

XVI FORUM DE CIENCIA Y TECNICA



"UMELISA DENGUE IGM PLUS: UNA NUEVA HERRAMIENTA PARA EL DIAGNÓSTICO Y LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA.

**Autores: Irinia Valdivia, Ariel Palenzuela, Regla Herrera,
Orlando Zulueta, Sadys Feal, Julio Ventura,
Carlos Silva y Niurka Carlos.**

**Centro de Inmunoensayo
2006**

**Centro de Inmunoensayo
XVI Forum de Ciencia y Técnica**

"UMELISA Dengue IgM PLUS: una nueva herramienta para el diagnóstico y la vigilancia epidemiológica.

Autores: Irinia Valdivia¹, Ariel Palenzuela¹, Regla Herrera¹, Orlando Zulueta¹, Sady Feal¹, Julio Ventura¹, Carlos Silva¹ y Niurka Carlos¹.

Coautores: Aramis Sánchez¹, Dayamí Alcántara¹, Mónica Saura¹, Meinardo Lafargue¹, René Robaina¹, Antonio Melchor¹, Liliena López¹ y Adriana González¹.

Colaboradores: Adrián Heredia¹, Celia García¹, Magdalena Barrios¹, Tania Licourt¹, Tulio Horta¹, María Victoria Cabrera¹, Guadalupe Guzmán², Susana Vázquez², Ana María Masa³, Sonia Rodríguez⁴, Carmen Julia Morales⁴, Mitzi Castro⁵ e Isabel Cwu⁵.

¹ Centro de Inmunoensayo. Calle 134 y Ave 25. Reparto Cubanacán. Miramar. Apartado 6653. Ciudad de la Habana. Cuba. Email: igtorch@cie.sld.cu.

² Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí".

³ Centro Provincial de Higiene y Epidemiología de Ciudad de la Habana.

⁴ Banco de Sangre Provincial. Calle 23, e/ 2 y 4. Ciudad de la Habana, Cuba.

⁵ Laboratorio de la Región Sanitaria Metropolitana. Tegucigalpa. Honduras.

1- INTRODUCCIÓN

El dengue es una enfermedad viral producida por los 4 serotipos del virus de igual nombre y transmitida por mosquitos del género *Aedes*. La enfermedad se reporta en más de 100 países y 2 500 millones de personas están en riesgo de padecerla. Se estima que anualmente ocurren 50 millones de infecciones y se producen entre 25 000 - 50 000 fallecidos con más de 500 000 casos hospitalizados, representando en la actualidad la enfermedad viral transmitida por artrópodos más importante que afecta al hombre. En los últimos años ha re-emergido acompañada de una amplia distribución geográfica y el desarrollo de una incrementada actividad epidémica. En la región de las Américas, en particular, se ha observado un incremento significativo en los casos de fiebre de dengue (FD) y fiebre hemorrágica (FHD); en el período comprendido entre 1968 y 1980 se reportaron sólo 60 casos de FHD en la región, procedentes de 5 países, y se pasó a más de 90 000 casos en el período de 1981 al 2002 procedentes de 28 países. Factores como la insuficiente disponibilidad de métodos de diagnóstico en algunos países, la inadecuada vigilancia epidemiológica y las insuficientes actividades de control del vector, son aspectos que agravan la situación e incrementan la magnitud del problema.

Cuba sufrió en 1981 la epidemia de dengue y dengue hemorrágico más grande reportada hasta el presente en las Américas (344 203 casos de dengue, de ellos 10 312 fueron dengue hemorrágico y fallecieron 158 personas, 101 niños y 57 adultos). El control de esta epidemia costó al país la elevada cifra de 103 000 000 USD, de ellos 43 000 000 en insecticidas y equipos de fumigación.

Como puede verse, la situación del dengue y del dengue hemorrágico en la región resulta realmente alarmante y las perspectivas para su control son remotas, ya que los factores de emergencia del dengue no tienen posibilidades reales de desaparecer.

Por otra parte, el dengue es considerada una de las enfermedades que provoca un mayor impacto en la economía, debido a las afectaciones económicas que producen las epidemias en el turismo, los bienes dejados de producir, los gastos por seguridad social, por concepto de hospitalización y por el control de vectores; así como la pérdida irrecuperable de vidas humanas que puede producirse en el transcurso de una epidemia, entre otros; por tanto resulta indispensable el desarrollo de sistemas de vigilancia para su prevención y control, en los que la confirmación del laboratorio ocupa un papel prioritario, ya que puede brindar información temprana y precisa a las autoridades de salud, lo que favorece la toma inmediata y oportuna de las medidas adecuadas para evitar la propagación de la enfermedad. Dada la emergencia y reemergencia del dengue y la FHD, su diagnóstico se convierte en un objetivo de primer orden para cualquier país, por la necesidad de diferenciar el dengue de otras enfermedades y como soporte a los sistemas de vigilancia.

Actualmente, las tradicionales pruebas serológicas para el diagnóstico de infecciones por arbovirus (virus transmitidos por artrópodos) están siendo sustituidas por los inmunoensayos, dado que los mismos pueden proporcionar una mayor sensibilidad y agilizan el trabajo técnico requiriendo un tiempo mucho menor para su ejecución. La detección de anticuerpos IgM anti - dengue utilizando los ensayos inmunoenzimáticos tipo ELISA representó uno de los avances de mayor importancia en el diagnóstico de esta entidad, el ELISA de Captura de IgM (MAC-ELISA) se ha constituido en una herramienta invaluable para el diagnóstico de rutina del dengue.

El UMELISA DENGUE IgM PLUS[®] es un ensayo comercial desarrollado por el Centro de Inmunoensayo hace poco más de 3 años y empleado para la detección de anticuerpos IgM dirigidos contra los cuatro serotipos del virus del dengue en muestras humanas de suero y sangre seca; utiliza las ventajas de la reacción de alta afinidad entre la estreptavidina y la biotina y se basa en el **Sistema Ultra Micro Analítico (SUMA)**; tecnología que integra el desarrollo de pruebas diagnósticas basadas en el principio del Ultra Micro ELISA (pequeños volúmenes de reactivos y muestras, 5 – 10 µL) con el desarrollo de los equipos que constituyen el complemento instrumental necesario para la realización de las mismas; ofreciendo además la posibilidad de realizar el cálculo, validación e interpretación de los resultados de manera automatizada, lo cual brinda facilidades para el procesamiento de los mismos y agiliza el trabajo.

Teniendo en cuenta las ventajas del empleo de muestras de sangre seca y su recomendación para la realización de estudios epidemiológicos y vigilancia de enfermedades de alta circulación como es el caso del dengue, así como para el estudio de muestras procedentes de niños pequeños, se realizaron los trabajos encaminados a incluir además este tipo de muestra como otra de las aplicaciones del UMELISA DENGUE IgM PLUS[®]

Entre las ventajas del uso de muestras de sangre seca se encuentra la facilidad para la toma de muestras, la cual se realiza por punción digital, del talón o del lóbulo de la oreja, con una lanceta; no es necesario centrifugar las muestras ni refrigerarlas para su transportación, la cual se facilita ya que no existe peligro de derrame del material biológico colectado; por otra parte el uso de esta forma de recolección de muestras permite una mejor cooperación de los individuos y disminuye los riesgos de contaminación del personal encargado de procesarlas. El aprovechamiento de todas estas ventajas haría más eficiente la vigilancia del dengue en los países afectados por la circulación de este agente infeccioso, los cuales, en su mayoría, cuentan con escasos recursos para enfrentar estudios epidemiológicos de envergadura, permitiéndoles llevar la vigilancia de la enfermedad hasta las zonas más apartadas de sus geografías.

Esta prueba comercial resulta de gran utilidad tanto para la realización de estudios masivos, como para labores de vigilancia a escala menor, debido a las facilidades de ejecución que brinda, los bajos costos de operación, el tiempo de duración de la técnica y la automatización en la obtención de resultados, así como la garantía de elevados niveles de sensibilidad y especificidad en los mismos. Actualmente se emplea en Cuba y otros países del área para la realización del pesquisaje primario que tiene lugar como parte de la vigilancia epidemiológica de la enfermedad, los Centros Provinciales de Higiene y Epidemiología (CPHE) de nuestro país utilizan esta prueba para el diagnóstico primario del dengue, cuyos resultados positivos son confirmados por el centro de referencia nacional.

Este ensayo se introdujo a la red nacional a partir del 2003 y a pesar de contar con un paso más que el UMELISA precedente, se realiza en menor tiempo que éste y se logra una mejora significativa de la especificidad de la prueba, sin afectación de la sensibilidad, lo cual acrecienta la confiabilidad en sus resultados. Con la introducción y generalización de este diagnosticador se pone a disposición del sistema de salud cubano y de otros países del área, donde también se emplea; una prueba comercial de gran utilidad para la vigilancia y apoyo al diagnóstico del dengue, cuyos resultados se encuentran avalados por las evaluaciones nacionales e internacionales realizadas, así como por el adecuado desempeño que se ha observado en la vigilancia epidemiológica del dengue en Cuba, desde su introducción en mayo del 2003.

2- OBJETIVOS.

2.1- Desarrollar un ensayo para la detección de anticuerpos IgM dirigidos contra los 4 serotipos del virus del dengue, de tipo ELISA y basado en la tecnología SUMA.

2.2- Lograr un producto de elevada calidad: sensible, específico, rápido y barato, que supere al ensayo precedente en cuanto a especificidad y resulte útil para labores de vigilancia del dengue y como apoyo al diagnóstico clínico.

2.3- Extender la aplicación de la prueba a muestras de sangre seca sobre papel de filtro, teniendo en cuenta las ventajas del empleo de este tipo de muestras para la realización de estudios epidemiológicos y para la población infantil.

2.4- Introducir y generalizar el empleo de la prueba en la red nacional de laboratorios de vigilancia de dengue, ubicados en los Centros Provinciales de Higiene y Epidemiología del país.

2.5- Lograr un producto comercial que resulte competitivo en la arena internacional.

3- MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1- Muestras empleadas

Panel # 1: Integrado por 624 muestras de suero procedentes de individuos con síntomas de enfermedad eruptivo-febril o de individuos supuestamente sanos, clasificadas previamente en el ELISA de captura de IgM (MAC-ELISA) anti-dengue, del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK), Centro Colaborador de la OPS/OMS para el estudio de Enfermedades Víricas y Centro de referencia para dengue en Cuba. Estas muestras fueron utilizadas para la evaluación de la sensibilidad y especificidad del ensayo, y fueron colectadas durante brotes o epidemias de dengue ocurridas en diferentes países del continente americano, incluida Cuba; algunas de ellas provienen de donantes de sangre. Estas 624 muestras proceden de: Brasil (36), Colombia (19), Venezuela (23), Ecuador (2), El Salvador (5), México (1) y Cuba (538).

Panel # 2: Formado por 1713 muestras de suero, que incluyen las procedentes de individuos con síntomas de enfermedad eruptivo-febril incluidas dentro de las 624 del Panel 1. Estas muestras fueron colectadas de regiones endémicas, en su mayoría durante brotes o epidemias de dengue ocurridas en Colombia (48), Venezuela (107), México (37), Brasil (285), Ecuador (16), El Salvador (56) y Cuba (1164). El panel fue empleado con el objetivo de observar el desempeño del ensayo en muestras procedentes de diferentes países de la región, que podrían ser potenciales usuarios de la prueba en el futuro y donde co-circulan otros flavivirus. Este panel contribuyó también a la determinación del nivel de corte.

Panel # 3: Compuesto por 1 416 muestras de suero procedentes de individuos supuestamente sanos, donantes de sangre de Colombia (94), Venezuela (324) y Cuba (998). Este panel permitió evaluar adicionalmente la especificidad del ensayo y corroborar la adecuación del valor de corte determinado.

Panel # 4: Incluye 238 muestras negativas cuyas características potencialmente pueden interferir en la especificidad de los inmunoensayos de manera general, ocasionando resultados falsos positivos o pueden presentar reactividad cruzada en ensayos de detección de IgM anti-dengue.

Panel # 5: Compuesto por 468 muestras pareadas de suero y sangre seca procedentes de donantes de sangre y 151 muestras pareadas de suero y sangre seca colectadas durante la epidemia de dengue ocurrida en Honduras, en julio del 2002. Las muestras de sangre seca fueron colectadas en papel de filtro Schleicher and Schuell 903 (S&S 903). Este panel fue empleado para la

evaluación de la sensibilidad y especificidad de la prueba en muestras de sangre seca, así como para la determinación de su nivel de corte con este tipo de muestra.

Todas las muestras se conservaron a -20 °C hasta su evaluación.

3.2- UMELISA DENGUE IgM PLUS

Es un ensayo heterogéneo, cualitativo, en su variante captura que emplea las ventajas de la reacción de alta afinidad entre la Estreptavidina y la Biotina y donde se utilizan como fase sólida tiras de ultramicroELISA revestidas con anticuerpos anti IgM humana. Las muestras se incuban en los pocillos de las tiras y los anticuerpos en su superficie capturan la IgM presente en el suero. A continuación, previo lavado que elimina los componentes de la muestra no fijados, se añade el antígeno de dengue (mezcla de los cuatro serotipos del virus) que se unirá a la IgM específica capturada en el paso anterior.

Una vez eliminado el antígeno en exceso, se añaden anticuerpos monoclonales biotinilados específicos al virus dengue (Anticuerpos Biotinilados), que se unirán al complejo formado sobre la fase sólida. Luego de otro paso de incubación y lavado se aplica el conjugado Estreptavidina / Fosfatasa Alcalina (F.A.), que revelará la reacción inmunológica, en caso que haya ocurrido. Por último se adiciona el sustrato fluorogénico (4-Metilumbeliferil fosfato), que será hidrolizado y la intensidad de la fluorescencia emitida permitirá detectar en la muestra la presencia de anticuerpos IgM específicos al virus del dengue. Todos los reactivos se incuban a 37 °C por 30 minutos, excepto el sustrato que se incuba a temperatura ambiente. Tras cada incubación se realizan 4 ciclos de lavado con tampón Tris-HCl 15 mM - Tween 20 al 0,05 %. Los resultados de las muestras se expresan en unidades de fluorescencia (UF) (fig. 1).

La validación e interpretación de los resultados de la prueba se puede realizar alternativamente de forma automática en el lector PR 521, mediante el paquete de programas Strips Reader Software versión 8.0, de la tecnología SUMA[®]. Los mismos se expresan como relación $(M-N)/(P-N)$ donde M es la fluorescencia de la muestra, N es la fluorescencia del suero control negativo y P corresponde a la fluorescencia del suero control positivo.

En el caso del procedimiento del ensayo para muestras de sangre seca, se corta con un perforador para papel un disco de 3 mm de diámetro en la zona central de la mancha de sangre; este ponche se deposita en un recipiente apropiado y se le añade 40 µL de diluyente de muestras (suero de carnero al 5 % (R2)). Luego de incubar una hora a temperatura ambiente (20-25 °C) en cámara húmeda y homogeneizar adecuadamente, las muestras son transferidas a la placa de reacción y a partir de este paso se sigue el mismo procedimiento descrito anteriormente para el caso de las muestras de suero.

UMELISA DENGUE IgM PLUS

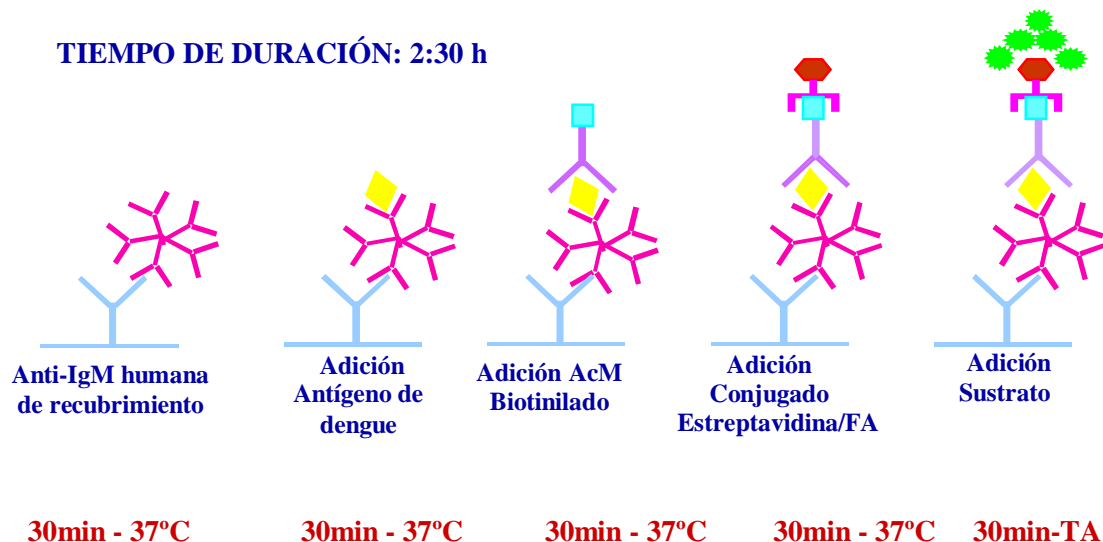


Figura 1: Principio de ensayo del UMELISA DENGUE IgM PLUS

3.3- ELISA de captura de IgM (MAC-ELISA)

Se utilizó, como técnica de referencia, el ELISA de captura de IgM desarrollado en el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Placas NUNC Maxisorp de 96 pozos fueron sensibilizadas con IgG de carnero anti-IgM humana (Sigma). Un volumen de 50 μ L de cada muestra, positivo (por duplicado) o negativo (por cuadruplicado) control fue adicionado en cada pozo a la dilución 1:20 en PBS con 0.5% BSA. Se incubó a temperatura ambiente por 2 horas. Posteriormente se añadió 50 μ L de una mezcla de antígeno constituida por los cuatro serotipos del virus dengue. Se incubó toda la noche a 4°C, adicionándose después 50 μ L del conjugado anti-dengue/peroxidasa diluido 1/3000 y incubándose nuevamente 1 h a 37 °C. Se utilizó como sustrato peróxido de hidrógeno y ortofenilendiamina (OPD) en solución tampón citrato-fosfato (pH 5). La reacción se detuvo con ácido sulfúrico al 12.5%. La lectura se realizó a 492 nm en un lector ELISA tipo MRX Microplate Reader. Criterio de positividad: Densidad óptica (DO) muestra \geq 2 veces DO control negativo.

3.4- Anticuerpos de recubrimiento.

Los anticuerpos anti IgM humana obtenidos en carnero (Centro de Inmunoensayo), fueron adsorbidos con AH-Sepharosa 4B-IgG humana y contra suero de ratón. Se purificaron por cromatografía de afinidad con AH-Sepharosa 4B-IgM humana. Finalmente, se dializaron contra solución salina tamponada con fosfato (SSTF) pH 7,4 y se almacenaron en la misma solución a -20 °C hasta el momento del uso.

3.5- Fase sólida.

Placas de poliestireno con dióxido de titanio e irradiadas, de 12 tiras x 8 pocillos (Greinerlabortechnik, Alemania), producidas para ultra micro ELISA (10 μ L por pocillo).

3.6- Sueros controles.

El suero control negativo se obtuvo de un donante de sangre en un Banco de Sangre de Ciudad de la Habana, Cuba. El suero control positivo, se conformó mezclando 5 sueros de pacientes de la epidemia de dengue ocurrida en Santiago de Cuba en 1997. La negatividad y positividad de los controles se evaluaron mediante las técnicas de inhibición de la hemaglutinación (IH) y el MAC ELISA del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK) de Cuba, centro de referencia nacional para dengue. Todos los sueros resultaron negativos al antígeno de superficie de la hepatitis B y no presentaron anticuerpos a VIH ni Hepatitis C.

3.7- Antígeno.

Se empleó una mezcla que contenía los 4 serotipos de los virus dengue, cada uno a 16 Unidades Hemaglutinantes (UH) obtenidos por el método de sacarosa-acetona a partir de cerebro de ratones lactantes inoculados con las cepas patrones Dengue1 (Hawai), Dengue 2 (Nueva Guinea C), Dengue 3 (H-87) y Dengue 4 (H-241).

3.8- Anticuerpo monoclonal anti dengue biotinilado (AcM/B).

Fue empleado un anticuerpo monoclonal anti-complejo dengue (isotipo IgG 1), purificado por cromatografía de afinidad utilizando una columna de Proteína A - Sepharosa CL 4B, el cual se unió a biotina, empleando el agente Biotinamidocaproate N-hidroxysuccinimide ester.

3.9- Conjugado de estreptavidina / fosfatasa alcalina.

La estreptavidina, se conjugó con la fosfatasa alcalina EIA-grado I (Boehringer Mannheim GmbH, W. Alemania) mediante el método del glutaraldehído en un solo paso (*Tijssen, 1985*).

3.10- Sustrato fluorigénico.

Se empleó una solución concentrada (0,5 mM) de 4-metilumbeliferil fosfato (Koch Light Ltd. Haverhill, Suffolk, Gran Bretaña). Como diluyente del sustrato se usó dietanolamina 1M, pH 9,8 (Merck, Alemania)

3.11- Equipamiento.

Para el lavado de las placas de reacción se empleó el lavador MW-2001 y para la lectura de la fluorescencia el lector Fotómetro-Fluorímetro PR 521, equipos de la tecnología SUMA[®].

3.12- Condiciones de elución para muestras de sangre seca.

Las condiciones óptimas de elución del analito de interés a partir de muestras de sangre seca se establecieron tanto para discos de 3 mm como de 5 mm de diámetro, para lo cual se ensayaron como soluciones eluentes el buffer de lavado Tris – HCl (Solución Tampón (R1)) y el Suero de Carnero al 5 % (Suero de Carnero (R2)), los tiempos de elución probados fueron 30 min y 1 hora y las

temperaturas ensayadas fueron 20-25 °C y 37 °C. Para la elución del disco de 3 mm se ensayó el volumen de 40 µL de eluyente, en tanto que para el disco de 5 mm se evaluó la elución con 70 µL. En la determinación de las condiciones de elución adecuadas, fue empleado un panel de 20 muestras: 10 clasificadas como negativas y 10 como positivas a IgM anti-dengue.

3.13- Determinación del nivel de corte.

Para seleccionar el nivel de corte de la prueba en muestras de suero se realizaron las distribuciones de frecuencias correspondientes a los grupos de muestras de donantes de sangre (Panel 3) e individuos con síntomas de enfermedad eruptivo-febril (Panel 2), normalizando la fluorescencia de las muestras con respecto a los controles del ensayo. Asimismo fue verificado el valor de corte del ensayo para muestras de sangre seca, empleando para ello el Panel 5.

3.14- Evaluación de la precisión del ensayo.

Se calculó la precisión intra e interensayo empleando 3 muestras con diferente grado de positividad y una muestra negativa. La prueba se realizó durante cinco días (cuatro placas por día) y se utilizaron dos lotes diferentes de placas, Conjugado y Anticuerpos Biotinilados. Los resultados se expresan como media de la fluorescencia obtenida y coeficiente de variación para cada una de las muestras ensayadas.

3.15- Reproducibilidad.

Para cada muestra utilizada en la evaluación de la precisión del ensayo, se determinó la relación entre el número de veces que resultaron positivas o negativas y el total de veces que fueron evaluadas durante los 5 días de duración de esta prueba. Con estos datos se determinó la reproducibilidad de los resultados del UMELISA DENGUE IgM PLUS.

3.16- Evaluación de la estabilidad de los componentes y el diagnosticador.

Se realizaron las pruebas de estabilidad en condiciones reales de almacenamiento (Estabilidad de anaquel) tanto para los componentes del estuche, como para el diagnosticador en su conjunto; en el caso de éste último se utilizaron para la prueba 3 lotes diferentes de estuches UMELISA DENGUE IgM PLUS.

Estas pruebas se realizaron de acuerdo a lo establecido por el Centro Estatal para el Control de Medicamentos y Diagnosticadores (CECMED).

Los resultados de las pruebas de estabilidad se expresan en cuanto al porcentaje de recuperación para la señal de fluorescencia del suero control positivo del ensayo en cada tiempo estudiado, con respecto a la prueba inicial.

4- RESULTADOS Y DISCUSION.

4.1- Evaluación de la sensibilidad y especificidad.

La evaluación de la sensibilidad y especificidad de la prueba para muestras de suero se realizó tras el análisis en el UMELISA DENGUE IgM PLUS de 624 muestras de suero con resultado definido según la prueba de referencia utilizada, en la cual 110 muestras fueron positivas y 514 negativas. La población de muestras evaluadas comprendió 563 muestras procedentes de individuos con síntomas de enfermedad eruptivo-febril colectadas durante brotes o epidemias de dengue ocurridas en diferentes países del continente americano, incluida Cuba, y 61 muestras de donantes de sangre de Venezuela, Colombia y Cuba. En la tabla 1 se reporta la sensibilidad y especificidad relativa del UMELISA con respecto al MAC-ELISA del IPK.

Tabla 1: Resultados del UMELISA DENGUE IgM PLUS con respecto al MAC-ELISA del IPK.

Total de muestras evaluadas	624
Positivas por ambas pruebas	107
Negativas por ambas pruebas	501
Positivas por UMELISA - Negativas por MAC-ELISA	13
Negativas por UMELISA - Positivas por MAC-ELISA	3

Resultados:

Sensibilidad: 97,27 %

Especificidad: 97,47 %

Se obtuvo muy buena concordancia entre los resultados del UMELISA y la prueba de referencia, con un índice kappa de 0,91. De las 13 muestras falsas positivas 2 correspondieron a donantes de sangre y el resto a individuos con síntomas de enfermedad eruptivo-febril colectadas durante brotes o epidemias de dengue; en tanto que las 3 falsas negativas correspondieron a este último grupo de muestras. Los niveles de sensibilidad y especificidad alcanzados avalan el empleo de esta prueba para los fines con que fue diseñada, o sea, para realizar el diagnóstico de dengue en muestras procedentes de individuos con sospecha de la enfermedad, contribuyendo de esta forma a la vigilancia epidemiológica de la misma.

Para la evaluación de la sensibilidad y especificidad de la prueba en muestras de sangre seca se empleó como referencia el resultado de la muestra de suero integrante del par. De las 619 muestras analizadas (468 muestras pareadas de suero y sangre seca procedentes de donantes de sangre y 151 muestras pareadas de suero y sangre seca colectadas durante una epidemia de dengue), 27 resultaron positivas tanto en suero, como en papel de filtro, para una sensibilidad de 100 % y 592 muestras fueron verdaderas negativas, arrojando un 100 % de especificidad de la prueba para este tipo de muestra, con respecto a sus homólogos en suero, empleadas como referencia (Tabla 2).

Tabla 2: Sensibilidad y especificidad clínicas. Muestras de sangre seca.

	Suero POS	Suero NEG	Total
PF POS	27 (VP)	0 (FP)	27
PF NEG	0 (FN)	592 (VN)	592
Total	27	592	619

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FN}} \times 100 = 100 \%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FP}} \times 100 = 100 \%$$

La especificidad del nuevo ensayo fue evaluada también en una población de donantes de sangre, que por tratarse de muestras procedentes de una población supuestamente sana, sus resultados son de inestimable valor en la evaluación de este parámetro. Para el análisis se utilizaron los resultados de 1416 sueros procedentes de donantes de sangre, de los cuales nueve fueron positivos en el UMELISA DENGUE IgM PLUS. Las muestras positivas se evaluaron en la prueba de referencia y los resultados se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3: Evaluación de la especificidad del ensayo en donantes de sangre.

Número de muestras evaluadas	Positivas por UMELISA y MAC-ELISA	Positivas por UMELISA y Negativas por MAC-ELISA	Especificidad UMELISA (%)
1 416	7	2	99,5

Las 7 muestras verdaderas positivas encontradas en la población supuestamente sana de donantes de sangre puede deberse a que tal y como se ha reportado, la respuesta de IgM anti- dengue en algunos individuos puede mantenerse durante varios meses a niveles detectables por los inmunoensayos.

En la actualidad el diagnóstico del dengue está dirigido principalmente a la vigilancia epidemiológica y es una necesidad urgente el contar con métodos que permitan un diagnóstico temprano de la enfermedad y en consecuencia, la toma de medidas terapéuticas adecuadas para el tratamiento y control del paciente. Se necesitan entonces métodos sensibles, específicos, rápidos y

baratos, que permitan por una parte el diagnóstico etiológico en el paciente y por otra brindar un pronóstico de la enfermedad. El sistema debe tener la sensibilidad y especificidad adecuadas para identificar en forma correcta a los individuos con la enfermedad en cuestión y excluir eficientemente a los que no la tengan. Los niveles de sensibilidad y especificidad alcanzados por el UMELISA DENGUE IgM PLUS tanto para muestras de suero, procedentes en su mayoría de individuos con sospecha de infección por dengue, como de sangre seca avalan el empleo de esta prueba para fines de vigilancia epidemiológica y diagnóstico de dengue. La evaluación de la especificidad del sistema con muestras de donantes de sangre, en las cuales la presencia de anticuerpos IgM anti-dengue es muy baja o casi nula; demuestran la superioridad cualitativa de este ensayo con respecto a la prueba que se venía utilizando anteriormente para estos fines.

El uso de buenas herramientas para el diagnóstico del dengue es de vital importancia para el cuidado clínico del paciente, como soporte de la vigilancia epidemiológica, para la confirmación de casos, para diferenciar el dengue de otras enfermedades tales como la leptospirosis, la rubéola, y otras infecciones por flavivirus, y para el manejo clínico y evaluación de los pacientes con la enfermedad severa.

4.2- Reactividad de la prueba en muestras procedentes de diferentes países de la región.

Se evaluaron en el ensayo 1713 muestras de suero (Tabla 4) procedentes de individuos con síntomas de enfermedad eruptivo-febril, que provienen de regiones donde el dengue es endémico, algunas de las cuales se encontraban en situación de brote o epidemia; por lo que se espera que la incidencia de reactividad entre ellas sea alta. Asimismo fue evaluada una población de donantes de sangre donde se encontró en general un bajo índice de reactividad. Todas estas muestras fueron colectadas en diferentes países de América que podrían ser usuarios de esta prueba en el futuro y donde co-circulan otros flavivirus, como el de la fiebre amarilla y la encefalitis de San Luis, por lo que resulta de gran utilidad observar el comportamiento de la prueba en ellas, dada la reactividad cruzada compleja específica existente en la respuesta inmune a los diferentes miembros de esta familia.

Tabla 4: Reactividad en muestras de diferentes países de América

País de procedencia	Muestras de donantes de sangre			Muestras de individuos con síntomas de enfermedad eruptivo-febril		
	N	Reacti-vas	%	N	Reacti-vas	%
Colombia	94	4	4,25	48	25	52,08
Venezuela	324	3	0,93	107	15	14,02
México	-	-	-	37	5	13,51
Brasil	-	-	-	285	140	49,12

El Salvador	-	-	-	56	25	44,64
Ecuador	-	-	-	16	8	50,00
Cuba	998	2	0,20	1 164	319	27,40
TOTAL	1 416	9	0,63	1 713	537	31,35

N: Número de muestras

?: Porcentaje de reactividad

Todas las muestras que resultaron reactivas, pertenecientes a donantes de sangre, fueron evaluadas en la prueba de referencia, en la cual siete de las nueve reactivas resultaron también positivas. Se observa que en las procedentes de Colombia es donde se alcanza el mayor porcentaje de reactividad para donantes de sangre, siendo clasificadas la totalidad de estas muestras como verdaderas positivas al exhibir este resultado también en la prueba del IPK, en tanto que, dentro de las tres reactivas de Venezuela se encuentran las dos muestras positivas por UMELISA y negativas por el MAC-ELISA de referencia que determinan el nivel de especificidad alcanzado en esta población. Los dos resultados reactivos detectados entre la población de donantes de sangre cubanos fueron clasificados como verdaderos por la referencia.

En el grupo de muestras procedentes de individuos con sintomatología de enfermedad eruptivo-febril los mayores porcentajes de reactividad se observan en las muestras de Colombia, Ecuador, Brasil y El Salvador, seguidos por Cuba, Venezuela y México; ello puede estar determinado por el momento de la epidemia o brote en que fueron colectados estos sueros, si al inicio o final, o en los días cercanos al pico de incidencia. De cualquier modo, atendiendo al comportamiento del ensayo en la población supuestamente sana de donantes de sangre y a la comparación de estos resultados en su totalidad con los alcanzados por la prueba que venía siendo empleada y cuya especificidad debía ser superada; podemos afirmar que se ha logrado desarrollar una prueba que manteniendo los niveles de sensibilidad del ensayo precedente, alcanza elevados índices de especificidad.

4.3- Condiciones de elución para muestras de sangre seca.

Las condiciones óptimas de elución de las muestras de sangre seca se fijaron durante 1 hora a 20-25 °C, empleando como solución eluente Suero de Carnero al 5 %, el mismo diluyente de las muestras de suero. Es posible emplear tanto discos de 3 mm como de 5 mm de diámetro.

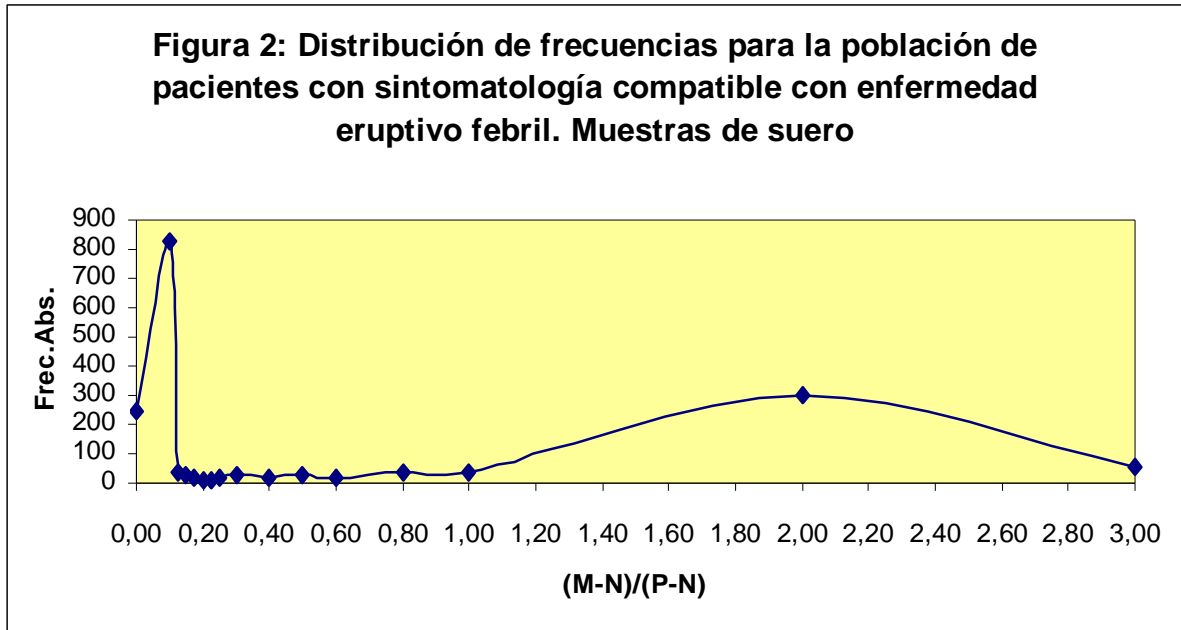
4.4- Determinación del nivel de corte del ensayo.

Se realizaron las distribuciones de frecuencias para ambas poblaciones (pacientes con sintomatología compatible con enfermedad eruptivo-febril (Figura 2) y donantes de sangre (Figura 3)), normalizando la fluorescencia de las muestras con respecto a los controles del ensayo.

En la figura 2 se observa el comportamiento claramente definido de dos grupos de muestras, correspondientes a las poblaciones de negativos y positivos del

grupo de muestras de suero procedentes de individuos con sintomatología compatible con enfermedad eruptivo-febril.

Formaron parte de esta distribución las muestras evaluadas en el MAC-ELISA del IPK, las cuales contribuyeron en gran medida a la definición de $0,225 \times (P-N) + N$ como nivel de corte del ensayo, ya que se garantizó que la mayoría de las muestras clasificadas como positivas por la prueba de referencia quedaran por encima del valor de corte seleccionado, lo cual asegura adecuados niveles de sensibilidad y especificidad para el UMELISA DENGUE IgM PLUS.



La distribución de frecuencias con respecto a la población de donantes de sangre (Figura 3), corrobora la decisión anterior en cuanto al valor de corte de la prueba; se obtiene una distribución en la cual el 99,36 % de las muestras de suero (Tabla 5) se encontraron por debajo del valor de corte seleccionado ($0,225 \times (P-N) + N$), en tanto que nueve muestras se encontraron por encima del mismo, de ellas siete resultaron también positivas en la prueba de referencia utilizada.

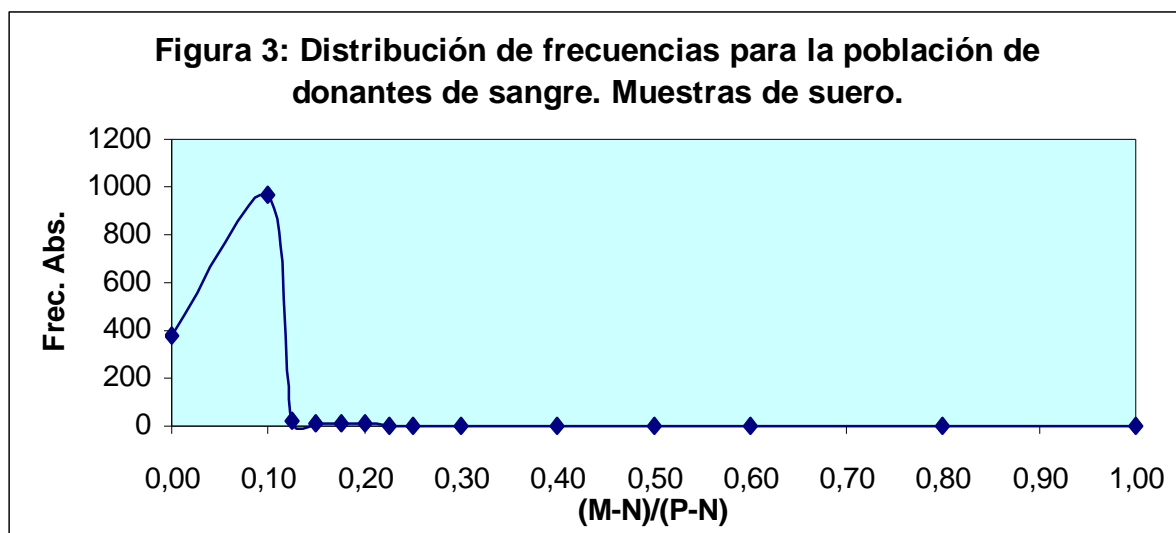


Tabla 5: Distribución de frecuencias para la población de donantes de sangre (muestras de suero). Determinación del valor de corte.

FI muestra/FI Control Positivo	Frec. Abs.	Frec.Acum.	Frec.Rel.Ac.
0,000	381	381	26,91
0,100	968	1 349	95,27
0,125	27	1 376	97,18
0,150	17	1 393	98,38
0,175	9	1 402	99,01
0,200	5	1 407	99,36
0,225	0	1 407	99,36
0,250	0	1 407	99,36
0,300	1	1 408	99,44
0,400	2	1 410	99,58
0,500	2	1 412	99,72
0,600	1	1 413	99,79
0,800	1	1 414	99,86
1,000	1	1 415	99,93
2,000	1	1 416	100

Leyenda:

FI: Fluorescencia (Unidades de fluorescencia)

Frec. Abs.: Frecuencia Absoluta

Frec.Acum.: Frecuencia Acumulada

Frec.Rel.Ac.: Frecuencia Relativa Acumulada

Según los resultados alcanzados con las muestras de sangre seca podemos concluir que no es necesario variar el nivel de corte de la prueba para este tipo de muestras, ya que se distribuye de manera muy similar a sus homólogos en

suero, tanto para la población de donantes de sangre (Fig.4) como para la de muestras procedentes de la vigilancia epidemiológica (Fig.5). En el caso de las primeras el 97,8 % de la población se encuentra por debajo del nivel de corte establecido $(0,225 (P-N) + N)$, en tanto que en el segundo grupo este requisito es cumplimentado por el 92,7 % de los casos estudiados. Las muestras de sangre para ambas poblaciones siguieron una distribución muy similar a las de suero. Se aplicó para el análisis el test estadístico F de Fisher para comparación de pendientes, demostrándose que con un 95 % de confianza su valor no difiere significativamente de 1 en cada una de las poblaciones estudiadas. Queda demostrado además que las distribuciones analizadas no presentan diferencias significativas para un 95 % de confianza, aplicando el estadígrafo chi cuadrado. Esto evidencia que los resultados del ensayo continúan siendo seguros y confiables independientemente de que se evalúen muestras de sangre seca, en lugar de suero.

Figura 4: Distribución de frecuencias para muestras de suero y sangre seca. Donantes de sangre.

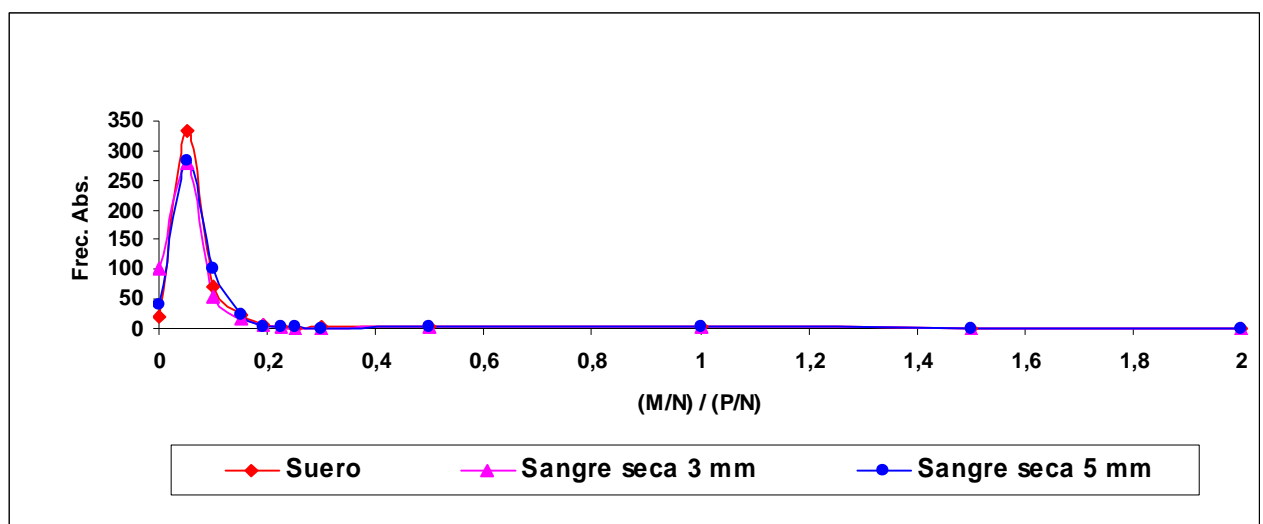
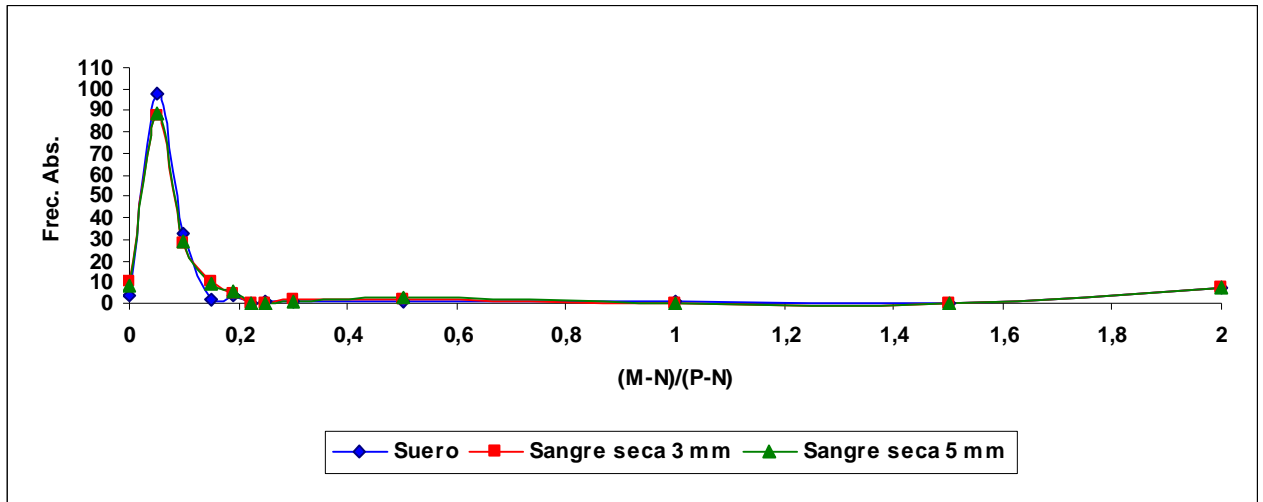


Figura 5: Distribución de frecuencias para muestras de suero y sangre seca. Vigilancia epidemiológica.



Se llevó a cabo también un análisis del comportamiento de las muestras reactivas en el ensayo, para las cuales, al aplicar las pruebas estadísticas antes señaladas, tampoco se observaron diferencias significativas entre sus niveles de positividad. independientemente del tipo de muestra empleada. En las Figuras 6 y 7 se presenta el comportamiento de algunas de estas muestras en suero y sangre seca.

Figura 6: Comportamiento de muestras reactivas de donantes de sangre en suero y sangre seca.

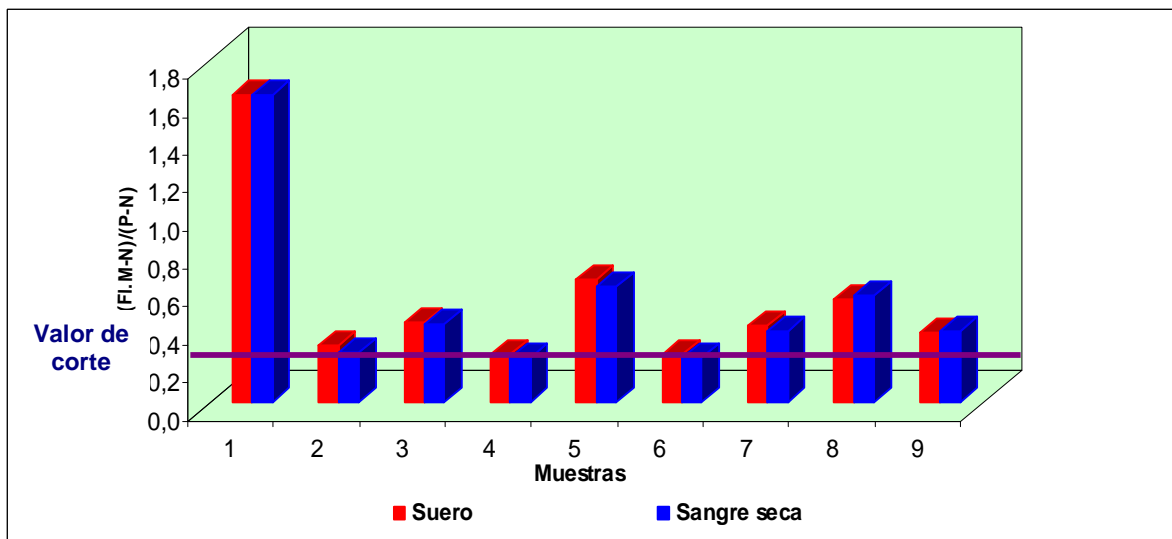
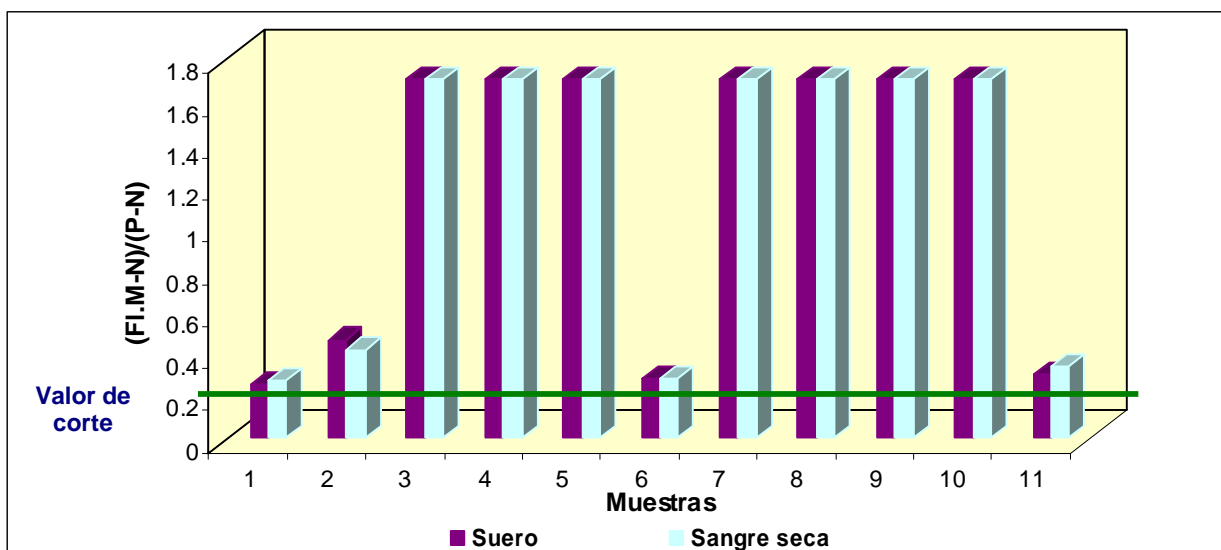


Figura 7: Comportamiento de muestras reactivas de vigilancia epidemiológica en suero y sangre seca.



4.5- Evaluación del comportamiento de diferentes grupos de muestras en el ensayo.

Con el objetivo de comprobar la robustez de la prueba y su comportamiento frente a muestras que pueden interferir en la especificidad de la misma, fueron evaluadas en el ensayo un grupo de muestras, que por sus características, pueden ser fuente de resultados adversos en cualquier inmunoensayo, ya que provocan reacciones inespecíficas en los mismos. Se evaluaron también un grupo de muestras que pueden interferir directamente en la especificidad de los ensayos de captura de IgM para dengue, ya que pueden presentar altas concentraciones de IgM a otros agentes infecciosos como el virus de la hepatitis A, el virus de la influenza y el de la fiebre amarilla (FA), que como se conoce, en el caso de este último, es un virus perteneciente a la familia *Flaviviridae* al igual que el virus del dengue y se reporta la posible ocurrencia de reacción cruzada entre los miembros de esta familia. La Tabla 6 muestra los resultados de la evaluación de estas muestras tanto en el ensayo desarrollado; como en el precedente.

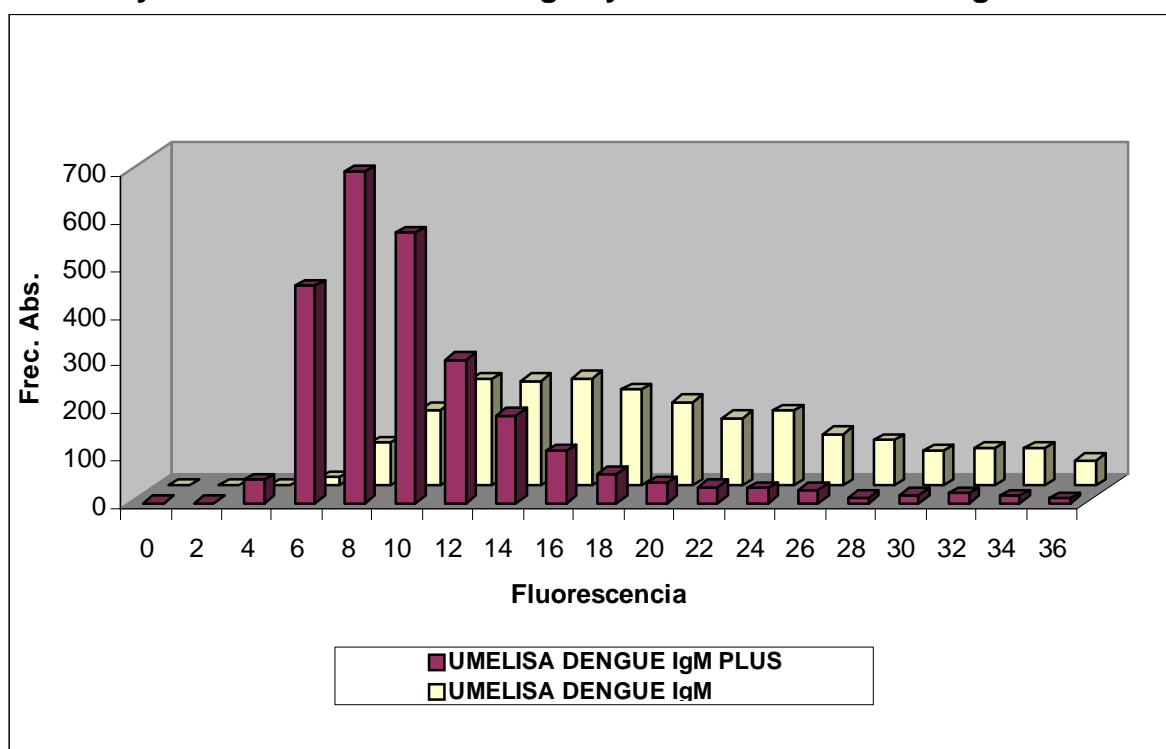
Tabla 6: Comportamiento de diferentes grupos de muestras en el UMELISA DENGUE IgM PLUS y el UMELISA precedente.

Tipo de Muestras	Número de muestras analizadas	Reactivas UMELISA DENGUE IgM PLUS	Reactividad (%)	Reactivas UMELISA DENGUE IgM	Reactividad (%)
Hemolíticas	15	0	0	1	6,7
Lipémicas	20	2	10,0	2	10,0
Ictero	20	0	0	1	5,0
Múltiparas	37	0	0	2	5,4
Factor reumatoideo	18	1	5,55	1	5,55
Contaminadas por m.o	52	0	0	6	11,5
Altas concentraciones de inmunoglobulinas	36	0	0	5	13,9
Individuos con anticuerpos IgM a hepatitis A	20	0	0	2	10,0
Individuos con infección confirmada por Influenza (fase convaleciente)	10	0	0	2	20
Individuos sanos vacunados contra Fiebre Amari-lla, con IgM contra FA	10	1	10	2	20
TOTAL	238	4	1,68	24	10,08

Estos resultados confirman las ventajas analíticas que en cuanto a especificidad se logran con el nuevo ensayo para detección de anticuerpos IgM al virus del Dengue, en el cual se obtienen sólo cuatro resultados positivos falsos dentro de las 238 muestras evaluadas, 6 veces menos que en el ensayo precedente, siendo las lipémicas las que mayoritariamente inciden en el mismo, seguido por las muestras con factor reumatoideo junto a las procedentes de individuos vacunados contra FA que presentan anticuerpos IgM a este agente; resultados similares a este último han sido encontrados en otros estudios y se deben a la reactividad cruzada complejo específico presente en los anticuerpos IgM que se levantan contra los diferentes flavivirus.

En la Figura 8 se muestra el comportamiento diferente de la fluorescencia de alrededor de 2000 muestras negativas en uno y otro ensayo. Se observa cómo la mayoría de las muestras negativas en el UMELISA DENGUE IgM presentan valores de fluorescencia que oscilan entre 12 y 26 unidades, en tanto que para el UMELISA DENGUE IgM PLUS, exponen valores que se hallan mayoritariamente entre 6 y 12 unidades de fluorescencia (UF), encontrándose un pequeño grupo de 185 muestras entre 12 y 14 UF. Estos resultados hablan a favor de la característica de bajo nivel de fondo (background) del UMELISA DENGUE IgM PLUS con respecto al ensayo anterior, lo cual incide directamente en los elevados niveles de especificidad alcanzados por esta prueba.

Figura 8: Comportamiento de la fluorescencia de muestras negativas en los ensayos UMELISA DENGUE IgM y UMELISA DENGUE IgM PLUS.



4.6- Precisión.

Los valores de coeficientes de variación intra e interensayo obtenidos para las muestras con diferentes grados de positividad fueron inferiores al 10 %, lo que concuerda con los criterios de calidad establecidos para este tipo de ensayo. En el caso de la muestra negativas, los coeficientes de variación exceden el 10 %, debido a que se trata de una muestra que presenta muy bajos valores de fluorescencia y cualquier pequeña variación en estos incide en su precisión, por tanto, para ella, los valores de coeficiente de variación especificados no deben exceder el 20 %. Los resultados se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7: Precisión del UMELISA DENGUE IgM PLUS.

Muestras	Precisión Interensayo		Precisión Intraensayo	
	UF	C.V.%	UF	C.V.%
Negativo	5,28	18,75	5,62	14,22
Positivo Bajo	65,12	7,09	63,29	5,87
Positivo Medio	104,06	7,24	98,33	4,32
Positivo Alto	137,99	6,18	135,81	4,98

UF: Unidades de Fluorescencia (Media)

CV: Coeficiente de Variación

4.7- Reproducibilidad.

Las muestras estudiadas presentaron elevados porcentajes de reproducibilidad en sus resultados todas las veces que fueron analizadas (Tabla 8), lo cual avala la calidad del ensayo para los fines que se persiguen: vigilancia y diagnóstico de dengue.

Tabla 8: Reproducibilidad del ensayo

Muestras	% de Reproducibilidad de resultados por días					(% Reprod. Interdías)
	1	2	3	4	5	
Negativo	100	100	100	100	100	100
Positivo Bajo	100	100	95,2	94,8	100	98,0
Positivo Medio	100	100	100	100	100	100
Positivo Alto	100	100	100	100	100	100

4.8- Evaluación de la estabilidad de los componentes y el diagnosticador.

Las pruebas de estabilidad de los componentes en condiciones reales de almacenamiento se realizaron a los anticuerpos biotinilados y el conjugado estreptavidina/fosfatasa alcalina, que son los reactivos de nueva introducción en el ensayo, la prueba se realizó durante 14 meses y se llevó a cabo simultáneamente a 2 lotes de cada reactivo en evaluación. En la tabla 9 se presentan los resultados generales, en cuanto a porcentaje de recuperación para la señal de fluorescencia del suero control positivo, obtenido para cada componente.

Para la evaluación de la estabilidad se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de calidad:

- Fluorescencia del Control Positivo (CP) en cada tiempo estudiado.
- Porcentaje de recuperación de la señal de fluorescencia del CP en cada tiempo estudiado. Para ello se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de Recuperación} = \frac{\text{Fluorescencia CP (Tiempo en estudio)}}{\text{Fluorescencia CP (Tiempo inicial)}} \times 100$$

Tabla 9. Resultados obtenidos en el Estudio de Estabilidad de los componentes: R6: Anticuerpos Biotinilados y R7: Conjugado del UMELISA DENGUE IgM PLUS.

Tiempo de evaluación	Anticuerpos biotinilados				Conjugado			
	Lote 1		Lote 2		Lote 1		Lote 2	
	UF	R (%)	UF	R (%)	UF	R (%)	UF	R (%)
Inicial	152,33	-	143,25	-	133,19	-	139,32	-
1 mes	147,21	96,6	145,18	100	135,04	100	133,21	95,6
3 meses	142,15	93,3	148,76	100	131,27	98,5	140,06	100
5 meses	149,62	98,2	130,60	91,2	128,86	96,7	135,82	97,5
8 meses	137,02	89,9	137,91	96,3	125,46	94,2	129,73	93,1
10 meses	140,23	92,1	141,36	98,8	129,33	97,1	127,48	91,5
12 meses	138,83	91,1	132,16	92,2	124,49	93,4	132,56	95,1
14 meses	136,31	89,5	130,12	90,8	125,16	94,0	130,88	93,9

Leyenda:

UF: Unidades de Fluorescencia del CP.

R(%): Porcentaje de Recuperación de la señal de fluorescencia del CP.

Para estos componentes se obtuvieron porcentajes de recuperación superiores al 80 %, que es el valor límite aprobado para este tipo de estudio y según los resultados, los reactivos evaluados se mantienen estables en condiciones de almacenamiento entre 2 – 8 °C por el período aprobado de 12 meses.

La evaluación de la estabilidad del diagnosticador en condiciones de almacenamiento (entre 2 - 8 °C) se llevó a cabo para 3 lotes de estuches conformados durante un período de 14 meses. Tal y como se observa en la tabla 10, todos los lotes mostraron porcentajes de recuperación, para la señal de fluorescencia del suero control positivo, superiores al 90 %; lo que indica que el diagnosticador se mantiene estable por un período aprobado de 12 meses.

Tabla 10: Estabilidad del diagnosticador en condiciones reales de almacenamiento. UMELISA DENGUE IgM PLUS

Lotes estudiados	Estabilidad 14 meses (%Recup. CP)
01	95,8
02	94,6
03	94,1

4.9- Resultados de las evaluaciones y desempeño del UMELISA DENGUE IgM PLUS.

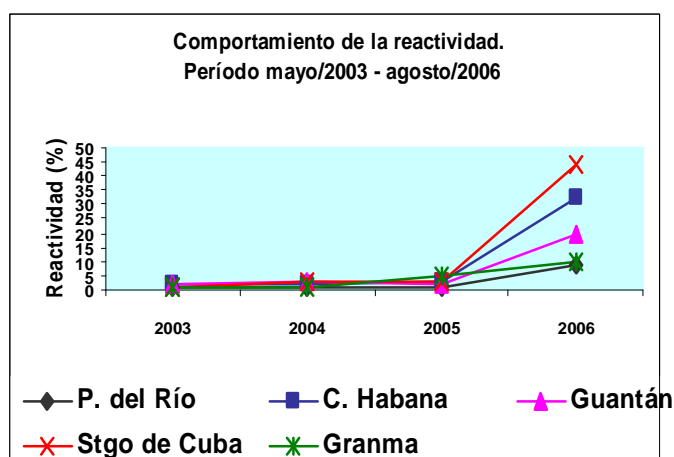
El UMELISA DENGUE IgM PLUS fue introducido en la red nacional de vigilancia de dengue desde mayo del 2003 y durante los primeros meses de su empleo llevamos a cabo el monitoreo de la reactividad alcanzada en algunos de los diferentes laboratorios instalados en el país (Tabla 11), comportándose la misma de manera homogénea en todos ellos y de acuerdo a los resultados esperados.

Tabla 11. Reactividad alcanzada en la Vigilancia Epidemiológica de Dengue en Cuba. UMELISA DENGUE IgM PLUS. (mayo-dic./2003)

Laboratorio de vigilancia	Muestras procesadas	Muestras reactivas	Reactividad (%)
P. del Río	708	10	1,41
C. Habana	4480	82	1,83
Guantánamo	561	11	1.96
S. de Cuba	1156	11	1,05
Granma	435	6	1,42
TOTAL	7340	120	1,63

Ampliando los datos presentados en la tabla anterior, en la figura 9 se presentan los resultados del desempeño del UMELISA DENGUE IgM PLUS alcanzados en algunos de los Centros Provinciales de Higiene y Epidemiología (CPHE) del país desde su introducción hasta agosto del 2006.

Figura 9: Desempeño del UMELISA Dengue IgM PLUS en los CPHE.



Tal y como se presenta en estos resultados, la reactividad de la prueba se mantuvo dentro de los parámetros esperados durante los años 2003 al 2005, el aumento de la misma en el 2006 ha estado relacionado al evento epidemiológico en que nos encontramos actualmente y se ha debido a un incremento en el número de muestras positivas a IgM anti-dengue procesadas y no a que el estuche haya presentado problemas en su especificidad. Constituye la prueba, por tanto, un eficiente termómetro para alertar a las autoridades de salud del momento en que se hace necesario reforzar las medidas de control para evitar la propagación de la enfermedad, cumpliendo de esta manera con uno de los objetivos principales para los que fue diseñada: llevar a cabo la vigilancia epidemiológica del dengue.

En la tabla 12 se presentan de manera resumida los resultados de las evaluaciones realizadas al UMELISA Dengue IgM PLUS tanto nacionales como internacionales, mostrando en todos los casos adecuados niveles de sensibilidad y especificidad, y muy buena concordancia con las pruebas de referencia empleadas.

Tabla 12: Resultados de las evaluaciones realizadas al UMELISA Dengue IgM PLUS.

Centro Evaluador	Resultados		
	Sensibilidad	Especificidad	Concordancia (Indice Kappa)
Cuba. 2002 Laboratorio de Enfermedades Infecciosas Centro de Inmunoensayo	97,3 %	97,5 %	Muy Buena (0,910)
México. 2002 Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE).	98,7 %	94,2 %	Muy Buena (0,892)
Cuba. 2003 Laboratorio de Arbovirus, Departamento de Virología, Centro Colaborador de la OMS/OPS para el Estudio de Enfermedades Víricas. Instituto "Pedro Kourí"	99,4 %	94,8 %	Muy Buena (0,924)

En la evaluación realizada en el Centro de Inmunoensayo se emplearon como muestras un panel de 624 muestras de suero procedentes en su mayoría de individuos con síntomas de enfermedad eruptivo-febril residentes en Cuba, Brasil, Venezuela, Colombia y México. La prueba de referencia fue el MAC-ELISA del Instituto "Pedro Kourí" (IPK), centro de referencia nacional de dengue en Cuba.

En la validación llevada a cabo por el INDRE, México, se utilizó un panel de 250 muestras de suero procedentes del banco de muestras biológicas del INDRE adecuadamente caracterizadas por el CDC de Puerto Rico.

En la evaluación que realizó el centro de referencia nacional de dengue (IPK) al UMELISA Dengue IgM PLUS se empleó un panel de 275 muestras de suero pertenecientes a las siguientes categorías:

- Sueros positivos de anticuerpos IgM a hepatitis A.
- Sueros (fase convaleciente) de individuos con una infección confirmada por Influenza.
- Sueros recibidos a través de la vigilancia nacional de dengue, todos con resultado negativo en la prueba de referencia.
- Sueros positivos y negativos de anticuerpos IgM a dengue, procedentes de las epidemias de Santiago de Cuba (1997) y Ciudad de la Habana (2001).

- Sueros de personas sanas vacunadas contra Fiebre Amarilla, que presentan anticuerpos IgM a Fiebre Amarilla.

Como referencia se empleó el MAC-ELISA del propio Instituto "Pedro Kourí" (IPK), centro de referencia nacional de dengue en Cuba.

Tal y como se observa, los resultados alcanzados en los diferentes laboratorios evaluadores fueron bastante similares y en todos los casos se logran elevados niveles de sensibilidad y una adecuada especificidad, propiedades que deben caracterizar a las pruebas que se emplean para la realización de pesquisajes masivos. Los resultados alcanzados en la evaluación realizada por el Instituto "Pedro Kourí" son de inestimable valor por cuanto esta institución constituye el centro de referencia nacional para dengue y por tanto cotidianamente evalúa el desempeño del UMELISA al llevar a cabo la confirmación de los casos positivos detectados con su empleo. Los resultados de esta evaluación inicial fueron entonces un anticipo de lo que ocurriría más adelante durante la vigilancia cotidiana del dengue en el país y de acuerdo a los datos mostrados en la tabla 11 y figura 9 ha quedado demostrada la mantención de los niveles de sensibilidad y especificidad alcanzados por el UMELISA inicialmente.

En el 2002 se llevó a cabo la evaluación de diferentes pruebas comerciales para Dengue por parte del Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (INDRE) de México; en la cual fue presentado el UMELISA Dengue IgM PLUS junto a otros ensayos comerciales procedentes en su mayoría de países del primer mundo (Tabla 13). Según los resultados alcanzados, el UMELISA se sitúa en uno de los primeros lugares en cuanto a sus resultados, ya que sin descuidar la especificidad alcanza elevados niveles de sensibilidad, al contrario de PanBio, BioRad o Chemicon que ostentan 100 % de especificidad, pero su sensibilidad cae al 93,6 %, o como Inmunolab. que alcanza un 100 % de sensibilidad; pero en total detrimento de su especificidad (14,3 %). Esta vez queda demostrado en el plano internacional la superior calidad del ensayo desarrollado.

Tabla 13: Resultados de la evaluación de diferentes pruebas comerciales para Dengue IgM. México, 2002. INDRE.

Prueba Comercial evaluada	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Dengue IgM (PANBIO)	93,6	100
Dengue IgM (BioRad)	93,6	100
Dengue IgM (Chemicon)	93,6	100
Dengue IgM (INMUNOLAB)	100	14,3
Dengue IgM (OMEGA)	85,9	96,5
Dengue IgM (Biosimex)	98,7	93,6
Dengue IgM PLUS (TecnoSuma)	98,7	94,2

5- IMPORTANCIA SOCIAL Y ECONÓMICA.

Dada la emergencia y reemergencia del dengue y la FHD, su diagnóstico se convierte en un objetivo de primer orden para cualquier país, por lo que resulta indispensable el desarrollo de sistemas de vigilancia para su prevención y control, en los que la confirmación del laboratorio ocupa un papel prioritario, ya que puede brindar información temprana y precisa a las autoridades de salud, lo que favorece la toma inmediata y oportuna de las medidas adecuadas para evitar la propagación de la enfermedad.

Contar con una prueba de factura nacional para el pesquisaje primario de dengue en el sistema de vigilancia nacional y que además posea las características de ser un método sensible, específico, rápido y barato, que permita por una parte el diagnóstico etiológico en el paciente y por otra brindar un pronóstico de la enfermedad; ha permitido realizar, desde su introducción hasta agosto del 2006, 471 754 pruebas de dengue, lo que ha constituido para el país un ahorro de cerca de 1.9 millones de dólares por concepto de sustitución de importaciones, teniendo en cuenta los precios a que se venden estos diagnosticadores en el mercado internacional. Además ha permitido contar con la garantía de una adecuada, confiable e ininterrumpida vigilancia de la enfermedad, por ejemplo; en la situación epidemiológica en que nos encontramos en estos momentos, en el Centro Provincial de Higiene y

Epidemiología de Ciudad de la Habana han sido procesadas, en los meses, de junio, julio y agosto, más de 33 000 muestras con el UMELISA Dengue IgM PLUS, lo cual ha permitido el monitoreo constante de la situación y la toma de medidas inmediatas para controlar la transmisión de la enfermedad.

Por otra parte, el UMELISA DENGUE IgM PLUS cuenta con registros sanitarios en diferentes países de la región, como Argentina, Colombia, Venezuela, México, Bolivia y Brasil (ver anexos). La exportación del estuche a dichos países ha permitido el ingreso de más de 650 000 dólares a la economía nacional, producto de la venta de más de 850 000 determinaciones.

Uno de los aspectos más importantes y menos estudiados en las epidemias de dengue ha sido su costo. Las afectaciones económicas en un país que sufre un proceso de esta naturaleza son cuantiosas, tanto en lo referente a los gastos incurridos en el tratamiento de los pacientes y en el control de la epidemia, como a la cantidad de bienes materiales que se dejan de producir por afectación de la masa trabajadora.

La epidemia de dengue que afectó a nuestro país en el verano de 1981 ha sido catalogada por varios autores como una de las mayores registradas desde que se describió esta enfermedad por Hammon en 1956 y fue la primera de su tipo ocurrida fuera del sudeste asiático y pacífico occidental. Su costo económico para el país fue estimado en más de 103 millones de dólares; 38,8 de ellos correspondientes a gastos de hospitalización, 43 a la campaña antivectorial, 14 a valores dejados de producir, entre otros, sin contar con el irrecuperable e inigualable costo humano debido a las vidas que se pierden durante el azote de una epidemia de dengue.

Teniendo en cuenta el impacto económico-social que provoca una epidemia de dengue es que deben aumentarse los esfuerzos para prevenirla, donde la disponibilidad de pruebas efectivas y confiables para su diagnóstico juegan un papel indispensable, pues permite tomar oportunamente las medidas necesarias para el control de la enfermedad y su transmisión; lo cual indudablemente minimiza los daños económicos y la pérdida de vidas humanas. No obstante, la adopción de medidas efectivas para el control del vector son las únicas capaces de evitar las epidemias.

6- CONCLUSIONES.

- El ensayo normalizado permite disponer de una prueba para la detección de anticuerpos de la clase IgM específicos al virus del dengue, lo cual es de esencial importancia para la vigilancia epidemiológica, el correcto seguimiento de una epidemia o brote de dengue y convierte a la prueba además en un valioso instrumento de apoyo al diagnóstico clínico de la enfermedad.
- Para el nivel de corte fijado ($0,225 \times (P-N) + N$) se han obtenido valores de sensibilidad y especificidad por encima de 97% y 94% respectivamente en todas las validaciones realizadas, lo que representa

una mejoría significativa, en cuanto a especificidad, con respecto al ensayo que se venía empleando anteriormente.

- En el ensayo normalizado se produce una disminución en la reactividad de las muestras que habitualmente interfieren en los inmunoensayos, con respecto al ensayo anterior, lo cual incide directamente en los elevados niveles de especificidad alcanzados por esta prueba.
- Tanto el diagnosticador en su conjunto, como los componentes que lo integran son estables 14 meses conservados en condiciones adecuadas.
- Se introdujo como otra de las aplicaciones de la prueba su empleo para muestras de sangre seca, quedando establecidas las condiciones de elución para este tipo de muestra.
- Para las muestras de sangre seca se obtuvo 100 % de sensibilidad y especificidad de la prueba, con respecto a sus homólogas en suero y se mantuvo el mismo nivel de corte.
- El desarrollo y generalización del empleo de este diagnosticador ha permitido a la economía nacional el ahorro de cerca de 1,9 millones de dólares por concepto de sustitución de importaciones, al no tener que comprar estos estuches en el mercado internacional; además ha permitido el ingreso de más de 650 000 dólares por la comercialización de la prueba en diferentes países del área.
- Contar con esta prueba, de factura nacional, para el pesquisaje primario de dengue y que además posee las características de ser un método sensible, específico, rápido y barato; garantiza una adecuada, confiable e ininterrumpida vigilancia de la enfermedad en nuestro país.

