

Artigo original

Avaliação de kits comerciais para detecção de antígenos NS1-dengue – São Paulo

Evaluation of commercial kits for detecting the antigen NS1-dengue – São Paulo

Fernanda Gisele da Silva¹; Sarai Joaquim dos Santos Silva¹; Iray Maria Rocco¹; Vivian Regina Silveira¹; Akemi Suzuki¹; Gizelda Katz²; Ivani Bisordi¹

¹Núcleo de Doenças de Transmissão Vetorial. Centro de Virologia. Instituto Adolfo Lutz. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil

²Centro de Respostas Rápidas. Instituto Adolfo Lutz. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil

RESUMO

O vírus dengue, pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, é constituído de RNA de fita simples que codifica proteínas estruturais e não estruturais. Possui quatro sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. O diagnóstico laboratorial rápido pode ser de grande ajuda no controle da expansão da doença. O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes kits de detecção da proteína NS1 do vírus dengue, tendo como referência o isolamento viral. Foram utilizadas 147 amostras de soro de pacientes com suspeita de infecção pelo DENV, das quais 64 foram recebidas para isolamento de vírus e 83 para ELISA IgM. O kit Dengue NS1 Ag Strip (Bio-Rad) obteve sensibilidade de 89%, especificidade de 66%, VPP 67% e VPN 88%. O Dengue Duo Test (Bioeasy) teve sensibilidade de 89%, especificidade 68%, VPP 70% e VPN 88%. O Platelia Dengue NS1 ELISA Ag (Bio-Rad) apresentou sensibilidade de 95%, especificidade 47%, VPP 59% e VPN 92%. O kit Dengue Early ELISA (Panbio) resultou em sensibilidade de 86%, especificidade 71%, VPP 69% e VPN 86%. De forma geral, os kits avaliados podem ser empregados no diagnóstico, sempre associados a critério clínico e epidemiológico ou outros métodos laboratoriais.

PALAVRAS-CHAVE: Dengue. Diagnóstico. Isolamento viral. Captura de NS1.

ABSTRACT

The dengue virus, which belongs to the family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*, consists of single-stranded RNA encoding structural and non-structural proteins. It has four serotypes: DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4. The rapid laboratory diagnosis may greatly help to control the spread of the disease. The objective of the present work was to evaluate diagnostic kits for dengue, by detecting the NS1 protein, using virus isolation as reference. We used 147 sera samples of patients suspected of DENV infection, 64 were tested for virus isolation and 83 by capture ELISA IgM. Dengue NS1 Ag Strip (Bio-Rad) achieved a sensitivity of 89%, specificity of 66%, PPV of 67% and NPV of 88%. Dengue Duo Test (Cassette) showed a sensitivity of 89%, specificity of 68%, PPV of 70% and NPV of 88%. The Platelia Dengue NS1 ELISA Ag (Bio-Rad) had a sensitivity of 95%, specificity of 47%, PPV of 59% and NPV of 92%. Dengue Early ELISA kit (PANBIO) resulted in a sensitivity of 86%, specificity of 71%, PPV of 69% and NPV of 86%. In general, the evaluated kits can be used in diagnosis, associated with other criteria such as clinical-epidemiological or other laboratorial methods.

KEY WORDS: Dengue. Diagnosis. Virus isolation. Capture of NS1.

INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença infecciosa, febril e aguda, e pode se apresentar como infecção inaparente, dengue clássico (DC), febre hemorrágica da dengue (FHD), síndrome do choque da dengue (SCD) e dengue com complicação (DCC).¹ Após realização de estudo internacional, em 2009, a Organização Mundial de Saúde (OMS) sugeriu uma nova classificação da doença para facilitar a triagem dos pacientes e os cuidados com a evolução do quadro clínico. A nova classificação é simples e consta de apenas duas definições: dengue (com e sem sinais de alerta) e dengue grave, para casos com extravasamento de plasma, hemorragia severa e comprometimento de órgãos.²

O vírus dengue (DENV) é um Arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*, gênero

Flavivirus e é transmitido ao homem por mosquitos do gênero *Aedes*. São quatro sorotipos denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Os quatro sorotipos formam um subgrupo no gênero *Flavivirus*.³ O DENV é esférico, envelopado, com projeções na superfície e tem aproximadamente 60 nm de diâmetro. Possui uma fita única de RNA com peso molecular (PM) de 4×10^6 , contendo aproximadamente 11.000 nucleotídeos e, por ser polaridade positiva, comporta-se como RNA mensageiro.

O genoma é organizado em uma única fase aberta de leitura (ORF) que codifica três proteínas estruturais: proteína C, localizada no nucleocápside ou proteína do núcleo; proteína M, que se encontra associada com a membrana; e a proteína E

do envelope, principal proteína estrutural, diretamente associada com a imunidade e provável virulência da amostra. Entre as proteínas virais, a proteína do envelope é uma das mais antigênicas. Anticorpos para proteína E inibem a ligação do vírus à célula e neutralizam o vírus. Esses anticorpos apresentam graus variáveis de reação cruzada entre os sorotipos dos DENV.

O DENV tem sete outras proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) que estão relacionadas com a infecção viral.⁴ As proteínas não estruturais são importantes na replicação, na transmissão pelo vetor, na virulência e outras funções no hospedeiro. Um importante alvo dos anticorpos para DENV é a proteína NS1, uma glicoproteína conservada que parece ser essencial para a viabilidade do vírus. Essa proteína é expressa na superfície das células infectadas e se encontra na circulação como uma substância solúvel.

O diagnóstico da dengue é difícil quando baseado exclusivamente em aspectos clínicos, uma vez que os sintomas podem ser confundidos com outras doenças. O diagnóstico específico se dá através do isolamento viral, detecção do antígeno, detecção do ácido nucleico viral e pesquisa de anticorpos.⁵ No entanto, buscam-se alternativas para o diagnóstico visando à minimização do tempo e custos.

O diagnóstico virológico da dengue deve ser feito na fase aguda da infecção, embora a reação em cadeia de polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) possa ser usada no início da fase de convalescência, com menor sensibilidade. O isolamento viral é feito por inoculação de amostras de soro em culturas celulares de mosquito *Aedes albopictus* (clone C6/36), seguido de imunofluorescência indireta (IFI).

Os ensaios sorológicos baseiam-se na pesquisa de anticorpos específicos contra o vírus. Podem ser utilizadas técnicas de neutralização e inibição da hemaglutinação, com amostras pareadas dos pacientes, para observação de conversão sorológica (aumento de quatro vezes ou mais dos títulos de anticorpos), entre a fase aguda da infecção e a fase convalescente. Os métodos sorológicos mais utilizados são os imunoenzimáticos ELISA de captura de anticorpos IgM, que permitem discriminar IgM na fase aguda da doença, facilitando o diagnóstico por necessitar apenas de uma amostra de soro, coletada a partir do sexto dia após início dos sintomas.

Como os sintomas iniciais da infecção pelos vírus dengue são inespecíficos, o diagnóstico diferencial é feito para diversos agravos: influenza, enterovirose, doenças exantemáticas (sarampo, rubéola, parvovirose e mononucleose infecciosa), hepatites virais, hantavirose, febre amarela, mayaro, malária, riquetsioses, alergias cutâneas e outras infecções que possam ser epidêmicas na região de ocorrência do caso.¹

Ensaio imunoenzimático e imunocromatográfico para a detecção da proteína viral NS1 estão disponíveis no mercado.⁶ Como o antígeno NS1 está presente no soro de indivíduos infectados desde o primeiro dia de doença, permanecendo na forma solúvel até o quinto ou sexto dia, seu uso vem sendo estudado como ferramenta de detecção precoce da dengue.⁷

O objetivo deste relato foi avaliar quatro kits para detecção de proteínas NS1 em dois formatos (imunoenzimático – ELISA e imunocromatográfico – Strip), comercialmente disponíveis, tendo como referência a técnica de isolamento de vírus em cultura de células.

METODOLOGIA

Para avaliar os diferentes *kits* de detecção de NS1 foi constituído um painel de amostras recebidas pelo Núcleo de Doenças de Transmissão Vetorial do Instituto Adolfo Lutz (NDTV/IAL) – órgão da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (CCD/SES-SP) – para diagnóstico laboratorial da dengue, no período de 2007 a 2008, provenientes da rede de saúde paulista.

Foram selecionadas 147 amostras, sendo 64 recebidas para isolamento de vírus (coletadas em fase aguda de infecção, de 0 a 3 dias de doença) e 83 para ELISA de captura de anticorpos IgM, técnica *in house* (coletadas em fase aguda-tardia, a partir do quinto dia após início de infecção).

Todas as amostras foram processadas para tentativa de isolamento de vírus. Aquelas que apresentaram resultado positivo foram assim distribuídas: 21 positivas para DENV-1, 10 para DENV-2 e 33 para DENV-3. Dentre as 83 amostras analisadas por ELISA IgM, 62 foram reagentes, 6 não reagentes e 15 resultaram leitura de densidade óptica próxima ao *cut-off* (CO) e, portanto, consideradas inconclusivas. Foram selecionadas mais 30 amostras de pacientes com outras patologias sendo: 2 amostras de pacientes com sarampo, 3 amostras de rubéola, 12 amostras de herpes e 13 de varicela zoster, todas confirmadas por técnicas sorológicas.

As amostras foram estudadas na sua totalidade e agrupadas, para avaliação, de acordo com os dias de doença. O dia zero foi considerado o de início da febre. Foram avaliados sensibilidade (S),

especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) para o total de amostras e para as amostras agrupadas de acordo com os dias de doença.⁸

Os cálculos foram realizados de acordo com as seguintes fórmulas:

S = capacidade de reconhecer os verdadeiros positivos ($a/a+c$), em que (a) representa o número de verdadeiros positivos e (c) o número de falsos negativos

E = instrumento de distinguir os verdadeiros negativos ($d/b+d$), em que (d) representa o número de verdadeiros negativos e (b) o número de falsos positivos

VPP = probabilidade de que cada positivo pelo teste, seja um caso ou verdadeiro positivo ($a/a+b$), em que (a) representa o número de verdadeiros positivos e (b) o número de falsos positivos

VPN = probabilidade de que cada negativo seja um sadio ($d/c+d$), em que (d) representa o número de verdadeiros negativos e (c) o número de falsos negativos

O cálculo do intervalo de confiança (IC 95%)⁹ para os valores de sensibilidade dos *kits* foi realizado com amostras coletadas de 0 a 3 dias após início de sintomas. Todas as amostras foram testadas pelos *kits* Dengue NS1 Ag Strip kit (Bio-Rad Laboratories, Marnes La Coquette, França), Dengue Duo Test (Bioeasy Diagnóstica), Dengue Early Elisa (Panbio Europa) e Platelia™ Dengue NS1 Ag Kit (Bio-Rad Laboratories, Marnes La Coquette, França). Todos os ensaios foram realizados em conformidade

com as instruções dos fabricantes, contidas nas bulas dos *kits*. As reações foram realizadas ao mesmo tempo e as leituras dos testes confirmadas por mais de um observador. Testes de inibição da hema-glutinação foram realizados com o intuito de elucidar eventuais resultados inconclusivos obtidos pelos *kits* comerciais.

Os resultados obtidos por isolamento viral foram utilizados como referência para análise dos resultados.

Isolamento de vírus

O isolamento de vírus foi realizado por inoculação em cultura de células de *Aedes albopictus* (C6/36), seguida por IFI com anticorpos policlonais; *pool* de fluido ascítico de camundongo antiDENV e imunoglobulina anticamundongo conjugada com isotiocianato de fluoresceína (SIGMA-ALDRICH). As amostras positivas no primeiro teste foram processadas por IFI com anticorpos monoclonais (Bio-manguinhos) para os quatro sorotipos de DENV.¹⁰

Testes imunocromatográficos

Dengue NS1 Ag Strip (Bio-Rad Laboratories, Marnes La Coquette, França): as tiras para imunocromatografia foram colocadas na posição vertical dentro de tubos de ensaio já contendo 50 µl da amostra a ser testada e uma gota do tampão de migração. A amostra do paciente migra ao longo da tira e os resultados são lidos ao fim de 15 minutos. Quando presente na amostra, o antígeno NS1 se liga aos anticorpos para NS1 fixados nas partículas de ouro coloidal do conjugado. Após a migração, os complexos são capturados pelos anticorpos para NS1 fixados

na linha teste, formando uma linha violeta quando a reação é positiva e sem coloração, quando a reação é negativa. Se não houver cor na linha controle o teste deve ser considerado inválido.

Dengue Duo Test (Bioeasy Diagnóstica Ltda): teste imunocromatográfico para detecção qualitativa do antígeno NS1 do DENV em amostras de soro, plasma e sangue humano. O teste contém uma membrana ou fita marcada com anticorpo para NS1 e um anticorpo para antígeno NS1 para DENV, conjugado ao ouro coloidal. A amostra desliza ao longo da membrana cromatográfica até a região teste que origina uma linha visível, quando se forma um complexo anticorpo/antígeno/anticorpo. Caso não haja coloração na altura esperada na linha teste a reação será considerada negativa. Se não houver cor na linha controle o teste deve ser considerado inválido.

Os critérios para validação das reações imunocromatográficas foram os indicados pelos fabricantes. As amostras foram classificadas como reagentes, não reagentes e inconclusivas. As amostras consideradas inconclusivas foram as que apresentaram leitura de coloração tênue.

Testes imunoenzimáticos ELISA para captura de NS1

Dengue Early ELISA (Panbio Europa): ensaio no formato ELISA para captura do antígeno NS1 do DENV no soro dos pacientes. Os orifícios da microplaca do teste estão sensibilizados com anticorpos para NS1. O *kit* contém anticorpo monoclonal para NS1 conjugado a enzima peroxidase, substrato TMB, solução tampão para lavagem, 5 controles (1 positivo, 1 negativo e 3 calibradores para valor de CO) e

solução para interrupção da reação (solução de bloqueio).

Platelia™ Dengue NS1 Ag kit (Bio-Rad Laboratories, Marnes La Coquette, França): ensaio imunoenzimático de captura da proteína NS1 para determinação qualitativa ou semiquantitativa em soro ou plasma humano. Os orifícios da microplaca estão sensibilizados com anticorpo para NS1. O *kit* contém diluente para amostras, anticorpo para NS1 marcado com a enzima peroxidase, substrato TMB, solução de bloqueio, 5 controles (1 positivo, 1 negativo e 3 calibradores para CO) e solução tampão de lavagem.

A validação das reações imunoenzimáticas e o valor de CO foram obtidos de acordo com os critérios e instruções dos fabricantes. As amostras foram classificadas como reagentes, não reagentes e inconclusivas. As consideradas inconclusivas foram as que apresentaram leitura de densidade óptica (DO) próxima ou igual ao valor de CO estabelecido para cada teste.

Inibição da hemaglutinação (IH)

A técnica de IH foi utilizada para a confirmação dos resultados. As amostras foram testadas contra os flavivírus DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, vírus da febre amarela

(YFV), vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) e vírus rocio (ROCV). Os antígenos para teste foram preparados a partir de cérebro de camundongos, albinos Swiss recém-nascidos, infectados e tratados por extração com sacarose-acetona.¹¹ Toda amostra que apresentou anticorpos inibidores da hemaglutinação a partir da diluição de 1/20 foi considerada positiva.^{12,13}

Ética em pesquisa: não foram evidenciados conflitos de interesses entre as empresas fornecedoras e produtoras de *kits* e o laboratório de saúde pública (IAL). As amostras dos pacientes foram recebidas pelo laboratório com solicitação de diagnóstico para dengue e identificadas apenas por números. A identidade dos pacientes foi mantida em sigilo.

RESULTADOS

O *kit* Platelia NS1 (Bio-Rad) foi o teste que apresentou maior sensibilidade (95%) e menor especificidade (47%). Quanto à especificidade, o *kit* Early Elisa NS1 (Panbio) apresentou o melhor desempenho (71%) e o Duo Test (BIOEASY) foi o segundo teste com maior especificidade (68%). O *kit* Duo Test (Bioeasy) obteve o maior valor preditivo positivo (70%) e o *kit* Platelia NS1 (Bio-Rad) apresentou o maior valor preditivo negativo (92%) (Figura 1).

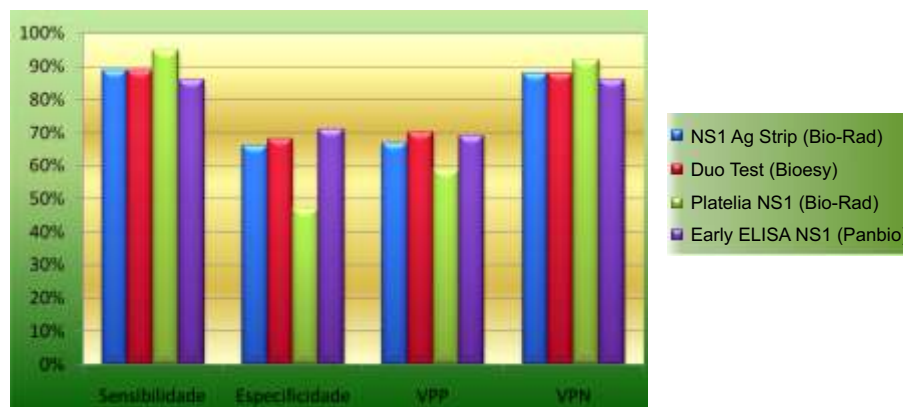


Figura 1. Valores de sensibilidade, especificidade, preditivo positivo e preditivo negativo, determinados para os *kits* de diagnósticos de NS1-dengue.

Como o painel de amostras para a avaliação foi heterogêneo em relação aos dias decorridos de infecção, foram selecionadas as amostras coletadas até o terceiro dia para uma análise mais detalhada, por serem essas as mais indicadas para avaliação na utilização de isolamento viral como técnica de referência.

Quando a sensibilidade dos testes foi calculada em relação aos dias decorridos após início dos sintomas, o *kit* Platelia NS1 (Bio-Rad) foi positivo em 50 das 54 amostras recebidas entre os dias 0-3 de doença, com sensibilidade de 93,1% e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) = 83,6 - 97,2%. O Early ELISA NS1 (Panbio) foi positivo em 45 das 54 amostras, com sensibilidade de 85,7% e IC 95% = 75,0% - 92,3% (Quadro 1). Os *kits* NS1 Ag Strip (Bio-Rad) e Duo Test (Bioeasy) foram positivos em 48 das 54 amostras recebidas entre 0-3 dias de doença, com sensi-

bilidade de 90% e IC 95% = 79,8 - 95,3% (Quadro 1).

No período de 4-6 dias de doença, o *kit* Platelia NS1 (Bio-Rad) resultou na maior sensibilidade (86%), seguido pelo, *kit* Early ELISA NS1 (Panbio), com sensibilidade de 80%. Os *kits* formato imunocromatográfico, NS1 Ag Strip (Bio-Rad) e Duo Test (Bioeasy), apresentaram a menor sensibilidade (73%).

O isolamento de vírus em cultura de células mostrou-se mais eficaz até o quarto dia de doença. No quinto e sexto dias o isolamento detectou a presença do vírus em algumas amostras, porém os *kits* tiveram mais amostras reagentes no mesmo período (Tabela 1). A partir do sexto dia o isolamento em cultura de célula não detectou a presença do vírus em nenhuma amostra, assim como os *kits*, à exceção do Platelia NS1 (Bio-Rad), que obteve duas amostras positivas nesse período.

Quadro 1. Sensibilidade para os quatro *kits* testados em relação aos dias de doença e intervalo de confiança.

| <i>Kits</i> analisados | Sensibilidade (0-3 dias de doença) | Intervalo de confiança (IC 95%) |
|------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| NS1 Ag Strip (Bio- Rad) | 90,0% | 79,8-95,3 |
| Duo Test (Bioeasy) Strip | 90,0% | 79,8-95,3 |
| Platelia NS1 (Bio-Rad) ELISA | 93,1% | 83,6-97,2 |
| Early ELISA NS1 (Panbio) | 85,7% | 75,0-92,3 |

Tabela 1. Número de dias de doença e amostras processadas para isolamento de DENV.

| Dias/doença | Nº (% de amostras) | DENV-1 | DENV-2 | DENV-3 | NEG | Amostras positivas (%) |
|------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------------------|
| 1 | 21 (15,4) | 9 | 1 | 9 | 2 | 13,9 |
| 2 | 22 (16,2) | 4 | 5 | 9 | 4 | 13,2 |
| 3 | 11 (8,1) | 7 | 1 | 3 | 0 | 8,1 |
| Sub-total | 54 (39,7) | 20 | 7 | 21 | 6 | 35,3 |
| 4 | 17 (12,5) | 1 | 3 | 7 | 6 | 8,1 |
| 5 | 27 (19,8) | 0 | 0 | 3 | 24 | 2,2 |
| 6 | 26 (19,1) | 0 | 0 | 2 | 24 | 1,5 |
| Sub-total | 70 (51,5) | 1 | 3 | 12 | 54 | 11,8 |
| 7 | 6 (4,4) | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 |
| 8 | 3 (2,2) | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| 9 | 1 (0,7) | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 10 | 2 (1,5) | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| Sub-total | 12 (8,8) | 0 | 0 | 0 | 12 | 0 |
| Total | 136 (100,0) | 21 | 10 | 33 | 72 | 47,1 |

Considerando-se o $n=136$, correspondente ao número de amostras que foram coletadas até o décimo dia de doença e processadas para tentativa de isolamento viral, observou-se que 39,7% das amostras foram coletadas até o terceiro dia após início dos sintomas; dentre elas, 35,3% foram positivas para um dos três sorotipos de DENV. Do quarto ao sexto dia de doença foram processadas 51,5% das amostras, das quais apenas 11,8% resultaram positivas pela técnica de isolamento de vírus. Após o sexto dia não se obteve nenhum isolamento de vírus (Tabela 1).

Quanto à sensibilidade, de acordo com os sorotipos de DENV: o *kit* Platelia Dengue NS1 (Bio-Rad) foi o mais sensível para o DENV-1 (100%); os *kits* NS1 Ag Strip (Bio-Rad) e o Duo Test (Bioeasy) apresentaram sensibilidade de 95% cada; e o Early ELISA NS1 (Panbio) obteve a menor sensibilidade (90%) para o DENV-1 (Figura 2).

Para o DENV2, o *kit* Platelia Dengue NS1 (Bio-Rad) também apresentou a maior sensibilidade (78%), já o Early ELISA NS1 (Panbio) obteve sensibilidade de 70% e os *kits* NS1 Ag Strip (Bio-Rad)

e o Duo Test (Bioeasy) apresentaram sensibilidade de 50% cada (Figura 2). Os *kits* Platelia Dengue NS1 (Bio-Rad), NS1 Ag Strip (Bio-Rad) e Duo Test (Bioeasy) apresentaram sensibilidade de 97% cada para o DENV-3 e o Early ELISA NS1 (Panbio) sensibilidade de 87% (Figura 2). Do total de amostras analisadas (147), em apenas 13 obteve-se resultados inconclusivos para um ou mais dos *kits* testados (Quadro 2).

Quando calculadas as porcentagens de discordância de resultados entre amostras inconclusivas, o teste Platelia NS1 Bio-Rad ELISA foi o que apresentou menos resultados discordantes em relação aos testes utilizados como referência. Utilizou-se também o teste de inibição da hemaglutinação (IH) para confirmar os resultados do MAC-ELISA.

Das 30 amostras positivas para outros agravos, apenas uma foi positiva para herpes e para dengue no *kit* Platelia NS1 (Bio-Rad), com especificidade de 97%. Os demais *kits* NS1 analisados nesse estudo apresentaram 100% de especificidade para esse grupo de amostras.

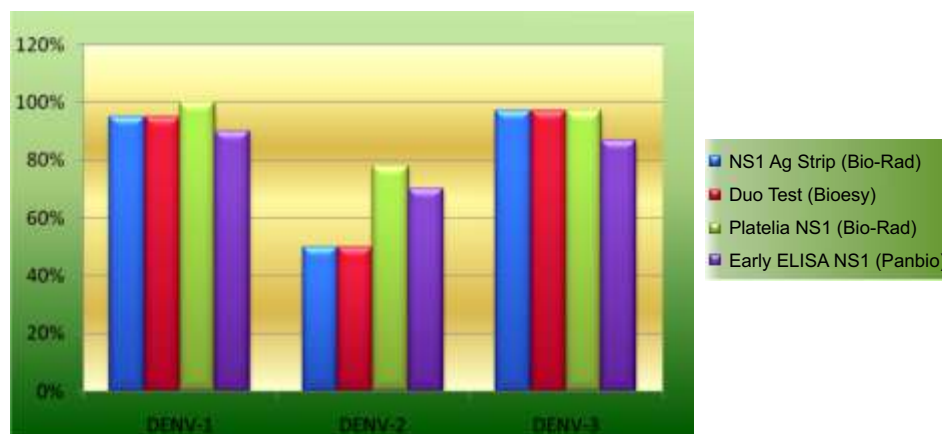


Figura 2. Sensibilidade dos *kits* de acordo com os sorotipos da dengue.

Quadro 2. Amostras com resultados inconclusivos nos kits NS1 e resultados de MAC-ELISA e inibição da hemaglutinação (IH).

| Nº | Isol.** | Dias*** | Bio-Rad NS1 | Bioeasy NS1 | NS1 Bio-Rad ELISA | Pan E Early ELISA NS1 | MAC. ELISA | IH |
|---------|---------|---------|-------------|-------------|-------------------|-----------------------|------------|----------------------------------|
| 278.618 | NEG | 5 | Positivo | Inc.**** | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo |
| 279.271 | POS | 4 | Positivo | Positivo | Positivo | Inc. | Negativo | Negativo |
| 288.112 | NEG | 5 | Negativo | Negativo | Inc. | Negativo | Positivo | DEN1,2,3,4 (5)* |
| 288.156 | POS | 4 | Negativo | Negativo | Inc. | Negativo | Negativo | Negativo |
| 289.067 | NEG | 6 | Negativo | Inc. | Negativo | Negativo | Positivo | DEN2 (3)* |
| 291.083 | NEG | 5 | Negativo | Negativo | Inc. | Negativo | Inc. | Negativo |
| 294.212 | NEG | 4 | Positivo | Positivo | Positivo | Inc. | Positivo | DEN2(2)*, DEN3,4(3)* |
| 298.289 | NEG | 5 | Negativo | Negativo | Inc. | Negativo | Positivo | Negativo |
| 301.287 | NEG | 6 | Negativo | Negativo | Inc. | Negativo | Positivo | DEN1,3 (4),DEN2,4(5)* |
| 301.294 | NEG | 6 | Inc. | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo | DEN1,2,3,4 (5)* |
| 301.325 | NEG | 6 | Positivo | Inc. | Positivo | Negativo | Positivo | DEN1 (2)* |
| 301.620 | NEG | 6 | Positivo | Inc. | Positivo | Negativo | Positivo | DEN1,2 (4)*, DEN3(3)*, DEN4 (2)* |
| 301.667 | NEG | 6 | Positivo | Inc. | Positivo | Positivo | Positivo | DEN1(2)* |

*número que representa título de anticorpos inibidores da hemaglutinação (IH): 1(1/10); 2(1/20); 3(1/40); 4(1/80); 5(1/160)

**Resultado de isolamento de vírus em cultura de células

***Dias de doença.

****Inconclusivo

DISCUSSÃO

Os exames específicos para diagnóstico de dengue têm a finalidade de orientar ações de vigilância epidemiológica, uma vez que a conduta terapêutica raramente será alterada em função da confirmação pelo laboratório de uma infecção por DENV.¹⁴

O isolamento viral seguido de imunofluorescência indireta é a técnica considerada referência para detecção e identificação do DENV. Entretanto, esse procedimento requer instalações apropriadas, apresenta custo elevado e demora cerca de 7 a 10 dias para ser concluído. Além disso, após o terceiro dia do início dos sintomas o nível de anticorpos começa a subir, interferindo no resultado e na sensibilidade do isolamento (Tabela 1).¹⁵

O teste de rotina para diagnóstico sorológico da dengue é o ensaio imunoenzimático de captura de anticorpos IgM, também denominado MAC-ELISA ou ELISA *in house*, que, apesar de apresentar bons resultados, somente detecta a doença em sua fase aguda tardia (a partir do quinto dia

do início dos sintomas), quando os títulos de anticorpos IgM são evidenciados.

Para realizar o diagnóstico pela detecção de anticorpos IgG são necessárias duas amostras de soro, uma da fase aguda e outra da fase convalescente da infecção. Os anticorpos IgG são detectáveis por kits comerciais ou pela técnica clássica em virologia, a inibição da hemaglutinação (IH).

Pode-se afirmar que a infecção é recente se houver uma conversão sorológica, caracterizada por um aumento de quatro vezes no título de anticorpos da primeira para a segunda amostra. A presença de anticorpos IgG em títulos altos nos soros dos pacientes, para todos os sorotipos de DENV na primeira semana de doença, sugere uma infecção secundária. Esse teste tem como desvantagem requerer duas amostras de soro e apresentar reações cruzadas para outros flavivírus.

Nesse contexto, uma alternativa significativa aos métodos tradicionais é a imuno-

cromatografia, pois trata-se de uma tecnologia inovadora que concentra a reação antígeno/anticorpo em uma única fase sólida, sendo esta mantida em temperatura ambiente. Possui alta sensibilidade, não exige equipamentos ou treinamento específico para realização do teste, e ainda gera o resultado em poucos minutos. A utilização desse novo método seria importante para regiões mais carentes de infraestrutura do País, onde não se dispõe de centros especializados de saúde ou laboratórios de análises.

Os métodos imunoenzimáticos para captura da proteína NS1 para diagnóstico de dengue permitem análise de um grande número de amostras, são de execução simples e proporcionam em um curto período resultados confiáveis.

Para se obter o isolamento do vírus é necessário que a amostra em estudo contenha a partícula viral íntegra. A detecção da proteína NS1 não indica necessariamente que a partícula viral esteja íntegra ou infectante. Esse fato, associado à manipulação e armazenamento das amostras, pode ter contribuído com o menor número de resultados positivos no isolamento viral em relação aos *kits* testados.

Pacientes com viremia muito baixa podem não apresentar NS1 mensurável, o que poderia explicar os resultados falsos negativos nos *kits*. Nos casos mais graves da doença os testes para diagnóstico são sensíveis. A sensibilidade depende da severidade da doença na população estudada. A especificidade depende da prevalência de co-morbidades com sintomas similares, fatores de confusão. A possibilidade da presença dessas tendências deve ser considerada quando se analisa os resultados de testes diagnósticos.¹⁶

Os quatro *kits* testados apresentaram maior sensibilidade quando as amostras foram coletadas no período de 0 ao 3º dia de doença. Dados publicados recentemente confirmam a maior sensibilidade para detecção de NS1 até o terceiro dia de doença.^{17,18,19}

Do quarto ao sexto dia, a sensibilidade foi menor se comparada com o período anterior, pois há o início da produção de anticorpos para DENV. A partir do sexto dia, não se obteve nenhum isolamento de vírus. Igualmente negativos foram os resultados com *kits* de detecção da proteína NS1. Isso era esperado, dado que o nível de anticorpos IgM está em elevação. Sendo assim, a melhor técnica para o diagnóstico passa a ser o ensaio MAC-ELISA.²⁰

Tanto para a técnica de isolamento viral como para os *kits* de captura da proteína NS1 observou-se maior positividade nas amostras coletadas até o terceiro dia de doença. Portanto, a recomendação de coleta de amostras até o terceiro dia de doença é imprescindível para o bom desempenho dessas metodologias.

Com o passar dos dias, desde o início dos sintomas, a sensibilidade dos *kits* diminui, provavelmente como reflexo da redução da carga viral e da proteína NS1. Também em outros estudos foi escassa a presença da proteína NS1 entre o sétimo e o nono dia e inexistente após esse período.⁶

Os *kits* testados apresentaram maior sensibilidade para os sorotipos DENV-1 e DENV-3 e menor sensibilidade para o sorotipo DENV-2. Outros estudos também evidenciaram variações de sensibilidade em relação aos sorotipos DENV-3²¹ e DENV-2 e DENV-4.^{22,23}

Estudos mostram que a sensibilidade reduzida para o DENV-2 poderia estar relacionada à resposta sorológica dos pacientes infectados.⁷ Outra explicação seria a menor afinidade do NS1-sonda específica e anticorpos monoclonais detectores (conjugado) para

o DENV-2 ou talvez a baixa circulação desse sorotipo no período estudado.⁷

No Estado de São Paulo o sorotipo DENV-4 foi detectado em 2011, portanto não foi possível avaliar os *kits* com relação a esse sorotipo.

A amostra com diagnóstico confirmado para herpes, reagente pelo *kit* Platelia NS1 (Bio-Rad), é provavelmente um resultado falso positivo. Salienta-se que esse *kit* foi o que apresentou a maior sensibilidade e menor especificidade.

Para completar a análise, o teste de IH foi realizado para confirmar os resultados do MAC-ELISA e para evidenciar infecções secundárias. As infecções secundárias são caracterizadas por apresentarem resposta fugaz de anticorpos IgM, rápido aumento de anticorpos IgG e, conseqüentemente, dificuldade para detecção de NS1 e isolamento de vírus.

Os anticorpos inibidores da hemaglutinação, na primeira infecção, são detectáveis a partir do sétimo dia de doença. Porém, a presença desses anticorpos em títulos altos antes do sétimo dia é sugestiva de infecção secundária corrente por DENV ou outro flavivírus.

Vale destacar a amostra SPH 288112, obtida no quinto dia de doença, com resultado reagente no MAC-ELISA e título de anticorpos inibidores da hemaglutinação elevado para os quatro sorotipos do DENV. Essa amostra resultou inconclusiva apenas no teste NS1 Bio-Rad ELISA, sinalizando uma possível infecção. Nos demais *kits* estudados a amostra apresentou resultado não reagente (Quadro 2).

Em infecções secundárias a pré-existência de anticorpos diminui a sensibilidade dos *kits* NS1. Assim, deve-se complementar o diagnóstico com pesquisa de anticorpos IgM e IgG para aumentar a sensibilidade na detecção de casos.²⁴ Os *kits* imunocromatográficos

Bio-Rad e Bioeasy, quando utilizados com amostras de pacientes coletadas entre 4 e 6 dias pós-infecção, apresentaram menor sensibilidade (73%).

As diferenças nos resultados apresentados e os obtidos por outros estudos podem estar relacionadas à escolha das amostras para o painel, ao número de amostras positivas para cada sorotipo, à presença de amostras de pacientes com infecções primárias ou secundárias e também ao número elevado de amostras com coleta na fase aguda tardia de infecção.

CONCLUSÃO

A utilização de *kits* de diagnóstico rápido para a detecção da proteína NS1 pode ser uma importante ferramenta para otimizar os recursos no monitoramento dos sorotipos de DENV circulantes, se utilizados como teste de triagem de amostras destinadas ao isolamento de vírus.

É importante lembrar que a capacidade laboratorial para atender à demanda de amostras para isolamento de vírus dengue não pode ser comparada àquela de testes imunocromatográficos ou imunoenzimáticos, devido à alta complexidade e o custo elevado da técnica de isolamento de vírus. Os *kits* testados apresentaram resultados rápidos e confiáveis, podendo ser usados para diagnóstico, desde que as amostras sejam obtidas na fase inicial da infecção – até o terceiro dia de doença. Entretanto, é recomendável sempre o uso associado a outros critérios, como clínico e epidemiológico, ou mesmo outras técnicas laboratoriais.

Os *kits* Dengue NS1 Ag Strip (Bio-Rad Laboratories, Marnes La Coquette, França), Dengue Duo Test (Bioeasy Diagnóstica) e PlateliaTM Dengue NS1 Ag Kit (Bio-Rad Laboratories, Marnes La Coquette, França) foram os que apresentaram maior sensibilidade e valor

preditivo negativo. O Dengue Early ELISA (Panbio Europa), de acordo com as condições em que foi testado, deve melhorar a sensibilidade.

Quando o objetivo é subsidiar as ações da vigilância epidemiológica e de controle de vetores, o prejuízo causado pela emissão de um resultado falso positivo é menor do que aquele causado pelo falso negativo. Por isso, a escolha por um teste diagnóstico deverá sempre levar em consideração a alta sensibilidade.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. 7. ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2008.
2. World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva, 2009.
3. Pires Neto RJ, Lima DM, Paula SO, Lima CM, Rocco IM, Fonseca BAL. Molecular epidemiology of type 1 and 2 dengue viruses in Brazil from 1988 to 2001. *Brazilian J Med Biol Res.* 2005;38(6):843-52.
4. Deubel V, Nogueira RMR, Drouet MT, Zeller M, Reynes J, MA DQ. Direct sequencing of genomic cDNA fragment amplified by the polymerase chain reaction for molecular epidemiology of dengue 2 virus. *Arch Virol.* 1992;129:197-210.
5. Santos NOS, Romanos MTV, Wigg MD. Introdução à virologia humana. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2. ed.; 2002.
6. Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand DM. 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;40:376-81.
7. Shu PY, Yang CF, Kao JF, Su CL, Chang SF, Lin CC, et al. Application of the dengue virus NS1 antigen rapid test for on-site detection of imported dengue cases at airports. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;16:589-91.
8. Fletcher RH, Fletcher SW, Wagner EH. *Clinical epidemiology: the essentials.* Baltimore: Williams & Wilkins; 2. ed, 1988.
9. Guedes MLS. & Guedes J S. *Bioestatística para profissionais de saúde.* Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia/ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Ao Livro Técnico S. A.;1988.
10. Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Velez M, Oliver A. Mosquito cell culture and specific

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos colegas do Núcleo de Doenças de Transmissão Vetorial (NDTV) do Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Central: Antonia Torres Marti, Vera Maura Barbosa, Selma Marina C. Petrella e Felipe Scassi Salvador, pela produção de reagentes biológicos e colaboração na realização dos testes. Às empresas Bioeasy, Bio-Rad e Medivax pela doação de *kits* para estudo.

- monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg.* 1984;33:158-65.
11. Casals J. Immunological technique for animal viruses. In: Moramorosh K, Koprowski H (eds): *Methods in virology*. 3. ed. New York: Academic Press; 1967, p.175-81.
 12. Sever JL. Application of a microtechnique to viral serological investigations. *J Immunol.* 1962;88:320-9.
 13. Clarke DH, Casals J. Technique for hemagglutination and hemagglutination inhibition with artropod-borne viruses. *Am J Trop Med Hyg.* 1958;7:561-73.
 14. Poersch CO. Desenvolvimento e avaliação de métodos moleculares para o diagnóstico da dengue. [tese de doutorado]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 2007.
 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;38:1053-7.
 16. Fonseca BAL, Fonseca SNS. Dengue virus infections. *Curr Opin Pediatr.* 2002; 14(1):67-71.
 17. Dussart P, Labeau B, Lagathu G, Louis P, Nunes MRT, 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.
 18. 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 viremia and antibody response. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(1):e360.
 19. Dussart P, Petit L, Labeau B, Bremand L, Leduc A, Moua D, et al. Evaluation of two new commercial tests for the diagnosis of acute virus infection using NS1 antigen detection in human serum. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2:e208.
 20. Kuno G, Gomez I, Gubler DJ. Detecting artificial anti dengue IgM complexes using a enzyme linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg.* 1987;36:153-9.
 21. Lima MRQ, Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Santos FB.. Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(7):e738.
 22. McBride WJH. Evaluation of dengue NS1 test kits for the diagnosis of dengue fever. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009;64:31-6.
 23. Ramirez AH, Moros Z, Comach G, Zambrano J, Bravo L, Pinto B, et al. Evaluation of dengue NS1 antigen detection tests with acute sera from patients infected with Dengue virus in Venezuela. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009;65:247-53.
 24. Tricou V, Vu TTH, Quynh NVN, Nguyen CVV, Tran TH, Farrar J, et al. Comparison of two dengue NS1 tests for sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. *BMC Infectious Diseases.* 2010;10:142.

Recebido em: 03/01/2011
Aprovado em: 05/05/2011

Correspondência/correspondence to:

Ivani Bisordi
Av. Dr. Arnaldo, 355 – Cerqueira César – CEP: 01246-902 – São Paulo/SP – Brasil
Tel.: 55 11 3068-2901/2902 – Fax: 11 3085-3505 – E-mail: ibisordi@ial.sp.gov.br