



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Los anticuerpos monoclonales y su uso en el diagnóstico e investigación

Alumno/a: Rocío Villar Villar

Junio, 2023

Índice

1. Objetivo.....	4
2. Introducción	4
2.1 Anticuerpos.....	4
2.2 Aplicación de anticuerpos monoclonales para la detección virus Dengue.....	7
3. Material y métodos.....	10
3.1. Aislamiento del virus	10
3.2. Pruebas moleculares	13
3.3. Pruebas inmunológicas	15
3.4. Técnica de ELISA	19
3.4.1 Anticuerpos primarios	20
3.4.2 Antígenos.....	21
3.4.3 Anticuerpos secundarios.....	22
3.4.4 Anticuerpos conjugados con enzimas.....	22
3.5 Tipos de ELISA	23
3.6. Pruebas rápidas.....	24
4. Resultados y discusión	26
5. Bibliografía	30

Índice de figuras

Figura 1: Estructura del anticuerpo.....	
Figura 2: Quimerización y humanización de anticuerpos monoclonales	6
Figura 3:Ciclo replicativo del Dengue	8
Figura 4:Efecto citopático producido por el virus Dengue en células C5/36HT.	11
Figura 5:Células VERO infectadas con Dengue	13
Figura 6:Distribución del Dengue en el mundo en el año 2000.	15
Figura 7:Técnica de inhibición de la hemaglutinación para el diagnóstico de dengue.	17
Figura 8:Técnica fijación del complemento para diagnóstico de dengue	18
Figura 9:Tipos de ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA)	24
Figura 10:Prueba rápida de casete para el diagnóstico de Dengue.	25
Figura 11:. Comparación de las técnicas de diagnóstico directo e indirecto en relación a su confianza y accesibilidad	28

Índice de tablas

Tabla 1:Pruebas inmunológicas comerciales que se emplean con mayor frecuencia para el diagnóstico de Dengue.	26
Tabla 2:Ventajas y desventajas de las técnicas empleadas para el diagnóstico de la infección por el virus Dengue.	30

Resumen

Los anticuerpos son glicoproteínas, componentes moleculares y humorales del sistema inmune, que tienen la capacidad de reconocer y bloquear virus, bacterias, parásitos u hongos. Los anticuerpos monoclonales, los cuales son producidos por los linfocitos B, han producido una revolución en el diagnóstico y tratamiento de numerosas enfermedades como es el caso del Dengue.

El Dengue es la enfermedad viral transmitida por vectores de mayor importancia en el mundo. Debido a que no existe vacuna hasta el momento, el diagnóstico temprano y específico es la única herramienta para brindar un tratamiento rápido y oportuno al paciente. La proteína no estructural 1 (NS1) del virus del Dengue es un objetivo útil para el diagnóstico de la infección ya que circula abundantemente por la sangre durante la fase aguda tanto en infecciones primarias como secundarias. Otras alternativas de pruebas confirmativas son el aislamiento viral, la detección de antígenos o de secuencias genómicas virales en muestras de suero o las técnicas serológicas.

Abstract

Antibodies are glycoproteins, molecular and humoral components of the immune system, which have the capacity to recognize and block viruses, bacterias, parasites or fungis. Monoclonal antibodies, which are produced by B lymphocytes, have produced a revolution in the diagnosis and treatment of numerous diseases such as Dengue.

Dengue is the most important vector-borne viral disease in the world. Since there is no vaccine so far, early and specific diagnosis is the only tool to provide prompt and timely treatment to the patient. The non-structural protein 1 (NS1) of the Dengue virus is a useful target for the diagnosis of the infection since it circulates abundantly in the blood during the acute phase in both primary and secondary infections. Other alternative confirmatory tests include viral isolation, detection of antigens or viral genomic sequences in serum samples, or serological techniques.

1. Objetivo

El objetivo de este trabajo es una revisión bibliográfica sobre la utilización de los anticuerpos monoclonales en investigación clínica en relación al diagnóstico de enfermedades infecciosas causadas por virus como es el caso del Dengue.

2. Introducción

2.1 Anticuerpos

Los anticuerpos (Abs) son glicoproteínas pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) que son secretadas por las células B para identificar y neutralizar organismos extraños o antígenos. Los anticuerpos comprenden dos cadenas pesadas y dos ligeras y se agrupan en diferentes isotipos dependiendo del tipo de cadena pesada que contengan.

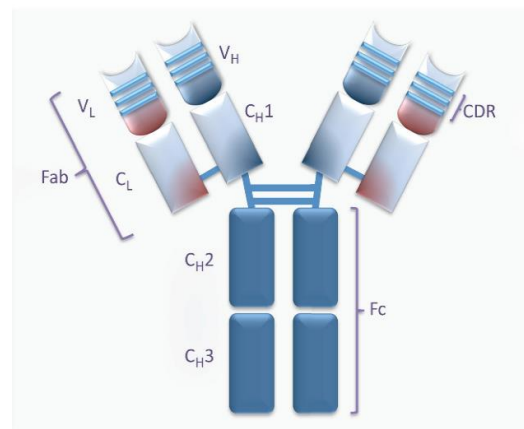


Figura 1: Estructura del anticuerpo

(Buss et al., 2012)

Los anticuerpos monoclonales terapéuticos son típicamente del isotipo γ -inmunoglobulina (o IgG) (representación esquemática en la Figura 1). Las regiones hipervariables de cada cadena pesada y ligera se combinan para formar el sitio de unión al antígeno, denominado dominio de unión al antígeno del fragmento (Fab), mientras que el dominio del fragmento cristalizable (Fc) responsable de la función efectora se compone de dos dominios constantes (Buss et al., 2012).

La especificidad de los anticuerpos está mediada por sus dominios variables y representada por la región Fab. Los dominios variables se pueden subdividir además en regiones hipervariables (o regiones determinantes de la complementariedad [CDR]) que se unen al antígeno directamente y regiones marco que sirven como andamiaje para que la CDR entre en contacto con el antígeno.

Aunque la respuesta inmunitaria a un antígeno es de naturaleza policlonal, en 1975 se describió la producción in vitro de anticuerpos murinos a partir de hibridomas (Kohler et al., 1975). Los anticuerpos monoclonales se descubrieron en la primera mitad de los años setenta por Milstein y Köhler, que estaban investigando los

mecanismos moleculares de la generación de diversidad de los anticuerpos y necesitaban producir una célula B inmortal con especificidad conocida, para así poder analizar las mutaciones de los genes de las Ig. Para conseguir esta célula inmortal fusionaron una línea de células de mieloma murino con células de bazo de un animal inmunizado. Pudieron seleccionar solamente las células híbridas y los clones con especificidad conocida.

Este trabajo tuvo una gran transcendencia ya que por primera vez se pudo disponer de cantidad ilimitadas de anticuerpos con especificidad conocida.

Las células tumorales de mieloma de ratón procedían todas ellas de una línea creada por Michael Potter en los años sesenta denominada MOPC21, deficitarias en enzimas clave para la síntesis de oligonucleótidos por la vía de rescate. El agente fusionante inicial era el virus Sendai, pero pronto se sustituyó por polietilenglicol. Las células B provenían de ganglios linfáticos o del bazo de ratones inmunizados repetida y eficazmente con el antígeno deseado. Estas células se cultivaban con las de mieloma y el agente fusionante en un medio de cultivo de composición especial (HAT) que no permite la supervivencia de las de mieloma no hibridadas los linfocitos B no fusionados morían también y quedaban las células fusionadas. La especificidad se analizaba en los sobrenadantes de los pocillos de las placas de cultivo, seleccionando sólo los deseados y al final se llevaba a cabo la clonación por dilución límite u otros medios (Galfré et al.,1981). Los hibridomas creados pueden conservarse indefinidamente en dimetil sulfóxido y los anticuerpos monoclonales se purifican a partir de los sobrenadantes.

El primer uso en terapia humana fue en 1982 para el tratamiento de un linfoma (Miller et al.,1982). Pronto se vio que el uso de monoclonales murinos arrastraba el problema de la tolerancia con producción de anticuerpos humanos antimurinos que disminuían su eficacia. Para solventar estas dificultades se exploraron diversas alternativas, de las que las más importantes son la quimerización y la humanización. La quimerización se desarrolló en 1984 (Morrison et al.,1982). Por quimerización se entiende la producción de anticuerpos monoclonales en los que solamente la región variable es de origen murino, y el resto de las cadenas pesadas y ligeras es de origen humano.

En los anticuerpos humanizados sólo son murinas las regiones hipervariables de las cadenas ligeras y pesadas. La mitad de los monoclonales utilizados en terapia humana son quiméricos o humanizados. Otra alternativa son los monoclonales

humanos que se producen en animales transgénicos portadores de genes de Ig humanos.

La técnica de hibridomas es de los avances más importantes en biomedicina, ya que ha permitido generar grandes cantidades de anticuerpos específicos. Al mismo tiempo ha permitido estudiar en detalle la estructura molecular de los anticuerpos y su interacción con los diversos antígenos. Su principal impacto ha sido como reactivos de elección para purificar antígenos, localizar antígenos en cortes histológicos (inmunofluorescencia, inmunohistoquímica) y en células (citometría de flujo), y en la cuantificación de antígenos en muestras biológicas con fines de investigación y diagnóstico (ELISA, Western Blot).

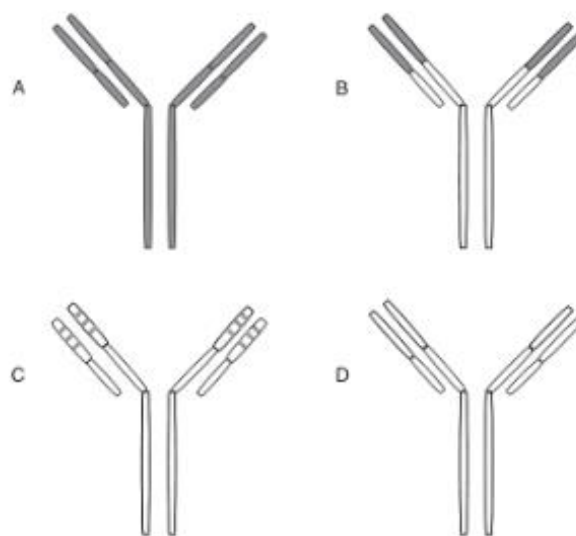


Figura 2: Quimerización y humanización de anticuerpos monoclonales

(Villasante.,2020)

- A. *Monoclonal murino*
- B. *Monoclonal quimérico en que las regiones variables son de origen murino siendo humano el resto de las cadenas*
- C. *Monoclonal humanizado: sólo incluye los segmentos hipervariables de origen murino*
- D. *Monoclonal humano*

Por otra parte, han ganado importancia por su potencial terapéutico, ya que pueden neutralizar específicamente moléculas específicas si se administran en pacientes con enfermedades autoinmunes o neoplásicas. Sin embargo, son fuertemente inmunogénicos y los pacientes pueden producir anticuerpos que neutralizan al terapéutico.

Como se ha dicho anteriormente, una de las posibles aplicaciones de los anticuerpos monoclonales es la detección de antígenos.

2.2 Aplicación de anticuerpos monoclonales para la detección virus Dengue.

Esta revisión bibliográfica se va a basar en la aplicación de este tipo de anticuerpos para la detección del virus del Dengue.

El dengue anteriormente denominada fiebre hemorrágica del dengue y síndrome de shock por dengue (DHF/DSS), es una de las principales enfermedades transmitidas por vectores en todo el mundo y más de 100 millones de personas se infectan cada año (Gubler y Meltzer.,1999),(Ganguly et al.,2013).

La fiebre del dengue es una importante enfermedad viral transmitida por mosquitos de los seres humanos. Durante 2002, más de 30 países latinoamericanos reportaron más de un millón de casos de dengue (FD) con un gran número de dengue hemorrágico (FHD) (Whitehorn y Farrar., 2010). Se notifican cada vez más casos de síndrome de choque por dengue (DSS) y de dengue hemorrágico más grave y potencialmente letal en niños que soportan gran parte de la carga de la enfermedad.

El virus del dengue es endémico en al menos 100 países en todo el mundo y causa más casos humanos que cualquier otro virus transmitido por mosquitos. La tasa de mortalidad por dengue hemorrágico en la mayoría de los países es del 5%, principalmente entre niños y adultos jóvenes. Causa manifestaciones clínicas como fiebre, náuseas, vómito, malestar general, dolor corporal generalizado, sangrado de mucosa, estos son los síntomas que se presentan en la fase febril que dura entre tres y cinco días. Posteriormente, la fiebre disminuye, aumenta el hematocrito debido al incremento de la permeabilidad vascular con la consecuente extravasación de los líquidos, y también se presenta una marcada y progresiva leucopenia y trombocitopenia, lo que da lugar a la fase crítica que dura entre 24 y 48 horas. Finalmente, si logra pasar la fase crítica llega la fase de recuperación en la que se produce una reabsorción de líquidos extravasculares, mejora el estado general, disminuyen los síntomas gastrointestinales, se normaliza el hematocrito y el recuento de leucocitos acompañado con el recuento de plaquetas.

Tiene cuatro serotipos (DENV-1, DENV-2,DENV-3 y DENV-4), que son antigénicamente distintos (Calisher et al., 1989 , Ganguly et al., 2013. Es un virus de ARN que pertenece a la familia Flaviviridae y al género Flavivirus.

El ciclo replicativo del virus dengue se inicia cuando un mosquito infectado pica a un huésped susceptible y le transfiere partículas virales infecciosas. Inicialmente, las partículas virales son capturadas por las células dendríticas intradérmicas (células de Langerhans) que se movilizan hacia los ganglios linfáticos locales (mientras el virus se replica) para realizar la presentación antigénica a los linfocitos T; simultáneamente, el virus infecta a otras células blanco de los ganglios, como los macrófagos y los linfocitos T.

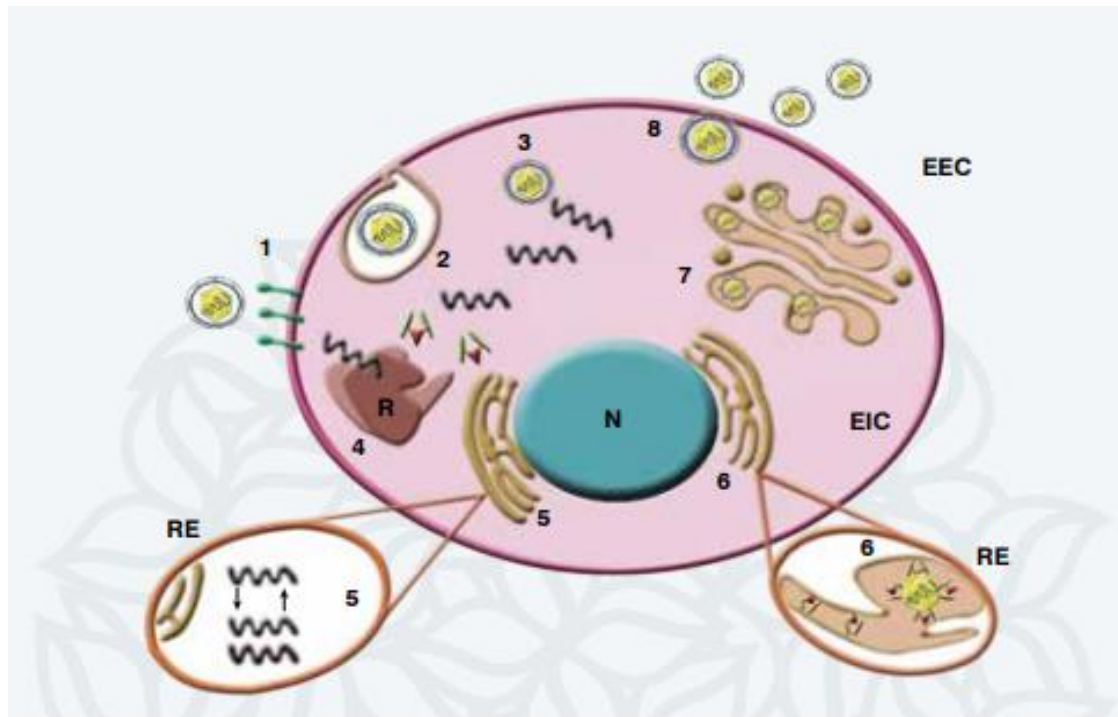


Figura 3: Ciclo replicativo del Dengue

(Ruiz et al., 2012)

1. Unión del virus a receptores presentes en la membrana plasmática.
2. Endocitosis mediada por clatrina.
3. Fusión de la membrana endosomal con la envoltura viral.
4. Traducción de proteínas.
5. Replicación del genoma viral.
6. Ensamblaje de la partícula viral inmadura.
7. Maduración de la partícula viral.
8. Liberación por gemación de las partículas virales maduras.

La proteína no estructural (NS) 1 del virus del dengue es una glicoproteína de 46–50 kDa que se expresa en células de mamífero infectados, tiene isoformas polimórficas (monómero, dímero, hexámero y oligómero. (Alcon et al., 2002 , Flamand et al., 1999).

Las 7 proteínas NS son proteínas intracelulares a excepción de la proteína NS1 del dengue, que existe como proteína secretada y asociada a la membrana. Se sabe que la proteína NS1 es producida durante la replicación viral. Posee determinantes no sólo específicos de grupo sino también específicos de tipo y ha sido reconocido como un antígeno importante en la infección por dengue (Young et al., 2000), (Falconar y Young, 1990)

Cada isoforma tiene un papel importante en el ciclo de vida viral. Tras la traducción del genoma del ARN viral dentro de las células de mamíferos infectadas, NS1 se sintetiza primero como un monómero soluble que se dimeriza rápidamente después de la modificación postraduccional en la luz del retículo endoplásmico (ER) y posteriormente se expresa como una proteína anfipática asociada a la membrana. Luego, los dímeros NS1 se transportan al complejo de Golgi y se ensamblan en hexámeros y se secretan en espacio extracelular como partículas de lipoproteínas (Müller, Winkler et al., 1989). La NS1 hexámera secretada se utiliza para el diagnóstico del dengue y se detecta en concentraciones de hasta 50 µg/ml en el suero de pacientes con dengue durante la fase febril de su enfermedad.

La función precisa de la proteína NS1 del dengue sigue sin estar clara. Sin embargo, la detección de antígenos de dengue no estructurales puede ser beneficiosa para un diagnóstico rápido de infección en etapa temprana debido a su larga vida media en la sangre.

Hay otras proteínas estructurales, pero una de las más importantes en la proteína de la envoltura E, la cual tiene un peso molecular de 50kDa y se distribuye por la superficie del virus formando complejos homodiméricos de tipo cabeza-cola. Posee tres dominios I, II y III. Los dominios I y II son determinantes para las interacciones entre el virus y los receptores de las células vulnerables a las que infecta. Por otro lado, esta glucoproteína es el principal inmunógeno del virus el cual estimula la respuesta inmune del individuo e induce la producción de anticuerpos específicos contra esa infección.

Por lo tanto, existe una necesidad urgente de reactivos de diagnóstico, profilácticos y terapéuticos para controlar la FHD. Los métodos comúnmente utilizados para diagnosticar el dengue incluyen diagnóstico molecular dirigido al ARN viral, inmunodiagnóstico dirigido a anticuerpos específicos contra el DENV y antígenos virales. Para superar las limitaciones de los anticuerpos terapéuticos y mejorar su

eficacia, se han ideado y aplicado varios enfoques de ingeniería y modificación al formato molecular de inmunoglobulina convencional.

Podría decirse que el más destacado de estos enfoques son los formatos de anticuerpo biespecífico (bsAb). Las ideas básicas detrás de estos formatos son bastante sencillas: para bsAb, la participación simultánea de dos objetivos diferentes por una sola molécula similar a un anticuerpo puede tener efectos terapéuticos sinérgicos o emergentes (Shim H.,2020). Los anticuerpos monoclonales biespecíficos tienen muchas aplicaciones en el área de la inmunodetección y se han explotado previamente para la administración dirigida de fármacos, el desarrollo de vacunas y la terapia génica (Khan et al., 2011, Khan et al., 2012 , Malabadi et al., 2012 , Sun Woo et al., 2013).

3. Material y métodos

Con el paso de los años se han ido usando y desarrollando diferentes técnicas diagnósticas, que abarcan desde técnicas celulares hasta las moleculares pasando por las inmunológicas que son las más comunes. Las técnicas de diagnóstico se pueden clasificar en directas si lo que se identifica es una partícula viral completa o una proteína que actúe como antígeno; o indirecta si se identifica la respuesta inmune que provoca la infección por un virus, es decir, la presencia de anticuerpos específicos.

3.1. Aislamiento del virus

El aislamiento del virus fue el primer método tradicional de diagnóstico usado para detectar la infección por DENV. Para esto, las muestras clínicas tomadas de los pacientes se cultivan en una variedad de líneas celulares de mosquito o de mamífero o en mosquitos vivos (Shu et al.,2004), (Guzmán et Kourí.,1996). Las muestras de sangre tomadas de pacientes infectados que experimentan una enfermedad febril hasta 5 días después del inicio de la enfermedad dan los resultados más exitosos. Sin embargo, el aislamiento del virus de pacientes con infección secundaria se ve dificultado por la rápida producción anamnésica de anticuerpos de reacción cruzada al principio de la fase aguda de la enfermedad que forman complejos inmunitarios con el virus circulante (Teles et al., 2005). Aunque la detección de DENV por aislamiento del virus es definitiva, no es particularmente práctica, ya que el aislamiento puede tardar días o semanas en realizarse (Lanciotti et al.,1992).

Como hemos comentado anteriormente, la inoculación del virus se puede realizar en distintos tipos de células, pero unas en concreto tienen mejores resultados en cuanto a la replicación viral. Las líneas celulares de mosquito son las que más se utilizan para aislar todos los serotipos del DENV. Proceden de larvas de *Aedes albopictus*, *Aedes pseudoscellaris*, y *Toxorynchites amboinensis*. Estas líneas son más sensibles a la replicación viral que las de origen mamífero como también son más fáciles de cultivar y más susceptibles a la formación de efecto citopático de tipo sincitio o células gigantes multinucleadas. (Guzmán et Kourí.,2004), (Chappel et al.,1971).

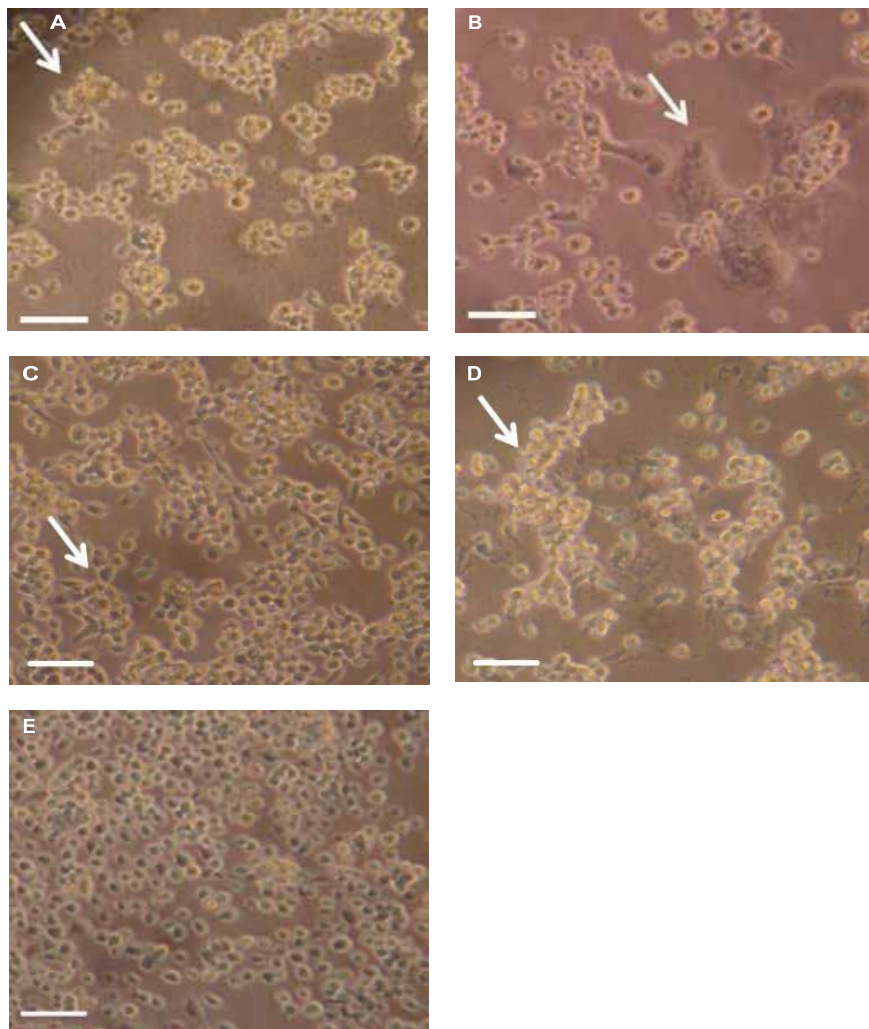


Figura 4: Efecto citopático producido por el virus Dengue en células C5/36HT.

(Ruiz et al.,2012)

En la figura 4 se puede observar el efecto citopático producido por el virus Dengue en células C5/36HT. Cada imagen equivale a una cepa con un serotipo del virus en células de mosquito a los ocho días de infección.

- En la imagen A se representa DENV-1. Se observa un efecto citopático caracterizado por la agrupación de células.*
- En la imagen B se representa DENV-2. Se observa como efecto citopático un sincitio característico.*
- En la imagen C se representa DENV-3. Se observa la agrupación y un ligero cambio de la morfología celular.*
- En la imagen D se representa DENV-4. Se observa la formación de un sincitio.*
- En la imagen E se representa un control sin virus dengue.*

Por otro lado, las líneas celulares de mamíferos que se utilizan para el aislamiento del virus dengue son las células LLCMK2 (células epiteliales de riñón de mono Rhesus Macaca mulatta), VERO (células epiteliales renales del mono verde africano) y BHK21 (fibroblastos de riñón de hámster). De estas líneas, la más sensible es LLCMK2.

Sin embargo, la sensibilidad de las líneas de mamífero puede variar dependiendo del serotipo o de la cepa infectante.

En general, todas estas líneas celulares requieren de un periodo de tiempo mayor que las células de mosquito y de varios pases ciegos para obtener títulos virales altos. Adicionalmente, la visualización del efecto citopático también depende del serotipo viral y del tipo de célula y, en algunos casos, a pesar de que las células están infectadas, no se observa dicho efecto.

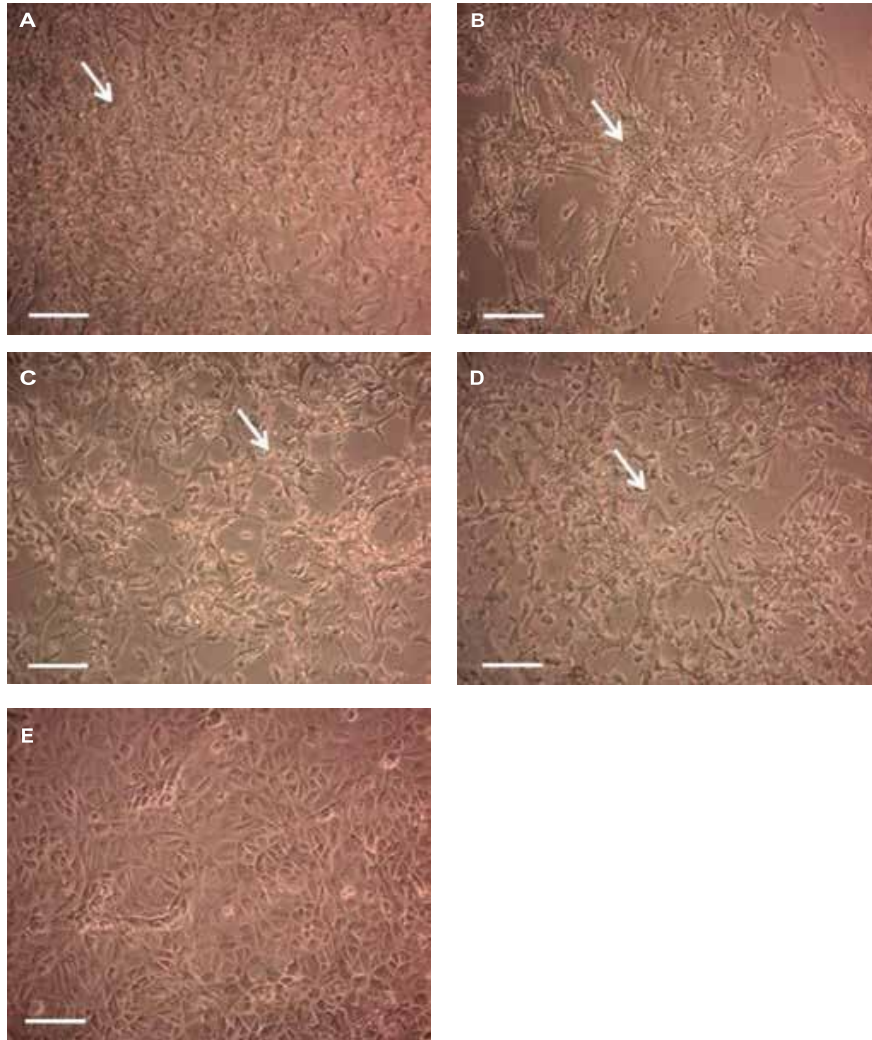


Figura 5: Células VERO infectadas con Dengue

(Ruíz et al., 2012)

En la figura 5 se puede observar las células Vero las cuales han sido infectadas con el virus del Dengue.

En cada imagen aparece cada uno de los cuatro serotipos virales a los siete días de infección.

- *En la imagen A se representa DENV-1. Se observan células ovaladas respecto al control.*
- *En la imagen B se representa DENV-2. Se observa un alargamiento de las células.*
- *En la imagen C se representa DENV-3. Se observa un alargamiento de las células.*
- *En la imagen D se representa DENV-4. Se observan células redondeadas.*
- *En la imagen E se presentan las células sin virus, por lo tanto, se usa como control.*

3.2. Pruebas moleculares

Los métodos basados en la PCR proporcionan un diagnóstico en el mismo día o al día siguiente durante la fase aguda de la enfermedad. Posteriormente se modificó a un ensayo RT-PCR que se adoptó en todo el mundo. Una gran ventaja de esta técnica es que el ARN viral se puede detectar desde el inicio de la enfermedad y es

sensible, específico, rápido, menos complicado que el método de aislamiento viral citado anteriormente.

La técnica de RT-PCR permite la detección del agente de forma directa en muestras de suero, células infectadas, sobrenadantes celulares, así como en muestras de tejidos frescos e incluidas en parafina por FDH. A su vez ha permitido determinar la presencia de infecciones concurrentes por 2 serotipos.

Además de su utilidad como un método de diagnóstico rápido, también ha sido empleado en el estudio genómico de cepas de dengue, lo que permite por medio del análisis mediante enzimas de restricción o secuenciación nucleotídica la clasificación de las cepas en genotipos.

Mediante la utilización de la PCR y la secuenciación nucleotídica se pudo determinar el genotipo de las cepas de dengue 1 y 2, aisladas en los brotes ocurridos en Cuba en los años 1977, 1981 y 1997; así como el posible origen geográfico de la cepa de dengue 3 que se reintrodujo en la región de las Américas en 1994. (Guzmán et al.,1965).

Por último, la combinación de ambas metodologías permitió confirmar el genotipo de la cepa de dengue 2 causante de la epidemia de FHD de 1981, a partir del estudio en muestras de hígado embebidas en parafina que habían sido guardadas por más de 16 años.

También es importante destacar que gracias a esta técnica se puede cuantificar con un marcador de severidad de la enfermedad, de manera que se puede cuantificar el ADNc viral. Algunos autores como Laue y otros aplicaron un protocolo para medir la cantidad de ADNc durante el proceso de amplificación que permitía medir la cantidad de ADN a la vez que se iba amplificando. (Shu et al.,2000)

A pesar de todas las ventajas y posibles aplicaciones de este tipo de técnica cabe destacar que el virus del Dengue afecta principalmente a regiones tropicales y subtropicales como países como sudeste asiático, las islas del Pacífico Occidental, América Latina y África.

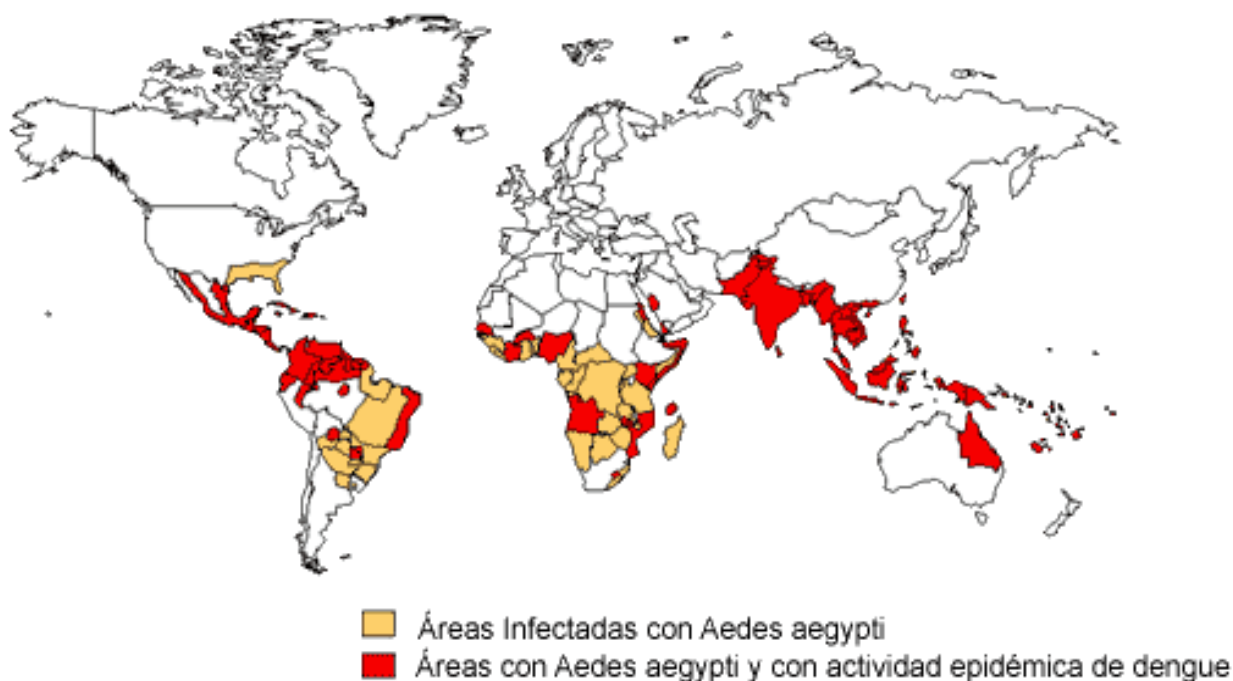


Figura 6: Distribución del Dengue en el mundo en el año 2000.

Wikipedia contributors. (s/f). Archivo:Distribución dengue 2000.png. Wikipedia, The Free Encyclopedia. (https://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Distribuci%C3%B3n_dengue_2000.png)

Debido a las zonas concretas en las que este virus está presente el uso de la técnica RT-PCR está impedido o es muy complicado puesto que el ARN viral se ve afectado por las fluctuaciones de temperatura y retrasos durante el transporte al laboratorio, las instalaciones para RT-PCR son limitadas ya que se necesita un equipo especializado y personal capacitado para realizar el análisis.

Entonces, este método no es siempre una opción en entornos remotos de escasos recursos económicos en donde el dengue es endémico.

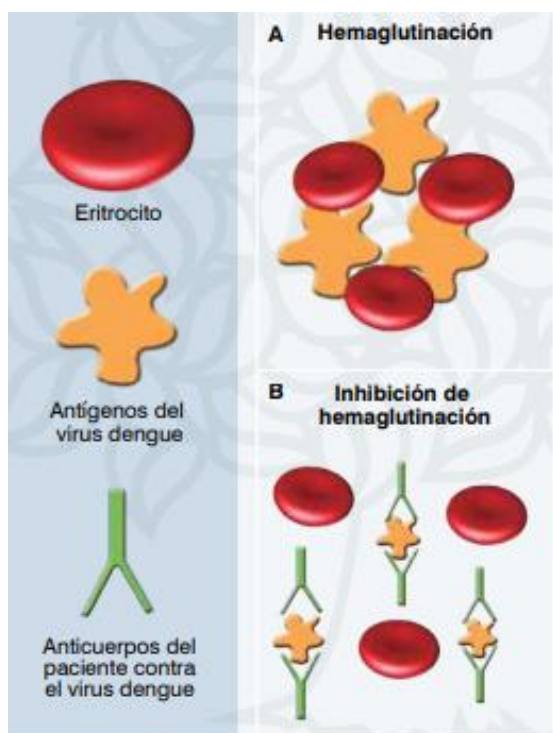
3.3. Pruebas inmunológicas

Un importante campo de detección para este virus son las técnicas inmunológicas las cuales permiten la detección de anticuerpos o de antígenos presentes en el suero de un paciente infectado. Por lo tanto, estas técnicas se basan en reacciones antígeno-anticuerpo mediante la formación de un inmunocomplejo, las cuales se pueden evidenciar por métodos de precipitación, aglutinación, fluorescencia, actividad enzimática etc. Para evitar falsos positivos o negativos la OMS recomienda el uso de sueros pareados, es decir, tomar una muestra de suero en la fase aguda y

otra muestra en la fase convaleciente. Dado que el suero en la fase aguda puede ser negativo para IgM y positivo cuando está en la fase convaleciente.

La infección por dengue en un huésped no inmune previamente produce una respuesta primaria de anticuerpos caracterizada por una respuesta de anticuerpos lenta y de baja cantidad. El anticuerpo IgM es el primer isotipo de inmunoglobulina que aparece. La IgG anti-dengue aparece en un nivel bajo al final de la primera semana del inicio de la enfermedad y aumenta lentamente. Por el contrario, durante una infección secundaria (infección por dengue en un huésped previamente inmune al dengue), los niveles de anticuerpos aumentan extremadamente rápido. Los altos niveles de IgG son detectables incluso en la fase aguda y aumentan drásticamente durante las siguientes dos semanas (Innis et al.,1989).

La prueba de la hemaglutinación (Clarke et al.,1958), es una técnica que permite la detección del virus por la capacidad que tienen algunas de sus proteínas de envoltura para aglutinar eritrocitos de una especie animal determinada o de un humano. Sin embargo, existe otra variante que es la prueba de inhibición de la hemaglutinación en la que se detectan anticuerpos específicos dirigidos contra el virus que evitan la aglutinación de los glóbulos rojos en presencia del virus. Para ello, el suero del paciente en donde se intuye que hay anticuerpos específicos se pone en contacto con el virus y posteriormente se agregan glóbulos rojos. Si en el suero hay anticuerpos que reconocen al virus, se unirán a éste y se inhibirá la hemaglutinación. Esta técnica fue propuesta en 1958 por Clarke y Casals.



- Si el paciente no tiene anticuerpos específicos contra el dengue, los antígenos virales inducen la hemaglutinación (Resultado negativo).
- Cuando en el suero del paciente hay anticuerpos específicos contra el virus del dengue, se inhibe la hemaglutinación (Resultado positivo).

Figura 7: Técnica de inhibición de la hemaglutinación para el diagnóstico de dengue.

(Ruiz et al.,2012)

Este ha sido el ensayo serológico más utilizado para el diagnóstico del dengue. De hecho, la Organización Mundial de la Salud ha desarrollado pautas para ayudar en la interpretación de los títulos de anticuerpos contra el virus del dengue obtenidos con la prueba de inhibición de la hemaglutinación.

La inhibición de la hemaglutinación es un método sensible (97,5%) para la detección de anticuerpos y específico (98,7%) contra el virus del dengue, y es especialmente útil para identificar IgM en infecciones primarias tanto en la fase aguda de la enfermedad como en la fase de convalecencia. Debido a las facilidades técnicas y el poco consumo de tiempo muchos laboratorios lo siguen utilizando como principal herramienta de diagnóstico. (Baumgarten et al.,1980), (Anantapreecha et al.,2007).

Hasta hace unas décadas, la inhibición de la hemaglutinación se utilizaba de rutina para evaluar las muestras de pacientes sospechosos de infección por el virus dengue. A las muestras con resultado sugestivo de infección por dengue se les realizaba la técnica de fijación del complemento para confirmar el diagnóstico, ya que tanto la sensibilidad como la especificidad de estas pruebas pueden ser comparables. (Corney et al.,1972), (Khai-Ming et al.,1958), (Veseniak-Hirian et al.,1969).

La fijación del complemento permite la detección de anticuerpos específicos contra el virus. Esta técnica se realiza en dos pasos: el primero se mezcla el suero del paciente sospechoso de tener anticuerpos contra el virus, de manera que genera un inmunocomplejo, y en la segunda se adiciona el complemento que es una hemolisina depende de complemento y glóbulos rojos. Si en la primera etapa se formaron inmunocomplejos, en la segunda el complejo se fijará a éstos y no se producirá lisis de los glóbulos rojos. Por el contrario, si no hay formación de complejos antígeno-anticuerpo, no se fijará el complemento y la hemolisina inducirá la lisis de glóbulos rojos. (Baumgarten.,1980), (James.,1990).

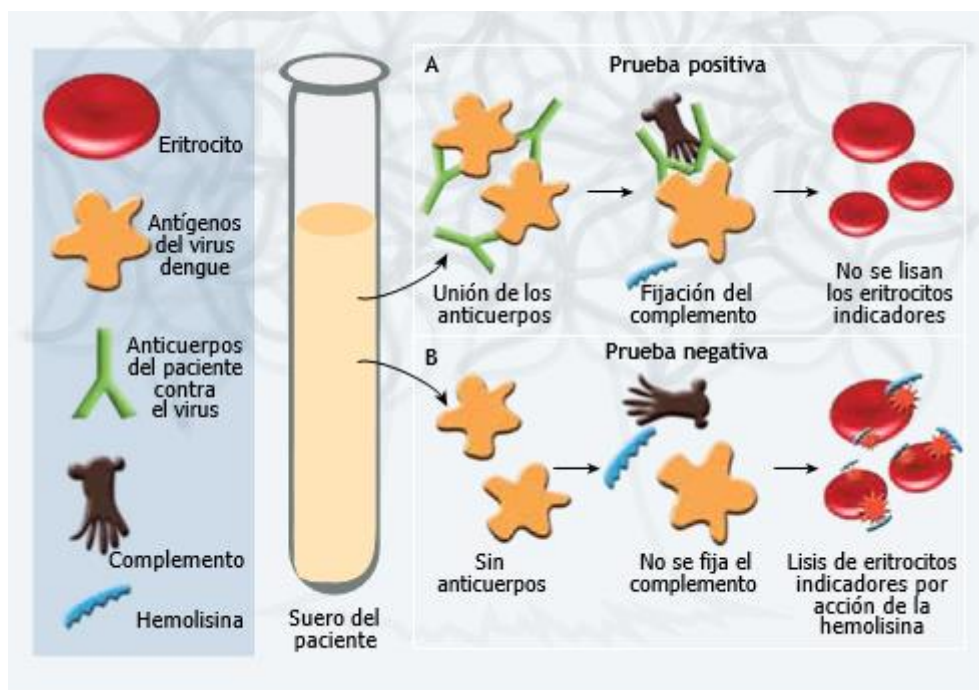


Figura 8: Técnica fijación del complemento para diagnóstico de dengue

(Ruiz et al.,2012)

Sin embargo, existe una amplia reactividad cruzada en infecciones secundarias con virus dengue o en infecciones por otros *arbovirus*, incluyendo aquellos para los cuales se pueden generar anticuerpos después de la vacunación como es el caso del virus de la fiebre amarilla (Yamada et al.,2003), por lo tanto, se reduce su efectividad en el diagnóstico y ha sido reemplazada por otras técnicas como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

3.4. Técnica de ELISA

ELISA es el método de detección líder en laboratorios clínicos de todo el mundo para la detección de biomarcadores asociados a enfermedades. Los kits comerciales de ELISA están fácilmente disponibles para diagnosticar una variedad de condiciones patológicas, incluidos los trastornos neurológicos, el cáncer y las enfermedades inflamatorias. Pueden detectar los ligeros cambios en la expresión de varios biomarcadores asociados a la enfermedad, incluidos beta-amiloide (Bruggink et al.,2013) y proteína tau (Harrington et al.,1990) para el diagnóstico de Alzheimer y BLTA, CD137, CTLA-4 y TNFRSF14 para el diagnóstico de cáncer.

El principio básico de ELISA se deriva del sistema inmunológico natural del cuerpo y se basa en las interacciones entre los anticuerpos producidos por el sistema inmunológico y los antígenos de la enfermedad (Darwish.,2006). ELISA fue introducido por primera vez como un radioinmunoensayo (RIA) por Hoffman et al. en 1973 y ha evolucionado desde entonces.

Un ELISA tradicional se lleva a cabo en un soporte de plástico sólido llamado placa ELISA, donde se emplean anticuerpos para capturar antígenos y luego se usa un sustrato para generar una señal medible con la ayuda de una enzima. La intensidad de la señal generada es proporcional a la concentración del antígeno (Engvall et al.,1971). Por lo tanto, ELISA se puede utilizar para determinar tanto la presencia del antígeno como su concentración. Esto es posible gracias a la adición paso a paso de componentes de ELISA a la placa de ensayo seguida de un período de incubación. Los componentes principales de ELISA son el anticuerpo primario, el anticuerpo secundario, el anticuerpo conjugado con enzima, el antígeno y el sustrato. Se utilizan varios tampones durante ELISA para la dilución de los componentes, el lavado del exceso de productos químicos, el bloqueo de las vacantes en la placa y la detención de la reacción del sustrato.

A lo largo de los años, se desarrollaron diferentes tipos de ELISA para mejorar la especificidad, reducir el ruido de fondo y mejorar la sensibilidad del ensayo. Estos métodos se pueden clasificar en cinco tipos principales: ELISA directo, indirecto, sándwich, competitivo y basado en nanopartículas. Todos los tipos de ELISA siguen el mismo principio básico de unión de antígenos con anticuerpos, pero difieren en el orden y el número de pasos. En general, un ensayo ELISA se puede dividir en los siguientes pasos:

1. Recubrimiento de proteínas en la placa ELISA.
2. Bloqueo de los sitios de unión libres de la placa.
3. Unión de anticuerpos con antígenos.
4. Lavado de la placa para eliminar el exceso de reactivos.
5. Unión del anticuerpo conjugado con enzima con el antígeno o anticuerpo.
6. Adición de sustrato.
7. Adición de reactivo de parada para detener la reacción del sustrato.
8. Por último, medición de la señal.

Las señales obtenidas se pueden analizar para calcular el límite de detección, la cual es la mínima cantidad o concentración de sustancia que puede ser detectada, y la sensibilidad del ensayo (Danielak et al.,2020). Según el tipo de anticuerpo y antígeno utilizado en el ensayo ELISA, las concentraciones de las proteínas, los tiempos de incubación y la composición de los tampones se pueden optimizar para lograr una alta sensibilidad del ensayo.

3.4.1 Anticuerpos primarios

Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig), como ya sabemos, son proteínas producidas por el sistema inmunitario para identificar y neutralizar moléculas extrañas. Los anticuerpos son proteínas en forma de Y con dos regiones fragmentadas de unión a antígeno (Fab) que interactúan específicamente con los antígenos y un brazo de fragmento cristalino (Fc) que interactúa con otras moléculas (como los glóbulos blancos) del sistema inmunitario.

Cada antígeno tiene un anticuerpo complementario con una afinidad fuerte y específica hacia su antígeno (Cruse et al.,1999). El ensayo ELISA aprovecha esta especificidad y se desarrolla como uno de los métodos de prueba más específicos disponibles para el diagnóstico clínico de condiciones patológicas.

Los anticuerpos tienen varios isotipos, como IgG, IgM, IgE, IgD e IgA, que son diferentes entre sí en términos de la respuesta inmunitaria que generan y las partes del cuerpo en las que se pueden encontrar (French.,1986). Cualquiera de los isotipos puede emplearse en ELISA, pero requiere tiempos y concentraciones de incubación optimizados. IgG es el anticuerpo más abundante con una estructura relativamente simple y se elige como el anticuerpo de muestra para los protocolos ELISA (Janeway et al.,2001).

IgG

IgG es el anticuerpo más abundante en el torrente sanguíneo y tiene una excelente especificidad hacia los antígenos. Por lo tanto, es la primera opción de anticuerpo en las pruebas inmunológicas. IgG tiene cuatro subclases: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Las subclases tienen una estructura ligeramente diferente y algunas subclases son más abundantes que otras. IgG se retiene en el torrente sanguíneo durante un tiempo prolongado después de la infección. La detección de IgG en fluidos corporales indica vacunación o infección previa.

IgM

IgM es el anticuerpo más grande en tamaño. Es el primer anticuerpo que se produce cuando ocurre una infección. La IgG sustituye gradualmente a la IgM para lograr una respuesta inmunitaria más eficaz a medida que avanza la enfermedad. El porcentaje relativo de IgG e IgM en la sangre se puede traducir para determinar la etapa y el tipo de infección. El gran tamaño de IgM contribuye a la dificultad de movimiento. Por lo tanto, se necesita un tiempo de incubación más prolongado cuando se recubre una placa ELISA con IgM (Florent et al.,1990).

IgA

La IgA se produce en partes del cuerpo que están directamente en contacto con el ambiente exterior. Por ejemplo, se puede encontrar en las lágrimas, la saliva y la leche materna. IgA evita que patógenos extraños entren en los órganos internos. IgA tiene dos subclases. El nivel de IgA se mide mediante ELISA para la detección de infecciones bacterianas (Sahu et al.,2008).

IgE

La IgE es el anticuerpo menos abundante en el cuerpo, pero produce la respuesta inflamatoria más fuerte. La producción de IgE está relacionada con reacciones alérgicas. Se expresa en reacciones como alergias, asma, sinusitis, alergias alimentarias y contra parásitos. Dado que la concentración de IgE expresada es muy alta, no se mide cuantitativamente (He et al.,2017).

3.4.2 Antígenos

El antígeno, también denominado generador de anticuerpos (Ag), es una proteína producida por un patógeno extraño, y su presencia en el cuerpo inducirá la respuesta inmunitaria que dará como resultado la generación de anticuerpos

(DeLisi.,1976). Las interacciones antígeno-anticuerpo son el factor esencial que constituye la base de ELISA. Por lo tanto, los anticuerpos y los antígenos deben elegirse cuidadosamente para que tengan una afinidad fuerte y específica entre sí. Cada anticuerpo tiene dos fragmentos Fab para su antígeno coincidente, un factor que debe tenerse en cuenta en los cálculos y análisis de ELISA. Los antígenos se clasifican según su origen. Pueden ser partículas extrañas o pueden generarse dentro del cuerpo en respuesta a una infección. Algunos ejemplos de antígenos extraños son las proteínas o sus fragmentos producidos por virus o bacterias. Por lo general, los antígenos que se originan en el interior del cuerpo no activan el sistema inmunitario.

3.4.3 Anticuerpos secundarios

Los anticuerpos secundarios se utilizan para la detección indirecta del antígeno. Los anticuerpos secundarios se unen al anticuerpo primario después de la unión del anticuerpo primario con el antígeno. Los anticuerpos secundarios deben ser específicos del anticuerpo primario. Se inyecta un anticuerpo primario en un huésped diferente para obtener un anticuerpo secundario. Por ejemplo, si se usa una IgG de ratón como anticuerpo primario, la IgG de ratón se inyecta en otro huésped, como una cabra, para obtener un anticuerpo secundario específico para la IgG de ratón, y este anticuerpo se denomina IgG anti-ratón de cabra (Steward.,1984). El ratón, la cabra, el conejo y el caballo son huéspedes comunes para la producción de anticuerpos secundarios, pero también se pueden usar otros animales.

3.4.4 Anticuerpos conjugados con enzimas

Las enzimas son catalizadores biológicos que aceleran las reacciones bioquímicas pero que no sufren ningún cambio por sí mismas. El papel de las enzimas en ELISA es catalizar una reacción química que produce productos fluorescentes, luminiscentes o absorbentes de UV. Se puede utilizar una variedad de enzimas en ELISA. La peroxidasa de rábano picante (HRP) y la fosfatasa alcalina (ALP) son las enzimas más utilizadas para aplicaciones ELISA (Hosseini et al.,2018). En ELISA, las enzimas se usan en conjugación con anticuerpos. Las enzimas y los anticuerpos pueden conjugarse antes de agregarlos a la placa ELISA o conjugarse en la placa ELISA.

3.5 Tipos de ELISA

- **Elisa directo:** El ELISA directo, como su nombre indica, es más directo, pero menos específico que otros tipos de ELISA. En este, un analito de interés se recubre directamente sobre la placa de ELISA, seguido de la adición de un anticuerpo conjugado con enzima específico para el analito recubierto. Luego se agrega el sustrato que produce una señal detectable en presencia de una enzima (Cerdeira-Kipper et al.,2019). La adición del tampón de parada detiene la reacción y luego se mide la señal.
- **Elisa indirecto:** En este tipo de ELISA, se usa un anticuerpo secundario como conector para conjugar indirectamente el primer anticuerpo con la enzima. Una ventaja de este método sobre ELISA directo es su mayor sensibilidad. En ELISA indirecto, solo es necesario biotinilar el anticuerpo secundario.
- **Elisa sándwich:** En sándwich ELISA, el antígeno se intercala entre dos anticuerpos. El anticuerpo se inmoviliza directamente en la placa ELISA, denominado anticuerpo de captura, que se une al antígeno. Luego se agrega el anticuerpo secundario, seguido de la adición de anticuerpos conjugados con enzimas o de detección (Lequin.,2005). La adición de sustrato inicia la reacción, y el producto formado se analiza midiendo la absorbancia de la señal, como se explicó anteriormente. La principal ventaja del ELISA sándwich sobre otros tipos es la señal de fondo reducida, la alta sensibilidad y la aplicabilidad para detectar antígenos en fluidos biológicos. Por ejemplo, los antígenos suelen estar presentes en otras biomoléculas, como las proteínas séricas. Por lo tanto, el recubrimiento directo de antígenos en la placa de ELISA podría resultar en la unión no específica de proteínas séricas, lo que resultaría en una señal de fondo alta y resultados "falsos positivos" (Drijvers et al.,2017). En ELISA sándwich, el recubrimiento previo con anticuerpos primarios permite la unión específica de antígenos en la placa ELISA y permite la detección selectiva de una molécula de interés en la muestra dada.
- **Elisa competitivo:** En ELISA competitivo, el antígeno de interés compete con un antígeno de referencia para unirse al anticuerpo. Cualquiera de los tipos de ELISA explicados anteriormente se puede realizar de forma competitiva. Por ejemplo, en un ELISA sándwich competitivo, la placa se recubre primero con el anticuerpo de captura. El antígeno de referencia luego se unirá al anticuerpo de captura, y luego se agregará el antígeno objetivo y el anticuerpo de

detección simultáneamente. Cualquier anticuerpo de detección que no esté conjugado con el antígeno objetivo se inmovilizará en la placa al unirse al antígeno de referencia. Los antígenos objetivo y sus anticuerpos adheridos se eliminarán por lavado, y la enzima y el sustrato se agregarán para detectar los anticuerpos inmovilizados. En este tipo de ELISA, una señal más alta indica una concentración más baja del antígeno objetivo.

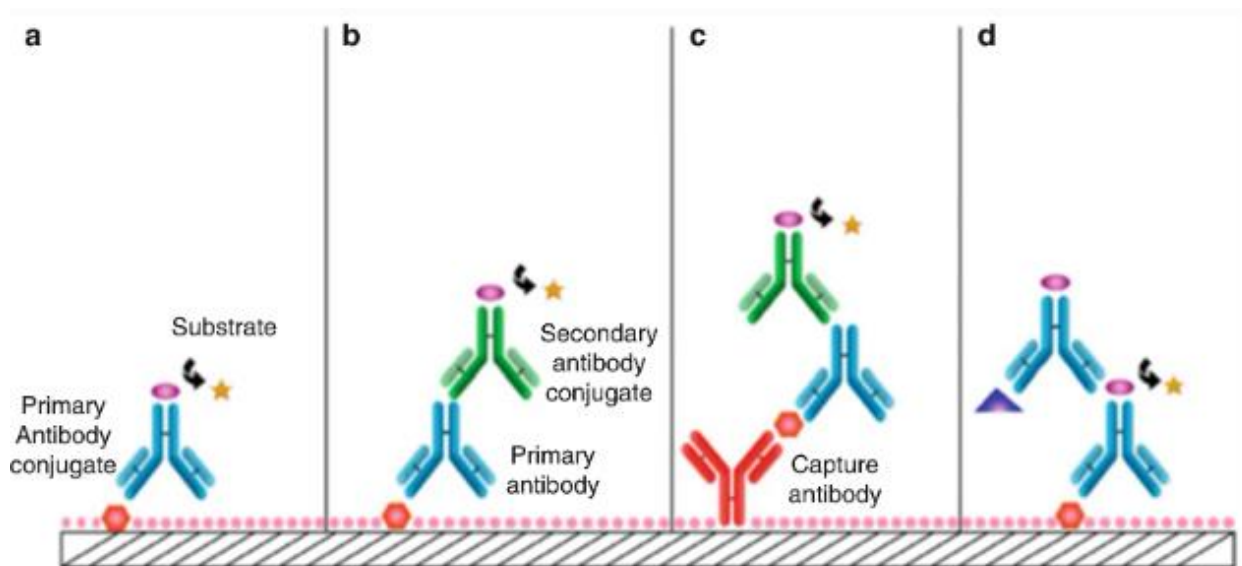


Figura 9: Tipos de ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA)

(Tabatabaei et al., 2022)

a) ELISA directo, b) ELISA indirecto, c) ELISA sándwich y d) ELISA competitivo.

La técnica de ELISA es una de las técnicas más usadas en los laboratorios para la detección de enfermedades debido a su alta fiabilidad, sin embargo, tienen un gran problema y es el largo tiempo de espera que es necesario hasta conocer el resultado. Por ello, y por la baja fiabilidad de los otros métodos de diagnóstico se han desarrollado las llamadas “pruebas rápidas”.

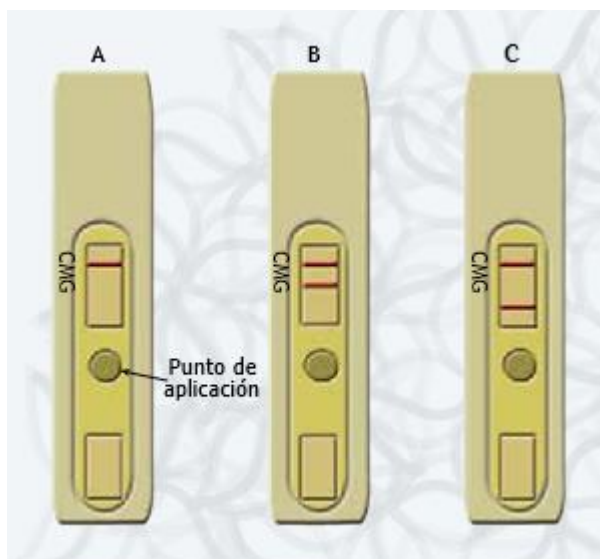
3.6. Pruebas rápidas

Las pruebas rápidas se utilizan para detectar tanto antígeno viral, específicamente la proteína NS1 del virus dengue, como anticuerpos del paciente, ya sean IgM o IgG. En 1998, la casa comercial Panbio® (Australia) presentó una prueba rápida de casete que consiste en un sistema visual en tira reactiva, donde se detectan

IgM e IgG, y diferencia presuntivamente una infección primaria de una secundaria. A partir de una reacción que es revelada por cromatografía en donde el suero en estudio migra a lo largo de la membrana de nitrocelulosa incorporada en el casete, se atrapan los anticuerpos IgG e IgM presentes en el suero por acción de anticuerpos anti-IgG o anti-IgM humana, y posteriormente se adhiere un antígeno viral unido a un anticuerpo monoclonal antiviral dengue marcado con oro coloidal.

Así, en un paciente en fase aguda de enfermedad, la presencia de IgG es característica de una infección secundaria y la presencia de IgM de una infección primaria. Además, estas pruebas contienen una línea de control "C" que siempre debe ser positiva, pues garantiza la calidad de los reactivos del casete e indica que se adicionó un volumen suficiente de la muestra. La sensibilidad y la especificidad de esta prueba es del 99% y del 96%, respectivamente. (Martínez-Vega et al.,2009), (Sang et al.,1998).

Otros investigadores han propuesto como prueba rápida para el diagnóstico de dengue la detección del antígeno viral NS1, el cual se secreta y participa en la formación de inmunocomplejos, y se puede detectar desde el primer día de aparición de los síntomas (Acosta-Bas et Gómez.,2005). La prueba rápida consiste en la detección rápida y temprana del antígeno por inmunocromatografía y también se detecta la presencia de anticuerpos IgM e IgG contra el virus. La sensibilidad de esta prueba está entre 62,4% y 80,7%, y tiene una especificidad entre 89,1% y 100%, respectivamente (Osorio et al.,2010), (Tricou et al.,2010).



- A. Prueba negativa, el control es positivo.
- B. Prueba positiva, con detección de IgM.
- C. Prueba positiva, con detección de IgG.

Figura 10: Prueba rápida de casete para el diagnóstico de Dengue.

(Ruiz et al.,2012)

En Colombia, se ha evaluado la utilidad de este tipo de pruebas en varios estudios (Martinez-Vega et al.,2009), (Osorio et al.,2010), los cuales resaltan la importancia de su uso en poblaciones rurales, dadas las limitantes que se tienen en campo para el adecuado almacenamiento y transporte de las muestras. Los resultados obtenidos en estos estudios indican que la tanto la sensibilidad como la especificidad de una de las pruebas rápidas para detección de IgM (casa comercial Panbio®) son superiores al 70%, mientras que para otra de las pruebas disponibles para detección de NS1/IgM/IgG (SD BIOLINE®), la sensibilidad es mayor al 80% cuando se compara contra pruebas de otras casas comerciales. En general, las pruebas rápidas son útiles como ayuda diagnóstica.

Tanto las pruebas de ELISA como las pruebas rápidas han tenido un gran auge en los últimos años, debido a sus altos niveles de confiabilidad y, en especial, a la disminución del tiempo para la obtención de los resultados; por estas razones, se hace pertinente incluir un listado de las pruebas comerciales que se utilizan con mayor frecuencia.

Prueba	Casa comercial	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Dengue Duo Rapid Strip Test	PanBio	90	86
PanBio Dengue Screening ELISA	PanBio	95	94
Pan Bio Dengue Duo ELISA	PanBio	99-100	92,8
MRL Diagnostics Dengue Fever Virus IgM Capture ELISA	MRL Diagnostics	98	100
Pan Bio Rapid Immunochromatographic Test	PanBio	100	100

Tabla 1: Pruebas inmunológicas comerciales que se emplean con mayor frecuencia para el diagnóstico de Dengue.

(Ruiz et al.,2012)

4. Resultados y discusión

El deterioro de la infraestructura de la salud pública, los cambios demográficos, el crecimiento de la población, las alteraciones ecológicas como la deforestación, cambios climáticos, movimientos internacionales de la población entre unos países y otros, así como el transporte de mercancías, son factores que han influido en la aparición de diferentes brotes de enfermedades y virus, entre ellas el dengue (Morse S.,1991).

En la mayoría de zonas en las que el Dengue es endémico como es el caso de Colombia, no existe un programa actual de vigilancia para *arbovirus* y por lo tanto la

circulación del virus no es notificada por los organismos gubernamentales, debido principalmente a un manejo inadecuado de los datos, por lo que no hay una buena comunicación respecto a los casos de infección.

Por otra parte, el diagnóstico definitivo de Dengue involucra desde la detección de anticuerpos, antígenos o ARN viral, hasta el aislamiento viral; sin embargo, como ya sabemos cada método varía en cuanto a la sensibilidad, la especificidad, los costos y el tiempo para obtener un resultado final. Por esto, es por lo que los análisis basados en la respuesta inmune frente a la infección se han convertido en técnicas rutinarias, debido a la rápida obtención de los resultados y al bajo costo, sin embargo, dependen del estado inmunológico del paciente, de la fase de la enfermedad en la que se toma la muestra y si se trata de una infección primaria o secundaria. También hay que tener en cuenta los falsos positivos por reacciones cruzadas con virus genéticamente relacionados.

Actualmente, la infección por el virus del Dengue es muy común y se han establecido principalmente las técnicas inmunológicas para llevar a cabo su diagnóstico. A pesar de esto, es importante cuestionarse si las técnicas elegidas son las adecuadas para llevar a un diagnóstico acertado ya que como hemos mencionado anteriormente hay diversos factores que pueden no dar un resultado acertado.

Por esto, creo que lo mejor sería añadir un segundo método más sensible y específico como son las técnicas moleculares, aunque lamentablemente esto es complicado que se pueda llevar a cabo en las regiones colombianas, que se consideran hiperendémicas, por los elevados costos, la falta de disponibilidad y personal. Una alternativa en dichos casos es la utilización de las pruebas rápidas, ya que son fáciles de almacenar y de procesar, y son muy sensibles y específicas, en especial cuando se detecta de manera combinada un antígeno viral (proteína NS1) y los anticuerpos contra el virus (IgM e IgG).

Por otro lado, aunque el aislamiento viral es considerado la técnica más fiable a través de la cual se realiza un diagnóstico directo, es una técnica que requiere demasiado tiempo para el diagnóstico (varios días e incluso semanas), además de que se necesita mucho gasto en infraestructura y altos costos para el mantenimiento de líneas celulares, como se observa en la tabla 2, por lo que se considera una técnica poco útil para proporcionar diagnóstico rápido y oportuno.

En conclusión, aunque las técnicas inmunológicas como el ELISA son las más accesibles, las de mayor confianza son aquellas que permitan detectar el genoma

(RT-PCR), los antígenos (pruebas rápidas) o la partícula viral completa (aislamiento viral) como se observa en la figura 11.

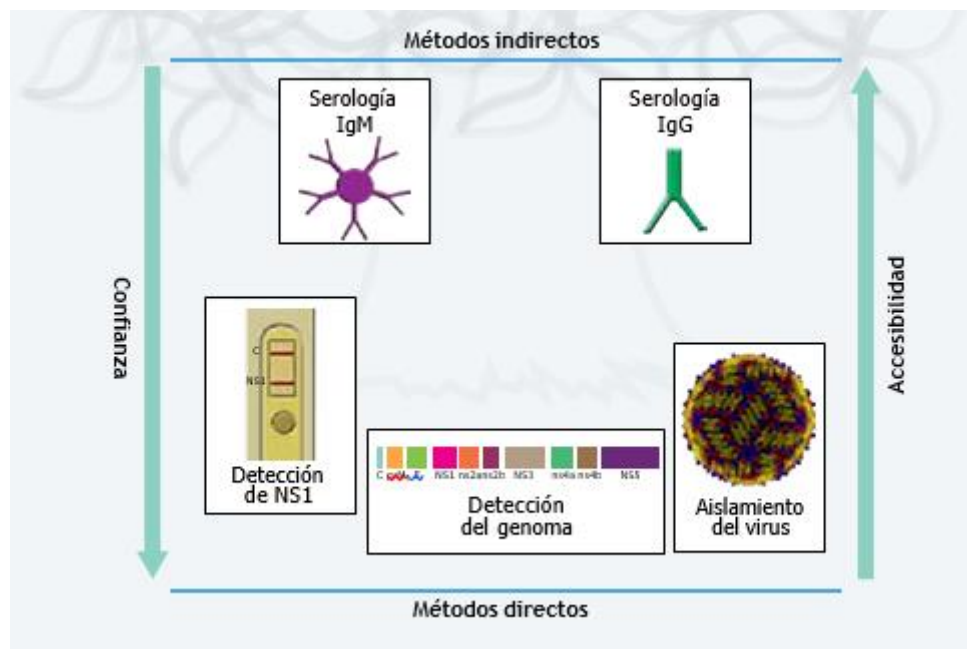


Figura 11.: Comparación de las técnicas de diagnóstico directo e indirecto en relación a su confianza y accesibilidad

(Ruiz et al.,2012)

A pesar de la gran variedad de técnicas disponibles, no podemos decir que haya una recomendada para todos los casos, sin embargo, sí hay que elegir una que sea sensible y específica, como es el caso del uso combinado de pruebas que detecten antígenos virales junto con anticuerpos específicos tipo IgM para el diagnóstico rápido.

Tipo de método	Técnicas	Ventajas	Desventajas
Indirecto	➤ Inhibición de la hemaglutinación ➤ Fijación del complemento ➤ ELISA ➤ Pruebas rápidas: detección de anticuerpos	➤ Son útiles para la confirmación de infecciones agudas ➤ Bajo coste ➤ Permiten diferenciar infección primaria de una secundaria	➤ El nivel bajo de anticuerpo puede no ser detectado, en especial la IgM en infecciones secundarias. ➤ Requieren sueros pareados, lo cual retrasa el diagnóstico. ➤ Si el paciente tiene una enfermedad que interfiera en la respuesta inmune dificulta el diagnóstico. ➤ No son tan sensibles como las técnicas que detectan genoma o antígenos.
	➤ Pruebas moleculares: RT-PCR, RT-PCR en tiempo real. ➤ Aislamiento viral: en cultivos celulares, inoculación de mosquitos, inoculación en ratones. ➤ Pruebas inmunológicas.	➤ Permiten diagnóstico temprano, lo cual favorece un tratamiento rápido y adecuado. ➤ Tienen alta especificidad, tanto para identificar como para serotipar.	➤ Requieren de infraestructura y equipos altamente costosos, además de personal con experiencia. ➤ No es posible diferenciar entre una infección primaria y secundaria.
Combinado	➤ Pruebas rápidas: detección de NS1 y de anticuerpos	➤ Costo muy bajo. ➤ Se puede realizar a temperatura	➤ Faltan estudios que evalúen la especificidad de esta técnica.

ambiente y no
requiere equipos
especializados.

- Permite diferenciar
entre infección
primaria y
secundaria.
- Se puede realizar
desde el primer día
de los síntomas.

Tabla 2:Ventajas y desventajas de las técnicas empleadas para el diagnóstico de la infección por el virus Dengue.

5. Bibliografía

Alcon, S., Talarmin, A., Debruyne, M., Falconar, A., Deubel, V., Flamand, M., 2002. 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. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 376–381.

Anantapreecha S, A-Nuegoonpipat A, Prakrong S, Chanama S, Sa-NGasang A, Sawanpanyalert P, et al. Dengue virus cross-reactive hemagglutination inhibition antibody responses in patients with primary dengue virus infection. *Jpn J Infect Dis* 2007; 60: 267- 270.

Baumgarten A. Viral immunodiagnosis. *Yale J Biol Med* 1980; 53: 71-83.

Buss, N. A., Henderson, S. J., McFarlane, M., Shenton, J. M., & de Haan, L. (2012). Monoclonal antibody therapeutics: history and future. *Current opinion in pharmacology*, 12(5), 615–622.

Bruggink KA, Jongbloed W, Biemans EALM et al (2013) Amyloid- β oligomer detection by ELISA in cerebrospinal fluid and brain tissue. *Anal Biochem* 433:112–120.

Calisher, C.H., Karabatsos, N., Dalrymple, J.M., Shope, R.E., Porterfield, J.S., Westaway, E.G., Brandt, W.E., 1989. Antigenic relationships between flaviviruses as

determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. J. Gen. Virol. 70, 37–43.

Cerda-Kipper AS, Montiel BE, Hosseini S (2019) Immunoassays radioimmunoassays and enzyme-linked immunosorbent assay. Encyclopedia of analytical science (pp. 55–75).

Chappell, W. A., Calisher, C. H., Toole, R. F., Maness, K. C., Sasso, D. R., & Henderson, B. E. (1971). Comparison of three methods used to isolate dengue virus type 2. *Applied microbiology*, 22(6), 1100–1103.

Clarke, D. H., & CASALS, J. (1958). Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. The American journal of tropical medicine and hygiene, 7(5), 561–573.

Cornesky RA, Hammon WM, Atchison RW, Sather GE. Effect of urea on the hemagglutinating and complement-fixing antigens of type 2 Dengue virus. Infect Immun 1972; 6: 952-957.

Cruse JM, Lewis RE (1999) Atlas of immunology. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

Danielak D, Banach G, Walaszczyk J et al (2020) A novel open source tool for ELISA result analysis. J Pharm Biomed Anal 189:113415.

Darwish IA (2006) Immunoassay methods and their applications in pharmaceutical analysis: basic methodology and recent advances. Int J Biomed Sci 2:217–235.

DeLisi C (1976) Antigen antibody interactions. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

Drijvers JM, Awan IM, Perugino CA et al (2017) The enzyme-linked immunosorbent assay: the application of ELISA in clinical research. Editor(s): Morteza Jalali, Francesca Y.L. Saldanha, Mehdi Jalali, Basic Science Methods for Clinical Researchers, Academic Press, 2017, Pages 119–133.

Engvall E, Perlmann P (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry 8(9):871–874.

Falconar, A.K., Young, P.R., 1990. Immunoaffinity purification of native dimer forms of the flavivirus nonstructural glycoprotein, NS1. *J. Virol. Methods* 30, 323–332.

Flamand, M., Megret, F., Mathieu, M., Lepault, J., Rey, F.A., Deubel, V., 1999. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *Journal of Virology* 73, 6104–6110.

Florent G, Wiseman A (1990) An IgM specific ELISA for the serodiagnosis of viral bovine respiratory infections. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 13:203–208.

French MAH (ed) (1986) *Immunoglobulins in health and disease*. Springer Netherlands, Dordrecht.

Galfré G, Milstein C. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Methods Enzymol.* 1981;73:3-46.

Ganguly, A., Malabadi, R. B., Bhatnagar, P. K., Tang, X., Das, D., Loebenberg, R., Suresh, M. R., & Sunwoo, H. H. (2015). Production and characterization of monospecific and bispecific antibodies against dengue virus NS1 protein. *Journal of virological methods*, 220, 5–12.

Ganguly, A., Malabadi, R.B., Loebenberg, R., Suresh, M.R., Sunwoo, H.H., 2013d. Enhanced prokaryotic expression of dengue virus envelope protein. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 16 (4), 609–621.

Gelanew, T., Poole-Smith, B. K., & Hunsperger, E. (2015). Development and characterization of mouse monoclonal antibodies against monomeric dengue virus non-structural glycoprotein 1 (NS1). *Journal of virological methods*, 222, 214–223.

Gubler, D.J., Meltzer, M., 1999. Impact of dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world. *Adv. Virus Res.* 53, 35–70.

Guzmán MG, Deubel V, Pelegrino JL, Rosario D, Marrero M, Sariol C, Kourí G. Partial nucleotide and amino acid sequences of the envelope and the envelope/nonstructural protein-1 gene junction of four dengue 2 virus strains isolated during the 1981 Cuban epidemic. *Am J Trop Med Hyg* 1995;52:241-6.

Guzmán, M. G., Kourí, G. (2004). Dengue diagnosis, advances and challenges. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 8(2), 69–80.

Harrington CR, Edwards PC, Wischik CM (1990) Competitive ELISA for the measurement of tau protein in Alzheimer's disease. *J Immunol Methods* 134:261-271.

He S, Li X, Gao J et al (2017) Development of sandwich ELISA for testing bovine β -lactoglobulin allergenic residues by specific polyclonal antibody against human IgE binding epitopes. *Food Chem* 227:33–40.

Hoffman DR (1973) Estimation of serum IgE by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J Allergy Clin Immunol* 51:303–307.

Hosseini S, Vázquez-Villegas P, Rito-Palomares M et al (2018) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Springer Singapore, Singapore.

Huo-Shu H, Hritz D, Kanesa N. Quantitative detection of dengue 2 using fluorogenic RT-PCR based on 3'-noncoding sequence. *J Virol Methods* 2000; 86:1-11.

Innis, B. L., Nisalak, A., Nimmannitya, S., Kusalerdchariya, S., Chongswasdi, V., Suntayakorn, S., Puttisri, P., & Hoke, C. H. (1989). An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 40(4), 418–427.

James K. Immunoserology of infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3: 132-152.

Janeway CA Jr, Travers P, Walport M et al (2001) *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition. New York: Garland Science; 2001. Chapter 1, Basic Concepts in Immunology.

Khai-Ming C, Thain S, Thaung U, Tin U, Myint KS, Swe T, et al. Clinical and laboratory studies on haemorrhagic fever in Burma, 1970-72. *Bull World Health Organ* 1974; 51: 227–235.

Khan, S.R., Ganguly, A., Malabadi, R.B., Sunwoo, H.H., Suresh, M.R., 2012. Gene delivery system: a developing arena of study for new era of medicine. *DNAG* 6(1),2–9 (8).

Köhler, G., Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495–497 (1975).

Lanciotti, R. S., Calisher, C. H., Gubler, D. J., Chang, G. J., & Vorndam, A. V. (1992). Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*, 30(3), 545–551.

Laue T, Emmerich P, Schmitz H. Detection of dengue virus RNA in patients after primary or secondary dengue infection by using the TaqMan Automated Amplification System. *JClin Microbiol* 1999;37:2543-7.

Lequin RM (2005) Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem* 51:2415–2418.

Malabadi, R.B., Ganguly, A., Hoon, H.H., Suresh, M.R., 2012. Role of bispecific monoclonal antibodies in immunodiagnostic assays. *Res. Pharm.* 2 (3), 08–14.

Martinez-Vega RA, Diaz-Quijano FA, Coronel- Ruiz C, Yebrail Gomez S, Villar Centeno LA. Evaluación de la utilidad de la prueba rápida de casete por inmunocromatografía para el diagnóstico de dengue en una región endémica colombiana. *Biomedica* 2009; 29: 616-624.

Miller RA, Maloney DG, Warnke R, Levy R. Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody. *N Engl J Med.* 1982;306:517-22.

Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:6851-5.

Morse S. S. (1991). Emerging viruses: defining the rules for viral traffic. *Perspectives in biology and medicine*, 34(3), 387–409.

Muller, D.A., Young, P.R., 2013. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Research* 98, 192–208.

Osorio L, Ramirez M, Bonelo A, Villar LA, Parra B. Comparison of the diagnostic accuracy of commercial NS1-based diagnostic tests for early dengue infection. *Viol J* 2010; 7: 361.

Quantitative and sensitive detection of SARS-CoV spike protein using bispecific monoclonal antibody based enzyme-linked immunoassay. *J. Virol. Methods* 187, 72–78.

Ruiz, L. Q., Gil, D., & Gutiérrez, M. (2012). Actualización en diagnóstico del dengue: evolución de las técnicas y su aplicación real en la clínica. *Medicina & Laboratorio*, 18, 411-441.

Sahu PS, Parija SC, Sahu PK (2008) Tear IgA-ELISA: a novel and sensitive method for diagnosis of ophthalmic cysticercosis. *Acta Trop* 106:168–174.

Sang CT, Hoon LS, Cuzzubbo A, Devine P. Clinical evaluation of a rapid immunochromatographic test for the diagnosis of Dengue Virus infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998; 5: 407-409.

Shim H. (2020). Bispecific Antibodies and Antibody-Drug Conjugates for Cancer Therapy: Technological Considerations. *Biomolecules*, 10(3), 360.

Shu, P. Y., Chen, L. K., Chang, S. F., Su, C. L., Chien, L. J., Chin, C., Lin, T. H., & Huang, J. H. (2004). Dengue virus serotyping based on envelope and membrane and nonstructural protein NS1 serotype-specific capture immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of clinical microbiology*, 42(6), 2489–2494.

Steward MW (1984) *Antibodies*. Springer Netherlands, Dordrecht.

Sunwoo, H.H., Palaniyappan, A., Ganguly, A., Ayman El-Kadi, Suresh, M.R., 2013.

Tabatabaei, M. S., & Ahmed, M. (2022). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 2508, 115–134.

Teles, F. R., Prazeres, D. M., & Lima-Filho, J. L. (2005). Trends in dengue diagnosis. *Reviews in medical virology*, 15(5), 287–302.

Tricou V, Vu HT, Quynh NV, Nguyen CV, Tran HT, Farrar J, et al. Comparison of two dengue NS1 rapid tests for sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. *BioMed Central* 2010; 10: 142.

Vesenjaj-Hirjan J, Hermon Y, Vitarana T. Arbovirus infections in Ceylon. *Bull World Health Organ* 1969; 41: 243-249.

Villasante, A. T. (2020). *Anticuerpos recombinantes como herramientas en neurobiología: producción y caracterización de anticuerpos monoclonales recombinantes para detectar proteínas sinápticas*. (s/f). Valencia.

Whitehorn, J., Farrar, J., 2010. Dengue. *Br. Med. Bull.* 95 (1), 161–173.

Winkler, G., Maxwell, S.E., Ruebner, C., Stollar, V., 1989. Newly synthesized dengue-2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane-associated after dimerization. *Virology* 171, 302–305.

Yamada K, Takasaki T, Nawa M, Yabe S, Kurane I. Antibody responses determined for japanese dengue fever patients by neutralization and hemagglutination inhibition assays demonstrate cross-reactivity between dengue and japanese encephalitis viruses. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10: 725-728.

Young, P.R., Hilditch, P.A., Bletchly, C., Halloran, W., 2000. 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.* 38, 1053–1057.