

Artículo original

Evaluación de ELISA de captura para NS1 como nueva herramienta del diagnóstico temprano de la infección por Dengue en Panamá.

Brechla Moreno*, Yamilka Díaz*, Julio Cisneros*, Gisel de Díaz**, Juan M. Pascale* Mariana García* , Sandra López-Vergès*.

Palabras clave:

dengue, diagnóstico, NS1 (proteína no estructural 1), ELISA de captura de NS1, IgM, genoma viral, RT-PCR, aislamiento viral, sensibilidad.

Key words:

dengue, diagnosis, NS1 (non structural protein1), NS1 capture ELISA, IgM, viral genome, RT-PCR, viral isolation, sensibility.

*Departamento de Investigación en Virología y Biotecnología, Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudio de la Salud (ICGES), Panamá, Panamá. *Laboratorio Clínico de Hospital San Fernando (LCHSF), Panamá, Panamá.

Correspondencia:
Mgtra. Brechla Moreno A.
brechla@yahoo.es
Teléfono: (507) 527 4815.

Resumen

Introducción. El dengue es una enfermedad infecciosa endémica en Panamá, por lo cual debemos tener un algoritmo de diagnóstico sensible y rápido para realizar un diagnóstico temprano, tomar decisiones eficaces y reducir el riesgo de complicaciones. La detección del antígeno NS1 por ELISA de captura puede ser efectiva en suero a partir del 1er día de fiebre hasta el 9no día, es fácil, rápida y menos costosa que otras metodologías diagnósticas.

Objetivo. Comparar la sensibilidad de una ELISA comercial de captura para NS1 con otros métodos diagnósticos de dengue utilizados en Panamá.

Materiales y Métodos. Se analizaron 138 sueros provenientes de la Ciudad de Panamá para diagnóstico de dengue por ELISAs comerciales de captura para NS1 e IgM, detección del genoma viral por RT-PCR en tiempo real y aislamiento viral en cultivo celular, y se compararon los resultados obtenidos por cada método.

Resultados. La ELISA de NS1 permite obtener un diagnóstico para dengue en menos de 6 horas. En este estudio se detectó más positivos para NS1 que la RT-PCR o aislamiento viral, incrementando la sensibilidad de la sola detección de IgM (57.4%) a una sensibilidad conjunta (IgM y NS1) de 87.23%.

Conclusión. La ELISA de NS1 en conjunto con la IgM ofrece una sensibilidad de detección de 87.23% y un diagnóstico precoz de dengue, lo que sugiere que la implementación de la ELISA NS1 en las instalaciones de salud en Panamá permita un diagnóstico rápido acertado

Abstract

Introduction. Dengue is an infectious disease endemic in Panama, and for this reason we need a sensitive and fast algorithm to realize early diagnosis, make efficient decisions and reduce the risk of complications. The detection of the NS1 antigen by ELISA can be effective in serum since the first day of fever to the 9th day, and it is easier, faster and less expensive than other diagnostic methods.

Objective. To compare the detection sensibility of a commercial NS1 ELISA with other dengue diagnosis methods used in Panama.

Materials and Methods. 138 sera from Panama city were analyzed for dengue diagnosis by a commercial ELISAs to detect NS1 and IgM, detection of the viral genome by real time RT-PCR and viral isolation in cell culture; and the results obtained for each method were compared.

Results. The ELISA to detect NS1 can give diagnostic results in less than 6 hours. In this study it detected more dengue positive samples than by RT-PCR or virus isolation, increasing the sensibility of the sole detection of the IgM (57.4%) to a combined sensibility (IgM and NS1) of 87.23%.

Conclusion. The commercial NS1 ELISA combine with the IgM detection offers a sensibility of detection of 87.23% and an early diagnosis of dengue. This suggest that the implementation of the NS1 ELISA in the health facilities in Panama allows a fast and reliable diagnostic test.

En términos de morbilidad, mortalidad y valor económico, el dengue es la arbovirosis de mayor relevancia en el mundo. El virus del dengue (DENV) pertenece al género Flavivirus, familia Flaviviridae, que presenta cuatro serotipos antigénicamente y genéticamente

distintos [1]. Se encuentra distribuido en zonas de los trópicos y subtropicos, poniendo en riesgo de infectarse a más de la mitad de la población mundial. DENV es transmitido principalmente por *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, causando una enfermedad cuya manifesta-

ciones clínicas han sido clasificadas por la OMS (Organización Mundial de la Salud) como dengue con y sin signos de alarma y dengue severo [2]. La evolución clínica de la enfermedad podría explicarse por la inmunidad previa a un serotipo, que podría aumentar el riesgo de dengue severo durante la infección con otro serotipo [3-6] o por la infección con un genotipo más virulento [1, 7, 8]. En Panamá han circulado los cuatro serotipos de DENV aumentando la probabilidad de epidemias y casos de dengue grave [3-6]. Desde la reemergencia del virus, se han registrado tres epidemias. El 2011, fue el año con la más alta mortalidad en Panamá, ya que de 31 defunciones reportadas desde 1993, 17 ocurrieron ese año (Epidemiología, MINSa). Para responder eficazmente a las epidemias y disminuir el riesgo de complicaciones, es crucial tener un buen algoritmo de diagnóstico que permita una detección temprana del virus.

Los métodos de diagnóstico clásicos son a menudo incapaces de reconocer las nuevas epidemias de manera oportuna y a un costo razonable. El aislamiento del virus se realiza a partir de muestras agudas de menos de cuatro días del inicio de los síntomas y es un proceso largo que requiere personal capacitado y un laboratorio con infraestructura de Nivel de Bioseguridad 2 [10]. El desarrollo de la RT-PCR ha reducido significativamente los tiempos de procesamiento de las muestras agudas [11, 12]; sin embargo, siguen siendo procedimientos costosos, además de requerirse personal capacitado en biología molecular. En Panamá, estos dos métodos de diagnóstico se realizan únicamente en el Instituto Comemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES), como centro nacional de referencia para dengue. Las ventajas de la detección de IgM incluyen un costo más económico y reactivos fáciles de adquirir, pero tiene una baja sensibilidad durante la fase aguda de la infección [2]. La detección de IgM contra el dengue se realiza a partir del quinto día del inicio de los síntomas, desventaja para detectar casos febriles con riesgo de desarrollar la enfermedad severa. Además, la IgM contra el dengue puede ser detectada hasta dos a tres meses después de la enfermedad, aumentando los casos de falsos positivos en zonas endémicas [2, 13]. En Panamá, las pruebas para la detección IgM e IgG han sido descentralizadas en las instalaciones de salud a nivel nacional desde 2009.

El virión de DENV cuenta con diez proteínas: tres estructurales y siete no estructurales (NS), dentro de las cuales se encuentra la NS1, proteína altamente conservada, esencial para la viabilidad del virus [14], que podría tener un papel en la replicación del ARN viral [1, 15]. La cantidad secretada de NS1 en suero de individuos infectados con DENV correlaciona directamente con la viremia y la patogénesis de la infección [16]. La NS1 es detectable por ensayos inmunoenzimáticos (ELISA, En-

zyme-linked immunosorbent assay) desde el primer día de fiebre hasta los nueve días de enfermedad en suero [17-21], y en algunos casos ha podido ser detectada hasta 18 días después de la aparición de los síntomas [2].

Gracias a estas cualidades, la detección de NS1 por ELISA podría ser una herramienta para el diagnóstico preciso en muestras agudas, en las que la IgM es indetectable y la PCR no está disponible. Esta metodología fue descrita en el año 2000 [18] e introducida en Panamá entre el 2009 y 2010 en instituciones privadas y en el 2011 en algunas instalaciones públicas de salud. Permitiría un diagnóstico temprano menos costoso y más rápido que los métodos existentes; siendo el objetivo de este estudio comparar los resultados obtenidos por el Dengue Early ELISA de Panbio (ELISA de captura del Antígeno NS1 del DENV), con los resultados del aislamiento viral, RT-PCR en tiempo real y ELISA de detección de IgM.

Materiales y Métodos

La toma de muestras de suero fue realizada en pacientes con cuadro febril y síntomas sospechosos de dengue, independientemente de los días de síntomas. 138 sueros fueron analizados por una ELISA de captura de la proteína NS1 de DENV (Dengue Early ELISA, Panbio, Australia), y la IgM e IgG fueron detectados utilizando los Dengue IgM e IgG Capture ELISA (Panbio, Australia), según instrucciones del fabricante.

Para el aislamiento viral se inocularon los 138 sueros en células Vero E6 (ATCC CCL-81), células de riñón de mono verde. Se incluyó un control positivo (aislado 487624 de DENV-1, Panamá, 1998) y como control negativo, células sin infectar. Se inoculó 100 μ l de cada muestra a una dilución 1:3 en PBS gelatina 0.5% (Gelatin from bovine skin, type B, SIGMA, USA). Las células fueron observadas por 14 días en busca de efecto citopático (EC). Los positivos, con más del 75% de células infectadas, con EC antes de los 14 días, fueron cosechados y tipificados.

Durante la cosecha viral, las células fueron fijadas con acetona al 20% en placas de inmunofluorescencia. Se realizó un tamizaje con un anticuerpo policlonal (Dengue 2 hyperimmune ascitic fluid, CDC, Puerto Rico) y los positivos fueron tipificados con anticuerpos monoclonales de ratón específicos para DENV-1 (Hawaii), DENV-2 (New Guinea C) y DENV-4 (H-241) (todos de CDC, Ft. Collins, USA), y DENV-3 (H87) (CDC, San Juan, Puerto Rico), que fueron detectados utilizando un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado

con fluoresceína (KPL, USA). A las placas se les agregó glicerina fosfatada de montaje para ser leídas en el microscopio de inmunofluorescencia (Nikon Eclipse 50 i, Japón).

RT-PCR en tiempo real: La extracción de ARN se realizó utilizando el kit comercial QIAamp Viral RNA Mini (QIAGEN, USA), según instrucciones del fabricante. Los ARN virales que se usaron como controles positivos se obtuvieron de cepas de los cuatro serotipos de DENV (aislados en el ICGES, Panamá, en el 1998). El ARN de DENV fue detectado mediante el uso del kit SuperScript III Platinum (Applied Biosystem, S.A., Life Technologies, USA) con los primers y sondas publicados por Leparc-Goffart, 2009 [22], según instrucciones del fabricante. Para determinar el serotipo de las muestras positivas por PCR, se utilizaron los primers y sondas publicados por el CDC en el 2013 [33].

Análisis de los resultados de diagnósticos:

Sensibilidad: Proporción de resultados positivos del método analizado entre todos los resultados positivos. VPP (valor predictivo positivo): probabilidad de tener la enfermedad si el resultado de la prueba diagnóstica es positivo. Para comparar los resultados obtenidos en dos grupos distintos se utilizó la prueba estadística t-test de dos colas con el programa Excel de Microsoft Office.

Resultados

De las 138 muestras sospechosas por dengue, 61 fueron positivas para el ARN viral, la NS1 o ambos. De 41 muestras positivas por RT-PCR, 30 fueron positivas para NS1, 2 indeterminadas y 9 negativas (Tabla 1). En cuanto al intento de aislamiento de esas 41 muestras, se logró aislar DENV en 24 de los sueros (Tabla 2). Cuando se analizaron las 97 muestras negativas por RT-PCR, 73 resultaron negativas para NS1, 4 indeterminadas y 20 positivas (Tabla 1). De estas últimas, 20 fueron negativas para el ARN viral y positivas para la NS1, y 16 fueron IgM positivas; esto sugiere que estas muestras fueron tomadas a partir del quinto día de inicio de síntomas

Tabla 1. Resultados de muestras sospechosas de Dengue por RT-PCR tiempo real para detección del ARN viral y por Dengue Early ELISA de captura de NS1.

		Detección de ARN viral		
		Positivo	Negativo	Total
Detección de NS1	Positivo	30	20	50
	Negativo	9	73	82
	Indeterminado	2	4	6
	Total	41	97	138

Tabla 2. Resultados de muestras sospechosas de Dengue por RT-PCR tiempo real para el ARN viral y Aislamiento Viral.

		Detección de ARN viral		
		Positivo	Negativo	Total
Aislamiento Viral	Positivo	24	2	26
	Negativo	17	95	112
	Total	41	97	138

cuando el ARN viral puede no ser detectable. De las 97 muestras negativas por RT-PCR, todas fueron negativas para el aislamiento viral, excepto dos (Tabla 2), que eran positivas para NS1 y negativas para la IgM.

De las 138 muestras, 50 fueron positivas para NS1, 6 indeterminadas y 82 negativas (Tabla 1). De las 6 muestras indeterminadas, 5 fueron positivas para IgM; de las 50 muestras positivas para NS1, en sólo 20 se pudo aislar virus, mientras que hubo un mayor aislamiento con las muestras positivas por RT-PCR (24 aislados/41 positivos por RT-PCR) (Tabla 3). De las 82 muestras negativas para NS1, sólo en seis se pudo aislar virus, las cuales eran positivas para el ARN viral (Tabla 3). De las muestras en las que se pudo aislar el virus, positivas para NS1 y/o el ARN viral, el 95% eran negativas para la detección de IgM (Tabla 4), mostrando una correlación inversa entre el aislamiento y la presencia de IgM contra el virus.

Tabla 3. Resultados de muestras sospechosas de Dengue por Aislamiento Viral y Dengue Early ELISA de captura de NS1.

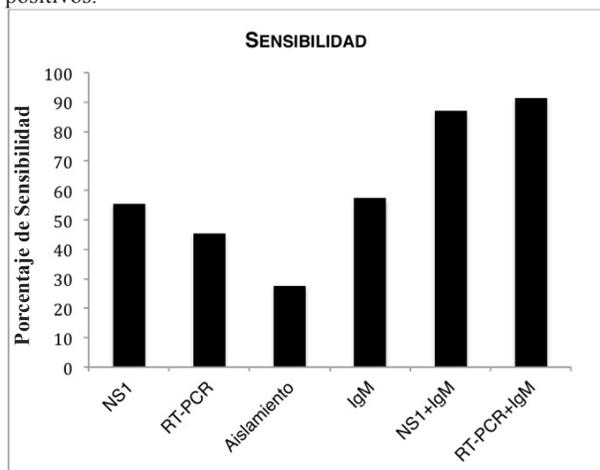
		Detección de NS1			
		Positivo	Negativo	Indeterminada	Total
Aislamiento Viral	Positivo	20	6	0	26
	Negativo	30	76	6	112
	Total	50	82	6	138

Tabla 4. Resultados de aislamiento viral de muestras positivas por PCR en tiempo real para el ARN viral de Dengue o por ELISA de NS1 con detección o no de IgM.

		Detección del ARN viral y de NS1, con detección o no de IgM			
		PCR+ IgM+	PCR+ IgM-	NS1+ IgM+	NS1+ IgM-
		(PCR+= 41)		(NS1+= 50)	
Aislamiento Viral	Positivo	1	23	1	19
	Negativo	8	9	21	9
	Total	9	32	22	28

De las 94 muestras positivas, 50 fueron positivas para NS1 (sensibilidad: 53.2%), 41 para el ARN viral (43.6%), 54 para la IgM (57.4%), y 26 pudieron ser aisladas (27.7%). Tomando en conjunto la detección de NS1 y de IgM, 82 muestras fueron positivas para ambos métodos o para uno de ellos (sensibilidad conjunta: 87.23%), y finalmente 86 muestras fueron positivas para la RT-PCR y/o la IgM (sensibilidad conjunta: 91.49%) (Figura 1).

Figura 1. Gráfica con las sensibilidades obtenidas por cada prueba en este estudio. Sensibilidad: Proporción de resultados positivos del método analizado entre todos los resultados positivos.



Discusión

Las nuevas metodologías han ayudado a hacer la respuesta de diagnóstico a la infección por dengue más rápida y oportuna. Por esta razón se realizó una comparación entre la ELISA de NS1 y los métodos vigentes en Panamá para el dengue (RT-PCR del ARN viral, aislamiento viral, detección de IgM e IgG). Los resultados sugieren que este método puede realizarse en las mismas instalaciones de salud, para obtener un diagnóstico temprano para dengue sin tener que esperar los cinco días de síntomas para detectar la IgM.

De las 94 muestras positivas en total, 50 fueron positivas para NS1 (sensibilidad: 53.2%), y tomando la detección de NS1 y de IgM la sensibilidad conjunta fue de 87.23%. Resultados similares fueron obtenidos en estudios previos, en los que se encontró que la sensibilidad de la ELISA de captura de NS1 estuvo entre el 52% y el 66%; por otro lado, la sensibilidad conjunta de la detección de la NS1 e IgM fue del 82% y al 86% utilizando el kit Dengue Early ELISA de Panbio u otros kits comerciales (Platelia) [23-26]. En este estudio no se observó diferencia significativa para la sensibilidad de NS1 entre rangos de edad; para definir si la hay serán necesarios estudios con un número mayor de muestras.

Es importante notar que aunque la RT-PCR obtuvo una sensibilidad inferior a la ELISA NS1 en nuestras muestras (43.6% versus 53.2%), en conjunto la ELISA IgM y la RT-PCR obtuvieron la mayor sensibilidad (91.49%), ya que estos dos métodos son complementarios; la RT-PCR siendo la más sensible para las muestras agudas y la detección de IgM para las muestras de igual o más de cinco días. Sin embargo, por razones logísticas y económicas, y debido al alto número de casos sospechosos por dengue, no sería posible en Panamá realizar para cada muestra el diagnóstico para NS1, la detección de IgM e IgG, y del ARN viral. Por lo cual sugerimos que este último método siga siendo centralizado en el ICGES, para disponer de un número representativo de muestras sospechosas por dengue (por lo menos 10%) y para todos los pacientes graves o fallecidos, para información complementaria y vigilancia epidemiológica para el MINSa.

Se observó una mejor correlación entre el aislamiento y la detección del ARN viral (de 41 muestras RT-PCR positivas, 24, 58.5%, se pudieron aislar) que entre el aislamiento y la NS1 (de 50 muestras positivas, se aislaron 20, 40%). Esto se debe probablemente a que la NS1 puede ser detectada antes de que la viremia sea suficientemente alta para realizar el aislamiento y días después que haya finalizado la viremia, mientras que la detección del ARN viral está directamente relacionado a la viremia. El aislamiento viral es crucial para la vigilancia epidemiológica de los genotipos y clados que circulan en el país. En el año 2009 solo circularon DENV-1 y DENV-3, y no se pudo detectar una diferencia de sensibilidad para cada serotipo que fuera estadísticamente significativa. Para poder relacionar la positividad de NS1 con los diferentes serotipos se sugiere ampliar el estudio a un número mayor de muestras y poder contar con sueros positivos para los cuatro serotipos.

Es común encontrar reacción serológica cruzada entre los virus del grupo de flavivirus como por ejemplo DENV-1, 2, 3 y 4, encefalitis de Murray Vallery, encefalitis japonesa, fiebre amarilla, virus del oeste de nilo, además de cruzar con muestras positivas para el virus de Epstein-Barr, malaria, leptospira, hepatitis A y algunas patologías autoinmunes. Por ello, para minimizar los casos de falsos positivos por IgM en zonas endémicas, como Panamá, debido a infecciones previas pero recientes (menos de tres meses) con dengue [13] u otros flavivirus circulantes en nuestro país, es importante complementar con otros métodos diagnósticos. El hecho de que la ELISA de NS1 sea sensible durante más días que la RT-PCR, la hace interesante para diagnóstico complementario a la detección del ARN viral en muestras de menos de cuatro días, y a la IgM en muestras de igual o más de cinco días. La NS1 sería un método diagnósti-

co indispensable en muestras de cuatro-cinco días, en las que el ARN viral puede no ser detectable y los títulos de IgM todavía no son suficientemente altos para así minimizar los falsos negativos.

Aunque el valor predictivo positivo (VPP) de la ELISA de NS1 es de 100% (si es positivo es dengue), y su sensibilidad relativa fue superior a la de la RT-PCR, en nuestras muestras obtuvimos once falsos negativos para NS1, de las cuales nueve fueron positivas por RT-PCR y se logró aislar 6/9. Igualmente, de seis muestras indeterminadas para NS1, dos fueron positivas para el ARN viral y cinco para IgM. De las nueve muestras positivas para el ARN viral y negativas para la NS1, ocho fueron positivas para la ELISA de captura IgG que detecta niveles elevados de IgG presentes en una infección secundaria. Estudios previos también han observado que varios métodos de detección de la NS1 son menos sensibles durante una infección secundaria comparados a las infecciones primarias [27], probablemente debido a la presencia de anticuerpos IgG contra NS1 en el paciente. Esto es importante para países endémicos, en los que la mayoría de las personas han sido previamente infectadas por dengue. Esto indica que un resultado negativo para NS1 no descarta la infección por DENV, como lo observado en estudios anteriores [28]. Por esto, el diagnóstico temprano de dengue en las instalaciones de salud no debe depender sólo de la detección de NS1, sino también de la IgM e IgG, que en conjunto tuvieron una alta sensibilidad en nuestro estudio (87.23%), como observado en estudios previos [24, 25]. Como los casos de infección secundaria o múltiples con diferentes serotipos tienen más probabilidad de desarrollar un dengue severo [29, 30], y debido al alto número de falsos negativos para NS1 en las infecciones secundarias, la OPS/OMS recomienda que el tratamiento clínico del paciente sea decidido por las observaciones clínicas, principalmente

de los signos de alarma, independientemente de los resultados de diagnóstico de laboratorio.

La incorporación de la determinación de NS1 en el diagnóstico de dengue, además de la determinación de IgM e IgG, se complementarían para el logro de un diagnóstico acertado en las instalaciones de salud. Es importante señalar que en el año 2012, de las 46 instalaciones públicas de salud que forman parte de la Red Nacional de Dengue, 27 (58.6%) de ellas realizaban diagnóstico de Dengue mediante detección de antígeno de NS1 en muestras agudas. De estas 27 instalaciones, 22 (81.4%) utilizaban método de inmunocromatografía comúnmente llamada prueba rápida (marca Standard Diagnostic) y en sólo cinco (18.5%), el método de ELISA (marca Panbio) (Fuente: base de datos de supervisión del 2012 de la Red Nacional de Dengue del Laboratorio Central de Referencia en Salud Pública, LCRSP, del ICGES).

Recomendamos por ahora la utilización de la ELISA como método de detección de la NS1 y no los métodos rápidos recientemente descritos, debido a los estudios que muestran que el caso de falsos negativos para el kit de detección rápida de NS1 aumenta en muestras de más de cinco días y que estos métodos fueron menos sensibles que la ELISA en estudios de campo [31, 32]. Se podrían utilizar los métodos rápidos si detectan en conjunto NS1, IgM e IgG, ya que en ese caso la sensibilidad y la especificidad pueden ser superiores a 95% [32]. Sugerimos que se realicen estudios futuros para determinar en campo la sensibilidad de estas pruebas rápidas y compararlas con los ELISAs correspondientes en Panamá.

Este trabajo fue financiado por el fondo anual de funcionamiento asignado al Departamento de Investigación en Virología y Biotecnología del ICGES.

Agradecimientos: A los compañeros de la sección de Inmunovirología, LCRSP, ICGES, por contribuir con la base de datos de supervisión de la Red Nacional de Dengue del año 2012.

Referencias

- [1] Martina, B.E., P. Koraka, and A.D. Osterhaus, Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev*, 2009. 22(4): p. 564-81.
- [2] (WHO), W.H.O. and S.P.f.R.a.T.i.T.D. (TDR), Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. 2009: Geneva.
- [3] Alvarez, M., et al., Dengue hemorrhagic Fever caused by sequential dengue 1-3 virus infections over a long time interval: Havana epidemic, 2001-2002. *Am J Trop Med Hyg*, 2006. 75(6): p. 1113-7.
- [4] Thein, S., et al., Risk factors in dengue shock syndrome. *Am J Trop Med Hyg*, 1997. 56(5): p. 566-72.
- [5] Vaughn, D.W., et al., Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis*, 2000. 181(1): p. 2-9.
- [6] Wang, W.K., et al., Slower rates of clearance of viral load and virus-containing immune complexes in patients with dengue hemorrhagic fever. *Clin Infect Dis*, 2006. 43(8): p. 1023-30.
- [7] Weaver, S.C. and N. Vasilakis, Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol*, 2009. 9(4): p. 523-40.

- [8] Domingo-Carrasco, C. and J. Gascon-Bustrenga, [Dengue and other hemorrhagic viral fevers]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2005. 23(10): p. 615-26.
- [9] Armien, B., et al., Clinical characteristics and national economic cost of the 2005 dengue epidemic in Panama. *Am J Trop Med Hyg*, 2008. 79(3): p. 364-71.
- [10] Saavedra, G. and E. Quiroz, Diagnostico por laboratorio del dengue en Panamá. 1988-2004. *Rev. Hosp Niño Panama*, 2007. 23: p. 24-30.
- [11] Kao, C.L., et al., Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. *J Microbiol Immunol Infect*, 2005. 38(1): p. 5-16.
- [12] Saxena, P., et al., Development and evaluation of one step single tube multiplex RT-PCR for rapid detection and typing of dengue viruses. *Virology*, 2008. 5: p. 20.
- [13] Martin, D.A., et al., Standardization of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assays for routine diagnosis of arboviral infections. *J Clin Microbiol*, 2000. 38(5): p. 1823-6.
- [14] Dussart, P., et al., Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. *Clin Vaccine Immunol*, 2006. 13(11): p. 1185-9.
- [15] Yabar V, C., Rol de las proteínas no estructurales en los eventos de replicación del ARN del virus dengue: propuesta de un modelo de replicación del ARN. *Rev. perú. med. exp. salud. publica*, 2003. 20(1): p. 51-57.
- [16] Libraty, D.H., et al., High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis*, 2002. 186(8): p. 1165-8.
- [17] Hang, V.T., et al., Diagnostic accuracy of NS1 ELISA and lateral flow rapid tests for dengue sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. *PLoS Negl Trop Dis*, 2009. 3(1): p. e360.
- [18] Young, P.R., et al., 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(3): p. 1053-7.
- [19] Alcon, S., et al., 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(2): p. 376-81.
- [20] Lapphra, K., et al., Evaluation of an NS1 antigen detection for diagnosis of acute dengue infection in patients with acute febrile illness. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2008. 60(4): p. 387-91.
- [21] Schilling, S., et al., Laboratory diagnosis of primary and secondary dengue infection. *J Clin Virol*, 2004. 31(3): p. 179-84.
- [22] Leparc-Goffart, I., et al., Development and validation of real-time one-step reverse transcription-PCR for the detection and typing of dengue viruses. *J Clin Virol*, 2009. 45(1): p. 61-6.
- [23] Kumarasamy, V., et al., Evaluating the sensitivity of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for early diagnosis of acute dengue virus infection. *Singapore Med J*, 2007. 48(7): p. 669-73.
- [24] Guzman, M.G., et al., Multi-country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis. *PLoS Negl Trop Dis*, 2010. 4(8).
- [25] Duong, V., et al., Clinical and virological factors influencing the performance of a NS1 antigen-capture assay and potential use as a marker of dengue disease severity. *PLoS Negl Trop Dis*, 2011. 5(7): p. e1244.
- [26] Bessoff, K., et al., Comparison of two commercially available dengue virus (DENV) NS1 capture enzyme-linked immunosorbent assays using a single clinical sample for diagnosis of acute DENV infection. *Clin Vaccine Immunol*, 2008. 15(10): p. 1513-8.
- [27] Tricou, V., et al., Comparison of two dengue NS1 rapid tests for sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. *BMC Infect Dis*, 2010. 10: p. 142.
- [28] Andries, A.C., et al., Field evaluation and impact on clinical management of a rapid diagnostic kit that detects dengue NS1, IgM and IgG. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012. 6(12): p. e1993.
- [29] Harris, E., et al., Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg*, 2000. 63(1-2): p. 5-11.
- [30] Rothman, A.L., Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest*, 2004. 113(7): p. 946-51.
- [31] Huang, C.H., et al., Laboratory diagnostics of dengue fever: An emphasis on the role of commercial dengue virus nonstructural protein 1 antigen rapid test. *J Microbiol Immunol Infect*, 2012.
- [32] Valdez Sandoval, J.J., et al., [Evaluation of the SD Dengue Duo diagnosis system for detection of NS1 protein and IgM and IgG dengue antibodies]. *Rev Cubana Med Trop*, 2012. 64(1): p. 27-34.
- [33] Santiago, G.A., et al, Analytical and Clinical Performance of the CDC Real Time RT-PCR Assay for Detection and Typing of Dengue Virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2013. 7(7): p. e2311.