



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO
TESINA DE GRADO PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
LICENCIADAS EN CIENCIAS DE LA SALUD EN LABORATORIO
CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO

TÍTULO:

EFICACIA DE LOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS Y ELISA PARA LA
DETECCIÓN DEL DENGUE EN LOS PACIENTES CON SÍNDROME FEBRIL,
QUE ACUDEN AL SUB CENTRO N° 1 DE LA CIUDAD DE ESMERALDAS,
DURANTE EL PERIODO DE ENERO A JUNIO DE 2015

AUTORAS:

Dayanna Brito A

Ana Cedeño S

TUTORA:

Lic. Ximena Robalino

Riobamba-Ecuador

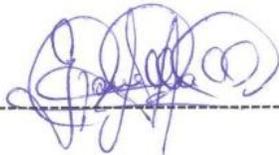
2015

CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL

El Tribunal de Defensa Privada conformada por: Lic. Gisnella Cedeño, Lic. Ximena Robalino, Dra. Mery Alvear, certificamos que los estudiantes: Dayanna Brito y Ana Cedeño, egresadas de la carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico de la Universidad Nacional de Chimborazo, se encuentran aptos para el ejercicio académico de la Defensa Pública de la Tesina, con el tema de investigación: EFICACIA DE LOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS Y ELISA PARA LA DETECCIÓN DEL DENGUE EN LOS PACIENTES CON SÍNDROME FEBRIL, QUE ACUDEN AL SUB CENTRO N° 1 DE LA CIUDAD DE ESMERALDAS, DURANTE EL PERIODO DE ENERO A JUNIO DE 2015.

Una vez que han sido realizadas las revisiones periódicas y ediciones correspondientes a la tesina.

Riobamba, Marzo 2016



Presidente del Tribunal

Lic Gisnella Cedeño



Miembro del Tribunal

Lic Ximena Robalino



Miembro del Tribunal

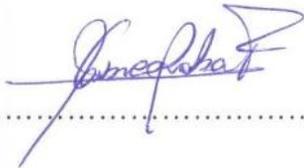
Mery Alvear Haro

ACEPTACIÓN DEL TUTOR

Por la presente, hago constar que he leído el protocolo del Proyecto de Grado

Presentado por las señoritas: Dayanna Brito y Ana Cedeño para optar al título de Licenciado en Laboratorio Clínico e Histopatológico, y que acepto asesorar al estudiante (a) en calidad de tutor, durante la etapa del desarrollo del trabajo hasta su presentación y evaluación.

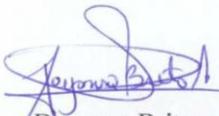
Riobamba, Marzo 2016



.....

DERECHO DE AUTORÍA

Nosotros, Dayanna Brito y Ana Cedeño, somos responsables de todo el contenido de este trabajo investigativo, los derechos de autoría pertenecen a la Universidad Nacional de Chimborazo.



Dayanna Brito

C.I.020210109-3



Ana Cedeño

C.I.080315469-9

AGRADECIMIENTO

Le agradezco a Dios y a mis padres por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

Dayanna

AGRADECIMIENTO

Agradezco a todas las personas y en especial a mis padres que de una u otra forma estuvieron conmigo, porque cada una aportó con un granito de arena; y es por ello que a todos y cada uno de ustedes les dedico todo el esfuerzo, sacrificio y tiempo que entregué a esta tesis.

Ana

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a Dios por haberme permitido llegar hasta el final de mi carrera y lograr mis objetivos además de su infinita bondad y amor. A mis padres por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una buena persona de bien y brindarme su amor. A mis maestros por su gran apoyo para la culminación de mis estudios profesionales y para la elaboración de esta tesis.

Dayanna

DEDICATORIA

Quiero dedicarle este trabajo A Dios que me ha dado la vida y fortaleza para terminar mi carrera. A mis Padres por estar ahí cuando más los necesité, por brindarme los recursos necesarios y estar a mi lado apoyándome, aconsejándome y por hacer de mí una mejor persona. A mis maestros que en este andar por la vida, influyeron con sus lecciones y experiencias en formarme como una persona de bien y preparada para los retos que pone la vida.

Ana

RESUMEN

El Dengue es una patología que en los últimos años ha proliferado en el mundo de forma alarmante debido a las condiciones sanitarias en los países de Latinoamérica, el tema: Eficacia de los métodos Cromatográficos y Elisa para la detección de Dengue, como ayuda diagnóstica en la detección de la patología, se realizó en el Sub Centro de Salud N° 1 de la ciudad de Esmeraldas, se tomaron las muestras a 43 pacientes en estado febril, a quienes se extrajo sangre para realizar las determinaciones de Inmuno Cromatografía y Elisa, se construyó el marco teórico, utilizando referentes teóricos correspondientes a las dos variables, en busca de una interrelación de las mismas y en qué grado, la metodología utilizada fue la investigación exploratoria, el diseño fue documental y de campo, para lo cual se utilizaron los métodos inductivo y deductivo, se realizaron las determinaciones en una muestra obtenida de los pacientes en el momento del pico febril, la muestra fue de 43 pacientes que se sometieron al estudio, los resultados arrojan una similitud en los porcentajes de las pruebas utilizadas, con una sensibilidad de 92 y 94 % para Inmuno Cromatografía y Elisa, mismos que permitieron cumplir los objetivos y comprobar la hipótesis planteada al inicio del proceso investigativo con la ayuda de un estadígrafo, de los 43 pacientes analizados obtuvimos 36 positivos, 4 negativos y 3 indeterminados para la detección de Dengue por Inmuno Cromatografía, dándonos una eficacia de 84%, mientras que de los 43 pacientes analizados por el método de Elisa obtuvimos 37 positivos, 4 negativos y 2 indeterminados dándonos una eficacia del 86%. Se elaboraron las conclusiones y se propusieron las recomendaciones; como conclusión principal se determina que para realizar una determinación de laboratorio para diagnosticar una patología, tomar en consideración las normas de bioseguridad, para evitar errores o contaminaciones al profesional de laboratorio que menoscabe su salud, se debe tomar en cuenta que se cumplan los requisitos de control de calidad durante todo el proceso de análisis clínico, de igual forma verificar la especificidad de las pruebas, debido a que es importante utilizar técnicas sensibles que tengan una alta especificidad de esa forma se estaría garantizando la idoneidad de las mismas.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CENTRO DE IDIOMAS

ABSTRACT

Dengue is a disease that in recent years has proliferated in the world at an alarming rate due to sanitation conditions in Latin American countries, the subject matter Effectiveness of Chromatographic and Elisa Methods for detection of Dengue, as a diagnostic aid in detection of the pathology the effectiveness of Chromatographic and Elisa methods for detection of dengue must determine, the theoretical framework was constructed using theoretical references for the two variables, looking for an interrelation between them and to what level, exploratory research was used as a methodology, the design was documentary and field, for which the inductive and deductive methods were used, determinations were performed on a sample obtained from patients at feverish peak, 43 patients were subjected of study, the results showed values that allowed to gather the objectives and test the hypothesis established at the beginning of the research process with the help of a statistician, conclusions were drawn and recommendations were proposed; its main conclusion is established to get through a determination of laboratory to diagnose a disease, take into account biosecurity standards to prevent errors or Laboratorist professionals get contaminated that undermines their health, quality control requirements should be taken into account during the whole clinical analysis process, likewise verify the specificity of the tests, because it is important to use sensitive techniques that have a high specificity in consequence would be ensuring the suitability of the testing.

Translation reviewed by:


Dra. Fanny Zambrano MsC.

ENGLISH TEACHER AT LANGUAGES CENTER FCS .

Riobamba March 4th, 2016



ÍNDICE

CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL.....	ii
ACEPTACIÓN DEL TUTOR.....	iii
DERECHO DE AUTORÍA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
DEDICATORIA.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	xiii
CAPÍTULO I.....	1
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	3
1.3 OBJETIVOS.....	3
1.3.1 Objetivo General.....	3
1.3.2 Objetivos Específicos.....	3
1.4. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA:.....	3
CAPÍTULO II.....	5
2. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1 POSICIONAMIENTO PERSONAL.....	5
2.2.1 Virus.....	5
2.2.2.1 Aedes Aegypti.....	10
2.2.2.2 Ciclo de Vida.....	10
2.2.3 Dengue.....	12
2.2.3.1 Síntomas y Signos del Dengue:.....	12
2.2.3.2 Tratamiento.....	12

2.2.3.3 Clasificación Clínica del Dengue	13
2.2.3.4 La importancia del Diagnóstico en el Dengue.....	14
2.2.4 Inmunología	14
2.2.4.1 Antígenos	15
2.2.4.2 Anticuerpos	16
2.2.5 Pruebas confirmatorias de Dengue	17
2.2.5.1 Diagnóstico de Laboratorio de Dengue.	17
2.2.5.2 Técnicas para el Diagnóstico de la Infección por el Virus Dengue.....	18
2.2.5.3 Técnicas Inmunológicas	19
2.2.5.4 Cromatografía	19
2.2.6 Especificidad y Sensibilidad de las Pruebas	35
2.2.6 Control de Calidad	36
2.3 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS	37
2.4 HIPÓTESIS	40
2.5. VARIABLES	40
2.5.1. Variable Independiente	40
2.5.2. Variable Dependiente	40
2.5.3 Operacionalización de las Variables.....	41
CAPÍTULO III.....	42
3. MARCO METODOLÓGICO.....	42
3.1 MÉTODO CIENTÍFICO	42
3.1.1 Tipo de Investigación.....	42
3.1.2 Diseño de Investigación.....	43
3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA.....	44
3.2.1. Población	44
3.2.2. Muestra	44
3.3. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	44
3.4. TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.	44
3.5 TÉCNICAS DE PROCEDIMIENTO PARA EL ANÁLISIS DE RESULTADOS.	45

3.6 COMPROBACIÓN DE LA HIPÓTESIS.....	51
CAPÍTULO IV	53
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	53
4.1 CONCLUSIONES	53
4.2 RECOMENDACIONES.....	54
LINCOGRAFÍA	56
ANEXOS	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°. 3. 1.	Pacientes investigados por edades que asisten al Sub Centro N° 1 de la Ciudad de Esmeraldas	45
Tabla N°. 3. 2	Determinación de Dengue por Cromatografía en pacientes que asisten al Sub Centro N° 1 de la Ciudad de Esmeraldas	46
Tabla N°. 3. 3	Determinación de Dengue por Elisa en pacientes que asisten al Sub Centro N° 1 de la Ciudad de Esmeraldas	48
Tabla N°. 3. 4	Análisis Comparativo	49

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N°. 2. 1	Estructura Básica del Anticuerpo	17
Gráfico N°. 2. 2	Estructura Genómica del Virus del Dengue	7
Gráfico N°. 2. 3	Estructura del Virus del Dengue.....	7
Gráfico N°. 2. 4	Ciclo Deplicativo del Virus	8
Gráfico N°. 2. 5	Técnica de Elisa.....	25
Gráfico N°. 2. 6	Mac Elisa	26
Gráfico N°. 2. 7	Elisa de Inhibición.....	27
Gráfico N°. 3. 1	Pacientes investigados por edades que asisten al Sub Centro N° 1 de la Ciudad de Esmeraldas	45
Gráfico N°. 3. 2	Determinación de Dengue por Cromatografía en pacientes que asisten al Sub Centro N° . 1 de la Ciudad de Esmeraldas	47
Gráfico N°. 3. 3	Determinación de Dengue por Elisa en pacientes que asisten al Sub Centro N° 1 de la Ciudad de Esmeraldas.....	48
Gráfico N°. 3. 4	Análisis Comparativo	49

INTRODUCCIÓN

El dengue es en la actualidad, la arbovirosis humana de mayor importancia. La enfermedad se reporta en más de 100 países y 2,500 millones de personas están en riesgo de padecerla. Se estima que anualmente ocurren 50, 000,000 de infecciones con más de 500,000 casos de hospitalización y se producen entre 25,000 y 50,000 muertes. (OMS, 2013). La abrupta incidencia del Dengue en el mundo, ha puesto en evidencia la necesidad de buscar métodos nuevos para el diagnóstico preciso, que además sean simples, eficientes y rápidos desde el punto de vista serológico, epidemiológico y clínico; características que reúnen los métodos para la detección de anticuerpos IgM; que aunque no diferencian el serotipo infectante son las más usados, aun cuando la reactividad cruzada que se produce entre los Flavivirus y su amplia distribución provoca ciertas polémicas en cuanto a su especificidad y sensibilidad; razones por las cuales han surgido nuevas técnicas, con el fin de aligerar y hacer menos laborioso el proceso de confirmación diagnóstica de pacientes que padecen esta enfermedad, al tiempo que permiten aportar un mejor control, monitoreo poblacional y prevención. (Valero, 2006).

En el Ecuador el Dengue representa un prioritario y creciente problema de salud pública en el contexto de las enfermedades transmitidas por vectores, mostrando un comportamiento endemo-epidémico desde su aparición a finales de 1988.

Los anticuerpos tipo IgM o IgG, presentes en el suero reaccionan cuando se combinan con anti IgM e IgG humana, inmovilizados en un soporte o tira, en 2 líneas. El anticuerpo monoclonal anti dengue marcado con oro coloidal reacciona con los antígenos virales. En una muestra positiva, el complejo de oro es capturado por la IgM y/o IgG en la membrana formando una línea color púrpura. El procedimiento fue desarrollado según instrucciones de la casa comercial, ensayando todas las muestras por duplicados. La prueba Elisa consiste en un inmunoensayo de captura sobre fase sólida, para la detección de anticuerpos IgM específicos a virus Dengue. Se utilizan pozos sensibilizados con anticuerpos anti IgM humana. Cuando se adicionan las muestras de suero, los anticuerpos IgM presentes en los mismos son capturados y detectados

mediante la adición de un complejo antígeno Dengue/anticuerpo monoclonal antinflavivirus conjugado a la enzima peroxidasa. Esta reacción se evidencia mediante la reacción con un cromógeno-sustrato para esta enzima (Tetrametilbenzidina/H₂O₂). La determinación de anticuerpos IgG se basa en el mismo principio, solo cambia el anticuerpo que está adherido a la fase sólida. El procedimiento fue desarrollado según instrucciones del fabricante y todas las muestras fueron ensayadas por duplicado.

En Esmeraldas el 75% de enfermos en hospitales, subcentros y clínicas presentan manifestaciones clínicas de dengue lo cual no se ha podido bajar el índice ya que existe poco conocimiento en la población sobre la reproducción de dicho vector

La tesis tiene la siguiente estructura.

El capítulo I, describe el marco referencial, el problema en estudio, la formulación del problema, la justificación e importancias del tema y los objetivos generales y específicos, sustentables en un marco teórico que lo transcribimos

Capítulo, capítulo II, estudia los referentes teóricos de las dos variables en estudio, con definiciones de destacados investigadores sobre la importancia de las técnicas de determinación Inmuno cromatográfico y Elisa para detectar dengue, sus tipos, importancia, beneficios entre otros y cómo influye la una variable sobre la otra.

El capítulo III, contiene la metodología utilizada para la investigación, tipo, diseño de estudio, población y muestra, técnicas de obtención de datos y de interpretación de los mismos.

El capítulo IV, describe la interpretación y análisis de los resultados que arrojan los instrumentos aplicados para obtener información que permita comprobar la hipótesis planteada.

El capítulo V, contiene las conclusiones y recomendaciones, que arroja todo el proceso investigativo.

CAPÍTULO I

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En los últimos años el dengue en el mundo ha proliferado. La OMS pronostica que cada año se producen entre 50 millones y 100 millones de infecciones por el virus del dengue en el mundo.

Dada la emergencia y reemergencia del dengue y la fiebre hemorrágica del dengue, su diagnóstico se convierte en un objetivo de primer orden para cualquier país, por la necesidad de diferenciarlo de otras enfermedades y como soporte a los sistemas de vigilancia de la enfermedad.

En este sentido, la confirmación de laboratorio ocupa un papel prioritario, siendo el inmunoensayo enzimático para la captura de IgM anti-dengue el método de elección por su elevada especificidad, sensibilidad y rapidez de ejecución.

En los últimos 50 años, su incidencia ha aumentado 30 veces con la creciente expansión geográfica hacia nuevos países y, en la actual década, de áreas urbanas a rurales. Se calcula que 2,5 mil millones de personas viven en áreas expuestas al riesgo del dengue ya que es la enfermedad viral transmitida por mosquito de más rápida propagación en el mundo.

En el Ecuador el Dengue representa un prioritario y creciente problema de salud pública en el contexto de las enfermedades transmitidas por vectores, mostrando un comportamiento endemo-epidémico desde su aparición a finales de 1988; año a partir del cual, de manera progresiva y en concordancia con la dispersión del vector y la circulación de nuevos serotipos virales, se han registrado varios ciclos epidémicos. La persistencia de la transmisión de la enfermedad está asociada a determinantes sociales, económicos, ambientales y culturales que en mayor o menor magnitud están presentes en aproximadamente el 70% de la extensión territorial del país, donde se estima habitan 8'220.000 habitantes que están en riesgo de enfermar por esta patología.

Durante el año 2012 se reportaron 287 enfermos de los cuales el 1.8% corresponden a dengue grave y dengue sin complicaciones el 91.6%, las condiciones son propicias para la reproducción del dengue transmitido por el *Aedes Aegypti*, que deposita sus huevos en aguas estancadas, recipientes sin tapa, charcos, llantas en desuso entre otros.

En Esmeraldas el 75% de enfermos en hospitales, sub centros y clínicas presentan manifestaciones clínicas de dengue lo cual no se ha podido bajar el índice ya que existe poco conocimiento en la población sobre la reproducción de dicho vector. En el mes de noviembre se presentaron 19 casos de dengue y solo se reportó 1 caso grave sin complicaciones. (Ministerio de Salud Pública, 2012).

La transmisión del dengue se mantiene de manera endémica durante todo el año y los ciclos epidémicos generalmente coinciden con la temporada de lluvias, donde se dan las condiciones propicias para la explosiva reproducción del *Aedes Aegypti* vector de la enfermedad en una serie de recipientes que se encuentran en las viviendas.

Las causas parecen ser: la presencia de llantas en las viviendas, tarrinas, botellas o recipientes inservibles en el patio de las casas que pueden contener agua.

El depósito de sus huevos lo hace en recipientes que contengan agua "limpia" (floreros, porta macetas, latas, botellas, tambores, cubiertas usadas con agua de lluvia) y así depositar sus huevos próximos a la superficie, los que adheridos a la parte interna de los recipientes artificiales o naturales, forman verdaderos criaderos. Los huevos eclosionan en 2 o 3 días convirtiéndose en larvas en condiciones favorables de temperatura y humedad. Los huevos constituyen la fase de resistencia del ciclo, dado que pueden mantener vivo el embrión hasta un año. Por lo general El *Aedes Aegypti* vive unas pocas semanas, no superando el mes.

1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿De qué forma se puede determinar la eficacia de los métodos Cromatográficos y Elisa para la detección del dengue en los pacientes con síndrome febril que acude al Sub Centro N° 1 de la ciudad de Esmeraldas durante el período de Enero a Junio de 2015?

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo General

Determinar la eficacia de los métodos Cromatográficos y Elisa para la detección del dengue en los pacientes con síndrome febril que acuden al Sub Centro N° 1 de la ciudad de Esmeraldas durante el período Enero a Junio de 2015.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Utilizar pruebas de screening Inmuno Cromatográficas y Elisa para la detección del Dengue
- Comparar la sensibilidad de las pruebas Inmuno Cromatográficas y Elisa para la detección del Dengue
- Establecer la eficacia de las pruebas mediante un estadígrafo como ayuda de diagnóstico del Dengue cualitativos y cuantitativos

1.4. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA:

El dengue es una enfermedad epidémica de alta potencia, que en los últimos años se ha estado presentando en sus formas, clásicas y hemorrágicas, en gran parte del territorio del Ecuador, debido a la propagación del mosquito *Aedes Aegypti*.

En este proyecto se toma el dengue como problema de investigación, debido a que esta enfermedad se presenta durante todo el año con mayor prevalencia en la estación invernal, alterando la salud de las personas que lo sufren y generando casos graves que conducen a la muerte.

La importancia de este tema está en que la población hace caso omiso de la información emitida por los organismos competentes sobre las formas de prevenir la enfermedad, convirtiéndose estas causas en la principal para que el virus se propague al resto de zonas costeras del país, debido a que no todas las personas están informadas de esta patología, a pesar de que se desarrollan programas de prevención, mismos que no han tenido un efecto positivo en vista de que los casos por la enfermedad aumenta cada año, motivo por el cual es necesario dar a conocer los mecanismos de acción del Dengue, sus características, y fundamentalmente establecer la especificidad de las pruebas Inmuno Cromatográficas frente a las Elisa para la detección de la enfermedad.

Debido a la alta prevalencia de la enfermedad cada año se utilizan nóveles técnicas para la detección del virus, es este nuestro interés de conocer cuál de las pruebas mencionadas en este estudio es más precisa para detectar el virus.

La factibilidad de este proyecto está en que se cuentan con los recursos, bibliográficos, técnicos, tecnológicos, temporales y económicos que serán aportados por las investigadoras.

Los beneficiarios directos serán los pacientes que acuden al Sub Centro de salud N ° 1 de Esmeraldas, y los beneficiarios indirectos serán los estudiantes de la carrera de laboratorio clínico de la Unach.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1 POSICIONAMIENTO PERSONAL.

Es muy relevante realizar la determinación de Dengue y la investigación minuciosa en pacientes que acudieron al Sub Centro de Salud N° 1 en Esmeraldas, ya que esta enfermedad se ha incrementado en lo que se direcciona en esta población para realizar la presente investigación.(Recalde, 2011)

De acuerdo con lo expuesto las tesis están de acuerdo con la escuela pragmática, del conocimiento, por ser las ciencias de laboratorio Clínico un área donde se interacciona la teoría con la práctica, es fundamental utilizar este enfoque, al poner en práctica las consideraciones teóricas y fundamentos del objeto estudio a fin de obtener resultados veraces que sean ayuda para que el profesional médico confirme o reformule su impresión diagnóstica.

2.2 FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.2.1 Virus

Los virus son microorganismos intracelulares, compuestos por ARN o por ácido desoxirribonucleico (ADN) nunca ambos y una capa protectora de proteína o de proteína combinada con componentes lipídicos o glúcidos. En general, el ácido nucleico es una molécula única de hélice simple o doble; sin embargo, ciertos virus tienen el material genético segmentado en dos o más partes. La cubierta externa de proteína se llama cápside, y las subunidades que la componen, capsómeros. Se denomina nucleocápsida al conjunto de todos los elementos anteriores. Algunos virus poseen una envuelta adicional que suelen adquirir cuando la nucleocápsida sale de la célula huésped. La partícula viral

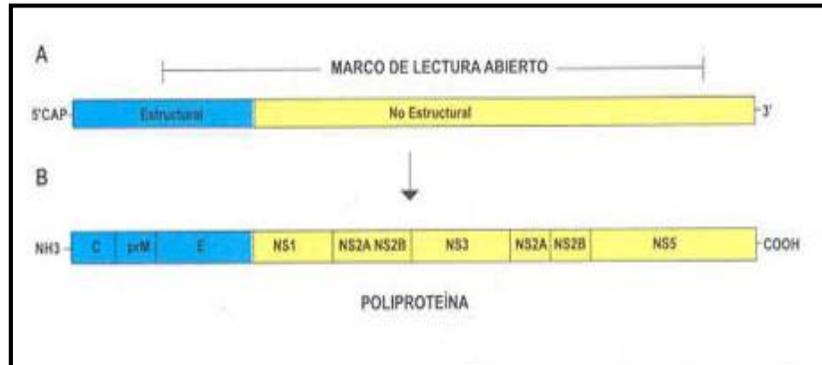
completa se llama virión. Los virus son parásitos intracelulares obligados, es decir: sólo se replican en células con metabolismo activo, y fuera de ellas se reducen a macromoléculas inertes.

El tamaño y forma de los virus son muy variables. Hay dos grupos estructurales básicos: isométricos, con forma de varilla o alargados, y virus complejos, con cabeza y cola (como algunos bacteriófagos). Los virus más pequeños son icosaédricos (polígonos de 20 lados) que miden entre 18 y 20 nanómetros de ancho (1 nanómetro = 1 millonésima parte de 1 milímetro). Los de mayor tamaño son los alargados; algunos miden varios micrómetros de longitud, pero no suelen medir más de 100 nanómetros de ancho. Así, los virus más largos tienen una anchura que está por debajo de los límites de resolución del microscopio óptico, utilizado para estudiar bacterias y otros microorganismos. (Avirutnan, 2008)

2.2.2 Virus del Dengue

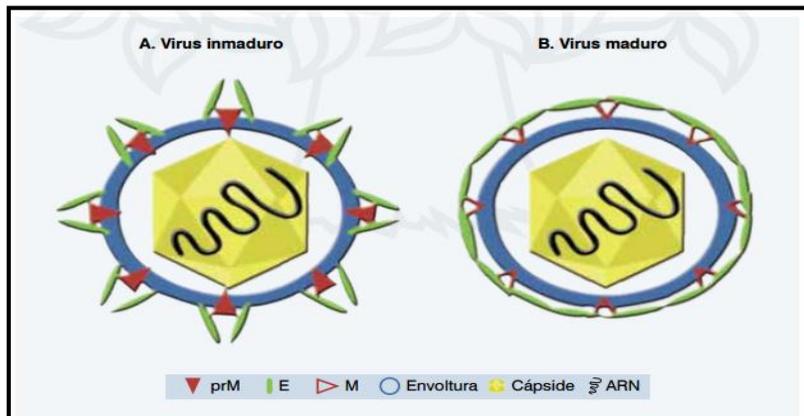
El virus dengue pertenece a la familia Flaviviridae y al género Flavivirus. Se han descrito cuatro serotipos antigénicamente diferentes, DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. El genoma viral está constituido por un ARN de cadena sencilla y polaridad positiva, el cual codifica para una poliproteína que se fragmenta por la acción de proteasas virales y celulares para originar 10 proteínas virales individuales, tres estructurales y siete no estructurales. Las proteínas estructurales tienen funciones que incluyen desde el proceso de interacción con los receptores de la célula blanco (proteína E), pasando por la inducción de la respuesta antigénica, hasta la formación de las estructuras del virión, mientras que las no estructurales son importantes para la replicación viral; además, las estructuras secundarias de tipo tallo-bucle presentes en los extremos 5' y 3' de las regiones no traducidas (5'UTR y 3'UTR) facilitan y potencian la traducción de las proteínas virales. (Chiu WW, 2005)

Gráfico N. 2. 1 Estructura genómica del virus del Dengue



Fuente: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid

Gráfico N. 2. 2 Estructura del virus del Dengue

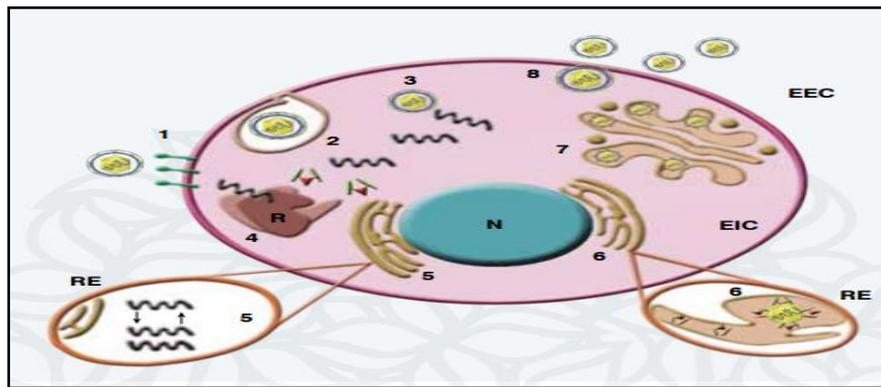


Fuente: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid

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. (Bartenschlager R, 2008).

Gráfico N. 2. 3 Ciclo replicativo del virus



Fuente: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid

De las enfermedades transmitidas por artrópodos, aquellas causadas por el virus dengue se consideran las más importantes en cuanto a morbilidad y a mortalidad. Existen cuatro serotipos de este virus, DENV-1 a DENV-4, todos capaces de producir varios tipos de enfermedad en el humano, conocidos comúnmente como “dengue”. Este término incluye tanto las formas no aparentes o silentes de la enfermedad como las formas clínicas severas y no severas. (Kurane I, 2001).

Más de 2,5 billones de personas habitan en zonas endémicas para el virus dengue y se estima que anualmente se presentan entre 50 y 100 millones de casos de dengue en todo el mundo.

Entre los factores responsables de la emergencia y la reemergencia del virus se encuentran el crecimiento de la población y la circulación constante de varios serotipos

en las mismas áreas endémicas, así como la gran densidad y la distribución geográfica de los vectores. Estos factores, sumados a la alta morbimortalidad de la infección, hacen que la enfermedad no solo sea un serio problema de salud pública, sino también un problema social y económico en los países en vía de desarrollo. Debido a que hasta el momento no existe una vacuna licenciada para la prevención de la infección ni una terapia específica para controlar la enfermedad, el diagnóstico temprano y específico es de vital importancia para brindar un tratamiento rápido y oportuno al paciente. (Mackenzie JS, 2004).

El diagnóstico presuntivo de la enfermedad se basa en las manifestaciones clínicas, pero el diagnóstico confirmatorio se debe hacer con base en pruebas de laboratorio, ya sean celulares (aislamiento de virus en cultivos) o inmunológicas (detección de IgM en fase aguda o seroconversión en fase convaleciente). Adicionalmente, los avances en técnicas de biología molecular han abierto la posibilidad de un diagnóstico más rápido y específico que podría ayudar a mejorar el tratamiento de los pacientes y por consiguiente, a controlar el desarrollo de la enfermedad.

En los últimos años, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció una agenda de prioridades en investigación de dengue, en la que se recomienda, entre otras cosas, validar las nuevas técnicas de diagnóstico descritas recientemente, haciendo especial énfasis en las moleculares, ya que son más sensibles y rápidas que las técnicas celulares e inmunológicas; además, son una herramienta epidemiológica importante para detectar el serotipo viral, y mediante secuenciación de regiones específicas en el genoma permiten identificar las cepas circulantes, lo que las convierte en una herramienta útil en estudios de evolución viral. Teniendo en cuenta estos antecedentes, es necesaria una revisión de literatura en relación con las técnicas que históricamente se han empleado para el diagnóstico de dengue, con el fin de facilitarle al médico o al personal de laboratorio la elección de un método diagnóstico en aquellos casos en donde hay sospecha de dengue. (Pierre V, 1994)

2.2.2.1 Aedes Aegypti

Es un insecto pequeño, de color oscuro con rayas blancas en el dorso y en las patas. Emite un resplandor plateado, según la incidencia de la luz sobre su cuerpo. Adopta una posición paralela a la superficie de reposo. Es de hábitos diurnos, se muestra activa a media mañana y poco antes de oscurecer. Sus hábitos son domésticos y su costumbre es seguir a las personas en sus desplazamientos.

Elige habitar tanto en áreas interiores o exteriores de las casas o departamentos, especialmente en lugares frescos y oscuros. Su alimentación, como la de otros insectos de su especie, consiste en el néctar y jugos vegetales, pero además, la hembra hematófoga (pica a cualquier organismo vivo que tenga sangre caliente), ya que después del apareamiento necesita sangre para la maduración de sus huevos. Su ataque es silencioso, picando las partes bajas de las piernas del hombre, especialmente los tobillos. (Chiu WW, 2005).

2.2.2.2 Ciclo de vida

El *Aedes Aegypti* tiene dos etapas bien diferenciadas en su ciclo de vida: fase acuática con tres formas evolutivas diferentes (huevo, larva y pupa) y fase aérea o adulto.

- La fase acuática dura aproximadamente siete días, con rangos entre tres y doce dependiendo de la temperatura.
- Los huevos soportan la desecación hasta de un año, por eso es muy frecuente encontrar grandes cantidades de larvas en las temporadas de lluvias, en diversos recipientes.
- El período de larvas comprende cuatro etapas evolutivas. El tiempo aproximado para pasar de una etapa a otra, es de aproximadamente 48 horas.

- El estado de pupa corresponde a la última etapa de maduración de la fase acuática. De ahí emerge (del agua) el mosquito que corresponde a la fase aérea.
- Una vez que los mosquitos hembras han emergido, buscan a los machos para copular y luego se alimentan con sangre para facilitar la maduración de los huevos. Realizan una postura cada 3 días y después de cada postura necesitan alimentarse con sangre.
- La sobrevivencia de los mosquitos adultos tiene un promedio de cuatro a ocho semanas, aunque puede variar por circunstancias climatológicas; la hembra sobrevive más tiempo que el macho y es más resistente a las variaciones de temperatura y humedad ambiental.

La sobrevivencia de los mosquitos depende de la capacidad para alimentarse, reproducirse, protegerse y dispersarse. Generalmente el apareamiento se realiza cuando la hembra busca alimentarse; se ha observado que el ruido que emite al volar es un mecanismo por el cual el macho es atraído así como con otras sustancias que liberan los moscos.

Una vez copulada e inseminada la hembra, el esperma que lleva es suficiente para fecundar todos los huevecillos que produce durante su existencia, no aceptando otra inseminación adicional

Las hembras de estos vectores son hematófagas, es decir se alimentan principalmente de sangre y es en ese momento cuando transmiten los virus causantes de la enfermedad. Los machos se alimentan de néctares de plantas que se encuentran a su alrededor; frecuentemente están cercanos a las fuentes de alimentación de las hembras para realizar el apareamiento. Están predominantemente asociados al hábitat humano. (Bartenschlager R, 2008)

2.2.3 Dengue

2.2.3.1 Síntomas y Signos del Dengue:

Pueden existir tres manifestaciones diferentes de la enfermedad: fiebre de dengue, fiebre hemorrágica de dengue y el shock hemorrágico.

La fiebre de dengue es una grave enfermedad de tipo gripal que afecta a los niños mayores y a los adultos, pero rara vez causa la muerte. En cambio, la fiebre hemorrágica de dengue (FHD) es otra forma más grave, en la que pueden sobrevenir hemorragias y a veces un estado de shock, que puede llevar a la muerte. En los niños es sumamente grave y el sólo el diagnóstico precoz, seguido del oportuno tratamiento puede prevenir la muerte. Los síntomas de la fiebre de dengue varían según la edad y el estado general de salud del paciente. Los lactantes y los niños pequeños pueden presentar un cuadro de fiebre y erupción parecida al sarampión, pero difícil de diferenciar de un estado gripal, una enfermedad eruptiva, el paludismo, la hepatitis infecciosa y otras enfermedades febriles. Los niños mayores y los adultos pueden tener síntomas análogos o un cuadro sintomático variable entre leve y gravísimo. (Avirutnan, 2008)

2.2.3.2 Tratamiento

No existe ningún medicamento en la actualidad dirigido a combatir el virus del dengue, por lo tanto sólo se puede realizar un tratamiento para aliviar los síntomas. Entre ellos, para la fiebre se puede administrar paracetamol (acetaminofén), nunca hay que tomar aspirina (ácido acetilsalicílico) ni otros analgésicos del grupo de los antiinflamatorios no esteroideos tales como el ibuprofeno, pues pueden aumentar el riesgo de manifestaciones hemorrágicas.

Para evitar la deshidratación se debe tomar abundantes líquidos y guardar reposo en cama.

Si el paciente tiene manifestaciones de dengue hemorrágico, debe acudir a un centro hospitalario, ya que probablemente necesite fluidos por vía endovenosa, e incluso podría requerir la administración de concentrado de plaquetas o de transfusiones de sangre si existen pérdidas importantes de la misma.

2.2.3.3 Clasificación Clínica del Dengue

El dengue es una enfermedad que se caracteriza por presentar manifestaciones clínicas que pueden ser graves o no graves. Estas manifestaciones permiten clasificar la enfermedad, de acuerdo con los criterios actuales propuestos por la OMS, como dengue (conocido anteriormente como dengue clásico o fiebre de dengue) o como dengue grave (conocido anteriormente como fiebre hemorrágica de dengue). El dengue cursa con manifestaciones clínicas como fiebre, náuseas, vómito, malestar general, eritema, dolor corporal generalizado, mialgias, artralgias, cefalea, petequias y sangrado de mucosa; estos síntomas se presentan en la fase febril que dura entre tres y cinco días. (OMS, programa para la investigación y capacitación en enfermedades tropicales, 2009)

Posteriormente, la fiebre disminuye, aumenta el hematocrito a causa del 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, en la fase de recuperación, la cual ocurre en aquellos pacientes que logran sobrevivir a la fase crítica, se produce la reabsorción de líquidos extravasculares, mejora el estado general, disminuyen los síntomas gastrointestinales, se normaliza el hematocrito y el recuento de leucocitos y, posteriormente, se normaliza el recuento de plaquetas.

Por su parte, el dengue grave se caracteriza por la extravasación de plasma, lo que puede originar choque por dengue, con o sin insuficiencia respiratoria, sangrados graves y

deterioro de órganos. Estos pacientes pueden presentar alteraciones como hipoxia y acidosis, lo que puede conducir a una coagulación intravascular diseminada o a una insuficiencia multiorgánica, en la cual se afecta principalmente el hígado, el corazón o el cerebro. Se han identificado diferentes factores que pueden desencadenar el dengue grave; estos involucran tanto al virus como al hospedero. De los factores asociados al virus, los serotipos DENV-4 y DENV-2 son más patogénicos que DENV-3 y DENV-1. Sin embargo, se debe tener en cuenta que las cepas del genotipo del sudeste asiático de DENV-2 son más virulentas que las cepas de otros genotipos, incluso se ha evidenciado un desplazamiento de las cepas locales del continente americano, por cepas pertenecientes al genotipo del sudeste. (OMS, programa para la investigación y capacitación en enfermedades tropicales, 2009)

2.2.3.4 La Importancia del Diagnóstico en el Dengue

La sintomatología que se presenta durante la infección por el virus dengue orienta el diagnóstico clínico, el cual es de tipo presuntivo; sin embargo, muchos de los síntomas también se pueden presentar en infecciones producidas por otros agentes etiológicos, lo que puede llevar a falsos positivos o falsos negativos. Es por ello, que el diagnóstico se debe confirmar mediante pruebas de laboratorio. Adicionalmente, en Colombia, teniendo en cuenta las normas del Ministerio de Salud y Protección Social, es de carácter obligatorio notificar los casos a las instituciones responsables de la vigilancia epidemiológica. Por lo tanto, las Instituciones Prestadoras de Salud se encargan de notificar los casos sospechosos de dengue a las instituciones de vigilancia del Gobierno, ya sean departamentales o estatales, que casi siempre son quienes realizan la confirmación de los casos. (Minprotección, 2008)

2.2.4 Inmunología

La Inmunología es la parte de la Medicina que se preocupa del correcto funcionamiento del sistema inmunitario: aquel que defiende al cuerpo de los invasores, como son los

microbios o las células cancerosas, por ejemplo. Este sistema debe reconocer al extraño, movilizar sus fuerzas y atacar. Para ello nuestro cuerpo está capacitado para llevar a cabo una compleja red de procedimientos que producen una rápida respuesta inmune cuando es necesario. (Iáñez, 2008)

2.2.4.1 Antígenos

Se denomina antígeno a cualquier agente extraño que al entrar en el organismo desencadena la producción de anticuerpos específicos contra él. Los antígenos suelen ser moléculas grandes que se hallan formando parte de las estructuras superficiales de los microorganismos (cápsula o pared bacteriana, envoltura o cápside de los virus, etc) o de las toxinas que éstos segregan en el medio interno. Para cada antígeno que puede entrar en el organismo, existen linfocitos B capaces de reconocerlo y de sintetizar proteínas que se unen específicamente al antígeno con el fin de desactivarlo. Estas proteínas se denominan anticuerpos. (Iáñez, 2008)

Virtualmente toda molécula ajena a un determinado organismo se comporta frente a éste como un antígeno, Se pueden diferenciar dos características primordiales en un antígeno.

Por una parte la inmunogenicidad o capacidad que presenta una molécula para generar una respuesta inmune en un organismo dado y la antigenicidad o particularidad del antígeno que hace que éste sea reconocido por un determinado anticuerpo. Ambas propiedades pueden o no estar presentes en un determinado antígeno. Moléculas de pequeño tamaño (haptenos o péptidos) son poco inmunogénicas y por ello se asocian a proteínas transportadoras de alto peso molecular o 'carriers' para inducir una respuesta inmune adecuada. Macromoléculas ubícuas (albúminas, citocromos, etc...) o de especies filogenéticamente relacionadas, son poco inmunogénicas. En estos casos, para obtener una respuesta adecuada es aconsejable utilizar como animal huésped una especie filogenéticamente alejada a la del antígeno a inocular.

Habitualmente se emplean como antígenos puros o previamente enriquecidos mediante técnicas de concentración o de separación electroforética. Uno de los criterios de mayor

importancia en la obtención de un suero monoespecífico es la inmunización con antígenos puros.

A la región del antígeno reconocida por un anticuerpo se le denomina epítipo o determinante antigénico. Un antígeno puede presentar un número variable de epítopes de estructura única o repetitiva.

La complejidad estructural de las proteínas favorece que éstas presenten por lo general un número elevado de epítopes distintos, mientras que los ácidos nucleicos y los polisacáridos, dada su repetitividad estructural, poseen un número escaso de epítopes diferentes. (Iáñez, 2008)

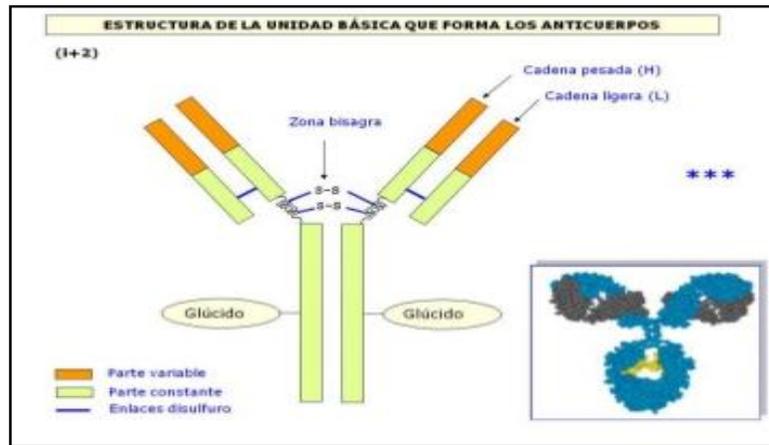
2.2.4.2 Anticuerpos

Los anticuerpos son moléculas de peso molecular aproximado de 150 kDa, pertenecientes al grupo de las inmunoglobulinas (Ig). Son moléculas capaces de reconocer otras moléculas, los antígenos. La capacidad de reconocimiento de un anticuerpo radica en las secuencias variables de sus cadenas proteicas, generadas por recombinación de una serie de 'gene cassettes' en el proceso de producción de los linfocitos B durante el desarrollo embrionario.

La combinatoria de estas secuencias puede producir más de un billón de secuencias diferentes. Esta información es almacenada en el 'pool' de linfocitos B presentes en nuestro tejido linfático.

La estructura básica de un anticuerpo se esquematiza en la figura: formado por dos cadenas proteicas pesadas y dos ligeras, unidas por puentes disulfuro. Se dividen en varias clases que se identifican según el tipo de cadena pesada en: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. (Iáñez, 2008)

Gráfico N. 2. 4 Estructura Básica del anticuerpo



Fuente: <http://es.slideshare.net/julianr110/inmunoglobulinas-e-hipersensibilidad>

2.2.5 Pruebas confirmatorias de Dengue

2.2.5.1 Diagnóstico de Laboratorio de Dengue.

La confirmación de laboratorio se realiza mediante pruebas que para detectar la presencia del virus, como es el aislamiento viral y pruebas moleculares o la determinación de anticuerpos a través de pruebas serológicas.

La determinación de anticuerpos IgM e IgG son de utilidad para determinar si se trata de una infección primaria o secundaria; además, los estudios de IgG por Panbio pueden determinar si a pesar de tratarse de una infección secundaria, también hay una infección reciente. (Uribarren, 2010)

Algunos de los métodos moleculares que se emplean en algunos centros de investigación son: RT-PCR, electroforesis en gel de agarosa y secuenciación Automática. (NORMA Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2014).

1. Condiciones de la muestra para identificación de dengue

Para poder diagnosticar dengue se necesita una muestra de sangre tomada en el período agudo de la enfermedad y una segunda muestra que puede tomarse desde el sexto día después del comienzo de los síntomas.

Deben recolectarse asépticamente 10 ml de sangre total la cual será transferida a tubos estériles libres de aditivos o preservativos. Los tubos que contienen la sangre se colocaran lo más rápido posible en hielo o en el refrigerador (4oC).

La separación del suero del coágulo se realizará el mismo día de la toma de la muestra y asépticamente. Los tubos con el suero se congelarán y almacenarán a temperatura de -70oC. El suero debe enviarse lo antes posible al laboratorio realizando el transporte en congelación. En las primeras 24-48h de colectado el suero, el mismo puede mantenerse a 40C hasta su envío al laboratorio (a igual temperatura). (Kouri, 2013)

2. Condiciones del paciente

La muestra debe obtenerse de pacientes que presenten cuadros febriles agudos con menos de cinco días de evolución desde el inicio de los síntomas

Identificación de anticuerpos IgM para dengue: los anticuerpos IgM para dengue aparecen en el suero aproximadamente al quinto día de iniciado el TABLA febril y persisten dos o tres meses. Su presencia indica infección actual o reciente. La muestra debe obtenerse en los casos que presenten síntoma febril con más de cinco días de evolución. (Kouri, 2013)

2.2.5.2 Técnicas para el Diagnóstico de la Infección por el Virus Dengue

A través de los años se han implementado diferentes técnicas diagnósticas, que abarcan desde las técnicas celulares hasta las moleculares, pasando por las inmunológicas, que son las más comunes. En general, las técnicas de diagnóstico se pueden clasificar como directas, si identifican partículas virales completas o proteínas que actúan como antígenos; o indirectas, si identifican la respuesta inmune que induce la infección por un

virus (presencia de anticuerpos específicos). También se pueden clasificar de acuerdo con su fundamento en técnicas de aislamiento viral, inmunológicas y moleculares. (Dutra NR, 2009).

2.2.5.3 Técnicas Inmunológicas

Las técnicas inmunológicas permiten la detección de anticuerpos (métodos indirectos) o de antígenos (métodos directos) presentes en el suero de un paciente infectado. Estas técnicas se basan en reacciones antígeno-anticuerpo (formación de inmunocomplejo), las cuales se pueden evidenciar por métodos de precipitación, aglutinación, fluorescencia, actividad enzimática o lisis celular. Teniendo en cuenta el curso clínico de la enfermedad y el comportamiento de la respuesta inmune (en una infección primaria o secundaria), la OMS recomienda el uso de sueros pareados, es decir, una muestra de suero tomada en fase aguda y otra tomada en fase convaleciente, pues dada la seroconversión (suero en fase aguda negativo para IgM y suero en fase convaleciente positivo para IgG), la cuadruplicación de los títulos lleva a un diagnóstico positivo de dengue. A continuación se describen las técnicas inmunológicas disponibles para el diagnóstico de la infección por el virus dengue. (Ocazonez RE, 2007).

2.2.5.4 Cromatografía

Los virus del Dengue, una familia con distintos serotipos de (Den 1, 2, 3,4), de cadena simple, envuelto, de los virus de ARN positivos. Los virus son transmitidos por picadura en el día por la familia Stegemyia, principalmente el Aedes Aegypti, y Aedes Albopictus. Hoy, más de 2.5 billiones de personas que viven en áreas tropicales de Asia, África, Australia, y las Américas están en riesgo de infectarse por Dengue. Se estima que 100 millones de casos de fiebre del dengue y 250,000 casos de dengue hemorrágico mortal ocurren anualmente en el mundo.

La detección serológica es el método más común para el diagnóstico de la infección con el virus del Dengue. Últimamente, la detección de antígenos liberados durante la replicación del virus en el paciente infectado muestra resultados muy prometedores. Se permite el diagnóstico desde el primer día después del inicio de la fiebre hasta el día 9, una vez que la fase clínica de la enfermedad termina, lo que permite un tratamiento precoz.

Método de análisis que permite la separación de gases o líquidos de una mezcla por adsorción selectiva, produciendo manchas diferentemente coloreadas en el medio adsorbente; está basado en la diferente velocidad con la que se mueve cada fluido a través de una sustancia porosa.

La prueba rápida Dengue Ag es un Inmunoensayo Cromatográfico de flujo lateral para la detección cualitativa del antígeno del Dengue (Dengue Ag) en suero o plasma humano. Este es usado por profesionales como tamizaje y ayuda diagnóstica de infección con el virus del Dengue. Las muestras reactivas con la prueba rápida *ad-bio* Dengue Ag deben confirmarse con métodos alternativos.

SD BIOLINE Dengue Duo

Intención de uso

QuickView™ Dengue Test es un es una prueba inmuno-cromatográfica rápida para la detección simultánea de anticuerpos IgG e IgM al virus del Dengue en sangre total, suero o plasma humano. La prueba está diseñada para el tamizaje de la infección viral del Dengue y como una ayuda en el diagnóstico diferencial de infecciones en conjunción con otros criterios. La fiebre del Dengue es una de las enfermedades más importantes del mosquito-borne en el mundo en los términos de morbilidad, mortalidad. La fiebre del virus Dengue (Serotipos 1-4) pertenece al grupo flavivirus y se trasmite en la naturaleza mediante picadura-diaria de mosquitos. El vector más importante del mosquito es

altamente domesticado y especies urbanas *Aedes Aegypti*. La infección primaria del Dengue, conocida también como la Fiebre Dengue, es el tipo más común de enfermedad de Dengue. Está asociado a la fiebre templada y alta, dolor de cabeza, dolor muscular y erupciones de la piel. La infección secundaria es conocida como Fiebre Hemorrágica Dengue (DHF) o síndrome de Shock de Dengue y resultados frecuentes en fiebre alta y en muchos casos con hemorragias eventuales y fallas circulatorias. El índice de fatalidad en pacientes con Síndrome de shock de Dengue puede ser tan alto como un 44%. El dengue se presenta típicamente con una fiebre de un repentino inicio de dolor de cabeza, dolor retroocular, dolor de espalda y los miembros (fiebre de hueso-roto) linfadenopatía y erupciones maculopapulares. Los pacientes diagnosticados con Dengue en áreas endémicas generalmente tienen una infección secundaria, mientras que pacientes en áreas no-endémicas son generalmente diagnosticados con infección primaria. La respuesta anticuerpo específico al virus del Dengue permite una serodiagnos y diferenciación entre infecciones de Dengue Primario y Secundario. QuickView™ Dengue Test es una nueva generación de prueba Inmuno Cromatográfica empleando el antígeno recombinante viral Dengue para los cuatro serotipos para detectar la respuesta del anticuerpo específico.

Principios de la prueba

QuickView™ Dengue Test emplea el principio de Inmuno Cromatografía. Los anticuerpos ratón anti-humano IgM y humano IgG son inmovilizados en la membrana de nitrocelulosa respectivamente, como dos líneas de prueba individuales (Línea IgM Línea IgG) en la ventana de prueba del dispositivo. La línea IgG en la ventana de prueba muy cercana a la ventana de muestra y seguida de la línea IgM. Como la muestra de prueba fluye a través de la membrana dentro del dispositivo de prueba El Dengue coloreado específico conjugado recombinante oro coloidal se compleja con los anticuerpos específicos (IgM y/o IgG) del virus del Dengue si está presente en la muestra. Este complejo se mueve más en la membrana hacia la región de prueba donde es capturado

por los anticuerpos humanos IgM e IgG revestidos en la membrana, conduciendo a la formación de una banda coloreada que indica el resultado positivo. La ausencia de esta banda coloreada en la ventana de prueba indica un resultado negativo. Una línea de control incorporada siempre aparecerá en la ventana de prueba cuando la prueba se ha realizado correctamente a pesar de la presencia o ausencia de los anticuerpos del Virus del Dengue en el espécimen.

Reactivos y material suministrado

Cada kit contiene:

1. QuickView™ Dengue Test Card en un sachet de aluminio
2. Buffer de muestra
3. Instrucciones de uso

Almacenaje y estabilidad

Los sachets sellados en el kit de pruebas deben ser almacenados entre 4-30°C para la duración del tiempo de caducidad como se indica en el sachet.

Advertencias y precauciones

1. Para uso de diagnóstico In Vitro solamente
2. Para uso de diagnóstico Profesional solamente
3. Leer las instrucciones con cuidado antes de efectuar la prueba
4. Este producto no contiene ningún material de procedencia humana
5. No usar el producto luego de la fecha de expiración
6. Manejar todos los especímenes como potencialmente infecciosos.
7. Seguir los estándares de procedimientos de laboratorios y guías de bioseguridad para el manejo y desecho de material potencial-mente infeccioso.

Cuando el procedimiento de la prueba se complete desechar los especímenes luego de auto clavado a 121°C por 20 min. Alternativamente, pueden ser tratados con hipoclorito de sodio al 0.5% por 1-2 horas antes de su desechos.

8. No pipetear los reactivos con la boca y no fumar o comer mientras se realiza la prueba.

9. Usar guantes durante todo el procedimiento de la prueba.

Colección del espécimen y preparación

1. No requiere una preparación especial previa del paciente antes de tomarle la muestra.
2. De preferencia Suero/Plasma frescos. El Suero/Plasma debe ser almacenado 2°-8°C hasta por 3 días en caso de demorar la prueba. Para almacenajes prolongados congelar el espécimen a -20°C por 3 meses o -70°C para periodos más largos.

3. La prueba trabaja mejor con muestras frescas de sangre entera. Si las pruebas no se pueden ejecutarse de inmediato, la sangre entera recolectada con un anticoagulante apropiado con el EDTA o Heparina u Oxalato debe ser almacenado de 2-8°C hasta por 3 días. Las muestras de sangre no deben ser congeladas.

4. Debe evitarse la repetición de congelamientos y descongelamientos del espécimen.

5. No usar especímenes hemolizados, coagulados, contaminados, lipémicos y viscosos/turbios.

6. Los especímenes conteniendo partículas deben ser centrifugados y usar para la prueba solamente el sobrenadante claro

7. Debe evitarse la inactivación térmica de la muestra

8. Los envíos de muestra deben cumplir con las normas locales de transportes de agentes etiológicos

PROCEDIMIENTO

		1
		Llevar los componentes a temperatura ambiente antes de su uso
		2
<p style="text-align: center;">Abrir el sachet y retirar el cassette</p> <p style="text-align: center;">Una vez abierto, el cassette debe ser usado de inmediato</p>		3
		Rotular el cassette de prueba con el nombre del paciente
4		
		<p>Aplicar 5ul de suero, plasma o sangre total humano al área "S1" Indicado por la marca de la flecha</p>
5		6
	<p>Adicionar 2 gotas de buffer de muestra al pozo marcado con "S"</p>	 <p>Al culminar lo 20 minutos leer los resultados. Una muestra positiva fuerte puede mostrar resultados mas prontamente.</p> <p><i>Nota: Los resultados luego de los 20 minutos pueden no ser seguros</i></p>

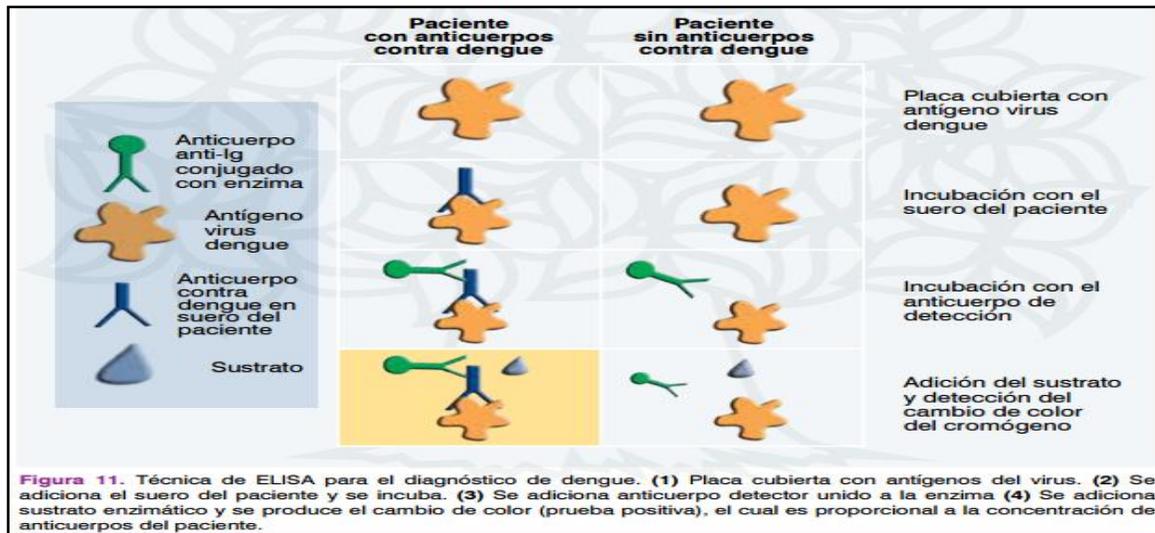
Fuente: http://www.pflabmedic.com.pe/catalogo/wp/INSERTO_DENGUE1.pdf

2.2.5.5 Elisa

Es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, como cambio de color o algún otro tipo; en ocasiones, con el fin de reducir los costos del ensayo, nos encontramos con que existe un anticuerpo primario que reconoce al antígeno y que a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario que lleva enlazado la enzima

anteriormente mencionada. La aparición de colorantes permite medir indirectamente mediante espectrofotometría el antígeno en la muestra.

Gráfico N. 2. 5 Técnica de Elisa



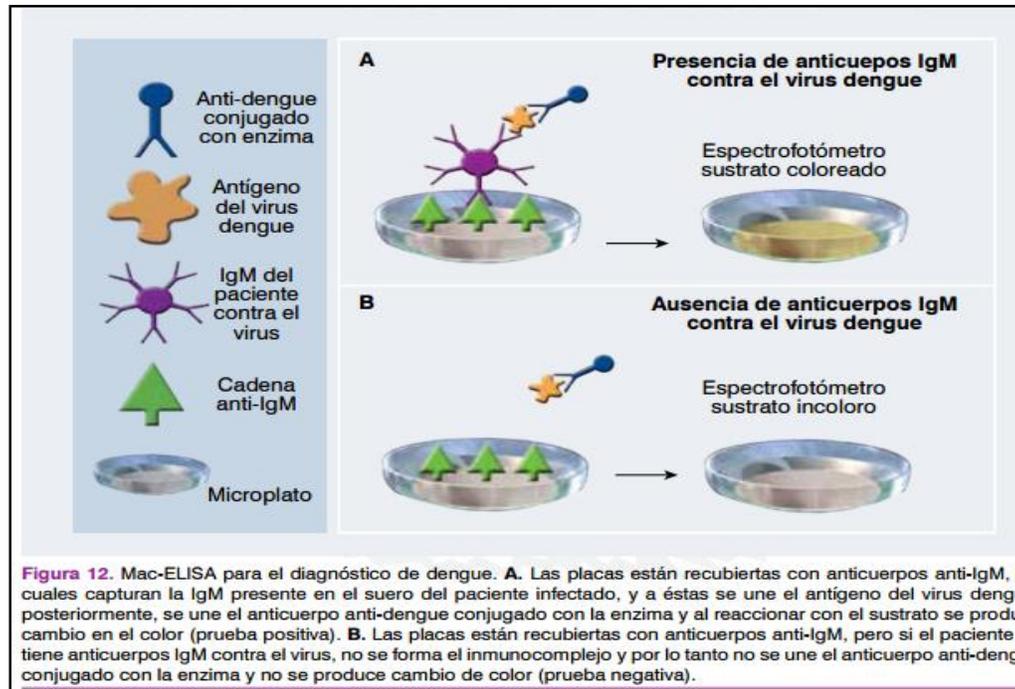
Fuente: (Vázquez, 1998)

Elaborado por: Dayanna Brito y Ana Cedeño

Elisa de captura de IgM (MAC- ELISA)

A partir de la década de los 80 se comenzaron a desarrollar los sistemas inmunoenzimáticos conocidos como ELISA, los cuales han sido de gran utilidad en el diagnóstico serológico del virus dengue. El MAC-ELISA aplicado para la detección de anticuerpos IgM a dengue, se ha convertido en una de las pruebas más utilizadas en los laboratorios, brindando un alto grado de sensibilidad y especificidad. Hasta el presente, este sistema es un invaluable método para la vigilancia de la FD y FHD/SCD, considerándose los anticuerpos IgM un importante marcador serológico de las infecciones por dengue. Estos anticuerpos comienzan a ser detectable con la caída de la fiebre, por lo que se recomienda que las muestras de suero utilizadas sean obtenidas después del 5to día de comienzo de los síntomas. (Innis, 1989)

Gráfico N. 2. 6 Mac Elisa



Fuente: (Vázquez, 1998)

Elaborado por: Dayanna Brito y Ana Cedeño

Método Elisa de inhibición (MEI)

Dos tipos de respuesta serológica se observan principalmente en el dengue: primaria y secundaria. La primaria se presenta en aquellos individuos que no son inmunes a flavivirus. La respuesta secundaria se observa en aquellos individuos con una infección aguda por dengue que han padecido previamente una infección por flavivirus. (Innis, 1989)

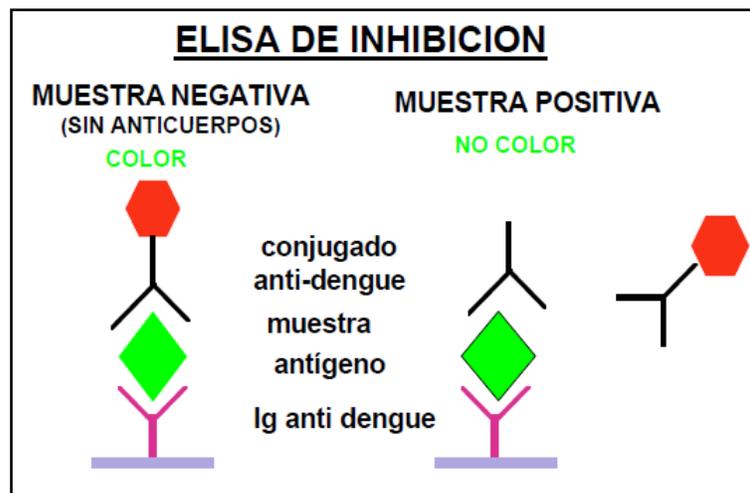
La inmunidad a un serotipo se considera de larga duración y efectiva frente a una segunda infección por el mismo serotipo. La existencia de los cuatro serotipos virales posibilita que se produzcan infecciones terciarias y cuaternarias.

En los individuos que sufren su primo infección, los anticuerpos IgG anti dengue comienzan a incrementarse lentamente a partir del 5to-6to día de comienzo de los

síntomas siendo máximos hacia los 15-21 días. Posteriormente declinan permaneciendo detectables prácticamente durante toda la vida. En el transcurso de una infección secundaria, los anticuerpos IgG se elevan casi simultáneamente al comienzo de los síntomas, permaneciendo elevados durante varias semanas declinando posteriormente. Estos altos niveles de anticuerpos IgG permiten un diagnóstico presuntivo en monosueros tomados durante la fase aguda de la enfermedad. (Innis, 1989)

Además del MAC-ELISA para la detección de anticuerpos IgM a dengue, se han desarrollado otros ELISAS para la detección de anticuerpos IgG que son de gran apoyo para el diagnóstico serológico de esta enfermedad (2-4) entre ellos el ELISA de Inhibición ha sido ampliamente aplicado, ya que además de su utilidad en poder confirmar un caso y definir el tipo de infección (primaria o secundaria) puede también ser empleado para estudios sero-epidemiológicos. (Vazquez, 2005)

Gráfico N. 2. 7 Elisa de inhibición



Fuente: (Vázquez, 1998)

Elaborado por: Dayanna Brito y Ana Cedeño

ELISA DE CAPTURA DE ANTICUERPOS IgG CONTRA DENGUE

Para la detección de infecciones secundarias por dengue

Uso Previsto

El ensayo ELISA de captura de anticuerpos IgG contra dengue de Panbio se utiliza para la detección cualitativa por presunción de niveles elevados de anticuerpos IgG contra el virus del dengue (serotipos 1-4) en pacientes con infecciones secundarias. Esta prueba está prevista como una ayuda para el diagnóstico clínico de laboratorio de pacientes que presentan síntomas clínicos consistentes con una infección por virus del dengue y deberá utilizarse junto con el ensayo ELISA de captura de anticuerpos IgM contra dengue y el ensayo Early ELISA para detectar dengue de Panbio, que también detectan infecciones primarias por virus del dengue. Los niveles altos de IgG indicativos de infección secundaria por dengue son detectables mediante el ensayo ELISA de captura de anticuerpos IgG contra dengue de Panbio ya a los 3 días del inicio de la enfermedad. Sin embargo, el período ventana óptimo de detección para un diagnóstico preciso de infección secundaria es de 6-15 días después del inicio de la enfermedad. Los resultados positivos son presuntos y se deberán confirmar mediante aislamiento viral, análisis de sueros pareados, detección de antígenos mediante técnicas de inmunohistoquímica o detección de ácido nucleico viral para poder confirmar la infección por virus del dengue.

Principio del ensayo

Los anticuerpos en suero de la clase IgG, cuando están presentes, se combinan con los anticuerpos anti-IgG humana con los que está recubierta la superficie de poliestireno de las tiras de micropocillos de prueba (placa de ensayo). Se diluye al volumen correcto de trabajo con diluyente para antígenos un conjunto de antígenos recombinantes de dengue concentrados de los serotipos 1-4. Los antígenos se producen utilizando un sistema de expresión en células de insecto y se inmunopurifican utilizando un anticuerpo monoclonal específico.

Al antígeno diluido se le agrega un volumen equivalente de peroxidasa de rábano (HRP) y anticuerpos monoclonales conjugados (MAb), permitiendo la formación de complejos antígeno-MAb. Se desecha el suero residual de la placa de ensayo mediante lavados y se agregan complejos antígeno-MAb a la placa de ensayo. Entonces, estos complejos antígeno-MAb se unen a los anticuerpos IgG específicos contra dengue del suero. Después de la incubación, los micropocillos se lavan y se añade un sistema de sustrato incoloro, tetrametilbencidina / peróxido de hidrógeno (Cromógeno TMB). La HRP hidroliza el sustrato, si esta presente y el cromógeno cambian a color azul. Después de interrumpir la reacción con ácido, la TMB cambia a amarillo. El cambio de color indica la presencia de anticuerpos IgG contra dengue en la muestra de ensayo.

Materiales que se suministran

1. Micropocillos Recubiertos con Anti-IgG Humana: (placa de ensayo) (12x8 pocillos). Listo para usar. Los micropocillos no utilizados deben volverse a sellar y almacenar con el secante.

Estable a 2-8°C hasta su caducidad.

2. Antígenos de Dengue 1-4 (recombinantes): Un vial con tapa transparente, 150 µL (Rojo) de antígenos virales de dengue 1, 2, 3 y 4 concentrados. El antígeno diluido no utilizado deberá desecharse. El antígeno concentrado es estable a 2-8°C hasta su caducidad.

3. Tampón de Lavado (20x): Una botella, 60 mL de solución salina tamponada con fosfato (pH 7,2-7,6) concentrada 20x con Tween 20 y conservante (Proclin™ al 0,1%). Puede cristalizarse a temperaturas bajas. Para corregirlo, incubar a 37°C hasta que esté transparente. Mezclar bien. Diluir una parte del Tampón de Lavado con 19 partes de agua destilada.

El tampón diluido se puede almacenar durante una semana (2-25°C).

4. Diluyente de la Muestra: Dos botellas, 50 mL (Rosa). Listo para usar. Solución salina tamponada con Tris (pH 7,2-7,6) con conservantes (Proclin™ al 0,1%) y aditivos. Estable a 2-8°C hasta su caducidad.

5. Diluyente de Antígeno: Una botella, 50 mL (Transparente).
Listo para usar. Tampón fosfato con conservantes (Proclin™ al 0,1% y gentamicina al 0,005%). Estable a 2-8°C hasta su caducidad.
6. Trazador de Anticuerpos Monoclonales Conjugados con HRP:
Una botella, 7 mL (Verde). Listo para usar. Trazador de anticuerpos monoclonales conjugados con peroxidasa de rábano con conservante (Proclin™ al 0,1%) y estabilizadores de proteínas. Estable a 2-8°C hasta su caducidad.
7. Cromógeno TMB (TMB): Una botella, 15 mL. Listo para usar.
Una mezcla de 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno en tampón de citrato-ácido cítrico (pH 3,5-3,8).
Estable a 2-8°C hasta su caducidad.
8. Control Reactivo: Un vial con tapón Rojo, 200 µL de suero humano (contiene azida de sodio al 0,1% y sulfato de gentamicina al 0,005%). Estable a 2-8°C hasta su caducidad.
9. Calibrador: Un vial con tapón Amarillo, 400 µL de suero humano (contiene azida de sodio al 0,1% y sulfato de gentamicina al 0,005%). Estable a 2-8°C hasta su caducidad.
10. Control Negativo: Un vial con tapón Verde, 200 µL de suero humano (contiene azida de sodio al 0,1% y sulfato de gentamicina al 0,005%). Estable a 2-8°C hasta su caducidad.
11. Solución de Parada: Un botella con tapón Rojo, 15 mL. Listo para usar. Ácido fosfórico 1M. Estable a 2-25°C hasta su caducidad.

Extracción y preparación de la muestra

La sangre obtenida por punción venosa se debe coagular a temperatura ambiente (20-25°C) y centrifugar después según las normas del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Approved Standard - Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture, H3-A5, 2003).

El suero se separará tan pronto como sea posible y se conservará refrigerado (2-8°C) o congelado ($\leq -20^{\circ}\text{C}$) si no se va a analizar en el plazo de dos días. Para el almacenamiento no se recomienda utilizar congeladores con descongelación automática.

No se recomienda usar suero icterico, hemolizado, lipémicos o con crecimiento bacteriano. El CLSI proporciona recomendaciones para almacenar muestras de sangre (Approved Standard - Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18-A3, 2004).

Protocolo del ensayo

Nota: Comprobar que todos los reactivos se han estabilizado a temperatura ambiente (20-25°C) antes de comenzar el ensayo. Si se realiza el ensayo fuera de los intervalos de tiempo y temperatura que se indican, se pueden obtener resultados no válidos. Deberán repetirse todos los ensayos que no estén comprendidos en los tiempos e intervalos de temperatura establecidos.

Predilución del suero

(i) Extraer el número necesario de micropocillos de la bolsa de aluminio e insertarlos en el soporte de tiras. Se necesitan cinco micropocillos para el Control Negativo (N), el Control Reactivo (R) y el Calibrador (CAL) por triplicado. Comprobar que el resto de los micropocillos no utilizados se guardan en la bolsa de aluminio bien sellada. (ii) Con tubos de ensayo o una placa de micro titulación adecuada, diluir el Control Negativo, el Control Reactivo, el Calibrador y las muestras del paciente:

(a) Añadir 1000 μL de Diluyente de Muestra a 10 μL de suero. Mezclar bien.

Como alternativa,

(b) Añadir 90 μL de Diluyente de Muestra a 10 μL de suero.

Tomar 20 μL del suero diluido y agregar 180 μL de

Diluyente de Muestra.

Mezclar bien.

Procedimiento del Elisa

Ver un resumen del método en la figura adjunta.

(a) Antígeno

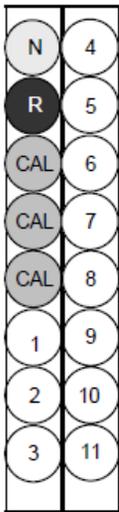
(i) Determinar el número necesario de pocillos para el ensayo.

Diluir el antígeno 1/250 utilizando el Diluyente de Antígeno.

Se recomienda diluir como mínimo 10 μL de antígeno en 2,5 mL de Diluyente de Antígeno. Esta cantidad es suficiente para cinco tiras (40 pocillos). Es necesario un volumen de 0,5 mL de antígeno diluido por tira. Una vez que se ha añadido el antígeno al Diluyente de Antígeno, la solución adquiere un color rojo pálido. Asegúrese de que el antígeno concentrado no utilizado permanece a 2-8°C.

(ii) Extraer el volumen necesario de antígeno diluido y mezclar con un volumen igual de trazador de MAb en un vial limpio de plástico o de vidrio. Mezclar suavemente la solución de antígeno y trazador de MAb y dejar a temperatura ambiente (20-25°C) hasta que se necesite (es necesario incubar durante 60 minutos). Desechar el antígeno diluido no utilizado.

(b) Placa de ensayo



(i) 10 minutos después de mezclar el Trazador de MAb y el antígeno diluido, pipetear 100 μL de muestra del paciente diluido y de los Controles diluidos en sus respectivos micropocillos.

(ii) Cubrir la placa e incubar durante 60 minutos a $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$.

(iii) Lavar seis (6) veces con Tampón de Lavado diluido (consultar el procedimiento de lavado más adelante).

(iv) Mezclar la solución antígeno-trazador MAb antes de realizar la transferencia. Pipetear 100 μL de complejos antígeno-MAb del vial de antígeno a los pocillos apropiados de la placa de ensayo.

(v) Cubrir la placa e incubar durante 60 minutos a $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$.

(vi) Lavar seis (6) veces con Tampón de Lavado diluido (consultar el procedimiento de lavado más adelante).

(vii) Pipetear 100 μL de TMB en cada pocillo.

(viii) Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente (20- 25°C), cronometrando desde la primera adición.

Aparecerá un color azul.

(ix) Pipetear 100 μL de Solución de Parada en todos los pocillos en la misma secuencia y cronometrando igual que cuando se añadió TMB. Mezclar bien. El color azul se volverá amarillo.

(x) Antes de los 30 minutos leer la absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 450 nm con un filtro de referencia de 600-650 nm.

Nota: Si se dispone de un espectrofotómetro de doble longitud de onda, fijar el filtro de referencia entre 600-650 nm. La lectura de los micropocillos a 450 nm sin filtro de referencia puede dar como resultado valores de absorbancia mayores por el ruido de fondo.

Procedimiento de lavado

En el procedimiento ELISA es fundamental realizar un lavado eficaz para eliminar la muestra o los componentes que no han formado complejos.

A. Sistema de lavado automático de las placas

- (1) Aspirar completamente todos los pocillos.
- (2) Llenar todos los pocillos hasta el borde (350 μ L) durante el ciclo de lavado.
- (3) Al terminar los seis (6) lavados, invertir la placa y golpear firmemente sobre papel secante para garantizar que se elimina todo el tampón.
- (4) El mantenimiento de los sistemas de lavado automático de placas debe ser continuo para garantizar un lavado eficaz. Se deben seguir las instrucciones de limpieza del fabricante en todo momento.

B. Lavado manual

- (1) Desechar el contenido de la placa en un contenedor apropiado.
- (2) Llenar los pocillos con Tampón de Lavado utilizando una botella flexible. Evitar formar burbujas con el Tampón de Lavado, lo que reduciría la eficiencia. Eliminar el Tampón de Lavado de los pocillos inmediatamente.
- (3) Volver a llenar los pocillos con Tampón de Lavado y eliminar rápidamente.
- (4) Repetir el paso (3) otras cuatro veces. El lavado con Tampón de Lavado debe repetirse seis (6) veces en total.

(5) Después del último lavado, eliminar el contenido de los pocillos y golpear la placa sobre papel secante para garantizar que se ha eliminado todo el tampón

El ensayo ELISA de captura de anticuerpos IgG contra dengue de Panbio detecta por presunción niveles elevados de anticuerpos IgG contra el virus del dengue en el suero de un paciente. Un resultado positivo (>22 Unidades Panbio) indica una infección secundaria activa. Si se sospecha una infección primaria, este ensayo debería utilizarse junto con el ensayo ELISA de captura de anticuerpos IgM contra dengue (E-DEN01M) de Panbio.

ÍNDICE	UNIDADES PANBIO	RESULTADO
<1,8	<18	Negativo
1,8 – 2,2	18 – 22	Dudoso
>2,2	>22	Positivo

Fuente: www.panbio

2.2.6 Especificidad y Sensibilidad de las pruebas

La sensibilidad estudia la posibilidad de que una prueba resulte positiva, en una persona a quien se ha diagnosticado la enfermedad, es decir la sensibilidad sirve para excluir la enfermedad.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

La especificidad estudia la posibilidad de que la prueba resulte negativa en un paciente a quien no se ha diagnosticado la enfermedad, la especificidad afirma la enfermedad.

Donde:

VP= Verdaderos positivos

VN= Verdaderos negativos

FN= Falsos negativos

2.2.6 Control de calidad

El control de la calidad se podría definir como las técnicas usadas para estandarizar algo. La función del control de calidad existe primordialmente como una organización de servicio, para conocer las especificaciones establecidas por la ingeniería del producto y proporcionar asistencia al departamento de fabricación, para que la producción alcance estas especificaciones. Como tal, la función consiste en la colección y análisis de grandes cantidades de datos que después se presentan a diferentes departamentos para iniciar una acción correctiva adecuada. (Jurna, 2005)

2.3 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS

Anticuerpo: Proteína sintetizada por las células plasmáticas como respuesta a la presencia de determinados antígenos o elementos extraños a la sangre. La infección por VIH provoca la creación de anticuerpos en la sangre por parte del organismo, que son detectables gracias al test ELISA y al Western Blot (los más usuales), y que sirven para determinar el estado serológico y saber si una persona es seropositiva. También se suele representar con la sigla Ac.

Antígeno. Sustancia que el organismo reconoce como extraña (por ejemplo, el VIH) que puede inducir una reacción como la creación de anticuerpos para combatir su presencia. Se representa con la sigla Ag.

Aedes Aegypti: El mosquito de la fiebre amarilla, es un culícido que puede ser portador del virus del dengue y de la fiebre amarilla, así como de otras enfermedades.

Cromatografía: Método de análisis que permite la separación de gases o líquidos de una mezcla por adsorción selectiva, produciendo manchas diferentemente coloreadas en el medio adsorbente; está basado en la diferente velocidad con la que se mueve cada fluido a través de una sustancia porosa.

Dengue: Enfermedad epidémica caracterizada por fiebre, dolores en los miembros y una erupción cutánea, parecida a la escarlatina, seguida de descamación.

Elisa: Es una serie de pruebas sanguíneas utilizadas para diagnosticar la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) de tipo crónica.

Fiebre: Aumento de la temperatura del cuerpo por encima de la normal, que va acompañado por un aumento del ritmo cardíaco y respiratorio, y manifiesta la reacción del organismo frente a alguna enfermedad

Hematófagos: Individuos que se alimentan de sangre. En los mosquitos sólo las hembras pueden alimentarse de sangre.

Hemorrágica: Son un grupo de enfermedades que son causadas por varias familias de virus: Arenavirus, Filoviridae, Bunyaviridae, Flavivirus.

Infección: La invasión del cuerpo por microorganismos que provocan una enfermedad.

Larva de mosquito: Es una forma intermedia entre el huevo y la pupa. Vive en el agua y se mueve mucho.

Microelisa: Es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, como cambio de color o algún otro tipo; en ocasiones, con el fin de reducir los costos del ensayo, nos encontramos con que existe un anticuerpo primario que reconoce al antígeno y que a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario que lleva enlazado la enzima anteriormente mencionada. La aparición de colorantes permite medir indirectamente mediante espectrofotometría el antígeno en la muestra.

Mosquito adulto: Insecto que presenta el cuerpo dividido en tres regiones (cabeza, tórax y abdomen), poseen un par de antenas, dos pares de alas (uno reducido) y tres pares de patas.

Pupa de mosquito: Transición entre el estado de larva y adulto. Ocurren profundas transformaciones que llevan a la formación del adulto y al cambio del hábitat acuático por el terrestre.

Salud pública: La ciencia y el arte de promover la salud, prevenir la enfermedad y prolongar la vida mediante esfuerzos organizados de la sociedad.

Transmisión: Proceso por el cual un parásito (en este caso virus del Dengue y de la Encefalitis de San Luis) es transportado por un mosquito (para estas enfermedades) de un individuo a otro (personas y/o animales).

Vacuna: Son sustancias que contiene patógenos debilitados o muertos pero no provocan enfermedad. Cuando se administra en el cuerpo de un organismo genera anticuerpos que fácilmente matan y reconocen al virus que produce una enfermedad. La próxima vez que el virus infecta a la persona, el organismo ya está preparado para combatirlo.

Virus: Agente infeccioso (microbio) responsable de numerosas enfermedades en todos los seres vivos. Son los causantes de diversas enfermedades, requieren de células vivas para multiplicarse y depender de ellas como parásitos.

2.4 HIPÓTESIS

La eficacia de los métodos Cromatográficos y Elisa permite la detección del dengue en los pacientes con síndrome febril que acuden al Sub Centro N° 1 de la ciudad de Esmeraldas durante el período de Enero a Junio de 2015.

2.5. VARIABLES

2.5.1. Variable independiente

Métodos Inmuno Cromatográficos y Elisa

2.5.2. Variable dependiente

Detección del Dengue

2.5.3 Operacionalización de las variables

VARIABLE INDEPENDIENTE	CONCEPTO	CATEGORÍA	INDICADOR	TÉCNICAS E INSTRUMENTOS
Métodos Inmuno Cromatográficos y Elisa	La cromatografía es un método físico de separación basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra móvil.	Método Físico Separación	Absorción selectiva Velocidad Fija Móvil	TÉCNICA Inmuno Cromatografía y Elisa INSTRUMENTO Manual De Técnicas Panbio para Elisa. Técnica Inmuno Cromatográfica SD BIOLINE Dengue Duo

VARIABLE DEPENDIENTE	CONCEPTO	CATEGORÍA	INDICADOR	TÉCNICA
Detección del Dengue	Es una prueba de laboratorio que se utiliza en ocasiones para evaluar a los pacientes con sospecha de infección viral transmitido por el mosquito Aedes Aegypti	Prueba de laboratorio Infección viral Aedes Aegypti	Micro Elisa Cromatografía DEN- 1 DEN- 2 DEN- 3 DEN- 4 Dengue Fiebre amarilla Chucunguña	TÉCNICA Inmuno Cromatografía y Elisa INSTRUMENTO Manual De Técnicas Panbio para Elisa. Técnica Inmuno Cromatográfica SD BIOLINE Dengue Duo.

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1 MÉTODO CIENTÍFICO

Método Deductivo: Este método observa el fenómeno de lo general a lo particular en este caso se utilizó para analizar los resultados de las pruebas, de Elisa e Inmuno Cromatografía.

Método Inductivo: Este método analiza el problema de lo particular a lo general. En esta investigación se utilizó para analizar las causas de la patología, el vector que transmite el dengue y cuales los efectos en los pacientes.

3.1.1 Tipo de Investigación

Exploratoria: En esta investigación se utilizó para estudiar el dengue desde su etiología hasta sus efectos en el ser humano, buscando establecer la relación entre las técnicas de determinación y el dengue.

Descriptiva: Una vez analizados los procesos fue necesario describir las técnicas y procedimientos a utilizar. En nuestro caso se utilizó para especificar, características y rasgos importantes de la enfermedad del dengue

3.2.2 Diseño de Investigación

De Campo: Porque la investigación se realizó en el lugar en el que ocurrieron los hechos, el Sub Centro de Salud N 1 en Esmeraldas, en el servicio de laboratorio clínico, al realizar las determinaciones de Cromatografía y Elisa.

Bibliográfico: Se hizo uso de documentos, libros, revistas especializadas, documentos electrónicos, página web que ayudaran a desarrollar las variables fundamentales en el proceso investigativo.

3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA

3.2.1. Población

43 pacientes con síndrome febril que acudieron al Sub Centro de Salud N° 1 en Esmeraldas en el período Enero a Junio de 2015.

3.2.2. Muestra

Por ser la población relativamente manejable no fue necesario extraer la muestra, misma que fue de 43 pacientes.

3.3. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Se utilizaron los reportes de laboratorio de las pruebas de Inmuno Cromatografía y Elisa

3.4. TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

Los resultados fueron:

Ordenados

Tabulados

Graficados

Analizados e interpretados

3.5 TÉCNICAS DE PROCEDIMIENTO PARA EL ANÁLISIS DE RESULTADOS

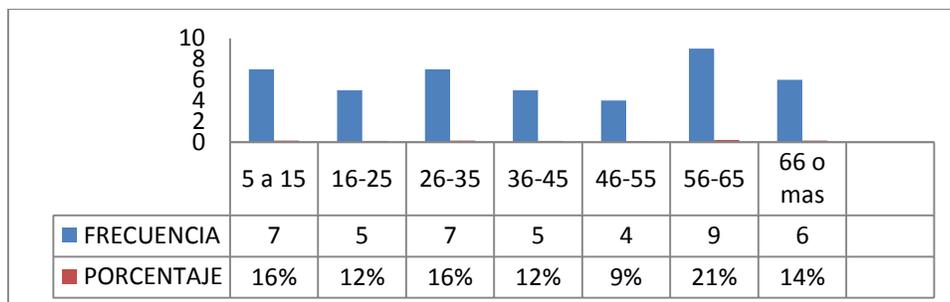
Tabla N°. 3. 1. Pacientes investigados por edades que asisten al Sub Centro N° 1 de la ciudad de Esmeraldas

EDAD	FRECUENCIA	PORCENTAJE
5-15	7	16 %
16-25	5	12 %
26-35	7	16 %
36-45	5	12 %
46-55	4	9 %
56-65	9	21 %
66 o mas	6	14 %
TOTAL	43	100 %

Fuente: Exámenes de laboratorio realizados en el Sub Centro de Salud N.1 Esmeraldas

Elaborado por: Dayanna Brito y Ana Cedeño

Gráfico N°. 3. 1 Pacientes investigados por Edad que asisten al Sub Centro N° 1 de la ciudad de Esmeraldas



Fuente: Exámenes de laboratorio realizados en el Sub Centro de Salud N.1 Esmeraldas

Elaborado por: Dayanna Brito y Ana Cedeño

ANÁLISIS

Referente a la edad de los examinados, 7 pacientes que corresponde al 16 % están en la edad de 5-15 años, 5 pacientes, equivalente al 12 %, en edad de 16-25 años, 7 pacientes, correspondiente 16 % edad de 26-35 años, 5 pacientes que corresponde al 12 % están en sobre los 36-45 años de edad, 4 pacientes que corresponde al 9 % están en sobre los 46-55 años de edad, 9 correspondiente al 21 % están en sobre los 56-65 años de edad y 6 pacientes que corresponde al 14 % estan en 66 o más años de edad.

INTERPRETACIÓN

La mayor cantidad de pacientes examinados está en la edad de 56 a 65 años, seguido de 26 a 35 años.

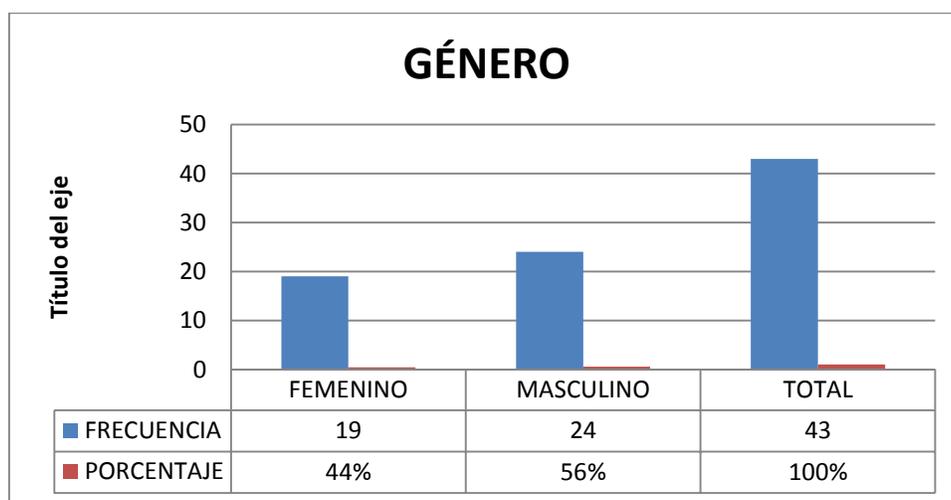
Tabla N°. 3. 2 Determinación de Dengue por género en pacientes que asisten al Sub Centro N° 1 de la ciudad de Esmeraldas

	FRECUENCIA	PORCENTAJE
FEMENINO	19	44 %
MASCULINO	24	56 %
TOTAL	43	100 %

Fuente: Exámenes de laboratorio realizados en el Sub Centro de Salud N.1 Esmeraldas en el Sub

Elaborado por: Dayanna Brito y Ana Cedeño

Gráfico N°. 3. 2 Determinación de Dengue por género en pacientes que asisten al Sub Centro N° 1 de la ciudad de Esmeraldas



Fuente: Exámenes de laboratorio realizados en el Sub Centro de Salud N.1 Esmeraldas

Elaborado por: Dayanna Brito y Ana Cedeño

ANÁLISIS

Mediante las pruebas de laboratorio realizadas, se determina que, 4 pacientes equivalente al 9 %, presentan valores normales, mientras que, 37 pacientes que corresponde al 86 %, se encuentran fuera de los valores normales y 2 como indeterminado que corresponde al 6 %.

INTERPRETACIÓN

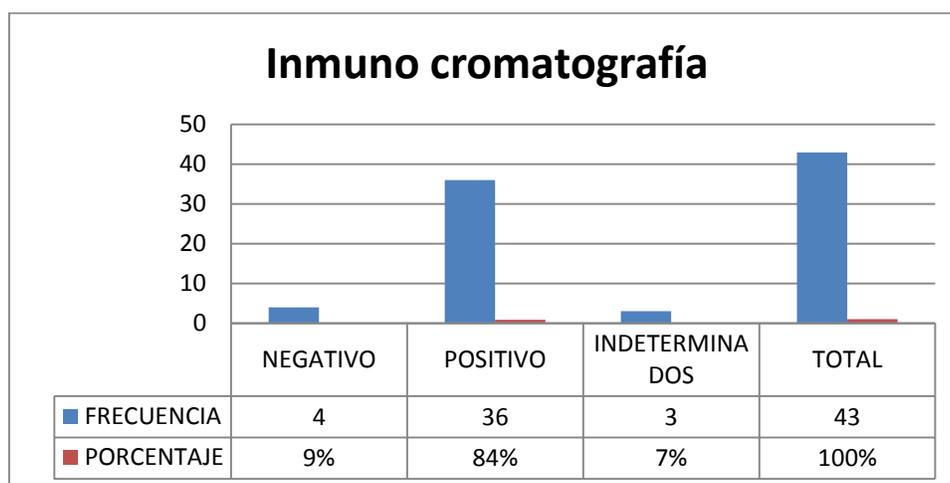
Más de la mitad de los pacientes que se realizaron la determinación por cromatografía, se encuentran fuera de valores normales.

Tabla N°. 3. 3 Determinación de Dengue por Inmuno Cromatografía en pacientes que asisten al Sub Centro N° 1 de la ciudad de Esmeraldas

	FRECUENCIA	PORCENTAJE
NEGATIVO	4	9 %
POSITIVO	36	84 %
INDETERMINADOS	3	7 %
TOTAL	43	100 %

Fuente: Exámenes de laboratorio realizados en el Sub Centro de Salud N.1 Esmeraldas en el Sub
Elaborado por: Dayanna Brito y Ana Cedeño

Gráfico N°. 3. 3 Determinación de Dengue por Inmuno Cromatografía en pacientes que asisten al Sub Centro N° 1 de la ciudad de Esmeraldas



Fuente: Exámenes de laboratorio realizados en el Sub Centro de Salud N.1 Esmeraldas
Elaborado por: Dayanna Brito y Ana Cedeño

ANÁLISIS

Mediante las pruebas de laboratorio realizadas, se determina que, 4 pacientes equivalente al 9 %, presentan valores normales, mientras que, 36 pacientes que corresponde al 84 %, se encuentran fuera de los valores normales y 3 como indeterminado que corresponde al 7 %.

INTERPRETACIÓN

Más de la mitad de los pacientes que se realizaron la determinación por Inmuno Cromatografía, se encuentran fuera de valores normales.

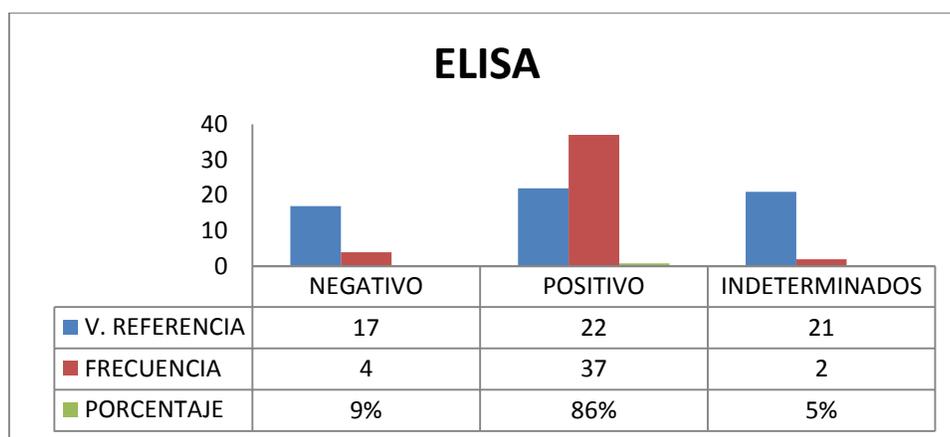
Tabla N°. 3. 2 Determinación de Dengue por Elisa en pacientes que asisten al Sub Centro N° 1 de la ciudad de Esmeraldas

	V. REFERENCIA	FRECUENCIA	PORCENTAJE
NEGATIVO	1-17 U.panbio	4	9 %
POSITIVO	> 22 U.panbio	37	86 %
INDETERMINADOS	18-21 U.panbio	2	5 %
TOTAL		43	100 %

Fuente: Exámenes de laboratorio realizados en el Sub Centro de Salud N.1 Esmeraldas

Elaborado por: Dayanna Brito y Ana Cedeño

Gráfico N°. 3. 4 Determinación de Dengue por Elisa en pacientes que asisten al Sub Centro N° 1 de la ciudad de Esmeraldas



Fuente: Exámenes de laboratorio realizados en el Sub Centro de Salud N.1 Esmeraldas

Elaborado por: Dayanna Brito y Ana Cedeño

ANÁLISIS

Mediante las pruebas de laboratorio realizadas, se determina que, 36 pacientes equivalente al 84 %, presentan valores fuera de rangos normales, mientras que, 4 pacientes que corresponde al 9 %, se encuentran dentro de los valores normales, 3 que corresponde al 7 % como indeterminado.

INTERPRETACIÓN

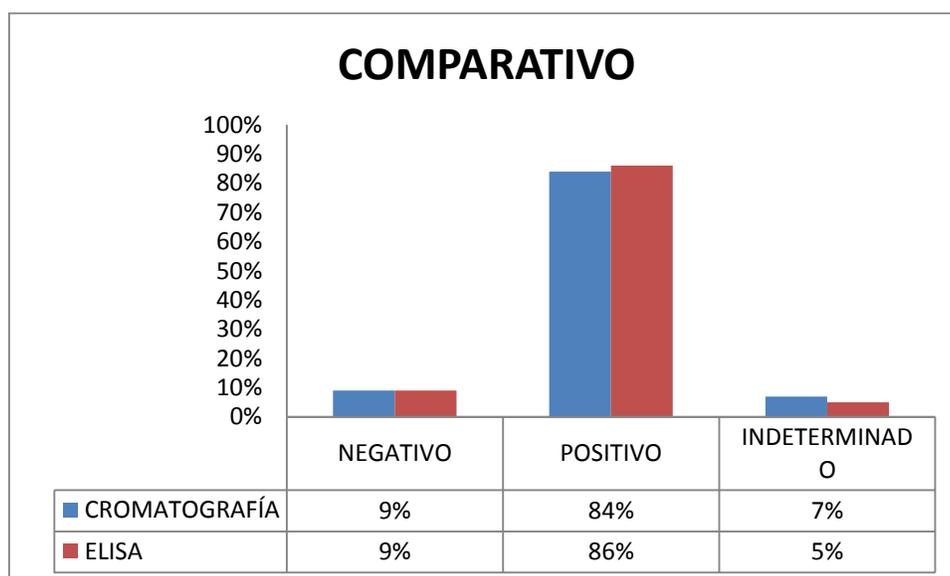
La mayor parte de pacientes que se realizaron la determinación de dengue por Elisa, se encuentran fuera de valores normales. Un pequeño grupo presenta valores dentro de los considerados normales.

Tabla N°. 3. 3 Análisis Comparativo

	NEGATIVO	POSITIVO	INDETERMINADO
INMUNO CROMATOGRAFÍA	9 %	84 %	7 %
ELISA	9 %	86 %	5 %

Fuente: Exámenes de laboratorio realizados en el Sub Centro de Salud N.1 Esmeraldas
Elaborado por: Dayanna Brito y Ana Cedeño

Gráfico N°. 3. 5 Análisis Comparativo



Fuente: Exámenes de laboratorio realizados en el Sub Centro de Salud N.1 Esmeraldas
Elaborado por: Dayanna Brito y Ana Cedeño

ANÁLISIS.

Como se puede evidenciar en el gráfico, el 86 % de pacientes que se realizaron la determinación de dengue por Inmuno Cromatografía, resultaron con valores positivos de los normales, lo cual nos evidencia que la prueba Inmuno Cromatografía es más específico para determinar dengue, que la prueba de Elisa que reporta el 84 %. La técnica de Elisa presenta un falso negativo más que la Inmuno Cromatográfica

Determinación de la sensibilidad de la prueba.

La sensibilidad estudia la posibilidad de que una prueba resulte positiva, en una persona a quien se ha diagnosticado la enfermedad, es decir la sensibilidad sirve para excluir la enfermedad.

Fórmula

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

Sensibilidad para Inmuno Cromatografía

$$S = \frac{36}{36 + 3}$$

S= 92 %

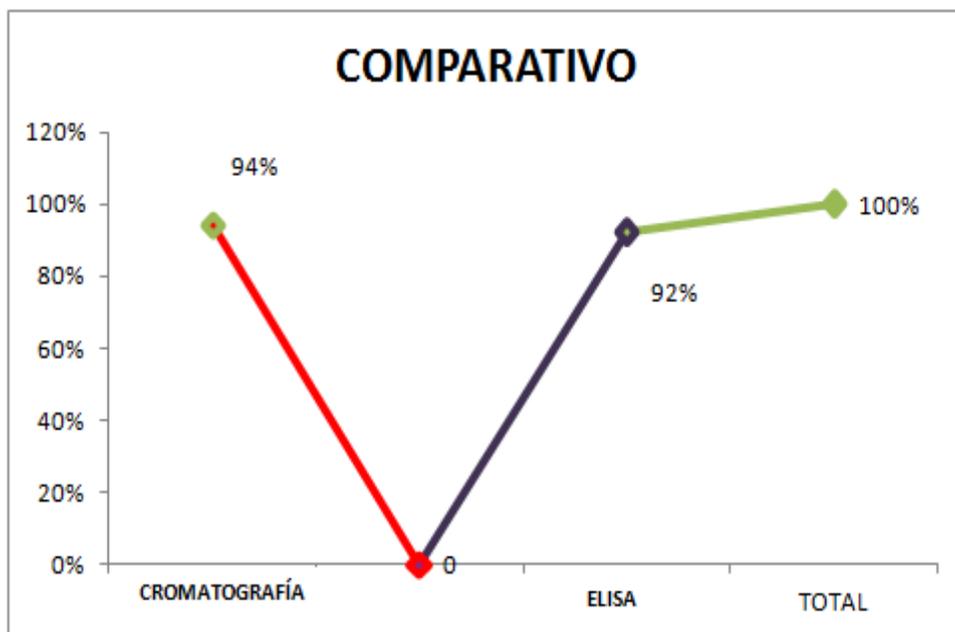
La sensibilidad de la prueba de Inmuno Cromatografía es el 92 %, considerada buena, pero puede presentar falsos negativos por cuanto es cualitativa.

Sensibilidad para Elisa

$$S = \frac{37}{37 + 2}$$

S= 94 %

La sensibilidad de la prueba de Elisa es el 94 %, considerada buena, si toma en cuenta que la sensibilidad aceptable es del 90 al 98 %.



ANÁLISIS

Como se puede evidenciar en el gráfico, la sensibilidad es mayor en la prueba de Elisa en relación a la de Inmuno Cromatografía.

3.6 COMPROBACIÓN DE LA HIPÓTESIS

a) Modelo lógico

Hi= La eficacia de los métodos Inmuno Cromatográficos y Elisa permite la detección del dengue en los pacientes con síndrome febril que acuden al Sub Centro N° 1 de la ciudad de Esmeraldas durante el período de Enero a Junio de 2015.

Ho= La eficacia de los métodos Inmuno Cromatográficos y Elisa no permite la detección del dengue en los pacientes con síndrome febril que acuden al Sub Centro N° 1 de la ciudad de Esmeraldas durante el periodo de Enero a Junio de 2015.

Modelo Matemático

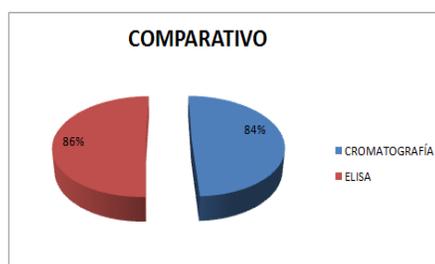
$$H_i: \chi^2_c > \chi^2_t$$

$$H_o: \chi^2_c = \chi^2_t$$

Modelo Estadístico

$$\chi^2_c = \sum \frac{(f_o - f_e)^2}{f_e}$$

	POSITIVOS
CROMATOGRAFÍA	84 %
ELISA	86 %



La hipótesis planteada se comprueba bajo los siguientes argumentos:

Del total de 43 pacientes que fueron analizados en el laboratorio del Sub Centro N° 1 de la ciudad de Esmeraldas, en la determinación de dengue mediante Inmuno Cromatografía el 84 % presenta valores altos, lo cual demuestra la especificidad de las pruebas.

En relación a la determinación de dengue por el método de Elisa, del total de pacientes que fueron analizados en el laboratorio del Sub Centro N° 1 de la ciudad de Esmeraldas, el 86 % presenta valores fuera de lo normal, lo cual demuestra que las dos pruebas deberían realizarse en conjunto.

Con los antecedentes expuestos, al establecer el porcentaje significativo de pacientes con determinación del dengue, la hipótesis planteada se comprueba positivamente.

Por lo tanto se comprueba la hipótesis.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

- Se utilizaron las pruebas de Inmuno Cromatografía y Elisa como screening a los pacientes en estado febril que acudieron al Sub Centro de Salud N° 1 de Esmeraldas, para someterlas a un estudio comparativo a fin de determinar la sensibilidad de cada una de ellas y establecer la eficacia en el diagnóstico de laboratorio para identificar el Dengue.
- La sensibilidad de la pruebas se establece mediante la fórmula que valora la cantidad de valores positivos de cada determinación, frente a los falsos negativos, de esta forma se determina que la prueba de Elisa es más sensible en un 94%, que la Inmuno Cromatografía la cual nos dio un porcentaje de sensibilidad del 92%, para la detección de Dengue.
- Mediante el estadígrafo utilizado en Microsoft Excel, se establece la eficacia de los métodos utilizados, los dos detectan en porcentajes similares la patología, para Inmuno Cromatografía en un 84% y Elisa en un 86%, con lo cual queda demostrada su idoneidad para la determinación de Dengue, por lo tanto podemos decir que ambas pruebas tienen un alto grado de eficacia y deberían usarse en conjunto.

4.2 RECOMENDACIONES

Una vez que se han expuesto las conclusiones se proponen las siguientes recomendaciones:

- Para la detección de Dengue, utilizar dos pruebas distintas mediante un screening de forma que se puedan realizar los análisis comparativos y verificar si los resultados positivos, también lo son en la prueba complementaria, garantizando la calidad del ensayo implementado en el laboratorio.
- Establecer la sensibilidad diagnóstica de la pruebas mediante la fórmula que valora la cantidad de positivos de cada determinación, frente a los falsos negativos, garantizando los resultados que ayudan al diagnóstico médico.
- Utilizar un estadígrafo para graficar la eficacia de los métodos utilizados, en el diagnóstico de Dengue, realizar los controles de calidad provistos en la técnica del reactivo, así como la que implementa cada laboratorio para evitar errores en las etapas, pre, analítica y pos analítica.
- Luego de utilizar las pruebas de screening para la determinación en del Dengue, es recomendable realizar las pruebas confirmatorias como el aislamiento viral, pruebas moleculares.

BIBLIOGRAFÍA

1. Avirutnan, P. (2008). "Dengue virus infection of human endothelial cell.
2. Bartenschlager R, M. S. (2008). Aspectos moleculares de la replicación del virus del dengue. Madrid: Microbiologica.
3. Chiu WW, K. R. (2005). Control del dengue. *Viol.*
4. Clark, D. H. (1985). Técnicas de hamglutinación.
5. Dutra NR, d. P. (2009). Implicaciones de los laboratorios de diagnostico de dengue. *Globo.*
6. Innis, B. L. (1989). An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circu.
7. Jurna, J. (2005). Análisis y planeación de la calidad. México: MacGraw Hill.
8. Kouri, P. (2013). Instituto de Salud. La Habana: Ministerio de Salud Pública.
9. Kurane I, T. T. (2001). Fiebre por dengue hemorrágico. *Revista médica de virología*, 301-311.
10. Mackenzie JS, G. D. (2004). Emergencias por flavivirus causantes de encefalitis. *Medica de virología*, 98-109.
11. Ministerio de Salud Pública. (2012). Boletín epidemiológico del ministerio de salud publica # 43.
12. Ocazonez RE, G. S. (2007). Serotipo patron de infección y dengue. *Salud pública*, 262-274.
13. OMS. (2013).
14. Pierre V, D. M. (1994). Identificación del mosquito flavivirus. *Médica de virología*, 93-104.
15. Recalde, J. (2011). Nuevas formas de pensar. Barcelona: Grao.
16. Vazquez, S. P. (2005). Serological markers during Dengue 3 primary and secondary infections. *Clínica de Virología*, 132-137.
17. Vázquez, S. S. (1998). Detección de IGM contra el virus de Idengue. *Panam salud Pública*, 174.178.

LINCOGRAFÍA

18. Iáñez, E. (2008). *Inmunología General*. Obtenido de https://www.ugr.es/~eianez/inmuno/cap_01.htm
19. Minprotección. (2008). *Medidas para prevenir dengue*. Bogotá: Colombia. Obtenido de <http://www.minproteccionsocial.gov.co/VBeContent/>
20. OMS. (junio de 2009). *programa para la investigación y capacitación en enfermedades tropicales*. Obtenido de dengue, guías para el diagnóstico y tratamiento: <http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2011/>
21. Uribarren, T. (2010). *Dengue, Fiebre Chicungunya y otros arbovirus*. Obtenido de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/virologia/dengue.htm>
22. Valero, N. (2006). *Comparación entre los métodos de inmunocromatografía e inmunoensayo enzimático (ELISA) en el diagnóstico del dengue*. Obtenido de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0075-52222006000100007

ANEXOS

Anexo 1

Evidencia fotográfica



Kit de determinación

Fuente: Laboratorio del Sub Centro de Salud N^o 1 de Esmeraldas

Elaborado por: Dayanna Brito y Ana Cedeño



Tubo contenedor de muestra

Fuente: Laboratorio del Sub Centro de Salud N° 1 de Esmeraldas

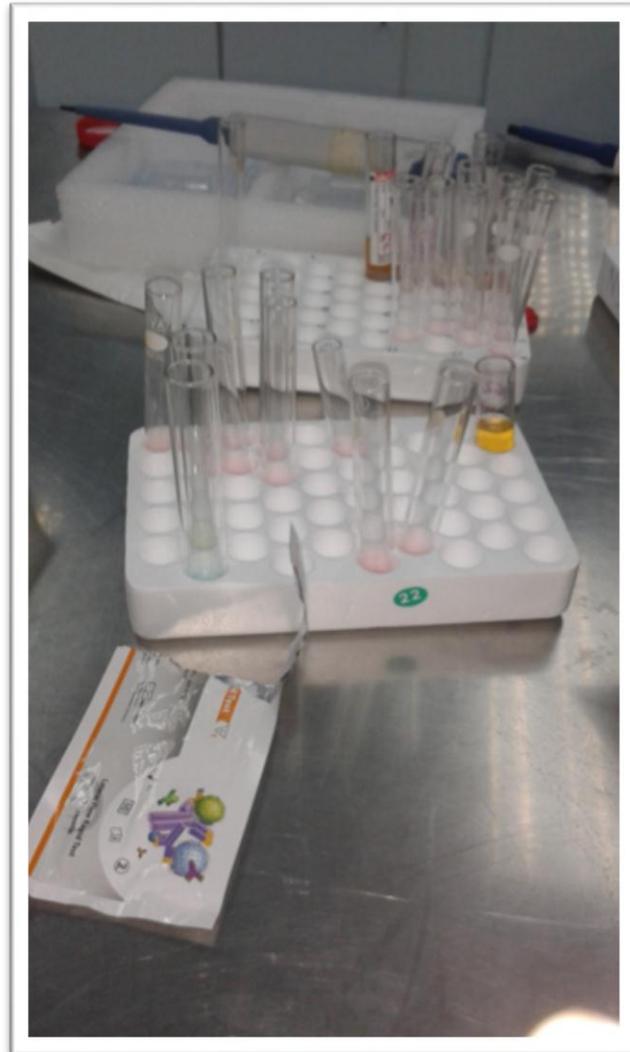
Elaborado por: Dayanna Brito y Ana Cedeño



Preparación de reactivos

Fuente: Laboratorio del Sub Centro de Salud N° 1 de Esmeraldas

Elaborado por: Dayanna Brito y Ana Cedeño



Preparación de las soluciones

Fuente: Laboratorio del Sub Centro de Salud N° 1 de Esmeraldas

Elaborado por: Dayanna Brito y Ana Cedeño



Reacción de color

Fuente: Laboratorio del Sub Centro de Salud N° 1 de Esmeraldas

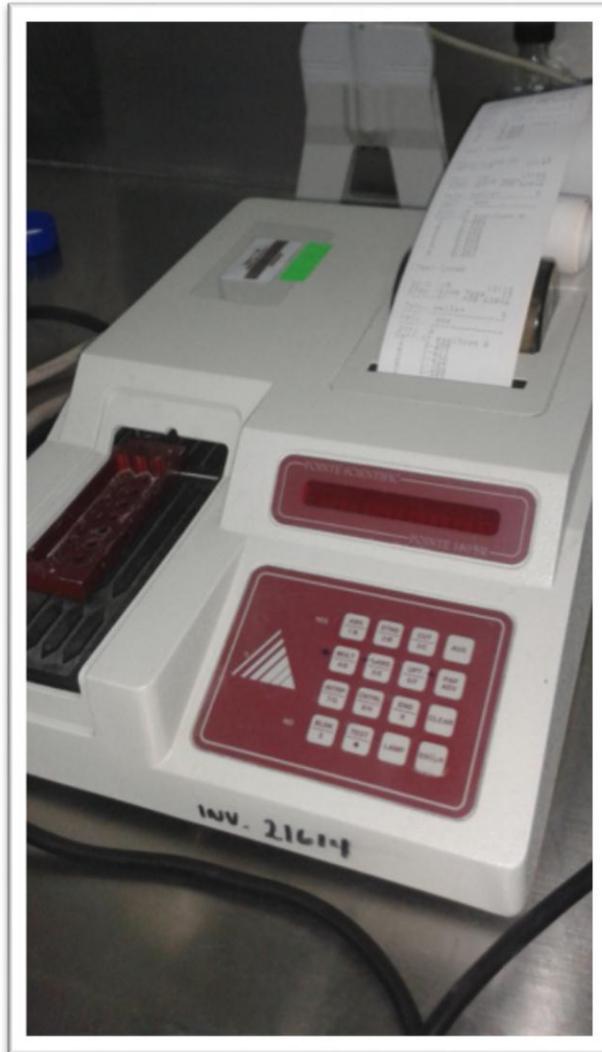
Elaborado por: Dayanna Brito y Ana Cedeño



Microposillos contenedores de los reactivos

Fuente: Laboratorio del Sub Centro de Salud N° 1 de Esmeraldas

Elaborado por: Dayanna Brito y Ana Cedeño



Equipo de determinación

Fuente: Laboratorio del Sub Centro de Salud N° 1 de Esmeraldas

Elaborado por: Dayanna Brito y Ana Cedeño

Anexo 2 Tabla General

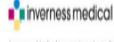
TABLA GENERAL

NUMERO	SEXO	EDAD	ELISA (U Panbio)	CROMATOGRAFÍA
1	Masculino	31	23,57	POSITIVO
2	Masculino	16	32,18	POSITIVO
3	Masculino	60	25,20	POSITIVO
4	Femenino	5	45,32	POSITIVO
5	Masculino	35	27,90	POSITIVO
6	Masculino	41	22,98	POSITIVO
7	Masculino	60	37,39	POSITIVO
8	Masculino	2	27,45	POSITIVO
9	Masculino	14	45,12	POSITIVO
10	Femenino	2	35,34	POSITIVO
11	Masculino	23	27,80	POSITIVO
12	Masculino	34	29,30	POSITIVO
13	Masculino	29	24,98	POSITIVO
14	Femenino	49	27,56	POSITIVO
15	Masculino	37	27,90	POSITIVO
16	Masculino	52	22,98	POSITIVO
17	Masculino	30	37,39	POSITIVO
18	Masculino	14	27,45	POSITIVO
19	Femenino	15	08,12	NEGATIVO
20	Femenino	10	07,50	NEGATIVO
21	Femenino	52	25,60	POSITIVO
22	Masculino	41	27,45	POSITIVO
23	Masculino	21	27,66	POSITIVO
24	Masculino	41	28,43	POSITIVO
25	Masculino	3	19,21	INDETERMINADO
26	Masculino	20	19,43	INDETERMINADO
27	Femenino	31	09,41	INDETERMINADO
28	Femenino	65	06,15	NEGATIVO
29	Femenino	67	45,32	POSITIVO
30	Masculino	45	27,90	POSITIVO
31	Masculino	52	22,98	POSITIVO
32	Masculino	38	37,39	POSITIVO
33	Masculino	6	27,45	POSITIVO

34	Femenino	14	45,12	POSITIVO
35	Masculino	21	35,34	POSITIVO
36	Masculino	29	27,80	POSITIVO
37	Masculino	32	29,30	POSITIVO
38	Femenino	43	22,98	POSITIVO
39	Masculino	32	37,39	POSITIVO
40	Masculino	18	27,45	POSITIVO
41	Femenino	7	45,12	POSITIVO
42	Masculino	5	66,91	POSITIVO
43	Masculino	56	10,40	NEGATIVO

Anexo 3 Insertos

Elisa de captura



Inverness Medical Innovations Australia Pty Ltd
53 Swinerton Mill Rock Rd Swinerton Park, QLD 4073 Australia
T: +61 (0) 7 3863 7100 F: +61 (0) 7 3863 7199
E: equis@invernessmedical.com.au www.panbio.com

Prohibida su venta o distribución en los Estados Unidos de América.

ELISA DE CAPTURA DE ANTICUERPOS IgG CONTRA DENGUE Para la detección de infecciones secundarias por dengue

Nº de catálogo E-DEN02G

USO PRETENDIDO
El ensayo ELISA de captura de anticuerpos IgG contra dengue de Panbio se utiliza para la detección cualitativa por presencia de niveles elevados de anticuerpos IgG contra el virus del dengue (serotipo 1-4) en pacientes con infecciones secundarias. Esta prueba está prevista como una ayuda para el diagnóstico clínico de laboratorio de pacientes que presentan síntomas clínicos consistentes con una infección por virus del dengue y deberá utilizarse junto con el ensayo ELISA de captura de anticuerpos IgM contra dengue y el ensayo Early ELISA para detectar dengue de Panbio, que también detectan infecciones primarias por virus del dengue. Los niveles altos de IgG indicativos de infección secundaria por dengue son detectables mediante el ensayo ELISA de captura de anticuerpos IgG contra dengue de Panbio ya a los 3 días del inicio de la enfermedad. Sin embargo, el periodo ventanoso óptimo de detección para un diagnóstico preciso de infección secundaria es de 6-15 días después del inicio de la enfermedad. Los resultados positivos son presuntivos y se deberán confirmar mediante aislamiento viral, análisis de sueros pareados, detección de antígenos mediante técnicas de inmunohistoquímica o detección de ácido nucleico viral para poder confirmar la infección por virus del dengue.

INTRODUCCIÓN
El virus del dengue es un flavivirus que abunda en zonas tropicales y subtropicales. Más de la mitad de la población mundial vive en regiones con riesgo de una posible transmisión del dengue, haciendo que éste sea la enfermedad por vector arthropodo más importante en seres humanos, en términos de morbilidad y mortalidad. Existen cuatro serotipos de virus del dengue claramente diferenciados pero antigenicamente relacionados que son transmitidos por la hembra de los mosquitos, principalmente el *Aedes aegypti*, el *Aedes albopictus* y el *Aedes polynesiensis*. Las manifestaciones clínicas de la infección por virus del dengue son variadas y oscilan de subclínicas hasta mortales. La enfermedad se evalúa según su gravedad, de la siguiente forma: enfermedad febril inespecífica, fiebre del dengue clásica, fiebre hemorrágica del dengue (DHF) (grados I y II) y síndrome de shock por dengue (DSS) (grados III y IV). La fiebre del dengue clásica se caracteriza por la aparición repentina de fiebre con dos o más de los siguientes síntomas: cefalea, dolor retroorbital, mialgia, artralgia, erupción cutánea, manifestaciones hemorrágicas y leucopenia¹. Es frecuente una evolución febril bífase a igual que inermia y anorexia con pérdida del sentido del gusto o sensación de un sabor amargo. La fiebre hemorrágica del dengue y el síndrome de shock por dengue son complicaciones graves, posiblemente mortales que se asocian a menudo con la infección por un segundo serotipo². La mayoría de los pacientes adultos en los países en los que el dengue es endémico tendrán una infección secundaria por dengue³. La detección de niveles específicamente elevados de anticuerpos IgG contra el virus del dengue mediante un ensayo ELISA es una herramienta de diagnóstico valiosa para la identificación de infecciones secundarias por dengue, en las que las complicaciones que sufren los pacientes son mayores^{4,5}. Tradicionalmente, se ha utilizado la titulación por inhibición de la hemaglutinación (HA) para clasificar las infecciones como primarias o secundarias. La definición actual depende de una prueba en la que se ensayan muestras de suero pareadas a intervalos de tiempo de por lo menos 7 días, conforme a la cual una muestra aguda con un título HA de > 1:1280 se define como proveniente de un paciente con una infección secundaria por flavivirus⁶. El ensayo ELISA para la captura de anticuerpos IgG contra el dengue de Panbio es una prueba alternativa al ensayo HA para realizar el diagnóstico serológico de infecciones secundarias por dengue.

MATERIALES QUE SE SUMINISTRAN

1. Microplacas Recubiertas con Anti-IgG Humana (placa de ensayo) (12x8 pocillos). Listo para usar. Los microplacas no utilizados deben volver a sellar y almacenar con el secante. Estable a 2-8°C hasta su caducidad.
2. Antígenos de Dengue 1-4 (recombinantes): Un vial con tapa transparente, 150 µL (Rojo) de antígenos virales de dengue 1, 2, 3 y 4 concentrados. El antígeno diluido no utilizado deberá desecharse. El antígeno concentrado es estable a 2-8°C hasta su caducidad.
3. Tampon de Lavado (20x): Una botella, 60 mL de solución salina tamponada con fosfato (pH 7.2-7.6) concentrada 20x con Tween 20 y conservante (Proclin™ al 0,1%). Puede cristalizarse a temperaturas bajas. Para corregirlo, inocular a 37°C hasta que esté transparente. Mezclar bien. Diluir una parte del Tampon de Lavado con 19 partes de agua desionada. El tampón diluido se puede almacenar durante una semana (2-25°C).
4. Diluyente de la Muestra: Dos botellas, 50 mL (Rojo). Listo para usar. Solución salina tamponada con Tris (pH 7.2-7.6) con conservantes (Proclin™ al 0,1%) y aditivos. Estable a 2-8°C hasta su caducidad.
5. Diluyente de Antígeno: Una botella, 50 mL (Transparente). Listo para usar. Tampón fosfato con conservantes (Proclin™ al 0,1% y gentalmina al 0,005%). Estable a 2-8°C hasta su caducidad.
6. Trazador de Anticuerpos Monoclonales Conjugados con HRP: Una botella, 7 mL (Verde). Listo para usar. Trazador de anticuerpos monoclonales conjugados con peroxidasa de rábano con conservante (Proclin™ al 0,1%) y estabilizadores de proteínas. Estable a 2-8°C hasta su caducidad.
7. Cromógeno TMB (TMB): Una botella, 15 mL. Listo para usar. Una mezcla de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina y peróxido de hidrógeno en tampón de citrato-acido cítrico (pH 3,5-3,8). Estable a 2-8°C hasta su caducidad.
8. Control Reactivo: Un vial con tapón Rojo, 200 µL de suero humano (contiene ácido de sodio al 0,1% y sulfato de gentalmina al 0,005%). Estable a 2-8°C hasta su caducidad.
9. Calibrador: Un vial con tapón Amarillo, 400 µL de suero humano (contiene ácido de sodio al 0,1% y sulfato de gentalmina al 0,005%). Estable a 2-8°C hasta su caducidad.
10. Control Negativo: Un vial con tapón Verde, 200 µL de suero humano (contiene ácido de sodio al 0,1% y sulfato de gentalmina al 0,005%). Estable a 2-8°C hasta su caducidad.
11. Solución de Fosfato: Un vial con tapón Rojo, 15 mL. Listo para usar. Acido fosfórico 1M. Estable a 2-25°C hasta su caducidad.

Proclin™ MM es una marca registrada de Rohm and Haas Company.

(In - Noivo) Precaución de Seguridad Para el Calibrador y el Control:
La concentración de ácido sódico en estos componentes se clasifica como no viva y está sujeta a las siguientes frases de riesgo (R22, R32) "No vivo por ingestión" y "Libera gases muy tóxicos en contacto con los ácidos".

OTROS MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- (1) Micropipeteadores ajustables, precisos, con puntas de pipeta desechables (de 5-1000 µL de capacidad)
- (2) Agua desionizada
- (3) Sistema de lavado de microplacas
- (4) Lector de microplacas con filtro de 450 nm
- (5) Cronómetro
- (6) Probeta graduada
- (7) Matraz
- (8) Tubos de ensayo o placa de microtitulación para hacer diluciones de sueros

PRECAUCIONES EXCLUSIVAMENTE PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO

- (i) Todo el material de procedencia humana que se utiliza para preparar los controles ha sido analizado para detectar la presencia de anticuerpos frente al virus de la inmunodeficiencia humana y 2 (VIH 1 y 2), la hepatitis C (VHC) y el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, siendo todos ellos negativos. Sin embargo ningún método ofrece una garantía completa y todos los controles y antígenos humanos se deben manipular como material potencialmente infeccioso. Los Centers for Disease Control and Prevention y los National Institutes of Health recomiendan que los reactivos potencialmente infecciosos se manipulen en los laboratorios de contención biológica de nivel 2⁷.
- (ii) Esta prueba se debe realizar en suero exclusivamente. No está establecido su uso con sangre total, plasma u otro tipo de muestra.
- (iii) No utilizar sueros ictericos o lipémicos o que muestren hemolisis o crecimiento bacteriano.
- (iv) No inactivar los sueros con calor.
- (v) Todos los reactivos se deben equilibrar a temperatura ambiente (20-25°C) antes de comenzar el ensayo. El método se ve afectado por las variaciones de temperatura. No extraer los microplacas de la bolsa cerrada hasta que hayan alcanzado la temperatura ambiente (20-25°C).
- (vi) Dispensar los reactivos directamente desde los frascos utilizando puntas de pipeta limpias. De no hacerlo así, los reactivos se pueden contaminar.
- (vii) Los microplacas no utilizados se deben volver a sellar y almacenar con el secante. De no hacerlo así, se pueden producir resultados erróneos.
- (viii) Sistema de suero:
 - (a) Dado que la TMB se puede contaminar con iones metálicos, no permitir que el sistema de sustrato entre en contacto con superficies metálicas.
 - (b) Evitar la exposición prolongada a la luz directa.
 - (c) Algunos detergentes pueden interferir con el rendimiento de la TMB
 - (d) La TMB puede tener un color azul pálido. Esto no afectará la actividad del sustrato o los resultados del ensayo.
- (ix) Algunos componentes del estuche contienen ácido sódico, que puede formar compuestos altamente explosivos de azidas metálicas al reaccionar con las tuberías de plomo y cobre. Cuando deseché este reactivo a través de los desagües, deje correr grandes cantidades de agua para evitar que la azida se despoile en los drenajes.
- (x) La azida sódica inhibe la actividad del conjugado. Se deben utilizar puntas de pipeta limpias para aspirar el conjugado de manera que no se traslade azida sódica desde otros reactivos.

PARA MÁS INFORMACIÓN DE SEGURIDAD CONSULTAR LA HOJA DE DATOS DE SEGURIDAD DEL MATERIAL (MSDS) DISPONIBLE EN INVERNESS MEDICAL INNOVATIONS AUSTRALIA.

EXTRACCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA
La sangre obtenida por punción venosa se debe coagular a temperatura ambiente (20-25°C) y centrifugar después según las normas del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Approved Standard - Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture, H3-A5, 2003). El suero se separará tan pronto como sea posible y se conservará refrigerado (2-8°C) o congelado (-20°C) si no se va a analizar en el plazo de dos días. Para el almacenamiento no se recomienda utilizar congeladores con descongelación automática. No se recomienda usar suero icterico, hemolizado, lipémico o con crecimiento bacteriano. El CLSI proporciona recomendaciones para almacenar muestras de sangre (Approved Standard - Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H16-A3, 2004).

PROTOCOLO DEL ENSAYO
Nota: Comprobar que todos los reactivos se han estabilizado a temperatura ambiente (20-25°C) antes de comenzar el ensayo. Si se realiza el ensayo fuera de los intervalos de tiempo y temperatura que se indican, se pueden obtener resultados no válidos. Deberán repetirse todos los ensayos que no estén comprendidos en los tiempos e intervalos de temperatura establecidos.

Predicción del suero
(i) Extraer el número necesario de microplacas de la bolsa de aluminio e insertarlos en el soporte de tras. Se necesitan cinco microplacas para el Control Negativo (N), el Control

Página 1 de 7 Revisado el 13/11/08 E-DEN02G (E3)

Página 2 de 7 Revisado el 13/11/08 E-DEN02G (E3)

Inmuno Cromatografía

QuickView™ Dengue IgG/IgM Combo Test

Video disponibles en [YouTube](https://www.youtube.com/lumiquick) www.youtube.com/lumiquick

REF 71019

Sólo para Uso de Diagnóstico In Vitro

Prueba Rápida Inmunocromatográfica Para La Detección Simultánea De Anticuerpos IgG / IgM Al Virus Del Dengue En Sangre Total, Suero O Plasma Humano

INTENCION DE USO

QuickView™ Dengue Test es un es una prueba inmuno-cromatográfica rápida para la detección simultánea de anticuerpos IgG e IgM al virus del Dengue en sangre total, suero o plasma humano. La prueba está diseñada para el tamizaje de la infección viral del Dengue y como una ayuda en el diagnóstico diferencial de infecciones en conjunción con otros criterios.

INTRODUCCION

La fiebre del Dengue es una de las enfermedades más importantes del mosquito-borne en el mundo en los términos de morbilidad, mortalidad. La fiebre del virus Dengue (Serotipos 1-4) pertenece al grupo flavivirus y se transmite en la naturaleza mediante picadura-diaria de mosquitos. Acedet. El vector más importante del mosquito es altamente doméstico y especies urbanas *Aedes Aegypti*. La infección primaria del Dengue, conocida también como la Fiebre Dengue, es el tipo más común de enfermedad de Dengue. Está asociado a la fiebre templada y alta, dolor de cabeza, dolor muscular y erupciones de la piel. La infección secundaria es conocida como Fiebre Hemorrágica Dengue (DHF) o síndrome de Shock de Dengue y resultados frecuentes en fiebre alta y en muchos casos con hemorragias eventuales y fallas circulatorias. El índice de fatalidad en pacientes con Síndrome de shock de Dengue puede ser tan alto como un 44%. El dengue se presenta típicamente con una fiebre de un repentino inicio de dolor de cabeza, dolor retrobulbar, dolor de espalda y los miembros (fiebre de hueso-oto) linfadenopatía y erupciones maculopapulares. Los pacientes diagnosticados con Dengue en áreas endémicas generalmente tienen una infección secundaria, mientras que pacientes en áreas no-endémicas son generalmente diagnosticados con infección primaria. La respuesta anticuerpo específico al virus del Dengue permite una serodiagnóstico y diferenciación entre infecciones de Dengue Primario y Secundario. QuickView™ Dengue Test es una nueva generación de prueba inmunocromatográfica empleando el antígeno recombinante viral Dengue para los cuatro serotipos para detectar la respuesta del anticuerpo específico.

PRINCIPIOS DE LA PRUEBA

QuickView™ Dengue Test emplea el principio de inmunocromatografía. Los anticuerpos ratón anti-humano IgM y humano IgG son inmovilizados en la membrana de nitrocelulosa respectivamente, como dos líneas de prueba individuales (Línea IgM Línea IgG) en la ventana de prueba del dispositivo. La línea IgG en la ventana de prueba muy cercana a la ventana de muestra y seguida de la línea IgM. Como la muestra de prueba fluye a través de la membrana dentro del dispositivo de prueba El Dengue coloreado específico conjugado recombinante oro coloidal se compleja con los anticuerpos específicos (IgM y/o IgG) del virus del Dengue si está presente en la muestra. Este complejo se mueve más en la membrana hacia la región de prueba donde es capturado por los anticuerpos humanos IgM e IgG revestidos en la membrana, conduciendo a la formación de una banda coloreada que indica el resultado positivo. La ausencia de esta banda coloreada en la ventana de prueba indica un resultado negativo. Una línea de control incorporada siempre aparecerá en la ventana de prueba cuando la prueba se ha realizado correctamente a pesar de la presencia o ausencia de los anticuerpos del Virus del Dengue en el espécimen.

REACTIVOS Y MATERIAL SUMINISTRADO

Cada kit contiene:

1. QuickView™ Dengue Test Card en un sachet de aluminio
2. Buffer de muestra
3. Instrucciones de uso

MATERIALES NO SUMINISTRADOS

1. Contenedor para colección de espécimen
2. Pipeta de 1-20ul
3. Timer o reloj

ALMACENAJE Y ESTABILIDAD

Los sachets sellados en el kit de pruebas deben ser almacenados entre 4-30°C para la duración del tiempo de caducidad como se indica en el sachet.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

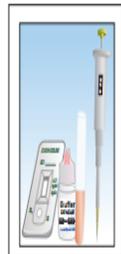
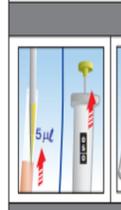
1. Para uso de diagnóstico *In Vitro* solamente
2. Para uso de diagnóstico *Profesional* solamente
3. Leer las instrucciones con cuidado antes de efectuar la prueba

4. Este producto no contiene ningún material de procedencia humana
5. No usar el producto luego de la fecha de expiración
6. Manjar todos los especímenes como potencialmente infecciosos.
7. Seguir los estándares de procedimientos de laboratorio y guías de bioseguridad para el manejo y desecho de material potencialmente infeccioso. Cuando el procedimiento de la prueba se complete desear los especímenes luego de auto clavado a 121°C por 20 min. Alternativamente, pueden ser tratados con hipoclorito de sodio al 0.5% por 1-2 horas antes de su desecho.
8. No pipetear los reactivos con la boca y no fumar o comer mientras se realiza la prueba.
9. Usar guantes durante todo el procedimiento de la prueba.

COLECCION DEL ESPECIMEN Y PREPARACION

1. No requiere una preparación especial previa del paciente antes de tomarle la muestra.
2. De preferencia Suero/Plasma fresco. El Suero/Plasma debe ser almacenado 2°-8°C hasta por 3 días en caso de demorar la prueba. Para almacenajes prolongados congelar el espécimen a -20°C por 3 meses o -70°C para periodos más largos.
3. La prueba trabaja mejor con muestras frescas de sangre entera. Si las pruebas no se pueden ejecutarse de inmediato, la sangre entera recolectada con un anticoagulante apropiado con el EDTA o Heparina u Oxalato debe ser almacenado de 2°-8°C hasta por 3 días. Las muestras de sangre no deben ser congeladas.
4. Debe evitarse la repetición de congelamientos y descongelamientos del espécimen.
5. No usar especímenes hemolizados, coagulados, contaminados, lipémicos y viscosos/turbios.
6. Los especímenes conteniendo partículas deben ser centrifugados y usar para la prueba solamente el sobrenadante claro
7. Debe evitarse la inactivación térmica de la muestra
8. Los envíos de muestra deben cumplir con las normas locales de transportes de agentes etiológicos.

PROCEDIMIENTO

	<p>1</p> <p>Llevar los componentes a temperatura ambiente antes de su uso</p>
	<p>2</p> <p>Abrir el sachet y retirar el cassette</p> <p>Una vez abierto, el cassette debe ser usado de inmediato</p>
	<p>3</p> <p>Rotular el cassette de prueba con el nombre del paciente</p>
	<p>4</p> <p>Aplicar 5ul de suero, plasma o sangre total humano al área "S" indicado por la marca de la flecha</p>
	<p>5</p> <p>Adicionar 2 gotas de buffer de muestra al pozo marcado con "S"</p>
	<p>6</p> <p>Al culminar lo 20 minutos leer los resultados. Una muestra positiva fuerte puede mostrar resultados mas prontamente.</p> <p><i>Nota: Los resultados luego de los 20 minutos pueden no ser seguros</i></p>