

UltramicroELISA de captura para la detección de anticuerpos IgG al dengue (UMELISA-DENGUE IgG).

Carmen Acosta, Regla Herrera, * Raquel López, ** Susana Vázquez,***
Guadalupe Guzmán,*** Laura Calderón .****

Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales, Centro de Inmunoensayo, Apdo 6653. Ciudad Habana. Cuba.

*Laboratorio de Enfermedades Infecciosas. Centro de Inmunoensayo.

**Laboratorio de Purificación de Proteínas. Centro de Inmunoensayo.

***Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Apart. 601. Ciudad Habana. Cuba.

****Instituto Nacional de Salud de Bogotá, Colombia.

Recibido: 16 de junio de 2000

Aceptado: 29 de noviembre del 2002

Palabras clave: dengue, ultramicroELISA, IgM, diagnóstico.

Key words: dengue, ultramicroELISA, IgG, diagnostic.

RESUMEN: En este trabajo se presentan los resultados de la estandarización y evaluación del ultramicroELISA Dengue IgG (UMELISA DENGUE IgG). Con este fin se estudiaron diferentes condiciones para el ensayo, seleccionando como óptimas una concentración de anticuerpos anti-IgG (γ) humana para el recubrimiento de las placas de ultramicroELISA de 10 $\mu\text{g/mL}$ y conjugado anticuerpo monoclonal complejo específico a una dilución de 1/3500. Con las condiciones antes mencionadas se estudiaron 60 pares de muestras procedentes de Colombia colectadas entre los meses de octubre y noviembre de 1992. Todos los sueros fueron evaluados por Inhibición de la Hemaglutinación (IH) y se compararon con los resultados por UMELISA DENGUE IgG; obteniéndose un 91,11 % de sensibilidad y 93,3 % de especificidad. Los resultados de UMELISA DENGUE IgG presentaron una buena correlación con la técnica de IH ($r=0,8699$, $p<0,0001$), y los niveles de IgG pueden ser utilizados en muestras pareadas para distinguir entre infecciones primarias y secundarias con el 78,6 % y 100 % de concordancia respectivamente. En las evaluaciones utilizando muestras con sospecha clínica de dengue provenientes de Cucuta y Medellín empleando como técnica de referencia la IH; la evaluación utilizando el GAC ELISA de Brasil y en la evaluación con muestras remitidas al IPK empleando la IH de dicha institución como referencia, los porcentajes de concordancia fueron de 96,8 %, 97,6 % y 91,7 % respectivamente.

ABSTRACT: In this work we report the results of standardization and validation of ultramicroELISA DENGUE IgG (UMELISA DENGUE IgG) for detection of IgG antibodies. With this purpose were studied different conditions for the assay and were chosen as optimal conditions: a concentration anti-IgG (γ) human, 10 $\mu\text{g/mL}$ and conjugate diluted 1:3500. Under these conditions were analyzed 60 paired sera for the detection of specific IgG antibodies against Dengue virus, obtaining 91,11 % of sensitivity. We compared, these samples analyzed by the UMELISA Dengue whit HAI of the Institute of Tropical Medicine "Pedro Kouri" from Cuba, and Institute National of Salud, from Colombia. The IgG

capture UMELISA showed good correlation with the HAI assay ($r=0,8699$, $p<0,0001$), and IgG level could be used to distinguish between serum paired primary and secondary infection, with 78,6 % of primary infections and 100 % of secondary infections being correctly classified. The agreement of UMELISA Dengue IgG with clinical suspect of dengue infection from Cucuta and Medellín, Colombia, with the evaluation with GAC-ELISA from Brazil, and HI remised sera to Institute of Tropical Medicine "Pedro Kouri" were 96,8 %, 97,6 % and 91,7 % respectively.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha ganado terreno la convicción de que la solución global a diversos problemas de salud solo puede alcanzarse mediante la realización de estudios a escala masiva, dependiendo del desarrollo de métodos de Pesquisaje que estudien a todos los componentes del grupo poblacional.¹

Considerando lo anterior, durante 1980 comenzó en Cuba el desarrollo de una técnica que permitía estudiar un gran número de muestras con el más bajo costo posible y con la cual se podrían compatibilizar las necesidades de un sistema de salud altamente socializado, con las posibilidades de un país en desarrollo. A partir de estos esfuerzos iniciales se desarrolló el Sis-

tema Ultramicroanalítico (SUMA) y las técnicas de ultramicroELISA, en los cuales se combina la extraordinaria sensibilidad de las pruebas de microELISA actuales, con el uso de ultramicrovolúmenes de muestras y reactivos. Teniendo en cuenta la disponibilidad de ambas técnicas, así como los éxitos mostrados por la aplicación del sistema SUMA y las técnicas de ultramicroELISA en la solución de diferentes problemas de salud en el ámbito nacional consideramos que era posible encontrar una respuesta práctica al pesquaje masivo y el diagnóstico del dengue.²

El dengue es uno de los arbovirus más importante en término de morbilidad y mortalidad ya que cerca de 2,5 billones de personas viven en áreas con una alta endemicidad de esta enfermedad. Cada año aparecen mas de un millón de casos.³

La inhibición de la hemaglutinación (IH) es la técnica empleada de forma tradicional para la clasificación de infecciones primarias (incremento gradual moderado del título de los anticuerpos) o secundaria (rápido incremento de los títulos altos).⁴ No obstante la IH presenta limitaciones practicas, encontrándose determinadas fundamentalmente por la necesidad del empleo de muestras pareadas, lo que no contribuye al diagnóstico rápido.

En los años 80, fueron desarrollados los radioinmunoensayos de captura de anticuerpos los cuales fueron remplazados rápidamente por los ensayos inmunenzimáticos (ELISA).^{5,6,7} Algunos de estos ensayos detectan anticuerpos IgM e IgG en suero y son capaces de distinguir en infecciones primarias y secundarias.^{6,7} Aunque estos ensayos solo pueden ser empleados en grandes centros debido a los requerimientos para la preparación de los antígenos de dengue y los anticuerpos contra dengue en sus etapas preliminares. Además, algunos de los pacientes con un diagnóstico presuntivo agudo deben esperar por incubaciones de toda la noche necesarias para la realización de la mayoría de estos ensayos.

En los primeros años de la presente década fue desarrollado un ensayo de captura para la detección de anticuerpos IgM al dengue emplean-

do una tecnología SUMA, con el objetivo de contribuir al diagnóstico y vigilancia epidemiológica de esta enfermedad.⁸

En el presente trabajo exponemos los resultados de la estandarización y evaluación del ultramicroELISA de captura para la detección de anticuerpos IgG al dengue (UMELISA DENGUE IgG) además, se analizan los resultados de la comparación de esta técnica con la técnica de IH y el GAC-ELISA de la Facultad de Medicina de Minas Gerais, Brasil.

MATERIALES Y METODOS

Anticuerpos

Los anticuerpos policlonales contra IgG humana (cadena γ específica) obtenidos en carnero fueron producidos en el Centro de Inmunoensayo, Cuba. Los mismos fueron absorbidos con AH-Sepharosa 4B-IgG de ratón y purificados por cromatografía de afinidad con AH-Sepharosa 4B-IgG humana. Finalmente fueron dializados contra solución salina tamponada con fosfato (SSTF) pH 7,4 y almacenados en la misma solución a -20°C hasta el momento del uso.

El anticuerpo monoclonal empleado fue obtenido en el Instituto de Medicina Tropical, este anticuerpo pertenece a la clase IgG, subtipo IgG1 y es específico al complejo dengue⁹.

Placas recubiertas con anticuerpos

Las placas de ultramicroELISA (8 X 12 tiras) de poliestireno con dióxido de titanio e irradiadas (Greiner Labortechnik, Germany), fueron recubiertas con una solución de tampón carbonato - bicarbonato (10 mM, pH 9,6) a una concentración de 10 μ g/mL de anticuerpos contra IgG (γ) humana e incubadas durante 4 horas a 45°C, finalmente fueron bloqueadas con SSTF conteniendo 0,1 % de seroalbúmina bovina (SAB).

Controles

El control negativo fue obtenido de un donante de sangre del Banco Provincial del municipio Marianao, Ciudad de la Habana, Cuba; mientras que para el control positivo se mezclaron 8 sueros de pacientes

precedentes de Colombia ya que en el año 1993 no se disponía de sueros positivos en el país. La negatividad y positividad de los controles se corroboraron mediante la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación (IH) del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK, Centro de referencia por la OPS en Américas para el Dengue), Cuba.⁸ Todos los sueros resultaron negativos a AgsHB y no presentaron anticuerpos a HIV y HCV.

Antígeno

Los antígenos de Dengue (Den) serotipos 1 al 4 (Den 1 Hawaii, Den 2 N. Guinea, Den 3 H-87 y Den 4 H-241) fueron suministrados por el IPK. Los mismos se obtuvieron por el método de acetona -sacarosa¹⁰. Para ser liofilizados en alícuotas de 500 μ L (conteniendo los 4 serotipos), a 64 unidades hemaglutinantes (U.H).

Conjugado anticuerpo-enzima

Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-complejo dengue (isotipo IgG 1) obtenido en el IPK⁹, el cual se purificó por cromatografía de afinidad utilizando una columna de Proteína A - Sepharosa CL 4B y se conjugó con fosfatasa alcalina EIA-grado I (Boehringer Mannheim GmbH, W. Germany) mediante el método del glutaraldehído en un sólo paso.¹¹

Sustrato fluorigénico

Se empleó una solución concentrada (0,5 mM) de 4 metil umbeliferil fosfato (Koch Light Ltd. Haverhill, Suffolk, En-gland). Para su dilución se utilizó Dietanolamina 1 M, pH 9,8 (Merck, Schuchardt).

Preparación de las soluciones de trabajo

Sueros Controles: Se presentan en el estuche listos para el uso, diluidos 1:21 con suero de carnero al 20 % en Tris Tween 0,0157 M pH 7,8 para una concentración final de 5%. Este es el mismo diluyente que se emplea para las muestras y en la reconstitución del antígeno.

Muestras: Se diluyen 1:21, al igual que los sueros controles.

Antígeno: Se reconstituye con 2 mL, para que las UH finales, sean 16 UH.

Conjugado: Se presenta listo para el uso, diluido 1:3 500 con Tris pH 8 y

sero albúmina bovina (SAP) al 1%.

Sustrato: Es diluido 1:10 antes del uso.

Equipamiento

Se utilizaron equipos de la tecnología SUMA (Centro de Inmunoensayo, Ciudad de la Habana, Cuba).¹²

Fluorímetro SUMA 421: Es un fluorímetro automatizado de alta sensibilidad, el cual realiza las lecturas de fluorescencia entre los 420 a 540 nm de longitud de onda. Se puede emplear también el SUMA 321 o el fotómetro - fluorímetro PR-521.

Lavador MAS 301: Es un equipo automatizado que garantiza la uniformidad de los lavados en las placas de reacción.

UMELISA DENGUE IgG

Es un ensayo inmunoenzimático heterogéneo que tiene como principio la captura de anticuerpos IgG. Este, constituye una modificación de la técnica de ultramicroELISA ya normalizada donde en lugar de emplear anticuerpos anti IgM humana se emplean anticuerpos anti IgG.⁸

Se aplican 10 µl de suero humano diluido (al igual que los controles) en los pocillos de la placa y se incuba 1 hora a 37°C en cámara húmeda. Los anticuerpos IgG presentes en las muestras se fijarán a los anticuerpos del recubrimiento. Después de 6 ciclos de lavado (de 30 segundos cada uno) con tampón Tris-HCl 15 mM conteniendo Tween-20 al 0,05 %; se añaden 10 µl de la mezcla de los 4 antígenos y se incuba 1 hora a 37°C. Se realiza otro proceso de lavado como ya se describió y se añaden 10 µl del conjugado en cada pocillo. En caso de reacción positiva el anticuerpo del conjugado se unirá al complejo formado previamente sobre la fase sólida. Las placas son incubadas como en la etapa previa y son lavadas nuevamente; posteriormente se adicionan 10 µl de sustrato y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. Al añadir el sustrato fluorogénico, éste será hidrolizado y la intensidad de la fluorescencia emitida permitirá detectar la presencia de anticuerpos IgG específicos a los 4 serotipos del virus dengue. La lectura, validación e interpretación de los resultados se realiza de forma automática por el lector SUMA y su paquete de pro-

gramas UMELISA DENGUE IgG.

Selección de las condiciones de ensayo

Para establecer la concentración adecuada de recubrimiento y la dilución de trabajo para el conjugado se realizó una titulación cruzada. Las concentraciones de anticuerpos contra IgG humana evaluadas estuvieron entre los 2,5 y 15 µg/mL y para el conjugado se probaron diluciones desde 1:1500 hasta 1:5000. El antígeno fue aplicado a 16 UH.⁶

Las variantes de incubación para el recubrimiento fueron: 18 horas a 4°C y 4 horas a 45°C.

Se seleccionó como variante más favorable la siguiente: tiempo de incubación, concentración de recubrimiento y dilución de conjugado con la cual se obtuvieron bajos coeficientes de variación, una señal de fluorescencia (U.F) aproximada de 5 y 130 U.F para el control negativo y control positivo respectivamente y la señal del control positivo en la prueba de estabilidad a 37°C, fue superior al 80% respecto a la de 4°C.

Muestras de suero humano

Se evaluaron muestras de donantes de sangre y de pacientes con sospecha clínica:

- donantes: 436 sueros tomados en el Banco de Sangre de Marianao, Ciudad de la Habana, Cuba.
- pacientes: 60 pares de sueros colectados durante los meses de octubre y noviembre de 1992, en Colombia (los mismos se encontraban debidamente conservados a -20°C con etilenglicol al 35 % y azida sódica al 0,2 %). Estos sueros de los pacientes fueron evaluados previamente con la técnica de IH en el Instituto Nacional de Salud de Bogotá, Colombia y en el IPK.
- 14 pares de sueros de pacientes con infección primaria según la técnica de IH.
- 33 pares de sueros de pacientes con infección secundaria según la técnica de IH.

Análisis estadístico

Los parámetros estadísticos fueron determinados empleando el Microsoft Excel, versión 7.0.

La determinación de los niveles de anticuerpos por encima del valor de corte fue determinada por ultra-

microELISA. Se empleó el test exacto de Fisher para comparar la sensibilidad y especificidad. El análisis de correlación de Pearson fue utilizado para la comparación de los niveles de relación del UMELISA y los títulos por IH en los sueros. El análisis de varianza (ANOVA) se utilizó para comparar las medias de la relación de IgG por UMELISA respecto a los diferentes títulos de la IH.

Distribución de frecuencia

Se realizó con los valores de relación M/P (donde M es la fluorescencia de la muestra y P la fluorescencia del suero control positivo del ensayo) obtenidos de la evaluación de los sueros de donantes de sangre, mediante el software mencionado.

Valor de corte

Una vez analizada la distribución de frecuencia y los resultados para las muestras de pacientes, se seleccionó el nivel de corte. El valor de corte se expresa como la relación M/P.

Precisión

Se utilizaron 5 muestras con diferentes niveles de positividad confirmadas por la técnica IH. Las mismas fueron aplicadas 10 veces por placa durante cinco días consecutivos para establecer los Coeficientes de Variación (C.V.) intra e interplacas.

Prueba de estabilidad

Las placas recubiertas con los anticuerpos anti IgG humana (γ), se incubaron 7 días a 37°C, cumplido el tiempo se evaluaron comparándolas con las placas mantenidas a 4°C. Se evaluó el porcentaje de recuperación de la señal de fluorescencia del suero control positivo (SCP) del as placas mantenidas a 37°C respecto a las conservadas a 4°C.

Evaluación analítica

Este análisis se realizó con el objetivo de establecer la sensibilidad, especificidad, concordancia, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) entre los resultados obtenidos con el UMELISA y otras técnicas de diagnóstico de infecciones por dengue.

Las evaluaciones analíticas del ensayo se realizaron en Cuba empleando muestras provenientes de Brasil y Colombia. En cada caso se analizó un grupo de muestras

previamente evaluadas con la técnica IH o el GAC-ELISA (Técnica que emplea el mismo principio de captura de confección casera) de la Facultad de Medicina de Minas Gerais.

Evaluación 1: Realizada en Cuba con 63 muestras provenientes de Cucuta y Medellín colectadas entre los meses de octubre - noviembre 1992. La técnica de referencia empleada fue el IH del IPK.

Evaluación 2: Realizada con muestras provenientes de la Facultad de Medicina de Minas Gerais, donde se evaluaron 171 sueros. Estas muestras habían sido previamente evaluadas con el GAC ELISA de dicha facultad.

Evaluación 3: Realizada con 229 muestras remitidas al IPK que se dividían en 129 positivas a por IH y 100 muestras positivas a enferme-

dades no asociadas (HSV, CMV, Rubéola, Toxoplasmosis, Hepatitis B, HCV), estas muestras son negativas por IH.

RESULTADOS

Selección de las condiciones de ensayo

Las condiciones de trabajo seleccionadas durante la titulación del recubrimiento, así como también la titulación del conjugado fueron: 10 µg/mL anticuerpos anti-IgG humana cadena γ como concentración de recubrimiento y 1:3500 como dilución del conjugado anticuerpos monoclonal/Fosfatasa Alcalina.

Distribución de frecuencias

El 91,3 % de la población presentó valores de relación inferiores a 0,15 (Figura 1.)

Valor de corte

Teniendo en cuenta la distribución de frecuencias de los sueros de donantes de sangre, el valor de corte propuesto fue un valor de relación M/P = 0,15.

La evaluación del ensayo con la finalidad de determinar la sensibilidad y especificidad obtenidas al evaluar las muestras pareadas de pacientes para la realización del diagnóstico, con las condiciones de trabajo seleccionadas y el valor de corte propuesto, se presentan en la Tabla I. De los 60 pares de sueros analizados con el UMELISA DENGUE IgG, 4 de ellos fueron falsos negativos y uno falso positivo, respecto a la IH.

El coeficiente de correlación obtenido entre la relación M/P del UMELISA respecto al título por IH fue 0,8699 (Figura 2).

Tabla 1. Comparación UMELISA e IH

IH	UMELISA DENGUE IgG		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	41	4	45
Negativo	1	14	15
Total	42	18	60

Sensibilidad: 91,84 %

Valor Predictivo Negativo(VPN): 78.94 %

Concordancia: 91.31 %

Especificidad: 93.75 %

Valor Predictivo Positivo(VPP): 97.83 %

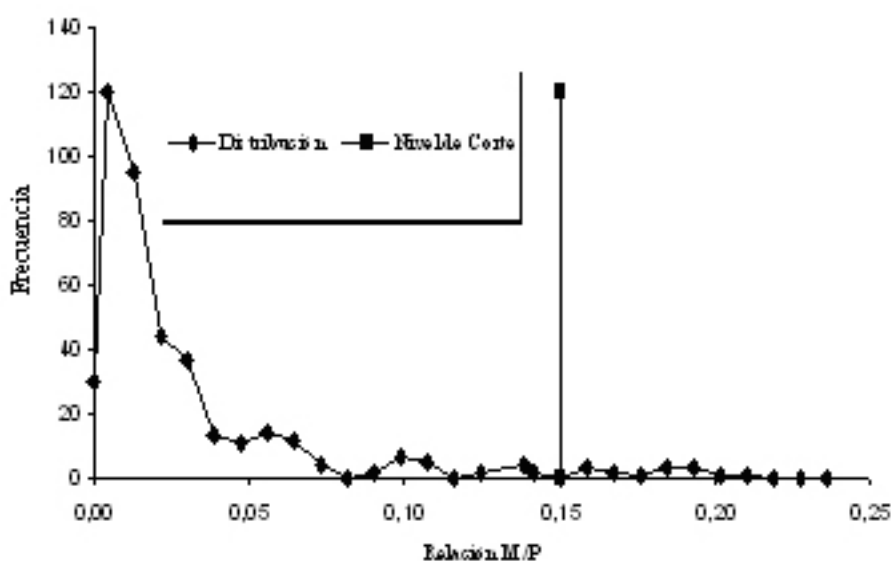


Figura 1. Polígono de frecuencia de las 436 muestras de donantes del Banco de sangre de Marianao, Ciudad de La Habana, Cuba.

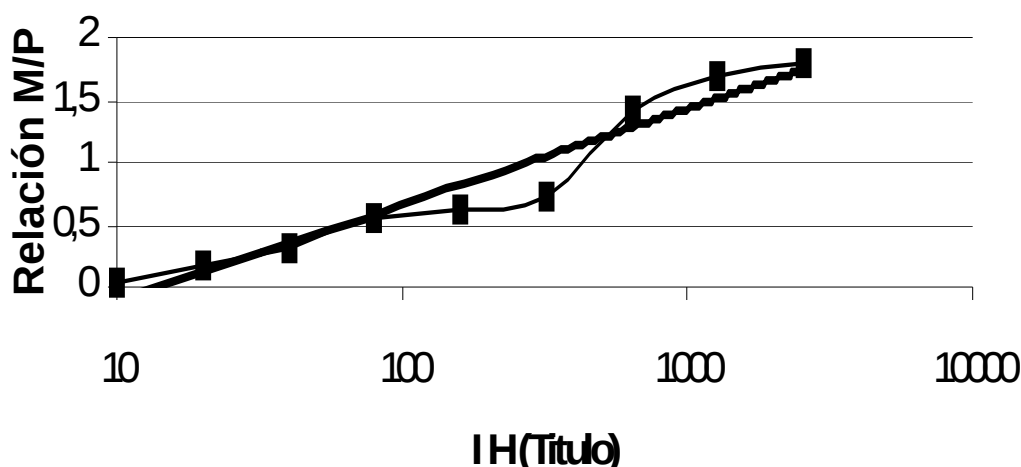


Figura 2. Correlación entre los valores de relación entre la fluorescencia de las muestras y la fluorescencia del control positivo (M/P) por UMELISA Dengue IgG con los títulos por IH.

Al evaluar la clasificación de las infecciones empleando el UMELISA Dengue IgG vemos que el ensayo clasifica correctamente las infecciones secundarias y cerca del 80 % las infecciones primarias (Tabla II).

Tabla 2. Comparación UMELISA Dengue IgG e IH en infección primaria y secundaria.

IH	UMELISA DENGUE IgG		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo Primaria	11	3	14
Positivo Secundaria	33	0	33

Sensibilidad para infección primaria: 78,6 %
 Sensibilidad para infección secundaria: 100 %
 Sensibilidad para ambas infecciones: 93,6 %.

Al comparar la sensibilidad del UMELISA Dengue IgG para la detección de anticuerpos IgG con respecto a los días de la aparición de los síntomas vemos que a partir del 5to día son detectados la mayoría de los sueros positivos (Figura. 3).

Precisión

Los coeficientes de variación (C.V) intra e interplacas no excedie-

ron de 4 y 7 % respectivamente.

Prueba de estabilidad

La recuperación de la señal de fluorescencia del SCP de las placas mantenidas a 37°C respecto a las de 4°C fue del 93,7%.

Validación analítica

En las validaciones realizadas con muestras simples provenientes de Cucuta y Medellín, Colombia;

Minas Gerais, Brasil; y muestras remitidas al IPK con el objetivo de determinar el valor del estuche para estudios epidemiológicos se obtuvo un 95,74 % (45/47), 95,45 % (42/44) y 89,8 % (116/129) de sensibilidad y un 100 % (16/16), 98.42 % (125/127) y 96 % (96/100) de especificidad respectivamente.

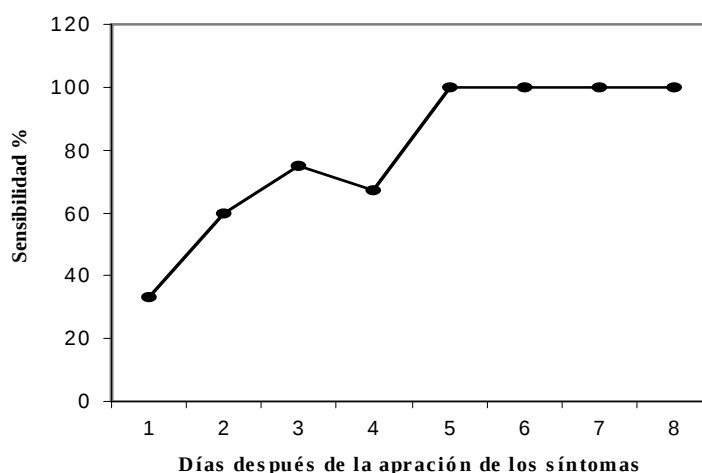


Figura 3. Sensibilidad del UMELISA Dengue IgG con muestras tomadas en los primeros días de la infección.

DISCUSION

Con las condiciones de trabajo seleccionadas, se logró una señal adecuada de los sueros controles (5 y 127 U.F para el negativo y positivo respectivamente). La señal del suero control positivo en la prueba de estabilidad a 37°C mostró una buena recuperación lo que nos permite predecir una estabilidad adecuada durante un año.

Los coeficientes de variación (C.V) intra e interplacas no excedieron de 4 y 7 % respectivamente, lo cual es una muestra de que la precisión del ensayo es la adecuada para garantizar la reproducibilidad de los resultados y se corresponde con lo establecido para las técnicas de ELISA.

Los resultados de la distribución de frecuencias mostraron un comportamiento logarítmico normal, donde el 91.7 % de la población presentó valores de relación inferiores a 0,15.

Durante la evaluación de la efectividad del estuche estandarizado en el diagnóstico, pudimos constatar que los 4 sueros falsos negativos presentaron títulos por IH inferiores o igual a 1:80 este resultado pudiera afectar el resultado positivo la evaluación de muestras con infección primaria donde los niveles de anticuerpos IgG en los primeros días de la enfermedad son relativamente bajos, no obstante estos resultados el ensayo a sido utilizado con resultados satisfactorios por las auto-

ridades sanitarias argentinas en un estudio epidemiológico publicado por la UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE (Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2000) y dos estudios colaborativos multicéntricos realizados en la provincia del Chaco y la ciudad de Posadas.^{13, 14, 15, 19}

Al realizar la evaluación de la factibilidad del empleo del UMELISA Dengue IgG para clasificar correctamente las infecciones por dengue, obtuvimos una buena concordancia. Se ha planteado que en aquellos pares de sueros donde se produce incremento de cuatro veces el título por IH y el suero convaleciente tiene títulos inferiores a 1/2560 se considera infección primaria y si son superiores a 1/2560, se considera una infección secundaria comprobada.⁴ Además, en las infecciones primarias los niveles de IgM contra dengue son sustancialmente mayores que los niveles de IgG, mientras que en las infecciones secundarias la IgG es la que predomina.¹⁶

En el análisis de la sensibilidad del UMELISA Dengue IgG con relación a los días de la aparición de los síntomas; pudimos constatar que a partir del 5to día es posible detectar prácticamente el 100 % de los sueros reportados por IH como positivos lo cual garantizaría que este ensayo, en conjunto con el UMELISA Dengue IgM, mejore

notablemente el diagnóstico de esta enfermedad.^{16, 17}

Cuando el análisis se centro en la comprobación de la efectividad del estuche para el estudio seroepidemiológico se comprobó, que el estuche presenta baja sensibilidad para las muestras de bajo título colectadas en etapas tempranas de una infección primaria lo cual nos sugiere que en el caso de infecciones pasadas donde los títulos frecuentemente son bajos, puede existir la pérdida de sensibilidad al igual que en muestras tomadas en los primeros 5 días de una infección primaria.

Los datos recogidos durante la epidemia de dengue en Santiago de Cuba mostraron la existencia de complicaciones hemorrágicas en pacientes con infección primaria, no obstante estos resultados la OPS en su manual de manejo del Dengue, mantiene como uno de los factores predisponentes a padecer dengue hemorrágico, los anticuerpos pre-existent.¹⁸

Los resultados de las evaluaciones realizadas en Cuba con muestras de Colombia, Brasil y remitidas al IPK son acorde a lo esperado además teniendo en cuenta el cuadro clínico de los pacientes y, además, el momento de la toma de la muestra en el momento de la admisión y salida del hospital podemos asegurar que la mayoría de las muestras provienen de pacientes con una infección recurrente.^{16, 18}

La presentación del estuche de reactivos UMELISA DENGUE IgG en el formato de "reactivos listos para el uso", asociado al empleo de placas de ultramicroELISA de tiras, que ofrece la posibilidad de no limitar el uso del estuche solamente a la evaluación de un gran número de muestras; así como los resultados obtenidos, indican que el UMELISA DENGUE IgG, puede ser utilizado con una adecuada confiabilidad en la detección temprana de pacientes con dengue, en conjunto con el UMELISA Dengue IgM, lo cual reviste gran importancia en el diagnóstico, control. Este estuche diagnóstico se encuentra registrado en Cuba, México, Argentina, Colombia y Brasil donde en la actualidad es empleado por las autoridades de salud de dichos países.^{13,14,15}

BIBLIOGRAFÍA

- Hannon H., and Therrell B. Guidelines on the prevention and control of congenital hypothyroidism. Hereditary diseases program WHO/ HDP/ CON, HYPO/ GL: 90, 4:1991
- González R.R., Robaina R., Rodriguez M.E., Blanco S. An enzyme ultramicroanalytical system. *Clin Chim Acta*, **197**, 5, 1991.
- Gubler, D.J. Serological diagnosis of dengue/dengue hemorrhagic fever. *Dengue Bull*, **20**, 20, 1996.
- Clarke D.H. and Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am J Trop Med Hyg*, **7**, 561, 1958.
- Chungue E, Marche G, Plichart R, Boutin JP, & Roux J. Comparison of immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay (IgG-ELISA) and haemagglutination of dengue antibodies. Prevalence IgG-ELISA antibodies in Tahiti. *Am J Trop Med Hyg*, **83**, 708, 1989.
- Innis B.L., Nisalak A., Nimmannitya S., Kusalerdchariya S., Chongswasdi V., Suntayakorn S., Puttisri P. & Hoke C.H. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am J Trop Med Hyg*, **40**, 418, 1989.
- Kuno G., Gomez I., Gubler D.J., An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. *J Virol Methods*, **33**, 101, 1991.
- Seijo A., Cernigoi B., Deodato B. Dengue importado del Paraguay a Buenos Aires. Estudio clínico y epidemiológico de 38 casos. *MEDICINA (Buenos Aires)*, **61**, 137, 2001.
- Hermida C., Vázquez S., Guzmán G.M, Gonzalez M., Marcet R., Munet M., Castillo A. Obtention of monoclonal antibodies against virus serotypes. *Arthropod Borne Virus Information Exchange*, June, 1988.
- Hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación. Técnicas de laboratorio para el diagnóstico de dengue. Curso Internacional "Dengue y dengue hemorrágico en las Américas", Instituto "Pedro Kouri", Cuba. 1995.
- Avrameas J. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for detection of Antigens and Antibodies. *Immunochem*, **63**, 43, 1969.
- Fernández J.L., García F.A., Solís R.L., Robaina R., García M., Valdés V., et al. The ultramicroanalytical system SUMA: A versatile technology for clinical testing. International Symposium Biotechria'91. Biotechnology of growth factors: vascular and nervous systems, 203, 1991.
- Gorodner J.O., Seijo A., Payes Monzón F., Robles B., Basualdo C., Pacce M., Botinelli O., Alonso J. M., Boffi, R. UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, 2000.
- Alonso J.M., Fabre A.R., De Biscay S., Ruiz M., Dellamea E., Lorenzo A., Silva E., Sánchez N., Luz-Michelini S., Chamorro M., Gorodner, J.O. Circulación de virus Dengue en la Provincia del Chaco - estudio colaborativo multicéntrico. [En línea] <http://www.unne.edu.ar> [Consulta: marzo 2001].
- Alonso J.M., Gorodner J.O., Fabre A.R., Galván M., Merino D.E., Balbachán S.E. Circulación de Virus Dengue en Población de la Ciudad de Posadas. [En línea] <http://www.unne.edu.ar> [Consulta: marzo 2001].
- David W.V., Green S., Kalayanarooj S., Innis B.L., Nimmannitya S., Suntayakorn S., Rothman A.L., Ennis F.A. and Nisalak A.. Dengue in the early febrile Phase: Viremia and antibody responses. *J Infect Dis*, **176**, 322, 1997.
- Ruechusatsawat K., Morita K., Tanaka M., Vongcheree S., Rojanasuphot S., Warachit P., Kanai K., Thongtradol P., Nimnakom P., Kanugkid S., Igarachi A. Daily observation of antibody levels among dengue patients detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Jap J Trop Med Hyg*, **22**, 9, 1994.
- OPS/OMS Dengue y dengue hemorrágico en las Américas. Guías para su prevención y control. Publicación científica n° 548. Washington (EEUU), 1995.
- Fernández J.L., García F.A., Solís R.L., Robaina R., García M., Valdés V., et al. The ultramicroanalytical system SUMA A versatile technology for clinical testing. Int Symp Biotechria'91. Biotechnology of growth factors: vascular and nervous systems, 203, 1991.