRODUCCIÓN

Los virus dengue pertenecen a la familia Flaviviridae y al género Flavivirus, son virus ARN cuyo tamaño oscila entre 40 y 70 nm, se ensamblan y liberan en el citoplasma principalmente en asociación con la membranas citoplasmáticas. Todos los Flavivirus comparten un determinante antigénico género específico que parece estar asociado con la nucleocápside<sup>1</sup>.

La infección por virus dengue causa una enfermedad cuyo espectro incluye dos formas, el dengue clásico que cursa con fiebre, cefalea, malestar general, dolor retro-orbitario, dolores en músculos y articulaciones, así como erupción en algunos casos; y la Fiebre Hemorrágica por Dengue/Síndrome de Shock por Dengue (FDH/SSD), que es la forma grave de la enfermedad, y se presenta con mayor frecuencia en los menores de 15 años<sup>2</sup>.

Esta enfermedad se ha venido notificando en las Américas desde hace más de 200 años. La primera epidemia de dengue clásico de las Américas documentada por laboratorio estuvo relacionada con el serotipo 3 y afectó

**Correspondencia:** María García Mendoza. Instituto Nacional de Salud. Calle Cápac Yupanqui 1400, Lima 11, Perú. Apartado Postal 471. Telf.: (0511) 4719920 – Fax: (0511) 4710179. Email: pgarcia@ins.sld.pe

al Caribe y a Venezuela en 1963-1964, aunque con anterioridad, se había aislado el virus de dengue 2 en estas regiones, en una situación no epidémica<sup>3</sup>. En 1968-1969, otra epidemia afectó a varias islas del Caribe donde se aislaron los serotipos 2 y 3, y, en la década de 1970, Colombia se vió afectada por extensos brotes asociados a los mismos serotipos<sup>4</sup>. En 1977, se introdujo en las Américas el serotipo 1, que después de su detección inicial en Jamaica se propagó a la mayoría de las islas del Caribe causando brotes explosivos<sup>4,5</sup>. En 1990, se produjo la primera epidemia de dengue clásico en el Perú, habiéndose registrado un total de 9,623 casos, en los departamentos de Loreto, San Martín, y Ucayali; aislándose el serotipo 1 hasta 1995, desde entonces se han presentado casos de dengue con este serotipo también en otros departamentos como Tumbes, Piura, Huánuco, Junín, y Cajamarca. En 1995, se aisló el serotipo 2 en Piura, y a inicios de 1996, en Bagua Grande (Amazonas)<sup>6,7</sup>. Bajo este panorama es inminente la introducción del dengue hemorrágico, y es pertinente la evaluación serológica de la población susceptible, así como el contar con métodos accesibles para la vigilancia epidemiológica del dengue.

Desde la introducción de la técnica de ELISA se ha evaluado la opción de utilizar el papel filtro, como un método fácil y de bajo costo para obtener y transportar muestras de sangre entera y a partir de ello detectar anticuerpos para el diagnóstico serológico en enfermedades virales<sup>8,9</sup>. En el Perú, ya se evaluó con éxito su uso para detectar anticuerpos<sup>10</sup>, siendo esto útil para estudios de seroprevalencia en poblaciones afectadas por dengue.

Debido a la importancia de realizar la vigilancia de infecciones agudas e identificar la presencia de brotes de dengue mediante la detección de IgM, se planteó el presente estudio, con el objetivo de evaluar la utilidad del papel filtro en nuestro medio, para la obtención de sangre total y la posterior detección de anticuerpos IgM contra el virus dengue, comparándola con la detección de anticuerpos en suero obtenido clásicamente utilizando tubos al vacío.

## MATERIALES Y METODOS

### POBLACIÓN DE ESTUDIO

Las muestras utilizadas en el presente estudio correspondieron a un brote de dengue ocurrido entre noviembre de 1995 y marzo del 1996, en Bagua Grande, localidad ubicada en la selva alta del departamento de Amazonas, habiéndose registrado 399 casos clínicamente diagnosticados.

En base a los registros epidemiológicos, se realizaron visitas domiciliarias y se seleccionaron inicialmente 112 pacientes que, de acuerdo a los criterios de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), tenían diagnóstico clínico de dengue clásico en los últimos 3 meses (enero - marzo 1996) y el antecedente epidemiológico de resi-

dir en una área con presencia de *Aedes aegypti*. Se obtuvo el consentimiento de los pacientes, habiéndose obtenido muestras de sangre en 100 de los 112 pacientes inicialmente elegidos. La información clínica y epidemiológica se obtuvo a través de una ficha elaborada para tal fin.

### PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

Identificados los casos y, previa autorización del paciente, se procedió a obtener 2 muestras en cada uno de ellos: una de sangre (suero) utilizando tubo de extracción al vacío y otra de sangre total en papel filtro.

#### Obtención de sangre en papel filtro

Se utilizó papel filtro WHATMAN N°3 en el cual se marcaron círculos de 16 mm de diámetro que absorben 50uL de sangre total aproximadamente, volumen que fue encontrado mediante ensayos previos<sup>9</sup> (Figura 1).

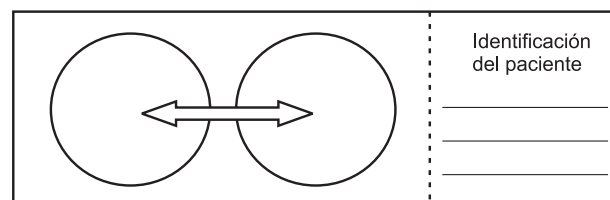


Figura 1. Papel Whatman N°3 con los círculos de 16 mm, delimitados para depositar la muestra de sangre y la identificación con el código del paciente.

La obtención de la muestra se realizó mediante la punción con una lanceta en el pulpejo lateral del dedo medio, dejando fluir la sangre espontáneamente dentro del círculo marcado en el papel filtro, tratando que la muestra cubra el diámetro indicado (volumen aproximado 50uL)(Figura 2); se dejó secar al medio ambiente en un lugar protegido de la luz solar directa, luego se colocaron en bolsas de plástico y fueron transportadas al laboratorio a temperatura ambiente, junto con la ficha clínico-epidemiológica respectiva. En el laboratorio se conservaron también a temperatura ambiente y se procesaron al mes de obtenidas<sup>8</sup>.

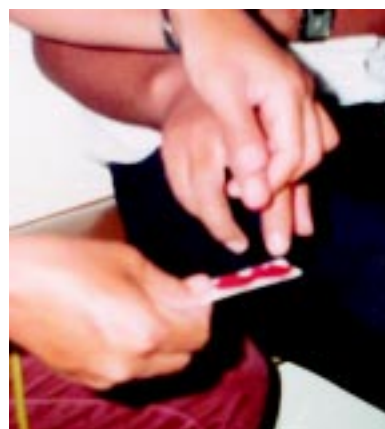


Figura 2. Procedimiento de obtención de sangre utilizando papel filtro Whatman N°3.

**Obtención de muestra de sangre en tubo de extracción al vacío para separar suero (Vacutainer)**

Se extrajo por punción venosa 10 ml de sangre total, utilizando tubos al vacío en los 100 pacientes a los que también se les tomó muestra en papel filtro. Se centrifugó a 2500 rpm y se procedió a separar el suero y mantenerlos a -10°C hasta su envío al Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Salud, donde se conservaron a -20°C hasta su procesamiento<sup>17</sup>.

*Prueba de ELISA de captura de IgM (MAC-ELISA) Modificado*

Las muestras de sangre total en papel filtro y las de suero fueron procesadas para la determinación de anticuerpos IgM contra dengue, utilizando la técnica ELISA Captura de IgM, a los 30 días después de su extracción.

**Elución de la muestra**

Se recortaron los círculos de papel filtro absorbidos con sangre total y se colocaron en viales que contenían 2ml de buffer fosfato salino (PBS) con leche descremada (LD) al 2,5% pH 7,2 a 4°C durante toda la noche, obteniendo una dilución de 1:40 como lo requiere el método utilizado.

**Procedimiento**

Los pozos fueron sensibilizados con 100 uL de anti-IgM humano a una dilución de 1:800, y obtenida mediante titulación, en buffer carbonato bicarbonato pH 9,5. Se incubó la placa a 4°C de 14 a 20 horas, se lavó 5 veces con PBS + tween 20 al 0,05%, se agregó 100 uL de buffer carbonato-bicarbonato + leche descremada al 2,5%, se incubó a 37°C por 30 minutos, se lavó 5 veces. Los sueros fueron diluidos a 1:40 a con PBS + LD al 2,5%. Luego, se agregó 100 uL del suero problema o las muestras eluidas y los controles positivo y negativos en los pozos respectivos, se incubó a 37°C por 2 horas, y se lavó 5 veces.

El antígeno (virus dengue 1 cepa Hawaii) utilizado en la prueba fue producido en cerebro de ratón lactante, tratado con sucrosa y acetona e inactivado con β-propiolactona<sup>17</sup>.

La dilución fue 1:400 en PBS + LD al 2,5% + Suero Humano Normal al 1,0%. La prueba utilizó también un antígeno control normal (cerebro ratón no infectado con el mismo tratamiento).

Se agregó 100 uL de antígeno (dengue 1) y Antígeno control normal en los pozos correspondientes a la misma dilución del antígeno viral, se incubó a 4°C por 12 horas, y se lavó la placa 5 veces. El conjugado empleado fue una inmunoglobulina IgG anti-flavivirus marcada con peroxidasa (6B6C-1). Se utilizó una dilución de 1:6000 en PBS + LD al 2,5%, se agregó 50 uL de conjugado a todos los pozos excepto los controles de sustrato, se incubó a 37°C por 1 hora, y se lavó la placa 7 veces. Luego se agregó el sustrato (OPD en buffer fosfato-citrato pH 5,0 + H2O2), se dejó a temperatura ambiente por 15 minutos, protegido de la luz, y finalmente, se mezcló la reacción con ácido sulfúrico al 2N.

El VALOR DE CORTE se obtuvo mediante : *Promedio de los negativos+3DS*, considerando en la prueba el valor de 0,2 como rango para la evaluación de los resultados para evitar falsos positivos por reacciones cruzadas por otros virus.

- Densidades ópticas < 0,2 : NEGATIVO.
- Densidades ópticas > 0,2 : POSITIVO.

**RESULTADOS**

Se analizaron 100 muestras de suero de igual número de pacientes, obtenidos de tubos al vacío encontrando que 25 (25,0%) de ellas presentaban anticuerpos IgM y 75 (75,0%) no presentaban anticuerpos IgM, variando ligeramente con los resultados de las muestras obtenidas a partir de papel filtro, donde hubo coincidencia en 24 de los positivos y en 74 de los negativos. Una muestra positiva en el suero no fue detectada en papel filtro (falso negativo), y una muestra negativa en el suero fue positiva en el papel filtro (falso positivo). Los resultados

**Tabla 1.** Resultado comparativo de IgM Anti-Dengue, en suero y papel filtro, utilizando la prueba de ELISA Captura IgM (MAC-ELISA)

		SUERO		
		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
P A P E L	POSITIVO	24	01	25
	NEGATIVO	01	74	75
	TOTAL	25	75	100

Concordancia (Indice Kappa) = 0,97 MB  
 Sensibilidad : 96,0 %  
 Especificidad: 98,0 %  
 Valor predictivo Positivo = 96,0 %  
 Valor predictivo Negativo = 98,0 %

serológicos a partir de muestras de suero y obtenidas en papel filtro, fueron sometidos a análisis estadístico<sup>18</sup>, presentando una sensibilidad para ELISA Captura IgM de 96,0%, especificidad de 98,0%, valor predictivo positivo de 96,0% y valor predictivo negativo de 98,0%. Así mismo al aplicar la prueba de concordancia del Índice Kappa, se obtuvo un resultado de 0,97 para ELISA Captura IgM.

Los resultados de la prueba de ELISA IgM de Captura (MAC-ELISA), comparando las muestras de suero y las muestras obtenidas en papel filtro se observan en la Tabla 1.

## DISCUSION

Conociendo la necesidad de contar con métodos de obtención de muestras que permitan superar inconvenientes como el transporte, la rapidez y el costo que representa, además de su aplicabilidad en los sistemas de vigilancia, se planteó este trabajo en el cual se estandarizó la obtención de sangre total en papel filtro. Algunos autores recomiendan esta forma de recolección como un buen método para almacenar muestras de sangre en condiciones de campo, particularmente en áreas rurales, donde usualmente no se cuenta con sistemas de refrigeración<sup>10,11</sup>.

Los resultados obtenidos en este estudio, muestran un alto porcentaje de sensibilidad, especificidad, y concordancia en las muestras de sangre total obtenida en papel filtro, cuando lo comparamos con las muestras de suero para la detección de anticuerpos IgM contra dengue.

Estos resultados son comparables a los estudios realizados por Guzmán<sup>8</sup> y Vásquez<sup>20</sup>, quienes emplearon papel filtro para la recolección de sangre y detectaron anticuerpos totales por los métodos de Inhibición de la Hemaglutinación<sup>8</sup> y ELISA de Inhibición<sup>19</sup>, y anticuerpos IgM por ELISA IgM de Captura<sup>20,21</sup>.

La sensibilidad obtenida en este estudio fué 96,0% para ELISA de Captura IgM, siendo inferior a la obtenida por Vásquez, que fue 98,1%<sup>20</sup>, y similar a los resultados reportados por la OPS cuando las muestras en papel filtro fueron almacenadas a temperatura ambiente y procesadas a 15 días, 30 días y a los tres meses<sup>9</sup>.

La sensibilidad reportada en estudios donde se detectan anticuerpos totales fué 99,0% a 96,0%, cuando las muestras fueron procesadas a los 15, 90 y 180 días después de la obtención, y de 96,0% cuando las muestras fueron procesadas al mes de su obtención, similar al resultado obtenido a los 180 días cuando las muestras son conservadas a 4°C, lo cual nos hace pensar en la degradación de los anticuerpos IgM<sup>19,21</sup>. En nuestro estudio, la disminución de la sensibilidad de la prueba podría ser atribuida a la calidad de almacenaje de las muestras ya que se obtiene una mayor sensibilidad cuando las muestras son almacenadas a 4°C<sup>10</sup>, mientras que en nuestro caso las muestras fueron almacenadas a tem-

peratura ambiente en bolsas de plástico por espacio de 30 días. Los autores hacen énfasis en el tiempo en que deben ser procesadas las muestras obtenidas en papel filtro que debe ser no mayor de 30 días inclusive a temperatura ambiente<sup>20</sup>, aunque en condiciones de campo, no es siempre factible contar con una cadena de frío.

Cuando se estudiaron otras etiologías como Tripanozomas, VIH, Sarampión, Encefalitis Japonesa<sup>10,11,12,13,14</sup>, Burke<sup>13</sup> encontró que al conservar sueros absorbidos en papel filtro y en bolsas de polietileno con gel de sílica a temperaturas menores o iguales de 25°C durante un año, los niveles de anticuerpos disminuyen sólo en un título. Estas condiciones podrían también explicar la sensibilidad obtenida en nuestro estudio, con respecto a los reportados en otros trabajos<sup>9,20,21</sup>.

De acuerdo a los resultados obtenidos, consideramos que pueden utilizarse muestras de sangre obtenidas en papel filtro para la detección de anticuerpos IgM contra dengue por ELISA de Captura IgM, teniendo en la obtención de muestra de sangre total en condiciones de campo como ventajas la facilidad de su realización y transporte, además del bajo costo. Asimismo, este mismo método puede ser utilizado para detección de IgG anti Dengue para encuestas sero-epidemiológicas que delimiten zonas de riesgo, así como para facilitar la vigilancia epidemiológica del Dengue con soporte laboratorial con un margen de error no muy significativo.

Sobre esta base se recomienda también validar el uso de papel filtro como una alternativa para obtener muestras de sangre total para las evaluaciones en otras patologías infecciosas de origen viral, como fiebre amarilla, sarampión, rubeola, hepatitis viral, etc.

## REFERENCIAS

1. **Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, et al.** Antigenic relationships among flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol* 1989; 70(Pt.1): 37-43.
2. **Martínez E, Guzmán MG, Valdéz M, Soler M, Kouri G.** Fiebre del dengue y dengue hemorrágico en infantes con infección primaria. *Rev Cubana Med Trop* 1993; 45: 97-101.
3. **Organización Panamericana de la Salud.** Dengue y dengue Hemorrágico en las Américas. Guía para su prevención y control. Washington, DC:OPS; 1995. Publicación Científica N° 548. 1995.
4. **Pinheiro FP.** El dengue en las Américas 1980-1987. *Boletín Epidemiológico.* Organización Panamericana de la Salud, 1989; 10: 1-2.
5. **Gubler DJ.** Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas. In: *Epidemiology of dengue and dengue haemorrhagic Fever.* Monograph on dengue/dengue haemorrhagic fever. World Health Organization 1993; 22: 9-11.

6. **Instituto Nacional de Salud, Lima-Perú.** Boletín informativo 1996, Año 2, N° 1: 10.
7. **Instituto Nacional de Salud, Lima-Perú.** Boletín informativo 1996, Año 2, N° 2: 25.
8. **Guzmán M, Kouri G, Bravo J.** Normalización de la toma de muestra de sangre en papel de filtro para la serología del dengue. *Rev Cub Trop* 1982; 34: 114-8.
9. **Top FH, Gunakasem P, Chantrasri C, Supavadee J.** Serologic diagnosis of dengue haemorrhagic fever using filter paper disc and one dengue antigen. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 1975; 6: 1824.
10. **García M, Cabezas C.** Detección de anticuerpos IgG de Dengue utilizando papel filtro. *Rev Med Exp* 1996; 2: 35-8.
11. **Marinkelle, Cornelis J, De Sánchez N, Grogl M, Gurl F.** Recomendaciones para el almacenamiento de sueros absorbidos en papel filtro bajo condiciones rurales, para el diagnóstico de infección chagásica con la prueba de inmunofluorescencia. *Rev Instit Med Trop Sao Paulo* 1978; 20: 112-4.
12. **Farzadegan H, Quinn T, Polk BF.** Detecting antibodies to human immunodeficiency virus in dried blood on paper filter. *J Infect Dis* 1987; 155(5): 1073-4.
13. **Wassilak SG, Bernier RH, Herrmann KL, Orestein WA, Bart KJ, Amler R.** Measles seroconfirmation using dried blood specimens in paper filter. *Pediatr Infect Dis* 1984; 3(2): 117-21.
14. **Burke DS, Chatyanonda K, Anandrik S, Nakornsri S, Nisalak A, Hoke CH Jr.** Improved surveillance of Japanese encephalitis blood specimens. *Bull WHO* 1995; 63(6): 1037-42.
15. **Kunisada T, Ando S, Saito K, Eshita Y, Roder W, Kruse M, 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(8): 649-54.
16. **Shibata M, Takano H, Hironaka K, Hirai K.** Detection of human cytomegalovirus DNA in dried newborn blood filter paper. *J Virol Methods* 1994; 46(2): 249-85.
17. **Instituto Nacional de Salud.** Manual de obtención de muestras. Primera edición. Lima, Perú. 1996.
18. **Instituto Nacional de Salud.** Manual de procedimientos para el diagnóstico de arbovirus. Primera edición. Lima-Perú. 1996.
19. **Cura E, Wendel S.** Manual de procedimientos de control de calidad para los laboratorios de serología de los bancos de sangre. Organización Panamericana de la Salud. 1994.
20. **Vásquez S, Fernández R, Lorente C.** Utilidad de sangre almacenada en papel filtro para estudios serológico por ELISA de inhibición. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1991; 33: 309-11.
21. **Vásquez S, Sáenz E, Huelva G, González A, Kouri G, Guzmán M.** Detección de IgM contra el virus del dengue en sangre entera absorbida en papel de filtro. *Rev Panam Salud Pública* 1998; 3: 174-8.
22. **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: 560-4.