

Evaluación del sistema diagnóstico SD Dengue Duo para la detección de la proteína NS1 y los anticuerpos IgM e IgG anti-dengue

MSc. José Johanatan Valdez Sandoval,¹ MSc. Didye Ruiz Amores,^{II} Dra. C. Susana Vázquez Ramudo,^{II} Téc. Naifí Calzada Gutiérrez,^{II} Dra. C. María G. Guzmán Tirado^{II}

RESUMEN

Introducción: el sistema comercial SD Dengue Duo (*Standard Diagnostics*) es una prueba rápida inmunocromatográfica que detecta la proteína NS1 del virus dengue y los anticuerpos anti-dengue IgM e IgG de forma simultánea. **Objetivo:** evaluar las características funcionales y operacionales del sistema comercial para la detección de los diferentes marcadores virológicos y serológicos. **Métodos:** se utilizó un panel constituido por 161 muestras de suero, 113 procedentes de pacientes con un diagnóstico clínico y serológico confirmado a cualquiera de los 4 serotipos del virus dengue y 48 negativas. Todas las muestras fueron procesadas por el sistema SD Dengue Duo y por las técnicas Platelia Dengue NS1 Ag, ELISA de captura IgM y el ELISA de inhibición utilizadas como referencia. **Resultados:** el sistema evaluado mostró una sensibilidad de 57,75 % para la proteína NS1, se observaron falsos negativos en muestras colectadas a partir del quinto día de iniciados los síntomas en casos con infección secundaria. La detección de anticuerpos IgM mostró una sensibilidad de 96,0 % y especificidad de 98,4 %. Se encontró una alta concordancia (95,7 %) al clasificar el tipo de infección. En el estudio global de los 3 marcadores la sensibilidad del sistema se incrementó hasta 100 %. **Conclusiones:** el SD Dengue Duo es un método simple, rápido, fácil de ejecutar, el cual no requiere de equipamiento adicional; tiene la ventaja de poder ser utilizado para muestras, tanto de fase aguda como en la fase convaleciente y pudiera ser una alternativa para el diagnóstico del dengue en aquellos laboratorios que no cuenten con facilidades para ello.

Palabras clave: dengue, proteína NS1, IgM, IgG, prueba rápida.

INTRODUCCIÓN

El dengue es una enfermedad febril aguda de origen viral causada por cualquiera de los 4 serotipos del complejo dengue los cuales se denominan, dengue 1 (Den-1), dengue 2 (Den-2), dengue 3 (Den-3) y dengue-4 (Den-4). Estos se transmiten al hombre a través de la picada de mosquitos del género *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, dando lugar a la infección.¹ Se estima que entre 50 y 100 millones de casos de dengue ocurren cada año, de las cuales 250 000-500 000 casos desarrollan el cuadro severo de la enfermedad y alrededor de 25 000 fallecen.²

Para el diagnóstico virológico del dengue se utiliza el aislamiento e identificación viral y la detección del genoma por la técnica de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (TR-RCP) o TR-RCP en tiempo real.³ Estos métodos brindan un diagnóstico más confiable de la infección, sin embargo, los métodos serológicos basados en la detección de los anticuerpos IgM e IgG a pesar de que son métodos menos confiables, donde la reactividad cruzada de los anticuerpos puede provocar dudas dentro del mismo género flavivirus,⁴ son más accesibles y por tanto más ampliamente utilizados en muchos laboratorios que no tienen las condiciones para desarrollar los métodos virológicos. El disponer de métodos rápidos,

¹ Laboratorio Estatal de Salud Pública. Secretaría de Salud. Culiacán Sinaloa, México.

^{II} Centro Colaborador de la OMS/OPS para el Estudio del Dengue y su Vector. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí".

seguros y confiables es de gran importancia para lograr una vigilancia adecuada que permita el control del vector y el cese de la transmisión viral.^{5,6}

Desde hace algunos años se le ha dado gran importancia a la proteína NS1, la cual es secretada al medio extracelular en la etapa virémica de la infección, basada en su posible utilidad como marcador de infección temprana;^{7,8} la detección de la proteína NS1 en suero resulta una ruta más rápida para el diagnóstico temprano de dengue.

En los últimos años se han desarrollado y evaluado sistemas comerciales con formato ELISA para el diagnóstico del dengue⁹⁻¹¹ y pruebas rápidas para la detección de la proteína NS1 al virus dengue.^{12,13} Uno de estos sistemas comerciales es el SD Dengue Duo de la firma *Standard Diagnostics*, el cual además de la detección de la proteína NS1 permite la detección de los anticuerpos IgM e IgG a dengue. Su diseño ofrece grandes ventajas, porque puede utilizarse en muestras colectadas en diferentes etapas clínicas, desde la fase aguda hasta la fase convaleciente. En este trabajo se realizó la evaluación de las características funcionales y operacionales del sistema comercial SD Dengue Duo para el diagnóstico de la infección por virus dengue, utilizando como técnicas de referencia al Platelia Dengue NS1 Ag (BioRad), ELISA de captura de IgM¹⁴ y el ELISA de inhibición.¹⁵

MÉTODOS

MUESTRAS

Se confeccionó un panel de 161 muestras de suero. Un total de 113 procedían de pacientes con un diagnóstico clínico y serológico confirmado a diferentes serotipos de virus dengue (33 de Den-1, 8 de Den-2, 49 de Den-3 y 23 de Den-4). De ellas 17 fueron colectadas entre los días 1 y 4 del comienzo de los síntomas, y 96 a los 5 d o más de la enfermedad. El otro grupo constituido por 48 muestras de sueros negativas a infección por virus dengue, estuvo integrado por: 10 de casos confirmados de hepatitis A (Laboratorio de Hepatitis de Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" [IPK]), 10 de influenza (Laboratorio de Influenza IPK), 19 de casos febriles con otras infecciones no relacionadas con dengue y 9 donantes sanos de banco de sangre.

Todas las muestras fueron procesadas tanto por las técnicas de referencia (Platelia Dengue NS1 Ag [Bio-Rad], ELISA de captura de IgM y el ELISA de inhibición) como por el sistema comercial SD Dengue Duo.

PLATELIA DENGUE NS1 Ag

El sistema Platelia para la detección de la proteína NS1 (Bio-Rad) se realizó según las indicaciones del fabricante. Se añadieron a las placas 50 μ L de las muestras y controles del ensayo y se incubó de forma simultánea con 100 μ L del conjugado (AcM/peroxidasa) durante 90 min a 37 °C. La presencia de la proteína NS1 en la muestra forma un complejo inmune AcM-NS1-AcM/peroxidasa. Tras 6 lavados, el complejo inmune se reveló al adicionar 160 μ L del cromógeno en tampón sustrato en dilución de 1:11. A los 30 min de incubación a temperatura ambiente, la reacción enzimática se detuvo con la adición de una solución ácida y se leyó en un lector de placas de ELISA a 450/620 nm. La densidad óptica (DO) obtenida es proporcional a la cantidad de la proteína NS1 presente en la muestra.

Cálculo e interpretación: los resultados se exponen en forma de relación mediante la fórmula siguiente:

Relación = S/CO, donde S es la DO obtenida para la muestra y CO la media de las densidades ópticas del calibrador. Una relación < 0,5 corresponde a un caso negativo, de $0,5 \leq$ relación < 1 es indeterminado y una relación \geq 1 corresponde a un caso positivo de NS1.

MÉTODO DE ELISA DE CAPTURA DE IgM A DENGUE (MAC-ELISA)

Para la detección de anticuerpos IgM a dengue se siguió la metodología del sistema diagnóstico MAC-ELISA, desarrollado en el laboratorio de Arbovirus del IPK.¹⁴ Se emplearon inmunoglobulinas anti-IgM humanas (Sigma), las cuales fueron fijadas a una concentración de 7,5 μ g/mL en la placa de poliestireno en solución de carbonato-bicarbonato pH 9,5 por toda la noche, en cantidades de 100 μ L por pozo. Las placas se bloquearon con 150 μ L de albúmina bovina 1 % en solución carbonato-bicarbonato, añadiéndose, después de lavar, 50 μ L en dilución de 1:20 en solución salina (PBS)

de los sueros y controles. A continuación, 50 μL de una mezcla de los 4 serotipos virales a 16 unidades hemaglutinantes fue añadida y después el conjugado IgG humana anti-dengue/peroxidasa es adicionado (50 μL en dilución de 1:8 000 en PBS). Cada paso de incubación de los reactivos fue precedido por varios lavados con PBS. El revelado se realizó mediante la adición de 100 μL de una solución que contenía 8 mg de ortofenilen-diamina (OPD) (Sigma) como cromógeno y 4 μL de peróxido de hidrógeno (Merck) como sustrato en 10 mL de solución tampón de fosfato citrato pH 5. Luego de detenida la reacción con 100 μL de ácido sulfúrico 12,5 %, la lectura de las densidades ópticas se realizó mediante un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 490 nm. La relación de densidad óptica (RDO) para cada suero se calculó según la fórmula siguiente: $RDO = P/N$, donde P es la DO de la muestra y N es la media aritmética de las DO de las réplicas del control negativo. Un suero se considera positivo si RDO ≥ 2 .

MÉTODO DE ELISA DE INHIBICIÓN PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgG A VIRUS DENGUE (MEI)

Para la detección de anticuerpos IgG se siguió la metodología del MEI desarrollada en el Laboratorio de Arbovirus del IPK.¹⁵ Las placas de poliestireno se recubrieron con 100 μL de inmunoglobulinas IgG anti-dengue a concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en solución carbonato-bicarbonato pH 9,5 e incubadas toda la noche. Tras un paso de bloqueo con 150 μL de albúmina bovina 1 % en solución carbonato-bicarbonato e incubación a 37 °C por 1 h, se realizaron 3 lavados con solución fosfato salina-Tween 20 (PBS-T20) y se incubó la placa con 100 μL de antígeno de Den-2 en dilución 1:50. Posteriormente se añadieron los sueros diluidos desde 1/20 hasta 1/10240 en PBS-T20 en diluciones al doble. Conjugado anti-dengue peroxidasa (1:7000 en PBS-T20), fue añadido posteriormente en cantidad de 100 μL por pozo. Cada paso de incubación de los reactivos se realizó a 37 °C por 1 h y fue precedido por 3 lavados con PBS-T20. El revelado se realizó mediante la adición de 100 μL de una solución que contenía OPD (Sigma) en 8 mg como cromógeno y 4 μL de peróxido de

hidrógeno (Merck) como sustrato en 10 mL de solución tampón de fosfato citrato a pH 5. La reacción fue detenida con 100 μL de ácido sulfúrico 12,5 %. La lectura de las DO se realizó mediante un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 490 nm. El porcentaje de inhibición para cada muestra fue calculado según la fórmula siguiente:

$$\% \text{ inhibición} = [1 - (\text{DO muestra} / \text{DO control negativo})] \times 100.$$

Criterio de infección primaria: un caso se considera como primario si el título de anticuerpos en el suero colectado entre los días 5 y 7 de comienzo de los síntomas es ≤ 20 .

Criterio de infección secundaria: un caso se considera como secundario si el título de anticuerpos en el suero colectado entre los días 5 y 7 de comienzo de los síntomas es ≥ 1280 .

PRUEBA RÁPIDA SD DENGUE DUO

El sistema SD Dengue Duo para la detección de la proteína NS1 (Korea) se realizó según las indicaciones del fabricante. A continuación se añadieron 3 gotas (100 μL) de la muestra de suero en el pozo circular, usando la pipeta proporcionada en el estuche; en el caso de la detección de anticuerpos IgM/IgG se añadieron 10 μL de suero con el capilar también proporcionado en el estuche y a continuación se añadieron 4 gotas (90-120 μL) del diluyente en el pocillo circular. Después de un período de 15-20 min la prueba fue leída por el técnico principal quien realizó el ensayo y detrás por un segundo técnico para la confrontación de los resultados. Las muestras con resultados discordantes se leyeron por un tercer técnico. Se valoró la funcionalidad y la operacionalidad del sistema teniendo en cuenta los parámetros utilizados en estudios realizados por el TDR/OMS.¹⁶

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el programa estadístico Epidat 3.1. Se determinó la sensibilidad y especificidad del sistema comercial SD Duo en comparación con los ensayos de referencia utilizados. Para la concordancia entre los observadores se determinó el índice de kappa.

RESULTADOS

DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL SISTEMA COMERCIAL SD DENGUE DUO EN LA DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA NS1

Para la evaluación del sistema SD Dengue Duo en la detección de la proteína NS1 se analizaron 161 muestras de suero. El estuche comercial Platelia NS1 fue utilizado como técnica de referencia. De los resultados obtenidos, 41 muestras resultaron positivas por ambas técnicas, 1 positiva para el sistema SD Dengue Duo que resultó negativa por la técnica de referencia Platelia NS1; 30 negativas por SD Dengue Duo y positivas por Platelia NS1, y 89 negativas por ambas técnicas (tabla 1). El sistema SD Dengue Duo mostró una sensibilidad de 57,75 % (IC 95 % 45,55-69,94) y una especificidad de 98,89 % (IC 95 % 96,17-100). La sensibilidad en función del momento de colectada la muestra varió, para ≤ 4 d de inicio de los síntomas fue de 93,75 % y para ≥ 5 d de 46,30 %.

En la tabla 2 se muestran los porcentajes de sensibilidad del sistema SD Dengue Duo en función de los serotipos infectantes, del tipo de infección (primaria y secundaria) y del momento de colectada de la muestra agrupados en ≤ 4 y ≥ 5 d.

Tabla 1. Comparación del SD Dengue Duo en la detección de la proteína NS1 con el sistema Platelia Dengue NS1 Ag

SD Duo		Platelia NS1	
		+	-
	+	41	1
	-	30	89

SD Dengue Duo sensibilidad: 57,75 % (IC 95 % 45,55-69,94); SD Dengue Duo especificidad: 98,89 % (IC 95 % 96,17-100).

En un primer grupo para días de colecta ≤ 4 los porcentajes de positividad oscilaron en los casos primarios entre 83,33 % y 100 % para los serotipos 2 y 3, y en los casos secundarios 100 % en todos los serotipos. Con relación al segundo grupo con días de colecta ≥ 5 se encontró en los casos primarios porcentajes de sensibilidad entre 14,28 y 94,11 %, correspondiendo el de mayor al serotipo 1 y el de menor al serotipo 3; mientras que en los casos secundarios el mayor porcentaje de sensibilidad encontrado fue de 6,66 % para los serotipos 1 y 4.

DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL SISTEMA COMERCIAL SD DENGUE DUO EN LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgM A VIRUS DENGUE

Al comparar el sistema SD Dengue Duo con el MAC-ELISA como técnica de referencia para la detección de anticuerpos IgM (tabla 3) se obtuvieron los resultados siguientes: del total de 161 muestras de sueros estudiadas, 96 fueron IgM positivas y 60 negativas por ambas técnicas, solo 5 muestras se mostraron discordantes por el sistema Dengue Duo. Los porcentajes de sensibilidad y especificidad para este sistema resultaron de 96 % (IC 95 % 91,66-100) y 98,36 % (IC 95 % 94,35-100), respectivamente.

EVALUACIÓN DEL SISTEMA COMERCIAL SD DENGUE DUO EN RELACIÓN CON EL TIPO DE INFECCIÓN (PRIMARIA O SECUNDARIA)

Para el análisis de la caracterización del tipo de infección se emplearon los resultados obtenidos de las 161 muestras de sueros estudiadas en

Tabla 2. Sensibilidad del sistema SD Dengue Duo en la detección de NS1 a los diferentes serotipos en función del tipo de infección

Serotipo	Días	Primarios		Secundarios	
		Muestras*	S (%) **	Muestras*	S (%) **
DEN-1	≤ 4	0/0	-	1/1	100
	≥ 5	16/17	94,11	1/15	6,66
DEN-2	≤ 4	3/3	100	3/3	100
	≥ 5	1/2	50	0/0	-
DEN-3	≤ 4	5/6	83,33	1/1	100
	≥ 5	4/28	14,28	0/14	0,0
DEN-4	≤ 4	0/0	-	3/3	100
	≥ 5	2/5	40	1/15	6,66

* Relación de muestras positivas a NS1 por SD Dengue Duo entre muestras positivas por Platelia NS1; **: sensibilidad

cuanto a la clasificación en primarios, secundarios y negativos, según el método de ELISA de inhibición como técnica de referencia. Como se observa en la tabla 4, 154 muestras de 161 coincidieron por ambas técnicas para 95,7 % de concordancia. De ellos 100 % (61/61) correspondió a casos primarios, 90,4 % (47/52) a casos secundarios y 95,83 % (46/48) a los negativos. Solo 4,3 % (7/161) fueron casos discordantes, de ellos 5 se mostraron como casos primarios por el SD Dengue Duo siendo secundarios y los 2 restantes como casos secundarios siendo negativos por la técnica de referencia.

Tabla 3. Comparación entre el SD Dengue Duo y el MAC-ELISA en la detección de anticuerpos IgM

	MAC-ELISA	
	+	-
SD Duo	96	1
	4	60

SD Dengue Duo sensibilidad: 96 % (IC 95 % 91,66-100); SD Dengue Duo especificidad: 98,36 % (IC 95 % 94,35-100).

Tabla 4. Comparación del SD Dengue Duo con el método de ELISA de inhibición (MEI) en relación con casos primarios, secundarios o negativos

SD Dengue Duo	MEI			Total
	Primario	Secundario	Negativo	
Primario	61	5	0	66
Secundario	0	47	2	49
Negativo	0	0	46	46
Total	61	52	48	161

ANÁLISIS GLOBAL DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA SD DUO

En el análisis global de todos los marcadores que se detectan en la prueba (NS1, IgM y IgG) se observó un aumento de la sensibilidad de 57,75 a 93,81 % cuando se incorporó junto con el análisis de la proteína NS1 el de los anticuerpos IgM y de 100 % cuando se incorporó el de la respuesta de IgG. Sin embargo, la especificidad disminuyó ligeramente de 98,89 % hasta 95,83 %.

Al hacer un análisis de la variabilidad entre las observaciones realizadas por los técnicos de los diferentes marcadores del sistema, se encontraron valores de kappa de 0,97 (IC 95 % 0,92-1,0) para la detección de la proteína NS1, de 0,96 (IC 95 % 0,91-1,0) para la detección de los anticuerpos IgM y 0,92 (IC 95 % 0,86-0,99) para la detección de anticuerpos IgG.

ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS OPERACIONALES DEL SISTEMA SD DENGUE DUO

A las características operacionales de la prueba SD Dengue Duo, se les dio valor del 1 al 3 en función de su mayor o menor claridad, facilidad de ejecución e interpretación de los resultados. Para ello se valoró el criterio de 3 técnicos, de los cuales se obtuvo un promedio de la puntuación para cada característica operacional evaluada. Los resultados obtenidos mostraron una calificación máxima de 3 para las 2 primeras características que reflejan un buen desempeño por parte del sistema en cuanto a su operacionalidad. Sin embargo para la tercera característica relacionada con la interpretación se obtuvo una puntuación de 2.

DISCUSIÓN

No existe en la actualidad ninguna prueba rápida que pueda ser considerada aceptable para un diagnóstico definitivo de dengue.¹⁶ Tampoco existe ninguna prueba inmunocromatográfica que incorpore además de la detección de anticuerpos IgM e IgG, la detección de la proteína NS1 a virus dengue. El SD Dengue Duo es el primer diseño de prueba rápida que se presenta con estas características.

Se han realizado diferentes evaluaciones a nivel internacional de sistemas que detectan la proteína NS1, tanto tipo ELISA como en formato prueba rápida. *Hang* y otros al evaluar el sistema NS1 Ag Strip (BIORAD), encontraron 72 % de sensibilidad y 100 % de especificidad utilizando TR-RCP en tiempo real como prueba de referencia. *Tricou* y otros al valorar el sistema rápido anterior en conjunto con el SD Dengue Duo encontraron una sensibilidad de 62,4 y 61,6 %, respectivamente, y 100 % de especificidad comparadas también con la técnica TR-RCP. Por otra parte, *Dussart* y otros¹⁷ al evaluar Platelia Dengue NS1 y la prueba rápida NS1 Ag Strip, ambas de BIORAD, encontraron una sensibilidad de la prueba rápida de 94,2 % con respecto al ELISA. De igual manera, *Hang* y otros mostraron una sensibilidad de 87,5 % al comparar los mismos sistemas.

En nuestro estudio se encontró un porcentaje más bajo de sensibilidad (57,75 %) al comparar la prueba rápida SD Dengue Duo con el Platelia NS1,

aunque con una alta especificidad (98,86 %). Estos resultados fueron similares a los obtenidos por *Tricou* y otros^{12,13} en su estudio.

Se ha planteado que la detección de la proteína NS1 se favorece si las muestras son tomadas dentro de los primeros días de comenzado los síntomas, donde los niveles de NS1 son más altos y los de anticuerpos son bajos o están ausentes, porque la presencia de anticuerpos afecta la detección por la formación de inmunocomplejos.^{7,18,19} *Dussart* y otros encontraron sensibilidades de 94,3 y 93,5 % en muestras colectadas a los 4 y 5 d o más, respectivamente, utilizando la prueba NS1 Ag Strip (BIORAD) en comparación con Platelia NS1. *Hang* y otros al evaluar los mismos sistemas encontraron 88,4 % en muestras colectadas a los 3 d o menos y 85,7 % en aquellas con 4 d o más. Resultados similares se encontraron en nuestro estudio, para muestras tomadas entre 4 d o menos (93,75 %), utilizando otra prueba rápida. Sin embargo, la prueba resultó menos sensible para muestras de más de 5 d, lo cual sugiere que la detección de la proteína NS1 mediante este sistema puede verse afectada con la presencia de anticuerpos IgM o IgG en el suero.

Aparentemente la respuesta al serotipo 1 en casos primarios no resultó afectada (tabla 2), lo que pudiera sugerir que los niveles de NS1 a este serotipo fueran más elevados o que también el anticuerpo monoclonal utilizado en la prueba reconoció mejor a la proteína NS1 del serotipo 1. Resultados obtenidos por *Tricou* y otros en la evaluación del SD Duo, mostraron la mayor sensibilidad del sistema para los casos primarios infectados con Dengue 1, lo que pudiera apoyar nuestros resultados.

Con relación a la detección de anticuerpos IgM, *Blacksell* y otros²⁰ en un metaanálisis de los resultados obtenidos por diferentes autores encontraron para la prueba rápida Panbio rangos de sensibilidad y especificidad entre 64 y 100 %, y 72 y 95 %. *Nga* y otros²¹ al evaluar Panbio y SD Bioline encontraron sensibilidades de 67,3 y 10,6 %, respectivamente, con especificidad de más de 90 % para ambas pruebas. Otro estudio realizado por el TDR/OMS con diferentes pruebas rápidas comerciales (Panbio Diagnostics “DuoCassette”, Pentax Corporation “HapalyseM”, Standar Diagnostics “SD Bioline” y Zephyr Biomedicals “Dengucheck”) mostró sensibilidades entre 20,5 y 77,8 %.¹⁶ En el presente trabajo, el sistema en evaluación

obtuvo resultados satisfactorios con valor de sensibilidad superior (96,0 %) a las evaluaciones anteriores para pruebas rápidas.

La clasificación serológica de un caso de dengue como primario o secundario es importante para evaluar el riesgo de sufrir el cuadro grave de la enfermedad, tanto en individuos como en una población, porque se plantea que uno de los factores de riesgo para el dengue severo está relacionado con la infección secundaria.²²⁻²⁴ En la evaluación de la detección de los anticuerpos IgG, *Blacksell* y otros observaron una baja sensibilidad y especificidad al definir los criterios de primarios y secundarios en las muestras para la evaluación del sistema rápido Panbio. Contrario a estos resultados, el sistema SD Duo mostró altos porcentajes de concordancia en el tipo de infección al compararse con la prueba de referencia.

En el análisis global de los diferentes marcadores que detecta el sistema se observó un incremento en la sensibilidad a medida que se fueron combinando, lo que habla de la fortaleza del sistema SD Duo y le proporciona una ventaja con respecto a los sistemas rápidos antes evaluados. La especificidad aunque disminuyó ligeramente se mantuvo en valores aceptables por encima de 95 %. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por *Tricou* y otros, que observaron un incremento de la sensibilidad del sistema SD Duo desde 62,4 % solo para la NS1 hasta 83,7 % cuando se incorporaban los resultados de la IgM e IgG, con una pequeña disminución de la especificidad cuando se analizaron los 3 marcadores juntos. De igual manera *Osorio* y otros reportaron un incremento de sensibilidad de 51 a 80,7 % y disminución de la especificidad desde 96,7 % hasta 89,1 %, al evaluar este sistema.

El análisis de la variabilidad entre las observaciones realizadas por ambos técnicos mostró valores de kappa mayores que 0,90 en la detección de los diferentes marcadores, lo que demuestra una fuerza de concordancia muy buena entre las lecturas de los técnicos para la prueba SD Duo.

Al evaluar las características operacionales del sistema se observó que la claridad de las instrucciones y facilidad de ejecución lograron el máximo de calificación, no siendo así para la interpretación de los resultados, lo cual pudo ser debido a la difícil interpretación de algunas muestras que mostraban bandas tenues. En la evaluación realizada por el TDR/OMS (2009) para la detección

de anticuerpos IgM, también en pruebas rápidas, se encontraron problemas en la observación de bandas tenues.

A pesar de la baja sensibilidad en la detección de la proteína NS1 en muestras colectadas ≥ 5 d, el análisis global corroboró la detección de 100 % de las muestras positivas, obteniéndose también una buena correlación entre los criterios de tipo de infección en el panel utilizado para este estudio. De tal manera, el sistema comercial SD Dengue Duo, además de ser un método simple, rápido, fácil de ejecutar y no requerir equipamiento adicional, tiene la ventaja de poder ser utilizado para muestras tanto en la fase aguda como en la fase convaleciente; esto permite la detección de forma simultánea de la proteína NS1 y los anticuerpos IgM e IgG presentes en el suero. No obstante a los resultados obtenidos en este estudio y debido a la importancia que tiene la proteína NS1 como marcador de infección temprana, consideramos que debe completarse la evaluación, incrementando el número de muestras colectadas en la fase aguda temprana y a diferentes serotipos para evaluar mejor la sensibilidad del sistema.

Evaluation of the SD Dengue Duo diagnosis system for detection of NS1 protein and IgM and IgG dengue antibodies

ABSTRACT

Introduction: SD Dengue Duo (Standard Diagnosis) commercial kit is an immunochromatographic rapid test that detects NS1 protein and IgG/IgM dengue antibodies simultaneously. **Objective:** to evaluate the operational and functional characteristics of this system for the detection of virological and serological markers. **Methods:** sera panel was made up by 161 samples, 113 from patients with clinically and serologically confirmed dengue caused by any of the four dengue virus serotypes and 48 negative samples. All these samples were tested by SD Dengue Duo Kit and by Platelia Dengue NS1 Ag, IgM Capture ELISA and ELISA Inhibition Method used as reference assays. **Results:** the evaluated kit showed a 57.75% sensitivity for the detection of NS1 protein, false negatives were detected in samples collected 5 days or more after fever onset in secondary infection cases. IgM detection showed 96.0% sensitivity and 98.4% specificity. Furthermore, high agreement (95.7%) in classifying dengue infection types (primary or secondary infections) was observed. The global study of the 3 markers, the sensitivity rose to 100%. **Conclusions:** SD Dengue Duo is a simple, easy and rapid assay; it does not require additional equipment, can be used for acute and convalescence serum samples and offers a good alternative for dengue diagnosis in those laboratories where a complete dengue virus diagnosis is difficult to perform.

Key words: dengue, NS1, IgM, IgG, rapid test.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis.* 2002;2(1):33-42.
- WHO. Dengue and dengue hemorrhagic fever. 2008[cited 5 Jun 2011]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>
- Guzmán Tirado MG, Rosario D, Kourí G. *Molecular Biology of the Flavivirus*. Norfolk: Horizon Bioscience; 2006. p. 191-223.
- Buchy F, Yoksan S, Peeling RW, Hunsperger E. *Laboratory tests for the diagnosis of dengue virus infection*. Geneva, Switzerland: TRD/ Scientific Working Group; 2006. p. 74-85.
- Senanayake S. Dengue fever and dengue haemorrhagic fever—a diagnostic challenge. *Aust Fam Physician.* 2006;35(8):609-12.
- Guzman M, Garcia G, Kouri G. Dengue and dengue hemorrhagic fever: research priorities. *Rev Panam Salud Publica.* 2006;19(3):204-15.
- Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol.* 2000;38(3):1053-7.
- Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol.* 2002;40(2):376-81.
- Vázquez S, Ruiz D, Barrero R, Ramírez R, Calzada N, Del Rosario Peña B, et al. Kinetics of dengue virus NS1 protein in dengue 4-confirmed adult patients. *Diagnostic Microbiology Infectious Disease.* 2010;68(46-9).
- Bessoff K, Phoutrides E, Delorey M, Acosta L, Hunsperger E. Utility of a commercial nonstructural protein 1 antigen capture kit as a dengue virus diagnostic tool. *Clin Vaccine Immunol.* 2010;17(6):949-53.
- Guzmán MG, Jaenisch T, Gaczkowski R, Ty Hang VT, Sekaran SD, Kroeger A, et al. Multi-country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(8):e811.
- Tricou V, Vu HT, Quynh NV, Nguyen CV, Tran HT, Farrar J, et al. Comparison of two dengue NS1 rapid tests for sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. *BMC Infect Dis* 2010; 10:142.
- Hang VT, Nguyet NM, Trung DT, Tricou V, Yoksan S, Dung NM, et al. Diagnostic accuracy of NS1 ELISA and lateral flow rapid tests for dengue sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(1):e360.
- Vazquez S, Cabezas S, Perez AB, Pupo M, Ruiz D, Calzada N, et al. Kinetics of antibodies in sera, saliva, and urine samples from adult patients with primary or secondary dengue 3 virus infections. *Int J Infect Dis.* 2007;11(3):256-62.
- Vazquez S, Acosta N, Ruiz D, Calzada N, Alvarez AM, Guzman MG. Immunoglobulin G antibody response in children and adults with acute dengue 3 infection. *J Virol Methods.* 2009;159(1):6-9.
- Hunsperger EA, Yoksan S, Buchy P, Nguyen VC, Sekaran SD, Enria DA, et al. Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(3):436-40.
- Dussart P, Petit L, Labeau B, Bremond L, Leduc A, Moua D, et al. Evaluation of two new commercial tests for the diagnosis of acute dengue virus infection using NS1 antigen detection in human serum. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2(8):e280.

18. Dussart P, Labeau B, Lagathu G, Louis P, Nunes MR, Rodrigues SG, et al. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. *Clin Vaccine Immunol.* 2006;13(11):1185-9.
19. Libraty DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, Kalayanaraj S, Green S, et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 2002; 186(8):1165-8.
20. Blacksell SD, Doust JA, Newton PN, Peacock SJ, Day NP, Dondorp AM. A systematic review and meta-analysis of the diagnostic accuracy of rapid immunochromatographic assays for the detection of dengue virus IgM antibodies during acute infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006; 100(8):775-84.
21. Nga TT, Thai KT, Phuong HL, Giao PT, Hung Le Q, Binh TQ, et al. Evaluation of two rapid immunochromatographic assays for diagnosis of dengue among Vietnamese febrile patients. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14(6):799-801.
22. Halstead SB. Antibodies determine virulence in dengue. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1171(Suppl 1):E48-56.
23. Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 2. An integral analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987;81(5):821-3.
24. Guzman MG, Kouri G. Dengue haemorrhagic fever integral hypothesis: confirming observations, 1987-2007. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008;102(6):522-3.

Recibido: 15 de septiembre de 2011. Aprobado: 19 de octubre de 2011.

Didye Ruiz Amores. Centro Colaborador de la OMS/OPS para el Estudio del Dengue y su Vector. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Autopista Novia del Mediodía, Km 6 ½. Lisa, La Habana, Cuba. CP 17100. Teléf.: 202 0450 Correo electrónico: didye.ruiz@ipk.sld.cu