

# Avaliação do desempenho de *kit* de imunofluorescência indireta para o diagnóstico sorológico de dengue

Performance evaluation of an indirect immunofluorescence kit for the serological diagnosis of dengue

Karina Emy Arai<sup>1</sup>, Carolina Rodrigues Dal Bo<sup>1</sup>, Ana Paula Marques Aguirra da Silva<sup>2</sup>,  
Sílvia Sanches Rodrigues<sup>2</sup>, Cristóvão Luis Pitangueira Manguieira<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>2</sup> Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brasil.

DOI: 10.31744/einstein\_journal/2020A05078

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar o desempenho da imunofluorescência indireta no diagnóstico sorológico de dengue em uma população com alta prevalência de arboviroses. **Métodos:** Duzentas amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de dengue foram testadas por ensaio imunoenzimático e imunofluorescência indireta mosaico BIOCHIP®. Foram calculados especificidade, sensibilidade e coeficiente Kappa. Nas amostras discordantes, realizou-se reação em cadeia da polimerase como método confirmatório. **Resultados:** Das 200 amostras, 20% foram positivas e 80% negativas para IgM antivírus da dengue no ensaio imunoenzimático. Das 40 positivas, 25% foram negativas na imunofluorescência indireta. Destas dez negativas, apenas 20% eram também negativas na reação em cadeia da polimerase. Das 160 negativas no ensaio imunoenzimático, 5% foram positivas na imunofluorescência indireta. Por fim, dentre as nove discordantes, 33% tiveram vírus da dengue detectado na reação em cadeia da polimerase. O coeficiente Kappa foi 0,70 (0,57-0,82). Sensibilidade e especificidade por imunofluorescência indireta foram, respectivamente, 75% e 94%. Para IgG antivírus da dengue, de 200 amostras, 15,5% foram positivas e 84,5% negativas no ensaio imunoenzimático. Das 31 positivas, 12,9% foram negativas na imunofluorescência indireta. Destas quatro discordantes, 25% apresentaram vírus da dengue não detectado na reação em cadeia da polimerase. Das 169 negativas, 8% foram positivas na imunofluorescência indireta. Destas, 64% foram positivas também na reação em cadeia da polimerase. O coeficiente Kappa foi 0,695 (0,56-0,83). Sensibilidade e a especificidade por imunofluorescência indireta foram, respectivamente, 87,1% e 91,7%. **Conclusão:** Ensaio imunoenzimático seria suficiente para diagnóstico sorológico de infecção aguda, não justificando a incorporação da imunofluorescência indireta. Substituir ensaio imunoenzimático pela imunofluorescência indireta poderia comprometer a sensibilidade para IgM. Contudo, a imunofluorescência indireta auxilia diferenciar três arboviroses simultaneamente, sendo vantajoso em epidemias concomitantes.

**Descritores:** Infecções por arbovírus; Dengue; Ensaio de imunoadsorção enzimática; Testes sorológicos; Técnica indireta de fluorescência para anticorpo

## ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the performance of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of dengue virus in a population with high prevalence of arboviruses. **Methods:** Two-hundred serum samples from patients with clinical suspicion of dengue fever were tested by immunoenzymatic and indirect immunofluorescence assay BIOCHIP® mosaic. Specificity, sensitivity and Kappa coefficient were calculated. Discordant samples were tested by polymerase chain reaction for confirmation. **Results:** Of the 200 samples, 20% were positive and 80% negative for anti-dengue

### Como citar este artigo:

Arai KE, Dal Bo CR, Silva AP, Rodrigues SS, Manguieira CL. Avaliação do desempenho de kit de imunofluorescência indireta para o diagnóstico sorológico de dengue. *einstein* (São Paulo). 2020;18:eAO5078. [http://dx.doi.org/10.31744/einstein\\_journal/2020A05078](http://dx.doi.org/10.31744/einstein_journal/2020A05078)

### Autor correspondente:

Karina Emy Arai  
Rua Madre Cabrini, 332 – Vila Mariana  
CEP: 04020-001 – São Paulo, SP, Brasil  
Tel.: (11) 98999-4555  
E-mail: karinaemyrai@gmail.com

### Data de submissão:

20/3/2019

### Data de aceite:

21/8/2019

### Conflitos de interesse:

não há.

### Copyright 2019



Esta obra está licenciada sob  
uma Licença *Creative Commons*  
Atribuição 4.0 Internacional.

virus IgM antibodies in the immunoenzymatic test. Of the 40 positives, 25% were negative in indirect immunofluorescence. Of these ten discordant results, only 20% were also negative in the polymerase chain reaction (PCR). Of the 160 negatives in the immunoenzymatic test, 5% were positive in indirect immunofluorescence. Of these nine discordant results, 33% were positive in the PCR. The Kappa coefficient was 0.7 (0.572-0.829). Sensitivity and specificity of indirect immunofluorescence were respectively 75% and 94%. For anti-dengue virus IgG antibodies, of the 200 samples, 15.5% were positive and 84.5% were negative in the immunoenzymatic test. Of the 31 positives, 12.9% were negative in indirect immunofluorescence. Of these four discordant results, 25% were negative in the PCR. Of the 169 negatives, 8% were positive in indirect immunofluorescence. Of these 14 discordant results, 64% were also positive in the PCR. The Kappa coefficient was 0.695 (0.563-0.83). Sensitivity and specificity of indirect immunofluorescence were 87.1% and 91.7%, respectively. **Conclusion:** For diagnosis of acute infection, the immunoenzymatic test is enough, and the use of additional methods is not warranted. Replacing the immunoenzymatic test by indirect immunofluorescence would compromise the sensitivity for IgM. However, indirect immunofluorescence can distinguish three arboviruses simultaneously, an advantage during concomitant epidemics.

**Keywords:** Arbovirus infections; Dengue; Enzyme-linked immunosorbent assay; Serologic tests; Fluorescent antibody technique, indirect

## INTRODUÇÃO

A dengue, uma arbovirose transmitida predominantemente por vetores da espécie *Aedes aegypti*, é um grave problema de saúde pública no Brasil, causando epidemias sazonais em praticamente todo o território nacional.<sup>(1)</sup> Foram registrados, no país, 572.308 casos prováveis em 2014, 1.621.797 em 2015, 1.483.623 em 2016, 251.711 em 2017 e 265.934 em 2018.<sup>(2-4)</sup> Todos os quatro sorotipos do vírus da dengue são encontrados no Brasil.

O diagnóstico laboratorial de dengue envolve principalmente técnicas como isolamento viral, identificação de anticorpos específicos para o vírus da dengue (DENV) pelos testes sorológicos, identificação direta do RNA viral e detecção do antígeno NS1.<sup>(5-7)</sup>

O diagnóstico sorológico da infecção aguda se baseia na detecção da imunoglobulina M (IgM) específica para DENV, que é detectável, em 93% dos casos, entre 6 a 10 dias após o aparecimento da febre.<sup>(8)</sup> A imunoglobulina G (IgG) específica para DENV pode ser identificada em infecções atuais se, no momento da realização do teste, já tiver ocorrido a soroconversão, sendo útil para identificação de infecções passadas de dengue. O teste de avididade de IgG auxilia na diferenciação entre infecção primária ou secundária de dengue.<sup>(6)</sup>

O ensaio imunoenzimático (ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) se tornou o teste sorológico mais utilizado nos laboratórios clínicos. É um teste

simples, rápido e que requer poucos equipamentos de alta tecnologia.<sup>(9-11)</sup> Durante uma epidemia, o ELISA consegue determinar rapidamente o quão difundida a transmissão se tornou. Em áreas endêmicas de dengue, esse teste pode ser usado para rastreamento de um grande número de amostras sorológicas a baixo custo.<sup>(9)</sup>

A imunofluorescência indireta é outro método sorológico que pode ser usado para identificar IgM e IgG específicos para dengue, e há poucos estudos<sup>(12,13)</sup> que avaliam o uso desse teste. A maioria dos testes sorológicos disponíveis nos laboratórios clínicos brasileiros foi desenvolvida fora do país, com estudos de validação frequentemente realizados em populações de baixa prevalência da doença e que não experimentaram surtos concomitantes de outras arboviroses, como Zika ou Chikungunya, que podem levar a resultados falso-positivos de dengue por reação cruzada de anticorpos, dificultando seu diagnóstico.<sup>(14)</sup>

Durante o surto epidêmico de dengue em 2016, um novo teste comercial de imunofluorescência indireta (IFI) mosaico BIOCHIP®, que promete diferenciar sorologicamente infecções por dengue, Zika e Chikungunya, desenvolvido na Alemanha, foi lançado no mercado brasileiro, competindo com os testes de ELISA utilizados rotineiramente há mais tempo.

## OBJETIVO

Avaliar o desempenho diagnóstico de um teste de imunofluorescência indireta para o diagnóstico sorológico de dengue em uma população com alta prevalência de infecções por arbovírus comparando com o teste sorológico ELISA.

## MÉTODOS

Foram utilizadas 200 amostras de soro provenientes da rotina do Laboratório Clínico do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE), colhidas no ano de 2014 e encaminhadas ao laboratório, após suspeita clínica de infecção por dengue. As amostras foram caracterizadas à época como negativas ou positivas para dengue por ELISA (Foccus, EUA). Todas as amostras foram testadas pelo teste de IFI Mosaico BIOCHIP® (Euroimmun, Alemanha).

Utilizando ferramentas estatísticas adequadas (software EP Evaluator), foram calculadas as probabilidades pré-teste: sensibilidade (capacidade que o teste diagnóstico apresenta de detectar os indivíduos verdadeiramente positivos) e especificidade (capacidade que o teste diagnóstico tem de detectar os verdadeiros negativos). Também foram calculadas probabilidades pós-

-teste: valor preditivo positivo (proporção de pacientes com teste positivo que efetivamente têm a doença de acordo com o teste padrão-ouro), valor preditivo negativo (proporção de pacientes que são negativos no teste e que efetivamente não têm a doença de acordo com o teste padrão-ouro). Por fim, foram calculados a acurácia, que é a probabilidade de o teste fornecer resultados corretos, e o coeficiente Kappa, uma medida de concordância entre dois métodos ajustada pela chance, ou seja, informa a proporção de concordância não aleatória, variando de -1 a 1, sendo, 0,00 para nenhuma concordância, 0,00-0,20 para concordância fraca, 0,21-0,40 para concordância sofrível, 0,41-0,60 para concordância regular, 0,61-0,80 para boa concordância, 0,81-0,99 para ótima concordância e 1 para concordância perfeita.<sup>(15,16)</sup>

Nas amostras discordantes entre os dois métodos, realizou-se a pesquisa do vírus por reação em cadeia da polimerase (PCR) como método diagnóstico confirmatório. O PCR é um teste molecular que faz uma detecção quantitativa do RNA do DENV, sendo considerado o padrão-ouro, uma vez que comprova a presença viral no organismo. Contudo, apresenta desvantagem, como possuir um alto custo, o que impede seu uso rotineiro como rastreamento nos laboratórios.<sup>(5)</sup>

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein, CAAE: 83521718.5.0000.0071, parecer número 2.909.625.

## RESULTADOS

Das 200 amostras estudadas, 40 (20%) foram classificadas como positivas e 160 (80%) como negativas para anticorpos IgM contra o DENV (anti-DENV), empregando-se o teste de referência ELISA.

Entre as 40 amostras positivas, 10 (25%) foram negativas no teste de IFI; destas 10 amostras discordantes, apenas 2 (20%) eram também negativas para dengue ao PCR. Por outro lado, das 160 amostras negativas no teste de referência ELISA, 9 (5%) foram positivas quando se empregou o teste de IFI; dessas 9 discordantes, 3 (33%) tiveram DENV detectado ao PCR (Tabela 1).

**Tabela 1.** Detecção de anticorpos IgM antivírus da dengue por meio do teste de ELISA e da imunofluorescência indireta

Imunofluorescência indireta IgM	ELISA IgM		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	30	9	39
Negativo	10	151	161
Total	40	160	200

Aplicando-se o teste Kappa ao conjunto de resultados dos dois ensaios, observou-se índice de concordância de 0,7 (0,572-0,829). A sensibilidade e a especificidade relativas da IFI foram, respectivamente, 75% e de 94%. O valor preditivo positivo da IFI foi 76,9%, o valor preditivo negativo da IFI foi 93,7% e a acurácia, 90,5%.

Para anticorpos IgG anti-DENV, de 200 amostras de soro, 31 (15,5%) foram classificadas como positivas e 169 (84,5%) como negativas, empregando-se o teste de ELISA. Das 31 amostras positivas, 4 (12,9%) foram negativas no teste de IFI; dessas 4 discordantes, apenas 1 (25%) apresentou DENV não detectado ao PCR. Por outro lado, das 169 amostras negativas, 14 (8%) foram positivas no teste de IFI avaliado; destas 14 discordantes, 9 (64%) foram positivas também ao PCR (Tabela 2).

**Tabela 2.** Detecção de anticorpos IgG antivírus da dengue. Comparação entre resultados obtidos empregando-se ELISA e imunofluorescência indireta

Imunofluorescência Indireta IgG	ELISA IgG		Total
	Reagente	Não reagente	
Reagente	27	14	41
Não reagente	4	155	159
Total	31	169	200

Aplicando-se o teste Kappa ao conjunto de resultados dos dois ensaios, observou-se índice de concordância de 0,695 (0,563-0,83). A sensibilidade e a especificidade relativas da IFI foram, respectivamente, de 87,1% e de 91,7%. O valor preditivo positivo da IFI foi 65,8%, o valor preditivo negativo da IFI foi 97,4% e a acurácia, 91%.

## DISCUSSÃO

A concordância, verificada pelo índice Kappa, entre o novo teste realizado por IFI e o teste utilizado como referência ELISA foi aceitável, demonstrando bom desempenho do novo teste.

Entretanto, a comparação com os resultados de PCR, método utilizado como confirmatório da presença de antígenos virais nas amostras com resultados discordantes entre os dois métodos, demonstrou maior concordância com o ELISA na maioria dos casos, exceto nos casos negativos por ELISA e positivos por IFI para anticorpos IgG anti-DENV (falso-positivos IgG), em que o resultado do PCR foi 64% coincidente com a imunofluorescência indireta.

## CONCLUSÃO

A imunofluorescência indireta possui desempenho aceitável, mas, para as situações de relevância clínica, no diagnóstico de infecção aguda (detecção de anticorpos IgM), a utilização apenas do teste de ELISA seria suficiente para o diagnóstico sorológico, não se justificando a incorporação de mais um método. Por outro lado, a substituição do teste de ELISA pela imunofluorescência indireta poderia comprometer a sensibilidade diagnóstica, aumentando o número de amostras falso-negativas para IgM.

## INFORMAÇÃO DOS AUTORES

Arai KE: <http://orcid.org/0000-0003-2929-5394>

Dal Bo CR: <http://orcid.org/0000-0002-9267-3282>

Silva AP: <http://orcid.org/0000-0002-0281-4302>

Rodrigues SS: <http://orcid.org/0000-0001-6619-7836>

Manguiera CL: <http://orcid.org/0000-0002-4227-3723>

## REFERÊNCIAS

- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496(7446):504-7.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 7 de 2018. *Boletim Epidemiológico*. 2018;49(9):1-13.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 51, 2015. *Boletim Epidemiológico*. 2016;47(2):1-9.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2018. *Boletim Epidemiológico*. 2019;50(4):1-14.
- Kao CL, Wu MC, Chiu YH, Lin JL, Wu YC, Yueh YY, et al. Flow cytometry compared with indirect immunofluorescence for rapid detection of dengue virus type 1 after amplification in tissue culture. *J Clin Microbiol*. 2001;39(10):3672-7.
- Peeling RW, Artsob H, Pelegrino JL, Buchy P, Cardoso MJ, Devi S, et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(12 Supp):S30-8.
- Henchal EA, Putnak JR. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev*. 1990;3(4):376-96. Review.
- Kuno G, Gómez I, Gubler DJ. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. *J Virol Methods*. 1991;33(1-2):101-13.
- Gubler DJ, Sather GE. Laboratory diagnosis of dengue and dengue hemorrhagic fever. In: Homma A, Cunha JF, editors. *Proceedings of the International Symposium on Yellow Fever and Dengue*. 1988. p. 291-322.
- Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, Kusalerdchariya S, Chongswasdi V, Suntayakorn S, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am J Trop Med Hyg*. 1989;40(4):418-27.
- Lam SK, Devi S, Pang T. Detection of specific IgM in dengue infections. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1987;18(4):532-8.
- Vene S, Mangiafico J, Niklasson B. Indirect immunofluorescence for serological diagnosis of dengue virus infections in Swedish patients. *Clin Diagn Virol*. 1995;4(1):43-50.
- Sucipto TH, Ahwanah NL, Churrotin S, Mataka N, Kotaki T, Soegijanto S. Immunofluorescence assay method to detect dengue virus in Paniai-Papua. *AIP Conference Proceedings*. 2016;1718(1):id.040001.
- Muller DA, Depelseñaire AC, Young PR. Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. *J Infect Dis*. 2017;215(Suppl\_2):S89-95. Review.
- Gart JJ, Buck AA. Comparison of a screening test and a reference test in epidemiologic studies. II. A probabilistic model for the comparison of diagnostic tests. *Am J Epidemiol*. 1996;83(3):593-602.
- Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159-74.